DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.06.025

糖皮质激素对哮喘豚鼠支气管粘膜 ICAM-1 E-选择素表达的影响

曹国强* 杨肇亨 (第三军医大学附属大坪医院呼吸内科) 重庆, 400042

提 要 目的: 研究糖皮质激素对哮喘豚鼠支气管组织中的细胞间粘附分子1(ICAM-1) mRNA E选择素 mRNA表达的影响。方法: 实验豚鼠被随机分为正常对照组、地塞米松(Dex)治疗组和哮喘组。用原位杂交方法显示 ICAM-1mRNA及 E选择素 mRNA的表达变化。结果: 原位杂交结果显示, ICAM-1mRNA E-选择素 mRNA在正常豚鼠支气管粘膜下的小血管、毛细血管内皮细胞及(或)支气管上皮细胞有基础表达。定量分析结果表明,哮喘豚鼠支气管组织表达 ICAM-1mRNA、E选择素 mRNA较正常对照组及 Dex治疗组显著增加($P < 0.05$, $P < 0.001$)。E选择素 mRNA的表达量与浸润的 Eos和炎细胞总数成显著的正相关($r = 0.65$, $P < 0.05$; $r = 0.78$, $P < 0.01$), ICAM-1mRNA的表达量与浸润的白细胞之间成显著的正相关($r = 0.65$, $P < 0.05$), DEX治疗组和正常对照组之间两种粘附分子的表达无显著差异。结论: 糖皮质激素可能通过抑制细胞粘附分子的表达来减少哮喘气道 Eos的浸润。

关键词 哮喘;糖皮质激素;细胞粘附分子
中图法分类号 R562.25

糖皮质激素(Glucocorticoid, GC)是目前治疗哮喘最有效的抗炎药物。其靶细胞为白细胞、粘液腺细胞和血管内皮细胞等,能降低循环中的嗜碱细胞、嗜酸细胞和 T细胞的数量,抑制哮喘气道嗜酸细胞浸润。但是 GC抗炎的确切机理尚不清楚。目前研究发现,细胞粘附分子特别是其中的细胞间粘附分子1(Intracellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、E选择素(E-selectin)、血管细胞粘附分子1(Vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)等与炎细胞的粘附、浸润、跨内皮移动等过程关系密切。哮喘患者支气管组织细胞粘附分子表达增加[1]。本实验将豚鼠制作出哮喘模型,地塞米松(DEX)进行干预,用原位杂交技术观察 ICAM-1、E选择素的表达变化,旨在从细胞粘附分子的角度探讨 GC抗哮喘的分子机理。

1 材料和方法

1.1 哮喘动物模型的制作及 Dex的干预

36只豚鼠(第三军医大学动物中心提供),雌雄不限,体重300~550 g,随机分为正常对照组(C),哮喘组(A), DEX治疗组(D)。A组: 参照 Hustson方法[2],第1、4、7天将1%的卵蛋白(OA)用402型超声雾化器雾化吸入3 min致敏豚鼠,第21~27天用2%的 OA雾化吸入5 min诱发其哮喘发作(诱发前30~45 min肌肉注射 H1受体拮抗剂苯海拉明10 mg/kg以防止豚鼠因过敏反应而死亡),诱发后24 h采集标本。C组: 用生理盐水致敏,诱发同 A组。D组: 致敏和诱发同 A组,在第16天用0.5 mg·kg^{-1}·d^{-1} DEX i.p.,连续6 d,诱发前12 h停药。

1.2 探针制备及标记

鼠 ICAM-1cDNA质粒(pUC19, 2686 bp)由日本 T. Horiuchi博士惠赠。E-选择素 cDNA质粒(AMP抗性, 5.0kb)由美国 M. P Bevilacqua博士惠赠。含目的基因片段的质粒经常规转化→扩增→抽提→纯化后,用 EcoR I、Pvu I双酶切下 ICAM-1cDNA片段;用 Xho I、Xba I双酶切下 E-选择素 cDNA片段。使用宝灵曼公司生产的地高辛体外转录标记试剂盒标记探针。

1.3 原位杂交

用豚鼠制作哮喘动物模型后, 24 h内活杀动物、支气管肺组织冰冻切片(30 μm)。原位杂交参照文献[3]进行,略有改进。漂浮冰冻切片在0.1 mol/L PBS(pH7.2)中漂洗3次,每次5 min,清除残留于组织中的固定液;切片在蛋白酶 K(2 μg/ml)中37℃孵育30 min,以暴露待测 mRNA; 0.1 mol/L PBS冲洗两次,每次3 min,清除残留的固定液。用新鲜配制的0.1 mol/L Tris-HCL(pH8.0)(含0.25%乙酸酐)漂洗切片10 min,以降低非特异性反应;湿盒内37℃预杂交4 h, 42℃杂交20 h。冲洗后 NBT显色,透明封片。光镜下观察,照相。原位杂交阴性对照实验: 在杂交液中加入地高辛标记的同义探针,其它步骤相同。

杂交结果由图像分析系统处理, 40× 10视野下,每张切片随机取5个视野(待测组织须充满整个视野)测量阳性呈色面积占整个视野面积的百分比,取5个视野的均值作为结果。

1.4 统计学处理

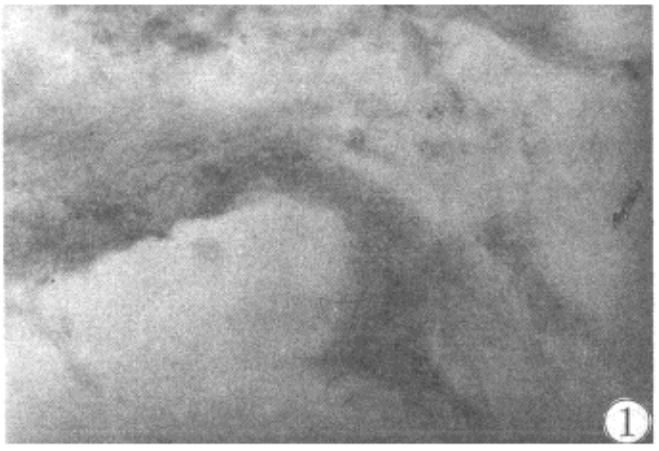
数据经 t检验处理,结果以 $\bar{x} \pm s$表示。

* 曹国强,男, 33岁,主治医师,讲师,硕士

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

2 结果

豚鼠 ICAM-1 mRNA的表达较为弥散,包括支气管上皮细胞、小血管内皮细胞等;E选择素 mRNA的表达则主要位于小血管内皮细胞的胞浆内,见图 1~2图像分析结果显示,哮喘豚鼠支气管组织 ICAM-1mRNA和 E-选择素 mRNA的表达较正常对照组和 DEX治疗组显著增加,见表 1 E选择素 mRNA的表达量与豚鼠支气管粘膜的 Eos浸润程度呈显著正相关,ICAM-1mRNA的表达量与支气管粘膜浸润的炎细胞总数呈显著的正相关,见表 2 3



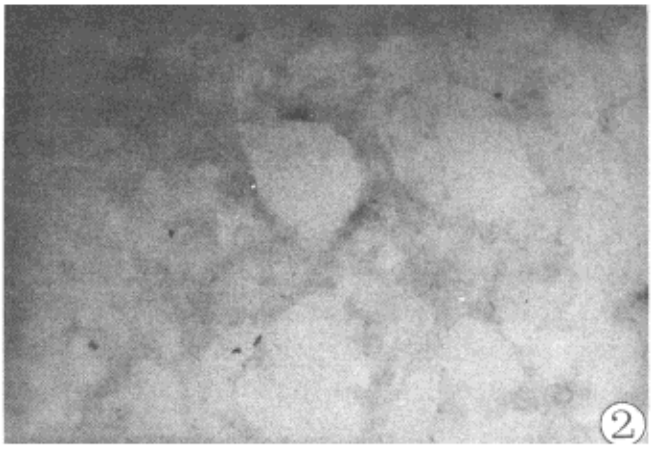


图 1 正常豚鼠支气管组织原位杂交,**ICAM-1 mRNA**杂交性信号分布于支气管上皮细胞 (ISH× 400)

Fig 1 *In situ* hybridization of normal bronchial tissues in guinea-pigs, hybridization signal of ICAM-1 mRNA is expressed and distributed in bronchial epithelial cells (ISH× 400)

图 2 正常豚鼠支气管组织原位杂交,E-选择素 **mRNA**杂交性信号分布于支气管粘膜下微血管内皮细胞 (ISH× 400)

Fig 2 *In situ* hybridization of normal bronchial tissues in guinea-pigs, hybridization signal of E-selectin mRNA is expressed and distributed in the endothelial cells of brouchial submucosal venule (ISH× 400)

表 1 细胞粘附分子在豚鼠支气管组织表达程度比较(%)

Tab 1 Comparison of the extent of expression of cell adhesion molecules in the bronchial tissues in guinea-pigs(%)

Groups	*n*	ICAM-1	E-selectin
Normal control	12	1.53± 1.07	0.84± 0.62
Bronchial asthma	12	3.36± 2.26*△	2.24± 1.12**△
Dex treatment	12	1.69± 1.50	1.33± 1.15

△: $P < 0.05$ *vs* Dex treatment group;

*: $P < 0.02$, **: $P < 0.001$ *vs* normal control.

表 2 豚鼠支气管组织炎细胞浸润程度比较(**cells/mm²**)

Tab 2 Comparison of the extent of cellular infitration in the bronchial tissues in guinea-pigs(**cells/mm²**)

Groups	*n*	Eosinophil infiltration	Total infiltration
Normal control	12	0.3± 0.3	1.2± 0.6
Bronchial asthma	12	1.3± 0.5*	2.4± 0.8*
Dex treatment	12	0.6± 0.5	1.5± 0.7

*: $P < 0.05$ *vs* control. Cellular infiltration(0~3): 0 = none; 1= 1~10 cells/mm²; 2= 10~50 cells/mm²; 3 = more than 50 cells/mm².

表 3 细胞粘附分子表达与支气管粘膜炎细胞浸润的关系

Tab 3 Correlations between cell adhesion molecule expression and the leucocyte infiltration in bronchial tissues in guinea-pigs

Groups	*n*	Eosinophil infiltration		Total infiltration	
		ICAM-1	E-selectin	ICAM-1	E-selectin
Normal control	12	0.43	0.45	0.32	0.25
Bronchial asthma	12	0.36	0.64*	0.69*	0.78**
Dex treaatment	12	0.12	0.42	0.19	0.51

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ *vs* normal control group.

3 讨论

哮喘已公认是一种以 Eos浸润为主的气道慢性炎症.炎细胞的粘附、浸润、渗出等过程均与细胞粘附分子有关。GC作为一种内源性抗炎物质,是目前最有效的抗哮喘药物,可以抑制支气管肺组织的炎症反应,减少支气管粘膜内的 Eos数量及 Eos脱颗粒,但其确切机理尚不清楚.体外实验发现,糖皮质激素能够抑制

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

人单核细胞及支气管上皮细胞表达 ICAM-1mRNA,也能抑制人脐静脉内皮细胞表达 E选择素 mRNA[4]。本实验发现 Dex能够显著抑制哮喘豚鼠气道的 Eos浸润,同时对哮喘豚鼠支气管粘膜组织的 ICAM-1mRNA E选择素 mRNA亦有明显抑制作用; E选择素 mRNA的表达量与豚鼠支气管粘膜的 Eos浸润程度呈显著正相关, ICAM-1mRNA的表达量与支气管粘膜浸润的炎细胞总数呈显著的正相关。因此我们认为 GC可能是通过抑制细胞粘附分子的表达来实现其抗哮喘作用的。GC抑制细胞粘附分子表达的机理尚不完全清楚,有作者认为该作用可能是 GC通过与糖皮质激素受体(GR)结合抑制了细胞粘附分子基因的表达,进而抑制其蛋白质表达来实现的[5]。另外 GC通过 GR的介导,诱导脂皮素的合成与释放,抑制磷脂酶 A2(PLA2)的活性,从而减少花生四烯酸代谢产物的合成,以及 GC抑制诱导细胞粘附分子表达的 TNF IL-1 IFN等多种细胞因子的合成,在 GC抑制粘附分子表达的机理中起一定作用,该机理在整体水平尤为重要。

参考文献

1 Manolitsas N D, Trigg C J, McAulay A E *et al*. The expression of intercellular adhesion molecule-1 and the β_1-integrins in asthma. Eur Respir J, 1994, 7: 1439

2 Hustson P A. Late-phase airway response provoked by ovalbumin inhalation in conscious sensitized guinea-pigs. Am Rev Respir Dis, 1990, 141: 535

3 蔡文琴,王伯云 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. 406~412

4 Van de Stopel, Caldenhoven E, Raaijmarkers J A M *et al*. Glucocorticoid-mediated repression of ICAM-1 expression in human monocytic and bronchial epithelial cell line. Am J Respir Cell Mol Biol, 1993, 8: 340

5 Cronstein B N, Kimmel S C, Levin R I *et al*. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: The glucocotiod receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 9991

(收稿: 1997-01-05;修回: 1997-11-03)

(编辑 刘 鹏)

Effects of glucocorticoid on the expression of intercellular adhesion molecule-1 in bronchial mucus tissue in guinea pigs with asthma

Cao Guoqiang, Yang Zhaoheng (Department of Respiratory Diseases, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract **Objective**: To study the effects of glucocorticoid (GC) on the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and E-selection in bronchial mucus tissue in guinea pigs with asthma. **Methods**: The guinea pigs were randomized into the normal control, dexamethasone-treated and asthmatic groups. The changes in mRNA expression of ICAM-1 and E-selectin were observed with *in situ* hybridization. **Results**: In situ hybridization showed that ICAM-1 mRNA and E-selectin mainly expressed in endothelial cells and/or epithelial cell cytoplasm. Quantitative analysis demonstrated that mRNA expression of ICAM-1 and E-selectin in the bronchial tissue was significantly higher in the asthmatic group than in the control and dexamethasone-treated groups ($P < 0.02$, $P < 0.05$). **Conclusion**: GC can inhibit the expression of ICAM-1.

Key words asthma; glucocorticoid; intercellular adhesion molecule; guinea pig

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