白僵菌素对支气管哮喘模型小鼠气道炎症的影响及其机理研究

吴 刚 朱 佳 朱际平
(南京中医药大学附属医院、江苏省中医院呼吸科,江苏南京 210029)

摘 要 目的:观察白僵菌素对支气管哮喘模型小鼠气道炎症的抑制作用并探索其机制。方法:以卵蛋白致敏建立支气管哮喘小鼠模型,随机分为模型组、地塞米松组和白僵菌素低、中、高剂量组,另取正常小鼠作为正常组。在小鼠致敏21d后,进行激发,诱发哮喘,并予相应药物治疗5d,正常组与模型组予生理盐水。治疗后所有小鼠取血留存,ELISA法检测肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白介素-12(IL-12)。每组小鼠行左肺灌洗,收集灌洗液行细胞计数。取右肺,行病理学和Western Blot检测Bax、Bcl-2和Caspase-3的表达。结果:模型组病理学检查发现气道和肺泡炎细胞浸润,肺组织内成纤维细胞浸润,肺泡灌洗液多种炎症细胞计数增加。白僵菌素能显著降低支气管哮喘模型小鼠肺泡灌洗液中的炎症细胞计数,显著降低血清TNF-α和IL-12含量,且表现出剂量依赖性。同时白僵菌素能明显减轻支气管哮喘模型小鼠肺组织的炎性细胞浸润和肺气肿。Western Blot检测发现白僵菌素各剂量组小鼠肺组织中促凋亡因子Bax和Caspase-3表达增加,而抑制凋亡的Bcl-2表达减少。结论:白僵菌素对支气管哮喘模型小鼠的气道炎症有抑制作用,能减少炎症因子的表达,并可能促进炎症细胞凋亡。

关键词 白僵菌素 支气管哮喘 小鼠 气道炎症 病理学 肺泡灌洗液 肿瘤坏死因子-α 白介素-12
中图分类号 R282.740.5 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2017)06-0076-04

支气管哮喘在全球所有人群均有发病,对健康造成严重影响[1],虽然现在对支气管哮喘的研究逐步深入,但是对疾病的控制并不理想。本病的发病与细菌、病毒感染和职业环境有关[2-5],其病理实质是气道慢性炎症,抗感染治疗是治疗的核心[4]。中医对于支气管哮喘的防治有着丰富的经验,诸多的研究证明中药、中药复方和中药提取物对气道炎症有抑制作用[5-6]。中药白僵蚕在临床常用于祛风化痰,对过敏性鼻炎、支气管哮喘等具有疗效[7-9]。本研究观察白僵蚕有效成分白僵菌素(BEA)的抗炎和免疫调节作用,以进一步明确其有效性和作用机制。

1 实验材料

1.1 药品与试剂、仪器 白僵菌素(BEA,Beauvericin,MSS1033-1,青岛普瑞邦),鼠源白介素-12(IL-12)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)试剂盒(Elabscience,上海童耀生物),卵蛋白(ovalbumin OVA,SRE0080,Sigma),BCA蛋白定量试剂盒(500/2500rxn,MERCK),Bax、Bcl-2、Caspase-3抗体(BioVision),地塞米松(DEX,批号:1510271,山东新华制药股份有限公司),氢氧化铝(Cat:vac-alu-250,Invivogen),雾化器(YS9801,上海亿圣科技有限公司),SDS-PAGE电泳仪(Mini-PROTEAN Tetra C,Bio-Rad),紫外分光光度计(UV-2600,日本岛津)。

1.2 实验动物 BALB/c雌性小鼠,6~8周龄,体重18~22g,由常州卡文斯实验动物有限公司提供,合格证号:2015045569。于SPF动物房内饲养,(21±2)℃环境,正常饲料,自由饮水。所有小鼠饲养1周后开始实验。

2 实验方法

2.1 分组与造模、给药 小鼠随机分为6组:正常组(Ctrl)、模型组(Model)、地塞米松组(DEX)和白僵菌素(BEA)低、中、高剂量组,每组8只。

除正常组以外,其余各组小鼠制作支气管哮喘模型。(1)致敏母液:取OVA 1.6mg,用生理盐水20mL完全溶解后分装,置于-20℃冰箱保存备用。(2)致敏液:称取40mg氢氧化铝,加入10mL生理盐水,混匀制成氢氧化铝悬液。每次致敏前,取等体积氢氧化铝悬液加入OVA致敏母液,充分混匀。(3)激发液:取

基金项目:江苏省中医药局中医药重点学科建设项目资助(苏中医政[2013]30)

OVA 1g,用生理盐水 100mL 完全溶解后,置于 4℃冰箱备用。致敏阶段:共 2 次,分别于第 1 日和第 8 日进行,正常组每只小鼠腹腔内注射生理盐水 0.5mL,其余各组小鼠每次每只给予 0.5mL 致敏液腹腔注射。激发阶段:于第 21 日开始,连续 5d,共 5 次,除正常组以外,其余各组小鼠置于自制的密闭雾化箱中,给予激发液雾化 30min,正常组用生理盐水雾化 30min。

每次雾化前 30min,正常组、模型组小鼠腹腔内注射生理盐水 0.5mL/只,地塞米松组予腹腔注射地塞米松(每只 10mg/kg),白僵菌素低、中、高剂量分别腹腔注射 1、3、5mg/kg 白僵菌素。

2.2 标本采集 于实验第 26 日处死小鼠,按步骤采集标本。

2.2.1 血清采集 小鼠眼眶取血,将血液放于离心管中,室温静置 2h 后,3000r/min,4℃离心 10min,收集血清,弃沉淀,-80℃冰箱储存备用。

2.2.2 肺泡灌洗液(BALF)收集 将小鼠固定在手术板上,暴露颈部气管,插入特制的钝头针,并把针头和气管一起固定结扎,开胸结扎右主支气管。用 1mL 注射器向气管内缓慢注入生理盐水 1mL,迅速回抽灌洗液,行左肺灌洗,注入回抽反复 3 次,收取 BALF,离心,去上清,沉淀物涂片,进行细胞计数及分类。

2.2.3 肺组织标本 开胸取右肺组织,一半置于 10%中性甲醛溶液中固定 24h 以上,常规取材、脱水、石蜡包埋、石蜡切片,进行 HE 及 Masson 染色等操作;另一半肺组织取匀浆,用于提取蛋白测定 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 的表达。

2.3 Western Blot 测定 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 含量 将小鼠肺组织放入玻璃匀浆器中匀浆,加入 100μL RIPA 裂解液,置于冰上抽吸裂解,12000r/min、4℃离心 10min,将上清转移至干净的 EP 管中,用 BCA 蛋白定量试剂盒对细胞进行定量。每个样品加入 20μg 蛋白,跑胶,将胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上,湿转,将 PVDF 膜放入 5%脱脂牛奶中封闭 1h,去除牛奶,加入 3mL 5%脱脂牛奶,4℃孵育过夜。加入 TBST 洗膜,每次 10min,洗 4 次;去除 TBST,加入 3mL 5%脱脂牛奶,并加入 1μL 二抗,室温孵育 1h;加入 TBST 洗膜,每次 10min,洗 4 次;加入 HRP 显色液,曝光。

2.4 ELISA 法检测血清中 TNF-α、IL-12 的表达水平 实验开始前各试剂均应平衡至室温,试剂或样品配置时,均需充分混匀,并尽量避免起泡。分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加标准品或样品稀释液 100μL,余孔分别加标准品或待测样品 100μL,给酶标板覆膜,37℃孵育 90min。弃去孔内液体,甩干,不用洗涤。每个孔中加入生物素化抗体工作液 100μL(在使用前 15min 内配制),酶标板加上覆膜,37℃温育 1h。弃去孔内液体,甩干,洗板 3 次,每次浸泡 1~2min,大约 350μL/每孔,甩干并在吸水纸上轻拍将孔内液体拍干。每孔加酶结合物工作液(临用前 15min 内配制)100μL,覆膜,37℃温育 30min。弃去孔内液体,甩干,洗板 5 次,方法同前。每孔加底物溶液(TMB)90μL,酶标板加上覆膜 37℃避光孵育 15min 左右。每孔加终止液 50μL,终止反应,此时蓝色立转黄色。立即用酶标仪在 450nm 波长测量各孔的光密度值(OD 值)。

2.5 统计学方法 检测数据以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较以双尾单因素方差分析(two-way ANOVA)进行。白僵菌素不同剂量组之间两两比较采用 Post Hoc 分析(事后检验),$P<0.05$ 为差异有显著性。统计分析由 SPSS 22.0 软件完成。

3 实验结果

3.1 各组小鼠 BALF 细胞计数比较 与正常组比较,模型组小鼠肺泡灌洗液中细胞总数和嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、中性粒细胞数均明显高于正常组($P<0.01$,$P<0.001$);地塞米松组小鼠肺泡灌洗液中细胞总数和各类细胞数均明显低于模型组($P<0.01$,$P<0.001$);白僵菌素各剂量组小鼠细胞总数和部分细胞计数不同程度低于模型组,且呈剂量依赖性,以白僵菌素高剂量组小鼠细胞总数和各类细胞数最低。见表 1。

表 1 各组小鼠 BALF 细胞计数比较($\bar{x}\pm s$) ×10⁴/mL

组 别	细胞总数	嗜酸性粒细胞	淋巴细胞	巨噬细胞	中性粒细胞
正常组	222.31±0.57***	133.33±22.45***	8.27±1.33**	41.38±6.89***	45.16±7.74***
模型组	2013.64±1.70	877.78±80.0	18.33±5.0	467.59±48.28	219.35±18.06
地塞米松组	522.33±0.78**	300.01±60.43**	7.93±1.27**	136.55±13.79***	90.32±9.68**
白僵菌素低剂量组	1217.42±1.39$^{\#}$	777.87±55.67$^{\#}$	22.67±4.33$^{\#}$	344.83±40.0$^{**\#}$	167.74±25.16$^{\#}$
白僵菌素中剂量组	1078.32±0.96$^{**\#\#}$	622.24±33.3$^{**\#\#\triangle}$	15.67±3.27$^{\#\#\triangle}$	304.83±16.55$^{**\#\#}$	154.84±26.45$^{\#\#}$
白僵菌素高剂量组	578.75±0.96$^{**\triangle\triangle\blacktriangle\blacktriangle}$	355.56±57.78$^{***\triangle\triangle\triangle\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle}$	11.67±2.0$^{**\triangle\triangle\blacktriangle\blacktriangle}$	164.14±20.69$^{***\triangle\triangle\triangle\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle}$	95.48±10.97$^{**\triangle\triangle\blacktriangle\blacktriangle}$

注:与模型组比较,*$P<0.05$,**$P<0.01$,***$P<0.001$;与地塞米松组比较,#$P<0.05$,##$P<0.01$;与白僵菌素低剂量组比较,△$P<0.05$,△△$P<0.01$,△△△$P<0.001$;与白僵菌素中剂量组比较,▲▲$P<0.01$,▲▲▲$P<0.001$。

3.2 各组小鼠肺组织病理学观察 见图1、图2。经HE染色显示：正常组小鼠肺泡壁轻度充血，间质无明显炎细胞浸润；模型组小鼠肺组织中炎细胞浸润明显，肺泡腔结构不清，气道黏膜水肿；地塞米松组小鼠肺组织炎细胞浸润和气道水肿明显减轻；白僵菌素各剂量组随着治疗剂量增加炎细胞浸润程度减轻，肺组织结构接近正常。Masson染色显示：正常组小鼠肺内支气管和血管分支周围有薄层蓝色的胶原纤维，为正常支气管和血管壁基底膜的染色反应；模型组小鼠肺组织成纤维细胞增生，并产生胶原纤维；地塞米松组小鼠肺内支气管、血管分支周围蓝色的染色反应轻微增多，为增生的成纤维细胞产生的胶原纤维；白僵菌素各剂量组随剂量增加，增生的成纤维细胞产生的胶原纤维减少。

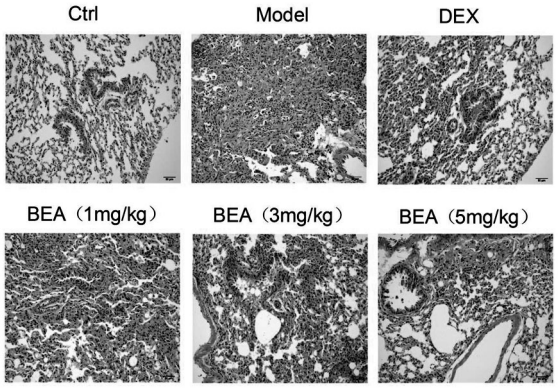

图1 各组小鼠肺组织病理(HE染色，×200)

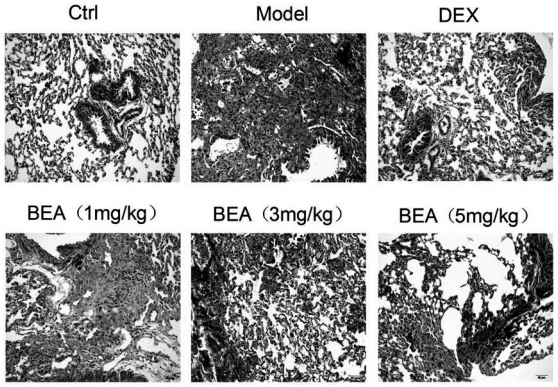

图2 各组小鼠肺组织病理(Masson染色，×200)

3.3 各组小鼠肺组织中Bax、Bcl-2、Caspase3蛋白表达比较 见图3。与正常组比较，模型组Bcl-2表达量增加，BaX和Caspase-3表达减少；地塞米松组较模型组Bcl-2表达降低，BaX和Caspase-3表达增加；白僵菌素可以剂量依赖性地促进Bax和Caspase-3蛋白表达，且抑制Bcl-2蛋白表达。

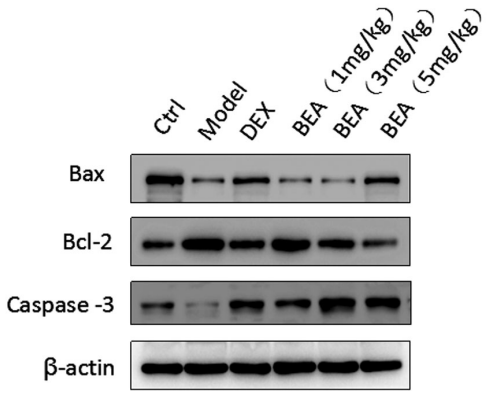

图3 Western Blot测定各组小鼠肺组织Bax、Bcl-2和Caspase-3含量

3.4 各组小鼠血清TNF-α、IL-12含量比较 与正常组比较，模型组小鼠血清TNF-α、IL-12含量均明显升高($P<0.01$)。与模型组比较，地塞米松组与白僵菌素各剂量组小鼠血清TNF-α明显下降($P<0.01$，$P<0.001$)，地塞米松组与白僵菌素中、高剂量组血清IL-12含量明显下降($P<0.01$，$P<0.001$)。地塞米松降低上述指标的效果明显优于白僵菌素，白僵菌素各剂量对上述指标的改善效果呈剂量依赖性。见表2。

表2 各组小鼠血清TNF-α、IL-12含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	TNF-α(pg/mL)	IL-12(pg/mL)
正常组	875.3±25.4**	379.3±25.4**
模型组	1750.6±75.7	746.37±29.7
地塞米松组	400.6±30.4***	181.4±28.4***
白僵菌素低剂量组	920.4±37.5**###	700.4±40.3###
白僵菌素中剂量组	825.7±32.7**###	542.3±15.3**###△
白僵菌素高剂量组	575.3±22.7***#△△▲	325.5±22.8***##△△▲

注：与模型组比较，**$P<0.01$，***$P<0.001$；与地塞米松组比较，#$P<0.05$，##$P<0.01$，###$P<0.001$；与白僵菌素低剂量组比较，△$P<0.05$，△△$P<0.01$；与白僵菌素中剂量组比较，▲$P<0.05$。

4 讨论

支气管哮喘是由嗜酸性粒细胞、肥大细胞和T淋巴细胞等多种炎性细胞参与的气道慢性炎症，其中嗜酸性粒细胞处于核心位置[10]。既往的研究表明，TNF-α参与了哮喘的气道炎性反应。TNF-α可引起气道高反应性，且能诱导肺内炎症细胞如中性粒细胞、嗜酸性粒细胞等聚集生成多种炎症递质。TNF-α可通过介导血管内皮细胞黏附中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞等在炎症部位聚集，刺激细胞生成IL-1、IL-6、IL-8等细胞因子，诱导血管内皮合成纤维细胞合成集落刺激因子，导致嗜酸性粒细胞、肥大细胞等聚集并活化，抑制嗜酸性粒细胞的凋亡，使气道炎症迅速放大并持续存在[11]。IL-12作为Th1

细胞因子，是多活性的细胞因子，行使多种生物学功能，既可调节 Th1/Th2 介导的免疫应答平衡，也能诱导多种细胞因子的产生，可能通过各个免疫环节参与哮喘的发病[12]。糖皮质激素可抑制多种免疫细胞的功能，有效抑制炎症反应的产生及放大，是目前已知抗哮喘气道炎症作用最强的药物。

本研究利用 VOA 激发建立支气管哮喘小鼠模型，模型组小鼠 BALF 细胞总数和嗜酸粒细胞数明显高于正常组，血清 TNF-α 和 IL-12 含量也显著高于正常组，肺组织病理显示出现严重的炎性反应，大量的炎症细胞浸润，伴有胶原组织的增生，提示造模成功。

本研究结果表明，BEA 可以减轻卵蛋白诱发的支气管哮喘模型小鼠的炎症反应，肺组织病理显示随着 BEA 剂量增加，炎细胞浸润减少，胶原增生也减轻，BEA 各剂量组小鼠血清中的炎症因子 TNF-α 和 IL-12 含量也明显低于模型组。研究还发现，BEA 对支气管哮喘模型小鼠肺组织中 Bax 和 Caspase-3 的表达有促进作用，而对 Bcl-2 蛋白的表达有抑制作用，因此推测 BEA 还有促进细胞凋亡的作用。BEA 还可减少支气管哮喘模型小鼠肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞和淋巴细胞的含量，显示 BEA 在抗嗜酸性粒细胞相关炎症方面具有疗效。淋巴细胞在支气管哮喘的发病过程中起着重要的作用，研究发现 T 辅助淋巴细胞分化的 Th1/Th2 型比例失衡是导致气道高反应性和支气管哮喘气道炎症形成的基础，而从 Th0 分化为 Th1 和 Th2 的过程中，IL-12 的水平起到了关键的作用[13]。本研究发现，经过 BEA 治疗的模型小鼠肺泡灌洗液中淋巴细胞数降低，同时肺组织中 IL-12 的表达量降低，说明 BEA 对 T 淋巴细胞介导的免疫反应有一定的抑制作用。BEA 各剂量组的组间分析显示，组间疗效存在差异，BEA 高剂量组 BALF 细胞计数（细胞总数和细胞组分）和血清 TNF-α、IL-12 的含量与中、低剂量组间存在显著性差异，BEA 中剂量组在 BALF 嗜酸性粒细胞计数和血清 IL-12 含量方面与低剂量组有显著性差异，提示 BEA 高剂量给药抑制哮喘模型小鼠气道炎症疗效更好。

综上，白僵菌素可能是白僵蚕发挥抗炎作用的有效成分，但对于其抗炎机制的研究还很不足，是否还存在其他的作用机制有待进一步探讨。另外，本研究主要是着眼于气道炎症，而对涉及哮喘疗效的肺功能等指标没有进行观察，这也是后续研究的重点。

参考文献

[1] Global Initiative for Asthma.Global Strategy for Asthma Management and Prevention[EB/OL].[2017-02-10].http://www.ginasthma.org.

[2] GRIFFITHS C，DREWS S J，MARCHANT D J.Respiratory Syncytial Virus：Infection，Detection，and New Options for Prevention and Treatment[J].Clin Microbiol Rev，2017，30(1)：277.

[3] STOCKS S J，BENSEFA-COLAS L，BERK S F.Worldwide trends in incidence in occupational allergy and asthma [J].Curr Opin Allergy Clin Immunol，2016，16(2)：113.

[4] OLIN J T，WECHSLER M E. Asthma：pathogenesis and novel drugs for treatment[J].BMJ，2014，349：g5517.

[5] GUIHUA X，SHUYIN L，JINLIANG G，et al.Naringin Protects Ovalbumin-Induced Airway Inflammation in a Mouse Model of Asthma[J].Inflammation，2016，39(2)：891.

[6] JIAO H Y，SU W W，LI P B，et al.Therapeutic effects of naringin in a guinea pig model of ovalbumin-induced cough-variant asthma[J].Pulm Pharmacol Ther，2015，33：59.

[7] 张洁，崔应珉.僵蚕治疗哮喘[J].中医杂志，2009，50(8)：724.

[8] 郑建国，杜文.僵蚕治疗过敏性鼻炎疗效确切[J].中医杂志，2009，50(8)：725.

[9] 梁文慧.僵蚕治疗支气管哮喘[J].中医杂志，2009，50(10)：916.

[10] NIXON J，NEWBOLD P，MUSTELIN T，et al.Monoclonal antibody therapy for the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease with eosinophilic inflammation[J].Pharmacol Ther，2017，169：57.

[11] BRIGHTLING C，BERRY M，AMRANI Y.Targeting TNF-alpha：a novel therapeutic approach for asthma [J].J Allergy Clin Immunol，2008，121(1)：5.

[12] SUZUKI M，MATSUMOTO T，OHTA N，et al.Intranasal CpG DNA therapy during allergen exposure in allergic rhinitis[J].Otolaryngol Head Neck Surg，2007，136(2)：246.

[13] MAHAJAN A K，KYLE HOGARTH D. Bronchial Thermoplasty：Therapeutic Success in Severe Asthma Associated with Persistent Airflow Obstruction[J].Journal of Asthma，2012(5)：527.

第一作者：吴刚（1980—），男，医学硕士，副主任医师，从事呼吸系统疾病的中医药诊疗研究。

通讯作者：朱际平，医学博士，副主任医师。zzz-one@163.com

收稿日期：2017-02-13

编辑：吴　宁