DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.05.006


# 哮喘豚鼠肺组织嗜酸性粒细胞 Fas表达及药物的影响*

李志奎** 王长征 钱桂生 (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所) 重庆, 400037

提 要 目的: 研究哮喘时嗜酸性粒细胞(Eos)凋亡与 Fas表达的关系及药物对它们的影响。方法: 应用地塞米松(DM)、雷公藤甲素(Triptolide, TP)及氨茶碱(AM)干预哮喘豚鼠,以 TUNEL法检测细胞凋亡,以 RT-PCR及原位杂交检测 Fas mRNA表达。结果: 哮喘组 Eos凋亡率较正常对照组显著降低($P < 0.01$),应用 DM、TP、AM后均显著增加($P < 0.01$)。正常豚鼠 Eos可检测到 Fas mRNA表达,不同密度 Eos表达差异不显著($P > 0.05$)。哮喘组 Fas mRNA明显减少,以低密度 Eos减少明显($P < 0.05$),应用 DM、TP、AM后其表达明显增加。结论: 凋亡调节的缺失是导致组织及血中 Eos增多的重要原因, Fas抗原参与了哮喘 Eos凋亡的调节,低密度 Eos更能反映哮喘的特征。DM、TP、AM可促进哮喘肺组织中的 Eos表达 Fas抗原,进而加强细胞凋亡。

关键词 哮喘;嗜酸细胞;细胞凋亡; Fas
中图法分类号 R329.25; R562.25

哮喘是一非特异的慢性炎症性疾病,嗜酸性粒细胞(Eosinophils, Eos)聚集、活化及其高毒性阳离子蛋白的释放在其发病过程中发挥着重要作用。以往人们注意到 Eos的渗出依赖 IL-5,但对 Eos炎症反应的控制研究很少。不断有证据表明细胞死亡是由细胞凋亡引起,对炎症反应清除很重要。近来发现 Eos凋亡减少是哮喘 Eos增加的重要原因之一。在体外, Eos存活依赖抑制凋亡的细胞因子白介素(Interleukin, IL)-3、IL-5、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF),是否存在促进 Eos凋亡的因素仍不很清。细胞表面分子 Fas/apo-1(CD95)被认为是一促凋亡基因,能促进多种细胞凋亡。Fas是一 45× $10^3$u蛋白,属于 TNF/NGF受体家族成员。Fas受体与其单抗或其配体交叉连接可致淋巴细胞凋亡。本实验用地塞米松、雷公藤甲素及氨茶碱干预,观察哮喘肺组织 Eos Fas表达与细胞凋亡及细胞凋亡与炎症清除的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

原位细胞凋亡检测试剂盒(*In Situ* Cell Death Detection Kit, POD),购自德国 Boehringer Mannheim(BM)公司。总 RNA提取试剂盒(Tripure Isolation Regent),德国 BM公司。寡核苷酸探针 3′末端标记试剂盒(Dig Oligonucleotide 3′-end Labeling Kit),德国 BM公司。Percoll分离液,瑞典 Phamacia公司。M-MLV逆转转录酶,美国 Promega公司。Taq DNA多聚酶,加拿大 Sango公司。Oligo dT(15),美国 Promega公司。dNTP,德国 BM公司。抗地高辛(Dig)抗体,德国 BM公司。

### 1.2 动物分组

健康豚鼠 30只,购自第三军医大学实验动物中心,体重 200~250 g,雌雄不拘,随机分为 5组(每组 6只): 正常对照组、哮喘组、地塞米松(DM)组、雷公藤甲素(Triptolide, TP)组及氨茶碱(AM)组。哮喘动物模型制备参照王长征[1]略加修改。在第 1天和第 8天,将 2%卵蛋白(OA,溶于生理盐水)与等量的氢氧化铝凝胶混匀后,豚鼠腹腔内注入 0.5 ml。在第 21天,将豚鼠置密闭容器内, 2% OA气雾进行激发,把动物暴露在 OA中至哮喘发作 30 min为止。激发前 30 min给予腹腔注射苯海拉明 5 mg/kg,防止豚鼠严重哮喘发作而死亡。48 h后行支气管肺泡灌洗(Bronchoalveolar lavage, BAL)。正常组: 按哮喘组方法,用苯海拉明预处理动物后,用生理盐水代替 2% OA进行激发, 48 h后行 BAL。各处理组: 按哮喘组方法处理动物。用卵蛋白激发 24 h后,用地塞米松 10 mg/kg或雷公藤甲素 40μg/kg或氨茶碱 100 mg/kg豚鼠腹腔注射, 24 h后行 BAL。

### 1.3 主要方法

1.3.1 支气管肺泡灌洗 经颈动脉放血处死动物后,立即用 Hanks液经气管注入 5 ml× 3次,轻轻按摩动物的胸部 20~30 s后回收 BAL,回收率大于 90%。

1.3.2 细胞计数及分类 全部 BAL液 400× g, 4℃离心 10 min,收集沉淀的细胞,重悬于 Hanks液中。进行 Eos绝对计数。取数滴 BAL液至玻片上,行细胞分类。

1.3.3 嗜酸细胞分离 配制不同比重的 Percoll液。在 5 ml离心管中依次加入 1.105、1.090、1.080的 Percoll液各 1 ml,最后加入上述细胞悬液 1 ml,用 960× g 20℃离心 15 min。离心完毕后,分别回收不同比重交界面的细胞层。用嗜酸细胞稀释液计不同比重的嗜酸细胞绝对数。调整细胞数 5× $10^6$/ml,取 1 ml行 RT-PCR。少许细胞涂片行原位杂交及凋亡检测。

1.3.4 引物合成 由中国科学院上海细胞生物研究所合成, PAGE纯化,纯度> 99%。扩增产物长度分别为 328、587 bp。

Fas同义链: 5′-CAA GGG ACT GAT AGC ATC TTT

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39670337
** 李志奎,男, 36岁,副主任医师,博士研究生

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

GAG G-3′

反义链: 5′-TGT GAA AGT CCA GAA CCC TAA GG-3′

β-actin同义链: 5′-CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA C-3′

反义链: 5′-AGG GTA CAT GTG GTG CCG CCA GA-3′

1.3.5 寡核苷酸探针标记 探针应用 Fas引物反义链,地高辛(Dig)标记使用 3′末端转移法,其原理是利用 3′末端转移酶将带有 Dig基团的 ddUTP掺入寡核苷酸探针 3′末端的游离羟基上。操作方法参照试剂盒说明进行,主要步骤如下:取 EP管依次加入探针 100 pmol,标记缓冲液 4 μl,$CoCl_2$ 4 μl,Dig-ddUTP 1 μl,TdT 1 μl,ddH₂O 5 μl,37℃孵育 10 min,4℃过夜。加 2 μl糖原终止反应。以 2.5 μl 4 mol/L LiCl及 75 μl预冷的乙醇充分混匀,-20℃ 2 h,12 000× g离心 10 min,弃上清,70%乙醇 50 μl漂洗,空干,加双蒸水 20 μl,-20℃保存。标记效率大于 90%。

1.3.6 原位凋亡细胞检测 TUNEL(TdT-mediated dUTP nick end labeling)法。参照试剂盒说明书进行。荧光显微镜下观察摄影。

1.3.7 原位杂交 参照蔡文琴[12]的方法进行。

1.3.8 逆转录 PCR法

1.3.8.1 总 RNA提取 应用 Tripure提取药盒(Tripure isolation reagent, TIR)依说明书进行。选取 5× $10^6$细胞悬液提取 RNA,细胞入 EP管离心、弃上清。室温直接加 TIR 1 ml对(5~10)× $10^6$,吹打、混匀以溶解上述样品。在室温放 5 min以确保完全溶解。加 0.2 ml氯仿。混匀 15 s,室温 2~15 min,12 000× g 4℃离心 15 min,将无色上清转入新 EP管。加 0.5 ml异丙醇。充分混匀,室温 5~10 min,沉淀 RNA,12 000× g 4℃离心 10 min,弃上清。加 1 ml(4℃预冷)75%乙醇。洗 RNA重悬混匀。7 500× g 4℃离心 5 min,弃上清后空气干燥。用 DEPC水 20 μl重悬 RNA,吹吸几次溶液以助溶解,55℃~60℃温育 10~15 min,测量 $D_{260}$、$D_{280}$,所有样本 $D_{260}/D_{280}$>1.8,以 $D_{260}$计算 RNA量,用 2 μg RNA进行 cDNA合成。

1.3.8.2 逆转录应用 MMLV,引物应用 Oligo(dT)15,逆转录为 42℃ 90 min。

1.3.8.3 PCR反应条件 96℃ 6 min,冰浴后加 Taq酶(2.5 u)0.7 μl,94℃ 45 s,55℃ 45 s,72℃ 1 min,35个循环,72℃ 10 min。PCR产物检测:采用 1.5%琼脂糖凝胶,加 10 μl Fas及相应的β-actin PCR产物进行电泳,电压 5~10 V/$cm^2$,电泳 40 min,于紫外透射仪下观察并拍照。电泳图扫描后用 PHOT-SHOP进行分析。以积分光密度(IOD)$_{(Fas)}$/IOD$_{(β-actin)}$之比进行统计学分析。

### 1.4 统计学分析

所有数据以 SPSS(Statistics package for social science)统计学分析。各组结果以 $\bar{x}\pm s$表示,采用非配对 $t$检验。

## 2 结果

### 2.1 DM、TP、AM对哮喘豚鼠 Eos细胞凋亡的影响

哮喘组 Eos凋亡率较正常对照组明显降低($P<0.01$),应用 DM、TP、AM后均显著增加($P<0.05$),低密度 Eos与正常密度 Eos比较差异不显著($P>0.05$),见表 1。

表 1 DM、TP、AM对哮喘豚鼠 BALF中 Eos细胞凋亡的作用(%,$n=6$,$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of DM, TP and AM on the apoptosis of eosinophils in BALF of asthmatic guinea pig(%, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

| | Normal | Asthma | Dexamethasone | Triptolide | Aminophylline |
|---|---|---|---|---|---|
| Hypodensity Eos | 8±2 | 4±2## | 24±5** | 17±9* | 15±5** |
| Normal density Eos | 7±2 | 3±2## | 22±4** | 16±8* | 14±4** |

##: $P<0.01$ *vs* normal; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* asthma

### 2.2 DM、TP、AM对哮喘豚鼠肺组织及 BALF Eos Fas表达的影响

原位杂交显示:正常组可检测到 Fas mRNA表达,哮喘组明显减少($P<0.05$),以低密度 Eos明显($P<0.05$),应用 DM、TP后其表达明显增加($P<0.05$, $P<0.01$)。AM可使低密度 Eos Fas表达增强($P<0.05$),对正常密度 Eos Fas表达无显著影响($P>0.05$),见表 2。

### 2.3 DM、TP、AM对 Eos Fas mRNA表达相对含量的影响

RT-PCR检测显示:正常组 Eos可检测到 Fas mRNA表达,哮喘组明显减少($P<0.05$),应用 DM、TP、AM后其表达明显增加,以低密度 Eos明显。AM组低密度 Eos Fas表达增强($P<0.05$),正常密度 Eos Fas表达增加不明显($P>0.05$),见表 3。

表 2 DM、TP、AM对哮喘豚鼠肺 BALF Eos Fas mRNA表达的影响[原位杂交强阳性率(%),$n=6$,$\bar{x}\pm s$]

Tab 2 Effects of DM, TP and AM on Fas mRNA expression in eosinophils of asthmatic guinea pig BALF(%, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

| | Normal | Asthma | Dexamethasone | Triptolide | Aminophylline |
|---|---|---|---|---|---|
| Hypodensity Eos | 35±8 | 25±3# | 37±5** | 36±9* | 36±8* |
| Normal density Eos | 43±6 | 33±7# | 43±6* | 43±8* | 37±17 |

#: $P<0.05$ *vs* normal; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* asthma

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

表 3　DM、TP、AM对 Eos Fas mRNA表达相对含量的影响($IOD_{(Fas)}/IOD_{(\beta actin)}$, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Effects of DM, TP and AM on Fas mRNA expression in eosinophils of asthmatic guinea pig BALF($IOD_{(Fas)}/IOD_{(\beta actin)}$, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

| | Normal | Asthma | Dexamethasone | Triptolide | Aminophyline |
|---|---|---|---|---|---|
| Hypodensity Eos | 2.09± 0.14 | 1.25± 0.11## | 1.89± 0.20** | 1.69± 0.21** | 1.63± 0.24** |
| Normal density Eos | 1.91± 0.45 | 1.29± 0.19# | 1.89± 0.24** | 1.64± 0.21* | 1.60± 0.39 |

#: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* normal; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* asthma

## 3　讨论

嗜酸性粒细胞在血中聚集及活化是许多过敏疾病的特征。活化的 Eos细胞毒产物引起的细胞损伤,致组织炎症,炎症的清除一部分是通过巨噬细胞,它可完整吞噬凋亡细胞。炎症细胞活动则通过选择性加强它们自我损伤而加速在组织中的清除。最近 Fas抗原研究给控制凋亡复杂网络带来一些希望。在多种细胞类型中起凋亡作用 Fas(Apo-1/CD95),是一种 45× $10^3$u 的跨膜蛋白,与 TNF-α、CD40等同属肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族。Fas可在胸腺细胞、T细胞、单核细胞、B细胞、质化细胞、上皮细胞及内皮细胞等多种细胞中表达。Fas抗原与它的天然配体(FasL)或其抗体结合后,诱导细胞内的酪氨酸和丝氨酸/苏氨酸磷酸化以及引起细胞内 $Ca^{2+}$ 浓度升高,促进细胞凋亡。这是一种 Fas依赖的清除体内多余细胞的重要方式。在体外,Fas配体及特异的单抗可致许多类型的细胞凋亡。最近发现 Eos可表达低但恒定的 Fas抗原水平。抗 Fas单抗在体外应用可加速 Eos凋亡,在体内可通过降低组织 Eos炎症治疗鼻息肉[3]。本研究发现,正常豚鼠的 Eos存在一定量的 Fas mRNA表达,而在哮喘时 Eos表达 Fas明显下降,同时细胞凋亡减少,表明 Fas依赖的 Eos凋亡是哮喘 Eos的特征。不同密度的 Eos细胞活性不同,低密度 Eos具有高细胞活性,本研究结果显示正常豚鼠肺中不同密度 Eos Fas表达无差异,而哮喘组低密度 Eos较正常密度 Eos Fas表达明显下降,表明它是哮喘组织炎症产生的主要原因,其调节凋亡的 Fas通路在哮喘时受限更加明显,同时对各种药物反应也更敏感,是 Eos炎症及其清除的焦点。有研究表明抗 Fas抗体在 24h内几乎可完全缓解 Eos肺炎[4]。凋亡细胞很快被巨噬细胞吞噬,并不引起第二次炎症,更重要的是 Fas介导的细胞死亡不能被外加 IL-3、IL-5或 GM-CSF救活。表明:① Fas介导死亡不易被这类因子通过 bcl-2信号救活,② 在严重的激素不敏感哮喘时,这些因子逃避了抑制,针对 Fas的治疗也许很有用。缺乏 Fas介导的 Eos死亡可能是哮喘时慢性气道炎症的重要因素[4,5]。

糖皮质激素通过不同机制抑制炎症细胞中细胞因子基因转录来降低组织中的炎症,在治疗多种 Eos相关疾病包括哮喘中有显著作用。地塞米松能引起体内 Eos显著降低。虽然激素作用的确切机理仍需研究,体内外实验均表明激素可促进凋亡的产生,本研究也证明了这一点。地塞米松结合 Eos上的糖皮质激素受体,相互作用,加速凋亡,促进炎症的清除[6]。Wallen 等[7]发现 IL-5、IL-3及 GM-CSF介导的 Eos存活可被皮质激素阻止。表明激素竞争性阻滞 Eos活动性细胞因子的作用。激素调整 Eos的死亡通过影响不同的凋亡信号,包括 Fas抗原的活动[8]。本研究发现哮喘豚鼠 Eos Fas抗原表达下降,应用 DM、TP、AM后,其 Fas抗原表达增加,表明它们均可影响了 Fas/FasL通路,促进细胞凋亡,利于肺组织炎症的清除,以 DM明显。AM也促进了 Eos凋亡,与地塞米松组无明显差异,但对 Eos Fas的表达不如 DM及 TP强,表明其作用机制不完全一样。其详细机制有待进一步研究。

凋亡调节的缺失是导致组织及血中 Eos增多的重要原因,Fas抗原也参与了哮喘豚鼠 Eos凋亡的调节,DM、TP、AM可促进哮喘肺组织中的 Eos表达 Fas抗原,进而加强细胞凋亡。发现选择性的促进 Fas表达过程的制剂对清除炎症及过敏反应具有诱人的前景。

## 参考文献


1　王长征,王春霞,钱桂生,等.银杏苦内酯对过敏性豚鼠气道内低密度嗜酸性细胞增多的调节作用.中国药理学通报,1996,12(3):238

2　蔡文琴,王伯　主编.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术.成都:四川科学技术出版社,1994.406~409

3　Hebestreit H, Yousefi S, Batti I, *et al*. Expression and function of the Fas receptor on human blood and tissue eosinophils. Eur J Immunol, 1996, 26(8): 1775

4　Tsuyuki S, Bertrand C, Erard F, *et al*. Activation of the Fas receptor on lung eosinophils leads to apoptosis and the resolution of eosinophilic inflammation of the airways. J Clin Invest, 1995, 96(6): 2924

5　Anderson G P. Resolution of chronic inflammation by therapeutic induction of apoptosis. TIPS, 1996, 17(12): 438


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

6 Woolley K L, Gibson P G, Carty K, *et al*. Eosinophil apoptosis and the resolution of airway inflammation in asthma. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 154(1): 237
7 Wallen N, Kita H, Weiter D, *et al*. Glucocorticoids inhibit cytokine-mediated eosinophil survival. J Immunol, 1991, 147(10): 3490
8 Druilhe A, Cai Z, Haile S, *et al*. Fas-mediated apoptosis in cultured human eosinophils. Blood, 1996, 87(7): 2822

(收稿: 1999-01-26;修回: 1999-03-31)
(编辑 王 红)

# Fas expression on eosinophils in lungs and its changes after treatment in asthmatic guinea pigs*

Li Zhikui, Wang Changzheng, Qian Guisheng (Department of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

**Abstract** **Objective**: To determine the relationship between the apoptosis of asthmatic eosinophils and Fas expression and its changes after treated with drugs. **Methods**: After the asthmatic guinea pigs were treated with dexamethasone (DM), triptolide (TP) and aminophylline (AM), apoptosis of the eosinophils was detected by TdT-mediated dUTP nick end labeling and Fas mRNA expression measured by RT-PCR and *in situ* hybridization. **Results**: The number of the apoptotic eosinophils was significantly lower in asthmatic group than in the control ($P < 0.01$) and markedly increased after treated with DM, TP and AM ($P < 0.01$). Fas mRNA of the eosinophils was moderately expressed in normal guinea pigs, decreased in asthmatic ones and significantly increased after treatment with the 3 agents ($P < 0.05$). **Conclusion**: Fas may be one of the important factors regulating apoptosis of eosinophils in asthma. DM, TP and AM can up-regulate the Fas expression to promote apoptosis of eosinophils in the lungs of guinea pigs after asthma.

**Key words** asthma; eosinophil; apoptosis; Fas; guinea pig

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39670337

# 低分子右旋糖酐 40引起过敏反应 1例

# Report of one case of hypersensitivity induced by dextran-40

孟小明* 李 军 杨宗才 司良毅 (第三军医大学附属西南医院特诊科)重庆, 400038

患者女性, 53岁, 因头晕、视物模糊 2年, 右下肢跛行 1年于 1998年 11月 18日入院。经检查后诊断为颈椎病、椎-基底动脉供血不足型;给予低分子右旋糖酐 40注射液 500 ml静滴。第 1日感头胀、耳鸣(如闪电样, 几秒钟后消失), 平卧加重, 无恶心呕吐, 无发热心悸, 观察, 未予特殊处理;次日静滴完同样液体后, 患者出现恶心、呕吐 2次, 为胃内容物, 每次约 60 ml;头胀如裂, 不能平卧, 无胸闷气促, 左眼胀, 视物模糊;无发热寒战, 呕吐不呈喷射状。查体: 生命征平稳, 意识清楚, 皮肤稍湿, 左咽腭弓粘膜下直径约 1 cm出血斑, 颈软, 心肺无特殊发现, 腹平软。以后两日, 仍有恶心呕吐 2次, 但较轻;皮肤奇痒, 以洗澡后加重。血及输液瓶剩余液细菌培养为阴性, 4次血常规均正常。治疗以抗过敏, 对症, 改善心脑循环。第 5日症状完全缓解。行低分子右旋糖酐 40皮试: 在患者左前臂内侧用低分子右旋糖酐 40注射液 0.1 ml(约 5 mg)皮内注射[1], 15 min时观察皮丘发红, 形成高出皮丘的红斑, 判为阳性。

* 孟小时, 男, 40岁, 副教授, 硕士

## 讨论

低分子右旋糖酐 40注射液系用蔗糖经肠膜状明串球菌-1226(Leuconostoc mesenteroides)发酵后生成的高分子葡聚糖聚合物, 经精制处理而得, 其本身具有一定抗原性。我科对 10名正常人行皮试有 3人呈阳性;这种过敏反应有逐渐加重的特点。因此, 在使用时应注意及时发现和处理;有条件时, 应尽量把低分子右旋糖酐 40皮试作为常规, 以避免更严重过敏反应发生[2]。

关键词 低分子右旋糖酐 40;过敏
中图法分类号 R593.1; R973.5

### 参考文献

1 牛家祺, 袁伟晋, 王英秀, 等. 低分子右旋糖酐引起不良反应 57例分析. 中华外科杂志, 1991, 29(10): 599
2 Hedin H, Ljungstrom H G. Prevention of dextran anaphylaxis: ten years experience with hapten dextran. Int Arch Allergy Immunol, 1997, 113(1~3): 358

(收稿: 1998-12-21;修回: 1999-04-14)
(编辑 王 红)

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