

AhR、CYP1B1 在哮喘小鼠肺及外周 T 淋巴细胞的表达

张雪雅 张维溪 盛安群 李昌崇

摘要 目的 对 AhR、CYP1B1 在哮喘模型小鼠肺组织及外周 CD4⁺T 细胞中的表达特征进行研究,探讨 AhR、CYP1B1 在哮喘发病中的作用。**方法** 建立哮喘小鼠模型,制备肺组织石蜡切片进行病理学检查。磁珠阳性分选法从脾脏中分离获得外周 CD4⁺T 细胞,利用 RT-PCR 半定量技术分别测定正常组和哮喘组小鼠肺组织及外周 CD4⁺T 细胞中 AhR、CYP1B1 mRNA 的表达量。**结果** 两组小鼠肺组织和外周 CD4⁺T 中均有表达 AhR、CYP1B1。哮喘组肺组织及外周 CD4⁺T 细胞中 AhR、CYP1B1 表达均较正常组低($P < 0.05$)。**结论** AhR、CYP1B1 在支气管哮喘的发病过程中发挥作用,可能是支气管哮喘治疗的新靶点。

关键词 AhR CYP1B1 支气管哮喘 肺 CD4⁺T 细胞

Expressions of AhR, CYP1B1 in the Lung and Peripheral T Lymphocytes of Mouse Asthma. Zhang Xueya, Zhang Weixi, Sheng Anqun, Li Changchong. Department of Pediatric Pulmonology, The Second Affiliated Hospital & Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To investigate the expression of AhR, CYP1B1 in tissue of the lung and the peripheral CD4⁺T lymphocytes in the mouse asthma model and the role of AhR, CYP1B1 in the pathogenesis of asthma. **Methods** The mouse asthma model was established. The paraffin slices of tissue in the lung were made to assess the histological changes by means of histopathology. Bead positive selection method is used to get peripheral CD4⁺T cells from the spleen. The mRNA expression of AhR, CYP1B1 genes in the lung tissue and the peripheral CD4⁺T lymphocytes isolated from the spleen in the asthmatic group and the normal group were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The expression of AhR, CYP1B1 genes were detected in the lung tissue and the peripheral CD4⁺T lymphocytes. The expressions of AhR, CYP1B1 decreased significantly both in the lung tissue and in the peripheral CD4⁺T lymphocytes in the asthmatic group compared with those in the normal group. **Conclusion** AhR, CYP1B1 play a role in the pathogenesis of asthma and maybe a new target of the asthma therapy.

Key words AhR; CYP1B1; Asthma; Lung; CD4⁺T lymphocytes

AhR (Aryl hydrocarbon receptor, AhR) 是 bHLH/PAS 家族的转录因子之一,具有调控环境化学物质生化和毒理反应的作用。当 AhR 受体与配体如 TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD) 等结合后,AhR 构象改变并由细胞质向细胞核内转移。在细胞核内,AhR 与其核异位蛋白 (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT) 形成异源二聚体,随后与增强子序列结合并与其目的基因中的二 ■ 英反应元件相互作用调控其转录。另外,AhR 与配体结合后可诱导调控细胞色素氧化酶 P450,如 CYP1B1 (cytochrome P450 1B1, CYP1B1) 等代谢酶,促进这些酶在芳香烃类化合物代谢中的作用。近年来研究^[1]发现,AhR 在调控 T 细胞分化中也有重要作用。AhR 在 Th17 和 Treg 细胞中均有表达而且参与它们

的分化过程,但是具体调控机制仍不清楚^[2]。支气管哮喘(简称哮喘)是儿童最常见的气道慢性炎症性疾病,是多种炎症细胞和炎症介质共同参与的过程,而 Treg/Th17 平衡失调在其中发挥重要作用。是否 AhR 与哮喘的发生可能有一定关联,目前国内外尚未报道。有鉴于此,笔者通过检测哮喘小鼠肺组织及外周 CD4⁺T 细胞中 AhR、CYP1B1 的基因表达来探讨其相关性,旨在阐明 AHR 在哮喘发病机制的可能作用,并为哮喘治疗寻找一种新的研究方向。

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公司;卵白蛋白(OVA)购自美国 Sigma 公司;磁珠购自德国梅天妮公司;大鼠抗小鼠 CD4⁺T 细胞-FITC 购自美国 BD 公司;Trizol 抽提试剂购自美国 Invitrogen 公司;RT-PCR 试剂盒购自美国 Fermentas 公司。

2. 方法:(1)哮喘小鼠模型的建立:将 16 只 Balb/c 小鼠按数字表法随机分为两组,即正常对照组和哮喘组,每组 8 只。参照李昌崇等方法制备哮喘小鼠模型:分别于第 1 天和

基金项目:国家青年自然科学基金资助项目(81100015)

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,教授,电子信箱:wzliehch@21cn.com

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;对照组以生理盐水代替 OVA 致敏和激发小鼠^[3]。(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,取右肺肺门段组织用 4% 多聚甲醛固定,送病理科石蜡包埋切片,用于 HE 染色;取左肺组织保存于 - 70℃ 冰箱备用。

(3)脾脏中 CD4⁺T 细胞的分离及纯度和存活率的检测:取脾脏组织用预冷的 PBS 冲洗干净后于 200 目不锈钢筛网上研磨获得悬浮的单个细胞,加入红细胞裂解液破红,PBS 液洗涤 2 次,用 Buffer 重悬细胞,调整细胞浓度为 1 × 10⁸ 个/毫升,加入 CD4⁺T 细胞阳性分选磁珠,4℃ 孵育 15min,过柱后获得分离的 CD4⁺T 细胞。收集 CD4⁺T 细胞采用流式细胞仪检验 CD4⁺T 细胞的纯度。用台盼蓝染液对 CD4⁺T 细胞进行染色,观察细胞存活率。细胞存活率按下式计算:细胞存活率 (%) = (染色阴性细胞数/细胞总数) × 100% (4)肺组织和外周 CD4⁺T 细胞中 AhR、CYP1B1 mRNA 的检测:用 Trizol 抽提总 RNA,然后根据 RT - PCR 试剂盒说明进行反转录和 PCR 扩增。AhR 引物上游 5' - AGCCGTGCAGAAAACAGTAA - 3' 下游 5' - AGGCGGTCTAACTCTGTGTTC - 3'。CYP1B1 引物上游 5' - CCTGACCATTAAGCCCAAGT - 3',下游 5' - ACTTG-CAGCCTTCCTCAGTT - 3'。GAPDH 引物上游 5' - TGCCTTC-CGTGTTCTCTAC - 3',下游 5' - GAGTTGCTGTGAAGTCGCA - 3'。以上引物均由上海英潍捷基贸易有限公司合成。AhR、CYP1B1、GAPDH 的扩增片段长度分别为 100bp、107bp、178bp,扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳,用 GEL - PRO32 凝胶图像分析系统进行条带扫描分析,以目的基因与内参 (GAPDH) 的 IOD 比值作为 mRNA 表达的相对含量。

3. 统计学方法:应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计。数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。方差齐者组间比较采用 *t* 检验,方差不齐的组间比较采用秩和检验,以 *P* < 0.05 为差异有

统计学意义。

结 果

1. 肺组织 HE 染色结果:哮喘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、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞为著,气道痉挛,气道壁增厚;而正常组无明显炎性细胞浸润(图 1)。

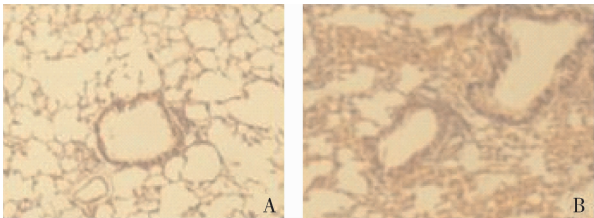


图 1 小鼠肺组织 HE 染色结果 (×100)
A. 对照组小鼠无明显病理表现;B. 哮喘组小鼠气道痉挛,气道壁增厚,管壁周围炎性细胞浸润

2. 脾脏细胞分选后 CD4⁺T 细胞的纯度和存活率:自小鼠脾脏中分离所得 CD4⁺T 细胞,加入 FITC - 标记的 CD4 小鼠单抗用流式细胞仪鉴定 T 细胞的分离纯度,结果显示 CD4⁺T 细胞的纯度达 92.59% ± 1.25%。CD4⁺T 细胞的存活率为 88.76% ± 3.15%,详见图 2。

3. 肺组织 AhR、CYP1B1 mRNA 表达:AhR、CYP1B1 的 mRNA 在哮喘组及正常组肺组织中均有表达,其中哮喘组肺组织中 AhR、CYP1B1 表达较正常对照组低 (*P* < 0.05),两组间比较差异有统计学意义(图 3 及表 1)。

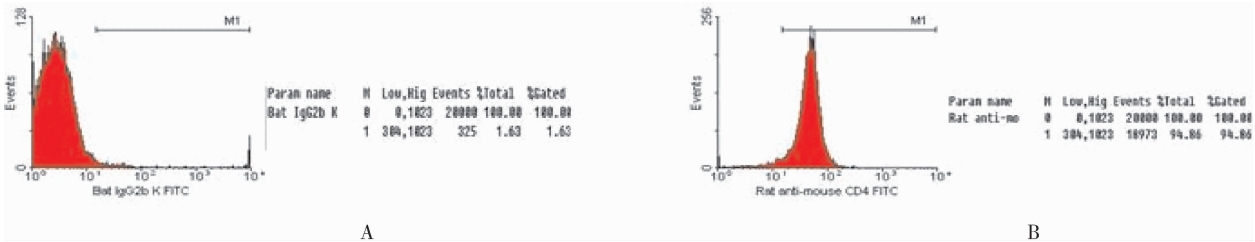


图 2 CD4⁺T 细胞分离纯度鉴定
A. 阴性对照; B. FITC 标记的小鼠 CD4 单抗

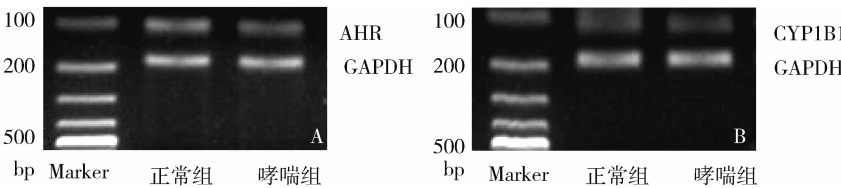


图 3 两组小鼠肺组织中 AHR、CYP1B1 RT - PCR 结果比较
A. 哮喘模型组 AHR mRNA 表达较对照组低;B. 哮喘模型组 CYP1B1 mRNA 表达较对照组低

表 1 两组小鼠肺组织中 AHR、CYP1B1 mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	IOD	
	AHR	CYP1B1
正常组	0.890 ± 0.160	0.638 ± 0.232
哮喘组	0.708 ± 0.168	0.360 ± 0.140
P	0.032	0.007

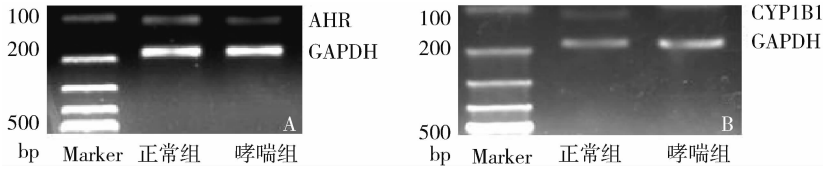


图 4 两组小鼠外周 CD4⁺T 细胞中 AHR、CYP1B1 RT-PCR 结果比较

A. 哮喘模型组 AHR mRNA 表达较对照组低; B. 哮喘模型组 CYP1B1 mRNA 表达较对照组低

表 2 两组小鼠 CD⁺T 细胞中 AHR、CYP1B1 mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	IOD	
	AHR	CYP1B1
正常组	0.195 ± 0.047	0.304 ± 0.064
哮喘组	0.124 ± 0.036	0.015 ± 0.006
P	0.003	0.024

讨 论

儿童支气管哮喘是儿童最常见的慢性炎症性疾病,是多种炎症细胞和炎症介质共同参与的过程,T 淋巴细胞在其中扮演重要角色。Th17 和 Treg 是 T 淋巴细胞的两种不同亚型。Treg/Th17 在机体内的动态平衡将影响哮喘的发生^[4]。这种作用得到国内外学者的广泛研究^[4,5]证实。

AhR 是一种位于细胞质中的转录因子,属于 bHLH-PAS 家族中的一员^[5],而 CYP1B1 是细胞色素 P450 超家族的重要成员, AhR 可参与调控其表达。环境中的多种化学分子都可以激活 AhR,如 TCDD,色氨酸衍生物、黄酮类和联二苯等。另外 AhR 是第 1 个被发现可以参与编码多种外源性代谢酶同时具有调控 TCDD 导致的毒理作用的转录因子。但有趣的是,近年来研究发现 AhR 活化还可以参与细胞的多种功能如参与免疫系统的调节,并在炎症性疾病中发挥作用^[6,7]。

近年来多种炎症性疾病动物模型实验研究证实 AhR 活化可以抑制炎症反应。Kerkvliet 等^[8]研究证实 TCDD 激活的 AhR 使 NOD 小鼠胰腺淋巴结中的 Foxp3⁺T 细胞的数目增多同时减轻糖尿病病情^[1,8]。另外, Quintana 等^[9]研究显示 TCDD 活化的 AhR 可诱导 Treg 生成,并缓解实验性自身免疫性脑脊髓炎

4. 外周 CD4⁺T 细胞 AhR、CYP1B1 mRNA 表达: 哮喘组外周 CD4⁺T 细胞中 AhR、CYP1B1 表达较明显低于正常对照组($P < 0.05$),两组间比较差异均有统计学意义(图 4 及表 2)。

(EAE)动物模型的临床症状。同时, Narendra 等^[10]研究表明激活 AhR 受体可以促进 Foxp3⁺T 细胞分化,抑制 Th17 细胞分化并改善实验性结肠炎小鼠炎症程度。但是,近来学者研究发现 AhR 活化也可以促进 Th17 细胞分化,并使 IL-17 的生成增多。这与激活 AhR 的配体种类有关。研究指出 FICZ (6-formylindolo[3,2-b]carbazole, FICZ) 激活的 AhR 将促进 CD4⁺T 细胞向 Th17 分化,但对于 Treg 的分化无影响。由此推测,AhR 调控 Treg/Th17 分化的功能具有配体特异性,配体种类和数量将影响 AhR 的功能^[10,11]。

本研究结果表明,在肺组织和外周 CD4⁺T 细胞中 AhR 和 CYP1B1 均有表达。而在哮喘组肺组织中,AhR 和 CYP1B1 表达低于正常对照组,两者差异有统计学意义。同时在哮喘组外周 CD4⁺T 细胞中,AhR 和 CYP1B1 表达也低于对照组,两者差异也有统计学意义。这与 Kerkvliet 等^[8]研究认为 AhR 活化可以抑制炎症反应的结论相符。但是这与 Zhu 等^[12]研究报道的哮喘患者体内 AhR 表达增多的研究结论相反。分析可能原因如下:一方面考虑本实验对象是小鼠而 Zhu 等实验对象是人,两者存在种属差异;另一方面,AhR 配体广泛存在于外界环境中。哮喘患者暴露在外界环境接触多种化学物质,而哮喘小鼠处于 SPF 环境中,接受相对单一的实验者给予的 OVA 抗原刺激。最后,考虑可能与本实验样本量较少有一定关系,可通过增大样本量或采用更加精确的实验方法进一步验证。综上所述,AhR、CYPAB1 在哮喘的发生中发挥作用,但哮喘发病机制错综复杂,参与的细胞及炎症因子繁多,是一个庞大的网络系统,很多环节还模糊不清。另外,AhR 在调控细胞功能方面的

作用仍有争议,因此明确机制仍待进一步深入研究。

参考文献

- 1 Marshall NB, Kerkvliet NI. Dioxin and immune regulation: emerging role of aryl hydrocarbon receptor in the generation of regulatory T cells [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010, 1183(1): 25-37
- 2 Zhang L, Ma J, Takeuchi M, *et al.* Suppression of experimental autoimmune uveoretinitis by inducing differentiation of regulatory T cells via activation of aryl hydrocarbon receptor [J]. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 2010, 51(4): 2109-2117
- 3 崇蕾, 张维溪, 聂颖, 等. 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 [J]. *医学研究杂志*, 2012, 41(4): 73-75
- 4 Wei B, Zhang H, Li L, *et al.* T helper 17 cells and regulatory T-cell imbalance in paediatric patients with asthma [J]. *Journal of International Medical Research*, 2011, 39(4): 1293-1305
- 5 Van Voorhis M, Fechner JH, Zhang X, *et al.* The aryl hydrocarbon receptor: a novel target for immunomodulation in organ transplantation [J]. *Transplantation*, 2012, 95(8): 983-989
- 6 Hogaboam JP, Moore AJ, Lawrence BP. The aryl hydrocarbon receptor affects distinct tissue compartments during ontogeny of the immune system [J]. *Toxicological sciences*, 2008, 102(1): 160-170
- 7 Kerkvliet NI. AHR-mediated immunomodulation: the role of altered gene transcription [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2009, 77(4): 746-760
- 8 Kerkvliet NI, Steppan LB, Vorachek W, *et al.* Activation of aryl hydrocarbon receptor by TCDD prevents diabetes in NOD mice and increases Foxp3⁺ T cells in pancreatic lymph nodes [J]. *Immunotherapy*, 2009, 1(4): 539-547
- 9 Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, *et al.* Control of Treg and TH17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor [J]. *Nature*, 2008, 453(7191): 65-71
- 10 Singh NP, Singh UP, Singh B, *et al.* Activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) leads to reciprocal epigenetic regulation of FoxP3 and IL-17 expression and amelioration of experimental colitis [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23522
- 11 Quintana FJ. The aryl hydrocarbon receptor: a molecular pathway for the environmental control of the immune response [J]. *Immunology*, 2012, 138(3): 183-189
- 12 Zhu J, Cao Y, Li K, *et al.* Increased expression of aryl hydrocarbon receptor and interleukin 22 in patients with allergic asthma [J]. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 2011, 29(3): 266-272

(收稿日期: 2013-05-08)

(修回日期: 2013-05-24)

主动脉瓣纤维样赘生物的诊断及治疗

任崇雷 姜胜利 王 嵘 王 瑶 李 越 李伯君 高长青

摘 要 **目的** 总结主动脉瓣纤维样赘生物(Lambl's excrescence, LE)的诊断及治疗经验。**方法** 回顾性分析解放军总医院 2010 年 1 月~2012 年 12 月收治的 25 例 LE 患者的临床资料,其中,男性 17 例,女性 8 例,患者年龄 30~70 岁,平均年龄 55.7±11.43 岁,合并脑梗死病史 8 例。所有患者均经食管超声心动图(TEE)检查确诊,有 7 例进行外科手术清除主动脉瓣赘生物。**结果** 25 例患者均治愈出院,7 例手术患者无并发症及手术死亡发生,22 例患者经随访 0.5~3.0 年无新发脑血管事件。**结论** 多数 LE 患者无症状,部分患者表现为反复的脑梗死。推荐 TEE 作为确诊该病的主要方法。发生两次以上栓塞事件者及合并其他心脏病变需手术者推荐手术治疗清除赘生物,其他患者抗凝治疗或者观察。

关键词 主动脉瓣纤维样赘生物 诊断 外科手术

Diagnosis and Treatment of Lambl's Excrescence on Aortic Valve. Ren Chonglei, Jiang Shengli, Wang Rong, Wang Yao, Li Yue, Li Bojun, Gao Changqing. Department of Cardiovascular Surgery, Institute of Cardiac Surgery of PLA, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Abstract Objective To summarize our experiences of diagnosis and treatment of Lambl's excrescence (LE) on aortic valve. **Methods** Clinical data of 25 patients with LE admitted to Chinese PLA General Hospital from January 2010 to December 2012 was retrospectively analyzed. There were 17 males and 8 females with the mean age 55.7±11.43 years (ranging from 30 to 70 years). Among them, 8 patients were combined cerebral embolism. All patients were diagnosed by transesophageal echocardiography (TEE). In 7 cases,

作者单位: 100853 北京,解放军总医院心血管外科、解放军心外科研究所(任崇雷、姜胜利、王嵘、王瑶、李越、李伯君、高长青);解放军总医院超声诊断科(李越)

通讯作者: 高长青, 电子信箱: gaochq301@yahoo.com