

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.19.017

1,25-二羟维生素 D₃ 对哮喘豚鼠肥大细胞类胰蛋白酶释放的影响

夏 维¹, 石敦义¹, 张桂蓉²

(1. 重庆市长寿区人民医院呼吸内科 401220; 2. 重庆医科大学附属第二医院保健科 400010)

摘要:目的 探讨 1,25-二羟维生素 D₃ 对哮喘豚鼠肥大细胞类胰蛋白酶释放的影响。方法 用卵清蛋白(OVA)腹腔注射致敏和雾化吸入激发建立哮喘豚鼠模型。将 30 只健康豚鼠分为对照组(A组)、哮喘组(B组)、1,25-二羟维生素 D₃ 组(C组),每组 10 只。A、B 组予花生油灌胃;C 组予 1,25-二羟维生素 D₃ 融入花生油灌胃。测定哮喘豚鼠呼气相气道阻力(Re),收集支气管肺泡灌洗液(BALF)进行细胞计数;肺组织 HE 染色和免疫组化观察肺组织病理变化及肥大细胞类胰蛋白酶分布情况。结果 C 组 Re 较 B 组明显降低($P < 0.05$)。B 组 BALF 细胞总数、嗜酸性粒细胞比例较 A 组增高($P < 0.05$),肺组织炎症病变明显;C 组 BALF 细胞总数、嗜酸性粒细胞比例较 B 组明显降低($P < 0.05$),肺组织炎症病变减轻。B 组 Tryptase 阳性细胞较 A 组明显增多($P < 0.05$),主要分布在气道黏膜下,肺泡间隔及血管周围;C 组 Tryptase 阳性细胞较 B 组显著减少。结论 1,25-二羟维生素 D₃ 可降低哮喘豚鼠气道阻力,减轻肺组织炎症反应,并可抑制肥大细胞释放类胰蛋白酶。

关键词: 1,25-二羟维生素 D₃; 哮喘豚鼠; 呼气相气道阻力; 肥大细胞类胰蛋白酶

中图分类号: R562

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)19-2446-03

Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on the mast cells tryptase in asthmatic guinea pigs

Xia Wei¹, Shi Dunyi¹, Zhang Guirong²

(1. Department of Respiratory Medicine, People's Hospital of Changshou District, Chongqing 401220, China;

2. Department of Health Care, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To observe the effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on the mast cell tryptase in asthmatic guinea pigs. **Methods** Asthmatic models in guinea pigs were constructed by immunization of intraperitoneal injection with ovalbumin(OVA) and challenge of inspiration with nebulized OVA. Thirty guinea pigs were divided into control group(group A), asthmatic group(group B), 1,25-dihydroxyvitamin D₃ group(group C), 10 cases in each group. Peanut oil were filled stomach in group A and group B, peanut oil with 1,25-dihydroxy vitamin D₃ were filled stomach in group C. The airway responsiveness was detected, and the total cell numbers and classification in bronch-alveolar lavage fluid(BALF) were studied. The lung tissues were stained with Hematoxylin-Eosin to observe the pathologica changes and with anti-human tryptase antibody by using immunohistochemical technique to count the mast cell tryptase. **Results** The airway responsiveness in group C were significantly lower than in group B($P < 0.05$). The total cell numbers and the percentage of eosinophil of BALF in group B were significantly higher than in group A($P < 0.05$), and the inflammation response in lung tissue were significantly slighter; the total cell numbers and the percentage of eosinophil of BALF in group C were significantly lower than group B($P < 0.05$), lung tissue inflammatory lesions reduced. Tryptase positive cells in group B increased significantly than in group A($P < 0.05$), and mainly distributed in the airway mucosa, the alveolar interval and around blood vessels; Tryptase positive cells in group C reduced significantly than group B. **Conclusion** 1,25-dihydroxyvitamin D₃ could reduce airway responsiveness, obviously relieve inflammation response in airway and lung tissue, and depress mast cell activation also.

Key words: 1,25-dihydroxyvitamin D₃; asthmatic guinea pigs; airway responsiveness; mast cell tryptase

1,25-二羟维生素 D₃ 是维生素 D 的活性形式,除了调节钙和骨代谢外,还发挥其他生物活性,如通过多种途径参与免疫调节活动。近期大量研究表明,1,25-二羟维生素 D₃ 与哮喘慢性气道炎症呈明显的负相关^[1-4],可通过多种途径影响哮喘免疫机制^[5-6]。哮喘的发病机制与 I 型变态反应密切相关,而类胰蛋白酶是肥大细胞最多的炎症介质,具有多种生物活性,是肥大细胞激活和介导疾病的标志^[7-8]。本研究拟通过 1,25-二羟维生素 D₃ 对哮喘豚鼠干预治疗后,观察哮喘豚鼠气道反应性及肺组织病理、类胰蛋白酶分布的变化,探讨 1,25-二羟维生素 D₃ 对哮喘变态反应方面的影响。

1 材料与与方法

1.1 材料 (1)实验动物及分组:健康豚鼠 30 只,雌雄不限,

体质量 264~362 g,由重庆医科大学动物实验中心提供。将 30 只豚鼠分为对照组(A组)、哮喘组(B组)、1,25-二羟维生素 D₃ 组(C组),每组 10 只。(2)主要试剂:卵清蛋白(OVA)、1,25-二羟维生素 D₃、氯化乙酰胆碱(Ach)均购自美国 sigma 公司;速眠新由第三军医大学提供;402 型超声雾化器购自上海四菱医疗器械厂;自制密闭有机玻璃箱 6 L(20 cm×20 cm×20 cm);抗 Tryptase 单克隆抗体 AA1(一抗)与 SP 工作试剂盒均由福建迈新公司提供。

1.2 方法

1.2.1 造模及给药方法 哮喘模型的建立:B、C 组每只豚鼠腹腔内注射 10% OVA 溶液 1 mL 致敏,2 周后将豚鼠置于密闭有机玻璃箱内,用超声雾化器喷入 1% OVA 溶液 15~30

min。观察豚鼠反应,以出现烦躁、呛咳、呼吸加快等典型的哮喘发作症状为成功动物模型。A 组以等量生理盐水进行腹腔注射和雾化,方法同前,上午花生油 1 mL 灌胃,连续 15 d。B 组上午花生油 1 mL 灌胃;C 组 1,25-二羟维生素 D₃ 以 2.5 μg · kg⁻¹ · d⁻¹融入 1 mL 花生油后进行灌胃,均持续 15 d。第 30 天按计划取材。

1.2.2 气道反应性测定 豚鼠速眠新麻醉后将其仰卧固定于手术台上,分离暴露出颈内静脉和气管,分别行颈内静脉及气管插管,置于动物肺功能检测分析系统的密闭体积描记箱内,通过动物呼吸机辅助通气,设置呼吸机潮气量 6 mL/kg,呼吸频率为每分钟 70 次。先给予生理盐水静脉注射,记录呼气相气道阻力(Re)并作为基础值。而后分次按浓度倍增法依次静脉注射 Ach,连续记录 Ach 注射前、后 Re,每次待 Re 降至正常后再开始下一个剂量,所有动物均给予以下 4 个剂量:40、80、160、320 μg/kg。结果以 Re 增高率(Re 的实测值/基础值 × 100%)表示。

1.2.3 肺泡灌洗液(BALF)细胞计数 结扎豚鼠右主支气管,插入连接有注射器的硅胶管,行肺泡灌洗 2 次,每次 4~6 mL,回收率大于 80%为成功。回收的 BALF 予离心机离心(1 500 r/min)10 min,细胞残渣经稀释滴于血细胞计数板上,40 倍光镜下计数细胞总数,HE 染色,行细胞分类。

1.2.4 肺组织 HE 染色及类胰蛋白酶免疫组化染色 取右侧上叶肺组织标本,制成 4 μm 厚的切片,作 HE 及类胰蛋白酶免疫组化染色,观察气道肺组织的病理改变及肥大细胞类胰蛋白酶颗粒分布情况。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件进行统计分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组豚鼠一般情况比较 A 组豚鼠雾化吸入生理盐水后

呼吸无任何变化,豚鼠行动敏捷,实验过程中无死亡。B 组豚鼠雾化吸入 OVA 后出现呼吸急促,腹式呼吸明显,部分豚鼠可听到哮鸣音,重者出现跌倒,抽搐,实验第 1 天超敏死亡 1 只。C 组灌胃时误入气管死亡豚鼠 1 只,豚鼠初期雾化吸入 OVA 出现哮喘样反应,后期经 1,25-二羟维生素 D₃ 灌胃后精神饮食逐渐好转,但较 A 组差。

2.2 气道反应性测定 3 组豚鼠气道内阻力基础值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。随着 Ach 浓度的增加,B 组 Re 较 A 组明显增高($P < 0.05$),尤其在 160~320 mg/mL 时;C 组与 A 组比较有类似变化。C 组 Re 较 B 组明显降低($P < 0.05$),见表 1。

2.3 支气管 BALF 细胞计数及分类 B 组 BALF 细胞总数高于 A 组,其中以嗜酸性粒细胞增高最为明显($P < 0.05$)。C 组 BALF 细胞总数及嗜酸性粒细胞比例较 B 组明显下降($P < 0.05$),见表 2。

2.4 肺组织 HE 染色 B 组气管黏膜组织中大量炎症细胞浸润,以嗜酸性粒细胞为主,其次为中性粒细胞、淋巴细胞等;支气管管腔狭窄,内有大量黏液栓形成,部分气道上皮脱落。气道平滑肌细胞明显增生、肥大,导致平滑肌层增厚。C 组气道黏膜非特异性炎症明显减轻,A 组则无此病理改变。

表 1 3 组豚鼠 Re 比较($\bar{x} \pm s$, cm H₂O/mL · s)

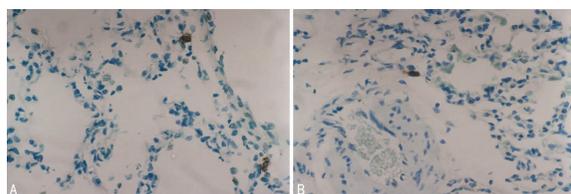
药品	A 组(n=10)	B 组(n=9)	C 组(n=9)
生理盐水	4.84±0.17	5.06±0.20	4.92±0.17
Ach 40 μg/mL	7.12±0.28	9.54±0.85▲	8.09±0.70△
Ach 80 μg/mL	7.91±0.75	11.14±0.93▲	9.08±0.81△
Ach 160 μg/mL	8.51±0.79	19.04±1.49▲	16.38±1.19△
Ach 320 μg/mL	8.71±0.87	33.14±3.40▲	21.08±1.80△

▲: $P < 0.05$,与 A 组比较;△: $P < 0.05$,与 B 组比较。

表 2 3 组豚鼠 BALF 细胞计数及分类($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞总数(×10 ⁸ /L)	嗜酸性粒细胞	中性粒细胞	单核细胞	淋巴细胞
A 组	10	9.10±1.54	0.033±0.027	0.053±0.037	0.699±0.083	0.215±0.027
B 组	9	21.90±2.44★	0.118±0.030★	0.042±0.024	0.613±0.027	0.227±0.044
C 组	9	17.50±2.41▲	0.071±0.019▲	0.060±0.021	0.611±0.065	0.258±0.045

★: $P < 0.05$,与 A 组比较;▲: $P < 0.05$,与 B 组比较。

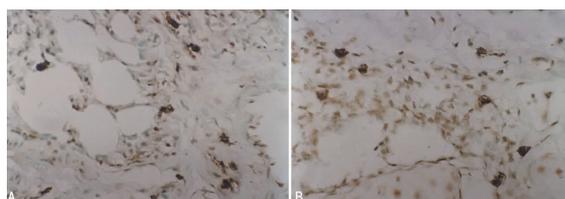


A:气道黏膜下;B:肺泡间隔。

图 1 A 组 Tryptase 阳性细胞表达(×400)

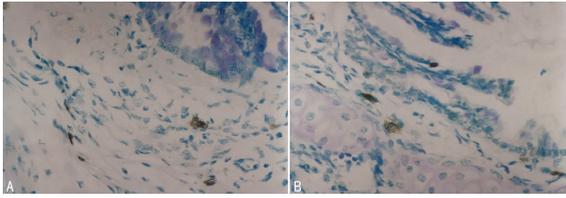
2.5 肺组织类胰蛋白酶免疫组化染色 A 组 Tryptase 阳性细胞表达很少,主要散布在黏膜下、肺泡间隔,见图 1。B、C 组 Tryptase 阳性细胞表达则明显增多,主要聚集在气管黏膜下、肺泡间隔、血管周围,一些 Tryptase 阳性颗粒散布在细胞外,

见图 2、3。B 组 Tryptase 阳性细胞为(17.3±1.19)与 A 组(3.2±0.98)比较差异有统计学意义($P < 0.05$);C 组 Tryptase 阳性细胞(13.9±1.87)较 B 组(17.3±1.19)明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



A:气道黏膜下;B:肺泡间隔及血管周围。

图 2 B 组 Tryptase 阳性细胞表达(×400)



A:血管周围;B:气管黏膜下。

图3 C组 Tryptase 阳性细胞表达($\times 400$)

3 讨论

哮喘的本质是由多种细胞(如嗜酸性粒细胞、肥大细胞、T淋巴细胞等)和细胞组分参与的慢性气道炎症,这种慢性炎症与气道高反应性密切相关,常表现为 Re 增高。本实验采用 OVA 注射致敏、雾化吸入方式诱导复制哮喘动物模型。B 组豚鼠在雾化吸入 OVA 后出现典型的哮喘样反应,Re 增高, BALF 细胞总数及嗜酸性粒细胞比例增高,肺组织气管上皮细胞肿胀、脱落,管腔变窄,管壁及管腔内有大量炎症细胞浸润,而 A 组则无上述改变,说明本实验哮喘模型制作成功。

近年来,大量研究表明维生素 D 与支气管哮喘发病密切相关,可能通过多种途径参与了哮喘的病因学^[6]。Brehm 等^[9]在拉丁美洲哥斯达黎加地区进行横断面调查,回归分析显示 1,25-二羟维生素 D₃ 缺乏与哮喘发病之间存在明显相关性,且 1,25-二羟维生素 D₃ 水平越低,哮喘症状越严重。Sutherland 等^[10]研究发现,在哮喘患者中,维生素 D 水平与气道反应性、肺功能及糖皮质激素受体密切相关,即患者血清 1,25-二羟维生素 D₃ 越低,其气道反应性越高(表现为 Re 增高),糖皮质激素受体敏感越低,肺功能越差。Majak 等^[11]在给哮喘患者补充维生素 D 后,发现能明显减低气道炎症反应,从而减少哮喘的急性发作。Boonstr 等^[12]研究发现,1,25-二羟维生素 D₃ 能增加辅助性 T 淋巴细胞(Th)向 Th 分化的趋势, Th1 下调, Th2 上调。在本实验中, C 组经 1,25-二羟维生素 D₃ 处理后,哮喘豚鼠 BALF、气管及肺组织中的炎症细胞浸润均明显减轻, Re 降低,提示 1,25-二羟维生素 D₃ 确能减轻哮喘豚鼠的气道炎症反应,降低 Re。

在哮喘的变态反应中,肥大细胞的激活至关重要,那么 1,25-二羟维生素 D₃ 能否对肥大细胞的激活产生影响呢? 类胰蛋白酶是一种相对分子质量为 134×10^3 的中性丝氨酸蛋白酶四聚体,它高度选择表达于肥大细胞,是肥大细胞激活的产物。在本实验中, B 组豚鼠肥大细胞数量及类胰蛋白酶颗粒明显较 A 组增多,证实类胰蛋白酶参与了哮喘发病过程^[13-15]。经 1,25-二羟维生素 D₃ 处理后,哮喘豚鼠肥大细胞数量及释放的类胰蛋白酶颗粒均明显减少,说明维生素 D 可能有抑制肥大细胞激活及释放类胰蛋白酶颗粒的作用。

参考文献:

[1] Herr C, Greulich T, Kocuzilla RA, et al. The role of vitamin D in pulmonary disease: COPD, asthma, infection, and cancer[J]. *Respir Res*, 2011, 12(1): 31.

[2] Camargo CA Jr, Ingham T, Wickens K, et al. Cord-blood 25-hydroxyvitamin D levels and risk of respiratory infection, wheezing, and asthma[J]. *Pediatrics*, 2011, 127(1):

180-187.

[3] Li F, Peng M, Jiang L, et al. Vitamin D deficiency is associated with decreased lung function in Chinese adults with asthma[J]. *Respiration*, 2011, 81(6): 469-475.

[4] Majak P, Olszowiec-Chlebna M, Smejda K, et al. Vitamin D supplementation in children may prevent asthma exacerbation triggered by acute respiratory infection[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2011, 127(5): 1294-1296.

[5] Hansdottir S, Monick MM. Vitamin d effects on lung immunity and respiratory diseases[J]. *Vitam Horm*, 2011, 86(1): 217-237.

[6] Mak G, Hanania NA. Vitamin D and asthma[J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2011, 17(1): 1-5.

[7] Bradding P, Walls AF, Holgate ST, et al. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 117(6): 1277-1284.

[8] Hallgren J, Pejler G. Biology of mast cell tryptase. An inflammatory mediator[J]. *FEBS J*, 2006, 273(9): 1871-1895.

[9] Brehm JM, Celedon JC. Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 179(8): 765-771.

[10] Sutherland ER, Goleva E, Jackson LP, et al. Vitamin D levels, lung function, and steroid response in adult asthma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181(7): 699-704.

[11] Majak P, Olszowiec-Chlebna M, Smejda K, et al. Vitamin D supplementation in children may prevent asthma exacerbation triggered by acute respiratory infection[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2011, 127(5): 1294-1296.

[12] Boonstr A, Barrat FJ, Crain C, et al. 1,25-Dihydroxy vitamin D₃ has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells[J]. *J Immunol*, 2001, 167(9): 4974-4980.

[13] Molinari JF, Scuri M, Moore WR, et al. Inhaled tryptase causes bronchoconstriction in sheep via histamine release[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 154(3): 649-653.

[14] He S, Peng Q, Walls AF, et al. Potent induction of a neutrophil and eosinophil-rich infiltrate in vivo by human mast cell tryptase: selective enhancement of eosinophil recruitment by histamine[J]. *J Immunol*, 1997, 159(12): 6216-6265.

[15] Brown JK, Tyler CL, Jones CA, et al. Tryptase, the dominant secretory granular protein in human mast cells, is a potent mitogen for cultured dog tracheal smooth muscle cells[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995, 13(8): 227-230.