

核因子 κ B 对支气管哮喘大鼠淋巴细胞增殖和凋亡的调节作用及雷公藤甲素对其影响

张 宁 徐永健 张珍祥 李超乾

摘要 目的 探讨核因子 κ B(NF- κ B)是否参与支气管哮喘淋巴细胞增殖和凋亡的调节过程以及雷公藤甲素对哮喘淋巴细胞增殖和凋亡的调控作用是否通过 NF- κ B 发挥。方法 分别给予哮喘大鼠模型 NF- κ B 抑制剂二硫代氨基甲酸吡咯烷(PDTC)和免疫抑制剂地塞米松及雷公藤甲素干预,进行病理检查、气道反应性测定,采用免疫荧光法检测肺组织和脾淋巴细胞 NF- κ B P65 的表达,免疫组织化学法测定脾淋巴细胞增殖细胞核抗原(PCNA)、流式细胞术检测脾淋巴细胞凋亡,电泳迁移率改变试验测定 NF- κ B 活性。结果 哮喘气道及脾淋巴细胞 NF- κ B 的核表达量和活性均明显高于正常对照(均 $P < 0.05$);哮喘脾淋巴细胞的增殖率明显高于正常对照($P < 0.05$),而凋亡率明显低于正常对照($P < 0.05$);NF- κ B 抑制剂 PDTC 的应用可使哮喘异常上调的 NF- κ B 核表达量及活性下降,脾淋巴细胞增殖减少、凋亡增多;且 NF- κ B 活性与脾淋巴细胞的增殖率呈显著正相关($r = 0.89, P < 0.05$),而与其凋亡率呈显著负相关($r = -0.54, P < 0.05$)。在体应用雷公藤甲素后,哮喘气道及脾淋巴细胞 NF- κ B 的核表达量及活性、脾淋巴细胞的增殖率均明显下降(均 $P < 0.05$),而凋亡率明显增加($P < 0.05$),同时气道炎性细胞的浸润及气道高反应性亦明显减轻(均 $P < 0.05$),且气道嗜酸粒细胞的数量及气道的反应性与 NF- κ B 活性呈显著正相关(r 分别为 0.79 和 0.68, $P < 0.05$);雷公藤甲素的作用与地塞米松差异无显著性($P > 0.05$)。结论 (1)NF- κ B 通过促进淋巴细胞增殖并抑制其凋亡而参与哮喘炎症反应及气道高反应性的形成;(2)雷公藤甲素通过抑制 NF- κ B 进而抑制淋巴细胞增殖,从而发挥抗哮喘气道炎症的作用,它抑制 NF- κ B 的分子机制是否与糖皮质激素类似有待进一步研究。

关键词 支气管哮喘;核因子 κ B;雷公藤甲素;细胞增殖;细胞凋亡

Regulatory Function of Nuclear Factor κ B on Lymphocyte Proliferation and Apoptosis in Bronchial Asthmatic Rats and Effect of Triptolide on the Regulation ZHANG Ning, XU Yong-jian, ZHANG Zhen-xiang, et al *Department of Respiratory Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan (430030)*

Objective To investigate whether nuclear factor κ B (NF- κ B) participates in the regulatory function of lymphocyte proliferation and apoptosis in bronchial asthma and whether the regulatory effect of triptolide on lymphocyte proliferation and apoptosis is conducted through NF- κ B. **Methods** Intervention with dexamethasone, triptolide and PDTC, a NF- κ B inhibitor, were used to treat asthmatic rats respectively. Pathological examination, airway response were determined, the NF- κ B P65 expression in lung tissue and splenic lymphocytes by immunofluorescent assay were adopted, proliferative cell nuclear antigen (PCNA) in splenic lymphocytes was measured by immunohistochemistry, apoptosis of splenic lymphocytes were monitored by flow cytometry and NF- κ B activity was investigated by electrophoresis mobility shift assay (EMSA). **Results** The nuclear expression and DNA binding activity of lung tissue and splenic lymphocytes in asthmatic rats were all significantly higher than those in the control (all $P < 0.05$), so was the proliferation rate of splenic lymphocytes ($P < 0.05$), while the apoptosis rate was much lower than that of normal control ($P < 0.05$). Administration of PDTC could reduce the up-regulated expression and activity of NF- κ B, the proliferation of splenic lymphocytes

基金项目:国家自然科学基金(No. 30070332)及教育部高等院校骨干教师资助计划(2000 度)资助项目

作者单位:华中科技大学同济医学院附属同济医院呼吸内科(武汉 430030)

通讯作者:张 宁, Tel: 027-83662563, Fax: 027-83662629, E-mail: nzhang@mails.tjmu.edu.cn

lowered, while the apoptosis increased. NF- κ B activity showed an obviously positive correlation with proliferation of splenic lymphocytes ($r = 0.89$, $P < 0.05$) and a significantly negative correlation with apoptosis rate ($r = -0.54$, $P < 0.05$). After asthmatic rats had been treated with triptolide in vivo, the NF- κ B nuclear expression and activity in airway and splenic lymphocytes, as well as the proliferation rate of splenic lymphocytes all lowered significantly (all $P < 0.05$), the apoptosis rate increased significantly ($P < 0.05$), at the same time, the inflammatory cell infiltration and high reactivity of airway were significantly alleviated (both $P < 0.05$). There were obviously positive correlation between the amount of airway eosinophils and reactivity with activity of NF- κ B ($r = 0.79$ and $r = 0.68$, $P < 0.05$), which indicated that the effect of triptolide was not significantly different from that of dexamethasone ($P > 0.05$). **Conclusion** (1) NF- κ B participates the formation of airway inflammation and hyper-reactivity in asthmatic rats by positive regulation on proliferation and negative regulation on apoptosis of lymphocytes. (2) Triptolide reduces airway inflammation by way of inhibiting NF- κ B, and further inhibiting the proliferation of lymphocytes, so that to give full play of the role of anti-asthmatic airway inflammatory agents. Whether the molecular mechanism of triptolide in inhibiting NF- κ B simulates that of glucocorticoid needs further studying.

Key words bronchial asthma; nuclear factor κ B; triptolide; cell proliferation; cell apoptosis

淋巴细胞的过度浸润是支气管哮喘重要的病理特征之一^[1]。它在肺组织局部的过度浸润与其增殖增多、凋亡减少有关,但增殖/凋亡失平衡的机制并不清楚。核因子 κ B (nuclear factor, NF- κ B) 是慢性炎症反应的关键转录因子,实验研究显示它具有促进细胞增殖、抑制凋亡的作用^[2]。它在哮喘气道炎症中的作用日益受到重视,但有关 NF- κ B 对哮喘炎症细胞增殖、凋亡的调控研究报道不多。因此,本研究拟探讨 NF- κ B 是否参与调节哮喘淋巴细胞的增殖和凋亡过程。

雷公藤具有明确的抗炎作用。虽然它在哮喘的临床治疗中尚未得到推广,但实验研究显示它能降低气道高反应性,并对多种细胞因子、核转录因子的表达及活性具有抑制作用^[3]。但有关它对淋巴细胞增殖、凋亡的影响报道不多。我们近年的研究显示雷公藤甲素可促进致敏大鼠肺及脾淋巴细胞凋亡^[4],但具体的调节机制尚不清楚。由于有研究显示 NF- κ B 能对 T 淋巴细胞发挥抗凋亡作用^[5],故我们推测雷公藤甲素对淋巴细胞凋亡的调控作用可能是通过 NF- κ B 发挥的。

材料与方法

1 动物 雄性 Wistar 大鼠 25 只(由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供),2~3 月龄,体重 (200 ± 50)g。

2 试剂和药物 二硫代氨基甲酸吡咯烷 (PDTC,美国 Sigma 公司),地塞米松(江苏板桥药业),雷公藤甲素(福建医药研究所提供,纯度 99.999%),增殖细胞核抗原(PCNA)小鼠一抗、NF- κ B

P65 小鼠一抗和 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG(美国 Sant Cruz 公司),免疫组化试剂盒(北京中山生物公司)。

3 大鼠哮喘模型的建立及分组 模型建立:参照我们以往的方法^[4]。动物分组:随机分为正常对照组(C组)、哮喘空白组(A组)、哮喘 PDTC 组(P组)、哮喘地塞米松组(D组)和哮喘雷公藤甲素组(T组),每组各 5 只。P、D、T 组分别于每天雾化激发之前腹腔注射 PDTC 200mg/kg、地塞米松 10mg/kg、雷公藤甲素 25 μ g/kg。

4 气道反应性测定及切片的制备 按照我们实验室已建立的方法^[6],调节动物呼吸机(浙江医科大学动物实验仪器厂)呼吸频率 100 次/min,潮气量 0.8ml。每只大鼠于最后一次雾化激发后 4h 内用 20% 乌拉坦 6ml/kg 腹腔注射麻醉,气管插管后依次雾化吸入 PBS,0.2、0.4、0.8、1.6、3.2g/L 的乙酰甲胆碱(用 PBS 配置)。每个浓度雾化吸入 3min,间隔 5min。雾化吸入后接上动物呼吸机测定气道压力。以雾化吸入 PBS 后的气道压力为基值,使气道压力升高 50% 所需吸入乙酰甲胆碱浓度作为 PC₅₀。气道反应性以 PC₅₀ 的负值代表。然后开胸取全肺迅速置于液氮中,30min 后贮存于 -80℃。用 -20℃ 恒冷切片机制成 10 μ m 的冰冻切片,4% 多聚甲醛固定 20min 后梯度脱水贮存于 -80℃ 待免疫组织化学、免疫荧光检测及苏木素-伊红(HE)染色。

5 脾淋巴细胞的分离 取出大鼠脾脏,在 200 目铜网上磨碎制备脾细胞悬液,用三蒸水破坏红细胞后,用 Ficoll 淋巴细胞分离液分离出淋巴细胞。制成细胞

涂片待免疫组化和免疫荧光检测。

6 脾淋巴细胞凋亡的检测 采用流式细胞术,另取上述脾淋巴细胞 1×10^6 个,加入 -20°C 75%乙醇于 -20°C 下固定过夜。PBS 洗涤后加入终浓度为 50mg/ml 的 RNase 和 50mg/ml 的碘化丙啶(PI),避光 30min 后用 FACSsort 型流式细胞仪进行细胞凋亡检测。

7 脾淋巴细胞 PCNA 的表达测定 采用免疫组织化学法。以 PCNA 的表达量作为细胞增殖指标。采用 Picture™ 两步法,3,3-二氨基联苯胺(DAB)进行显色。用 PBS 取代一抗作为空白对照。PCNA 阳性者细胞核呈棕黄色。400 倍光镜下随机观察 5 个视野,用北京航天航空大学医用计算机定量图像分析系统(CMAIS)计算阳性染色的平均光密度值,以 5 个视野的平均值作为该只大鼠的测定值。

8 肺组织和脾淋巴细胞 NF- κ B P65 的表达检测 采用免疫荧光法,为显示细胞核,在 FITC 标记的二抗孵育的同时加入终浓度为 $0.8\mu\text{g/L}$ 的 PI 共孵育,余同常规方法。用 Olympus-BX60 型荧光显微镜进行观察。阴性细胞为细胞核发出橘红色荧光、胞浆无荧光或少量绿色荧光;阳性细胞因为 NF- κ B 被激活后进入胞核故胞核呈红色与绿色叠加后的黄色、胞浆无或少量绿色。随机观察 5 个视野,计算每个视野阳性细胞百分率,以 5 个视野的平均值作为该只大鼠的测定值。

9 脾淋巴细胞核蛋白的提取及电泳迁移率改变实验(EMSA) 方法参照文献^[7],每份标本取核蛋白 $10\mu\text{g}$ 进行 EMSA,测定 NF- κ B 的活性。

10 肺组织的病理检查 肺组织切片 HE 染色后,400 倍光镜下随机观察 5 个视野,计数支气管黏膜及黏膜下嗜酸性粒细胞(Eos)数,计算每个视野平均值。

11 统计学方法 数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。用方差分析检验 5 组间的总差异,各两组间比较用 q 检验完成。两变量的相关关系用直线相关关系法进行分析。

结 果

1 各组气道炎性细胞和气道反应性的变化 见表 1。A 组大鼠气道 Eos 的数量和气道反应性均明显高于 C 组($P < 0.05$);在体应用 PDTC、地塞米松和雷公藤甲素后,哮喘大鼠的气道 Eos 的数量和气道反应性均明显降低,与 A 组比较差异有显著性($P < 0.05$),但仍明显高于 C 组($P < 0.05$)。D 组与 T 组比较差异

无显著性($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠气道 Eos 和 PC₅₀的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Eos(个/HP)	PC ₅₀ (g/L)
C	5	1.6 ± 1.1	2.56 ± 0.88
A	5	$20.2 \pm 2.4^*$	$0.32 \pm 0.11^*$
P	5	$13.0 \pm 1.6^{*\Delta}$	$1.44 \pm 0.36^{*\Delta}$
D	5	$9.4 \pm 1.1^{*\Delta}$	$1.12 \pm 0.44^{*\Delta}$
T	5	$10.8 \pm 2.6^{*\Delta}$	$1.28 \pm 0.44^{*\Delta}$

注:与 C 组比较,* $P < 0.05$;与 A 组比较, $\Delta P < 0.05$

2 肺组织和脾淋巴细胞 NF- κ B 的变化 见表 2,图 1。A 组大鼠肺组织和脾淋巴细胞 P65 的表达及 NF- κ B 的活性均明显高于 C 组($P < 0.05$);在体应用 PDTC、地塞米松和雷公藤甲素后,哮喘大鼠的肺组织和脾淋巴细胞 P65 的表达及 NF- κ B 的活性均明显降低,与 A 组比较差异有显著性($P < 0.05$),但仍明显高于 C 组($P < 0.05$)。D 组与 T 组比较差异无显著性($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠肺组织、脾淋巴细胞 P65 表达和 NF- κ B 活性的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肺组织 P65 阳性细胞百分率(%)	脾淋巴细胞 P65 阳性细胞百分率(%)	NF- κ B 活性 结合条带灰度值
C	5	4.7 ± 2.6	2.4 ± 1.5	591 ± 147
A	5	$33.6 \pm 4.8^*$	$24.8 \pm 3.0^*$	$38590 \pm 3826^*$
P	5	$14.4 \pm 3.6^{*\Delta}$	$10.6 \pm 2.1^{*\Delta}$	$4008 \pm 1156^{*\Delta}$
D	5	$19.6 \pm 2.7^{*\Delta}$	$13.0 \pm 2.7^{*\Delta}$	$5462 \pm 1152^{*\Delta}$
T	5	$15.8 \pm 8.0^{*\Delta}$	$14.4 \pm 2.7^{*\Delta}$	$6013 \pm 1116^{*\Delta}$

注:与 C 组比较,* $P < 0.05$;与 A 组比较, $\Delta P < 0.05$

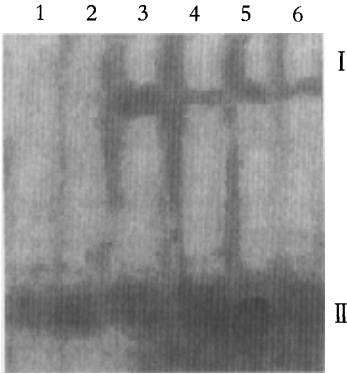


图 1 各组大鼠脾淋巴细胞 NF- κ B EMSA

注:泳道 2~6 分别为 C、A、P、D、T 组;泳道 1 为 A 组另加 100 倍未标记的 NF- κ B 同序寡核苷酸探针;I 为结合条带;II 为游离条带

3 各组脾淋巴细胞增殖和凋亡的变化 见表 3。A 组大鼠脾淋巴细胞增殖率明显高于 C 组而凋亡率明显低于后者($P < 0.05$);在体应用 PDTC、地塞米松和雷公藤甲素后,哮喘大鼠的脾淋巴细胞增殖率明显降低,凋亡率则明显增高,与 A 组比较差异有显著性

($P < 0.05$), 但与 C 组比较差异仍有显著性 ($P < 0.05$)。D 组与 T 组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。

表 3 各组大鼠脾淋巴细胞 PCNA 表达
和细胞凋亡的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PCNA 平均光密度值	细胞凋亡率 (%)
C	5	0.03 ± 0.01	6.2 ± 0.2
A	5	0.35 ± 0.04 *	2.7 ± 0.6 *
P	5	0.18 ± 0.03 * △	13.1 ± 1.8 * △
D	5	0.12 ± 0.03 * △	20.9 ± 2.3 * △
T	5	0.13 ± 0.04 * △	22.2 ± 3.6 * △

注:与 C 组比较, * $P < 0.05$; 与 A 组比较, △ $P < 0.05$

4 气道炎症及气道反应性、NF- κ B 活性与淋巴细胞增殖及凋亡之间的关系 气道嗜酸粒细胞数量及气道反应性与 NF- κ B 活性呈显著正相关 (r 分别为 0.79 和 0.68, $n = 25$, $P < 0.05$); NF- κ B 活性与脾淋巴细胞的增殖率呈显著正相关 ($r = 0.89$, $n = 25$, $P < 0.05$); NF- κ B 活性与脾淋巴细胞的凋亡率呈显著负相关 ($r = -0.54$, $n = 25$, $P < 0.05$)。

讨 论

淋巴细胞的过度增殖和浸润既是支气管哮喘重要的病理特征,又是其发病机制的始动因素,但引起其增殖增多、凋亡减少的机制并不清楚。我们研究了在慢性炎症性疾病和细胞增殖中具有重要调控作用的转录因子 NF- κ B 对哮喘淋巴细胞增殖、凋亡的影响。发现:哮喘气道及脾淋巴细胞 NF- κ B 的核表达量及活性均明显高于正常对照;哮喘脾淋巴细胞的增殖率明显高于正常对照,而凋亡率明显低于正常对照;NF- κ B 抑制剂 PDTC 的应用可使哮喘异常上调的 NF- κ B 核表达量及活性下降,脾淋巴细胞增殖减少、凋亡增多;且 NF- κ B 活性与脾淋巴细胞的增殖率呈显著正相关,而与其凋亡率呈显著负相关。提示 NF- κ B 参与了支气管哮喘淋巴细胞增殖和凋亡的调节过程,它在支气管哮喘中发挥的是抗凋亡、促增殖作用,该作用可能是它促进哮喘炎症反应及气道高反应性形成的机制之一。关于 NF- κ B 促进淋巴细胞增殖的作用机制,推测可能为:(1)NF- κ B 能直接促进数种抗凋亡基因转录,包括 bcl-2 家族成员 A1/Bfl-1,肿瘤坏死因子受体相关因子 1 和 2,凋亡抑制剂 c-IAP1、2 和 IXAP;(2)NF- κ B 亦可直接调控 cyclin D1 基因,而 cyclin D1 能促进细胞由 G₁ 期进入 S 期;(3)NF- κ B 能调控 IL-2 的生成,而后者是 T 淋巴细胞增殖分化的关键性细胞因子。

雷公藤甲素抗炎、抑制免疫的作用是明确的,但其作用机制尚不清楚。我们以往的研究^[4]显示雷公藤甲素抑制多种细胞因子表达外,尚能抑制哮喘淋巴细胞

增殖、促进其凋亡,其具体机制不明确。本研究显示雷公藤甲素能抑制哮喘肺组织和脾淋巴细胞 NF- κ B 的阳性表达及活性,哮喘异常增强的脾淋巴细胞的增殖随之下降而凋亡增多,气道炎症和气道高反应性减轻。提示雷公藤甲素对哮喘淋巴细胞的抗增殖、促凋亡作用可能是通过 NF- κ B 发挥的。本研究还发现雷公藤甲素的上述作用与糖皮质激素地塞米松差异无显著性。糖皮质激素抑制 NF- κ B 的机制可能在于:(1)诱导 I κ B α mRNA 表达及蛋白质合成;(2)与糖皮质激素受体结合后,被活化的糖皮质激素受体在细胞核内能直接与 NF- κ B P65 亚基发生蛋白质的相互作用,从而抑制后者的转录活性。至于雷公藤甲素是否通过上述机制发挥抑制 NF- κ B 的作用有待进一步研究。

参 考 文 献

- Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, et al. The role of allergy in the development of asthma. *Nature* 1999;402(6760): B12—17.
- Barkett M, Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* 1999;18(49):6910—6924.
- 程晓明,王长征,钱桂生. 雷公藤甲素致敏小鼠 T 细胞 IL-5mRNA 的表达及核因子 NFAT 活性. *中华微生物和免疫学杂志* 2001;21(5):516—519.
- 薛健敏,徐永健,张珍祥,等. 雷公藤内酯对致敏大鼠淋巴细胞凋亡的影响. *中华微生物和免疫学杂志* 2001;21(2): 130—133.
- Gerondakis S, Grumont R, Rourke I, et al. The regulation and roles of Rel/NF- κ B transcription factors during lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 1998; 10(3):353—359.
- 李超乾,徐永健,张珍祥,等. 支气管哮喘模型支气管肺泡灌洗液中 $\gamma\delta$ T 细胞明显活化. *中华微生物和免疫学杂志* 2001;21(6):609.
- Li CQ, Xu YJ, Zhang ZX. Over-active $\gamma\delta$ T lymphocytes in BALF in asthma model. *Chin J Microbiol Immunol* 2001;21(6):609.
- Zhang N, Xu YJ, Zhang ZX, et al. A non-radioactive method for detecting nuclear transcription factor DNA binding activity. *J Huazhong Univ Sci Tech (Med Sci)* 2003;23(3):227—229.

(收稿:2002-08-22 修回:2004-02-20)