

## • 基础研究 •

糖皮质激素对哮喘大鼠气道上皮细胞 NF- $\kappa$ B/ICAM-1 表达的影响

王宏伟,邵玉霞,梁蕊

[摘要] 目的 探讨糖皮质激素(布地奈德混悬液)对核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)、细胞间粘附分子-1(ICAM-1)在哮喘大鼠气道上皮细胞表达的影响。方法 将 30 只大鼠随机分为对照组、哮喘组、布地奈德治疗组,应用免疫组化技术结合计算机病理图像分析系统测定大鼠气道上皮胶原的沉积和气道上皮细胞 NF- $\kappa$ B/ICAM-1 的相对含量。结果 哮喘组 NF- $\kappa$ B/ICAM-1 的表达水平、气道上皮胶原的沉积明显高于对照组及布地奈德治疗组(均  $P < 0.01$ ),气道上皮细胞 NF- $\kappa$ B 与 ICAM-1 表达呈正相关( $r = 0.61, P < 0.01$ ), ICAM-1 的表达水平与气道上皮胶原含量呈正相关( $r = 0.47, P < 0.01$ )。结论 NF- $\kappa$ B/ICAM-1 在哮喘气道重构的发生机制中发挥重要作用,早期应用布地奈德可能通过下调 NF- $\kappa$ B/ICAM-1 的表达,干预气道重构。

[关键词] 哮喘;气道重构;核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B);细胞间粘附分子-1(ICAM-1);糖皮质激素

Effects of inhaled budesonide on the expression of nuclear factor  $\kappa$ B and intercellular adhesion molecule 1 in airway epithelial cells of asthma rats WANG Hong-wei, SHAO Yu-xia, LIANG Rui. Department of Respiration, Affiliated 2nd Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang, China

[Abstract] Objective To investigate the effects of early inhaled budesonide on the expression of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and intercellular adhesion molecule (ICAM-1) in airway epithelial cells of asthma rats. Methods 30 rats were randomly divided into three groups: control group, asthma group and therapeutic group with inhaled budesonide. The expression of NF- $\kappa$ B and ICAM-1 in bronchial epithelium were observed with immunohistochemical staining and computer image analysis system. Results The expression of NF- $\kappa$ B, ICAM-1 and subepithelial collagen deposition were significantly higher in asthma group than those of control group and of therapeutic group ( $P < 0.01$  respectively). There was a close correlation between the expression of NF- $\kappa$ B and ICAM-1 in asthma rats ( $r = 0.61, P < 0.01$ ), as well as between the expression of ICAM-1 and subepithelial collagen ( $r = 0.47, P < 0.01$ ). Conclusion The excessive expression of NF- $\kappa$ B and ICAM-1 play an important role in the pathogenesis of airway remodeling in asthma. Budesonide can influence airway remodeling by downregulating the expression of NF- $\kappa$ B and ICAM-1.

[Key words] asthma; airway remodeling; nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B); intercellular adhesion molecule (ICAM-1); glucocorticoid

中图分类号: R562.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2006)01-0041-02

[本文著录格式] 王宏伟,邵玉霞,梁蕊.糖皮质激素对哮喘大鼠气道上皮细胞 NF- $\kappa$ B/ICAM-1 表达的影响[J].中国康复理论与实践,2006,12(1):41-42.

核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 是一种调控基因表达的 DNA 结合蛋白,其可通过调控细胞因子和粘附分子基因的表达,参与机体的各种炎症和免疫反应<sup>[1]</sup>,而细胞间粘附分子-1(ICAM-1)在哮喘炎症形成和气道重构中发挥了极为重要的作用。我们拟通过检测哮喘大鼠气道上皮细胞 NF- $\kappa$ B 亚单位 p65 蛋白和 ICAM-1 的蛋白表达,探讨 NF- $\kappa$ B/ICAM-1 的表达和哮喘气道重构的关系以及布地奈德的干预作用。

## 1 材料和方法

1.1 哮喘模型制备与分组 健康雄性大鼠 30 只,体重 120~180 g,随机分为哮喘组、布地奈德治疗组和生理盐水对照组,每组 10 只。哮喘组和布地奈德组每只腹腔内注射抗原液 1 ml(含卵蛋白 100 mg、灭活百日咳杆菌  $5 \times 10^9$  个、氢氧化铝干粉 100 mg)致敏,2 周后用超声雾化器向自制雾化吸入箱内喷雾 1%卵蛋白,

使动物吸入 30 min 激发哮喘,每日 1 次,连续吸入 8 周。每日激发前 30 min,布地奈德组先雾化吸入 0.02%的布地奈德 20 min,30 min 后再吸入卵蛋白。抗原激发后,以大鼠出现呼吸急促,严重者呼吸减慢或节律不整、轻度紫绀、四肢无力、行动迟缓或俯伏不动等为激发成功标志。对照组用生理盐水代替抗原液致敏和激发,每日 1 次,连续吸入 8 周。

1.2 取材及染色 各组大鼠分别于末次激发后 24 h 内用 1%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔麻醉下开胸,经右心室插管至肺动脉,用生理盐水快速冲洗后取右肺中叶,置于 10%甲醛中固定。右肺石蜡切片、HE 染色,苦味酸-天狼猩红染色,测量胶原面积(Wcol),用 Wcol/Pbm 表示胶原沉积面积。

采用过氧化物酶标记的 SABC 法行 NF- $\kappa$ B、ICAM-1 免疫组化染色:一抗选用兔抗大鼠 NF- $\kappa$ B、ICAM-1 单克隆抗体,稀释为 1:200。用 SABC 试剂盒(武汉博士德生物有限公司)进行操作,分别按顺序加一抗多克隆抗体、NF- $\kappa$ B/ICAM-1 二抗生物素标记的 IgG 工作液、辣根酶标记的链霉卵白素工作液,再行 DAB 显色及苏木素复染。阴性对照以磷酸盐缓冲液

基金项目:黑龙江省科技攻关课题(GC04C30502)。

作者单位:哈尔滨医科大学附属第二医院呼吸科,黑龙江哈尔滨市 150086。作者简介:王宏伟(1969-),男,黑龙江兰西县人,硕士,主治医师,主要研究方向:支气管哮喘气道重构机制。通讯作者:邵玉霞。

(PBS) 代替一抗而其他条件相同。阳性信号为胞浆内棕黄色颗粒。每张片子选择内径 100 ~ 200  $\mu\text{m}$  的细支气管连同周围肺泡区,随机选取 3 个视野,计算机自动测量并计算阳性信号积分吸光度。

1.3 统计学分析 所有数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 SPSS 软件进行统计分析,计量资料采用方差分析,以  $P < 0.05$  为有显著性差异,两变量的相关性检验用直线相关分析。

## 2 结果

2.1 病理学改变 光镜下观察,与对照组相比,哮喘组大鼠气道壁及平滑肌明显增厚,上皮细胞脱落,管腔狭窄,管壁内及周围炎性细胞浸润。布地奈德治疗组上述改变明显减轻。

2.2 NF- $\kappa\text{B}$  及 ICAM-1 免疫组织化学染色 胶原沉积情况 哮喘组大鼠气道上皮细胞 NF- $\kappa\text{B}$  及 ICAM-1 均明显高于对照组(均  $P < 0.01$ );治疗组 NF- $\kappa\text{B}$  及 ICAM-1 较哮喘组明显减少(均  $P < 0.01$ );哮喘组胶原含量明显高于对照组( $P < 0.01$ );而治疗组胶原含量介于两者之间。见表 1,封三彩图 4.1 ~ 4.6。

表 1 各组 NF- $\kappa\text{B}$  ICAM-1 和胶原沉积结果比较(吸光度)

组别	n	NF- $\kappa\text{B}$	ICAM-1	胶原
正常对照组	10	37.33 $\pm$ 6.28	17.6 $\pm$ 3.01	5.13 $\pm$ 0.91
哮喘模型组	10	69.00 $\pm$ 9.53 <sup>a</sup>	42.33 $\pm$ 5.57 <sup>a</sup>	13.30 $\pm$ 2.54 <sup>a</sup>
激素治疗组	10	51.67 $\pm$ 6.98 <sup>a,b</sup>	29.00 $\pm$ 6.16 <sup>a,b</sup>	9.28 $\pm$ 1.56 <sup>a,b</sup>

注:a:与对照组相比, $P < 0.01$ ;b:与哮喘组相比, $P < 0.01$ 。

2.3 相关性分析 气道上皮细胞 NF- $\kappa\text{B}$  与 ICAM-1 表达水平呈明显正相关( $r = 0.61$ ,  $P < 0.01$ ),哮喘组 ICAM-1 与上皮下胶原沉积呈明显正相关( $r = 0.47$ ,  $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

传统观点认为哮喘的特征是气道的慢性炎症、可逆性的气道阻塞,但近年来普遍认为是慢性气道炎症引起气道壁结构改变(即气道重构)的结果。多种炎性细胞、生长因子、炎性介质、细胞因子及酶类形成复杂的网络参与气道重构。气道平滑肌细胞和粘膜下成纤维细胞等在长期慢性气道炎症刺激下,气道平滑肌细胞增生、肥大,胶原沉积,导致管腔狭窄,致使哮喘症状慢性化和顽固化。

NF- $\kappa\text{B}$  是 I $\kappa\text{B}$  蛋白家族中两个亚单位构成的二聚体复合物,其中 p65 和 p50 组成的异源二聚体最具代表性。正常情况下,在胞浆内 NF- $\kappa\text{B}$  与 I $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$  的抑制蛋白)结合,呈无活性状态,当某些细胞外刺激信号,如多种细胞因子、变应原等引起 I $\kappa\text{B}$  的两个 N 末端丝氨酸残基磷酸化,I $\kappa\text{B}$  从而被称 26S 的蛋白酶降解,

使 NF- $\kappa\text{B}$  与 I $\kappa\text{B}$  解离,NF- $\kappa\text{B}$  随即被激活而进入细胞核内,与其调控的靶基因的特异位点结合,激活其靶基因的转录<sup>[1-2]</sup>。

ICAM-1 属于免疫球蛋白超家族的一种细胞表面粘附分子,Cunter 等人发现,ICAM-1 基因由 7 个外显子和 6 个内含子组成,其上游序列在真核基因表达及调控方面起着重要作用。ICAM-1 的分布十分广泛,包括各种上皮细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞、网状细胞、单核巨噬细胞和淋巴细胞等。一些细胞因子,如 TNF- $\alpha$ 、IL-1、NF- $\kappa\text{B}$  可促进 ICAM-1 的表达。

ICAM-1 在嗜酸性粒细胞粘附和跨内皮细胞移行中起重要作用。上皮基膜下间质胶原沉积是哮喘的病理标志之一,增厚的网状层主要成分是 III 型、V 型胶原,以及少量的 I 型胶原和纤维连接蛋白<sup>[3-4]</sup>。有人把 III 型、V 型胶原的增多和成纤维细胞的出现作为气道重构的标志物;而 I 型胶原的改变,尤其是 I / III 型胶原的比值可作为新的胶原合成的敏感指标。

本实验用卵蛋白作为激发因子,反复诱导大鼠哮喘发作,从支气管肺组织切片上均可看到大量炎细胞浸润,胶原沉积,符合哮喘气道重构的病理改变,实验模型成立。免疫组化结果显示,哮喘大鼠气道上皮细胞 NF- $\kappa\text{B}$  及 ICAM-1 表达明显高于对照组和普米克治疗组。说明哮喘时,在炎症、过敏原等刺激下,NF- $\kappa\text{B}$  被激活,调控其靶基因(ICAM-1 等)转录;上皮细胞 ICAM-1 表达上调增加了炎性细胞在该部位的募集及胶原的沉积(ICAM-1 与胶原沉积呈正相关,提示 ICAM-1 可能引起胶原沉积增加),加重上皮细胞的损伤,最终导致气道重构的发生。

随着人们对哮喘概念的更新,糖皮质激素已被推荐为一线治疗药物<sup>[5]</sup>。吸入性糖皮质激素通过局部给药,不仅减少了全身给药的不良反应,而且能够达到更好的肺沉积率,发挥最佳的抗炎功效。本实验的结果提示,早期应用布地奈德可能通过下调 NF- $\kappa\text{B}$  的表达,减少 ICAM-1 的表达,从而减轻上皮细胞的损伤。

## [参考文献]

- [1] Blackwell TS, Christman JM. The role of factor-kappa B in cytokine gene regulation[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997, 17: 3 - 9.
- [2] Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, et al. Airway wall in asthma[J]. Chest, 2003, 123(3 suppl): 417s - 22s.
- [3] Holgate ST. Inflammation and structural changes in the airway of patients with asthma[J]. Respir Med, 2000, 94: 53 - 56.
- [4] Wilson JW, Li X. The measurement of reticular basement membrane and submucosal collagen in the asthmatic airway[J]. Clin Exp Allergy, 1997, 27(4): 363 - 371.
- [5] 张志平. 压缩雾化吸入辅助治疗小儿哮喘时的行为干预[J]. 中国康复理论与实践, 2005, 11(4): 308.

(收稿日期: 2005-11-01)



图 4.1 哮喘组大鼠气道上皮细胞  
NF- $\kappa$ B 的表达 (SABC, 400  $\times$ )



图 4.2 治疗组大鼠气道上皮细胞 NF- $\kappa$ B 的表达 (SABC, 400  $\times$ )



图 4.3 哮喘组大鼠气道上皮细胞  
ICAM-1 的表达 (SABC, 400  $\times$ )

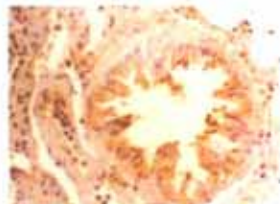


图 4.4 治疗组大鼠气道上皮细胞  
ICAM-1 的表达 (SABC, 400  $\times$ )



图 4.5 哮喘组大鼠粘膜下胶原的沉  
积 (SABC, 400  $\times$ )



图 4.6 治疗组大鼠粘膜下胶原的沉积  
(SABC, 400  $\times$ )

图 1.1—图 1.8 正文见 P6

Fig. 2.1—Fig. 2.5 正文见 P12—13

图 3.1—图 3.3 正文见 P15

图 4.1—图 4.6 正文见 P42