

· 论 著 ·

呼吸道合胞病毒感染相关性哮喘的发病机制初探*

王爱平,李秋根,汪俊[△],喻杰,夏莺,蔡金莲
(江西省人民医院呼吸内二科,南昌 330006)

摘要:目的 探讨呼吸道合胞病毒(RSV)感染大鼠相关性哮喘的可能相关机制。方法 SD 大鼠 30 只,随机分为对照组、RSV 组和抗神经生长因子(NGF)组,每组 10 只。RSV 组采用每周 1 次 RSV 滴鼻法复制 RSV 感染模型。抗 NGF 组先腹腔腔内注射山羊抗大鼠 β -NGF 抗体,3 h 后按照 RSV 组相同的方法进行 RSV 感染。电镜观察肾上腺髓质细胞超微结构变化,ELISA 检测血清 NGF 和肾上腺素浓度变化,免疫组织化学检测肾上腺髓质细胞 NGF 表达变化,RT-PCR 检测肾上腺髓质细胞 NF-L mRNA 表达差异。结果 (1)电镜下 RSV 组髓质细胞线粒体丰富,嗜铬颗粒浓度明显降低,细胞膜可见明显杵状突起生长现象。(2)ELISA 结果显示,RSV 组大鼠血清 NGF 浓度明显高于对照组和抗 NGF 组($P<0.05$),而对照组和抗 NGF 组大鼠血清 NGF 浓度差异无统计学意义($P>0.05$)。与对照组相比,RSV 组和抗 NGF 组血清肾上腺素浓度明显下降($P<0.01$);与抗 NGF 组相比,RSV 组血清肾上腺素浓度明显下降($P<0.05$)。(3)免疫组织化学显示,与对照组和抗 NGF 组相比,RSV 组肾上腺髓质细胞 NGF 阳性表达明显增强;与对照组相比,抗 NGF 组肾上腺髓质细胞 NGF 阳性表达也明显增强。(4)RT-PCR 结果显示,与对照组相比,RSV 组和抗 NGF 组肾上腺髓质细胞 NF-L mRNA 表达明显增强;与 RSV 组相比,抗 NGF 组肾上腺髓质细胞 NF-L mRNA 表达明显减弱。结论 RSV 感染相关性哮喘的发生可能与 NGF 诱导肾上腺髓质细胞向神经元细胞转化导致血清中肾上腺素浓度下降有关。

关键词:呼吸道合胞病毒;感染;肾上腺髓质细胞;神经生长因子;神经丝
doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.32.002 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2013)32-3852-04

Preliminary study of pathogenesis on respiratory syncytial virus-related asthma*

Wang Aiping, Li Qiugen, Wang Jun[△], Yu Jie, Xia Ying, Cai Jinlian
(Second Department of Respiratory, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: Objective To explore the underlying mechanism of respiratory syncytial virus-related asthma. **Methods** Totally 30 sprague-dawley rats were randomly divided into control group, respiratory syncytial virus(RSV) group, and anti-NGF group, with 10 in each group. RSV infection model was established by nasal drip once a week. In anti-NGF antibody intervention group, each rat was given intraperitoneal injection of anti-NGF for 3 h before identical RSV infection, transmission electron microscopy(TEM) were performed to observe the ultramicro-structure changes in adrenal medullary cell. The concentrations of adrenaline and NGF in serum were measured by ELISA. The NGF expression was assayed by immunohistochemistry. The expression difference of neurofilament protein mRNA was detected by RT-PCR. **Results** (1) Electron microscope showed, medullary cells riched in mitochondria, Chromaffin granule concentration decreased obviously, and membrane could saw clubbing phenomenon of neurite outgrowth clearly in RSV infection group. Meanwhile, NGF expression was significantly increased in RSV infection group. (2) ELISA results showed that the concentrations of NGF in the RSV group was significantly increased compared with control group and anti-NGF group($P<0.05$), while the concentrations of NGF showed no difference between control group and anti-NGF group($P>0.05$). Compared with control group, the adrenaline concentration of RSV group and anti-NGF group was significantly decreased($P<0.01$), and the adrenaline concentration of RSV group was significantly decreased compared with anti-NGF antibody group($P<0.05$). (3) NF-LmRNA expression was significantly increased in RSV group. However, compared with control group, the NF-LmRNA expression was significantly decreased in anti-NGF group. (4) RT-PCR results show that, Compared with control group, adrenal medullary cells NF-LmRNA expression of RSV group and the anti-NGF group was significantly increased. Compared with RSV group, NF-LmRNA adrenal medulla cells in Anti-NGF group was significantly decreased. **Conclusion** RSV infection may induce the adrenal medullary cell differentiation to nerve cell by over-expressed NGF, and result in the decrease of adrenaline in serum to involve in asthma progression.

Key words: respiratory syncytial virus; infections; adrenal medulla cell; nerve growth factor; neurofilament

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)感染是婴幼儿呼吸道感染最常见的病原体之一^[1],大量的流行病学资料显示反复感染 RSV 的婴幼儿数年甚至十年后出现哮喘的风险显著增高^[2]。目前的研究认为神经生长因子(nerve growth

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30960143);江西省科技支撑计划资助项目(20111BBG70016-3)。 作者简介:王爱平(1954~),主任医师,本科,主要从事支气管哮喘机制的研究。 [△] 通讯作者, E-mail: wangjun5087@163.com。

factor,NGF)介导的神经源性炎症在 RSV 感染中占有重要地位。RSV 感染后肺组织中 NGF 及其受体水平明显增高^[3],过度表达的 NGF 通过复杂的神经-免疫机制诱导气道高反应性以及哮喘发作,它可以解释 RSV 感染后急性期出现的症状,但仍无法解释 RSV 感染和哮喘高发病率之间的内在联系。哮喘发作的直接原因是由于支配气道的肾上腺素能、胆碱能神经或其受体系统出现兴奋或抑制失衡^[4],气道的舒缩调节主要通过肾上腺髓质细胞合成、分泌肾上腺素入循环血中,而拮抗支气管收缩等哮喘病理生理反应。一定浓度的肾上腺素是维持气道舒张的必要条件。研究发现肾上腺髓质嗜铬细胞在发生病变的情况下(如肿瘤等)可出现肾上腺素合成、释放减少^[5]。前期的研究也证实支气管哮喘状态下^[6],循环血中肾上腺素浓度明显下降,因此,推测肾上腺髓质细胞功能异常可能参与 RSV 感染相关性哮喘的发病,而 NGF 可能在此过程发挥重要作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 选择 SD 大鼠乳鼠 1 周龄 30 只,体重 12~15 g,严格 SPF 条件下饲养,由江西中医学院实验动物中心提供。其中 HeLa 人宫颈癌细胞株由湘雅医学院药理教研室提供,小鼠抗大鼠突触囊泡素单克隆抗体由美国 NeoMarkers 公司提供,RSV A2 标准株由中科院武汉病毒研究所提供,纯化山羊 IgG 由武汉博士德公司提供,山羊抗大鼠 β -NGF 抗体由美国 R&D systems 公司提供,RT-PCR 试剂盒和引物由上海生物工程公司提供,SABC 免疫组化试剂盒由武汉博士德公司提供,NGF 检测 ELISA 试剂盒由美国 R&D systems 公司提供,肾上腺素检测 ELISA 试剂盒由美国 BPB BIOMEDICALS 公司提供。

1.2 方法

1.2.1 RSV 病毒悬液制备及毒性检测

1.2.1.1 制备 选择铺满单层 HeLa 细胞的细胞培养瓶中,将 RSV 病毒株接种其中,吸附 1 h,加入细胞培养维持液,在置满 CO₂ 培养箱中培养,100%时收获病毒。振荡细胞瓶,使细胞从瓶壁脱落,反复冻融 3 次。

1.2.1.2 毒性检测 2~5 d 后在显微镜下观察细胞病变,待病变达 100%,离心 10 min(4 ℃,800×g),将细胞碎片除去,取病毒悬液上清液,滴定稀释为终滴度 5×10^4 TCID₅₀/0.1 mL 备用。选择无病毒的 HeLa 单层细胞培养瓶中上清液做对照组。

1.2.2 动物分组^[3] 将 30 只 SD 大鼠随机分为 3 组。RSV 组:接种 RSV 病毒悬液,将 0.4 μ L/g 滴度为 5×10^4 TCID₅₀/0.1 mL 滴入一侧鼻孔内;接种后隔离饲养 SD 大鼠,3 d 消毒 1 次,1 周换笼消毒 1 次。抗 NGF 组:接种 RSV 病毒悬液联合 NGF 抗体,先将山羊抗大鼠 β -NGF 抗体(稀释度 1:1 000,4 mL/kg)腹腔内注射,3 h 后按照 RSV 组同样方法接种 RSV 病毒。对照组:注射纯化山羊抗大鼠 β -NGF 抗体(稀释度 1:1 000,4 mL/kg),然后将 0.4 μ L/g 无病毒培养基鼻滴。12 周后处死所有 SD 大鼠取材。

1.2.3 电镜观察 用 2.5%戊二醛固定 SD 大鼠肾上腺组织,以 0.01 mol/L PBS 漂洗,1%锇酸固定,再次用 0.01 mol/L PBS 漂洗,分别用 50%丙酮酸、70%丙酮酸、90%丙酮酸、100%丙酮酸逐级脱水,按照 1:1 比例混合 100%丙酮与 EPON812 环氧树脂包埋剂,纯包埋剂浸泡、包埋肾上腺组织,修块机修块,定位后采用超薄切片机切片,后用硝酸铅和醋酸铀进行双重染色,选择 H750 透视电镜,观察肾上腺髓质细胞

超微结构的改变。

1.2.4 ELISA 检测血清 NGF 和肾上腺素浓度变化 具体步骤严格按照说明书进行操作。

1.2.5 免疫组化检测肾上腺髓质细胞 NGF 表达 选择石蜡切片 5 μ m 脱蜡后用 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,常规石蜡切片(厚 5 μ m)。切片脱蜡至水,吹干,0.01 mol/L PBS 洗 3 次,每次 5 min,室温孵育 10 min,正常山羊血清室温封闭 30 min,滴加 1:250 的抗 NGF 抗体,4 ℃下放置过夜,PBS 液 0.01 mol/L 洗涤 3 次,每次 5 min,将 PBS 加入标本中,常温下孵育 2 h,PBS 液 0.01 mol/L 洗涤 3 次,每次 5 min,DAB 显色,脱水,封片。对照组采用 PBS 液体代替抗一抗,其余无区别。

1.2.6 RT-PCR 检测肾上腺髓质细胞神经丝蛋白(NF-L mRNA)表达 采用 Trizol 法提取大鼠肾上腺髓质同一部位细胞总 RNA,将总 RNA 2 μ g, M-MLV 逆转录酶 1 μ L,oligo(DT) 18 1 μ L,NTPs 1 μ L,RNA 酶抑制剂 0.5 μ L,加入 0.1%DEPC 蒸馏水直到 20 μ L。42 ℃后孵育 1 h,温度在 94 ℃使样品变形,5 min 后,取 2 μ L cDNA 做 PCR。NF-L 上游引物:5'-ATG CTC AGA TCT CCG TGG AGA TG-3',下游引物:5'-GCT TCG CAG CTC ATT CTC CAG TT-3',产物 365 bp; β -actin 作为内参照,上游引物:5'-GGG AAA TCG TGC GTG ACA-3',下游引物:5'-GGA AGG AAG GCT GGA AGA G-3',产物 183 bp。每 25 μ L 反应体系中含引物 2 μ L,TaqDNA 0.5 μ L,dNTPs 1 μ L,MgCl₂ 2.5 μ L。反应条件:SYN/ β -actin 为 94 ℃ 5 min 预变性,分别采用 94 ℃ 60 s,72 ℃ 60 s,58 ℃ 60 s,35 个循环,最后 72 ℃延伸 5 min。取 5 μ L PCR 产物,琼脂糖凝胶进行电泳,选择紫外透射仪检测产物并进行半定量分析,选择 Eagle Eye II 凝胶成像分析系统。

1.3 统计学处理 数据均采用 SPSS16.0 统计软件进行统计学处理,采用图像分析系统,测定肾上腺髓质细胞中 NGF 阳性反应物的灰度(A)值,A 值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料采用 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 电镜结果 电镜下对照组胞浆内嗜铬颗粒分布均匀,髓质细胞线粒体清晰,细胞核膜清晰,细胞膜光滑;RSV 组电镜下可见细胞膜呈杆状突起生长,临近细胞膜部分髓质细胞出可见囊泡形成,髓质细胞线粒体丰富,脂质增多,嗜铬颗粒浓度明显降低;抗 NGF 组电镜下髓质细胞细胞膜和细胞核结构清晰,线粒体丰富,嗜铬颗粒浓度降低,细胞膜未见明显突起生长和囊泡形成。见图 1。

2.2 肾上腺髓质细胞 NGF 免疫反应 3 组大鼠肾上腺髓质中可见 NGF 阳性反应的细胞,阳性反应物呈棕黄色,位于细胞质,见图 2。与对照组和抗 NGF 组比较,RSV 组肾上腺髓质细胞中 NGF 阳性表达明显增强;与对照组相比,抗 NGF 组肾上腺髓质细胞中 NGF 阳性表达明显增强。显微图像分析显示对照组肾上腺髓质细胞 NGF 平均 A 值为 141 ± 12 ,与 RSV 组(116 ± 15)和抗 NGF 组(132 ± 14)比较,差异有统计学意义($t = 14.02, 13.52, P < 0.05$)。RSV 组和抗 NGF 组比较,差异有统计学意义($t = 12.42, P < 0.05$)。

2.3 血清肾上腺素浓度变化 ELISA 结果显示,与对照组相比,RSV 组和抗 NGF 组血清肾上腺素浓度明显下降($P < 0.01$)。与抗 NGF 组相比,RSV 组血清肾上腺素浓度明显下

降($P<0.05$)。见图 3。

2.4 血清 NGF 浓度变化 ELISA 结果显示:对照组血清 NGF 浓度为(87 ± 7.7)pg/mL,抗 NGF 组血清 NGF 浓度为(86 ± 9.2)pg/mL,RSV 组血清 NGF 浓度为(99 ± 10.6)pg/

mL。RSV 组血清 NGF 浓度明显高于对照组和抗 NGF 组($P<0.05$),而对照组和抗 NGF 组之间血清 NGF 浓度差异无统计学意义($P>0.05$)。

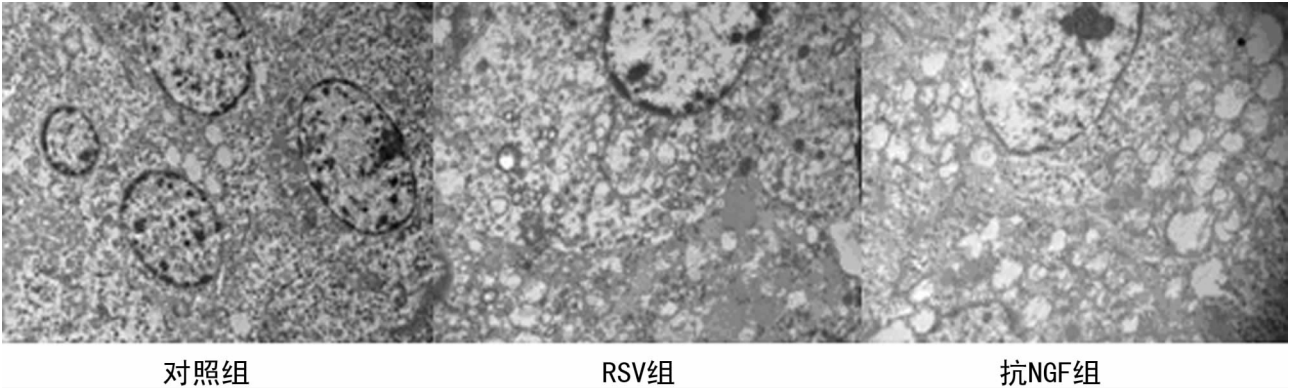


图 1 各组大鼠肾上腺髓质细胞超微结构变化(×10 000)

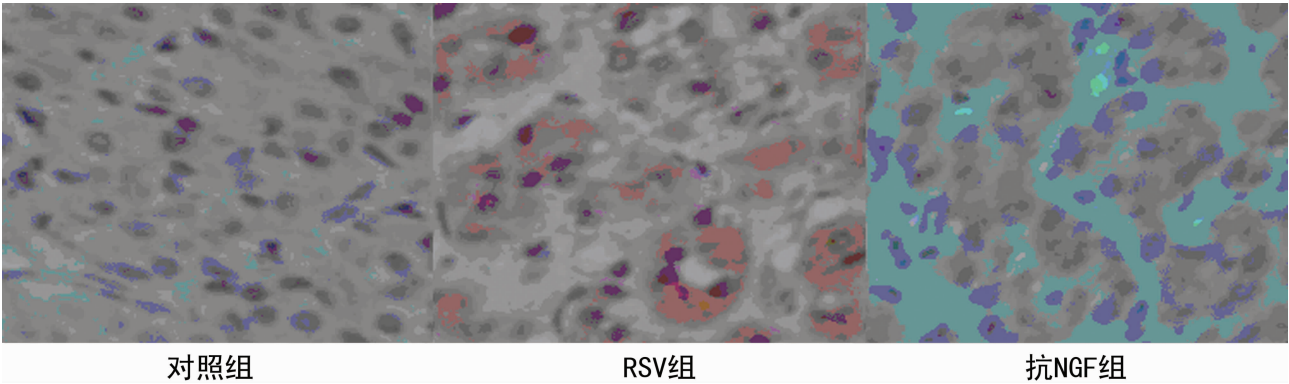


图 2 各组大鼠肾上腺髓质细胞 NGF 表达变化(×400)

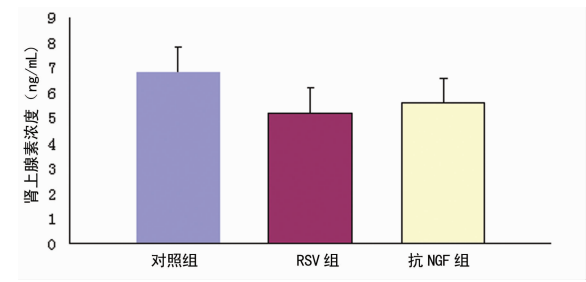


图 3 各组大鼠血清肾上腺素浓度比较

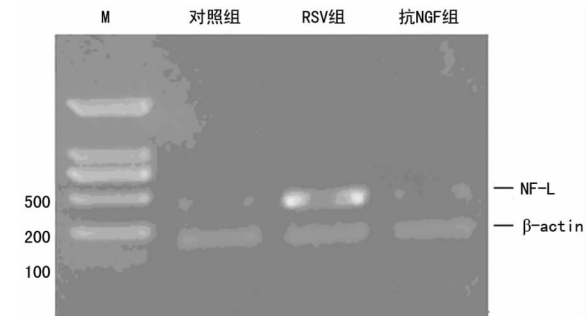


图 4 各组大鼠肾上腺髓质 NF-L mRNA 电泳分析图

2.5 RT-PCR 检测肾上腺髓质细胞 NF-L mRNA 的表达 RT-PCR 结果显示,与对照组相比,RSV 组和抗 NGF 组肾上腺髓质细胞 NF-LmRNA 表达明显增强,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 RSV 组相比,抗 NGF 组肾上腺髓质细胞 NF-

L mRNA 表达明显减弱,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1、图 4。

表 1 各组大鼠肾上腺髓质 NF-L mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	NF-L mRNA (A 值)	NF-L mRNA/ β -actin mRNA
对照组	10	131.35 $\pm$ 7.42	0.34 $\pm$ 0.12
RSV 组	10	74.98 $\pm$ 4.58	0.49 $\pm$ 0.11
抗 NGF 组	10	112.28 $\pm$ 8.37	0.41 $\pm$ 0.14

3 讨 论

NGF 是一种对神经细胞起到特殊营养作用的多肽因子,在调节神经元存活、增殖、分化、神经突起生长以及神经传递等多方面发挥重要作用^[7]。有研究显示,哮喘状态下肺结构细胞和炎症细胞均高表达 NGF 的细胞^[8],作者前期的研究发现支气管哮喘状态下肾上腺髓质细胞中 NGF 表达增强,提示病理状态下肾上腺髓质细胞可能也是 NGF 来源之一^[9-10]。本研究发现反复 RSV 感染后大鼠血清中 NGF 浓度升高的同时肾上腺髓质细胞中 NGF 表达明显增强,而抗 NGF 抗体能明显降低肾上腺髓质细胞中 NGF 的表达,提示反复感染 RSV 可诱导肾上腺髓质细胞 NGF 的过度表达,而肾上腺髓质细胞可能也是 NGF 来源之一。

肾上腺髓质嗜铬细胞具有内分泌和神经细胞两种表型^[11],在生理状态下表现为内分泌表型,可分泌一定浓度的肾

上腺素维持气道的舒张,同时由于和神经细胞起源相同,这些细胞不仅具有内分泌功能,还有向神经细胞转潜在分化能力。给孕鼠持续注射 NGF 可以使肾上腺髓质嗜铬细胞向交感神经元转化,而引起其结构和功能的改变^[12],同时原代培养的外源性 NGF 作用下,大鼠肾上腺嗜铬细胞可以长出突起,表现出神经细胞表型^[13]。本研究 RSV 组大鼠超微结构结果显示肾上腺髓质细胞细胞膜可见杵状和绒毛状突起,其中线粒体增多,间隙增宽,嗜铬颗粒浓度降低,同时血清中肾上腺素水平明显低于抗 NGF 组和对照组,说明 NGF 可以使血清中肾上腺素的表达下降。

神经丝(neurofilament protein,NF)是构成神经元胞体和神经轴突细胞骨架的主要成分^[14],存在于神经细胞、外周神经以及交感神经节中。本研究显示,反复 RSV 感染后肾上腺髓质中 NF-L mRNA 表达明显增强,而抗 NGF 抗体干预后 NF-LmRNA 表达下降,说明反复 RSV 感染后能促进肾上腺髓质细胞突触数量的增加和成熟,提示肾上腺髓质细胞有向神经细胞转化的倾向,而 NGF 可能是诱导肾上腺髓质细胞向神经转化的重要因素。再次验证了过度表达的 NGF 可能诱导具有内分泌功能的肾上腺髓质细胞向神经细胞转化,同时可能伴有内分泌功能的改变。

因此,作者推测 RSV 反复感染后过度表达的 NGF 可能通过诱导肾上腺髓质细胞向神经转化导致循环血中肾上腺素浓度下降,难以维持气道舒张,从而参与哮喘的发生和发展。

参考文献:

[1] El Omari K,Dhaliwal B,Ren J,et al. Structures of respiratory syncytial virus nucleocapsid protein from two crystal forms: details of potential packing interactions in the native helical form[J]. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*,2011,67(Pt 10):1179-1183.

[2] Wu P,Hartert TV. Evidence for a causal relationship between respiratory syncytial virus infection and asthma [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*,2011,9(9):731-745.

[3] Hu C,Wedde-Beer K,Auais A,et al. Nerve growth factor and nerve growth factor receptors in respiratory syncytial virus-infected lungs [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*,2002,283(5):L494-502.

[4] Zamora MR,Budev M,Rolfe M,et al. RNA interference

therapy in lung transplant patients infected with respiratory syncytial virus[J]. *Am J Respir Crit Care Med*,2011,183(6):531-538.

[5] Astor TL. RNA interference,RSV,and lung transplantation:A promising future for siRNA therapeutics[J]. *Am J Respir Crit Care Med*,2011,183(5):427-428.

[6] Scuri M,Chen BT,Castranova V,et al. Effects of titanium dioxide nanoparticle exposure on neuroimmune responses in rat airways [J]. *J Toxicol Environ Health*,2010,73(12):1353-1369.

[7] Freund-Michel V,Frossard N. The nerve growth factor and its receptors in airway inflammatory diseases [J]. *Pharmacol Ther*,2008,117(1):52-76.

[8] Hahn C,Islamian AP,Renz H,et al. Airway epithelial cells produce neurotrophins and promote the survival of eosinophils during allergic airway inflammation[J]. *J Allergy Clin Immunol*,2006,117(4):787-794.

[9] 汪俊,胡成平,梁伟军,等. 哮喘大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞表型转化与神经生长因子表达水平初探[J]. *中国实用内科杂志*,2007,27(4):270-272.

[10] Feng JT,Li XZ,Hu CP,et al. Neural plasticity occurs in the adrenal medulla of asthmatic rats[J]. *Chin Med J*,2010,123(10):1333-1337.

[11] Davidson-Moncada J,Papavasiliou FN,Tam W. MicroRNAs of the immune system: Roles in inflammation and cancer[J]. *Ann N Y Acad Sci*,2010,1183(2):183-194.

[12] Kodani M,Yang G,Conklin LM,et al. Application of taqman low-density arrays for simultaneous detection of multiple respiratory pathogens [J]. *J Clin Microbiol*,2011,6(21):2175-2182.

[13] Chakraborty S,Piedimonte G,Ding M,et al. Fate of airway epithelial cells exposed to titanium dioxide nanoparticles:NGF-regulated apoptotic death[J]. *Am J Respir Crit Care Med*,2011,183(1):21-25.

[14] Skalsky RL,Cullen BR. Viruses,microRNAs,and host interactions[J]. *Ann Rev Microbiol*,2010,64(1):123-141.

(收稿日期:2013-06-08 修回日期:2013-07-29)

(上接第 3851 页)

for Windows 95/98/NT[J]. *Nucl Acids Symp Ser*,1999,41(1):95-98.

[8] World Health Organization. Standardization of the nomenclature for genetic characteristics of wild-type rubella viruses[J]. *Wkly Epidemiol Rec*,2005,80(14):126-132.

[9] Frey TK. Molecular biology of rubella virus[J]. *Adv Virus Res*,1994,44(1):69-160.

[10] World Health Organization. Global distribution of measles and rubella genotypes——update[J]. *Wkly Epidemiol Rec*,2006,81(51/52):474-479.

[11] World Health Organization. Update of standard nomenclature for wild-type rubella viruses,2007[J]. *Wkly Epi-*

demiol Rec,2007,82(2):216-222.

[12] 朱贞,许文波,毛乃颖,等. 2003~2007 年中国风疹病毒基因特征分析[J]. *病毒学报*,2008,24(1):7-16.

[13] 李崇山,杨玉颖,王建国,等. 2001~2011 年上海市风疹病毒分子流行病学研究[J]. *病毒学报*,2012,28(2):124-129.

[14] 雷玥,田宏,刘杨,等. 天津地区风疹病毒的分子特征分析[J]. *天津医药*,2010,38(7):552-555.

[15] 王艳,李丹,马艳,等. 辽宁省风疹野病毒基因特征分析[J]. *中国公共卫生*,2011,27(2):193-195.

(收稿日期:2013-06-08 修回日期:2013-07-14)