

· 论 著 ·

## 地塞米松对子宫珠蛋白相关蛋白 1 在哮喘小鼠的表达及影响的研究

罗 伟,王荣丽,李国平,邓述凯,杨小琼  
(泸州医学院呼吸内科,四川 646000)

**摘要:**目的 观察子宫珠蛋白相关蛋白 1(UGRP-1)基因在小鼠肺组织的表达及地塞米松对其的影响。方法 将 36 只小鼠随机分为哮喘模型组、地塞米松干预组、空白对照组。用实时荧光定量 PCR 法分别检测小鼠末次激发后 6 h 和 24 h 肺组织 UGRP-1 mRNA 的量;用  $\Delta\Delta Ct$  法计算其相对值,作为标本的 UGRP1 基因在 mRNA 水平上的相对表达量,并用酶联免疫吸附法(ELISA)测肺泡灌洗液(BALF)中 UGRP1 水平。结果 在末次激发后 6 h 处死的哮喘模型组及地塞米松干预组间 UGRP-1 mRNA 量比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),但均显著低于空白对照组( $P<0.05$ );在 24 h 处死的哮喘模型组、地塞米松干预组和空白对照组间肺组织 UGRP-1 mRNA 含量两两间比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ),空白对照组表达最高,哮喘模型组最低。6 h 处死的小鼠 BALF 中 UGRP-1 的量:地塞米松干预组和哮喘模型组差异无统计学意义( $P>0.05$ ),空白对照组含量最高;24 h 处死的小鼠地塞米松干预组 UGRP-1 量较 6 h 批有明显升高( $P<0.05$ ),与空白对照组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),哮喘模型组含量最低( $P<0.05$ )。结论 哮喘小鼠肺组织 UGRP-1 及其基因表达在 6 h 和 24 h 均较空白对照组明显降低;地塞米松能促进 UGRP-1 基因的表达,并能维持其蛋白的稳定。

**关键词:**哮喘;地塞米松;子宫珠蛋白相关蛋白 1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.12.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)12-1153-03

## Expression of uteroglobin related protein 1 and the effect of dexamethasone in asthma mouse

Luo Wei, Wang Rongli, Li Guoping, Deng Shukai, Yang Xiaoqiong

(Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

**Abstract:** **Objective** To detect the expression of uteroglobin related protein 1(UGRP-1) and the effect of dexamethasone(DM) on UGRP1. **Methods** Divided mouse into three groups randomly, asthma group, sensitized control group, dexamethasone interfered group; real-time PCR assay was applied to test the CT quantity of the gene of UGRP-1, at the time 6h and 24h after the last provocation. The relative magnitude was calculated by the mean of  $\Delta\Delta Ct$ . Compared the relative magnitude among the sensitized control group, allergic asthma group and DM interfered group. The level of UGRP-1 in BALF of each group was assayed by ELISA. **Results** There was no obvious difference on the quantity of the UGRP-1 mRNA between asthma mouse and DM interfered mouse( $P>0.05$ ), both of that were much lower than the control mice( $P<0.05$ ) at 6h; At 24h the quantity of UGRP-1 mRNA asthma mouse was much lower than other two groups. At 6h the quantity of UGRP-1 in sensitized control group was the highest among all three groups and at 24h the asthma group was the lowest. In DM interfered group the quantity of UGRP-1 at 24h was much higher than that at 6h( $P<0.05$ ) and the asthma group was the lowest. **Conclusion** The expression of UGRP-1 in asthma group was lower than the sensitized control group obviously( $P<0.05$ ) at 6h and 24h, DM can promote the expression of UGRP-1 gene and maintain its stability.

**Key words:** asthma; dexamethasone; uteroglobin related protein 1

子宫珠蛋白相关蛋白 1(uteroglobin-related protein, UGRP-1)为子宫珠蛋白/clara 细胞分泌蛋白(UG/CCSP)超家族成员。人类 UGRP-1 基因定位于 5q32,主要分布于肺组织,甲状腺有少量表达,为一同型二聚体蛋白,含 91 个氨基酸残基。研究表明 UGRP-1 在肺部表达可抑制变态炎症反应<sup>[1-2]</sup>;最近发现 UGRP-1 为一肺生长因子,在肺发育全过程均发挥作用<sup>[3]</sup>。哮喘小鼠中 UGRP-1 与 IL-4、IL-5、IL-9、IL-13 等 TH<sub>2</sub> 细胞因子呈负相关,但 UGRP-1 基因的表达在哮喘小鼠肺组织连续时间段的变化规律,国外文献报道有矛盾。有学者报道哮喘小鼠的 UGRP-1 基因表达在 6 h 和 24 h 均明显低于空白对照组( $P<0.05$ ),但随后实验又得到相反结论,即在 24 h 后与空白组差异无统计学意义( $P>0.05$ )<sup>[4-6]</sup>;地塞米松对气道变态炎症反应有确切作用,但对 UGRP-1 表达的影响还未见报道。本实验通过检测小鼠哮喘组、空白对照组、地塞米松干预组在末次激发后 6 h 和 24 h 肺组织 UGRP-1 mRNA 及

BALF 中 UGRP-1 的含量,了解它们之间相互关系,为哮喘的发生寻找新的理论依据,为哮喘治疗探索新的途径。

**1 材料与方法**

**1.1 试剂** 天根 RNAsimple Total RNA Kit 总 RNA 提取试剂盒、日本 Toyobo Rever Tra Ace- $\alpha$ -TM 逆转录试剂盒、天根 Real Master Mix(SYBR Green)荧光定量试剂盒、美国 Rd 公司小鼠 UGRP-1 ELISA 试剂盒。

**1.2 实验动物** BALB/c 小鼠(购于华西实验动物中心)鼠龄 6 周,雌性,体质量 18 g 左右,无特定病原体(SPF)级。

**1.3 动物模型实验分组** 36 只 BALB/c 小鼠随机分为 3 组,(1)哮喘模型组:小鼠在第 1 天和第 8 天腹部注射抗原混悬液(鸡卵清蛋白 OVA 50  $\mu$ g,氢氧化铝 2 mg,生理盐水 0.2 mL)致敏,第 14 天开始乙醚麻醉后滴鼻激发,每只小鼠每次滴入 100  $\mu$ L OVA 溶液(含 20  $\mu$ g OVA)连续 7 d。(2)地塞米松干预组:致敏同哮喘模型组,在激发前 30 min 腹部注射地塞米松

表 1 UGRP-1 基因扩增的  $\Delta\Delta Ct$  值及 BALF 中 UGRP-1 含量( $\bar{x}\pm s$ )

组别	小鼠(只)	$\Delta\Delta Ct$ (相对值)		UGRP-1( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	
		6 h	24 h	6 h	24 h
空白对照组	6	1.000 $\pm$ 0.000	1.000 $\pm$ 0.000 <sup>c</sup>	0.800 $\pm$ 0.210	0.794 $\pm$ 0.195 <sup>c</sup>
哮喘模型组	6	0.379 $\pm$ 0.216 <sup>a</sup>	0.107 $\pm$ 0.138 <sup>abc</sup>	0.360 $\pm$ 0.135 <sup>a</sup>	0.232 $\pm$ 0.118 <sup>ac</sup>
地塞米松干预组	6	0.554 $\pm$ 0.189 <sup>a</sup>	0.402 $\pm$ 0.123 <sup>ac</sup>	0.358 $\pm$ 0.129 <sup>a</sup>	0.747 $\pm$ 0.239 <sup>b</sup>
F		22.418	108.464	14.754	16.018
P		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与空白对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 6 h 组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 两两间比较; “—”表示无此项。

溶液 0.2 mL (3 mg/kg)。(3)空白对照组:致敏同哮喘模型组,麻醉后滴鼻 100  $\mu\text{L}$  生理盐水。

**1.4 肺泡灌洗液获取** 每组取 6 只小鼠于末次激发后 6 h 挖眼取血后断颈处死,气管插管取肺泡灌洗液,每次取 0.5 mL PBS 缓慢推入,每只小鼠取 BALF 1.5 mL 左右,低温 4  $^{\circ}\text{C}$  1500 r/min,离心 5 min,上清液吸入另一 EP 管,记录体积并迅速冻于 -80  $^{\circ}\text{C}$  保存。每组余下小鼠于激发后 24 h 依前法处理。

**1.5 肺 UGRP-1 mRNA 的表达** (1)肺组织总 RNA 的提取:按 RNAsimple TOTAL RNA KIT 总 RNA 提取试剂盒说明进行提取,最后得到 100  $\mu\text{L}$  总 RNA 溶液,紫外分光光度计测 RNA 含量及纯度。(2)RNA 的逆转录:cDNA 反应体系共 20  $\mu\text{L}$ ,Oligo(dT)20 1  $\mu\text{L}$ ,TotalRNA 2  $\mu\text{L}$ ,5RT BUFFER 4  $\mu\text{L}$ ,dNTPmixture 2  $\mu\text{L}$ ,RNase inhibitor 1  $\mu\text{L}$ ,Revertra Ace 1  $\mu\text{L}$ ,RNase H<sub>2</sub>O 9  $\mu\text{L}$ ,反应条件:30  $^{\circ}\text{C}$  10 min、42  $^{\circ}\text{C}$  20 min、99  $^{\circ}\text{C}$  5 min、4  $^{\circ}\text{C}$  5 min。(3)实时荧光定量 PCR(ABI7500 荧光定量 PCR 仪):UGRP-1 上游引物 5-CCC TCA TTT GTA CCC TTg-3,下游引物 5-ATG GGA GGT TGT TCA CGT AG-3;内参照  $\beta$ -actin 上游引物 5-ACC TCT ATG CCA ACA CAG-3,下游引物 5-GGA CTC ATC GTA CTC CTG CT-3。每一份 cDNA 标本分 2 管进行扩增(目的基因 UGRP-1 和内参照基因  $\beta$ -actin),设置空白对照并进行稳定性及重复性实验。毛细管中加入下列反应体系:2.5 + RealMasterMix/20 + SYBR solution 12.5  $\mu\text{L}$ ,cDNA 2.5  $\mu\text{L}$ ,上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ ,RNase H<sub>2</sub>O 8  $\mu\text{L}$ ,反应条件:94  $^{\circ}\text{C}$  1 min、95  $^{\circ}\text{C}$  15 s、57.1  $^{\circ}\text{C}$  15 s、71  $^{\circ}\text{C}$  45 s、熔链温度 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s,40 个循环。取空白对照组 K<sub>2</sub> cDNA 依次稀释 10 倍至 10 000 倍,以此绘制标准曲线,计算各标本 UGRP-1 和  $\beta$ -actin 基因扩增的 CT 值,用  $\Delta\Delta Ct$  法计算各基因表达的相对值。

**1.6 肺泡灌洗液 UGRP-1 测定** 用酶联免疫吸附法(ELISA)测定其含量。

**1.7 统计学处理** 用 SPSS13.0 软件统计处理数据,同时间段不同组间行单因素方差分析和同模型组不同时间段行 2 个随机样本的 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 24 h 处死的不同组别肺组织病理切片** 哮喘模型组小鼠可见小气管及小血管周围有大量炎细胞浸润,肺泡腔可见嗜酸性粒细胞,个别可见肺泡间隔破坏,红细胞漏出;地塞米松干预组肺组织有少量炎细胞浸润及少量炎性渗出物,有较明显炎症吸收情况;空白对照组小血管、小气管周围无炎细胞浸润,肺泡腔及肺间隔无渗出物。

**2.2 各组小鼠肺组织中 UGRP-1 mRNA 的含量** 在 6 h 时间段小鼠哮喘模型组及地塞米松干预组间 UGRP-1 mRNA 量比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但均显著低于空白对照组( $P < 0.05$ );在 24 h 时间段哮喘模型组、地塞米松干预组和空白对照组小鼠间肺组织 UGRP-1 mRNA 含量两两间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),空白对照组含量最高,哮喘模型组最低;在同模型组不同时间段中,哮喘模型组在 24 h 的 UGRP-1 mRNA 含量显著低于 6 h 组( $P < 0.05$ ),地塞米松干预组及空白对照组两个时间段比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1。

**2.3 肺泡灌洗液(BALF)中 UGRP-1 含量** 在 6 h 时间段地塞米松干预组和哮喘模型组间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但均显著低于空白对照组( $P < 0.05$ );在 24 h 时间段地塞米松干预组含量与空白对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),哮喘模型组含量明显低于另两组( $P < 0.05$ )。在同模型组不同时间段中,地塞米松干预组 24 h UGRP-1 量较 6 h 组有明显提高( $P < 0.05$ );哮喘模型组表达降低,空白对照组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1。

## 3 讨 论

支气管哮喘是气道慢性炎性疾病,其发病机制涉及多种炎性细胞、气道结构细胞、多种细胞因子与炎性因子之间复杂的相互作用。UGRP-1 作为一主要表达于肺组织的细胞因子为近年来研究热点。人类 UGRP-1 基因定位于 5q32,此区域已被证明含哮喘易感位点并且编码多种 TH2 细胞因子,如 IL-5、IL-9、IL-13 以及 TNF、IFN 等,同时也包含皮质醇抵抗、难治性巨细胞贫血和 5q 综合征等疾病的易感位点。UGRP-1 与 UG/CCSP 有明显的氨基酸相似序列,而 UG/CCSP 被证明有抗炎、调节免疫、抗肿瘤等作用<sup>[7-10]</sup>。有学者通过腺病毒重组体(AD-UGRP-1)转染小鼠的方法,发现哮喘小鼠气道炎症有明显吸收,嗜酸性粒细胞聚集受抑制,直接证明 UGRP-1 有抑制气道变态反应作用<sup>[11-12]</sup>。

实验结果表明哮喘模型组小鼠在连续时间段(6、24 h)其肺组织表达的 UGRP-1 及 mRNA 比空白对照组明显降低,随着时间推移其 UGRP-1 及 mRNA 含量愈发减少,并未出现 Chiba 等<sup>[4]</sup>报道的 24 h 后 UGRP-1 含量接近正常的现象。Chiba 等<sup>[4]</sup>得出的结论理论上与其后续实验 UGRP-1 抑制肺部变态炎症反应相矛盾;因为若 24 h 后哮喘组 UGRP-1 含量与对照组无差异,那就不能说明 UGRP-1 的抗炎作用,而这一结论恰是 Chiba 等<sup>[4]</sup>实验证实了的。地塞米松干预组 2 个时间段的 UGRP-1 mRNA 变化不明显,但对比哮喘组在 24 h UGRP-1 mRNA 含量较 6 h 组明显降低现象,说明地塞米松有

维持其 mRNA 在胞液中稳定,抑制其降解的作用。有趣的是地塞米松干预组 24 h 批 BALF 中 UGRP-1 含量较 6 h 组有明显升高,但其 mRNA 含量并无明显升高,说明地塞米松能促进 UGRP-1 翻译、维持 UGRP-1 稳定并抑制其降解,从而提高 UGRP-1 含量,提示类固醇类激素除已知的胞核内促进基因转录的作用外,还能在胞浆中促进基因的翻译。

从目前研究来看 UGRP-1 似乎有抑制整个 Th2 细胞因子分泌的作用,而 Th1/Th2 比例失衡恰是哮喘发生的关键。UGRP-1 与 Th2 细胞因子相似的基因定位及其独特的抗炎作用,提示了一条前者从基因水平干预后者分泌的途径。地塞米松除有已知的直接抑制炎症细胞聚集、抑制其分泌炎症介质如 IL-4、15<sup>[13]</sup>,促进炎症细胞(嗜酸性粒细胞)凋亡作用外,还可促进 UGRP-1 基因的表达并维持其 mRNA 及蛋白的稳定而发挥抑制气道变态反应炎症作用。目前已证明 UGRP-1 为一抗炎因子,巨嗜细胞清除受体(MACRO)为该蛋白受体<sup>[14-15]</sup>,但其通过何种胞内信号转导途径发挥抗炎作用,地塞米松通过胞内受体结合于 UGRP-1 基因何位点促进其转录,如何维持胞浆中 mRNA 及蛋白的稳定,仍需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Niimi T, Munakata M, Keck-Waggoner CL, et al. UGRP1, a uteroglobin/Clara cell secretory protein-related protein, is a novel lung-enriched downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor[J]. *Mol Endocrinol*, 2001, 15(11):2021-2036.
- [2] Gurmukh S, Sikandar L, Katyal. Clara cells and clara cell 10 kD protein(CC10) [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997, 26(2):141-143.
- [3] Kurotani R, Tomita T, Yang Q, et al. Role of secretoglobin 3A2 in lung development[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 178(4):389-398.
- [4] Chiba Y, Kusakabe T, Kimura S. Decreased expression of uteroglobin-related protein 1 in inflamed mouse airways is mediated by IL-9[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 287(9):1193-1195.
- [5] Chiba Y, Srisodsai A, Supavilai P, et al. Interleukin-5 reduces the expression of uteroglobin-related protein (UGRP)1 gene in allergic airway inflammation[J]. *Immunol Lett*, 2005, 97(1):123-129.
- [6] Srisodsai A, Kurotani R, Chiba Y, et al. Interleukin-10 induces uteroglobin-related protein(UGRP)1 gene expres-

sion in lung epithelial cells through homeodomain transcription factor T/EBP/NKX2.1[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(38):4358-4360.

- [7] Niimi T, Munakata M, Keck-Waggoner CL, et al. A polymorphism in the human UGRP1 gene promoter that regulates transcription is associated with an increased risk of asthma[J]. *Am J Hum Genet*, 2002, 70(6):718-721.
- [8] Nakayama J, Noguchi E. No evidence for association between the -112G/A polymorphism of UGRP1 and childhood atopic asthma[J]. *Clin Exp Allergy*, 2003, 33(7):902-904.
- [9] Rigoli L, Di Bella C, Procopio V, et al. Uteroglobin-related protein 1 gene -112G/a polymorphism and atopic asthma in Sicilian children [J]. *Allergy Asthma Proc*, 2007, 28(6):667-669.
- [10] Batra J, Niphadkar PV, Sharma SK, et al. Uteroglobin-related protein 1 (UGRP1) gene polymorphisms and atopic asthma in the Indian population[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2005, 136(1):1-6.
- [11] Chiba Y, Kurotani R, Kusakabe T, et al. Uteroglobin-related protein 1 expression suppresses allergic airway inflammation in Mice[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 173(9):958-961.
- [12] Shijubo N, Itoh Y, Yamaguchi T, et al. Clara cell protein-positive epithelial cells are reduced in small airways of asthmatics[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 160(8):930-933.
- [13] 张颖, 金发光. 哮喘小鼠白细胞介素 15 动态分析及地塞米松的干预作用[J]. *重庆医学*, 2006, 35(12):1685-1688.
- [14] Bin LH, Nielson LD, Liu X, et al. Identification of uteroglobin-related protein 1 and macrophage scavenger receptor with collagenous structure as a lung-specific ligand-receptor pair[J]. *J Immunol*, 2003, 171(8):924-927.
- [15] Niimi T, Copeland NG, Gilbert DJ, et al. Cloning, expression, and chromosomal localization of the mouse gene (Scgb3a1, alias Ugrp2) that encodes a member of the novel uteroglobin-related protein gene family[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2002, 97(1):120-124.

(收稿日期:2010-11-09 修回日期:2011-02-22)

(上接第 1152 页)

- 疗前后 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>Treg 细胞与 FOXP3 基因表达的变化[J]. *山东医药*, 2008, 48(37):28-33.
- [11] Yu J, Heck S, Pate IV, et al. Defective circulating CD25 regulatory T cell in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura[J]. *Blood*, 2008, 112(4):1325-1330.

- [12] 卢雪红, 于春雷, 李一, 等. SLE 患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞及相关因子 FOXP3 的变化[J]. *中国老年杂志*, 2007, 1(27):99-102.

(收稿日期:2010-09-21 修回日期:2010-11-17)