

福莫特罗对过敏性哮喘大鼠气道中嗜酸性粒细胞浸润的抑制作用

朱建波 许成芳 王文霞

摘要 目的:研究福莫特罗对过敏性哮喘大鼠嗜酸性粒细胞(eosinophil, EOS)炎症的作用,探讨影响肺组织内嗜酸性粒细胞浸润的机制。方法:48 只雄性 Wistar 大鼠随机分为 6 组:正常对照组(A)、哮喘模型组(B)、小剂量(0.08 mg/kg)福莫特罗组(C)、中剂量(0.12 mg/kg)福莫特罗组(D)、大剂量(0.16 mg/kg)福莫特罗组(E)、地塞米松(0.5 mg/kg)组(F),每组 8 只。卵蛋白致敏诱发建立哮喘大鼠模型,福莫特罗口服,地塞米松腹腔注射给药 7 d。常规 HE 染色观察病理变化;酶联免疫吸附法(ELISA)测肺组织匀浆中嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(eosinophil cationic protein, ECP)的含量。结果:(1)A 组气道炎症没有明显变化;B 组炎症变化明显,大量 EOS 浸润,较 A 组差异有显著性($P < 0.01$);各用药组炎症有所减轻,浸润 EOS 数量明显减少($P < 0.01$)。(2)B 组嗜酸性粒细胞趋化活化因子(eotaxin)较 A 组显著升高($P < 0.01$);各用药组下降($P < 0.05$)。各用药组 eotaxin 与 EOS 数量呈正相关。(3)B 组 ECP 含量较 A 组显著升高($P < 0.01$);各用药组均低于 B 组($P < 0.01$)。结论:(1)哮喘气道中嗜酸性粒细胞增多。福莫特罗能够明显降低气道中 EOS 数量,与抑制 EOS 趋化有关。(2)福莫特罗可能是通过减少肺组织内 eotaxin 的表达来抑制 EOS 趋化的。(3)福莫特罗能够抑制 EOS 活化,减少肺组织中的 ECP 含量。

关键词 哮喘; 福莫特罗; 嗜酸性粒细胞; 嗜酸性粒细胞趋化活化因子; 嗜酸性粒细胞阳离子蛋白

Inhibitory effects of formoterol on infiltration of eosinophils in allergic asthmatic rats ZHU Jian-bo*, XU Cheng-fang, WANG Wen-xia. *Respiratory Intensive Care Unit, Binzhou City People's Hospital, Binzhou 256610, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of formoterol on airway eosinophilic inflammation in allergic rats, and explore the mechanism of infiltration of eosinophils. **Methods** Forty-eight male Wistar rats were divided into control group (group A), asthma group (group B), formoterol 0.08 mg/kg group (group C), formoterol 0.12 mg/kg group (group D), formoterol 0.16 mg/kg group (group E), and dexamethasone group (group F) randomly. Eight rats in each group. Asthma models of rats were induced by inhaling ovalbumin. Formoterol was given by intragastric administration and dexamethasone was given by peritoneal injection once a day for 7 days. The tissue sections of lung were stained with hematoxylin and eosin. The expressions of eotaxin and eosinophil cationic protein (ECP) were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** (1) The lungs of group A had not any inflammation changes; The lungs of group B had very severe inflammation, and the number of eosinophil in the lung tissue was very significantly higher than that of group A ($P < 0.01$); The lung tissue of every medication groups were moderate inflammation, and the numbers were significantly lower than that of group B ($P < 0.01$). Inflammation of medication groups had moderated, the numbers of eosinophil were remarkably reduced ($P < 0.01$). (2) The eotaxin of group B was significantly higher than that of group A ($P < 0.01$); The eotaxin of all medication groups were significantly decreased ($P < 0.05$); The expression of eotaxin had positive correlation with the numbers of eosinophil in all medication groups. (3) The ECP of group B was significantly higher than that of group A ($P < 0.01$); The ECP of every medication group was lower than that of group B ($P < 0.01$). **Conclusions** (1) In the model of allergic asthma established in the experiment, the number of eosinophil was increased. Formoterol can decrease the number of eosinophil in lungs tissue, which may correlate with inhibiting the accumulation of eosinophil. (2) It is possible that formoterol inhibit the accumulation of eosinophil by inhibiting the expression of eotaxin. (3) Formoterol can inhibit the activation of eosinophil and decrease the ECP of lung tissues.

【Key words】 Asthma; Formoterol; Eosinophil; Eotaxin; Eosinophil cationic protein

支气管哮喘是由多种炎症细胞,包括嗜酸性粒细胞(eosinophil, EOS)、肥大细胞、淋巴细胞、上皮细胞等及其细胞组分参与的慢性气道炎症,其中 EOS 起着尤为关键的作用^[1]。聚集活化的 EOS 可以分泌多种炎症物质,参与气道炎症反应及气道重塑^[2],还参与抑制气道的免疫反应^[3]。

β_2 受体激动剂是哮喘急性发作的首选药物,研究表明其不但能够扩张支气管,还具有控制气道炎症的作用。部分长效 β_2 受体激动剂如福莫特罗(formoterol)因其起效快作用时间长而备受临床医师青睐。本实验通过复制哮喘大鼠模型,以地塞米松为对照研究在体内福莫特罗对气道浸润 EOS 的作用,为临床治疗哮喘提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 Wistar 大鼠(SPF 级),购于山东大学实验动物中心。

1.2 实验试剂与仪器 富马酸福莫特罗(安通克),沈阳山之内制药有限公司;地塞米松磷酸钠注射液,济南利民制药有限责任公司;卵蛋白(级),Sigma 公司提供,编号 A5378;大鼠 Eotaxin 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒,上海森雄科技实业有限公司;大鼠 ECP 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒,上海轩昊科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 哮喘模型的制备及给药方法 48 只雄性 Wistar 大鼠,6~8 周,体重 180~220 g,随机分为 6 组,每组 8 只。A 组,正常对照组;B 组,哮喘模型组;C 组,小剂量福莫特罗组(0.08 mg/kg);D 组,中等剂量福莫特罗组(0.12 mg/kg);E 组,大剂量福莫特罗组(0.16 mg/kg);F 组,地塞米松组(0.5 mg/kg)。模型复制参照文献^[4]并加以改进,正常对照组给予等量的生理盐水对照操作。各实验组第 1、8 天注射卵蛋白混悬液(卵蛋白 1 mg,生理盐水 1 mL,氢氧化铝 200 mg,四肢内侧皮下、腹腔内各 0.2 mL)。第 15 天起将大鼠放入自制密闭容器内,2%卵蛋白混悬液雾化吸入 30 min,大鼠出现咳嗽、呼吸急促、点头呼吸、打喷嚏、烦躁不安及尿便失禁等过敏反应症状。正常对照组给予生理盐水雾化吸入相同时间。按照以上方法每天雾化吸入 1 次,连用 10 d。

给药方法:从第 18 天(即第 4 次诱发哮喘日)开始,每次诱发前 1 h F 组给予腹腔注射地塞米松,生理盐水灌胃;C、D、E 组给予相应剂量的福莫特罗灌胃,生理盐水腹腔注射;A、B 组分别给予生理盐水腹腔注射,生理盐水灌胃。连用 7 d。

1.2.2 取材及标本制备 最后一次诱发哮喘后 48 h

(中性粒细胞 < 1%, 淋巴细胞 < 9%)^[4],2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠(46 mg/kg),将其仰面固定在解剖台上,打开腹腔,从腹主动脉抽血 5~10 mL,剪断腹主动脉;打开胸腔,剪开左心耳,充分放血。切取右肺,称重后-80℃冻存;左肺切成厚度约 4 mm 组织块,4%多聚甲醛固定。切取右侧肺组织,称重后-80℃冰冻 30 min。30 min 后将冰冻肺组织放入匀浆器内,加入少量冰生理盐水(0.5 mL/1 g),20 000 r/min 匀浆 10 min 将组织搅碎。匀浆液 3 000 r/min 离心 10 min,留取上清液-80℃冻存备用。切取左侧肺组织,4%多聚甲醛内固定 4~5 h,经过水洗、梯度酒精脱水、浸蜡、包埋。采用连续切片的方法行 HE 染色,观察组织炎症变化,计数 EOS 浸润。每张切片由同一名观察者在高倍镜下($\times 400$)随机选择 10 个视野,分别计算支气管、血管周围 EOS 浸润的数量,平均值作为该片的代表值。

1.2.3 Eotaxin 及 ECP 测定 用酶联免疫吸附的方法测定(严格按照说明书操作)。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 11.5 统计软件处理。实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示;各组数据均行正态检验(Q-Q 图)和方差齐性检验(Levene 法);各指标比较均采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用 LSD 检验;指标间相关比较采用 pearson 相关分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

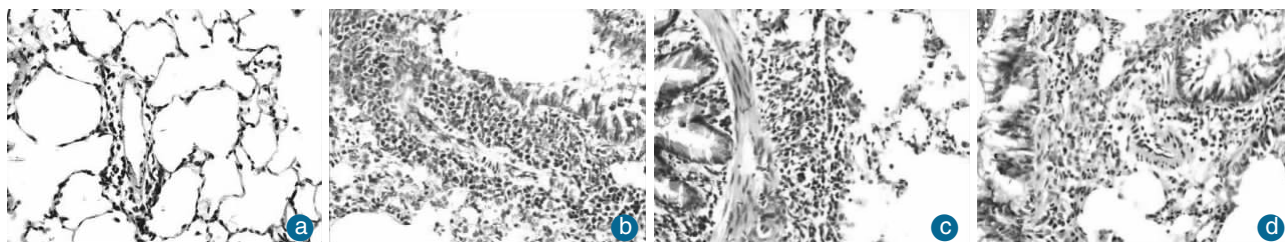
2 结果

各组大鼠模型肺组织病理改变见图 1。正常对照组大鼠肺组织中 EOS 数量少,哮喘模型组肺组织内有大量 EOS 浸润,福莫特罗组浸润 EOS 数量明显减少,并且随福莫特罗剂量增加,EOS 数量愈减少。糖皮质激素能够减少多种炎症细胞的浸润,起到保护肺组织的作用。HE 染色的 EOS 在镜下表现为胞浆呈鲜红色,细胞核为杆状核或呈分叶状。

各组大鼠肺组织匀浆中 eotaxin 及 ECP 的含量见表 1。福莫特罗干预下浸润 EOS 数量与 eotaxin 直线相关分析见表 2、图 2。哮喘大鼠肺组织中 eotaxin 及 ECP 的含量明显增加,而福莫特罗各组含量明显减少;肺组织中 EOS 浸润数量与 eotaxin 的含量存在直线相关性。

3 讨论

众所周知,哮喘的本质是气道炎症,多种炎症细胞长期浸润气道是支气管哮喘的一个突出特征。通过对基因缺失的大鼠模型(如表达 IL-5、IL-4 的基因)的研究表明了 EOS 在哮喘病理改变和气道高反应性中的重要作用^[5]。



注: a, 正常对照组; b, 哮喘模型组; c, 中等剂量福莫特罗组; d, 地塞米松组

图 1 各组大鼠肺组织 HE 染色 ($\times 400$)

表 1 各组大鼠肺组织中浸润 EOS 数量、eotaxin 及 ECP 含量

$\bar{x} \pm s$

组别	例数	EOS 数量 (个/HP)	eotaxin (pg/mL)	ECP (ng/mL)
A 组	8	2.24 \pm 0.85	8.82 \pm 1.45	9.84 \pm 2.66
B 组	8	103.60 \pm 2.94 ^①	25.86 \pm 1.49 ^①	70.55 \pm 6.34 ^①
C 组	8	28.39 \pm 2.26 ^②	21.33 \pm 1.09 ^②	54.79 \pm 5.13 ^②
D 组	8	20.18 \pm 1.29 ^③	19.90 \pm 1.36 ^④	50.62 \pm 4.00 ^⑤
E 组	8	16.04 \pm 3.54 ^⑥	18.22 \pm 1.51 ^⑦	42.35 \pm 3.23 ^⑧
F 组	8	7.22 \pm 3.02 ^⑨	16.33 \pm 1.61 ^⑩	25.48 \pm 5.88

注: 检验水准 $\alpha = 0.05$; ①与 A 组比较 $P < 0.01$; ②与 B 组比较 $P < 0.01$; ③与 C 组比较 $P < 0.01$; ④与 C 组比较差异无显著性, $P = 0.052$; ⑤与 C 组比较差异无显著性, $P = 0.086$; ⑥与 D 组比较 $P < 0.05$; ⑦与 C 组比较 $P < 0.01$, 与 D 组比较 $P < 0.05$; ⑧与 C、D 组比较 $P < 0.01$; ⑨与 E 组比较 $P < 0.01$, 与 A 组比较 $P < 0.05$; ⑩与 E 组比较 $P < 0.05$

表 2 福莫特罗干预下 EOS 与 eotaxin 相关分析

处理	例数	决定系数 (R^2)	相关系数 (r)	P 值
福莫特罗	24	0.809	0.899	< 0.01

注: 检验水准 $\alpha = 0.05$

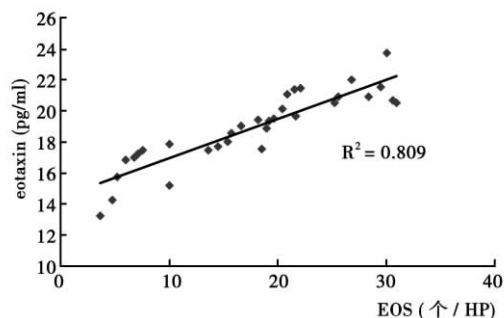


图 2 福莫特罗干预下 EOS 数量与 eotaxin 含量相关分析

β_2 受体激动剂是最有效的支气管扩张药物, 能够迅速改善临床症状, 是哮喘急性发作的首选药物。有研究表明长效 β_2 受体激动剂不但能够扩张气道, 还具有一定的抗气道炎症, 增强黏液-纤毛运输功能, 减轻气道渗出等作用。本实验结果表明在为期 1 周的治疗后, 福莫特罗组大鼠肺组织内 EOS 数量明显减少, 并且呈剂量依赖性。这说明福莫特罗能够减少哮喘大鼠气道中 EOS 浸润数量, 其相关机制也有不同的研究结果。

影响 EOS 向肺组织内迁移的主要细胞因子是 IL-5 和 eotaxin, 有研究表明福莫特罗不能通过 IL-5

影响 EOS 在肺组织内的浸润^[6]。Eotaxin 是由呼吸道上皮细胞、平滑肌、纤维母细胞及多种炎症细胞, 如淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、上皮细胞和 EOS 等分泌的, 属于 C-C 化学性趋化因子超家族中的 β 亚群。本实验发现哮喘大鼠肺组织匀浆中的 eotaxin 含量明显升高, 地塞米松能够明显减少 eotaxin 的含量, 3 种剂量福莫特罗均能减少肺组织匀浆中 eotaxin 的含量, 中等剂量与小、大剂量的差异无显著性, 考虑剂量选择上组距较小的缘故。福莫特罗干预后气道中浸润 EOS 数量与肺组织匀浆中 eotaxin 存在明显的直线相关 ($r = 0.899$, $P < 0.01$), 说明福莫特罗可能通过抑制 eotaxin 的表达减少肺组织内 EOS 浸润的数量。

活化的 EOS 能够分泌多种毒性蛋白, 痰液中的 ECP 较血清中的含量更能反映患者病情的严重程度, 是抗炎疗效的观测指标之一。本实验测定了肺组织匀浆中 ECP 的含量, 结果证明福莫特罗能够减少肺组织内 ECP 的含量。一些研究表明在体外福莫特罗能够通过抑制血小板或纤维母细胞等多种途径抑制 EOS 的活化, 减少炎症介质的释放, 推测在体内亦有相同的作用。本实验尽管观察到 ECP 含量降低了, 但是尚不能排除 EOS 数量变化对 ECP 含量的影响。

总之, 通过我们的实验研究证实福莫特罗能够减轻气道的 EOS 炎症, 可能是通过抑制 eotaxin 的表达, 从而减少 EOS 由外周血向肺组织内迁移

的。近年来国外有研究报道,长期应用 β_2 受体激动剂能够增加气道高反应性和过敏原诱发的气道反应,并且长期吸入 β_2 受体激动剂能够增加气道的 EOS 数量^[7],长期单独应用 LABA 治疗哮喘,患者气道的 EOS 炎症不能有效控制^[8],而且其扩张支气管的作用掩盖了气道炎症的恶化^[9],影响患者及时治疗。也有体外实验证实福莫特罗能够抑制 EOS 凋亡,从而加重气道炎症的研究,尤其是长期应用 β_2 受体激动剂。这需要进一步的临床实验来证实。

4 参考文献

- [1] Shen H H. Eosinophil: central mediator of allergic asthma [J]? Chin Med J, 2005, 118(1): 4-5.
- [2] Torrego A, Hew M, Oates T, et al. Expression and activation of TGF- β isoforms in acute allergen-induced remodeling in asthma [J]. Thorax, 2007, 62(4): 307-313.
- [3] Ueki S, Adachi T. Expression of PPAR gamma in eosinophils and its functional role in survival and chemotaxis [J]. Immunol Lett, 2003, 86(2): 183-189.
- [4] Lloyd C M, Gonzalo J A, Nguyen T, et al. Resolution of

bronchial hyperresponsiveness and pulmonary inflammation is associated with IL-3 and tissue leukocyte apoptosis [J]. J Immunol, 2001, 166(3): 2033-2040.

- [5] Leigh R, Ellis R, Wattie J N, et al. Type 2 cytokines in the pathogenesis of sustained airway dysfunction and airway remodeling in mice [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2004, 169(7): 860-867.
- [6] Wallin A, Sandstrom T. The effects of regular inhaled formoterol and budesonide on preformed Th-2 cytokines in mild asthmatics [J]. Respir Med, 2002, 96(12): 1021-1025.
- [7] Aldridge R E, Hancox R J, Robin Taylor D, et al. Effects of terbutaline and budesonide on sputum cells and bronchial hyperresponsiveness in asthma [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161(5): 1459-1464.
- [8] Kips J C. A long-term study of the antiinflammatory effect of low-dose budesonide plus formoterol versus high-dose budesonide in asthma [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161(3 Pt 1): 996-1001.
- [9] McIvor R A, Pizzichini E, Turner M O, et al. Potential masking effects of salmeterol on airway inflammation in asthma [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 158(3): 924-930.

(收稿:2009-08-11 编辑:徐荣远)

不同剂量芹菜素对急性局灶性大鼠脑缺血/再灌注损伤神经保护作用的影响

王果 韩书珍 陈翔 李泽宜 牛文泽 李雪梅

摘要 目的:观察不同剂量芹菜素对急性局灶性大鼠脑缺血/再灌注损伤的神经保护作用,探讨发挥芹菜素脑保护作用的适宜剂量。方法:采用改良线栓法建立局灶性脑缺血/再灌注模型,对大鼠进行神经行为学评分,测定脑组织含水量、伊文思蓝(EB)和丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化以及芹菜素对上述变化的影响。结果:模型组和芹菜素组的神经行为学评分、脑含水量、EB及MDA含量均显著升高,SOD活性显著降低;和模型组比较,芹菜素组可降低神经行为学评分、脑含水量、EB及MDA含量,提高SOD活性,其中以中剂量组(25 mg/kg)改变最为明显。结论:芹菜素以中剂量组(25 mg/kg)对急性缺血/再灌注脑损伤的保护作用最为显著。

关键词 脑缺血; 芹菜素; 脑含水量; 伊文思蓝; 丙二醛; 超氧化物歧化酶

芹菜素是天然存在的一种黄酮类化合物,广泛存在于多种水果、蔬菜、豆类和茶叶中。研究发现芹菜素具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、镇静、促进碳水化合物代谢、神经保护、免疫调节等作用。本课题组前期实验已证实芹菜素(25 mg/kg)能通过改善脑水

肿、降低脑毛细血管通透性减轻脑缺血损伤^[1]。但芹菜素在脑缺血后发挥脑保护作用的适宜剂量,目前尚无体内实验可以证明。有研究报道芹菜素发挥镇静作用的最低有效浓度是 25 mg/kg^[2]。本实验旨在利用大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型,以 25 mg/kg 芹菜素为中剂量组,10 和 50 mg/kg 芹菜素分别作为低剂量和高剂量组,腹腔注射后对比研究其对脑缺血再灌注后的脑保护作用,探讨芹菜素发挥脑保护作用的适宜剂量。

1 材料与方法

1.1 材料 SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只,体重(250 ±

doi: 10.3969/j.issn.1006-5725.2010.13.014

基金项目:温州市科技局国际合作项目(编号:H20070034)

作者单位:325000 温州医学院附属第二医院育英儿童医院
康复中心

通信作者:陈翔 E-mail:chen1962xiang@sina.com