

Notch2、Notch4 受体在哮喘小鼠肺中的表达及布地奈德、姜黄素对其影响

崇 蕾 张维溪 聂 颖 王 婷 李昌崇

摘 要 **目的** 探讨 Notch2、Notch4 受体在哮喘小鼠肺组织中的表达水平以及布地奈德和姜黄素对其的影响。**方法** 将 32 只 Balb/c 小鼠按随机数字表法随机分为正常对照组(A 组),哮喘组(B 组),布地奈德组(C 组)和姜黄素组(D 组),每组 8 只。以卵白蛋白致敏激发建立哮喘小鼠气道炎症模型,每组小鼠分别于末次激发后处死,取肺组织行 HE 染色观察炎症浸润程度,免疫组织化学染色和 RT-PCR 法检测各组小鼠肺组织中 Notch2 和 Notch4 受体蛋白和 mRNA 的表达水平。**结果** (1)C、D 组 Notch2 蛋白及 mRNA 表达[分别为 (0.075 ± 0.002) 、 (0.073 ± 0.002) 和 (0.088 ± 0.012) 、 (0.085 ± 0.008)]均明显低于 B 组[分别为 (0.104 ± 0.005) 、 (0.275 ± 0.015)],但仍高于 A 组[分别为 (0.049 ± 0.004) 、 (0.041 ± 0.007)], P 均 < 0.05 。(2)4 组 Notch4 蛋白及 mRNA 表达分别为 (0.121 ± 0.004) 、 (0.118 ± 0.003) 、 (0.117 ± 0.004) 和 (0.117 ± 0.005) 以及 (0.595 ± 0.019) 、 (0.601 ± 0.125) 、 (0.606 ± 0.145) 、 (0.604 ± 0.019) ,差异无统计学意义,均 $P > 0.05$ 。**结论** Notch2 受体参与哮喘小鼠气道炎症过程,布地奈德和姜黄素可能部分通过 Notch2 受体对哮喘小鼠气道炎症有一定抑制作用;Notch4 受体对哮喘小鼠气道炎症无明显影响。

关键词 Notch 受体 哮喘气道炎症 布地奈德 姜黄素

Expression of Notch2, Notch4 Receptors in Lung of Asthmatic Mice and the Effects of Budesonide and Curcumin. Chong Lei, Zhang Weixi, Nie Ying, Wang Ting, Li Changchong. Department of Pediatric Pulmonology, The Second Affiliated Hospital & Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract **Objective** To observe the expressions of Notch2, Notch4 receptors in the lung and the effects of budesonide and curcumin on the airway inflammation in asthmatic mice. **Methods** 32 Balb/c mice were randomly divided into 4 groups: normal control group (A group), asthma group (B group), budesonide group (C group) and curcumin group (D group), with each 8 mice. We use ovalbumin to allergize and challenge mice to establish asthmatic airway inflammation model. After the last challenge, each mouse was killed and its lung tissues were extracted for HE staining, immunohistostaining and RT-PCR. The airway inflammation invasion degree was observed through HE staining, and Notch2, Notch4 receptor proteins and mRNA expression levels were analyzed through immunohistostaining and RT-PCR respectively. **Results** ① Notch2 receptor protein and mRNA expression level in C and D groups [(0.075 ± 0.002) , (0.073 ± 0.002) and (0.088 ± 0.012) , (0.085 ± 0.008) respectively] were significantly lower than B group [(0.104 ± 0.005) , (0.275 ± 0.015) respectively], but still higher than A group [(0.049 ± 0.004) , (0.041 ± 0.007) respectively], with all $P < 0.05$. ② Notch4 receptor protein and mRNA expression level in the four groups [(0.121 ± 0.004) , (0.118 ± 0.003) , (0.117 ± 0.004) , (0.117 ± 0.005) and (0.595 ± 0.019) , (0.601 ± 0.125) , (0.606 ± 0.145) , (0.604 ± 0.019) respectively] had no significant differences, with all $P > 0.05$. **Conclusion** Notch2 receptor takes part in the airway inflammation process of asthmatic mice, and budesonide and curcumin may inhibit asthmatic mice airway inflammation partly through Notch2 receptor. Notch4 receptor has no effect on the asthmatic mice airway inflammation.

Key words Notch receptor; Asthmatic airway inflammation; Budesonide; Curcumin

Notch 受体家族广泛存在于从无脊椎动物到哺乳动物等多种生物体内,参与多种组织细胞的信号识别、增殖、分化和凋亡等功能活动,近来研究表明,

Notch 参与外周 T 淋巴细胞及其亚群的分化发育过程^[1,2]。支气管哮喘是一种由多种炎症细胞和细胞成分参与的慢性气道炎症性疾病, Th2 细胞的分化发展是其发病的始动环节^[3]。布地奈德作为一种吸入性糖皮质激素,具有减轻气道炎症和抗过敏的作用,但它的具体作用机制如何,目前尚未明确。Oh 等^[4]研究提示,姜黄素也可明显改善过敏性气道炎症和气

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y2090327)

作者单位:325000 温州医学院第二附属育英儿童医院呼吸科

通讯作者:李昌崇, 电子信箱:wzlicch@21.cn.com

道高反应性,故本研究利用布地奈德和姜黄素干预哮喘模型,观察其可能的作用靶点。

材料与方法

1. 材料:体重 18~22kg 的 SPF 级雄性 Balb/c 小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司;卵白蛋白(OVA)和姜黄素药液购自美国 Sigma 公司;布地奈德雾化液由阿斯利康公司提供;SP 二步法检测试剂盒为北京中杉金桥生物技术有限公司产品;Notch2 单克隆抗体和 Notch4 多克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司;Trizol 抽提试剂由美国 Invitrogen 公司提供;RT-PCR 试剂盒购自美国 Fermentas 公司。

2. 方法:(1)小鼠气道炎症模型的建立:将 64 只 Balb/c 小鼠适应性饲养 3 天后,随机分为 4 组,即正常对照组(A 组)、哮喘组(B 组)、布地奈德组(C 组)和姜黄素组(D 组),每组 8 只。参照李昌崇等^[5]方法制备哮喘小鼠气道炎症模型:分别于第 1 天和第 13 天经小鼠腹腔注射 0.01% OVA/Al(OH)₃ 混合液 0.1ml 致敏,第 25~32 天每天以 1% OVA 生理盐水溶液进行雾化激发;布地奈德组于每次 OVA 激发前 2h 雾化吸入 0.5mg/ml 的布地奈德雾化液,持续至最后 1 次激发^[6];姜黄素组小鼠于每次激发前 20min 胃饲姜黄素药液 200mg/kg,持续至最后 1 次激发^[7];正常组以生理盐水代替 OVA 致敏和激发小鼠。(2)肺组织标本的采集及处理:各组小鼠于末次激发后 24h 内处死,取左肺肺门段组织固定于 4% 多聚甲醛,送病理科石蜡包埋切片,用于 HE 染色和免疫组织化学染色;取右肺组织迅速置于液氮冷冻后转入 -80℃ 冰箱保存,用于 RT-PCR 检测。(3)肺组织中 Notch2、Notch4 受体蛋白的测定:用 SP 二步法检测试剂盒对肺组织切片进行 Notch2(1:400)、Notch4(1:100)免疫组化染色,阳性结果为胞膜、胞质或胞核呈棕黄色,每张切片随机选择 4 个 ×400 倍镜下支气管视野,图像分析软件测定阳性部位的平均吸光度(MOD),取其平均值作为该样本的 MOD 值。(4)肺组织中 Notch2、Notch4 受体 mRNA 的检测:用 Trizol 一步法抽提总

RNA,然后根据 RT-RCT 试剂盒说明进行反转录和 PCR 扩增。Notch2 上游引物:5'-CAACTGTGAGGTGGACAAAAATG-3',下游引物:5'-TGTTTCATACACGGCTTGGAGATA-3';Notch4 上游引物:5'-CACCAGGCTTGAAGGGAG-3',下游引物:5'-GAAACCAGGACGGCAGAGG-3';β-actin 上游引物:5'-CGGGACCTGACAGACTACCTCAT-3',下游引物:5'-CCACAGGATTCCATACCCAAGA-3'。以上引物均由上海基康生物工程有限公司合成。Notch2、Notch4、β-actin 的扩增片段长度分别为 398,353,272。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳,用 SMART 凝胶图像分析系统进行条带扫描分析,以目的基因与内参照(β-actin)的 IOD 比值作为 mRNA 表达的相对含量。

3. 统计学方法:用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。用 Levene' test 进行方差齐性检验,同一指标各组间比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐者采用 LSD 检验,方差不齐者采用 Dunnett'T3 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组小鼠 HE 染色结果:见图 1。B 组小鼠肺组织气管支气管周围炎细胞浸润明显,以中性粒细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞为著,C、D 组炎细胞浸润较 B 组稍减弱,而 A 组无炎细胞浸润。

2. 各组小鼠 Notch2 蛋白和 mRNA 表达的比较:Notch2 蛋白于 A 组主要表达在支气管上皮细胞的胞膜和胞质,于 B 组主要表达在支气管上皮细胞和淋巴细胞的胞核(淋巴细胞胞质少,胞核呈圆形,几乎占满了细胞,通过苏木素复染,胞核染成淡蓝色),B 组 Notch2 受体蛋白和 mRNA 水平明显高于 A 组(P 均 < 0.01),C、D 组 Notch2 受体蛋白和 mRNA 均低于 B 组($P < 0.01$),但仍高于 A 组($P < 0.01$)(图 1、图 2、表 1)。

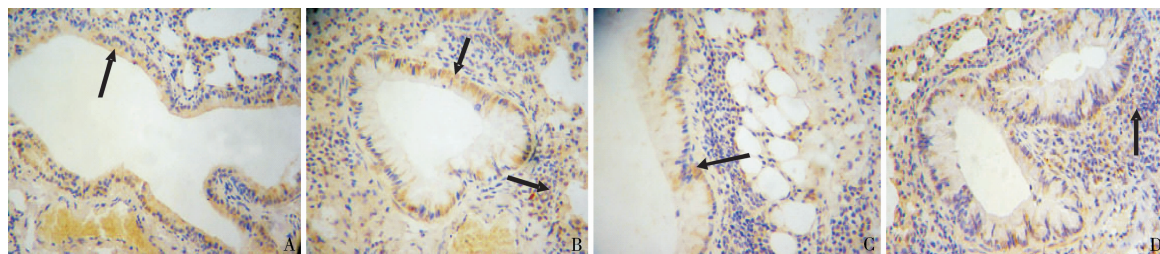


图 1 布地奈德、姜黄素对 Notch2 受体蛋白表达的影响(×400)

A. 正常对照组;B. 哮喘组;C. 布地奈德组;D. 姜黄素组

3. 各组小鼠 Notch4 蛋白和 mRNA 表达的比较:Notch4 蛋白主要表达于支气管上皮细胞和血管平滑肌细胞胞膜和胞质,4 组 Notch4 受体蛋白和 mRNA 差异均没有统计学意义, $P > 0.05$ (图 3、表 2)。

讨 论

Notch 家族是目前备受国内外学者关注的一类跨

膜受体家族,在哺乳动物中发现有 4 种 Notch 受体和 5 种 Notch 配体。Notch 广泛存在于多种生物体内,参与多种组织细胞的信号识别、增殖、分化和凋亡等功能活动,在多种细胞命运的决定中均发挥着重要作用^[1]。越来越多的研究表明,Notch 信号通路在调节外周 T 淋巴细胞分化过程中起了决定性作用,且不同

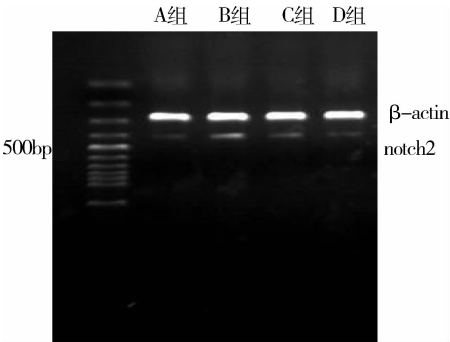


图 2 布地奈德、姜黄素对 Notch2 受体 mRNA 表达的影响
A ~ D 分别为正常对照组、哮喘组、布地奈德组、姜黄素组

表 1 各组小鼠肺组织中 Notch2 蛋白及 mRNA 表达的比较 (n = 8, $\bar{x} \pm s$)

组别	蛋白	mRNA
A	0.049 ± 0.004	0.041 ± 0.007
B	0.104 ± 0.005 ^a	0.275 ± 0.015 ^a
C	0.075 ± 0.002 ^{ab}	0.088 ± 0.012 ^{ab}
D	0.073 ± 0.002 ^{ab}	0.085 ± 0.008 ^{ab}

A ~ D 分别为正常对照、哮喘、布地奈德、姜黄素组; 与 A 组比较, ^aP < 0.01, 与 B 组比较, ^bP < 0.01

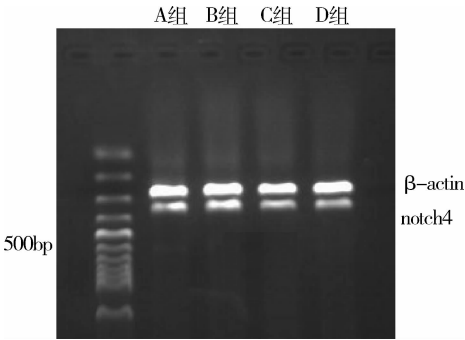


图 3 布地奈德、姜黄素对 Notch4 受体 mRNA 表达的影响
A ~ D 分别为正常对照组、哮喘组、布地奈德组、姜黄素组

表 2 各组小鼠肺组织中 Notch4 蛋白及 mRNA 表达的比较 (n = 8, $\bar{x} \pm s$)

组别	蛋白	mRNA
A	0.121 ± 0.004	0.595 ± 0.019
B	0.118 ± 0.003	0.601 ± 0.125
C	0.117 ± 0.004	0.606 ± 0.145
D	0.117 ± 0.005	0.604 ± 0.019

A ~ D 分别为正常对照、哮喘、布地奈德、姜黄素组; 4 组 Notch4 受体蛋白和 mRNA 差异均没有统计学意义, P > 0.05

的 Notch 受体和配体结合产生的效应可完全不同,这就使得 Notch 家族愈发神秘难解^[2,8]。但大多数研究证实,在细菌、病毒、TLR 配体等 Th1 诱导因素作用下,抗原呈递细胞 (APC) 表面 DLL1 或 DLL4 产生增多,与 Notch3 受体结合后可抑制 Th2 细胞分化,从而

促进 Th1 细胞分化,而在蠕虫、过敏原、毒素或前列腺素 E₂ 等 Th2 诱导环境下,APC 表面 Jagged1/2 配体增多,与 Notch1 受体结合后诱导 Th2 细胞分化^[8]。而 Notch2、Notch4 对外周 T 淋巴细胞分化的作用不甚明确,且 Kopan 等^[9]还发现 Notch 信号激活方式较一般的信号通路不同,激活后通过 3 次酶切作用,产生缩短的胞内段,及 NICD, NICD 随即进入细胞核,与靶基因结合产生一系列的生物学效应。故本研究通过免疫组化染色和 RT-PCR 观察 Notch2 和 Notch4 受体在 Th2 型免疫反应——哮喘中的表达情况,结果发现 Notch2 受体蛋白和 mRNA 在哮喘小鼠肺组织中明显增高,且 Notch2 蛋白在哮喘组中主要表达于支气管上皮细胞和淋巴细胞的胞核,而 Notch4 受体蛋白和 mRNA 在哮喘小鼠肺组织中的表达与正常组相比差异无统计学意义,说明 Notch2 受体在哮喘小鼠气道炎症中发挥了一定作用,且激活后大部分转移到了核内,Notch4 则对哮喘小鼠气道炎症无明显影响。

布地奈德是一种吸入性糖皮质激素,较之全身性皮质激素,它局部浓度高,不良反应少,是目前控制和缓解哮喘发作的关键药物,但它的抗炎机制目前仍不十分明确,前期研究提示布地奈德可能部分通过 Notch1 受体发挥一定的抗炎作用,但它是否对 Notch2 受体也有类似的作用呢? 姜黄素是从姜黄中提取出来的一种中成药,众多研究已证实,姜黄素具有抗炎、抗氧化、抗纤维化等作用,近期研究发现姜黄素可通过抑制 NF- κ B 转录激活改善过敏性气道炎症和气道高反应性,那么它也可能通过 Notch2 受体对哮喘气道炎症有一定的作用^[4]。

本实验利用布地奈德和姜黄素干预哮喘模型,发现布地奈德组和姜黄素组小鼠肺组织中 Notch2 受体蛋白和 mRNA 均比哮喘组减少,差异有统计学意义,而两组小鼠肺组织中 Notch4 蛋白和 mRNA 表达与哮喘组相比,差异无统计学意义,提示布地奈德和姜黄素均可部分通过抑制 Notch2 信号改善哮喘气道炎症^[10]。

综上所述,Notch2 信号在哮喘气道炎症过程中也发挥了一定作用,布地奈德和姜黄素可能部分通过抑制 Notch2 信号改善哮喘气道炎症,而 Notch4 对哮喘气道炎症的发生发展影响不大。近年来,哮喘的定义在不断的改进改善,哮喘的治疗方案也在不断的演变完善,寻求更有效、不良反应更少的治疗方案是当前医务工作者的首要任务,深入研究药物的作用靶点可为以后的联合用药提供更精准的理论依据,为进一步完善哮喘的治疗方案打下基础。 (下转第 83 页)

许的髋臼外展角最小值和头颈直径比呈非线性关系, 颈干角为 130° , 满足普通标准条件与严格标准条件下, 可允许的最小髋臼外展角 ($IA_{\min}$) 与头颈比 (HNR) 呈非线性关系分别为: $IA_{\min 1} = 168.13HNR_1^{-2.504}$ ($r^2 = 0.9985$), $IA_{\min 2} = 213.79HNR_2^{-2.272}$ ($r^2 = 0.996$), 因此对于本研究头颈比范围内的特定假体, 术前可用此关系式来评估可允许的髋臼最小外展角。

理论上, 对于一个术后髋关节活动度要求不高的患者来说, 选择一个小的头颈直径比假体也是可以的, 但是, 考虑到手术台上骨盆位置的不稳定和安放杯颈时的误差, 卧位、坐位及站立位姿势骨盆位置的变化, 骨盆位置及腰椎曲度随着年龄增长的变化, 髋关节假体位置一直处于变化中, 因此, 选择大的没有假体撞击的髋关节活动度对于短期及长期的临床疗效是至关重要的。大的头颈直径比有一个大的髋臼杯位相安全范围, 提供了良好的髋关节活动度, 满足本研究条件下, 认为选择头颈直径比 > 2.37 是合适的。

4. 影响髋关节活动范围的其他因素: 本研究是在一个非常理想的情况下采用计算机模拟, 通过分析不同假体安装参数、股骨假体颈干角和头颈比, 来评估髋关节活动范围的影响因素, 影响因素还包括很多因素, 如杯的包容、假体与骨或软组织间的撞击、患者术前骨骼畸形和术后康复等。

计算机辅助矫形手术使得假体能按照术前计划的位置进行安装, 当然, 手术程序也可能改变, 只要股

骨试模首先安装的话, 然后髋臼假体相对应进行定位, 实际手术中, 假体也是按照试模所测的方向进行最后的安装, 通过本研究发现杯位置对髋关节活动范围的影响比颈位置大, 因此, 臼杯应该根据一个给定的股骨假体位置进行更加准确的调整。

参考文献

- Widmer KH, Zurfluh B. Compliant positioning of total hip components for optimal range of motion[J]. J Orthop Res, 2004, 22(4): 815 - 821
- D'Lima DD, Urquhart AG, Buehler KO, et al. The effect of the orientation of the acetabular and femoral components on the range of motion of the hip at different head - neck ratios[J]. J Bone Joint Surg Am, 2000, 82(3): 315 - 321
- Li YJ, Yang GJ, Zhang LC, et al. Influences of head/neck ratio and femoral antetorsion on the safe - zone of operative acetabular orientations in total hip arthroplasty[J]. Chin J Traumatol (English Edition), 2010, 13(4): 206 - 211
- Wu G, Siegler S, Allard P, et al. ISB recommendation on definitions of joint coordinate system of various joints for the reporting of human joint motion - Part 1: ankle, hip, and spine. International Society of Biomechanics[J]. J Biomech. 2002, 35(4): 543 - 548
- Yoshimine F. The safe - zones for combined cup and neck anteversions that fulfill the essential range of motion and their optimum combination in total hip replacements[J]. J Biomech 2006, 39(7): 1315 - 1323
- Murry DW. The definition and measurement of acetabular orientation[J]. J Bone Joint Surg Br, 1993, 75(2): 228 - 232
- 邵俊杰, 张先龙, 季文婷, 等. 髋关节假体安装参数的计算机模拟研究[J]. 中华骨科杂志, 2008, 28(7): 552 - 556

(收稿: 2011 - 05 - 22)

(修回: 2011 - 06 - 13)

(上接第 75 页)

参考文献

- Gazave E, Lapebie P, Richards GS, et al. Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes[J]. BMC Evol Biol, 2009, 9(1): 249 - 276
- Osborne BA, Minter LM. Notch signalling during peripheral T - cell activation and differentiation[J]. Nature, 2007, 7(1): 64 - 75
- Peter J. Barnes. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(3): 183 - 192
- Oh SW, Cha JY, Jung JE, et al. Curcumin attenuates allergic airway inflammation and hyper - responsiveness in mice through NF - kappaB inhibition[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 136(3): 414 - 421
- 李昌崇, 张维溪, 陈小芳, 等. 巨噬细胞炎性蛋白 1α 及其 mRNA 在哮喘小鼠气道炎症中的作用[J]. 中华儿科杂志, 2004, 42(2): 90 - 93

- 沈华浩, 王绍斌. 布地奈德干预对卵白蛋白致敏小鼠抗原激发后气道炎症及气道重塑的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(3): 13 - 18
- 孙杰, 吴斌, 梁标, 等. 姜黄素对哮喘小鼠 α - SMA 的表达及气道重构的影响[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(7): 603 - 605
- Amsen D, Antov A, Flavell RA. The different faces of Notch in T - helper - cell differentiation[J]. Nature, 2009, 9(2): 116 - 124
- Kopan R, Ilagan MX. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism[J]. Cell, 2009, 137(2): 216 - 233
- Sohei M, Hironori S. Evolution of asthma concept and effect of current asthma management guidelines[J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2010, 2(3): 172 - 176

(收稿: 2011 - 08 - 22)

(修回: 2011 - 09 - 05)