

# n-3 多不饱和脂肪酸对哮喘小鼠白三烯 B4 及 5 脂氧合酶基因表达的影响

王 强 罗运春 周晓聪 黄 娟

**摘 要** 目的: 探讨 n-3 多不饱和脂肪酸 (n-3PUFA) 对哮喘小鼠支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中白三烯 B4 (LTB4) 水平、肺组织 5 脂氧合酶 (5-LO) mRNA 表达的影响及其可能的机制。方法: 建立小鼠卵蛋白哮喘模型, 分别灌胃不同剂量的 n-3PUFA 干预, 用 ELISA 的方法检测 BALF 中 LTB4 含量; 用 RT-PCR 的方法检测肺组织中 5-LO mRNA 表达的变化。结果: 哮喘小鼠 BALF 中 LTB4 水平、肺组织 5-LO 基因表达水平较正常对照组显著升高 ( $P < 0.01$ ); 灌胃 n-3PUFA 干预的 3 个剂量组与模型组相比, LTB4 含量、5-LO 基因表达水平下降 ( $P < 0.05$ )。结论: LTB4 在气道里的高浓度及 5 LO 基因表达的上调在哮喘小鼠发病中起重要作用, n-3PUFA 可以降低哮喘小鼠 BALF 中 LTB4 的浓度, 抑制肺组织 5-LO mRNA 表达, 从而起到对抗哮喘气道炎症的作用。

**关键词** 哮喘 白三烯 B4 脂氧合酶 脂肪酸类, 不饱和 小鼠

Effects of n-3PUFA on leukotriene B4 and genetic expression of 5-lipoxygenase in asthmatic mice WANG Qiang, LUO Yun-chun, ZHOU Xiao-cong, HUANG Juan. Department of Respiratory Disease, Affiliated Yuying Children's Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China

**【Abstract】** Objective To investigate the effects of n-3 polyunsaturated fatty acid (n-3PUFA) on leukotriene B4 (LTB4) levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and 5-lipoxygenase (5-LO) mRNA expression in the lung tissues of asthmatic mice and the possible mechanism. Methods A mouse model of ovalbumin-induced asthma was established and the mice were challenged by gastric administration with n-3PUFA in different concentrations. The LTB4 levels in BALF were measured by ELISA and RT-PCR was used to detect the mRNA expression of 5-LO in pulmonary tissues. Results The levels of LTB4 in BALF and 5-LO mRNA expression in pulmonary tissues of the asthmatic mice significantly increased as compared with those of the normal controls ( $P < 0.01$ ). The levels of LTB4 in BALF and 5-LO mRNA expression in lung tissues in 3 n-3PUFA treatment groups were markedly lower than those in the non-treatment group ( $P < 0.05$ ). Conclusions High levels of LTB4 in the airway and upregulation of 5-LO mRNA in the pulmonary tissue play an important role in the pathogenesis of bronchial asthma. n-3PUFA may reduce the LTB4 levels and inhibit the 5-LO mRNA expression, resulting in opposing inflammation of the airway.

**【Key words】** Asthma Leukotriene B4 Lipoxygenase Fatty acids, unsaturated Mice

白三烯 B4 (LTB4) 是花生四烯酸 (AA) 经 5 脂氧合酶 (5-LO) 途径代谢的产物, 是支气管哮喘发病过程中重要的炎性介质, 是目前已知最强的中性粒细胞催化因子和活化因子之一。目前一般认为糖皮质激素不能抑制白三烯类物质的产生, 从而导致部分哮喘反复发作难以治愈。n-3 多不饱和脂肪酸 (n-3PUFA) 具有维护生物膜的结构和功能、治疗心血管疾病、抗炎、抗癌以及促进大脑发育、减肥等生理功能。本研究旨在探讨 n-3PUFA 对哮喘小鼠支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中 LTB4 水平及肺组织 5-LO mRNA 表达的影响, 为进一步探讨 n-3PUFA 的作用机制并为非药物防治哮喘提供新的理论依据。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 BALB/c 雄性小鼠 50 只, 日龄 21 ~35 d, 体重 16 ~20 g, 购自上海斯莱克实验动物

有限责任公司, 许可证号 SCXK(沪)2003-0003。于温州医学院试验动物中心层流实验室饲养, 饲养温度 25 , 相对湿度 70%, 昼夜照明 12/12 h。

1.2 试剂 OVA (Grade ), Sigma U.S.A.; Trizol 抽提试剂, Invitrogen U.S.A.; RT-PCR 试剂盒, TAKALA JAPAN; 琼脂糖 (agarose), 100 bp DNA Ladder, 上海生工生物工程有限公司; DEPC, GIBCO U.S.A.; 小鼠 LTB4 ELISA 试剂盒, 上海轩昊科技发展有限公司; 引物由上海基康生物有限公司设计并合成。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物	序列	5 - 3	目的长度 (bp)
5-LO	Sense	GCCTCAGGTTTCCCAAGT	448
	Antisense	CGCTGTTGGGAATCCTGTCT	
GAPDH	Sense	CCCCAATGTGTCCGTCGT	233
	Antisense	CATACCAGGAAATGAGCTTGACA	

1.3 主要仪器 空气压缩雾化器 (PARI BOY 037G6000), PARI BOY N038, GERMAN; 低温高速离心机, 德国 Hettich 公司; ELX 50 自动洗板机, Bid-

Tek Elx50, U.S.A; ELX 808IU Bio-TEK 酶标仪, U.S.A; SmartView 凝胶图像分析系统, 上海复日科技有限公司;

1.4 药品配制 称取  $\text{AlCl}_3$  干粉 1.36 g 和  $\text{NaOH}$  干粉 1.23 g, 分别倒入 50 mL 双蒸馏水中, 用玻璃棒搅拌, 使之充分溶解, 然后将  $\text{NaOH}$  溶液缓慢倒入  $\text{AlCl}_3$  溶液中, 一边倒入一边搅拌, 使之充分反应, 用生理盐水反复洗涤, 高压消毒后无菌保存。取 0.4 g  $\text{Al}(\text{OH})_3$  凝胶, 加入 OVA 溶液(把 4 mg OVA 干粉加入 1 mL 生理盐水溶液中, 充分溶解后经滤菌器过滤), 最后加生理盐水稀释至 4 mL。1% OVA 生理盐水溶液: 称取 OVA 干粉 0.15 g 溶解于 1 mL 生理盐水溶液中, 经滤菌器过滤, 加无菌生理盐水至 15 mL 充分摇匀, 使每毫升液含 OVA 10 mg, 现配现用。

1.5 小鼠哮喘模型的制作 模型复制分致敏和激发两个阶段。致敏阶段: 第 8 天和第 22 天腹腔注射含 0.1% OVA /  $\text{Al}(\text{OH})_3$  磷酸盐缓冲液(PBS) 0.1 mL。激发阶段: 第 32 天开始以 1% OVA 雾化吸入, 每天 1 次, 1 次 30 min, 连续定时激发 5 d, 以此制作急性哮喘模型

1.6 实验分组 雄性 Balb/c 小鼠 50 只, SPF 级, 日龄 21 ~35 d, 体重 16 ~20 g, 由温州医学院实验动物中心提供。随机分为 A、B、C、D、E 组, 每组 10 只。A 组(正常对照组)每次灌胃、致敏、激发以生理盐水代替鱼油或 OVA; B 组为哮喘模型组, 方法如 1.5 所述; C、D、E 组为食用鱼油组, 哮喘激发同 B 组, 并于实验第 1 天开始每日上午 8 时 30 分予以鱼油灌胃, 剂量分别为 0.12、0.24、0.48 g/kg。

1.7 标本处理 所有小鼠均于最后一次激发后 12 h, 清醒动物眼眶动脉放血处死。用生理盐水 1 mL 分 3 次于气管插管处注入, 缓慢冲洗右肺, 回收率约 80%, 得到的 BALF 收集在 EP 管, 2 000 r/min 离心 15 min, 取上清 -70 保存。取左肺大约 100 mg 立即放入 -70 冰箱保存备用。

1.8 酶联免疫吸附实验(ELISA)检测 BALF 中 LTB4 浓度 实验过程严格按照试剂说明书进行。

1.9 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)总 RNA 的抽提 采用 Trizol 一步法抽提肺组织总 RNA。RT, 按下列组成配制 20  $\mu\text{L}$  反应体系: 25 mmol/L  $\text{MgSO}_4$  4  $\mu\text{L}$ , 2  $\times$ Bca 1st Buffer 10  $\mu\text{L}$ , RNase Free  $\text{dH}_2\text{O}$  1.5  $\mu\text{L}$ , dNTP Mixture 1  $\mu\text{L}$ , RNase Inhibitor 0.5  $\mu\text{L}$ , BcaBEST Polymerase 1  $\mu\text{L}$ , Oligo dT Primer 1  $\mu\text{L}$ , 实验样品 RNA 1  $\mu\text{L}$ 。按 65  $^\circ\text{C}$  1 min 30  $^\circ\text{C}$  5 min 65  $^\circ\text{C}$  30 min 98  $^\circ\text{C}$  5 min 5  $^\circ\text{C}$  5 min 进行反转录反应。PCR, 按下列组成配制 20  $\mu\text{L}$  反应体系: 25 mmol/L  $\text{MgSO}_4$  1.2  $\mu\text{L}$ , 5  $\times$ Bca 2nd Buffer 3.2  $\mu\text{L}$ , Bca-Optimized Tap 0.1  $\mu\text{L}$ , 上游 5-LO PCR 引物 0.7  $\mu\text{L}$ , 下游 5-LO PCR 引物 0.7  $\mu\text{L}$ , 上游 GAPDH 引物 0.3  $\mu\text{L}$ , 下游 GAPDH 引物 0.3  $\mu\text{L}$ , cDNA 2.0  $\mu\text{L}$ ,

RNase Free  $\text{dH}_2\text{O}$  11.5  $\mu\text{L}$ 。把此 PCR 反应液轻轻混匀, 稍离心, 按下列条件在 PCR 扩增仪上进行扩增。94

预变性 3 min, 94 变性 30 s, 56 退火 30 s, 72 延伸 1 min, 35 个循环, 最后一个循环 72 延伸 5 min。阴性对照用 0.4  $\mu\text{L}$  去离子水代替 RNA 样品进行同条件的 RT-PCR。各取 5-LO、GAPDH 基因 PCR 产物 5  $\mu\text{L}$  与 6  $\times$  上样缓冲液比例混合, 上样于 2% 琼脂糖凝胶, 100 V 恒压电泳半小时, EB 染色, FR-980 生物电泳图像分析系统获取凝胶图像。SmartView 软件测定产物光密度值, 5-LO 与对应的 GAPDH 的电泳带总灰度的比值为半定量结果(相对值)。

1.10 统计学处理 用 SPSS 11.5 统计软件进行分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组比较采用方差分析。两两比较方差齐者用 LSD 检验, 方差不齐者用 Dunnett-t 检验。P < 0.05 提示差异有显著性。

## 2 结果

与 A 组比较, B 组小鼠 BALF 中 LTB4 含量、5-LO 基因表达水平明显增加(P < 0.01); 鱼油干预的 3 个剂量组与 B 组相比, LTB4 含量、5-LO 基因表达水平下降(P < 0.05); 对于降低哮喘小鼠 BALF 中 LTB4 含量, 3 种剂量鱼油的效果相当, 没有明显的量效关系(P > 0.05), 除 C 组外均达到正常水平; 对于降低哮喘小鼠 5-LO 基因表达量, E 组的抑制效果优于 C、D 组, 并达到正常水平(P < 0.05), 见表 2。

表 2 各组 BALF 中 LTB4 浓度及 5-LO mRNA 表达  $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	LTB4(pg/mL)	5-LO mRNA
A 组	10	41.437 $\pm$ 14.422	0.256 $\pm$ 0.019
B 组	10	143.001 $\pm$ 63.355	0.605 $\pm$ 0.057
C 组	10	67.663 $\pm$ 36.885	0.408 $\pm$ 0.049
D 组	10	46.416 $\pm$ 15.785	0.328 $\pm$ 0.024
E 组	10	53.258 $\pm$ 14.988	0.244 $\pm$ 0.020

注: 与 A 组比较, P < 0.05, P < 0.01; 与 B 组比较, P < 0.05, P < 0.01

## 3 讨论

PUFA 是指含两个或更多个双键的长链脂肪酸。根据靠近双键碳原子的位置不同, PUFA 可分为 n-3、n-6 等系列脂肪酸。在 n 碳原子数第三位上存在有双键的 PUFA 成为 n-3PUFA, 主要包括二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)、 $\alpha$  亚麻酸。PUFA 在机体内具有较为广泛的生理功能和生物学效应, 而且双键越多, 不饱和程度越高, 营养价值也越高。鱼油 n-3PUFA(EPA、DHA) 人体不能合成, 需要从食物中摄取, 所以是人类的必需脂肪酸, 从上世纪 70 年代被关注以来研究逐渐增多, 现在认为它具有维护生物膜的结构和功能、治疗心血管疾病、抗炎、抗癌以及促进大脑发育、减肥等生理功能<sup>[1]</sup>。

LTB4 是 PUFA 的脂氧合酶代谢途径中产生的一

类二十碳不饱和脂肪酸,是引起支气管哮喘的主要前炎症介质,具有的致炎作用和强烈的诱导白细胞趋化和黏附作用。它的产生需要 AA(一种 n-6PUFA)的释放和 5-LO 的激活。各种刺激包括受体激活及抗原-抗体反应等可激活磷脂酶,分解磷脂释放出 AA。AA 通过 5-LO 途径代谢形成 4 系列白三烯<sup>[2]</sup>。5-LO 是脂氧化酶家族的一个成员,细胞激活后 5-LO 从胞浆移至核膜(此过程依赖  $Ca^{2+}$ ),在核膜与 5-脂氧化酶活化蛋白结合形成一种稳定的化合物,催化 AA 形成一种不稳定的中间产物——5-氢过氧化二十碳四烯酸,5-氢过氧化二十碳四烯酸再转化为环氧化物白三烯 A4 (leukotriene A4, LTA4)<sup>[3]</sup>。LTA4 水解酶是一种含锌的金属蛋白酶,具有内在的氨基肽酶活性。与氨基酸肽酶 N 家族酶有明显的同源性。LTA4 酶活性可被金属的水解酶抑制剂如 bestatin 所抑制。LTA4 很不稳定,经 LTA4 水解酶作用水解为二羧酸 LTB<sub>4</sub>。LTB<sub>4</sub> 可刺激人外周血单核细胞和 T 细胞产生 IL-1、TNF- $\alpha$  和 IL-5。另外,LTB<sub>4</sub> 可使核转录因子过氧化物增殖剂——活化受体(PPAR- $\gamma$ )和 IL-4 介导的 B 细胞 IgE 合成增加,亦可使中性粒细胞 CD11b/CD18 黏附蛋白和 L-选择素表达上调。LTB<sub>4</sub> 还能促进炎症细胞向气道迁徙、聚集。特别在中性粒细胞的迁徙聚集,中性粒细胞被认为在哮喘机型发作中起关键作用<sup>[4]</sup>。鱼油 n-3PUFA 可以在细胞膜部分的替换 n-6PUFA,竞争与 5-LO 结合,鱼油 n-3PUFA 在 5-LO 作用下生成 LTB<sub>5</sub>,致炎作用为 LTB<sub>4</sub> 的 1/20~1/5,从而降低炎症的严重程度<sup>[5-6]</sup>。

本实验结果显示哮喘小鼠 BALF 中 LTB<sub>4</sub> 水平、肺组织 5-LO 基因表达水平较正常对照组显著高,提

示 LTB<sub>4</sub> 水平的增高、5-LO 基因表达的上调在哮喘的发病中起一定的作用。3 个剂量鱼油均可抑制哮喘小鼠 BALF 中 LTB<sub>4</sub> 的水平,并使其水平降至正常对照组水平除(低剂量组除外)。提示鱼油 n-3PUFA 除了通过与 AA 竞争酶系减少 LTB<sub>4</sub> 外,还通过抑制 5-LO mRNA 的表达减少 LTB<sub>4</sub> 的生成。

不能抑制 4 系列白三烯(LTB<sub>4</sub>-LTE<sub>4</sub>)的产生被认为是激素耐受性哮喘的原因之一<sup>[7-8]</sup>,因此对 n-3 PUFA 的研究可能为哮喘防治提供新的思路,具有重要的现实意义。

#### 4 参考文献

- [1] 林晓明,李勇.高级营养学[M].北京:北京大学医学院出版社,2004:8.
- [2] 袁成凌,建铭余,增亮.花生四烯酸及其代谢物的生物学作用[J].中国药物化学杂志,2000,10(1):75-78.
- [3] Broughton K S, Wade J W. Total fat and (n-3):(n-6) fat ratios influence eicosanoid production in mice [J]. J Nutr, 2002, 132(1): 88-94.
- [4] 石俊,安京华,姚侠,等.廿烷五烯酸影响机体免疫机制的研究与应用[J].中国临床康复,2006,10(20):143-145.
- [5] Thies F, Nebe von Caron G, Powell J R, et al. Dietary supplementation with gamma-linolenic acid or fish oil decreases T lymphocyte proliferation in healthy older humans [J]. J Nutr, 2001, 131(7): 1918-1927.
- [6] Silverman E S, Le L, Baron R M, et al. Cloning and functional analysis of the mouse 5-lipoxygenase promoter [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002, 26(4): 475-483.
- [7] 彭秋莹,陈爱欢.白三烯研究进展及其在婴幼儿喘息性疾病中的作用[J].中华儿科杂志,2006,44(7):553-556.
- [8] 王华,陈艳波,张孔.白三烯受体拮抗剂对哮喘患者 IL-5 水平及气道高反应性的影响[J].实用医学杂志,2005,21(21):2392-2395.

(收稿:2006-11-28)

## 股骨干切开复位内固定术中发生脂肪栓塞综合征 1 例

荣 伟 赛海芳

患者,男,25岁,因车祸伤及右下肢而入院,X线片示右股骨干骨折,伴骨盆骨折,拟于连续硬膜外麻醉下行股骨干切开复位髓内针固定术。术前肌注苯巴比妥钠 0.1g,阿托品 0.5mg。术前 ECG 检查正常,BP 112/76 mmHg,HR 103 次/min。于 L<sub>2-3</sub> 间隙穿刺置管,用 2%利多卡因麻醉,效果佳。当髓内针固定后大约 30 min,正在为患者缝皮时,患者出现胸闷、气促,心

率增至 140~155 次/min,收缩压降至 76~85 mmHg,SpO<sub>2</sub> 陡降为 75%~84%,ECG 示 S-T 段抬高,继而意识丧失且双侧瞳孔散大。此时怀疑发生脂肪栓塞综合征。立即行气管内插管,吸氧浓度分数为 0.6,呼气末正压为 0.8 kPa。同时给予氢化考的松 200 mg,甘露醇 250 mL 快速输注。回到骨科病房后给予适量白蛋白及低分子右旋糖酐等治疗,低氧血症很快得到纠正。病人于第 3 天清醒,6 d 后恢复正常。

讨论 股骨干髓内针固定术,扩髓时髓腔压力骤升,明显高于髓腔内静脉压,脂肪极易进入静脉,致呼吸和循环变化。

治疗时行气管内插管,可改善通气。激素可使脂肪滴颗粒变小,游离脂肪酸减少,可减轻对肺泡的炎性刺激,抑制细胞水肿,保护肺血管内皮细胞的完整性,降低渗透,从而改善通气功能。白蛋白可降低游离脂肪酸的毒性,纠正低蛋白血症。低分子右旋糖酐可改善微循环,减轻组织水肿,还可扩容纠正休克。因此在扩髓后必须严密监测 BP、HR、ECG、RR 及 SpO<sub>2</sub>,一旦发生难以解释的变化,尽早作出诊断及治疗。

(收稿:2006-11-13)

作者单位:264400 山东省威海市文登中心医院麻醉科(荣伟),感染管理科(赛海芳)