

[文章编号] 1000 - 4718(2005)03 - 0555 - 04

微卡对哮喘豚鼠肺组织嗜酸粒细胞凋亡及 Bcl - 2 蛋白表达的影响

赵云峰, 罗永艾

(重庆医科大学附属第一医院肺科, 重庆 400016)

[摘要] 目的 研究微卡对哮喘豚鼠肺组织嗜酸粒细胞凋亡及 Bcl - 2 蛋白表达的影响。方法: 30 只豚鼠随机分为生理盐水组、哮喘组及微卡组, 每组 10 只。微卡组每只豚鼠在 OVA 致敏前 10 d 肌注 22.5 μg 微卡。应用 TUNEL 法检测肺组织嗜酸粒细胞的凋亡, 免疫组化法检测肺组织 Bcl - 2 蛋白的表达。结果: 微卡组豚鼠肺组织嗜酸粒细胞凋亡指数(23.78 \pm 5.42)% 显著高于哮喘组(4.56 \pm 0.68)% ($P < 0.01$); 肺组织 Bcl - 2 蛋白平均积分吸光度值(1 556.3 \pm 492.4) 显著低于哮喘组(2 321.9 \pm 751.2) ($P < 0.05$)。结论: 微卡能诱导哮喘豚鼠肺组织嗜酸粒细胞凋亡, 可能与其抑制 Bcl - 2 蛋白在哮喘豚鼠肺组织的表达有关。

[关键词] 微卡; 哮喘; 嗜酸粒细胞; 细胞凋亡; 蛋白 Bcl - 2; 豚鼠

[中图分类号] R562 **[文献标识码]** A

支气管哮喘是一种以嗜酸粒细胞浸润为主要病理特征的慢性气道炎症性疾病, 减少嗜酸粒细胞浸润有助于哮喘气道炎症的消退^[1], 而嗜酸粒细胞凋亡增加可以减少浸润的嗜酸粒细胞数量^[2]。bcl - 2 原癌基因是目前为止被认为最重要的凋亡抑制基因^[3], 其基因产物可以有效阻止细胞凋亡的发生。微卡(M. vaccae, 母牛分支杆菌菌苗)是一种双向免疫调节剂, 可以明显减少哮喘小鼠支气管肺泡灌洗液中嗜酸粒细胞数量^[4]。末端脱氧核苷酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT)介导的脱氧三磷酸尿嘧啶(dUTP)末端标记法(TUNEL法)常用于检测组织中早期凋亡的细胞, 在此我们应用 TUNEL 法研究微卡对哮喘豚鼠肺组织嗜酸粒细胞凋亡是否有影响, 用免疫组化方法研究肺组织 Bcl - 2 蛋白的表达。

材 料 和 方 法

1 药品及试剂

微卡每瓶 22.5 μg 由安徽龙科马生物制药有限责任公司生产, 卵白蛋白(ovalbumin, OVA, Grade II)购自美国 Sigma 公司, TUNEL 法原位细胞凋亡检测试剂盒购自北京鼎国生物技术有限责任公司, Bcl - 2 免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

2 方法

2.1 实验动物及分组

4 - 5 周龄普通级健康英国种杂毛豚鼠 30 只, 购于重庆医科大学实验动物中心(合格证号: 渝 20020001), 体重 180 - 200 g, 雌雄各半, 分笼饲养。动物室温波动于 18 - 25 $^{\circ}\text{C}$, 普通光照, 自由饮水, 喂食豚鼠专用饲料及富含维生素 C 的蔬菜。30 只豚鼠按随机数字法随机分为生理盐水组、哮喘组及微卡组, 每组 10 只。

2.2 哮喘模型的建立及微卡预防用药 哮喘组及微卡组每只豚鼠于第 1 d 腹腔注射 10% 卵白蛋白 1 mL(用生理盐水配制)致敏, 第 15 d 雾化吸入 0.3% 卵白蛋白激发, 每次 10 min, 连续 10 d, 微卡组豚鼠在卵白蛋白致敏前 10 d 于股部肌肉注射 22.5 μg 微卡(溶于 1 mL 生理盐水中, 每侧肌注 0.5 mL); 生理盐水组于第 1 d 腹腔注射 1 mL 生理盐水, 第 15 d 雾化吸入生理盐水, 每次 10 min, 连续 10 d。

2.3 支气管肺泡灌洗液中炎症细胞计数及分类

最后 1 次激发后 2 h, 用 20% 乌拉坦按 7 mL/kg 腹腔注射麻醉豚鼠, 行气管切开及气管插管(长 6 cm, 内径宽 2 mm) 缝线牢固结扎, 用 pH 值 7.4 的 PBS 液对支气管肺泡进行灌洗并收集支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF), 每次注入 5 mL PBS 液, 反复冲洗 2 次后吸出, 共 3 次, 回收率 80% 以上。将收集的 BALF 摇匀, 取 200 μL BALF, 加入 200 μL 白细胞稀释液^[5], 普通光镜下在血球计数板上计数白细胞, 将其余 BALF 以 1 200 r/min 的速度离心 10 min, 沉淀物涂片, HE 染色后在 400 倍放大倍数下, 计数 500 个细胞, 根据形态学进行白细胞分类计数。

[收稿日期] 2004 - 07 - 08 [修回日期] 2004 - 09 - 21

Tel: 023 - 68898698; E-mail: yfzh71@yahoo.com.cn

2.4 肺组织标本处理 支气管肺泡灌洗完毕后,无菌操作下切取部分肺组织,4%多聚甲醛(含0.1%DEPC)固定,常规石蜡包埋切片分别进行HE染色、TUNEL法测定细胞凋亡和免疫组化方法研究肺组织Bcl-2蛋白的表达。

2.5 TUNEL法原位细胞凋亡检测 主要步骤如下:石蜡切片经二甲苯脱蜡及梯度乙醇脱水,PBS漂洗;蛋白酶K(20 mg/L)37℃消化15 min,PBS漂洗;加入0.3% H₂O₂室温浸泡30 min,PBS漂洗;0.1% TritonX-100冰浴2 min,PBS漂洗,晾干;实验组和阳性对照片加入由末端脱氧核苷酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase,TdT),脱氧三磷酸核苷(deoxyribonucleoside triphosphate,dNTP)和生物素标记的脱氧三磷酸尿苷(deoxyuridine triphosphate,dUTP)组成的混合物10 μL,37℃孵育60 min,缓冲液A漂洗;加入封闭液50 μL,37℃孵育30 min后弃封闭液;加入含有碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,AP)标记的链亲和素的显色反应液40 μL,37℃孵育30 min,缓冲液B漂洗;NBT/BCIP(nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate disodium salt,硝基四唑氮蓝/5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸盐)显色,置暗盒中20 min,缓冲液B漂洗;0.5%甲基绿复染20 s,酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

2.6 Bcl-2免疫组化实验过程 参照试剂盒说明书进行操作。

2.7 结果判定及图像处理 镜下观察:凋亡的嗜酸粒细胞为蓝紫色双核或单核,胞浆不着色。Bcl-2

蛋白表达阳性细胞浆着色呈棕黄色。每张切片高倍镜下(×400)随机选取5个视野,分别计算嗜酸粒细胞数量(HE染色)及嗜酸粒细胞凋亡指数(TUNEL法),凋亡嗜酸粒细胞占相应嗜酸粒细胞的百分比,AI)。每张Bcl-2免疫组化切片应用GD-8型病理图像分析系统在低倍镜下(×100)随机选取5个视野,每个视野的积分吸光度值作为Bcl-2蛋白表达量,计算平均值作为该切片代表值。染色越深,积分吸光度值越大,反映Bcl-2蛋白表达量越多。

3 统计学处理

各组实验数据用SPSS统计软件处理,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较进行 q 检验,率的比较进行卡方检验。

结 果

1 豚鼠激发后反应

生理盐水组豚鼠雾化吸入生理盐水后与吸入前呼吸无变化。哮喘组豚鼠雾化吸入OVA后,立即用前爪搔抓面部,进而出现呼吸加快、加深、咳嗽、点头呼吸,口唇紫绀,部分可闻及哮鸣音,重者出现跌倒。微卡组豚鼠只表现为呼吸频率稍微增加,无上述哮喘发作的表现。

2 BALF中白细胞总数及分类

哮喘组BALF中白细胞总数、嗜酸粒细胞及嗜酸粒细胞占白细胞总数百分比均显著高于生理盐水组(均 $P < 0.01$)。微卡组BALF中该3项指标均显著低于哮喘组(均 $P < 0.01$)。见表1。

表1 3组豚鼠BALF中白细胞总数及其分类

Tab 1 Total and differential count of WBC in BALF of three group guinea pigs ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Group	Total cell($\times 10^8/L$)	Eosinophi(%)	Macrophage(%)	Neutrophil(%)	Lymphocyte(%)
Saline	2.04 ± 0.42	0	87.3 ± 5.2	2.4 ± 0.8	10.3 ± 5.1
Asthma	5.30 ± 0.92*	21.8 ± 3.0*	64.2 ± 3.4	4.7 ± 1.4	9.6 ± 4.1
M. vaccae	3.26 ± 0.80#	6.3 ± 2.1#	70.5 ± 6.1	7.8 ± 1.3	15.4 ± 9.4

* $P < 0.01$ vs saline group; # $P < 0.01$ vs asthma group.

3 肺组织形态改变

HE染色肺组织切片光镜可见生理盐水组支气管管腔光滑、上皮完整、气道黏膜无水肿,肺泡间隔正常,气道及肺泡偶见嗜酸粒细胞浸润。哮喘组气道黏膜明显水肿,黏膜基层增厚,杯状细胞增多,支气管管腔缩小,部分可见黏液栓,气道周围血管扩张充血,气道黏膜层、黏膜下层、血管周围组织、肺泡壁及肺泡腔内有大量炎性细胞浸润,以嗜酸粒细胞为主,嗜酸粒细胞核可见分叶和单核等形态,肺泡腔

巨噬细胞也增多,肺泡隔增厚,肺泡腔呈过度充气状态。微卡组气道黏膜无明显水肿,管腔无缩小,气道黏膜有少量嗜酸粒细胞浸润,较哮喘组明显为少,肺泡间隔未见异常。

4 肺组织嗜酸粒细胞数量及其凋亡

生理盐水组豚鼠气道及肺组织未见嗜酸粒细胞凋亡。微卡组肺组织嗜酸粒细胞数量平均为(12.4 ± 3.7)个/HP,显著低于哮喘组(64.5 ± 8.6)个/HP($P < 0.01$)。嗜酸粒细胞凋亡指数平均为(23.78 ±

5.42)% ,显著高于哮喘组(4.56 ± 0.68)%($P < 0.01$)。见图 1-3。

5 肺组织 Bcl-2 蛋白表达

生理盐水组豚鼠肺组织 Bcl-2 蛋白为弱阳性表达 ,平均积分吸光度值为 739.4 ± 255.6 ;哮喘组为强阳性表达 ,平均积分吸光度值为 2321.9 ± 751.2 ,主要表达细胞为嗜酸粒细胞 ;而微卡组为弱阳性表达 ,平均积分吸光度值为 1556.3 ± 492.4 ,显著低于哮喘组($P < 0.05$)。见图 4-6。

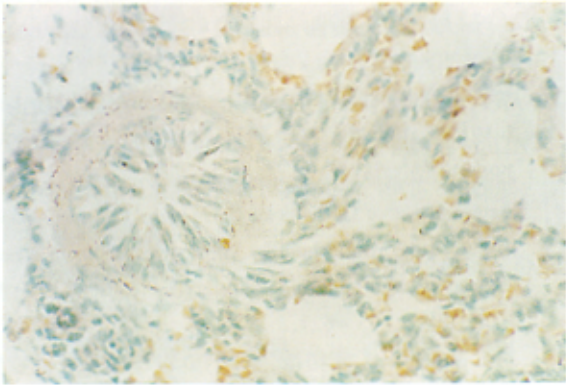


Fig 1 There is no eosinophil apoptosis in lung tissue of NS group guinea pig (TUNEL, ×400).

图 1 生理盐水组豚鼠肺组织无嗜酸粒细胞凋亡

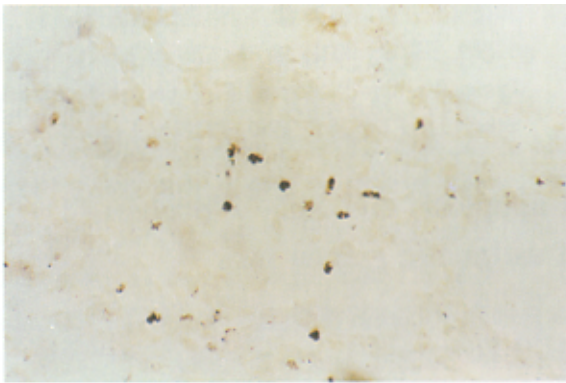


Fig 2 There is a few eosinophil apoptosis in lung tissue of asthma group guinea pig (TUNEL, ×400).

图 2 哮喘组豚鼠肺组织可见少量嗜酸粒细胞凋亡

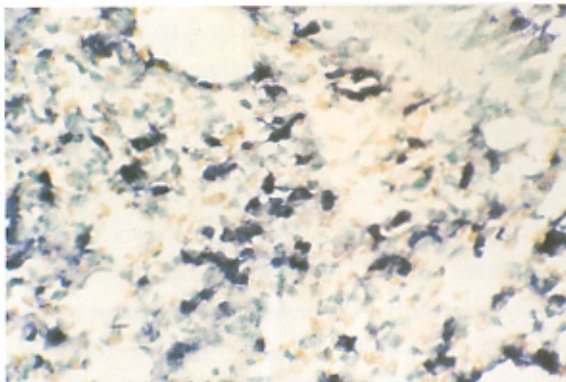


Fig 3 There is a lot of eosinophil apoptosis in lung tissue of M.vacciae group guinea pig (TUNEL, ×400).

图 3 微卡组豚鼠肺组织可见大量嗜酸粒细胞凋亡

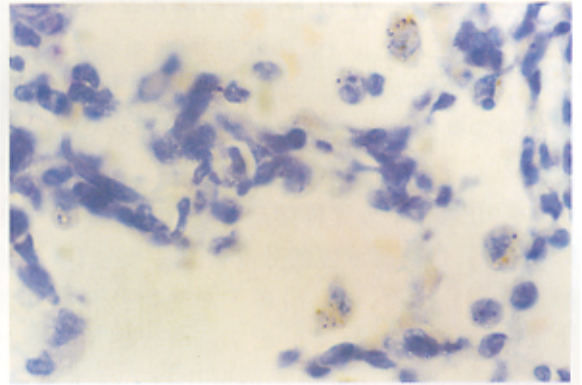


Fig 4 There is weak expression of Bcl-2 protein in lung tissue of NS group guinea pig (immunohistochemistry, ×400).

图 4 生理盐水组豚鼠肺组织 Bcl-2 蛋白弱表达

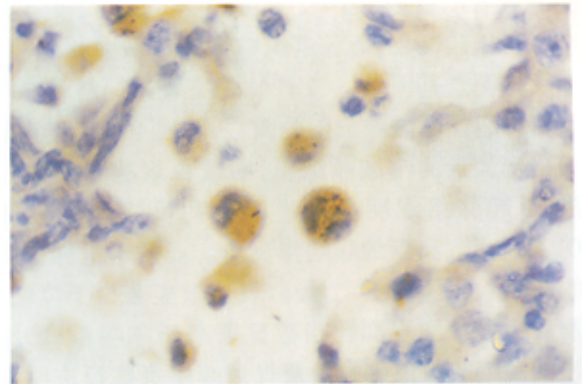


Fig 5 There is strong expression of Bcl-2 protein in eosinophils in lung tissue of asthma group guinea pig (immunohistochemistry, ×400).

图 5 哮喘组豚鼠肺组织嗜酸粒细胞中 Bcl-2 蛋白呈强阳性表达

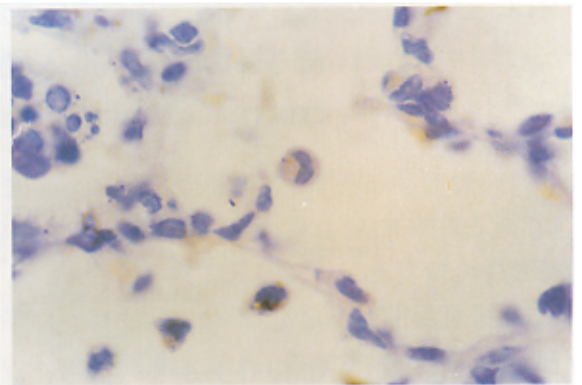


Fig 6 There is weak expression of Bcl-2 protein in eosinophils in lung tissue of M.vacciae group guinea pig (immunohistochemistry, ×400).

图 6 微卡组豚鼠肺组织嗜酸粒细胞中 Bcl-2 蛋白呈弱阳性表达

讨 论

支气管哮喘慢性气道炎症的形成与嗜酸粒细胞增殖、活化、浸润密切相关^[6,7] ,研究发现哮喘可能存在嗜酸粒细胞凋亡受抑或凋亡缺陷。 *bcl-2* 原癌基因在嗜酸粒细胞凋亡中研究最多。 *bcl-2* 基因家族

中, *bcl-2*、*bcl-XL* 具有促进细胞生长、抑制凋亡的作用, 而 *bax*、*bcl-XS* 具有促进细胞凋亡的作用。*bcl-2* 抗凋亡的作用与抗氧自由基以及维持线粒体膜的稳定性、抑制细胞色素 C 和凋亡诱导因子释放有关^[3]。

微卡是母牛分支杆菌经生物技术处理冻干而成的注射剂, 含有高浓度的分支杆菌 I 型抗原, 具有双向免疫调节作用, 可以提高正常动物及免疫功能低下动物的免疫功能; 而对处于超敏状态下免疫功能亢进动物的免疫功能则起抑制作用。被 WHO 推荐为治疗结核病的唯一一种免疫制剂。

本实验结果显示, 哮喘组豚鼠肺组织嗜酸粒细胞胞浆有明显的 Bcl-2 蛋白表达, 肺组织仅有少量嗜酸粒细胞凋亡, 而肺组织中大量嗜酸粒细胞浸润, 表明抑凋亡基因 *bcl-2* 产物的高表达抑制了哮喘组豚鼠肺组织嗜酸粒细胞的凋亡, 造成 BALF 及肺组织中出现大量的嗜酸粒细胞, 嗜酸粒细胞释放炎性介质, 引起肺组织明显的哮喘炎症反应和豚鼠雾化 OVA 后出现典型的哮喘样反应。而微卡组豚鼠肺组织嗜酸粒细胞 Bcl-2 蛋白表达量显著少于哮喘组, 而且嗜酸粒细胞凋亡指数显著高于哮喘组, 肺组织浸润的嗜酸粒细胞数量及气道哮喘炎症反应明显轻于哮喘组, 表明微卡能够抑制 Bcl-2 蛋白在哮喘豚鼠肺组织嗜酸粒细胞的表达, 从而诱导嗜酸粒细胞凋亡, 使 BALF 中及肺组织浸润的嗜酸粒细胞数量显著减少, 进而明显减轻豚鼠受到 OVA 激发后的反应。

综上所述, 在卵白蛋白致敏豚鼠前肌注微卡能够明显减轻哮喘豚鼠雾化吸入卵白蛋白后的哮喘样反应, 显著减少 BALF 及肺组织嗜酸粒细胞的数量, 减轻肺组织哮喘炎症反应, 表明微卡对哮喘豚鼠模型的形成有预防作用。

[参 考 文 献]

[1] Walsh GM. Eosinophil apoptosis: Mechanisms and clinical relevance in asthmatic and allergic inflammation[J]. Br J Haematol, 2000, 111(1): 61-67.

[2] Kankaanranta H, Lindsay MA, Giembycz MA, et al. Delayed eosinophile apoptosis in asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2000, 106(1pt1): 77-83.

[3] 刘艳, 荆玉红, 孙宏丽, 等. M₃ 受体与大鼠缺血性心肌细胞凋亡关系的研究[J]. 药学报, 2004, 39(5): 338-341.

[4] Zuany-Amorim C, Sawicka E, Manlius C, et al. Suppression of airway eosinophilia by killed mycobacterium vaccae-induced allergen-specific regulatory T-cell[J]. Nat Med, 2002, 8(6): 625-629.

[5] 刘金保, 钟南山, 李树浓, 等. PPD 对豚鼠实验性哮喘气道炎症的作用[J]. 免疫学杂志, 2002, 18(5): 350-352.

[6] 熊建平, 毕延芹, 孙祥英. 吸入低氧气体对哮喘缓解期豚鼠嗜酸性粒细胞和 CD₄⁺ T 淋巴细胞的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(6): 670-672.

[7] Drazen JM, Arm JP, Austen KF. Sorting out the cytokines of asthma[J]. J Exp Med, 1996, 183(1): 1-5.

Effects of *M. vaccae* on eosinophil apoptosis and Bcl-2 protein expression in lung tissues of asthmatic guinea pigs

ZHAO Yun-feng, LUO Yong-ai

(Department of Pulmonology, The First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

[ABSTRACT] AIM: To study the effects of *M. vaccae* on eosinophil apoptosis and Bcl-2 protein expression in lung tissues of asthmatic guinea pigs. METHODS: 30 guinea pigs were divided into normal saline (NS) group, asthma group and *M. vaccae* treatment group at random, every group included 10 guinea pigs. Guinea pigs in *M. vaccae* treatment group were injected intramuscularly with 22.5 μg *M. vaccae* 10 days before OVA immunization. TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) technique was used to investigate the apoptosis of eosinophils and immunohistochemistry method was used to study the expression of Bcl-2 protein in lung tissues. RESULTS: The apoptosis index (AI) of eosinophils in lung tissues in *M. vaccae* treatment group was significant higher than that in asthma group [(23.78 ± 5.42)% vs (4.56 ± 0.68)%, *P* < 0.01]. The mean optical density value of Bcl-2 protein in lung tissues of *M. vaccae* treatment group was significant lower than that of asthma group [(1 556.3 ± 492.4) vs (2 321.9 ± 751.2), *P* < 0.05]. CONCLUSION: The apoptosis of eosinophils induced by *M. vaccae* in lung tissues of asthmatic guinea pigs may be due to the inhibition of Bcl-2 protein expression.

[KEY WORDS] *M. vaccae*; Asthma; Eosinophils; Apoptosis; Protein, Bcl-2; Guinea pig