

### 【基础研究】

通信作者:曾锦荣(1963-),男,广西桂林人,硕士,教授,研究方向:肺癌;E-mail:zjr@glmc.edu.cn。马礼兵(1987-),男,江西兴国人,博士,副教授,研究方向:哮喘;E-mail:181275547@qq.com。

支气管哮喘(bronchial asthma,BA)是常见的慢性支气管炎性疾病,研究发现,BA 的发病机制与辅助性 T 细胞(T helper cell,Th)1/Th2 细胞功能失衡有密切的关系,主要表现为 Th1 型免疫反应被抑制,Th2 型免疫反应亢进。通过增强 Th1 型反应、降低 Th2 型反应,对 BA 可以起到治疗作用<sup>[1]</sup>。T-bet 是 Th1 细胞亚群分化的特异性转录因子,GATA-3 是 Th2 细胞亚群分化的特异性转录因子。T-bet 和 GATA-3 的平衡调控是决定 Th1/Th2 细胞功能平衡的关键因素<sup>[2]</sup>。有研究发现,BA 患者的外周血、支气管肺泡灌洗液及肺组织匀浆中心房钠尿肽(atrial natriuretic peptide,ANP)水平升高<sup>[3]</sup>。本研究通过建立 BA 小鼠模型,并应用 ANP 及其受体抑制剂 A71915 干预,观察小鼠支气管炎症及转录因子 T-bet、GATA-3 的表达情况,探讨 ANP 信号通路在 BA 发病中的作用及其机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及分组** 清洁级 BALB/C 雌性小鼠 40 只,8 周龄,体质量( $20.0 \pm 2.0$ ) g,由桂林医学院实验动物中心提供。40 只小鼠随机分为 4 组:正常对照组、BA 组、ANP 组和 ANP + A71915 组,每组 10 只。

**1.2 试剂与仪器** 鼠 GATA-3 单克隆抗体(美国 Proteintech 公司),鼠 T-bet 单克隆抗体(美国 Abcam 公司),免疫组织化学染色试剂盒(美国 RD 公司),ANP(美国 California Bioscience 公司),A71915(美国 Bachem 公司),卵白蛋白(ovalbumin,OVA)、氢氧化铝凝胶(美国 Sigma 公司),偶联辣根过氧化物酶的羊抗鼠二抗(美国 Santa Cruz 公司),1.5 mL Eppendorf(EP)管(美国 Axygen 公司),手术器械(桂林医学院附属医学院设备科),402AI 超声雾化器(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司)。

**1.3 BA 小鼠模型的建立** BA 组小鼠利用 OVA 和氢氧化铝凝胶(0.01 mg OVA 溶于 0.2 mL 氢氧化铝凝胶,第 1、13 天经腹腔注射)致敏及反复雾化吸入  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 OVA 溶液,持续雾化 30 min,每周 3 次,直至第 56 天处理小鼠;ANP 组小鼠在每次 OVA 雾化吸入前 30 min 雾化吸入 ANP( $1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ );ANP + A71915 组小鼠在每次 ANP 雾化吸入前 30 min 腹腔注射 A71915( $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ );正常对照组小鼠应用生理盐水代替。

**1.4 肺组织病理学观察** 小鼠最后 1 次雾化 24 h 后,用  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  水合氯醛麻醉后取肺组织放入  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  多聚甲醛溶液中固定 24 h,采用颈椎脱臼法处死小鼠。乙醇梯度脱水后石蜡包埋切片,苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色。观察各组

小鼠支气管改变,每只小鼠挑选 3 张有完整支气管横断面的切片,采用 MIAS-2000 医学图像分析系统在 400 倍光镜下观察,参照 BA 小鼠支气管炎症评分标准<sup>[4]</sup>进行支气管炎症评分:无炎症细胞浸润为 0 分;少量炎症细胞浸润为 1 分;1 层炎症细胞围绕支气管为 2 分;2~4 层炎症细胞围绕支气管为 3 分;4 层以上炎症细胞围绕支气管为 4 分。

过碘酸-希夫(periodic acid-schiff,PAS)染色:切片后置入  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  高碘酸溶液中氧化 5 min,用蒸馏水冲洗后加入 Schiff 试剂染色 30 min,然后在偏重亚硫酸钠浸洗 2 遍后行苏木精染核 5 min。观察支气管黏膜杯状细胞增生和支气管黏液分泌情况,以 PAS 染色阳性的杯状细胞数占支气管上皮细胞数的百分比表示,评分标准<sup>[5]</sup>:<5% 为 0 分;5%~25% 为 1 分;26%~50% 为 2 分;51%~75% 为 3 分;>75% 为 4 分。

### 1.5 肺组织转录因子 GATA-3 和 T-bet 免疫组织化学染色

小鼠肺组织行固定、脱水、包埋、切片后,采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶联结法(streptavidin-peroxidase,SP)三步法行抗 T-bet 和 GATA-3 免疫组织化学反应。切片常规脱蜡至水,置于装有柠檬酸的高压锅中进行抗原修复;质量分数 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液中孵育 10 min,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)冲洗 3 次,每次 3 min;滴加最适合比例一抗, $37^\circ\text{C}$  温箱孵育 1 h;PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;滴加二抗, $37^\circ\text{C}$  温箱孵育 15 min;PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。3,3'-二氨基联苯胺显色(1 mL 蒸馏水加显色剂 A、B、C 各 1 滴,混匀),显色后自来水冲洗;苏木精复染、脱水、透明,树胶封片;显微镜观察。GATA-3 蛋白主要表达于支气管壁及其周围肺组织、肺间质的炎症细胞内,阳性反应为棕黄色颗粒沉着。T-bet 蛋白主要表达在支气管壁及其周围肺组织、肺间质的炎症细胞内,阳性反应为棕黄色颗粒沉着。

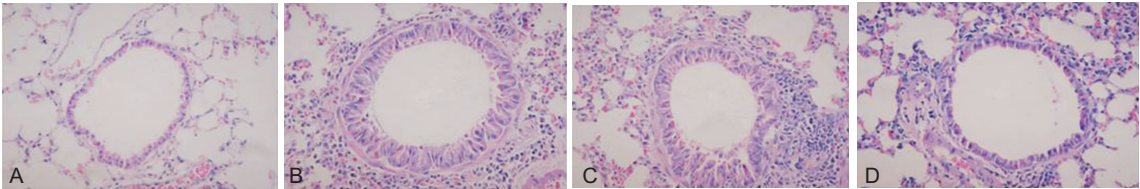
**1.6 统计学处理** 应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组计量资料进行正态性检验和方差齐性检验,符合正态性分布和方差齐的数据比较采用单因素方差和  $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组小鼠行为学变化** 与正常对照组比较,其他 3 组小鼠均出现明显的烦躁不安、抓耳挠腮、呼吸加快等 BA 发作表现。激发至约 1 周后,BA 组小鼠症状更加严重,且出现嗜睡状态,整个建模过程中未出现小鼠死亡。

**2.2 肺组织病理学** 结果见图 1、图 2 和表 1。正常对照组:小鼠支气管及肺泡结构正常,未见明显炎症细胞及明显的 PAS 染色阳性上皮细胞。BA 组:可见支气管黏膜充血水肿及大量坏死脱落的上皮细胞,支气管周围发现大量的炎症细胞,炎症细胞浸润程度明显高于正常对照组 ( $P < 0.01$ );PAS 染色可见大量的阳性细胞,细胞轮廓粗大饱满,上皮细胞坏死脱落明显,支气管黏液分泌功能亢进,与正常对照

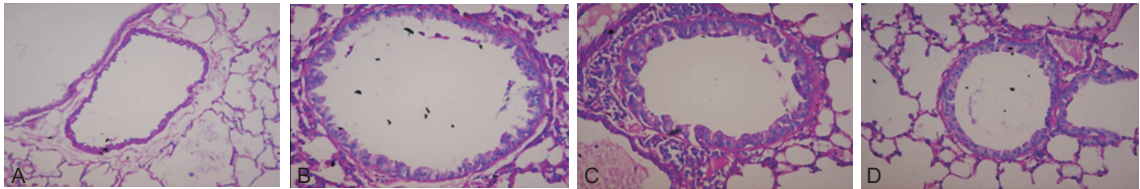
组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。ANP 组:与 BA 组比较,支气管黏膜充血水肿更显著,炎症细胞浸润更严重,炎症程度明显高于 BA 组 ( $P < 0.01$ );PAS 染色阳性细胞数量及支气管上皮细胞黏液分泌更多 ( $P < 0.01$ )。ANP + A71915 组:与 ANP 组比较,炎症细胞浸润明显减轻 ( $P < 0.01$ ),PAS 染色阳性细胞减少,支气管上皮细胞黏液分泌减少 ( $P < 0.01$ )。



A: 正常对照组;B:BA 组;C:ANP 组;D:ANP + A71915 组。

图 1 小鼠肺组织病理学变化 (HE 染色, ×100)

Fig. 1 Pathological changes in lung tissue of mice (HE staining, ×100)



A: 正常对照组;B:BA 组;C:ANP 组;D:ANP + A71915 组。

图 2 小鼠肺组织病理学变化 (PAS 染色, ×100)

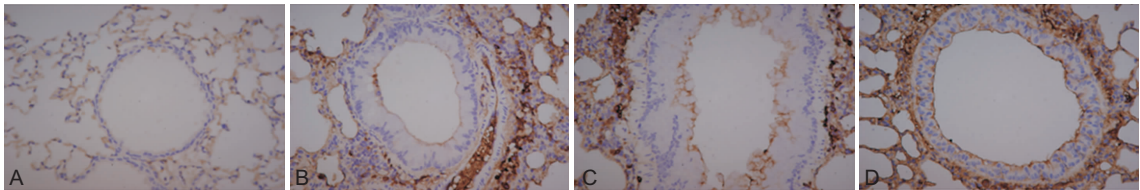
Fig. 2 Pathological changes in lung tissue of mice (PAS staining, ×100)

表 1 4 组小鼠肺组织炎症细胞浸润及支气管黏液分泌程度比较

Tab. 1 Comparison of inflammatory cell infiltration of lung tissue and mucus secretion of bronchus of mice in the four groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	炎症细胞浸润 程度评分	支气管黏液 分泌程度评分
正常对照组	10	0.40 ± 0.52	0.50 ± 0.53
BA 组	10	2.50 ± 0.53 <sup>a</sup>	2.51 ± 0.53 <sup>a</sup>
ANP 组	10	3.60 ± 0.52 <sup>b</sup>	3.40 ± 0.52 <sup>b</sup>
ANP + A71915 组	10	2.30 ± 0.48 <sup>c</sup>	2.50 ± 0.53 <sup>c</sup>

注:与正常对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 BA 组比较<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与 ANP 组比较<sup>c</sup> $P < 0.01$ 。



A: 正常对照组;B:BA 组;C:ANP 组;D:ANP + A71915 组。

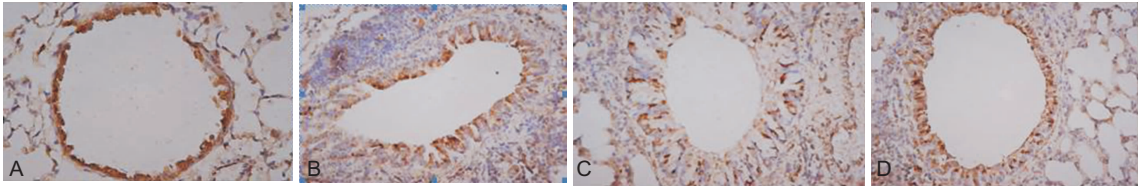
图 3 小鼠肺组织中 GATA-3 蛋白的表达 (免疫组织化学, ×100)

Fig. 3 Expression of GATA-3 protein in lung tissue of mice (immunohistochemistry, ×100)

**2.4 小鼠肺组织中 T-bet 蛋白表达** 结果见图 4 和表 2。正常对照组:肺组织内有大量的棕黄色颗

粒沉着,颜色较深。BA 组:肺组织、肺间质及支气管壁周围有少量的棕黄色颗粒沉着,阳性细胞颜色浅

而分布不广泛,T-bet 蛋白表达低于正常对照组( $P<0.01$ )。ANP 组:支气管壁上皮细胞及其周围肺组织、肺间质较少棕黄色颗粒沉着,着色更浅,阳性细胞明显少于 BA 组,T-bet 蛋白表达明显低于



A:正常对照组;B:BA 组;C:ANP 组;D:ANP + A71915 组。

图 4 小鼠肺组织中 T-bet 蛋白的表达(免疫组织化学,×100)

Fig. 4 Expression of T-bet protein in lung tissue of mice (immunohistochemistry, ×100)

表 2 小鼠肺组织中 T-bet、GATA-3 蛋白的表达

Tab. 2 Expression of T-bet and GATA-3 protein in lung tissue of mice			
组别	<i>n</i>	(x̄ ± s)	
		T-bet 蛋白	GATA-3 蛋白
正常对照组	10	1.95 ± 0.17	0.89 ± 0.11
BA 组	10	1.42 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.69 ± 0.16 <sup>a</sup>
ANP 组	10	0.80 ± 0.16 <sup>b</sup>	2.61 ± 0.18 <sup>b</sup>
ANP + A71915 组	10	1.48 ± 0.18 <sup>c</sup>	1.72 ± 0.15 <sup>c</sup>

注:与正常对照组比较<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与 BA 组比较<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与 ANP 组比较<sup>c</sup> $P<0.01$ 。

3 讨论

BA 的发病机制至今仍不明确,其中,免疫失调被公认为 BA 的重要发病机制,最具代表性的是 CD4<sup>+</sup>T 细胞群中的 Th1/Th2 亚群数量与功能的失衡,即 Th2 型应答优势化<sup>[6]</sup>。目前有效的治疗手段为规范地吸入激素与长效支气管扩张剂;然而,临床发现不少 BA 患者即使接受规范的吸入治疗,仍出现依赖甚至耐药情况,进而发展为难治性 BA;其可能机制为 BA 患者的个体差异、长期吸入治疗致使相应的受体敏感度下降及受体内化致数量减少、支气管重塑致反应性下降等<sup>[7-8]</sup>,而这些因素在短时间内很难解除。因此,寻找新的替代药物或联合用药成为解决此困境的重要手段之一。

ANP 又称心钠素,为利钠肽家族主要成员,是一种经典的调控机体容量-压力内稳态的多效能活性肽,具有扩张血管、利钠、利尿等作用<sup>[9]</sup>;利钠肽受体 A 是 ANP 的主要作用受体,可介导相关细胞活动如增殖、分化、凋亡等<sup>[10]</sup>。近期研究发现,ANP 信号可抑制 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞亚群 Th17 细胞的分化与功能,表明 ANP 信号参与免疫调节,这提示除具有调节循环内稳态功能外,ANP 信号还拥有诸多值得关注的生物学功能<sup>[11]</sup>。有研究发现,急性过敏性 BA 小鼠外周血、支气管肺泡灌洗液及肺组织匀浆中 ANP 水平升高,并且雾化吸入 ANP 后,醋甲胆碱诱发的 BA 小鼠支气管痉挛明显减弱,其舒张支气管的强度与沙

BA 组( $P<0.01$ )。ANP + A71915 组:支气管壁及其周围有少量的棕黄色颗粒沉着,T-bet 蛋白表达明显高于 ANP 组( $P<0.01$ )。

丁胺醇类似<sup>[12]</sup>,与潘金兵等<sup>[5]</sup>结论基本一致,表明 ANP 信号参与 BA 的发病,但其机制尚不清楚。有体外研究发现,ANP 信号可引起不成熟树突状细胞的表型变化,促进其抗原提呈作用,并且在 ANP 和脂多糖共同刺激下,利用树突状细胞和初始 CD4<sup>+</sup>T 细胞进行共同培养,发现可促进 Th2 细胞表型反应<sup>[13]</sup>。综上推测,ANP 信号是否可能通过调控 Th1/Th2 细胞亚群的数量与功能平衡,参与 BA 免疫失衡的发病过程。为了明确 ANP 信号在 Th1/Th2 细胞表达功能中的作用,本研究通过建立 BA 小鼠模型并给予 ANP 及其受体抑制剂 A71915 进行干预。研究发现,雾化吸入 ANP 后,抑制了小鼠 Th1 型转录因子 T-bet 蛋白表达,同时加强了 Th2 型转录因子 GATA-3 蛋白表达,加重了支气管炎性反应以及支气管黏液分泌程度;而注入 ANP 受体抑制剂 A71915 后,Th1 型转录因子 T-bet 表达则有所上升,Th2 型转录因子 GATA-3 表达受到抑制,同时给予 ANP 受体抑制剂 A71915 后小鼠肺组织支气管的炎症反应也有所缓解,支气管黏液分泌明显减少。结果提示,ANP 信号参与了 Th1/Th2 细胞功能的表达过程,ANP 信号通过参与调控 Th1/Th2 细胞功能平衡<sup>[14]</sup>,抑制 Th1 型细胞反应而促使 Th2 型细胞反应优势化,从而加重 BA 支气管炎症反应,使小鼠 BA 加重。

参考文献:

[1] 刘艳明,农光民,吴娇华,等.抑制肺组织信号转导和转录激活因子-3 磷酸化对支气管哮喘小鼠呼吸道炎症及呼吸道重塑的影响[J].中华实用儿科临床杂志,2014,29(4):265-269.

[2] 俞海国,钱丽娟,钱小青,等.转录因子 T-bet/GATA-3 在支气管哮喘小鼠中的表达及地塞米松的干预作用[J].南京医科大学学报:自然科学版,2009,29(1):55-59.

[3] Ma L B, Li J X, Wang G Y, et al. Atrial natriuretic peptide suppresses Th17 development regulation of cGMP-dependent protein kinase and PI3K-Akt signaling pathways[J]. Regul Pept, 2013, 181:9-16.



白 Bax,是一系列凋亡相关蛋白中最重要的一对调节子<sup>[13-16]</sup>,Bax 通过与 Bcl-2 形成异源二聚体,封闭 Bcl-2 活性,导致细胞凋亡<sup>[17-19]</sup>。本实验结果显示白花蛇舌草可使 Ramos 细胞 Bcl-2 蛋白表达水平下调,且随着剂量的增加,Bcl-2 蛋白下降更加明显;而 Bax 蛋白表达水平上调,导致 Bax 和 Bcl-2 蛋白之间的比例平衡被打破,Bax/Bcl-2 比值升高,细胞出现凋亡。这可能是白花蛇舌草引起 Ramos 细胞凋亡的分子机制之一,即细胞活化调控胱天蛋白依赖的线粒体途径,进而促进肿瘤细胞凋亡。

参考文献:

[1] 陈永康. 白花蛇舌草的化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):290-293.

[2] 曾永长,梁少瑜,罗佳波,等. 白花蛇舌草水提部位体内外抗肿瘤实验研究[J]. 中药新药与临床药理,2011,22(5):521-524.

[3] 隋在云,王爱洁. 白花蛇舌草和半枝莲微粉配伍对小鼠 H22 肝癌细胞周期及凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(23):290-292.

[4] 张翔,叶宝东,林圣云,等. 白花蛇舌草注射液对多发性骨髓瘤细胞株 RPMI8226 增殖的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2012,32(12):1658-1662.

[5] 张焱,谢蕊繁,陈坚,等. 白花蛇舌草对人胶质瘤 U87 细胞的影响及机制[J]. 中华实验外科杂志,2011,28(12):2171-2173.

[6] 刘岩,张春阳,张大田,等. 白花蛇舌草提取物诱导人肾癌 GRC-1 细胞凋亡及抑制血管生成的实验研究[J]. 山东医药,2011,51(8):97-98.

[7] 余萍. 白花蛇舌草注射液诱导 SKOV-3 细胞株凋亡的研究[J]. 中国药业,2012,21(18):24-25.

[8] 刘汝青,邓雪清,肖勇梅,等. 白花蛇舌草提取物对鼻咽癌细胞株 CNE1 的毒性及其机制[J]. 新医学,2011,42(8):510-512.

[9] 杨炯,刘汝青,杜德荣,等. 白花蛇舌草总黄酮对黑色素瘤 A375 和 B16 细胞增殖抑制作用的研究[J]. 世界中西医结合杂志,2011,6(10):844-846,856.

[10] 单保恩,张金艳,杜肖娜,等. 白花蛇舌草的免疫学调节活性和抗肿瘤活性[J]. 中国中西医结合杂志,2001,21(5):370-374.

[11] Estaquier J,Vallette F,Vayssiere J L,*et al.* The mitochondrial pathways of apoptosis[J]. *Adv Exp Med Biol*,2012,942(1):157-183.

[12] Zielinski R R,Eigl B J,Chi K N. Targeting the apoptosis pathway in prostate cancer[J]. *Cancer J*,2013,19(1):79-89.

[13] Lam L T,Zhang H,Chyla B. Biomarkers of therapeutic response to BCL2 antagonists in cancer[J]. *Mol Diagn Ther*,2012,16(6):347-356.

[14] 周俊,何湘珍,肖启国. 金樱子通过增加 Bcl-2/Bax 表达比抑制大鼠糖尿病性白内障晶状体上皮细胞的凋亡[J]. 眼科新进展,2014,34(4):314-318.

[15] 吴俭,金国强,杨利丽,等. 复方丹参注射液对感染性休克大鼠脑损伤时一氧化氮、B-细胞淋巴瘤-2 蛋白及 S100 的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志,2014,29(10):758-760.

[16] 梁冰,曹永亮,郭爱华,等. Edaravone 对视网膜缺血-再灌注损伤大鼠 Bcl-2 和 Bax 表达的影响[J]. 眼科新进展,2013,33(4):316-318.

[17] Thomas S,Quinn B A,Das S K,*et al.* Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy[J]. *Expert Opin Ther Targets*,2013,17(1):61-75.

[18] Tomek M,Akiyama T,Dass C R. Role of Bcl-2 in tumour cell survival and implications for pharmacotherapy[J]. *J Pharm Pharmacol*,2012,64(12):1695-1702.

[19] 陶红芳,方建林,刘元生,等. 紫杉醇下调死亡结构域沉默子表达促进白血病细胞凋亡新机制研究[J]. 中华实用儿科临床杂志,2014,29(11):862-865.

( 本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)

( 上接第 294 页)

[4] Hellermann G,Kong X Y,Gunnarsdottir J,*et al.* Mechanism of bronchoprotective effects of a novel natriuretic hormone peptide [J]. *J Allergy Clin Immunol*,2004,113(1):79-85.

[5] 潘金兵,张铁栓,侯宇虹,等. 支气管哮喘患者血浆心钠素、C 型利钠肽的水平及临床意义[J]. 中华结核和呼吸杂志,2000,23(9):521.

[6] 潘小晶,王锁英,许化溪,等. T-bet 基因传递对支气管哮喘模型小鼠 T 淋巴细胞亚群的免疫调节作用[J]. 中华实用儿科临床杂志,2013,28(4):281-284.

[7] Louis R,Schleich F,Barnes P J. Corticosteroids: still at the front-line in asthma treatment[J]. *Clin Chest Med*,2012,33(3):531-541.

[8] Bergeron C,Tulic M K,Hamid Q. Airway remodelling in asthma in asthma: from benchside to clinical practice[J]. *Can Respir J*,2010,17(4):e85-e93.

[9] 郁森,秦兵,张莉,等. 脑钠肽在老年慢性心力衰竭诊断及预后评估中的应用价值[J]. 新乡医学院学报,2013,30(9):741-

743.

[10] Misono K S,Philo J S,AraKawa T,*et al.* Structure, signaling mechanism and regulation of the natriuretic peptide receptor guanylate cyclase[J]. *FEBS J*,2011,278(11):1818-1829.

[11] 马礼兵. ANP 信号调控 CD4<sup>+</sup>T 细胞及其在过敏性哮喘中的作用研究[D]. 长沙:中南大学,2012.

[12] Ma L B,Xiang X D. Atrial natriuretic peptide/natriuretic peptide receptor A ( ANP/NPRA ) signaling pathway: a potential therapeutic target for allergic asthma[J]. *Med Hypotheses*,2011,77(5):832-833.

[13] Morita R,Ukyo N,Furuya M,*et al.* Atrial natriuretic peptide polarizes human dendritic cells toward a Th2-promoting phenotype through its receptor guanylyl cyclase-coupled receptor A [J]. *J Immunol*,2003,170(12):5869-5875.

[14] 王谷宜. β-arrestin-2 对急性哮喘小鼠脾 CD4<sup>+</sup>T 细胞 Th1/Th2 型细胞因子分泌的影响及其机制研究[D]. 长沙:中南大学,2011.

( 本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超)