

论著·实验研究

STAT6 和 ORMDL3 在哮喘小鼠肺组织中的表达及布地奈德的干预作用

邹丽萍 张希 张艳 许秀娟 王铁锋

(郑州大学第三附属医院儿内科, 河南 郑州 450052)

[摘要] **目的** 探讨信号转导和转录激活因子6 (STAT6) 以及哮喘易感基因血清类黏蛋白1样蛋白3 (ORMDL3) 在哮喘小鼠气道重塑中的作用, 并观察布地奈德 (BUD) 对上述两种物质水平的干预作用。**方法** BALB/c 雌性小鼠30只, 随机分为对照组、哮喘组和BUD组。应用鸡卵清蛋白 (OVA) 激发试验建立哮喘小鼠模型, BUD组在每次激发前30 min应用生理盐水溶解的BUD雾化液进行雾化吸入, 对照组应用生理盐水替代OVA溶液。苏木精-伊红染色及Masson染色观察各组小鼠气道病理学改变; ELISA法检测各组小鼠肺组织匀浆中IL-13水平; RT-PCR法检测各组肺组织STAT6及ORMDL3的mRNA表达。**结果** 哮喘组气道病理学改变较正常组和BUD组明显, 而BUD组气道病理学变化较哮喘组减轻。哮喘组和BUD组IL-13水平、STAT6及ORMDL3的mRNA表达均明显高于对照组 ($P<0.05$), 且哮喘组IL-13水平、STAT6和ORMDL3的mRNA表达均高于BUD组 ($P<0.05$)。Pearson相关分析显示STAT6和ORMDL3 mRNA在哮喘组的表达呈正相关 ($r=0.676, P=0.032$)。**结论** STAT6和ORMDL3可能参与了小鼠气道重塑过程, BUD可能通过下调STAT6和ORMDL3的mRNA表达, 改善气道重塑。 [中国当代儿科杂志, 2014, 16(2): 198-202]

[关键词] 哮喘; STAT6; ORMDL3; 气道重塑; 小鼠

Down-regulatory effects of budesonide on expression of STAT6 and ORMDL3 in lung tissues of asthmatic mice

ZOU Li-Ping, ZHANG Xi, ZHANG Yan, XU Xiu-Juan, WANG Tie-Feng. Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Email: zlpzlpzyz@163.com)

Abstract: Objective To investigate the roles of signal transduction and activator of transcription 6 (STAT6) and orosomucoid 1-like 3 (ORMDL3) in airway remodeling among asthmatic mice and to observe the effects of budesonide (BUD) on their expression. **Methods** Thirty BALB/c mice were randomly divided into control, asthma, and BUD intervention group. The mice were sensitized and challenged with ovalbumin (OVA) to establish a mouse model of asthma. The BUD intervention group received aerosol inhalation of BUD dissolved in normal saline 30 minutes before each OVA challenge, while normal saline was used instead of OVA solution in the control group. The pathological changes in the airway were observed by hematoxylin-eosin staining and Masson staining. The interleukin-13 (IL-13) level in lung homogenate was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The mRNA expression of STAT6 and ORMDL3 was measured by RT-PCR. **Results** The asthma group showed more pathological changes in the airway than the control and BUD intervention groups, and the BUD intervention group had reduced pathological changes in the airway compared with the asthma group. The asthma and BUD intervention groups had significantly higher IL-13 levels and mRNA expression of STAT6 and ORMDL3 than the control group ($P<0.05$), and these indices were significantly higher in the asthma group than in the BUD intervention group ($P<0.05$). The Pearson correlation analysis showed that STAT6 mRNA expression was positively correlated with ORMDL3 mRNA expression ($r=0.676, P=0.032$). **Conclusions** STAT6 and ORMDL3 may be involved in the airway remodeling of mice, and BUD can reduce airway remodeling in asthmatic mice, possibly by down-regulating mRNA expression of STAT6 and ORMDL3.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(2): 198-202]

Key words: Asthma; STAT6; ORMDL3; Airway remodeling; Mice

[收稿日期] 2013-07-13; [接受日期] 2013-12-27

[基金项目] 郑州市科技局的计划项目 (121PPTGG507-21)。

[作者简介] 邹丽萍, 女, 本科, 主任医师。

支气管哮喘 (bronchial asthma), 简称哮喘, 是儿童时期最常见的慢性呼吸道疾病, 反复喘息严重威胁儿童的身心健康, 因此研究哮喘的发病机制尤为重要。信号转导和转录激活因子 (signal transduction and activator of transcription, STAT) 是与靶基因调控区 DNA 结合的新型转录因子家族。在介导多种细胞因子及趋化因子的信号转导中发挥着重要作用。STAT6 是 STAT 家族成员之一, 近年来发现 STAT6 在哮喘的发生发展中起到重要作用; 血清类黏蛋白 1 样蛋白 3 (orosomucoid 1-like 3, ORMDL3) 基因是与儿童哮喘的发生有密切关系的哮喘易感基因^[1], 其编码位于内质网上由 153 个氨基酸组成的跨膜蛋白, 目前 ORMDL3 与气道重塑的关系仍不明了; 本研究探讨哮喘小鼠气道重塑中 STAT6 和 ORMDL3 表达情况和布地奈德 (budesonide, BUD) 的干预作用, 为临床治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF 级 4~6 周龄 BALB/c 雌性小鼠 30 只, 体重 20~25 g, 购于河南省动物实验中心, 遵照随机数字法分为对照组、哮喘组、BUD 干预组, 每组各 10 只。

1.2 主要试剂

鸡卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 购于美国 Sigma 公司, BUD 混悬液购于阿斯利康公司, ELISA 试剂盒购于北京博奥森生物技术有限公司, TRIzol、反转录试剂盒及 PCR 试剂盒均购于法国 Transgene 公司。

1.3 哮喘模型制备及干预

参照 Yang 等^[2]报道的制备哮喘小鼠模型的方法并略加改进, 哮喘组和 BUD 组小鼠分别于第 1、8、15 天腹腔内注射 OVA-氢氧化铝混悬液 0.2 mL (其中 OVA 20 μ g, 氢氧化铝 2 mg) 致敏各 1 次, 对照组应用生理盐水 0.2 mL 替代致敏液行腹腔注射。从第 22 天开始激发, 哮喘组和 BUD 组应用 1%OVA 5 mL 雾化吸入, 每次 30 min, 每天 1 次, 共 14 d; BUD 组在每次激发前 30 min 应用生理盐水溶解的 BUD 雾化液 5 mL (含 BUD 1 mg) 进行雾化治疗^[3]; 对照组应用生理盐水 5 mL 替代

1%OVA 进行雾化吸入。抗原激发后小鼠出现打喷嚏、烦躁不安、呼吸加快、抓耳挠腮、竖毛等表现提示哮喘模型成功。

1.4 标本制作

参照文献^[4], 各组小鼠分别在末次激发后 24 h 内, 乙醚麻醉, 开胸结扎左肺门, 取左肺至于液氮中保存, 用于 RT-PCR 及 ELISA 检测, 经右心室插管至肺动脉, 应用生理盐水对右肺进行匀速灌注、冲洗至肺组织变为白色, 然后应用 4% 甲醛进行内固定, 取右肺中叶浸入 4% 的甲醛中行外固定 24 h, 石蜡包埋, 3 μ m 切片, 行苏木精-伊红 (HE) 染色和 Masson 染色, 于 400 倍光镜下观察气道壁病理学改变。

1.5 ELISA 法检测肺组织 IL-13 水平

称取各组小鼠肺组织, 加入适量生理盐水冰浴下用匀浆器制成匀浆, 4000 r/min 离心 10 min, 取上清。考马斯亮蓝法 (Bradford) 检测肺组织匀浆中总蛋白含量。采用 ELISA 法检测肺组织匀浆中 IL-13 含量, 操作过程按 ELISA 试剂盒说明进行。所测 IL-13 含量用肺组织匀浆的总蛋白含量校正。

1.6 RT-PCR 检测 STAT6 和 ORMDL3 mRNA 表达的变化

采用 TRIzol 提取各组小鼠肺组织总 RNA, 用反转录试剂盒反转录为 cDNA, 设计引物并扩增目的基因片段。STAT6 上游引物: 5'-ACGGCTCTATG-TTGACTTTC-3', 下游引物: 5'-AGATGCTGTTTCCC-TTCC-3', 片段长度: 185 bp; ORMDL3 上游引物: 5'-TGTTGGCTTGTTTACCCTC-3', 下游引物: 5'-CC-CTTGCTCAGAACTCCC-3', 片段长度: 327 bp; 以 GAPDH 作为内参, 上游引物: 5'-CCACTTGAA-GGGTGGAGC-3', 下游引物: 5'-TGAAGTCG CAGG-AGACAA-3', 片段长度: 530 bp。反应体系为 50 μ L, 其中 cDNA 2 μ L、上下游引物各 1 μ L、缓冲液 (含 Mg^{2+}) 5 μ L、dNTPs 4 μ L、DNA 聚合酶 1 μ L、ddH₂O 36 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 57 $^{\circ}$ C (STAT6) / 55 $^{\circ}$ C (ORMDL3、GAPDH) 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增后产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 采用凝胶电泳成像系统分别测定 STAT6、ORMDL3 和内参 GAPDH 的灰度值, 并以 STAT6、ORMDL3 与 GAPDH 的比值作为其 mRNA 的表达水平。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件包对数据进行统计学分析, 计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间均数的比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 法; 两个因素之间相关性采用 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠肺组织病理学改变

对照组小鼠气道壁结构完整, 厚度正常, 上皮细胞排列正常, 可见少量胶原纤维。哮喘组气

道结构紊乱, 表现为明显的支气管壁增厚、杯状细胞化生、黏液分泌增多、胶原纤维增生, 可见大量炎症细胞浸润。BUD 组气道结构紊乱情况较哮喘组减轻, 炎症细胞较哮喘组减少。见图 1。

2.2 STAT6 和 ORMDL3 mRNA 及 IL-13 在各组小鼠肺组织中的表达比较

哮喘组小鼠肺组织中 IL-13 水平及 STAT6 和 ORMDL3 mRNA 的表达均明显高于 BUD 组及对照组 (均 $P < 0.05$), 同时 BUD 组肺组织中 IL-13 水平及 STAT6 和 ORMDL3 mRNA 的表达亦均明显高于对照组 (均 $P < 0.05$), 见表 1, 图 2~3。

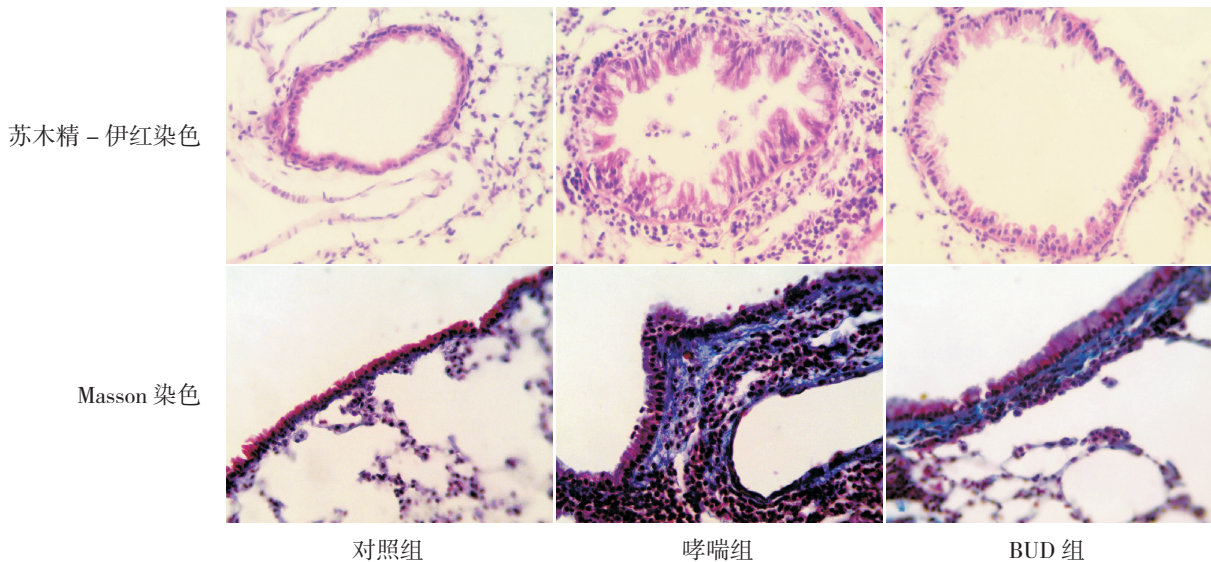


图 1 各组小鼠气道组织病理学变化 ($\times 400$) 苏木精-伊红染色结果示: 对照组气道壁厚度正常, 可见散在炎症细胞; 哮喘组气道壁增厚, 可见大量炎症细胞浸润; BUD 组气道壁厚度较哮喘组减轻, 炎症细胞较哮喘组减少。Masson 染色结果示: 对照组上皮细胞下可见少量胶原纤维; 哮喘组上皮细胞下可见较多胶原纤维; BUD 组胶原纤维较哮喘组明显减少, 图中胶原纤维显蓝色。

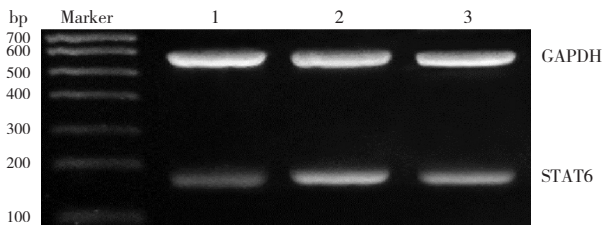


图 2 RT-PCR 检测各组小鼠肺组织 STAT6 mRNA 的表达变化 1: 对照组; 2: 哮喘组; 3: BUD 组。

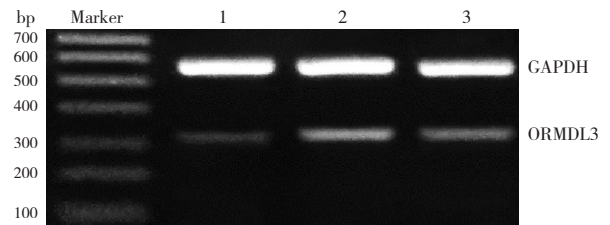


图 3 RT-PCR 检测各组小鼠肺组织 ORMDL3 mRNA 的表达变化 1: 对照组; 2: 哮喘组; 3: BUD 组。

表 1 各组小鼠肺组织中 IL-13 水平以及 STAT6 和 ORMDL3 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IL-13 (ng/mg)	STAT6 mRNA	ORMDL3 mRNA
对照组	10	26.4 ± 1.5	0.38 ± 0.07	0.075 ± 0.013
哮喘组	10	56.0 ± 2.6 ^a	0.78 ± 0.08 ^a	0.340 ± 0.032 ^a
BUD 组	10	37.2 ± 2.7 ^{ab}	0.52 ± 0.05 ^{ab}	0.194 ± 0.026 ^{ab}
F 值		416.988	92.472	290.457
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: a 为与对照组比较, $P < 0.05$; b 为与哮喘组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 相关分析

哮喘组 STAT6 mRNA 及 ORMDL3 mRNA 的表达水平呈正相关 ($r=0.676$, $P=0.032$)。

3 讨论

支气管哮喘以气道高反应、气道炎症及气道重塑为主要表现。气道重塑主要病理特征包括气管平滑肌增厚、上皮下纤维化、粘液腺的增生、新生血管的形成等。既往认为气道重塑发生于重度哮喘或哮喘病程晚期, 有研究显示在轻度患者及儿童哮喘的早期就存在气道重塑^[5]。气道重塑是不可逆的气道结构改变, 因此如何早期控制气道重塑是目前研究的重点。本实验应用 OVA 连续激发 14 d 制备哮喘模型, 哮喘组病理学改变可见气道壁厚度增加、炎症细胞增多、气道上皮胶原纤维沉积, 提示成功建立气道重塑模型。

STAT 是一种能与靶基因调控区 DNA 结合的新型转录因子家族。多种细胞因子通过 JAK/STAT6 途径而诱导目的基因表达, 发挥其生物学作用。STAT6 是 Th2 型淋巴细胞特异性转录因子, 可被 IL-4、IL-13 等激活后促使 Th2 细胞的增殖、分化, 同时促进释放 IL-4、IL-5、IL-13 等多种 Th2 型细胞因子, 导致 Th2 细胞功能亢进, 而 Th1/Th2 细胞亚群功能失衡是引起哮喘发病的主要原因^[6]。Blease 等^[7]证明与野生型小鼠 (STAT6^{+/+}) 相比, 基因敲除小鼠 (STAT6^{-/-}) 产生 Th2 型细胞因子的功能降低, 同时气道高反应性明显减轻。本研究中哮喘组 IL-13 水平及 STAT6 mRNA 的表达较对照组增高。推断经过过敏原反复刺激后小鼠体内 IL-13 分泌增加, 进而激活 JAK/STAT6 途径, 上调

STAT6 的表达, 促进粘液分泌、平滑肌细胞增生、胶原的生成, 参与气道重塑。

ORMDL3 基因是 2007 年定义的与儿童哮喘的发生有密切关系的易感基因, 定位于 17 号染色体长臂 21 号位 (17q21) 上, 其编码位于内质网膜的跨膜蛋白, 但是其功能及参与哮喘的机制目前还尚不清楚。已有研究证明 ORMDL3 在炎症性肠病^[8]、I 型糖尿病^[9] 等发病机制中起到重要作用, 表明 ORMDL3 可能参与了免疫系统失调。应用过敏原和细胞因子 (IL-4 或 IL-13) 刺激气道上皮细胞后 ORMDL3 mRNA 的表达增加^[10]。ORMDL3 的表达产物可以抑制内质网的 Ca²⁺ATP 酶 (SERCA) 活性并导致内质网中 Ca²⁺ 浓度减少, 同时增加非折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR)^[11-12]。研究显示内质网中钙泵调节异常可能是平滑肌过度释放与气道重塑有关细胞因子的基础^[13]; UPR 为一种内源性炎症途径, 可激活 NF- κ B 信号通路, 而受 NF- κ B 调控的基因产物囊括了大多数参与哮喘气道炎症及重塑的主要细胞因子和炎症介质^[14]。本研究结果显示哮喘组 IL-13 水平及 ORMDL3 mRNA 较对照组增高, 推断 IL-13 可能通过激活气道上皮细胞的内质网系统, 导致 ORMDL3 及其表达产物增加, 释放细胞因子及炎症介质参与气道重塑。Miller 等^[10] 发现 ORMDL3 表达高度依赖 STAT6 水平, Qiu 等^[15] 证明 STAT6 调控 ORMDL3 的表达, 也可能通过激活 JAK/STAT6 信号通路上调 ORMDL3 的表达。

本实验结合病理学哮喘组气道结构改变, RT-PCR 结果显示 STAT6 和 ORMDL3 mRNA 表达较对照组升高, 且二者呈正相关, 推断 STAT6 和 ORMDL3 可能共同参与了哮喘小鼠气道重塑过程, 且二者起协同作用。BUD 为吸入性糖皮质激素, 是目前治疗哮喘的有效药物, 副作用较全身应用糖皮质激素少。BUD 组 STAT6 及 ORMDL3 mRNA 表达较哮喘组降低, BUD 可能通过下调 STAT6 及 ORMDL3 的表达减轻气道重塑。可能的原因有: (1) BUD 可能通过抑制 IL-13 的表达, 直接下调 STAT6、ORMDL3 表达。(2) BUD 可能通过抑制 IL-13 的分泌, 间接抑制 JAK/STAT6 通路, 下调 STAT6、ORMDL3 的表达。(3) BUD 在体内对 STAT6 及 ORMDL3 的表达有直接调控作用。

[参 考 文 献]

- [1] Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma[J]. Nature, 2007, 448(7152): 470-473.
- [2] Yang G, Volk A, Petley T, et al. Anti-IL-13 monoclonal antibody inhibits airway hyperresponsiveness, inflammation and airway remodeling [J]. Cytokine, 2004, 28(6): 224-232.
- [3] 卞芳芳, 王军, 路名明, 等. ROR α 在支气管哮喘小鼠肺组织中的表达及BUD对其抑制作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2012, 14(8): 628-631.
- [4] 栾斌, 王亚哲, 张艳丽, 等. 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ 对哮喘小鼠肺内TIM-4表达的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2013, 15(1): 67-70.
- [5] Malmstrom K, Pelkonen AS, Malmberg LP, et al. Lung function, airway remodeling and inflammation in symptomatic infants: outcome at 3 years[J]. Thorax, 2011, 66(2): 157-162.
- [6] Goleva E, Hauk PJ, Boguniewicz J, et al. Airway remodeling and lack of bronchodilator response in steroid-resistant asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2007, 120(5): 1065-1072.
- [7] Blease K, Schuh JM, Jakubczik C, et al. Stat6-deficient mice develop airway hyperresponsiveness and peribronchial fibrosis during chronic fungal asthma [J]. Am J Pathol, 2002, 160(2): 481-490.
- [8] Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease[J]. Nat Genet, 2008, 9(8): 955-962.
- [9] Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, et al. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes[J]. Nat Genet, 2009, 9(6): 703-707.
- [10] Miller M, Tam AB, Cho JY, et al. ORMDL3 is an inducible lung epithelial gene regulating metalloproteases, chemokines, OAS, and ATF6[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(41): 16648-16653.
- [11] Cantero-Recasens G, Fandos C, Rubio-Moscardo F, et al. The asthma-associated ORMDL3 gene product regulates endoplasmic reticulum-mediated calcium signaling and cellular stress[J]. Hum Mol Genet, 2010, 19(1): 111-121.
- [12] McGovern DP, Gardet A, Torkvist L, et al. Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci[J]. Nat Genet, 2010, 9(4): 332-337.
- [13] Mahn K, Hirst SJ, Ying S, et al. Diminished sarco/endoplasmic reticulum Ca $^{2+}$ ATPase (SERCA) expression contributes to airway remodelling in bronchial asthma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(26): 10775-10780.
- [14] 陶莉, 等. 内质网应激在酒精性肝病中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2013, 29(7): 547-549.
- [15] Qiu R, Yang Y, Zhao H, et al. Signal transducer and activator of transcription 6 directly regulates human ORMDL3 expression[J]. FEBS J, 2013, 280(9): 2014-2026.

(本文编辑: 万静)

· 消息 ·

2014年国家级儿科神经病学新进展培训班暨学术会议通知

国家继续教育项目小儿神经病学新进展培训班暨学术会议将于2014年4月25~27日在深圳市福田区雅枫国际酒店举行。会议邀请北京大学、首都医科大学、中南大学、福建医科大学、暨南大学和深圳市儿童医院专家就儿科神经病学热点问题、新进展讲座。主要内容有: 脑电图新进展与管理, 结节性硬化症诊断标准与治疗新进展, 小儿颅内感染(化脑、病脑)最新指南, 癫痫持续状态急救, 癫痫外科神经电生理定位与术中监测, 小儿癫痫等神经系统遗传性疾病分子诊断, 生酮饮食疗法新进展, 神经科学学术论文撰写, 儿科药物临床试验机构管理与治疗药物监测。同期进行学术会议, 欢迎踊跃投稿。投稿范围: 小儿癫痫, 颅内感染, 小儿脑瘫, 小儿神经肌肉病, 脑电图, 神经遗传代谢病, ADHD, 抽动障碍, 孤独症等小儿神经系统疾病。投稿格式: 结构式摘要1000字以内, 欢迎论著全文投稿。来稿需注明作者姓名、通讯地址、email、手机。投稿方式: 电子邮件, word格式, 主题: 2014年深圳儿科神经病学学术会议投稿。邮件地址: epilepsycenter@vip.163.com。截稿日期: 2014年4月10日。全文投稿格式按《中国实用神经疾病杂志》投稿要求, 杂志编委会挑选合格论著10篇发表。凡参会者可获国家级医学继续教育证书及I类学分8分。注册费: 1200元, 研究生凭研究生证600元。食宿统一安排, 费用自理。项目负责人: 廖建湘。学术委员会主任: 翟琼香。联系人: 胡雁、吴勇, 联系电话: 18718796805。主办单位: 深圳市医学继续教育中心, 深圳市儿童医院和深圳市抗癫痫协会。承办: 深圳市儿童医院, 深圳市抗癫痫协会。日程: 2014年4月25日报到; 26~27日全天交流, 27日下午撤离。

深圳市医学继续教育中心
深圳市儿童医院
深圳市抗癫痫协会
2013年12月26日