

补脾益气方对支气管哮喘大鼠肺组织 Toll 样受体 4 表达的影响

柳 春* 闵广艳 王艳杰 赵丹玉 曹 阳 郭隽馥

辽宁中医药大学生物化学与分子生物学教研室, 沈阳市皇姑区崇山东路 79 号, 110847

基金项目: 辽宁省教育厅高等学校科研项目计划(2005L245; 2009A500); 辽宁省自然科学基金资助项目(20072078)

* 通讯作者: liuchun5@yahoo.com.cn, (024)31207093

[摘要] 目的 观察补脾益气方对支气管哮喘大鼠肺组织 Toll 样受体 4(TLR4) 的影响。方法 将 36 只 Wistar 大鼠随机分为对照组、哮喘组、治疗组, 每组 12 只。哮喘组使用卵蛋白致敏和激发制备支气管哮喘模型, 对照组使用等量生理盐水代替卵蛋白, 治疗组在第 1 次致敏时以补脾益气方 10g/kg 灌胃治疗, 每天 1 次, 共 21 天。观察各组大鼠嗜酸性粒细胞(EOS)等炎性细胞的计数, 并采用 RT-PCR 检测各组大鼠肺组织 TLR4 的 mRNA 表达水平, 采用免疫组化检测肺组织 TLR4 的蛋白表达水平。结果 哮喘组大鼠肺组织 TLR4 的 mRNA 及蛋白的表达均显著高于对照组和治疗组 ($P < 0.01$); 哮喘组大鼠血液中 EOS 计数及其他炎性细胞百分比均显著高于对照组和治疗组 ($P < 0.01$)。结论 支气管哮喘大鼠肺组织 TLR4 mRNA 和蛋白的表达显著增强, 补脾益气方能有效抑制其表达, 并同时降低血液中 EOS 等炎性细胞的数量。

[关键词] 补脾益气; 支气管哮喘; Toll 样受体 4; 嗜酸性粒细胞

Effect of Bupi Yiqi Formula on the Expression of Toll-like Receptor 4 in Bronchial Asthma Rats

LIU Chun, MIN Guangyan, WANG Yanjie, ZHAO Danyu, CAO Yang, GUO Junxiu

(Biochemistry and Molecular Biology Teaching Department, Liaoning University of Chinese Medicine, Shenyang 110847)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Bupi Yiqi Formula (Formula for reinforcing the spleen and strengthening qi) on the expression of toll-like receptor 4 in bronchia asthma rats. **Methods** Thirty-six Wistar rats were randomized into control group, asthma group, and treatment group with 12 in each. The asthma models were made through ovalbumin sensitization and provocation, the control group was given the same amount of normal saline instead of ovalbumin, and the treatment group was treated with Bupi Yiqi Formula 10g/kg for gastric feeding when the first time sensitization was given. The intervention was give once a day, 21 days in total. The counts of eosinophil (EOS) and other inflammatory cells were observed. TLR4 mRNA expression in lung tissues was detected by RT-PCR and the TLR4 expression was detected by immunohistochemical method. **Results** The TLR4 mRNA expression and TLR4 expression in lung tissues of the asthma group were all significantly higher than those of the control group and treatment group ($P < 0.01$), and the count of EOS and the percentage of other inflammatory cells of the asthma group were significantly higher than those of the control group and treatment group ($P < 0.01$). **Conclusion** The TLR4 mRNA and protein expressions in lung tissues of the asthma group are significantly strengthened, Bupi Yiqi Formula effectively inhibit these expressions and decrease the count of inflammatory cells including EOS.

Key Words Bupi Yiqi (Reinforcing the spleen and strengthening qi); bronchial asthma; toll-like receptor 4; eosinophil (EOS)

支气管哮喘(简称哮喘)是一种由多种细胞包括气道的炎性细胞和结构细胞及细胞组分参与的以气道炎症、可逆性气流受限和气道高反应性为特征的免疫变态反应性疾病,其中以气道炎症为最主要的病理变化,并决定气流受限和气道高反应性的程度。Toll 样受体 4(TLR4)是一种属于跨膜蛋白的免疫模式识别受体,能够识别入侵的病原体,诱导一系列炎性反应产生炎性因子。本实验通过研究哮喘大鼠气道炎症与肺组织中 TLR4 表达的改变,探讨补脾益气方对 TLR4 的调控作用及对炎性细胞含量的

影响,进而观察补脾益气方对哮喘炎症反应的抑制作用,为临床上补脾益气方防治哮喘提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

健康雄性 Wistar 大鼠 36 只, SPF 级, 体重(200 ± 20)g, 由北京通利华实验动物技术有限公司提供, 动物许可证号: SCXK(京)2007-0001。

1.2 药物

补脾益气方(由黄芪 50g, 白术 15g, 防风 15g, 黄芩 30g, 大枣 100g 等组成), 常规煎煮 2 次, 过滤

合并浓缩药液至浓度为生药 1g/ml。

1.3 试剂

卵蛋白 (Grade II, 美国 Sigma 公司, 批号 A5253); RT-PCR 试剂盒 [DRR019A, 宝生物工程 (大连) 有限公司]; 兔抗大鼠 TLR4 多克隆抗体 (BA1717, 武汉博士德生物工程有限公司); 灭活百日咳杆菌疫苗 (武汉云达生物药业有限公司, 批号 20090310); 氢氧化铝干粉 (天津药业集团)。

2 方法

2.1 动物分组与处理方法

将 36 只 Wistar 大鼠采用随机数字表法分为 3 组: 对照组、哮喘组、治疗组, 每组 12 只。哮喘组: 参考文献[3]的方法制备哮喘模型, 分为致敏和激发 2 个阶段。致敏: 在实验的第 1、3、5 天, 每天给大鼠腹腔注射 1ml 抗原液 (卵蛋白 100mg、灭活百日咳杆菌疫苗 5×10^9 个、氢氧化铝干粉 100mg 溶于 1ml 生理盐水); 激发: 从实验的第 5 天开始, 以 1% 卵蛋白溶液用超声雾化器喷雾, 在封闭的雾化箱内大鼠自然吸入雾气, 激发成哮喘。雾化吸入每次 30min, 连续 7 天。对照组: 致敏时用等量生理盐水代替抗原液腹腔注射, 激发时以等量生理盐水代替卵蛋白溶液进行雾化吸入。治疗组: 在第 1 次致敏时开始补脾益气方治疗, 按照人鼠剂量转换, 给予大鼠成人等效量的 10 倍即 10g/kg 灌胃治疗, 每天 1 次, 共 21 天。

2.2 炎性细胞计数分类测定

在给药 21 天后取材。血液样本: 20% 乌拉坦腹腔注射麻醉大鼠, 眶静脉取血 0.5ml, EDTA · Na₂ 抗凝, 混匀。全自动五分类动物血液分析仪器测定嗜酸性粒细胞 (EOS) 计数及 EOS、中性粒细胞、淋巴细胞的百分比。组织标本: 开胸从固定部位切取右肺中叶, 4% 多聚甲醛固定。

2.3 TLR4 mRNA 检测

采用 Trizol 进行肺组织总 RNA 提取; 采用 RT-PCR 试剂盒分两步进行 RT-PCR 反应: 以 β -actin 为内参照, 参考文献[2]选取大鼠 TLR4 引物, TLR4 引物序列: 上游 5'-GCATTGTATCGCCT-TCTTAGCA-3', 下游 5'-CCTGTGAGGTCGTT-GAGGTTAG-3', 扩增片段长度 293bp。 β -actin 引物序列: 上游 5'-TGTATGCCTCTGGTCGTAC-CAC-3', 下游 5'-ACAGAGTACTTGCGCTCAG-GAG-3', 扩增片段长度 592bp, 由宝生物工程 (大连)

有限公司合成。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 2min, 94℃ 变性 30s, 65℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 1min, 共 30 个循环, 最后 72℃ 加时延伸 5min, 4℃ 冷却终止反应; 琼脂糖凝胶电泳; 利用 WD-9413B 凝胶成像分析仪进行图像分析; 用 Gelpro32 软件测量目的基因和内参照的平均光密度值, 并计算两者的比值, 以该比值反应目的基因的 mRNA 表达水平。

2.4 TLR4 的蛋白表达

载玻片防脱片处理, 切片常规脱蜡至水, 按照试剂说明书的步骤进行操作; 苏木素轻度复染, 脱水, 透明, 封片; 显微镜观察, 拍照; 采用 BI2000 医学图像分析系统进行图像分析, 选取 200 倍图像, 观察肺内支气管部位, 细胞质呈棕黄色为 TLR4 阳性表达细胞, 每张切片随机选取至少 5 个高倍视野进行积分光密度测定, 取其平均值作为该切片的代表值。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件处理, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

在饲养、造模和治疗过程中各组大鼠均有死亡, 实验结束时各组均剩余大鼠 10 只, 全部大鼠进行炎性细胞计数分类, 每组取 8 只进行 RT-PCR 和免疫组化实验。

3.1 各组大鼠肺组织 TLR4 mRNA 表达比较

表 1 示, 哮喘组大鼠 TLR4 mRNA 的表达量显著高于对照组 ($P < 0.01$), 治疗组显著低于哮喘组 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠肺组织 TLR4 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TLR4 平均光密度/ β -actin 平均光密度
对照组	8	0.277 $\pm$ 0.067*
哮喘组	8	0.681 $\pm$ 0.107
治疗组	8	0.362 $\pm$ 0.078*

注: 与哮喘组比较, * $P < 0.01$

3.2 各组大鼠肺组织 TLR4 蛋白表达比较

表 2、图 1 示, 哮喘组大鼠肺组织 TLR4 蛋白阳

表 2 各组大鼠肺组织 TLR4 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠	TLR4 积分光密度
对照组	8	3232.606 $\pm$ 33.987*
哮喘组	8	4113.367 $\pm$ 62.382
治疗组	8	3884.372 $\pm$ 78.023*

注: 与哮喘组比较, * $P < 0.01$

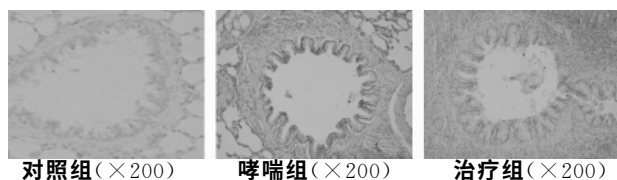


图 1 各组大鼠肺组织 TLR4 蛋白表达的比较

性主要表达于各级支气管上皮细胞、肺泡巨噬细胞、中性粒细胞、EOS 及淋巴细胞等,哮喘组 TLR4 蛋白表达显著高于对照组 ($P < 0.01$),治疗组显著低于哮喘组 ($P < 0.01$)。

3.3 各组大鼠血液中炎性细胞比较

表 3 示,哮喘组大鼠 EOS 计数及 EOS、淋巴细胞和中性粒细胞百分比显著高于对照组 ($P < 0.01$),而治疗组以上指标均显著低于哮喘组 ($P < 0.01$)。

表 3 各组大鼠血液炎性细胞比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	EOS 计数 ($\times 10^9/L$)	EOS (%)	淋巴细胞 (%)	中性粒细胞 (%)
对照组	10	$0.02 \pm 0.01^*$	$0.24 \pm 0.15^*$	$49.82 \pm 12.79^*$	$15.34 \pm 4.30^*$
哮喘组	10	0.13 ± 0.12	0.71 ± 0.58	72.45 ± 5.62	23.32 ± 4.58
治疗组	10	$0.04 \pm 0.03^*$	$0.29 \pm 0.19^*$	$62.56 \pm 5.25^*$	$16.04 \pm 3.49^*$

注:与哮喘组比较,* $P < 0.01$

4 讨论

哮喘已经成为威胁公众健康的最常见慢性呼吸道疾病之一,近 20 多年来其患病率和病死率急剧上升^[3]。医学界从病因、发病机制、药物治疗等各个方面对哮喘进行了研究,而哮喘发病的免疫学机制已成为研究的热点。

气道的慢性炎症是哮喘病理变化的最主要特征,气道炎症反应涉及很多炎性相关细胞因子和炎症蛋白的参与。Toll 样受体 (TLR) 是一类模式识别受体 (PRR),主要存在于巨噬细胞、中性粒细胞、EOS、淋巴细胞等免疫相关的细胞表面,能调节先天免疫与获得性免疫,其介导的信号通路在炎症的发生、发展和变化中具有重要意义,说明 TLR 在炎症相关疾病如哮喘的发生机制和防治方面具有重要的研究价值,其中 TLR4 承担了主要作用,已有实验证实,在肺组织中 TLR4 主要分布于气道上皮细胞、肺泡巨噬细胞等^[4],TLR4 识别入侵的病原体,诱导炎症反应和促进炎性细胞的转录、表达及释放,从而可能参与哮喘炎症的发生和发展。通过抑制 TLR4 的激活,可以阻止或者降低哮喘炎症表达,本实验验证了这个理论的可行性。对 TLR4 在哮喘过程中

信号转导的深入研究,可进一步揭示哮喘的发病机制,为临床防治哮喘提供理论依据。

抗炎、对症、免疫治疗被认为是哮喘最基本的治疗方法^[5],补脾益气方已被证实具有明显的免疫调节作用,杨月妍等^[6]研究表明,补脾益气中药可以显著降低哮喘大鼠肺泡灌洗液中白细胞介素-5 (IL-5)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的含量,改善气道炎症的状况。本实验结果显示,哮喘组大鼠肺组织 TLR4 mRNA 和蛋白的表达显著升高,且血液中炎性细胞的计数也升高,说明哮喘时炎症反应可通过 TLR4 信号转导机制进一步增加炎症细胞如 EOS 的释放;治疗组大鼠肺组织中 TLR4 mRNA 和蛋白的表达明显低于哮喘组,血液中炎性细胞的计数如 EOS 也明显减少,提示补脾益气方可通过抑制 TLR4 的活化间接地阻止或降低哮喘气道的炎症反应,从而达到防治哮喘的目的。

参考文献

- [1] 吕国平,崔德健,郭英江,等. 介绍一种建立大鼠哮喘模型的实验方法[J]. 中华结核和呼吸杂志,1995,18(6):377-378.
- [2] 陈蔓英,吴洪斌,曾浩,等. 保肝复功水煎剂对急性肝损伤大鼠肝组织 Toll 样受体 2、4 表达的影响[J]. 中西医结合肝病杂志,2009,19(4):225.
- [3] Masoli M, Fabian D, Holt S, et al. The global burden of asthma; executive summary of the GINA Dissemination Committee report[J]. Allergy, 2004, 59(5):469-478.
- [4] 苏苗赏,李昌崇,林立,等. 地塞米松对年幼期哮喘大鼠 TOLL 样受体 4 信号转导的调节机制[J]. 中华儿科杂志,2006,44(12):940.
- [5] 张久山. 支气管哮喘防治进展[J]. 天津医药,2000,28(3):191-192.
- [6] 杨月妍,魏庆宇,杨春山,等. 补脾益气中药对哮喘大鼠模型 BALF 中 IL-5 GM-CSF TNF- α 和 sIL-2R 的影响[J]. 中华中医药学刊,2008,26(5):965-967.

(收稿日期:2010-12-14;修回日期:2011-03-24)

[编辑:崔京艳]

欢迎投稿
欢迎订阅