

孟鲁司特对哮喘豚鼠气道嗜酸性粒细胞凋亡及 Fas mRNA 表达的影响

武玉清, 周成华, 张洪泉*

(扬州大学 医药研究所, 江苏 扬州 225001)

摘要: 目的 研究白三烯受体拮抗剂孟鲁司特(montelukast, MK)对哮喘豚鼠气道嗜酸性粒细胞(eosinophil, Eos)凋亡和 Fas mRNA 表达的影响。方法 以卵白蛋白致敏豚鼠制备哮喘模型。用密度梯度离心法分离并计数支气管肺泡灌洗液(BALF)中的嗜酸性粒细胞;采用 TUNEL 技术原位检测嗜酸性粒细胞凋亡;通过逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)技术检测嗜酸性粒细胞 Fas mRNA 的表达。结果 孟鲁司特能显著降低哮喘豚鼠 BALF 中 Eos 的数量;在孟鲁司特治疗组,嗜酸性粒细胞凋亡指数明显升高, Fas mRNA 的表达显著增强,与模型组比较均有显著性差异。结论 嗜酸性粒细胞凋亡与 Fas mRNA 表达增加高度相关;增强气道嗜酸性粒细胞 Fas mRNA 的表达,促进其凋亡,可能是孟鲁司特拮抗哮喘气道炎症的一个重要机制。

关键词: 白三烯受体拮抗剂; 孟鲁司特; 哮喘; 嗜酸性粒细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R562.25; R976 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2004)10-0769-05

Effects of montelukast on apoptosis and Fas mRNA expression of eosinophils in airway of asthmatic guinea pigs

WU Yu-qing, ZHOU Cheng-hua, ZHANG Hong-quan*

(Medical and Pharmacological Institute of Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

Abstract: Aim To study the effect of montelukast on apoptosis and Fas mRNA expression of eosinophils in airway of asthmatic guinea pigs. **Methods** Experimental asthma model of guinea pigs was induced by ovalbumin. The eosinophils in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) were separated by density gradient centrifugation. The apoptosis of eosinophils was labeled by TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) technique. Fas mRNA expression of eosinophils was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** After treatment with montelukast, the number of eosinophils in BALF of asthmatic guinea pigs decreased significantly. The apoptosis index as well as Fas mRNA expression of eosinophils were elevated significantly. There were statistical differences between the therapeutic group and the model group. **Conclusion** Apoptosis of eosinophils is highly correlated with the increased expression of Fas mRNA. Enhancing expression of Fas mRNA and promoting apoptosis of eosinophils subsequently may be an important mechanism for montelukast to antagonize airway inflammation of asthma.

Key words: leukotriene receptor antagonist; montelukast; asthma; eosinophil; apoptosis

孟鲁司特(montelukast, MK)是一种新型高选择性半胱氨酰白三烯受体(1)拮抗剂,是新一代非甾体类抗炎药。研究发现,孟鲁司特能降低肺毛细血

管通透性和气道高反应性^[1];具有抑制气道重塑及抗肺纤维化作用^[2];并能降低呼出气体中一氧化氮(NO)的含量^[3];孟鲁司特可抑制血清可溶性白细胞介素-2受体(sIL-2R)、白细胞介素-4(IL-4)、可溶性细胞间粘附分子-1(sICAM-1)、嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(ECP)^[1]和内皮素-1(ET-1)^[4]等多种细胞因子及炎症介质的释放;还能够抑制炎症细胞的

收稿日期: 2003-10-08.

基金项目: 江苏省新药研究基金资助项目(JP010622080560).

*通讯作者 Tel: 86-514-7978821, Fax: 86-514-7978821,

E-mail: hqzhang3000@eastday.com

游走迁移、聚集、增殖和活化^[5]。但孟鲁司特对哮喘气道嗜酸性粒细胞凋亡的影响及其凋亡机制的研究国内外尚未见报道。本实验研究了孟鲁司特对哮喘豚鼠气道嗜酸性粒细胞凋亡及 Fas mRNA 表达的影响,为进一步阐明孟鲁司特拮抗哮喘气道炎症的机制提供了实验依据。

材料和方法

药品与试剂 孟鲁司特,美国默克公司生产,用时以 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)配成所需浓度的混悬液;卵白蛋白(OVA)、多聚赖氨酸,美国 Sigma 公司产品;Percoll 细胞分离液,瑞典 Pharmacia 公司产品;TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒,华美生物工程公司产品;经典总 RNA 抽提试剂盒,美国 Promega 公司产品;MMLV 一步法 RT-PCR 试剂盒,加拿大 BBI 公司产品。

器材及仪器 402 型超声雾化器,上海四菱医疗器械厂产品;TGLL-18G 精华牌高速冷冻离心机,太仓市医疗厂产品;LD4-2A 型水平离心机,北京医用离心机厂产品;国华 SK-1 快速混匀器,深圳天南海北实业有限公司产品;RY-2000 瑞医病理图文分析系统,东南大学瑞医科技产品;Biometra 梯度 DNA 扩增仪,德国 Biotron 公司产品;TANON GIS-2008 数码凝胶图像处理系统,天能科技(上海)有限公司产品。

动物与分组 健康豚鼠 40 只,250-350 g,♀♂各半,由扬州大学实验动物中心提供。随机分为 5 组,每组 8 只。即正常对照组,哮喘模型组,MK 高、中、低剂量组(30,15,7.5 mg·kg⁻¹)。

哮喘模型建立与给药 参照文献[6]方法略加改进,正常对照组以生理盐水致敏和引喘,引喘前 2 h ig 0.5% 羧甲基纤维素钠。其余各组于实验 d 1 ip 5% 卵白蛋白 1 mL,同时双后肢分别 im 5% 的卵白蛋白 0.4 mL;d 15 起用 1% 卵白蛋白雾化吸入引喘,每天 1 次,连续 1 周,以出现呛咳、憋喘、呼吸加快、点头运动等症状为激发成功,每次引喘时间不超过 30 s。模型组引喘前 2 h ig 0.5% 羧甲基纤维素钠,孟鲁司特各剂量组引喘前 2 h 分别 ig 不同剂量的药物。于引喘的 d 1,观察各组豚鼠的喘息潜伏期(最长观察 6 min,超过 6 min 则按 6 min 计时)和跌倒率。

支气管肺泡灌洗液的制备^[7] 各组豚鼠于最后一次引喘后 4 h,以戊巴比妥钠 30 mg·kg⁻¹麻醉,立即经气管注入 4 °C D-Hanks 液 5 mL,轻轻按

摩胸部 20-30 s 后回收 BALF,共 3 次,回收率大于 90%。回收后的肺泡灌洗液于 4 °C,400 × g,离心 10 min,弃上清液,沉淀细胞用 D-Hanks 液 1 mL 重新悬浮,等待分离嗜酸性粒细胞。

嗜酸性粒细胞的分离 参考文献[8]方法配制不同密度的 Percoll 液。在 5 mL 离心管中依次加入密度为 1.100 和 1.085 g·mL⁻¹的 Percoll 液各 1 mL,最后加入上述细胞悬液 1 mL。960 × g 水平离心 15 min (20 °C),离心完毕后,回收不同密度 Percoll 液交界面的细胞层,即为嗜酸性粒细胞^[9]。用 D-Hanks 液 1 500 r·min⁻¹离心洗涤 10 min,洗涤 2 次后,再用 D-Hanks 液 1 mL 重悬,镜下计 Eos 绝对数。取少许细胞于多聚赖氨酸处理过的载玻片上,制备细胞涂片进行细胞凋亡检测。调整细胞数至约 2 × 10⁶·mL⁻¹,取 1 mL 进行 RT-PCR。

TUNEL 法检测嗜酸性粒细胞凋亡 严格按照 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作,以细胞核中有棕色颗粒者(以 DAB 为底物)为阳性细胞。由同一观察者在每张细胞涂片中随机选取 5 个高倍视野(×200 倍),分别计数细胞凋亡数目,计算每个视野中的细胞凋亡指数(凋亡指数 = 凋亡细胞/细胞总数 × 100%),计算平均值作为该切片的代表值。

引物合成 引物参照文献[2]由上海 Sangon 生物工程技术服务有限公司合成,PAGE 纯化,纯度大于 99%。Fas 同义链:5'-CAA GGG ACT GAT AGC ATC TTT GAG G-3';Fas 反义链:5'-TGT GAA AGT CCA GAA CCC TAA GG-3',扩增产物长度为 328 bp。β-Actin 同义链:5'-CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA C-3';β-actin 反义链:5'-AGG GTA CAT GTG GTG CCG CCA GA-3',扩增产物长度为 587 bp。

总 RNA 抽提 选取 2 × 10⁶ 个细胞提取总 RNA,应用美国 Promega 公司经典总 RNA 抽提试剂盒,严格按照说明书步骤进行。最后提取的 RNA 用 DEPC 水 20 μL 溶解,68 °C 处理 10 min 助溶。测量 A₂₆₀ 和 A₂₈₀ 值。所有样品 A₂₆₀/A₂₈₀ > 1.8,以 1A₂₆₀ = 40 μg 计算 RNA 的产率,取 RNA 1 μg 进行 RT-PCR。

RT-PCR 反应体系 采用加拿大 BBI 公司 MMLV 一步法 RT-PCR 试剂盒,反应体系如下:2 × 反应混合液 25 μL,模板 RNA 1 μg,Fas 同义链、Fas 反义链、β-actin 同义链、β-actin 反义链引物终浓度各为 0.2 μmol·L⁻¹,MMLV/Taq 混合酶 1 μL,加

Rnase-free ddH₂O 至 50 μL。轻轻混匀,稍离心确保所有组分都在管底。

RT-PCR 反应条件 cDNA 合成和预变性(1 个循环):40 °C 45 min;94 °C 5 min。PCR 扩增(35 个循环):94 °C 30 s;58 °C 45 s;72 °C 1 min。终延伸(1 个循环):72 °C 10 min。

RT-PCR 产物检测 采用 1.5% 琼脂糖凝胶,加 RT-PCR 产物 10 μL 进行电泳,通过 TANON GIS-2008 数码凝胶图像处理系统对照片进行光密度扫描定量。计算 Fas 与内标 β-actin 积分光密度的比值(Fas/β-actin)。

统计学处理 除各组间跌倒率比较采用 χ² 检验外;其余结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用非配对 *t* 检验。所有数据以 SPSS 软件统计分析,采用 Pearson 法进行相关分析。

结果

1 孟鲁司特对诱发豚鼠哮喘的影响

模型组潜伏期最短,跌倒率最高,与正常对照组比较差异显著(*P* < 0.01);孟鲁司特各剂量组豚鼠,随着药物剂量的加大潜伏期逐渐延长,跌倒率依次降低,与模型组相比均有显著差异(*P* < 0.01)。见表 1。

Table 1 Effect of montelukast (MK) on latency and tumble ratio of asthmatic guinea pigs

Group	Dose/mg · kg ⁻¹	Latency/s	Tumble ratio/%
Normal control	-	360	0
Asthma model	-	64 ± 40 **	100 **
MK	7.5	173 ± 64 ^{△△}	37.5 ^{△△}
	15	268 ± 89 ^{△△}	25 ^{△△}
	30	313 ± 98 ^{△△}	25 ^{△△}

The process exceeding 6 min was treated as 6 min. *n* = 8, $\bar{x} \pm s$. ***P* < 0.01 vs normal control; ^{△△}*P* < 0.01 vs asthma model (latency by *t*-test; tumble ratio by Chi-square-test)

2 孟鲁司特对哮喘豚鼠气道嗜酸性粒细胞数量的影响

哮喘模型组 BALF 中嗜酸性粒细胞数量显著升高,与正常对照组相比有显著差异(*P* < 0.01);孟鲁司特各剂量组均能显著降低哮喘豚鼠气道嗜酸性粒细胞的数量,与模型组相比均有显著差异(*P* < 0.01)。见表 2。

3 孟鲁司特对哮喘豚鼠气道嗜酸性粒细胞 Fas mRNA 表达相对含量的影响

RT-PCR 产物检测结果表明,正常对照组 Eos 可

检测到 Fas mRNA 表达,哮喘模型组豚鼠气道嗜酸性粒细胞 Fas mRNA 表达明显减少;给予孟鲁司特防治后,各剂量组嗜酸性粒细胞 Fas mRNA 表达显著增加,与哮喘模型组相比均有显著差异,见表 3 和图 1。

Table 2 Effect of montelukast (MK) on the number of eosinophils (Eos) in BALF of asthmatic guinea pigs

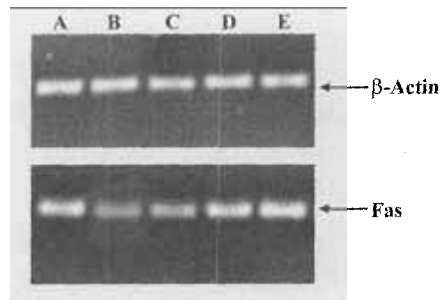
Group	Dose/mg · kg ⁻¹	The number of Eos/mL ⁻¹ (×10 ⁻⁶)
Normal control	-	2.4 ± 0.3
Asthma model	-	7.8 ± 1.2 **
MK	7.5	6.1 ± 0.8 ^{△△}
	15	4.9 ± 0.9 ^{△△}
	30	3.1 ± 0.6 ^{△△}

The eosinophils in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) were separated by density gradient centrifugation with Percoll and resuspended in D-Hanks 1 mL balanced salt solution. *n* = 8, $\bar{x} \pm s$. ***P* < 0.01 vs normal control; ^{△△}*P* < 0.01 vs asthma model

Table 3 Effect of montelukast (MK) on Fas mRNA expression of eosinophils in BALF of asthmatic guinea pigs

Group	Dose/mg · kg ⁻¹	Fas /β-actin
Normal control	-	0.92 ± 0.12
Asthma model	-	0.56 ± 0.13 **
MK	7.5	0.72 ± 0.15 [△]
	15	0.85 ± 0.22 ^{△△}
	30	1.03 ± 0.16 ^{△△}

n = 8, $\bar{x} \pm s$. ***P* < 0.01 vs normal control; [△]*P* < 0.05, ^{△△}*P* < 0.01 vs asthma model



A: Normal control; B: Asthma model; C: MK 7.5 mg · kg⁻¹; D: MK 15 mg · kg⁻¹; E: MK 30 mg · kg⁻¹

Figure 1 Effect of montelukast on Fas mRNA expression of eosinophils in BALF of asthmatic guinea pigs. Fas mRNA expression of eosinophils was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The 1.5% agarose gel was used for electrophoresis of the RT-PCR fragments of Fas mRNA and β-actin

4 孟鲁司特对哮喘豚鼠气道嗜酸性粒细胞凋亡的影响

哮喘模型组豚鼠气道 Eos 凋亡明显减少, 凋亡指数显著低于正常对照组 ($P < 0.01$); 给予孟鲁司特防治后, 各剂量组凋亡细胞明显增多, 凋亡指数与哮喘模型组相比均有显著差异。见表 4。

Table 4 Effect of montelukast (MK) on apoptosis of eosinophils in airway of asthmatic guinea pigs

Group	Dose/mg · kg ⁻¹	Apoptosis index of Eos/ %
Normal control	-	9.4 ± 1.9
Asthma model	-	5.8 ± 1.2**
MK	7.5	7.5 ± 1.7 ^Δ
	15	9.0 ± 1.6 ^{ΔΔ}
	30	12.1 ± 2.4 ^{ΔΔ}

The apoptosis of eosinophils was labeled by TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) technique. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs normal control; ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs asthma model

5 相关性分析

经过 Pearson 法进行相关性分析, 致敏豚鼠引喘潜伏期与嗜酸性粒细胞 Fas mRNA 表达呈显著性正相关 ($r = 0.712, P < 0.01$); 与细胞凋亡指数也呈显著正相关 ($r = 0.795, P < 0.01$)。哮喘模型组 Fas mRNA 表达最弱, 而嗜酸性粒细胞凋亡指数也最低; 孟鲁司特治疗组中, 随着剂量的加大, 嗜酸性粒细胞 Fas mRNA 表达逐渐增强, 而 Eos 凋亡指数也逐渐升高; 气道嗜酸性粒细胞 Fas mRNA 表达和凋亡指数呈显著性正相关 ($r = 0.824, P < 0.01$)。

讨论

目前认为, 支气管哮喘是一种以气道嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、肥大细胞浸润为主, 涉及多种炎性介质和细胞因子的慢性非特异性炎症性疾病。嗜酸性粒细胞聚集、活化及其释放高毒性阳离子蛋白在哮喘气道炎症的形成中发挥重要的作用。嗜酸性粒细胞聚集增加和凋亡延迟是肺内 Eos 浸润的重要因素, 而减少肺内 Eos 浸润则促进哮喘气道炎症的消退^[10]。

凋亡, 又称程序性细胞死亡, 通过凋亡清除体内多余的或衰老的细胞, 对于维持体内组织细胞的平衡与稳定具有重要的作用。凋亡细胞体积缩小, 胞核染色质紧结, 晚期胞浆形成由胞膜包绕的含有核碎片的凋亡小体, 凋亡细胞细胞膜完整, 可被巨噬细胞完整吞噬, 不释放胞内炎症介质, 不引起炎症过

程, 有利于炎症控制。近年发现在哮喘气道炎症消退过程中, Eos 存在凋亡现象, 如果凋亡延迟或不足, 则会使炎症反应持续或进一步扩大^[11,12]。

在多种细胞中起凋亡作用的 Fas (Apo-1/CD95) 是一种 45×10^3 u 的跨膜蛋白, 属肿瘤坏死因子受体超家族, 可在多种细胞中表达。Fas 抗原与它的天然配体 (FasL) 或其抗体结合后, 诱导细胞内的酪氨酸和丝氨酸/苏氨酸磷酸化以及引起细胞内 Ca^{2+} 浓度升高, 促进细胞凋亡。在体外, Fas 配体及特异的单抗可致许多类型的细胞凋亡。最近发现 Eos 可表达恒定的 Fas 抗原水平, 抗 Fas 单抗在体外应用可加速 Eos 凋亡^[13]。有研究表明抗 Fas 抗体在 24 h 内几乎可完全缓解 Eos 肺炎^[14]。Fas 单抗可明显促进哮喘动物浸出的 Eos 凋亡, 从而降低其对乙酰胆碱的气道高反应性^[15]。提示 Fas 抗原参与了 Eos 凋亡的调节。

作者研究发现, 孟鲁司特能显著延长致敏豚鼠的引喘潜伏期, 降低跌倒率, 说明孟鲁司特对豚鼠哮喘具有较强的拮抗作用。相关分析表明, 致敏豚鼠的引喘潜伏期与嗜酸性粒细胞 Fas mRNA 表达和细胞凋亡指数均呈显著性正相关, 哮喘豚鼠气道 Eos 的凋亡指数与其 Fas mRNA 表达也呈显著性正相关。正常豚鼠的 Eos 存在一定量的 Fas mRNA 表达, 而哮喘豚鼠 Eos 表达 Fas 明显下降, 同时细胞凋亡减少, BALF 中 Eos 数量显著升高, 与正常对照组相比均有显著差异, 这可能是导致哮喘气道炎症的重要机制之一。提示 Fas 依赖的 Eos 凋亡参与了哮喘 Eos 炎症的调控。应用孟鲁司特后, 其 Fas 抗原表达增加, 细胞凋亡指数也升高, BALF 中 Eos 数量也显著下降, 表明孟鲁司特影响了 Fas/FasL 通路, 促进细胞凋亡, 有利于肺组织炎症的清除, 从而发挥拮抗哮喘的发作和减轻发作程度的作用。

凋亡调节的缺失是导致组织及血中 Eos 增多的重要原因, Fas 抗原也参与了哮喘豚鼠 Eos 凋亡的调节。白三烯受体拮抗剂孟鲁司特可增强哮喘肺组织中的 Eos 表达 Fas 抗原, 进而促进细胞凋亡, 减少气道 Eos 浸润, 可能是其拮抗哮喘气道炎症的一个重要机制。

References:

- [1] Stelmach I, Jerzynska J, Kuna P. A randomized, double-blind trial of the effect of treatment with montelukast on bronchial hyperresponsiveness and serum eosinophilic cationic protein (ECP), soluble interleukin 2 receptor (sIL-2R), IL-4, and soluble intercellular

- adhesion molecule 1 (sICAM-1) in children with asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, **109**(2):257-263.
- [2] Henderson WR Jr, Tang LO, Chu SJ, *et al.* A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, **165**(1):108-116.
- [3] Bisgaard H, Loland L, Oj JA. NO in exhaled air of asthmatic children is reduced by the leukotriene receptor antagonist montelukast [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, **160**(4):1227-1231.
- [4] Finsnes F, Lyberg T, Christensen G, *et al.* Leukotriene antagonism reduces the generation of endothelin-1 and interferon-gamma and inhibits eosinophilic airway inflammation [J]. *Respir Med*, 2002, **96**(11):901-906.
- [5] Braccioni F, Dorman SC, O'byrne PM, *et al.* The effect of cysteinyl leukotrienes on growth of eosinophil progenitors from peripheral blood and bone marrow of atopic subjects [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, **110**(1):96-101.
- [6] Zhang HQ, Lin AP, Ge XQ, *et al.* Effect of bambuterol on experimental asthma and its mechanism in guinea pigs [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther* (中国临床药理学与治疗学), 2001, **6**(4):339-342.
- [7] Li ZK, Wang CZ, Qian GS. Fas expression on eosinophils in lungs and its changes after treatment in asthmatic guinea pigs [J]. *Acta Acad Med Mil Tert* (第三军医大学学报), 1999, **21**(5):321-324.
- [8] Gartner I. Separation of human eosinophils in density gradients of polyvinylpyrrolidone-coated silica gel (percoll) [J]. *Immunol*, 1980, **40**(1):133-136.
- [9] Guo XM, Wang CZ, Lai KF, *et al.* Induction of eosinophil apoptosis and expression suppression of IL-5 and GM-CSF mRNA in allergic asthma with tripholide in guinea pigs [J]. *Acta Acad Med Mil Tert* (第三军医大学学报), 1999, **21**(9):627-629.
- [10] Walsh GM. Eosinophil apoptosis: mechanisms and clinical relevance in asthmatic and allergic inflammation [J]. *Br J Haematol*, 2000, **111**(1):61-67.
- [11] Haczku A. T cells and eosinophils in asthma [J]. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 1998, **45**(1):17-19.
- [12] Wenzel SE, Larsen GL, Johnston K, *et al.* Elevated levels of leukotriene C4 in bronchoalveolar lavage fluid from atopic asthmatics after endobronchial allergen challenge [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1990, **142**(1):110-112.
- [13] Hebestreit H, Youseti S, Batti I, *et al.* Expression and function of the Fas receptor on human blood and tissue eosinophils [J]. *Eur J Immunol*, 1996, **26**(8):1775-1776.
- [14] Tsuyuki S, Bertrand C, Erard F, *et al.* Activation of the Fas receptor on lung eosinophilic inflammation of the airways [J]. *J Clin Invest*, 1995, **96**(6):2923-2925.
- [15] Yamashita N, Tajima M, Nakano J, *et al.* Induction of apoptosis in bronchial eosinophils: beneficial or harmful? [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2000, **122**(Suppl 1):40-43.