

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.18.010

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200722.1727.024.html>(2020-07-24)

PIR-B mAb 对哮喘小鼠气道 CD34⁺ 祖细胞分化及嗜酸性粒细胞浸润的影响^{*}

李小波,黄 茂,王斌梁,王笑咪
(浙江省台州市第一人民医院呼吸与危重症医学科 318020)

[摘要] **目的** 研究 PIR-B mAb 对哮喘小鼠气道 CD34⁺ 祖细胞分化及嗜酸性粒细胞(Eos)浸润的影响。**方法** 选取健康的 C57BL/6J 小鼠 32 只,按照随机数字表法分为 4 组:正常组、哮喘组、对照抗体组、PIR-B mAb 治疗组,每组 8 只。除正常组外,其他 3 组采用注入致敏液和卵清蛋白(OVA)雾化激发方式建模,同时对照抗体组注入 IgG2b,PIR-B mAb 治疗组注入 PIR-B mAb,流式细胞仪对 CD34⁺ 祖细胞及 Eos 细胞进行计数并分析 CD34⁺ 祖细胞的分化情况和 Eos 募集情况;苏木素-伊红(HE)染色和过碘酸希夫(PAS)染色观察 Eos 在肺组织中的浸润程度;RT-PCR 和 Western bolt 检测 Eotaxin、CCR3 mRNA 和蛋白的相对表达水平。**结果** 哮喘组支气管肺泡灌洗液、外周血、骨髓中的 CD34⁺ 祖细胞比例和 CD34⁺ 祖细胞总数明显高于正常组($P<0.05$),对照抗体组与哮喘组比较差异无统计学意义($P>0.05$),PIR-B mAb 治疗组明显低于哮喘组和对照抗体组(均 $P<0.05$);哮喘组支气管肺泡灌洗液、外周血、骨髓中的 Eos 比例和 Eos 总数明显高于正常组($P<0.05$),对照抗体组与哮喘组比较差异无统计学意义($P>0.05$),PIR-B mAb 治疗组明显低于哮喘组和对照抗体组(均 $P<0.05$)。HE 染色及 PAS 染色表明:与正常组相比较,哮喘组和对照抗体组的 Eos 在支气管和血管周围的浸润明显增加,哮喘组和对照抗体组的黏液分泌量明显增加;与哮喘组比较,PIR-B mAb 治疗组 Eos 的浸润和黏液分泌呈明显降低,哮喘组中的 Eotaxin、CCR3 mRNA 和蛋白相对表达水平明显高于正常组(均 $P<0.05$),对照抗体组与哮喘组比较差异无统计学意义($P>0.05$),PIR-B mAb 治疗组明显低于哮喘组和对照抗体组(均 $P<0.05$);与正常组比较,哮喘组和对照抗体组 Eos 募集情况明显升高($P<0.05$),PIR-B mAb 治疗组以上指标较哮喘组和对照抗体组显著降低($P<0.05$),对照抗体组和哮喘组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** PIR-B mAb 能够抑制哮喘小鼠 Eotaxin、CCR3 表达水平,降低 CD34⁺ 祖细胞分化和 Eos 的表达,减轻哮喘小鼠肺部组织 Eos 的浸润。

[关键词] 免疫球蛋白样受体 B;哮喘;CD34⁺ 祖细胞;嗜酸粒细胞;细胞分化;浸润
[中图分类号] R562.25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)18-3020-06

Effects of PIR-B mAb on the differentiation of CD34⁺ progenitor cells and infiltration of eosinophils in asthmatic mice^{*}

LI Xiaobo, HUANG Mao, WANG Binliang, WANG Xiaomi
(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, First People's Hospital of Taizhou City, Taizhou, Zhejiang 318020, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of PIR-B mAb on differentiation of airway CD34⁺ progenitor cells and infiltration of eosinophils (Eos) in asthmatic mice. **Methods** Thirty-two healthy C57BL/6J mice were randomly divided into the 4 groups: the normal group, the asthma group, the control antibody group and the PIR-B mAb treatment group, with 8 mice in each group. In addition to the normal group, the other three groups were modeled by injection of sensitizing solution and oval bumin (OVA) atomization excitation method, while the control antibody group was injected with IgG2b, the PIR-B mAb treatment group was injected with PIR-B mAb, and the cells were counted by flow cytometry. The differentiation of CD34⁺ progenitor cells was analyzed. HE staining and PAS staining were used to observe the degree of infiltration of Eos in lung tissue. The expression levels of Eotaxin, CCR3 mRNA and protein were detected by RT-PCR and Western blot.

^{*} **基金项目:** 浙江省医药卫生科技计划项目(2019KY779);台州市科技计划项目(162yw05)。 **作者简介:** 李小波(1978—),副主任医师,硕士,主要从事慢性气道疾病研究。

Results The proportion of CD34⁺ progenitor cells and the total number of CD34⁺ progenitor cells in bronchoalveolar lavage fluid, peripheral blood, and bone marrow of the asthma group were significantly higher than those of the normal group ($P < 0.05$); there were no statistically significant difference between the control antibody group and the asthma group about the indexes above ($P > 0.05$), the PIR-B mAb treatment group was significantly lower than that of the asthma group and the control antibody group (both $P < 0.05$). The proportion of Eos and total Eos in bronchoalveolar lavage fluid, peripheral blood and bone marrow of the asthma group were significantly higher than those of the normal group ($P < 0.05$); there were no statistically significant difference between the control antibody group and the asthma group about the indexes above ($P > 0.05$), the PIR-B mAb treatment group was significantly lower than that of the asthma group and the control antibody group (both $P < 0.05$). The expression levels of Eotaxin, CCR3 mRNA and protein in bronchoalveolar lavage fluid, peripheral blood, and bone marrow of the asthma group were significantly higher than those of the normal group ($P < 0.05$); there was no statistically significant difference between the control antibody group and the asthma group about the indexes above ($P > 0.05$), the PIR-B mAb treatment group was significantly lower than that of the asthma group and the control antibody group (both $P < 0.05$). HE staining and PAS staining showed: compared with the normal group, the Eos recruitment in the asthma group and the control antibody group increased significantly ($P < 0.05$), and the eosinophil recruitment in the PIR-B mAb treatment group decreased significantly when compared with the asthma group and the control antibody group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the eosinophil recruitment between the control antibody group and the asthma group ($P > 0.05$). **Conclusion** PIR-B mAb can inhibit the expression levels of Eotaxin and CCR3 in asthmatic mice, reduce the differentiation of CD34⁺ progenitor cells and the expression of Eos, and can reduce the infiltration of Eos in the lung tissue of asthmatic mice.

[Key words] PIR-B; asthma; CD34⁺ progenitor cells; eosinophils; cell differentiation; infiltration

支气管哮喘简称哮喘,是一种异质性疾病,它是一种慢性的气道炎症,是一个主要以嗜酸性粒细胞(eosinophil, Eos)浸润为主的气道炎症^[1]。Eos 来源于骨髓 CD34⁺ 祖细胞,由于患者接触大量过敏原后, Th2 细胞活化分泌大量的趋化因子,导致骨髓 CD34⁺ 祖细胞增殖和分化为成熟的 Eos^[2]。成熟的 Eos 分泌血小板活化因子等炎症介质,导致支气管平滑肌痉挛、微血管通透性增加等不良反应^[3]。Eos 也释放神经毒素、过氧化酶、主碱基蛋白等物质对上皮细胞产生细胞毒作用,致使上皮细胞脱落和坏死,从而产生气道高反应性^[4]。哮喘可发生于各个年龄段,不同人群哮喘发病率在 1%~18%,据统计目前全世界有 3 亿人患哮喘^[5]。哮喘的病理学特征主要包括黏液栓、黏膜下炎症细胞浸润、上皮纤维化、肌成纤维细胞增生^[6]。临床主要表现为呼吸困难、咳嗽、气促等,严重的哮喘发作会导致猝死发生,所以应重视哮喘的治疗^[7]。目前认为哮喘可控,但不能完全治愈。配对免疫球蛋白样受体 B (paired immunoglobulin-like receptor, PIR-B) 属于免疫球蛋白样受体家族, PIR-B 是一种抑制性配体,具有广泛的生物学功能,有研究报道 PIR-B 能够抑制 Toll 样受体 (TLR) 介导的炎症反应^[8]。PIR-B mAb 是 PIR-B 抑制剂,抑制 PIR-B 水平的增长,本研究主要探讨 PIR-B mAb 对哮喘小鼠气道 CD34⁺ 祖细胞分化及 Eos 浸润的作用,为寻找治疗哮喘的靶向药物提供理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

32 只健康的 C57BL/6J 小鼠购自温州医科大学实验动物中心, 6~8 周龄, 体重 19~23 g; 卵清蛋白 (OVA) 购自美国 Sigma 公司; PIR-B mAb 购自大连宝生物工程公司; IgG2b 购自德国 Miltenyi 公司; 培养基和胎牛血清购自美国 BD 公司; PCR 引物序列购自日本 TaKaRa 公司; 佐剂液态铝购自美国 Santa Crue 公司; 冰乙酸购自杭州长征化工厂; 瑞氏染液购自上海新华化工厂; TRIzol 试剂盒购自美国 Abcam 公司; 反转录酶购自浙江双林化工试剂厂; 溶血剂购自上海生工生物技术有限公司; 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 实验分组和动物模型的建立

按照随机数字表法分为 4 组: 正常组、哮喘组、对照抗体组、PIR-B mAb 治疗组, 每组 8 只。除正常组外, 所有 C57BL/6J 小鼠第 0~14 天腹腔分别注入致敏液 0.2 mL 进行致敏处理, 正常组注入等体积的生理盐水。第 24~26 天, 将哮喘组、对照抗体组、PIR-B mAb 治疗组的 C57BL/6J 小鼠放在密闭的容器里雾化吸入 OVA 溶液 10 mL 进行激发处理, 正常组吸入等体积的生理盐水。对照抗体组在激发前腹腔注射非特异性 IgG2b (ns-IgG2b) 150 μ g, 激发时 IgG2b 50 μ g 与 OVA 同时给予小鼠雾化吸入。PIR-B mAb 治疗组激发前腹腔注射 PIR-B mAb 150 μ g, 激发时 PIR-B mAb 50 μ g 与 OVA 同时给予小鼠雾化吸入。激发后 48 h, 腹腔注入 1 000 μ mol/mL 肝素钠抗凝处理, 再将 1% 戊巴比妥钠注入腹腔进行麻醉, 处死小

鼠,进行标本收集。

1.3 细胞计数

外周血:小鼠注射肝素钠 0.2 mL 抗凝,麻醉取一侧眼球放血 1 mL,收集至 1.5 mL 的离心管中,进行离心处理,离心转速为 1 250 r/min,4 ℃ 条件下 1 250 r/min 离心 5 min,收集上清液,取 20 μL 抗凝血,调整体积为 100 μL,加入 CD34-PE 单抗,再加入 Iso-type control 10 μL 混合均匀,4 ℃ 条件下 2 000 r/min 离心 45 min,弃上清液,PBS 洗 2 遍,加入 1%多聚甲醛 0.5 mL,混悬,采用流式细胞仪分析计数 CD34⁺祖细胞。沉淀物涂片备瑞氏-吉姆萨染色进行 Eos 标记,采用单盲法计数 Eos 比例。

支气管肺泡灌洗液:暴露小鼠颈前气管,横刀切口,插入 18G 气管插管针,结扎右侧肺根部,在左肺行支气管肺泡灌洗,PBS 洗 3 次,回收 80%的液体,置于 1.5 mL 的离心管中离心处理,4 ℃ 条件下 1 250 r/min 离心 5 min,取 20 μL 支气管肺泡灌洗液,剩余方法同上。

骨髓:制备骨髓细胞悬液,剪开小鼠右腿股骨处皮肤,使股骨充分暴露,进行肌肉组织清除,再以 25G 针在股骨头和股骨颈处穿刺骨髓腔,采用 HBSS 洗 3 次,吹打成骨髓细胞悬液,进行离心处理,4 ℃ 条件下 1 250 r/min 离心 5 min,取 20 μL 骨髓细胞悬液,剩余方法同上。

1.4 苏木素-伊红(HE)染色

通过气管插管灌注 10%中性甲醛使左肺固定,固定 24 h 后,沿左肺门处切取肺叶 2 cm,乙醇脱水,石蜡包埋,制成蜡块。石蜡 3 μm 切片,60 ℃ 烤箱熔蜡,然后用 100%、95%、80%和 75%梯度乙醇脱水,放于水中冲洗 3 min,切片 HE 染色 2 min,再用二甲苯渗透切片,中性树脂封片,光镜下观察其病理的变化。

1.5 过碘酸希夫(PAS)染色

取肺组织 3 μm 放入 10%中性甲醛固定液和 Camoy 固定液中 4 ℃ 低温固定,乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,1%的高碘酸氧化物作用 10 min,流水冲洗 5 min,蒸馏水洗 2 次,Schiff 氏染液中避光染色 30 min,放入 0.5%的偏重亚硫酸钾中浸洗 3 次,分化流水冲洗 3 次,1%的盐酸乙醇分化,自来水冲洗,温水反蓝,中性树脂封片。

1.6 RT-PCR 检测 PIR-B、Eotaxin、CCR3 mRNA 表达

将肺组织放入胰酶消化,冷却无菌的 PBS 洗涤 3 次,弃上清液,放入 EP 管,加入 100 μL 三氯甲烷和 2 mL TRIzol 搅拌均匀,放入冰箱冷却 10 min。再加入 300 mL 异丙醇于 4 ℃ 条件下 2 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 2 mL 70%的乙醇,于 4 ℃ 条件下 1 500 r/min 离心 5 min,通过 TRIzol 提取总 RNA,将总 RNA 逆转录为 cDNA 后行 PCR 反应,PCR 反应条件:90 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,72 ℃ 20 s,

60 ℃ 5 min,共 45 个循环。实验重复 3 次,检测 PIR-B、Eotaxin、CCR3 mRNA 相对表达水平,引物序列如表 1。

表 1 各基因 PCR 引物序列			
基因	方向	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
PIR-B	正向	ACCGTCGCGCTTTCTATGGT	237
	反向	CCCTTCGCCAAGGCGTTTAT	
Eotaxin	正向	AUUTCGCAAAGUCUACCACGA	306
	反向	GGATTGCAUAAAGUGTCGCACG	
CCR3	正向	AUUGGCUTTTAUCUACCACGAU	144
	反向	GGATTTGCTCGCGUGTCGCACGAU	
GAPDH	正向	CGTATCGGACGCCTGGTT	395
	反向	GCTTCGCCTCTACTTCUG	

1.7 Western blot 检测蛋白 PIR-B、Eotaxin、CCR 表达水平

采用 RIPA 缓冲液提取肺组织细胞,提取蛋白 40 μg 检测 PIR-B、Eotaxin、CCR 表达水平,电泳转膜处理,然后在室温条件下用 5%的脱脂牛奶封闭 2 h,将聚偏氟乙烯(PVDF)膜与稀释的 PIR-B、Eotaxin、CCR3 一抗(1:1 000)在 4 ℃ 孵育过夜,然后在 37 ℃ 下用稀释的二抗(1:50 000)处理 2 h,封闭 2 h 后 TBST 洗涤 3 次。采用 ECL 发光试剂盒对蛋白进行显色,用 Image J 软件分析图像的灰度值。

1.8 流式细胞仪检测 Eos 募集情况

将肺组织用胰酶消化,使用分离试剂盒获得单细胞悬液,再用 4%多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗 3 次,加入 300 μL 3%牛血清清蛋白封闭非特异性抗原,待 20 min 后去除封闭液,将细胞用荧光标记的异硫氰酸荧光素(FITC),Percp 结合抗 CD3(145-2C11)、FITC 结合抗 CD11b、PE 结合抗 CD11c 特异性抗体对细胞进行染色,再加兔抗人 CD34⁺抗体,常温避光孵育 24 h,去一抗,PBS 洗 3 次,加入 Fluor-488 标记的二抗,孵育 4 h,去二抗,滴加 5 μL 二脒基苯基叫噪进行封闭,通过荧光显微镜观察细胞分化情况,数据使用 LSRFortessa X 软件收集,使用 FlowJo 软件进行分析。

1.9 统计学处理

采用 SPSS18.0 软件处理数据,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间两两比较采用 SNK-*q* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 对各组小鼠外周血、支气管肺泡灌洗液、骨髓中 CD34⁺祖细胞比较

哮喘组外周血、支气管肺泡灌洗液、骨髓中的 CD34⁺祖细胞比例和 CD34⁺祖细胞总数明显高于正常组(*P* < 0.05),对照抗体组以上指标与哮喘组比较差异无统计学意义(*P* > 0.05),PIR-B mAb 治疗组以

上指标显著低于哮喘组和对照抗体组,差异有统计学意义(均 $P<0.05$),见表 2。

2.2 各组小鼠外周血、支气管肺泡灌洗液、骨髓中 Eos 比较

哮喘组外周血、支气管肺泡灌洗液、骨髓中的 Eos 比例和 Eos 总数明显高于正常组 ($P<0.05$),对照抗体组以上指标与哮喘组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$),PIR-B mAb 治疗组以上指标显著低于哮喘组

和对照抗体组,差异有统计学意义(均 $P<0.05$),见表 3。

2.3 HE 染色、PAS 染色检测肺组织 Eos 浸润情况
HE 染色和 PAS 染色结果显示,与正常组比较,哮喘组和对照抗体组的 Eos 在支气管和血管周围的浸润明显增加,哮喘组和对照抗体组的黏液分泌量明显增加;与哮喘组比较,PIR-B mAb 治疗组 Eos 的浸润和黏液分泌量呈明显降低,见图 1。

表 2 各组外周血、支气管肺泡灌洗液、骨髓中 CD34⁺祖细胞比例和总数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	外周血		支气管肺泡灌洗液		骨髓	
	CD34 ⁺ 祖细胞	CD34 ⁺ 祖细胞	CD34 ⁺ 祖细胞	CD34 ⁺ 祖细胞	CD34 ⁺ 祖细胞	CD34 ⁺ 祖细胞
	比例(%)	总数($\times 10^6/L$)	比例(%)	总数($\times 10^6/L$)	比例(%)	总数($\times 10^6/L$)
正常组	0.52±0.11	5.97±1.63	1.42±0.35	0.47±0.31	45.78±14.49	2.64±0.63
哮喘组	1.18±0.21 ^{ab}	11.22±1.69 ^{ab}	9.38±1.15 ^{ab}	7.82±1.76 ^{ab}	85.34±12.65 ^{ab}	5.51±0.69 ^{ab}
对照抗体组	1.16±0.22 ^{ab}	10.98±1.79 ^{ab}	8.92±1.24 ^{ab}	7.66±1.85 ^{ab}	84.73±12.64 ^{ab}	5.21±0.73 ^{ab}
PIR-B mAb 治疗组	1.24±0.33 ^a	7.13±2.01 ^a	3.49±1.21 ^a	2.42±0.79 ^a	59.24±11.37 ^a	3.05±0.71 ^a
F	7.853	10.239	8.759	6.784	30.464	7.815
P	0.021	0.011	0.019	0.033	<0.001	0.022

^a: $P<0.05$,与正常组比较;^b: $P<0.05$,与 PIR-B mAb 治疗组比较。

表 3 各组外周血、支气管肺泡灌洗液、骨髓中 Eos 比例和总数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	外周血		支气管肺泡灌洗液		骨髓	
	Eos 比例	Eos 总数	Eos 比例	Eos 总数	Eos 比例	Eos 总数
	(%)	($\times 10^6/L$)	(%)	($\times 10^6/L$)	(%)	($\times 10^6/L$)
正常组	0.79±0.17	6.57±1.29	0.16±0.07	0.05±0.03	1.68±0.16	22.78±2.71
哮喘组	3.79±0.62 ^{ab}	31.46±5.79 ^{ab}	28.85±1.03 ^{ab}	20.03±5.37 ^{ab}	5.21±0.36 ^{ab}	66.73±5.21 ^{ab}
对照抗体组	3.73±0.58 ^{ab}	31.23±5.78 ^{ab}	27.53±1.22 ^{ab}	19.94±1.22 ^{ab}	5.63±0.31 ^{ab}	64.27±3.94 ^{ab}
PIR-B mAb 治疗组	1.79±0.27 ^a	12.29±3.06 ^a	3.29±0.93 ^a	4.03±1.37 ^a	2.91±0.34 ^a	40.37±4.06 ^a
F	18.465	25.781	26.476	23.365	12.784	36.468
P	0.016	0.005	0.002	0.007	0.028	<0.001

^a: $P<0.05$,与正常组比较;^b: $P<0.05$,与 PIR-B mAb 组比较。

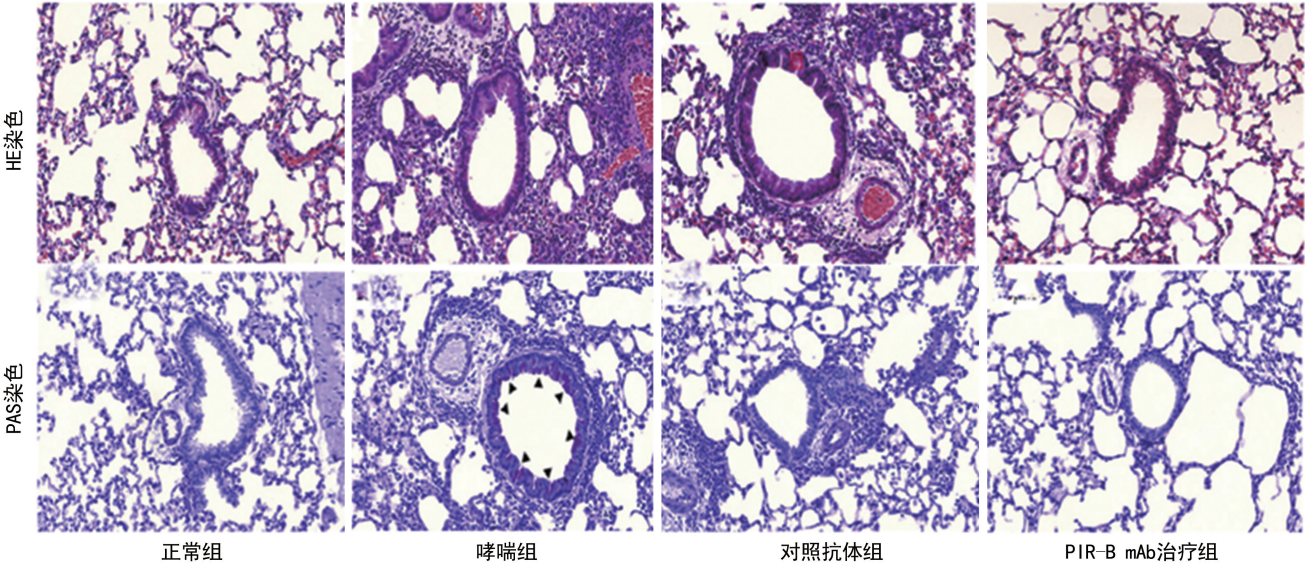


图 1 各组小鼠肺组织病理学改变($\times 200$)

表 4 各组小鼠肺组织中 Eotaxin、CCR3 mRNA 和蛋白的表达($\bar{x}\pm s$)

组别	Eotaxin mRNA	CCR3 mRNA	Eotaxin 蛋白	CCR3 蛋白
正常组	0.63±0.97	0.98±0.13	0.41±0.36	0.49±0.03
哮喘组	1.61±0.14 ^{ab}	3.27±1.16 ^{ab}	1.24±0.33 ^{ab}	1.04±0.07 ^{ab}
对照抗体组	1.82±0.13 ^{ab}	3.65±1.18 ^{ab}	1.29±0.27 ^{ab}	1.12±0.08 ^{ab}
PIR-B mAb 治疗组	0.76±0.29	1.71±1.22 ^a	0.61±0.18	0.71±0.09 ^a
F	36.762	19.371	36.562	16.785
P	0.003	0.007	0.002	0.012

^a: $P<0.05$,与正常组比较;^b: $P<0.05$,与 PIR-B mAb 组比较。

2.4 哮喘小鼠中肺组织中 Eotaxin、CCR3 mRNA 和蛋白的表达

哮喘组中的 Eotaxin、CCR3 mRNA 和蛋白明显高于正常组(均 $P<0.05$),对照抗体组以上指标与哮喘组比较差异无统计学意义($P>0.05$),PIR-B mAb 治疗组以上指标明显低于哮喘组和对照抗体组,差异有统计学意义(均 $P<0.05$),见表 4 和图 2。

2.5 PIR-B mAb 对各组小鼠 Eos 募集的影响

用流式细胞仪检测 Eos 募集情况,与正常组比较,哮喘组和对照抗体组 Eos 募集明显升高($P<0.05$),PIR-B mAb 治疗组 Eos 募集较哮喘组和对照

抗体组显著降低($P<0.05$),对照抗体组和哮喘组中 Eos 募集差异无统计学意义($P>0.05$),见图 3。

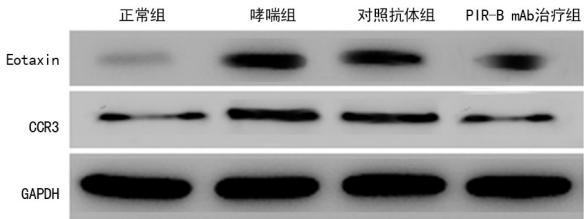


图 2 Western blot 检测各组小鼠肺组织中 Eotaxin、CCR3 mRNA 和蛋白的表达

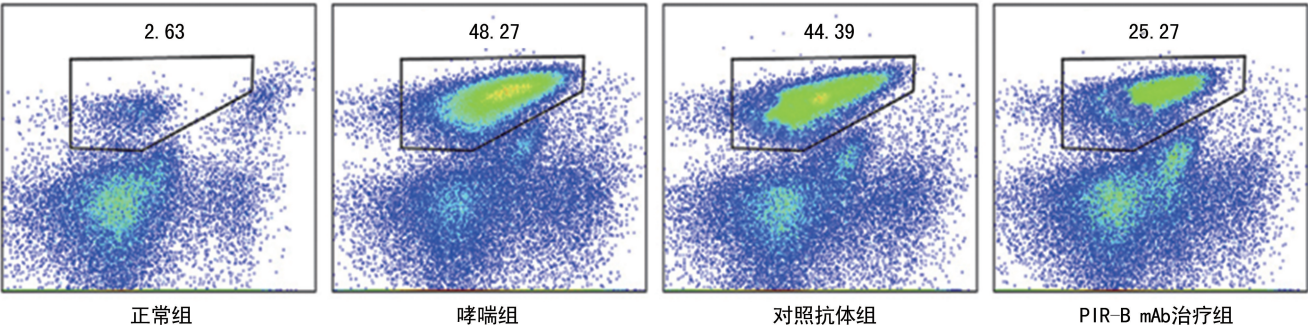


图 3 PIR-B mAb 对各组小鼠 Eos 募集情况的影响

3 讨论

Eos 源于骨髓中的 CD34⁺祖细胞,CD34⁺祖细胞增殖并分化为成熟的 Eos,随之迁移到外周血和支气管黏膜^[9]。Eos 在哮喘的发病中起着非常重要的作用。随着 Eos 的生成和活化,会分解多种炎症介质,刺激支气管平滑肌痉挛和气道水肿等反应^[10]。在支气管哮喘发生发展的过程中起着不容小觑的作用。在气道黏膜中,Eotaxin 主要表达于上皮细胞和 Eos 中,具有强大的趋化作用^[11]。Eotaxin 与 CD34⁺祖细胞上的 CCR3 相结合,参与 CD34⁺祖细胞的迁移和活化。Eotaxin 还能与 Th2 淋巴细胞触及过敏炎症区域,活化这些细胞,参与过敏性炎症反应。CCR3 是一种受体蛋白,介导细胞趋化,使细胞活化达到迁移的作用^[12]。CCR3 在 Eos 中高表达,Eotaxin 还可以高效活化 CCR3,导致 Eos 迁移至气道组织,释放活性物质,引起气道高反应性,导致支气管哮喘的发生和发展。

本研结果显示,哮喘组支气管肺泡灌洗液、外周血、骨髓中的 CD34⁺祖细胞比例和 CD34⁺细胞总数明显高于正常组,对照抗体组以上指标与哮喘组比较无明显差异,PIR-B mAb 治疗组以上指标显著低于哮喘组和对照抗体组;哮喘组支气管肺泡灌洗液、外周血、骨髓中的 Eos 比例和 Eos 总数明显高于正常组,对照抗体组以上指标与哮喘组比较无明显差异,PIR-B mAb 治疗组以上指标显著低于哮喘组和对照抗体组。ZHAKEER 等^[13]研究证明 CD34⁺祖细胞总数增多,CCR3 水平就会上升,从而促进 CD34⁺祖细胞的分化和趋化,促使 Eos 的生成^[14]。哮喘患者接触到大量的过敏原后会分泌大量的趋化因子,在 Eotaxin 和 PIR-B 的作用下,CD34⁺祖细胞增殖分化成 Eos。KARANI 等^[15]研究表明,抗原激发支气管肺泡灌洗液和外周血的 CD34⁺祖细胞增多,BrdU 掺入法检测 CD34⁺祖细胞分别占支气管肺泡灌洗液和外周血的

78%和 86%^[14-15]。本研究中 CD34⁺ 祖细胞在哮喘组中较正常组也明显增多。

本研究表明,哮喘组中的 Eotaxin、CCR3 mRNA 和蛋白与正常组比较明显增高,对照抗体组以上指标与哮喘组比较无明显差异,PIR-B mAb 治疗组以上指标明显低于哮喘组和对照抗体组;与正常组比较,哮喘组和对照抗体组 Eos 募集明显升高,给药后的 PIR-B mAb 治疗组 Eos 募集显著降低,对照抗体组和哮喘组 Eos 募集无明显差异。而募集于气道局部的 Eos 对气道组织具有一定的损伤效应,进而引起气道高反应性,导致哮喘的发生发展。研究表明,PIR-B 能够促进 Eos 细胞的成熟、趋化和活化,然后分泌大量的化学介质产生细胞毒性,对哮喘的发生发展起到重要的作用^[16]。PIR-B mAb 是 PIR-B 抑制剂,能抑制 PIR-B 的表达和细胞的分化^[17]。本研究表明,PIR-B mAb 不仅能抑制哮喘小鼠 Eotaxin、CCR3 表达,还能减轻哮喘小鼠肺部组织 Eos 的浸润和募集,可能对小鼠哮喘的病理生理过程起到抑制作用。

综上所述,PIR-B mAb 能够抑制哮喘小鼠 Eotaxin、CCR3 表达水平,降低 CD34⁺ 祖细胞分化和 Eos 募集,减轻哮喘小鼠肺部组织 Eos 的浸润。

参考文献

- [1] 李丽,娄春艳,李敏,等. 孟鲁司特钠对哮喘小鼠气道重塑及 Th17/CD4⁺ CD25⁺ Treg 表达的影响[J]. 中国当代儿科杂志,2016,18(11):1174-1180.
- [2] 周丽芬,林启旺,廖莉,等. 外源性 H₂S 干预对 O₃ 致哮喘小鼠气道反应性和气道重塑的影响[J]. 中国病理生理杂志,2016,32(2):347-351.
- [3] MURAD H A, HABIB H S, RAFEEQ M M, et al. Co-inhalation of roflumilast, rather than formoterol, with fluticasone more effectively improves asthma in asthmatic mice[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2017, 242(5):516-526.
- [4] MA S Q, WEI H L, ZHANG X. TLR2 regulates allergic airway inflammation through NF- κ B and MAPK signaling pathways in asthmatic mice[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(10):3138.
- [5] YANG X, LV J N, LI H, et al. Curcumin reduces lung inflammation via Wnt/beta-catenin signaling in mouse model of asthma[J]. *J Asthma*, 2017, 54(4):335-340.
- [6] 沈启英,方磊,吴惠梅,等. Toll 样受体 2 在七氟醚抑制哮喘小鼠气道炎症中的作用[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(002):138-141.
- [7] 刘雨东. 栀子苷减轻幼年哮喘小鼠气道炎症反应并下调 TLR4/NF- κ B 活性[J]. 基础医学与临床, 2016, 36(10):1417-1421.
- [8] EL-DESOUKI N I, TABL G A, ELKHODARY Y A. Biological studies on the effect of estrogen on experimentally induced asthma in mice[J]. *Toxicol Ind Health*, 2016, 32(1):30-38.
- [9] CHENG Z, WANG X, DAI L, et al. Suppression of microRNA-384 enhances autophagy of airway smooth muscle cells in asthmatic mouse[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(40):67933-67941.
- [10] 柯莉芹,王凤美,罗运春. 血管活性肠肽对哮喘小鼠气道炎症及 Th17/Treg 平衡的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2017, 19(6):699-704.
- [11] 钟薇,吴聪. 二甲双胍对哮喘小鼠的气道炎症的影响[J]. 广西医科大学学报, 2016, 33(4):588-591.
- [12] QIAO J Y, LI S, ZHANG Y L, et al. HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway and role of vitamin D in asthmatic mice[J]. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*, 2017, 19(1):95-103.
- [13] ZHAKEER Z, HADEER M, TUERXUN Z, et al. Bufalin inhibits the inflammatory effects in asthmatic mice through the suppression of nuclear factor-kappa B activity[J]. *Pharmacology*, 2017, 99(3/4):179-187.
- [14] 张吴越,顾永春,汤颖,等. 甘草酸对支气管哮喘小鼠 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路的影响[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(16):1273-1278.
- [15] KARANI L W, TOLO F M, KARANJA S M, et al. Safety and efficacy of prunus africana and warburgia ugandensis against induced asthma in BALB/c mice[J]. *European J Med Plants*, 2017, 3(3):345-368.
- [16] 胡美,许欣婷,李红梅,等. NOTCH 信号通路调控哮喘小鼠气道上皮纤维化[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(5):781-786.
- [17] 雷媛,旷寿金,廖彩时. 细菌溶解产物及全反式维甲酸对哮喘小鼠气道炎症的影响[J]. 中国现代儿科学杂志, 2018, 20(6):514-518.