

三氧化二砷对哮喘豚鼠肺内嗜酸性粒细胞凋亡的影响^{*}

周林福 殷凯生

内容提要 目的:研究三氧化二砷(As_2O_3)对哮喘豚鼠肺内嗜酸性粒细胞(EOS)凋亡的影响及其作用机制。方法:豚鼠 30 只随机分为 3 组,即对照组、哮喘组和 As_2O_3 (2mg/kg)治疗组。采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的脱氧三磷酸尿嘧啶缺口末端标记(TdT-mediated dUTP nick end labelling, TUNEL)技术原位标记细胞凋亡,计算机图像分析技术对气道壁 EOS 浸润和 EOS 凋亡进行定量测定。结果:对照组豚鼠气道壁 EOS 计数(4.4 ± 2.5)个/HP, EOS 凋亡指数为(0.42 ± 0.08)%;与对照组比较,哮喘组豚鼠气道壁 EOS 浸润显著增加($P < 0.01$), EOS 凋亡指数显著下降($P < 0.01$); As_2O_3 治疗组,气道壁 EOS 浸润显著下降($P < 0.01$), EOS 凋亡指数显著增加($P < 0.01$),并且气道壁 EOS 浸润数量与 EOS 凋亡指数之间呈显著性负相关($r = -0.949, P < 0.01$)。结论:EOS 凋亡异常是支气管哮喘的一个重要的发病机制; As_2O_3 通过促进肺内 EOS 凋亡,下调 EOS 浸润数量,从而减轻了哮喘气道炎症;小剂量 As_2O_3 治疗哮喘既有效又相对安全,具有潜在的应用价值。

关键词 三氧化二砷 支气管哮喘 嗜酸性粒细胞 细胞凋亡

Effect of Arsenic Trioxide on Apoptosis of Pulmonary Eosinophile in Asthmatic Guinea-Pigs ZHOU Lin-fu, YIN Kai-sheng *The First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing (210029)*

Objective: To study the effect and mechanism of arsenic trioxide (As_2O_3) on apoptosis of pulmonary eosinophiles (PE) in asthmatic guinea-pigs. **Methods:** Thirty guinea-pigs were divided into 3 groups at random, the control group, the asthmatic group and the As_2O_3 group. The dosage of As_2O_3 used was 2 mg/kg. The apoptotic PE were labelled by TdT-mediated dUTP nick end labelling technique, and the PE infiltration and apoptosis were detected quantitatively using computerized image analysis technique. **Results:** In the control group, the amount of infiltrating PE was 4.4 ± 2.5 cells/HP and the PE apoptotic index (AI) was $0.42 \pm 0.08\%$. In the asthmatic group, the amount increased ($P < 0.01$) and AI decreased significantly ($P < 0.01$). After the asthmatic animals had been treated with As_2O_3 , the two parameters changed reversedly significantly ($P < 0.01$), and there was a significantly negative correlation between them ($r = -0.949, P < 0.01$). **Conclusion:** The PE apoptosis abnormality is one of the important mechanisms that cause bronchial asthma, As_2O_3 could alleviate the airway inflammation through promoting PE apoptosis and lower PE infiltration. Low dose of As_2O_3 is proved to be effective with relative safety, it also has potential value in treating asthma.

Key words arsenic trioxide, bronchial asthma, eosinophile, cell apoptosis

支气管哮喘(简称哮喘)是一种以嗜酸性粒细胞(EOS)浸润为主要病理特征的慢性气道变应性炎症, Th2 细胞是引起和维持这种炎症反应的重要因素⁽¹⁾。EOS 是一种终末分化细胞,在哮喘气道炎症消长的过程中成为关键的效应细胞, EOS 凋亡受抑可能是肺组织 EOS 浸润增加的一个重要机制⁽²⁾。

近年来,应用三氧化二砷(As_2O_3)治疗急性早幼粒

细胞白血病(APL),取得了令人瞩目的进展,诱导 APL 细胞凋亡是其最重要的治疗机制⁽³⁾。据此,笔者采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的脱氧三磷酸尿嘧啶缺口末端标记(TUNEL)技术和计算机图像分析技术,研究 As_2O_3 对哮喘豚鼠肺内 EOS 凋亡的作用,为阐明 As_2O_3 治疗哮喘的作用机制提供实验依据。

材料与方法

1 动物 选择清洁级健康雄性豚鼠 30 只,体重(300 ± 50)g,由南京军区南京总医院实验动物中心提供。

^{*} 江苏省中医管理局基金资助项目(No. 9974)

南京医科大学第一附属医院呼吸内科(南京 210029)

2 药物 亚砷酸注射液每支含 As_2O_3 10mg, 哈尔滨伊达药业有限公司生产, 批号: 19990191。

3 试剂与仪器 试剂: Grade II 鸡卵白蛋白 (OVA) 美国 Sigma 公司产品; PBS 为福州迈新生物制品有限公司产品; 氯胺酮注射液每支 100mg, 江苏恒瑞医药股份有限公司产品; TUNEL 试剂盒, 德国 Roche 公司产品。仪器: IEC601-1 型超声波雾化吸入器, 德国 Boehringer Ingelheim 公司产品; 2135 型石蜡切片机, 德国 Leica 公司产品; NYD-1000 型计算机彩色图像分析系统, 由南京医科大学和东南大学联合研制。

4 实验方法

4.1 模型的建立、分组及给药方法 颗粒饲料辅以新鲜蔬菜喂养, 自由饮水, 适应环境 3 天后, 随机分为 3 组, 每组 10 只, 即对照组 (第 1 组)、哮喘组 (第 2 组) 和 As_2O_3 治疗组 (第 3 组)。第 2 组和第 3 组豚鼠分别于实验第 1 天和第 8 天腹腔内注射 10% OVA 溶液 1ml 两次致敏, 于实验第 15 天起开始雾化吸入 1% OVA 气溶胶诱喘, 每天 1 次, 每次 30s, 连续 1 周, 以出现烦躁、呛咳、呼吸深快和点头运动等症状为激发成功, 其中第 3 组豚鼠每次在雾化吸入后 0.5h, 腹腔内注射按 2mg/kg 浓度配制的 As_2O_3 溶液 2ml, 第 1 组豚鼠则按上述各时间段分别于腹腔内注射或雾化吸入等量生理盐水作为正常对照。

4.2 观察项目及检测方法 于实验第 25 天每只以氯胺酮 2mg 腹腔内注射麻醉并处死豚鼠, 取右肺中下叶, 10% 中性甲醛溶液固定 24h 后, 常规石蜡包埋和切片, 厚 $4\mu m$, 分别做 HE 染色和 TUNEL 标记。TUNEL 法细胞凋亡原位检测, 参照 TUNEL 试剂盒说明书进行操作, 主要步骤如下: (1) 石蜡切片经二甲苯脱蜡及梯度酒精脱水, PBS (0.01mol/L, pH7.4) 漂洗 5min, 共 2 次; (2) 蛋白酶 k (2mg/L) 37℃ 消化 15min, PBS 漂洗 5min, 共 3 次; (3) DNA 平衡液平衡阳性对照片 2min 后, 加入 DNase I, 37℃ 反应 10min; (4) 实验组和阳性对照片分别加入 TUNEL 工作液 (1:19 稀释) 50 μ l, 37℃ 孵育 45min, PBS 漂洗 5min, 共 3 次; (5) 加入碱性磷酸酶 (AP) 标记的抗荧光素抗体 50 μ l, 37℃ 孵育 30min, PBS 漂洗 5min, 共 3 次; (6) 经 Buffer III 平衡后, NBT/BCIP 显色, 室温下暗处显色至阳性对照显色良好时终止呈色反应; (7) 缓冲甘油 (PBS: 甘油 = 1:3) 封片和观察。计算机图像分析以肺内支气管为分析对象, 由同一观察者在每张切片中随机选取 5 个高倍视野 ($\times 400$), 分别测定支气管壁 EOS 浸润计数 (HE 染色) 和 EOS 凋亡指数 (TUNEL

标记), 计算其平均值作为该切片的代表值。

5 统计学方法 采用 SAS 软件进行统计分析, 各组间均数的比较采用 q 检验, SPSS 软件对支气管壁 EOS 浸润计数和 EOS 凋亡指数进行 Pearson 相关性分析。

结 果

1 对照组豚鼠肺内支气管壁 EOS 浸润计数和 EOS 凋亡的形态学特点 见图 1。以胞核染成紫蓝色的细胞为阳性凋亡细胞, 结合肺组织内 EOS 浸润和细胞凋亡的动态变化判断阳性 EOS 凋亡细胞, EOS 凋亡细胞占相应 EOS 的百分比即为其凋亡指数。对照组豚鼠支气管壁 EOS 计数为 (4.4 ± 2.5) 个/HP, EOS 凋亡指数为 $(0.42 \pm 0.08)\%$ 。

2 哮喘组豚鼠肺内支气管壁 EOS 浸润计数和 EOS 凋亡的特点 见图 2。与对照组比较, 哮喘组豚鼠支气管壁 EOS 计数为 (78.6 ± 9.2) 个/HP, 呈显著增加 ($P < 0.01$), EOS 凋亡指数为 $(0.23 \pm 0.05)\%$, 呈显著下降 ($P < 0.01$)。

3 As_2O_3 对哮喘豚鼠肺内支气管壁 EOS 浸润计数和 EOS 凋亡的影响 见图 3。与哮喘组比较, 哮喘豚鼠经 As_2O_3 处理后, 支气管壁 EOS 计数为 (32.8 ± 7.2) 个/HP, 呈显著下降 ($P < 0.01$), EOS 凋亡指数为 $(2.98 \pm 0.62)\%$, 呈显著增加 ($P < 0.01$), 并且支气管壁 EOS 浸润计数和 EOS 凋亡指数经 SPSS 软件 Pearson 相关性分析后, 呈显著性负相关关系 ($r = -0.949$, $P < 0.01$)。

讨 论

哮喘是一种以 EOS 浸润为主要病理特征的慢性气道变应性炎症, EOS 激活后释放胞浆内毒性物质和炎性介质造成组织损伤和炎症反应, 而减少肺内 EOS 浸润有助于促进哮喘气道炎症的消退⁽⁴⁾。目前研究认为, 下调肺内 EOS 数量可能是通过下列途径⁽⁵⁾: 外周血 EOS 肺内募集减少; 肺内 EOS 发生迁移; EOS 坏死; EOS 凋亡, 巨噬细胞及时清除。

EOS 是一种终末分化细胞, 死亡时以细胞凋亡的形式被清除⁽⁶⁾。近年来研究发现, 巨噬细胞能够迅速识别和吞噬发生凋亡的各期 EOS^(7,8), 其中对凋亡后期粒细胞的吞噬可能是机体防止炎症细胞坏死进而损伤组织的最后一条防线⁽⁹⁾。我们研究发现, 与对照组比较, 哮喘组豚鼠肺内 EOS 凋亡显著下降而 EOS 浸润显著增加, 提示 EOS 凋亡减少可能是哮喘气道 EOS 浸润增加的一个重要机制。



图 1 对照组豚鼠支气管壁 EOS 凋亡的形态学特点
TUNEL 标记×400



图 2 哮喘组豚鼠支气管壁 EOS 凋亡的形态学特点
TUNEL 标记×400

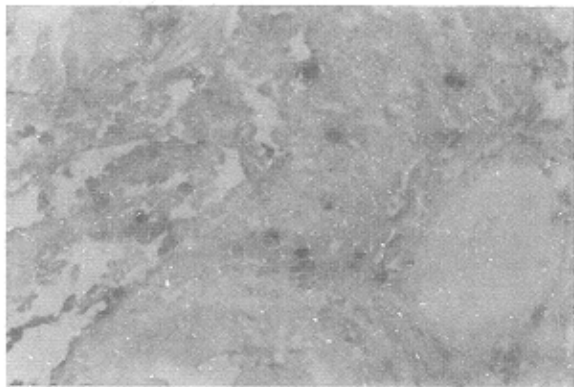


图 3 As_2O_3 对哮喘豚鼠支气管壁 EOS 凋亡的影响
TUNEL 标记×400

As_2O_3 是中药砒霜的有效提取成分,是一种能与含巯基蛋白高度结合的原浆毒,在体内存在蓄积倾向,具有致癌、致畸、致突变的协同作用⁽¹⁰⁾。我国学者研究发现, As_2O_3 治疗 APL 的有效剂量为 $10\text{mg}/\text{d}^{(11)}$,我们采用 $2\text{mg}/\text{kg}$ 浓度 As_2O_3 溶液治疗后,哮喘豚鼠肺内 EOS 凋亡显著增加而 EOS 浸润显著下降,并且两

者呈显著性负相关,提示促进肺内 EOS 凋亡,下调肺内 EOS 浸润数量,在整个实验过程中,我们还观察到哮喘豚鼠经 As_2O_3 治疗后,每次诱喘时间较哮喘组豚鼠明显延长,同时没有出现任何厌食、消瘦或呆滞的症状,这说明利用小剂量 As_2O_3 可以相对安全而有效地达到治疗哮喘之目的。

进一步研究小剂量 As_2O_3 诱导 EOS 凋亡的信号传导途径,而且据此研究和开发诱导 EOS 凋亡的特异性分子药物,无疑将为哮喘的防治带来新的前景。

参 考 文 献

1. Lambert LE, Bering JS, Kudlacz EM, et al. Characterization of the antigen-presenting cell and T cell requirements for induction of pulmonary eosinophilia in a murine model of asthma. *Clin Immunol Immunopathol* 1996 ;81:307—311.
2. Simon HU, Blaser K. Inhibition of programmed eosinophile death: a key pathogenic event for eosinophilia? *Immunol Today* 1995 ;16:53—55.
3. Mervis J. Ancient remedy performs new tricks. *Science* 1996 ;273:578.
4. Walsh GM. Eosinophile apoptosis: Mechanisms and clinical relevance in asthmatic and allergic inflammation. *Br J Haematol* 2000 ;111:61—67.
5. Kankaanranta H, Lindsay MA, Giembycz MA, et al. Delayed eosinophile apoptosis in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000 ;106:77—83.
6. Woolley KL, Gibson PG, Carty K, et al. Eosinophile apoptosis and the resolution of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996 ;154:237—243.
7. Stern M, Meagher L, Savill J, et al. Apoptosis in human eosinophiles: programmed cell death in the eosinophile leads to phagocytosis by macrophages and is modulated by IL-5. *J Immunol* 1992 ;148:3543—3549.
8. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. *Am J Pathol* 1995 ;146:3—15.
9. Ren Y, Stern M, Haslett C, et al. Macrophage recognition of post apoptotic granulocytes: a specific but pro-inflammatory last line of tissue defense? *J Leukoc Biol* 1996 (Suppl):38.
10. Dai J, Weinberg RS, Waxman S, et al. Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system. *Blood* 1999 ;93:268—277.
11. Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, et al. Use of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood* 1997 ;89:3354—3360.

(收稿 2001-09-12 修回 2001-12-21)