

· 论 著 ·

神经生长因子介导神经源性气道炎症机制探讨*

余巍巍¹, 曾锦荣¹, 王昌明¹, 蔡双启²

(1. 桂林医学院附属医院呼吸内科, 广西 541001; 2. 广西医科大学附属医院呼吸内科, 南宁 531001)

摘要:目的 研究神经生长因子(NGF)介导哮喘大鼠神经源性气道炎症肿瘤坏死因子 α (TNF- α) mRNA 的表达机制, 探讨防治哮喘的新方法。方法 采用放射免疫分析方法检测卵清蛋白致敏哮喘大鼠下呼吸道肺组织 NGF、TNF- α 的表达及抗 NGF 干预对其表达的影响。结果 (1)哮喘组大鼠肺组织 NGF 蛋白、NGF mRNA 的平均灰度值分别为 145 ± 7 、 128 ± 7 ; 对照组分别为 189 ± 7 、 191 ± 6 ; 抗 NGF 干预组分别为 156 ± 6 、 139 ± 8 ; 3 组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$); (2)哮喘组大鼠 TNF- α 蛋白及 TNF- α mRNA 的灰度值分别为 141 ± 7 、 127 ± 7 ; 对照组分别为 175 ± 8 、 179 ± 9 ; 抗 NGF 干预组分别为 164 ± 8 、 155 ± 6 ; 3 组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论 NGF 促进合成和释放 TNF- α 可能是 NGF 参与哮喘气道神经源性炎症反应的机制之一, 抗 NGF 干预能够有效地将其抑制。

关键词:哮喘; 神经生长因子; TNF- α mRNA 表达; 气道炎症

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.02.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)02-0108-03

Experimental study on the mechanisms of regulating airway neurogenic inflammation in asthma by nerve growth factor*

She Weiwei¹, Zeng Jinrong¹, Wang Changming¹, Cai Shuangqi²

(1. Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guangxi 541001, China; 2. Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 531001, China)

Abstract: Objective To study the mechanisms of regulating airway neurogenic inflammation in asthma by nerve growth factor (NGF) on TNF- α mRNA expression, and to explore new ideas for prevention and treatment of asthma. **Methods** The asthma models were established by sensitization and challenge with ovalbumin, and the asthma model was treated with anti-NGF. The expression of NGF and TNF- α in lung tissue of each rat was detected by immunohistochemistry and hybridisation in situ. **Results** (1) The gray-levels of NGF protein /NGF mRNA, in the lungs were 145 ± 7 , 128 ± 7 for the asthmatic group respectively; 189 ± 7 , 191 ± 6 for the normal control group respectively, and 156 ± 6 , 139 ± 8 for the asthmatic group with anti-NGF treatment. There were significant differences in gray-level of NGF protein /NGF mRNA among those three groups ($P < 0.01$). (2) The gray-levels of TNF- α protein /TNF- α mRNA, in the lungs were 141 ± 7 , 127 ± 7 for the asthmatic group respectively; 175 ± 8 , 179 ± 9 for the normal control group respectively, and 164 ± 8 , 155 ± 6 for the asthmatic group with anti-NGF treatment. There were also significant differences in gray-level of TNF- α protein / TNF- α mRNA among those three groups ($P < 0.01$). **Conclusion** In this experimental, enhancing the synthesis and release of TNF- α may be one of the mechanisms by which NGF regulate airway neurogenic inflammation in asthmatic rats, and this mechanism can be depressed by the intervention of anti-NGF.

Key words: asthma; nerve growth factor; TNF- α mRNA expression; airway inflammation

支气管哮喘与细胞信号传导的研究一直备受国内外学者的普遍关注, 有必要从基因水平研究神经生长因子(NGF)调控免疫细胞因子表达的机制。NGF 不仅是神经系统营养因子^[1], 由于其能够高效地调控炎症细胞因子的作用而受到国内外学者的关注。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)是一种具有广泛生物学活性的前炎症细胞因子, TNF- α 能诱导血管内皮细胞表达黏附分子, 促进炎症细胞的浸润与活化, 刺激血小板活化因子、白三烯等炎症介质的合成, 从而导致气道高反应性。本研究拟通过建立大鼠哮喘模型来研究 NGF 与 TNF- α 的关系及各自在哮喘气道炎症中的作用, 并探讨其可能的机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 8 周龄清洁级雌性 SD 大鼠 30 只, 按随机数字表法将大鼠随机分为正常对照组(A 组)、哮喘组(B 组)、NGF 干预组(C 组), 每组 10 只。

1.2 哮喘模型的建立及抗 NGF 干预 A 组: 致敏过程以磷酸

盐缓冲液(PBS)代替卵清蛋白(OVA)注射, 激发过程以盐水雾化吸入, 相关参数与 B 组相同; B 组哮喘模型的构建方法于实验第 1 天、第 14 天致敏, 即 OVA 20 μ g 由 1 mg 氢氧化铝乳化后, 腹腔注射 200 μ L。第 21~27 天, 将大鼠置于密闭容器内, 以超声雾化器雾化 3% OVA 盐水气溶胶并对其进行吸入激发, 每天 1 次, 每次 30 min。C 组哮喘模型建立同 B 组, 但于每次激发前 3 h, 先经鼻滴入抗大鼠 β -NGF 抗体(稀释 1:50) 50 μ L, 每日 1 次, 连续 7 d。各组大鼠均于末次激发后 24 h 处死, 取组织标本进行相关检测。并通过肺功能检测、HE 染色观察肺组织病理变化、BALF 炎症细胞计数等多方面来证实模型的成功建立。

1.3 肺组织病理标本制作^[2] 灌洗后经气管向右肺注入 4% 多聚甲醛使胸膜展平后, 置 4% 多聚甲醛中固定, 常规石蜡包埋, 切片, 厚度约 5 μ m, HE 染色, 显微镜下观察支气管、肺组织病理特征。

* 基金项目: 广西卫生厅科学基金资助项目(Z2009353)。

1.4 免疫组织化学 石蜡切片经常规处理后,滴加正常山羊血清室温封闭 20 min,然后按亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(ABC)法进行免疫组织化学反应。阴性对照组用 PBS 代替上述抗体。

1.5 原位分子杂交 石蜡切片经常规处理后,按经典方法进行原位分子杂交。阴性对照用 PBS 代替上述抗体。用原位分子杂交比较 3 组 TNF- α 水平,RT-PCR 半定量法测定大鼠肺组织 NGF mRNA 表达,Western-blot 法检测 3 组 NGF 蛋白水平变化。

1.6 结果判定 观察 NGF、TNF- α 及 NGF mRNA、TNF- α mRNA 在肺组织的表达,并用显微图像分析系统测定 8 个视野的阳性系数和灰度值。阳性系数的计算参照文献[1]的方法。NGF、TNF- α 及其 NGF mRNA、TNF- α mRNA 阳性细胞均以胞质着色为主,阳性颗粒呈棕褐色或棕黄色。

1.7 统计学处理 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.5 统计软件进行分析,计量资料采用单因素方差分析,两样本的多重比较采用 LSD- t 检验;等级资料采用秩转换的非参数检验(Kruskal-Wallis)法,多个独立样本的两两比较采用 Mann-Whitney U 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NGF 蛋白及 NGF mRNA 的表达 B 组大鼠肺组织及其周围可见大量的 NGF 蛋白及 NGF mRNA 阳性细胞,而 C 组则明显减少,A 组大鼠仅见少量阳性细胞,见封 2 图 1。B 组大鼠肺组织 NGF 蛋白、NGF mRNA 的平均灰度值(待测物质灰度值越高,表明其在细胞中表达的量越低,反之,灰度值越低表明其在细胞中表达的量越高)分别为 145 ± 7 、 128 ± 7 ;A 组分别为 189 ± 7 、 191 ± 6 ;C 组分别为 156 ± 6 、 139 ± 8 ,3 组比较差异有统计学意义($t = 19.50, P < 0.01$; $t = 15.90, P < 0.01$; $t = 14.89, P < 0.01$);各组大鼠肺组织 NGF 蛋白平均阳性系数 B 组大于 A 组,且 C 组小于 B 组,3 组比较差异有统计学意义($t = 1.29, P < 0.01$; $t = 3.85, P < 0.01$; $t = 2.19, P < 0.01$);其 NGF mRNA 平均阳性系数为 B 组小于 A 组,且 C 组大于 B 组,3 组比较差异有统计学意义($t = 1.24, P < 0.01$; $t = 3.65, P < 0.01$; $t = 2.14, P < 0.01$),见封 2 图 2。其阳性产物平均灰度值,见表 1。

表 1 各组大鼠肺组织 NGF 蛋白及 NGF mRNA 平均阳性系数(平均秩)及平均灰度值比较

组别	n	NGF 蛋白		NGF mRNA	
		阳性系数	灰度值($\bar{x} \pm s$)	阳性系数	灰度值($\bar{x} \pm s$)
A 组	10	1.29*	$189 \pm 7^*$	1.24*	$191 \pm 6^*$
B 组	10	3.85	145 ± 7	3.65	128 ± 7
C 组	10	2.19*	$156 \pm 6^*$	2.14*	$139 \pm 8^*$
Hc	—	31.32	$103.25^\#$	29.71	$257.36^\#$
P	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

*: $P < 0.01$,与 B 组比; #: F 值; —: 表示无此项。

2.2 TNF- α 蛋白及 TNF- α mRNA 的表达 B 组大鼠 TNF- α 蛋白及 TNF- α mRNA 的灰度值分别为 141 ± 7 、 127 ± 7 ;A 组分别为 175 ± 8 、 179 ± 9 ;C 组分别为 164 ± 8 、 155 ± 6 ;3 组比较差异有统计学意义($t = 28.40, P < 0.01$; $t = 22.22, P < 0.01$)。各组大鼠肺组织中 TNF- α 蛋白平均阳性系数为 B 组大于 A 组,且 C 组小于 B 组,3 组比较差异有统计学意义($t = 1.61, P$

< 0.01 ; $t = 3.80, P < 0.01$; $t = 2.35, P < 0.01$);其 TNF- α mRNA 平均灰度值为 B 组大于 A 组,且 C 组小于 B 组,3 组比较差异有统计学意义($t = 1.47, P < 0.01$; $t = 3.81, P < 0.01$; $t = 2.19, P < 0.01$),见表 2。B、C 组血清 TNF- α 水平明显高于 A 组($P < 0.05$);C 组血清 TNF- α 水平低于 B 组($P < 0.05$)。见封 2 图 3。

表 2 各组大鼠肺组织 TNF- α 蛋白及 TNF- α mRNA 平均阳性系数(平均秩)及平均灰度值比较

组别	n	TNF- α 蛋白		TNF- α mRNA	
		阳性系数	灰度值($\bar{x} \pm s$)	阳性系数	灰度值($\bar{x} \pm s$)
A 组	10	1.61*	$175 \pm 8^*$	1.47*	$179 \pm 9^*$
B 组	10	3.80	141 ± 7	3.81	127 ± 7
C 组	10	2.35*	$164 \pm 8^*$	2.19*	$155 \pm 6^*$
Hc	—	30.32	$121.53^\#$	31.14	$231.55^\#$
P	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

*: $P < 0.01$,与 B 组比; #: F 值; —: 表示无此项。

3 讨 论

支气管哮喘是一种气道炎症性疾病,其炎症发生与调控气道的神经系统之间存在复杂的相互作用。气道神经激活和气道上皮的相互作用在其中起着重要作用^[3]。已有研究表明,支配气道的感觉神经及其相关营养因子可能与气道炎症的形成密切相关,并提出了气道神经源性炎症学说^[4-5]。众多的实验证明哮喘状态下 NGF 及其受体表达升高^[6-7],在哮喘患者血清和支气管肺泡灌洗液中 NGF 的水平明显升高^[8],同时,国内外有许多资料均已证实 TNF- α 对气道炎症具有促进作用^[9-10]。哮喘组大鼠血清、TNF- α 浓度较正常对照组增高,通过趋化激活中性粒细胞等炎性细胞共同参与气道炎症的形成,在气道炎症的持续和放大中起到重要作用,说明其在气道炎症发病中具有重要意义。在炎症情况下,TNF- α 和 NGF 相互之间有何影响?正是本实验要探讨的症结所在。本实验测定了哮喘大鼠肺组织 TNF- α mRNA 的表达,并观察了拮抗 NGF 作用后哮喘大鼠 TNF- α 表达的变化。发现哮喘大鼠肺组织 TNF- α mRNA 的表达及血清 TNF- α 水平均较正常对照组增高,而应用了抗 NGF 抗体拮抗了 NGF 作用后 TNF- α 表达水平下降。由此,可判断哮喘大鼠炎症发作可能是由于肺组织 TNF- α mRNA 表达增加,TNF- α 生成增多所致。阻断内源性 NGF 可降低哮喘大鼠肺组织 TNF- α mRNA 的表达,提示 NGF 可能通过调节 TNF- α 的表达参与哮喘发病。NGF 可能通过增进肺组织 TNF- α mRNA 的表达作为参与哮喘的发病机制之一。本实验结果显示,与正常大鼠比较,哮喘大鼠肺组织(主要为免疫炎性细胞和气道结构细胞)中 NGF 蛋白及 NGF mRNA 表达显著增加,说明哮喘状态下 NGF 增高主要是由于支气管、肺组织细胞合成增加所致,同时还发现,拮抗 NGF 生物活性则能够有效抑制 TNF- α 的合成和分泌。从本研究结果可推测,哮喘气道神经源性炎症发病机制中可能存在一个循环作用链:气道上皮、支气管、肺组织炎性细胞(嗜酸性粒细胞等)合成 NGF 增加,合成的 NGF 刺激细胞合成 TNF- α 增多,TNF- α 再作用于气道效应细胞(上皮细胞、平滑肌细胞等)而触发气道神经源性炎性反应,反过来,炎性反应又可以显著上调肺组织 NGF 的表达,从而形成恶性循环,拮抗 NGF 生物活性则能够有效抑制 TNF- α 的合成和分泌,达到减轻哮喘气道高反应等病理生理

改变的目的。在国外研究中, Silvestri 等^[11]报道哮喘发作期患者 TNF- α 水平明显高于缓解期及对照组患者, 而且哮喘病情越严重, 持续时间越长, 血清 TNF- α 浓度越高; 反之, 病情越轻, 持续时间越短, 血清 TNF- α 浓度越低。Bonini 等^[12]在其研究中发现, 哮喘患者血清 NGF 水平增高, 且过敏性哮喘患者血清 NGF 水平比非过敏性哮喘患者高。对过敏性哮喘小鼠进行抗 NGF 处理, 可明显减轻哮喘引起的气道高反应性。

综上所述, NGF 可以通过调节合成和分泌 TNF- α 表达参与哮喘神经源性炎症反应而在哮喘气道炎症中发挥作用; 同时抗 NGF 干预可下调 TNF- α mRNA 表达和蛋白分泌水平, 减轻哮喘气道炎症, 参与哮喘的整个病理生理过程, 从而有利于对于哮喘气道炎症的控制, 因而能为哮喘防治提供新的思路。

参考文献:

- [1] 曹霞, 何素蓉, 刘艳. 神经生长因子治疗新生儿缺氧缺血性脑病的临床疗效观察[J]. 重庆医学, 2008, 37(20): 2323-2324.
- [2] Feltis BN, Wignarajah D, Reid DW, et al. Effects of inhaled fluticasone on angiogenesis and vascular endothelial growth factor in asthma[J]. Thorax, 2007, 62(4): 314-319.
- [3] 刘春丽, 赖克方, 钟南山. 气道神经源性炎症与慢性咳嗽的发病机制[J]. 国外医学呼吸系统分册, 2004, 24(4): 237-242.
- [4] Barnes PJ. Non-adrenergic non-cholinergic neurol control of human airways[J]. Arch Int Pharmacodynother, 1986, 280 Suppl 2: 208-228.
- [5] Casale TB. Neuropeptides and the lung[J]. J Allergy Clin

Immunol, 1991, 88(1): 1-14.

- [6] Lindsay RM, Harmar AJ. Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons[J]. Nature, 1989, 337(6205): 362-364.
- [7] Alam R. Chemokines in allergic inflammation[J]. J Allergy Clin Immunol, 1997, 99(3): 273-277.
- [8] Griffmhs CEM, Voothees JJ, Nickoloff BJ. Characterization of intercellular adhesion molecular-1 and HLA-DR expression in normal and inflamed skin: modulation recombinant interferon and tumor necrosis factor[J]. J Am Acad Dermatol, 1989, 20(4): 617-629.
- [9] Ulich TR, Howard SC, Remick DG, et al. Intratracheal administration of endotoxin and cytokines. VI. Antisetum to CINC inhibits acute inflammation[J]. Am J Physiol, 1995, 268(2 Pt 1): L245-250.
- [10] 刘晓湘, 曹德寿, 闫军浩, 等. NGF 对哮喘豚鼠下呼吸道及内脏感觉传入部位 TNF- α mRNA 表达的上调作用[J]. 解剖学报, 2004, 35(3): 225-229.
- [11] Silvestri M, Bontempelli M, Giacomelli M, et al. High serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-8 in severe asthma: markers of systemic inflammation[J]. Clin Exp Allergy, 2006, 36(11): 1373-1381.
- [12] Bonini S, Lambiase A, Angelucci F, et al. Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(20): 10955-10960.

(收稿日期: 2010-08-25 修回日期: 2010-10-25)

(上接第 107 页)

- [3] Toyofuku T, Yubuki M, Etotsu K, et al. Intercellular calcium signaling via gap junction in connexin43 transfected cells[J]. J Biol Chem 1998, 273(3): 1519-1528.
- [4] Jacques AH, Pascal N, Paolo M. Contribution of connexins to the function of the vascular wall[J]. Cardiovas Res, 2004, 62(2): 345-356.
- [5] 明佳, 李涛, 杨光明, 等. Cx40、43 调节缺氧处理大鼠肠系膜上动脉收缩反应性的信号途径[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(7): 1262-1265.
- [6] Ming J, Li T, Zhang Y, et al. Regulatory effects of MEGJ on vascular reactivity following hemorrhagic shock in rats[J]. Shock, 2009, 31: 80-86.
- [7] Rosario J, Emile A, Juan D, et al. Involvement of thromboxane A2 in the endothelium-dependent contractions induced by myricetin in rat isolated aorta[J]. Br J Pharmacol, 1999, 127(7): 1539-1544.
- [8] 明佳, 刘良明, 李涛, 等. 肌-内皮缝隙连接对失血性休克大鼠血管收缩反应的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2006, 18(9): 519-522.

- [9] 明佳, 刘良明, 李涛, 等. 肌-内皮缝隙连接对失血性休克大鼠血管舒张反应的影响[J]. 创伤外科杂志, 2006, 8(2): 120-123.
- [10] Knapp J, Boknik P, Linck B, et al. Cantharidin enhances norepinephrine-induced vasoconstriction in an endothelium-dependent fashion[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 294(2): 620-626.
- [11] Xu J, Liu LM. The role of calcium desensitization in vascular hyporeactivity and its regulation following hemorrhagic shock in the rat[J]. Shock, 2005, 23(6): 576-581.
- [12] Liu LM, Ward JA, Dubick MA. Hemorrhagic shock induced vascular hyporeactivity to norepinephrine in select vasculatures of rats and the roles of nitric oxide and endothelin[J]. Shock, 2003, 19(3): 208-214.
- [13] Fukata Y, Aman M, Kaibuchi K. Rho/Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cell[J]. Pharmacol Sci, 2001, 22(1): 33-39.

(收稿日期: 2010-06-18 修回日期: 2010-09-09)