DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.16.005
第25卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 16
2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

文章编号:1000-5404(2003)16-1411-04

论著

用PKC抑制剂Rottlerin治疗小鼠实验性哮喘的研究

宋建勇[1],任渝祥[1],林 辉[1],张晓民[1],宋建勋[2] (第三军医大学:[1]预防医学系流行病学教研室;[2]基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究蛋白激酶PKC抑制剂Rottlerin在防治小鼠实验性哮喘中的作用。方法 OVA蛋白诱导BALB/c小鼠建立实验性气道哮喘模型。腹腔注射给予PKC抑制剂Rottlerin与PBS,比较肺抗性及气道反应,肺组织学和Th_2细胞因子产生的差异。结果 腹腔注射Rottlerin(0.3 mg/kg)可抑制肺支气管AHR及嗜酸性粒细胞浸润,阻止气道组织嗜酸粒细胞炎症,Goblet细胞增生及粘液产生,明显减弱血清中IgE及Th_2细胞因子的产生。结论 腹腔注射PKC抑制剂Rottlerin可抑制小鼠实验性哮喘。

关键词:哮喘;PKC抑制剂;变态反应;炎症;细胞因子
中图法分类号:R392.11;R562.2+5 文献标识码:A

Potential in for PKC inhibitor Rottlerin in murine experimental model of asthma

SONG Jian-yong, REN Yu-xiang, LIN Hui, ZHANG Xiao-min, SONG Jian-xun (Department of Epidemiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the potential role of PKC inhibitor Rottlerin in the treatment of asthma. **Methods** Balb/c mice were sensitized and challenged with ovalbumin (OVA) protein to construct murine experimental model of asthma. Then the mice were treated by means of injection of Rottlerin or phosphate-buffered saline (PBS) into the abdominal cavity. Changes of the total serum IgE, pulmonary eosinophils, cytokines and pulmonary inflammation were investigated. **Results** Injection of Rottlerin at the dose 0.3 mg/kg into the murine abdominal cavity could inhibit the infiltration of pulmonary eosinophils and pulmonary inflammation and significantly decrease the production of total serum IgE and Th_2 cytokines as well. **Conclusion** Rottlerin can inhibit murine experimental asthma.

Key words: asthma; PKC inhibitor; allergy; inflammation; cytokine

哮喘(Asthma)在过去的20多年中已逐渐成为一种常见的慢性病,尤其是西方工业发达国家已成为一种多发性流行病性疾病。哮喘被归结为气道高敏(Airway hyperreactivity, AHR),定义来自肺支气管收缩,粘液大量产生及慢性嗜酸性粒细胞浸润所引起的严重气道阻塞。AHR及粘液过量产生被认为是哮喘的典型症状[1~3]。蛋白激酶C(Proterin kinase C, PKC)是机体内正常存在的一种应激蛋白,在机体正常的信号传导,尤其是质膜动态调节中起重要作用。PKC活化是机体细胞及链反应(Cascade)早期事件,包括分泌、基因表达、增殖及肌肉收缩[4,5]。Rottlerin又名Mallotoxm,是从Mallotus philippinensis植物中提取的一种选择性抑制PKCη和PKCθ的PKC抑制剂(分子质量,516.5),但对PKCα,PKCβ及PKCγ亦有抑制作用。Rottlerin能够降低血管紧缩素II(Angiotensin II)及去甲肾上腺素(Norepinephrine, NE)所引起的肺血管收缩反应,局部处理可抑制药物引起的耳部水肿,但亦可抑制通过δ1受体(δ1-opioid receptor)刺激所引起的心脏保护反应[6,7]。

激活PKC在机体免疫细胞活化中起重要作用,T细胞共刺激信号通路(CD28, CD40, OX40, 4-1BB等)亦通过活化PKC促进T细胞产生细胞因子及增值[8]。本研究利用Rottlerin特异性抑制PKC活性,从而抑制T细胞完全活化的特点,探讨治疗小鼠实验性哮喘的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 12只BALB/c小鼠,6~8周,雌雄各半,本校实验动物中心提供。

1.1.2 药物 OVA鸡卵白蛋白(Chicken egg albumin),β-methacholine及氢氧化铝(Allumium hydroxide)购自Sigma。Rott-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30201812)
作者简介:宋建勇(1964-),男,山东省肥城县人,高级实验师,主要从事流行病学方面的研究,发表论文15篇。电话:(023)68752286
通信作者:宋建勋,电话:(023)68752236
收稿日期:2002-12-31;修回日期:2003-06-07

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

lerin 购自 Biochem。

1.1.3 抗体 抗鼠 IL-4、IL-5、IL-9、IFN-γ、IgE 及生物素或 HRP 连接的抗体购自 BD PharMingen。

1.1.4 仪器 体积记录仪(Whole-body Plethysmography)为 Buxco Technologies 公司之产品。

1.2 方法

1.2.1 鼠实验性气道哮喘模型建立 12 只 BALB/c 小鼠分为3组,每组4只。致敏组小鼠予以腹腔注射 0.2 ml PBS 含吸附于 2 mg 氢氧化铝的 20 μg OVA 蛋白。非致敏组小鼠则注射 PBS。25 d 后,所有小鼠在树脂玻璃盒中通过喷雾器给予 OVA 蛋白(5 mg/ml,在 15 ml PBS 中)30 min,每天一次连续 4 d。小鼠肺部变态性炎症检测在最后一次气道暴露后 18~24 h。致敏小鼠分为 2 组,即 Rottlerin 治疗组及对照组。Rottlerin 治疗组小鼠在气道给予 OVA 之前 30 min,腹腔注射含 Rottlerin 0.3 mg/kg 的 PBS,对照组仅给予 PBS。

1.2.2 肺抗性及气道反应检测 AHR 检测在 OVA 最后一次气道暴露后的 1~3 h,方法参照 Jember 等[9]。通过体积记录仪记录单个小鼠对吸入的 β-methacholine (Mch, 1.25~10 mg/ml)的呼吸曲线,AHR 由 Penh 指数评估,即 Penh 水平高于基线的平均百分变化值。

1.2.3 肺组织学观察 OVA 最后一次气道暴露 1 d 后,用 1 ml PBS 含 2% BSA 进行肺支气管灌注(Bronchoalveolar lavage, BAL)回收灌洗液(BAL fluid, BALF),于 400× g 离心分离 BALF 细胞。BALF 上清用于下面的细胞因子检测。总 BAL 细胞数用台盼蓝排除法计数;瑞氏-吉木沙(Wright-Giema)染色计数 BAL 中各白细胞亚类数量(嗜酸性粒细胞,嗜中性粒细胞,淋巴细胞及单核细胞)。5 μm 常规肺组织切片用 HE 染色鉴定炎性浸润,用 PAS (Periodic acid Schiff) 染色检测粘液产量。

1.2.4 细胞因子检测 OVA 最后一次气道暴露小鼠 24 h 后,夹心 ELISA(Sandwich ELISA)法检测 BALF 中 IL-4、IL-5、IFN-γ 等细胞因子量。

1.2.5 总血清及 OVA 特异性 IgE 检测 OVA 最后一次气道暴露后的 24 h,小鼠血清总 IgE 水平用夹心 ELISA 方法检测。OVA 特异性 IgE(OVA-IgE 免疫复合物)用标准的 ELISA 法检测。先用 OVA 包被 ELISA 板,随后及次加入测试血清及抗 IgE 二级抗体。

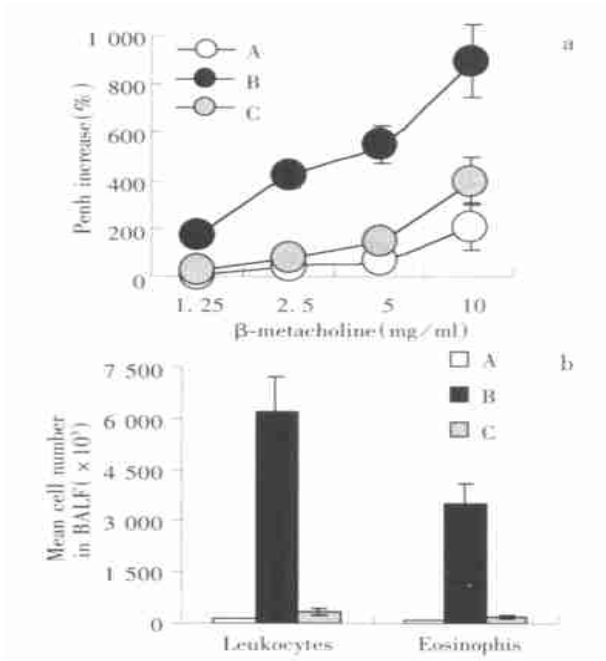
2 结果

2.1 鼠实验性气道变应原性哮喘

BALB/c 小鼠接受 OVA 致敏,出现明显气道高敏(AHR),Penh 指数非常明显地随β-Methacholine 浓度增高,而非致敏小鼠则相对较低,甚至对低浓度 β-Methacholine 似无反应,见图 1a)。肺组织切片显示,致敏组小鼠肺部嗜酸性粒细胞浸润,且 BALF 总细胞数量明显增高,产生大量粘液,而非致敏组则无炎症及细胞灌注,见图 1b。致敏组小鼠 BALF 中 Th_2 细胞因子(IL-4, IL-5, IL-9, IL-13)分泌量明显高于非致敏组,血清中 OVA 特异性 IgE 抗体明显增高。

2.2 Rottlerin 抑制 AHR 及嗜酸性粒细胞浸润

接受 Rottlerin 处理的 OVA 致敏小鼠明显降低 AHR,见图 1a。OVA 致敏后第 4 天小鼠 BALF 中含较少的总白细胞数及嗜酸性粒细胞,见图 1b。



A: Alum+PBS; B: Alum-OVA+PBS; C: Alum-OVA+Rottlerin; a: Measurement of AHR. Results are the mean percent change in Penlevels above baseline after exposure to increasing concentration of inhaled β-methacholine. b: Total leukocyte numbers and numbers and numbers of eosinophils in BALF after exposure to aerosolized OVA

图 1 **Rottlerin 抑制 OVA 致敏小鼠引起的变应原性 AHR 和气道炎症**

Fig 1 Rottlerin suppresses the mice development of AHR feature and airway inflmmation of asthma after OVA sensitization and challenge

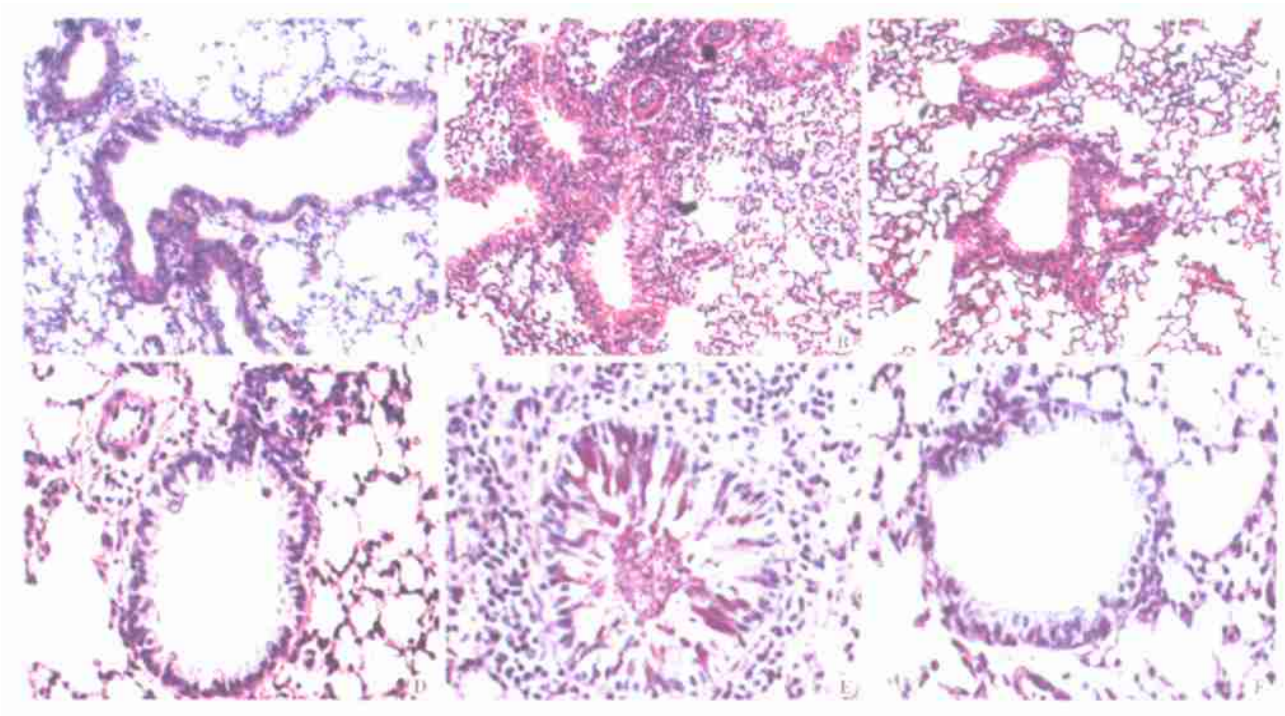
2.3 Rottlerin 阻止发展气道组织炎性浸润,Goblet 细胞增生及粘液产生

HE 染色显示,未经 Rottlerin 处理的致敏小鼠肺切片中出现大量嗜酸粒细胞,单核细胞等炎性浸润细胞及引起分泌粘液的支气管上皮细胞增生,而用 Rottlerin 处理的实验组小鼠的肺上皮细胞正常,仅在支气管和管壁中含少量细胞,见图 2A, B, C。肺浸润程度,以+1到+5表示,+5代表大多数气管和支气管浸润(>3个细胞深度),+1为仅含少量浸润灶(Inflammatory foci)。PAS 染色显示,未处理的致敏小鼠肺气道中出现大量粘液及产生粘液的 PAS 阳性细胞,而 Rottlerin 实验组致敏小鼠则明显降低 PAS 阳性细胞数量,见图 2D, E, F。

2.4 Rottlerin 明显减弱 IgE Th_2 细胞因子的产生

对照 OVA 致敏小鼠 BAL Th_2 细胞因子量及血清中 Th_2 相关的抗体 IgE 明显增高,而经 Rottlerin 处理的致敏小鼠可以明显减弱血清中 IgE 及 BAL Th_2 细胞因子量的增高。用 Rottlerin 处理小鼠之 BALF 中 IL-4、IL-5、IL-9 和 IL-13 等 Th_2 细胞因子几乎被完全抑制;IFN-γ 保持非常低的表达量,说明注射 Rottlerin 的T细胞并没有转换为 Th_2 反应。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



A ~C: HE staining (×200) for quantitation of inflammatory infiltration. D ~F: PAS staining (× 200) for highlight the mucus-secreting cells

图 2　**Rottlerin** 阻止发展肺组织炎性浸润, **Goblet** 细胞增生及粘液产生

Fig 2　Rottlerin inhibits lung infiltration, goblet cell hyperplasia, and mucus production

3　讨论

哮喘作为一种多因素诱导的疾病, 虽然表现为肺部慢性炎症, 但诱导机制趋向于认为是由于气道变应原所引起的一种免疫紊乱所造成的免疫疾病。Th_2 细胞因子的偏向性诱导是引起哮喘的主要原因。患者受到变异原(Allergen)入侵或病原体感染, 引起 Th_2 偏向性免疫应答(Th_2-biased immune responses), 包括大量产生 Th_2 细胞因子: IL-4, IL-5, IL-9 和 IL-13, 引起呼吸道炎症, 气道嗜酸性粒细胞增加, 粘液超高分泌及 AHR[9]。

已有的实验研究显示, Th_2 细胞因子中 IL-4、IL-5、IL-9 和 IL-13 在哮喘发病中起主要作用。用抗体中和或基因敲除 IL-4 或 IL-5 可抑制气道哮喘的发生, 而注射重组 IL-13 可增加小鼠感染哮喘的致敏性。IL-4 和 IL-5 亦可控制肺嗜酸性细胞浸润级 IgE 的产生, IL-13 和 IL-9 则控制粘液产生及 AHR[10]。

虽然肥大细胞和嗜酸性粒细胞可以产生 Th_2 细胞因子, 可能在哮喘炎症反应中起作用, 但大量的临床及实验研究显示引起哮喘发病的始动原是 T 细胞, 尤其是 CD4 细胞亚类。清除 CD4 细胞的小鼠可阻止 AHR 及嗜酸性粒细胞浸润, 及过继性转移的 Th_2 克隆或原代 CD4 T 细胞分泌 IL-4、IL-5 和 IL-13[10~12]。因此, 适当控制 T 细胞的激活可以控制哮喘的发生。

通过控制抗原识别及通过 T 细胞受体(TCR)的信号传递可阻止 T 细胞的激活。现有的控制 T 细胞激活的方法有几种, 一种是封闭 T 细胞的共刺激分子, 以抑制 T 细胞的完全激活及功能, 优点是毒副作用小。已有研究证明, 封闭 CD28/B7 信号在鼠哮喘模型中可减少 Th_2 细胞因子 IgE 产出, AHR 和嗜酸性粒细胞浸润。封闭 CD40/CD40L 信号也可有效抑制哮喘的产生[11, 12]。最新研究显示, 肺支气管抗原特异性调节 T 细胞(TR)可以抑制变应原诱导的气道高敏, 而依赖 ICOS-ICOSL 共刺激信号可激活及产生 TR 细胞。因此, 通过增强 ICOS-ICOSL 信号, 以增加 TR 细胞数量, 亦可抑制哮喘的发生。另外一种控制 T 细胞激活的方法是使用化学抑制剂封闭 T 细胞信号传导来控制哮喘的发生, 如 Corticosteroids、Cyclosponi A、FK506 和 Rapamycin 等, 都已取得一定效果, 但毒副作用偏大。PKC 在 T 细胞信号传导及细胞因子产生中起重要作用。PKC 异形体家族(PKC isoform superfamily)含三群蛋白: 经典 PKC 为 Ca^{2+} 依赖性, 通过其半胱氨酸富含的 C1 结构域被磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidylserine, PS), 甘油二酯 (Diacylglycerol, DAG) 及佛波酯 (Phorbol esters, TPA 或 PMA)所激活, 包括 PKCα, PKCβ, PKCγ; 新型 PKC (Novel)为 Ca^{2+} 非依赖型, 但仍受 PS, DAG 及 TPA 的调控,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

包括 PKCδ、PKCε、PKCη 和 PKCθ；非标准型 PKC（Atypical）为 Ca^{2+} 非依赖型，亦不受 PS、DAG 及 TPA 的调控选择性抑制，包括 PKCξ 及 PKCλ。三群 PKC 都含有一个假底物（Pseudo-substrate）或称之为自动抑制区（Auto-inhibitory domain），它能与 PKC 催化区的底物结合位点结合，从而在缺乏激活剂的情况下阻止 PKC 激活。PKC 激活受 3 个不同位点的磷酸化作用的控制。它们是Thy 500，位于活化环中，Thy 641 为自动磷酸化位点，以及位于 3′-C 末端的 Ser 600 亲水性位点。适量 Rottlerin 可以选择性抑制 T 细胞 PKCη 和 PKCθ 的激活，从而控制机体的免疫反应。

本研究策略是利用第 2 条途径来防治哮喘，目的是试图降低化学药物的毒副作用，尽可能只抑制 Th_2 细胞的激活以抑制哮喘。从实验结果看，Rottlerin 有望在防治哮喘中起作用。

参考文献：

[1] Sandford A, Pare P. Homing in on the asthma gene[J]. Lancet, 2002, 360(9331): 422—423.

[2] Pernis A B, Rothman P B. JAK-STAT signaling in asthma[J]. J Clin Invest, 2002, 109(10): 1279—1283.

[3] Lee S Y, Lee Y H, Shin C, *et al*. Association of asthma severity and bronchial hyperresponsiveness with a polymorphism in the cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 gene[J]. Chest, 2002, 122 (1): 171—176.

[5] San-Antonio B, Iniguez M A, Fresno M. Protein kinase Czeta phosphorylates nuclear factor of activated T cells and regulates its transactivating activity[J]. J Biol Chem, 2002, 277(30): 27073—27080.

[6] Kayali A G, Austin D A, Webster N J. Rottlerin inhibits insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes by uncoupling mitochondrial oxidative phosphorylation[J]. Endocrinology, 2002, 143(10): 3884—3896.

[7] Chen J H, Huang C H, Lin L Y. Rottlerin stimulates metallothionein gene expression but inhibits metal transport in Chinese hamster ovary cells[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2001, 177(3): 256—263.

[8] Huang J, Lo P F, Zal T, *et al*. CD28 plays a critical role in the segregation of PKC theta within the immunologic synapse[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(14): 9369—9373.

[9] Jember A G, Zuberi R, Liu F T, *et al*. Development of allergic inflammation in a murine model of asthma is dependent on the costimulatory receptor OX40[J]. J Exp Med, 2001, 193(3): 387—392.

[10] Pahl A, Zhang M, Kuss H, *et al*. Regulation of IL-13 synthesis in human lymphocytes: implications for asthma therapy[J]. Br J Pharmacol, 2002, 135(8): 1915—1926.

[11] Arestides R S, He H, Westlake R M, *et al*. Costimulatory molecule OX40L is critical for both Th1 and Th_2 responses in allergic inflammation [J]. Eur J Immunol, 2002, 32(10): 2874—2880.

[12] Dong C, Temann U A, Flavell R A. Cutting edge: critical role of inducible costimulator in germinal center reactions[J]. J Immunol, 2001, 166(6): 3659—3662.

[13] Akbari O, Freeman G J, Meyer E H, *et al*. Antigen-specific regulatory T cells develop *via* the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity[J]. Nat Med, 2002, 8(9): 1024—1032.

[14] Krappmann D, Patke A, Heissmeyer V, *et al*. B-cell receptor and phorbol ester-induced NF-κB and c-Jun N-terminal kinase activation in B cells requires novel protein kinase C's[J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(19): 6640—6650.

[15] Kontny E, Kurowska M, Szczepanska K, *et al*. Rottlerin, a PKC isozyme-selective inhibitor, affects signaling events and cytokine production in human monocytes[J]. J Leukoc Biol, 2000, 67(2): 249—258.

（编辑 薛国文）

（上接 1410 页）

④打开包埋盒盖时应注意是否有组织粘附在上面。如有应及时取下放入包埋模内，以防组织丢失。⑤包埋时要注意组织观察的内容选择包埋方向，不清楚的要问取材的医生[1]。⑥包埋整块大组织时宜先将组织放入包埋模，再放上包埋盒，最后倒入石蜡；包埋碎小组织则宜先将石蜡倒入包埋模且倒满，再用加热的镊子将组织放入包埋模内，最后放上包埋盒。此时应注意避免蜡块中存有气泡。⑦包埋时最好将包埋盒外底面朝下，石蜡的液面应适当高出包埋盒内底面少许。⑧包埋完成后立即将包埋模放在冰面上降温，不可放入水中降温。在蜡块未完全冷却前不可将蜡块放入冰箱。⑨包埋时应注意保护好写在包埋盒上的病理号。

2 讨论

包埋时的石蜡温度较高，有利于组织与石蜡的结合，在包埋碎小组织时包埋模底部不会立即凝固，保证了组织在同一平面上。整块较大组织先放入包埋模内能使组织充分暴露，切片时可减少修片时间。包埋模放在冰面上降温可减少高温石蜡对组界抗原性的影响；自下而上的冷却防止了包埋盒与石蜡间产生空心，从而使其结合更牢固，石蜡液面适当高出包埋盒的内底面，也是防止石蜡块与包埋盒分离而无法制片。包埋时宜将包埋盒的外底面放在下面，这样可节省 50％左右的石蜡。包埋盒上的病理号用 HB 铅笔写重些，且一定要规范。

一次性塑料包埋盒在包埋内窥镜等小组织及肝、肾穿刺组织时更显其优越性。由于包埋模被加热，石蜡温度相对较高，石蜡在包埋模内短时间不会凝固，这样将小组织放入时能使其在同一平面上，有利于将组织切全[2]。

另外一次性塑料包埋盒对取材有了更高的要求。它保证了组织间有了充分的间隔而利于脱水。由于在包埋盒上书写病理号，省去了包埋后贴标签这一步，节省了时间。但在归档时最好还是再将纸打的病理号码贴在蜡块上，以防以后出错。但塑料包埋盒也存在一定的不足，比如包埋盒的使用增加了成本；由于包埋盒占用了一定的空间，所以脱水筐所能容纳的组织块减少了，当有大量的标本时就有了一定的限制。

关键词：一次性塑料包埋盒；石蜡组织包埋
中图法分类号：R361.+2 文献标识码：B

参考文献：

[1] 周 导. 常规病理制片组织包埋的注意点[J]. 诊断病理学杂志, 1999, 6(2): 165.

[2] 苏 菁. 胃粘膜活检组织的简易包埋法[J]. 诊断病理学杂志, 1998, 5(3): 167.

（编辑 王 红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net