

· 基础研究 ·

阿奇霉素对哮喘大鼠瘦素表达及气道炎症的影响

朱述阳¹, 嵇桂娟¹, 卢立国², 闫明华¹, 段存玲¹, 张文辉¹, 卞宏¹

(1. 徐州医学院附属医院呼吸内科, 江苏徐州 221006; 2. 江苏省沭阳县人民医院呼吸科 223600)

摘要:目的 探讨阿奇霉素对肥胖哮喘大鼠气道炎症肺组织内及气道平滑肌细胞(ASMC)内瘦素表达的变化及抗炎作用。
方法 将大鼠随机分为正常对照组、正常哮喘组、正常干预组和肥胖对照组、肥胖哮喘组、肥胖干预组, 建立肥胖、哮喘模型以及体外培养大鼠 ASMC, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定血清、支气管肺泡灌洗液(BALF)及细胞上清液中瘦素浓度, Western blot 法检测肺组织和 ASMC 内瘦素蛋白的表达。
结果 肥胖对照组、肥胖哮喘组和肥胖干预组 BALF 白细胞总数及中性粒细胞数, 肺组织瘦素蛋白表达及血清、BALF 和细胞上清液中瘦素浓度与体质量正常相应组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。
结论 肥胖哮喘大鼠气道炎症肺组织内瘦素表达增加, 阿奇霉素能抑制气道炎症并部分降低哮喘大鼠瘦素的表达。

关键词: 支气管哮喘; 肥胖症; 气道平滑肌细胞; 瘦素; 阿奇霉素

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.08.027

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)08-0909-04

Effects of azithromycin on expression of leptin and airway inflammation in rats with asthmaZhu Shuyang¹, Ji Guijuan¹, Lu Liguang², Yan Minghua¹, Duan Cunling¹, Zhang Wenhui¹, Bian Hong¹

(1. Department of Respiration, Affiliated Hospital, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221006, China;

2. Department of Respiration, Shuyang County People's Hospital, Shuyang, Jiangsu 223600, China)

Abstract: Objective To investigate the role of azithromycin on the expression change of leptin in airway inflammatory lung tissues and airway smooth muscle cells(ASMC) in obese rats with asthma and its anti-inflammatory effects. **Methods** Rats were randomly divided into 6 groups($n=8$): 3 groups with normal weight including the control group(group A), asthmatic group(group B), and azithromycin intervention group(group C) and 3 groups with obesity including the control group(group D), asthmatic group(group E) and azithromycin intervention group(group F). The obese and asthma models were constructed. The rat ASMC was cultured in vitro. The concentrations of leptin in serum, BALF and the supernatant of cultured ASMC were determined by ELISA, and the expression of leptin in lung tissue and ASMC was measured by Western blot. **Results** The total number of WBC and the number of neutrophils of bronchoalveolar lavage fluid(BALF), the protein expression of leptin in lung tissues and the leptin concentrations in serum, BALF and supernatant in the group D, E and F all showed statistical difference compared with the corresponding groups with normal weight($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of leptin in the airway inflammatory lung tissues in obese rats with asthma is increased. Azithromycin can inhibit airway inflammation and partially reduce the expression of leptin in asthmatic rats.

Key words: bronchial asthma; obesity; airway smooth muscle cells; leptin; azithromycin

哮喘是多种细胞和细胞组分共同参与的气道慢性炎症性疾病。气道平滑肌细胞(airway smooth muscle cells, ASMC)在哮喘的发病机制中的作用被越来越多的研究发现^[1]。研究表明肥胖患者哮喘发病率增加, 且症状严重, 对治疗不敏感, 肥胖哮喘小鼠气道炎症和反应性明显高于非肥胖哮喘小鼠^[2]。瘦素是由脂肪细胞分泌的一种蛋白质, 其受体在肺组织中有广泛的表达, 其能够独立于肥胖而调节气道炎症反应^[3]。大环内酯类抗菌药物在支气管哮喘中治疗作用得到越来越多研究证实^[4]。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器 卵清蛋白(ovalbumin, OVA, 美国 Sigma 公司), 阿奇霉素(天津市生物化学制药厂, 批号: 国药准字 H20020293), DMEM 培养基(Gibco 公司), 20% 小牛血清(杭州四季青公司), 瘦素酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限

公司), 一抗(兔抗大鼠 leptin IgG, 1:100 稀释, 武汉博士德生物有限公司), 二抗(羊抗兔 IgG, 1:200 稀释, 北京中杉金桥生物技术有限公司), 4-羟乙基哌嗪乙磺酸{[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid, HEPES}, 100 U/mL 青霉素、链霉素等。

1.2 大鼠肥胖模型的建立 参照文献^[5]建立大鼠肥胖模型, 选择雌性 4 周龄 SD 大鼠 48 只, SPF 级, 体质量(76~81)g, 由徐州医学院实验动物中心提供。适应性饲养 1 周后, 将 48 只大鼠随机分为体质量正常组 24 只, 喂食基础饲料, 每 100 g 提供能量 1 697.1 kJ; 体质量肥胖组 24 只, 喂食高能饲料, 每 100 g 提供能量 1 951.7 kJ, 其中 35% 的能量由脂肪提供。两组均不锈钢笼单笼饲养, 12 h 光照/12 h 黑暗, 室温 22~25 °C, 湿度 40%~70%, 自由饮蒸馏水, 人为控制大鼠摄食量, 并记录每日摄食量和撒食量, 每周称重, 喂养 7 周。以超过正常大鼠体质量 1/3 为肥胖标准。

1.3 大鼠哮喘模型的建立 将体质量正常组再分为正常对照组、正常哮喘组和正常干预组。体质量肥胖组再分为肥胖对照组、肥胖哮喘组和肥胖干预组,每组 8 只。参照文献[6]并加以改进制备大鼠哮喘模型:正常哮喘组、正常干预组、肥胖哮喘组和肥胖干预组大鼠于喂养 7 周后,第 1 天腹腔注射含有 1 mg OVA 和 20 μg 氢氧化铝的生理盐水 0.5 mL,并于第 8 天重复注射 1 次。自第 15 天开始给予 1% OVA 雾化吸入,每天 1 次,每次 30 min,持续 3 d;正常干预组和肥胖干预组在每次雾化前 30 min 腹腔注射阿奇霉素,剂量按 $1.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,溶解于 0.5 mL 生理盐水中;正常哮喘组、肥胖哮喘组以生理盐水代替。正常对照组、肥胖对照组以生理盐水代替 OVA 致敏和激发。

1.4 ASMC 的培养及鉴定 肥胖模型以及哮喘模型复制成功后,处死大鼠,迅速无菌分离大鼠的气道平滑肌组织,采用组织贴块法培养原代 ASMC,胰酶消化法传代并自然纯化,实验用 4~6 代。取第 4 代培养的大鼠 ASMC,制成单细胞悬液接种于 96 孔培养板,37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养 24 h,正常哮喘组、正常干预组、肥胖哮喘组和肥胖干预组分别给予含致敏老鼠血清的培养液,正常对照组和肥胖对照组给予含 0.1% 胎牛血清的培养液继续培养 48 h,正常干预组和肥胖干预组给予达氏修正依氏培养基(dulbecco's modified eagle's medium, DMEM)稀释的阿奇霉素(10^{-5} M)。培养的正常对照组 ASMC 经形态学观察和免疫组织化学染色法测 α 肌动蛋白(α -actin)的表达进行细胞的鉴定。

1.5 标本采集及处理 取心脏血 2 mL,分离血清分装, -80°C 保存备用。用 PBS 灌洗左肺,反复 3 次,回收率在 80% 以上视为成功。计数支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)白细胞总数和中性粒细胞数目,4 $^{\circ}\text{C}$ 下,2 500 r/min 离心 15 min,取上清液, -80°C 保存备用。取右肺组织,迅速放入液氮冷冻后,保存在 -80°C 冰箱中用于 Western blot

测定,取左肺组织,4% 多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋、切片、HE 染色。ASMC 干预培养 24 h 后,取上清液离心后 -20°C 低温保存备用。

1.6 血清、BALF 及细胞上清液中瘦素浓度测定 参照试剂盒说明书操作,测吸光度值(A450 nm),通过标准曲线计算血清、BALF 及细胞上清液中瘦素的浓度。

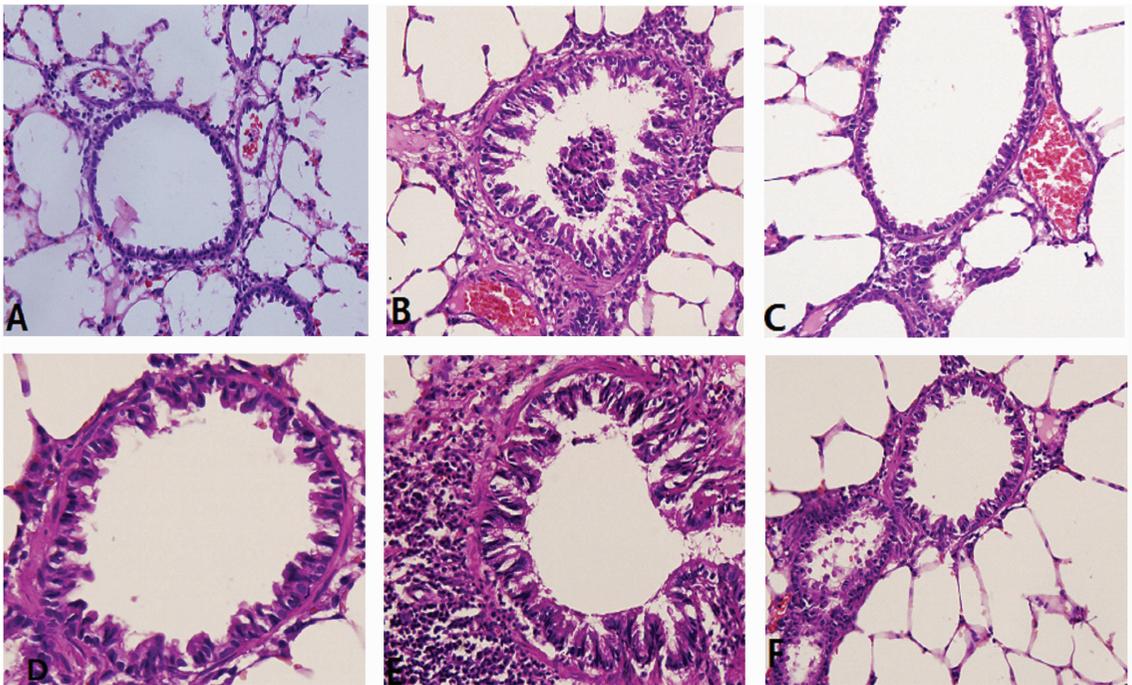
1.7 肺组织中瘦素蛋白含量测定 1 mg 肺组织中加入 6 μL 尿素裂解缓冲液,置冰上 1 h,每 15 min 涡旋 1 次,4 $^{\circ}\text{C}$ 下,10 000 r/min 离心 1 h,取上清液,以牛血清清蛋白为标准品测定蛋白浓度。150 μg 蛋白加入十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)上样缓冲液,置沸水中加热 5 min。经 10% SDS-PAGE 电泳分离后,以半干转移法转至硝酸纤维膜上。室温封闭 1 h,加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,再加入二抗,室温孵育 2 h,显色 1~2 h 后终止。以大鼠 β 肌动蛋白(β -actin)作内参照。以目的蛋白与 β -actin 吸光度值的比值进行半定量分析。

1.8 大鼠 ASMC 内瘦素蛋白含量测定 将细胞制成单细胞悬液后,按细胞数 1×10^7 接种于 6 孔细胞培养板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、50 mL/L CO_2 培养 24 h,待细胞生长融合后收集蛋白,Western blot 分别检测细胞内瘦素蛋白的含量。

1.9 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析比较各组均数总的差异, q 检验进行两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 阿奇霉素对肥胖哮喘模型大鼠肺组织病理变化的影响 正常对照组和肥胖对照组大鼠肺组织可见黏膜上皮细胞完整,管腔中无黏液分泌,管壁无炎症细胞浸润;正常哮喘组和肥胖哮喘组大鼠肺组织显示黏膜上皮局部脱落,黏膜下水肿,黏液腺增生,杯状细胞增多,管壁各层均可见炎症细胞浸润;正常干预组和肥胖干预组大鼠肺组织炎症细胞浸润减轻,见图 1。



A: 正常对照组; B: 正常哮喘组; C: 正常干预组; D: 肥胖对照组; E: 肥胖哮喘组; F: 肥胖干预组。

图 1 6 组大鼠肺组织病理表现影像(免疫组织化学染色, $\times 400$)

2.2 ASMC 的鉴定 培养的 ASMC 呈梭形, 平行生长, 束状排列, 密集与稀疏处相互交错呈“峰谷”状。免疫细胞化学检测法表明, 抗平滑肌 α -actin 抗体呈阳性染色即胞质内可见大量绿色荧光, 证实所养细胞为 ASMC。见图 2~3。

2.3 6 组大鼠 BALF 中白细胞总数和中性粒细胞数 正常干预组、肥胖干预组 BALF 中白细胞总数、中性粒细胞计数明显低于正常哮喘组及肥胖哮喘组 ($P < 0.05$)。正常哮喘组和肥胖哮喘组分别较正常对照组和肥胖对照组均有所升高, 肥胖哮喘组较正常哮喘组升高 ($P < 0.05$)。见表 1。

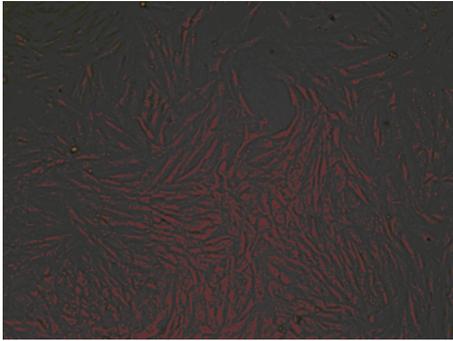


图 2 培养的第 4 代 ASMC 影像 (倒置显微镜, $\times 100$)

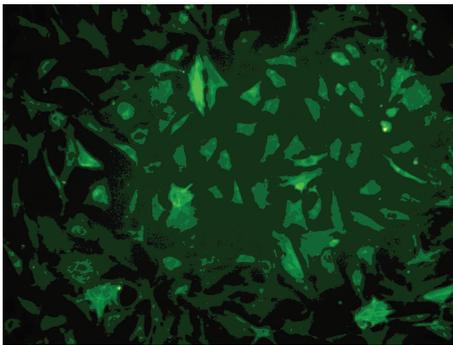


图 3 ASMC 抗 α -actin 免疫荧光细胞化学影像 (倒置显微镜, $\times 400$)

表 1 各组大鼠 BALF 中白细胞总数和中性粒细胞计数的比较 ($\bar{x} \pm s, \times 10^4 / \text{mL}$)

组别	n	白细胞总数	中性粒细胞
正常对照组	8	48.0 \pm 6.7	1.89 \pm 0.55
正常哮喘组	8	80.3 \pm 5.6*	2.59 \pm 0.72*
正常干预组	8	35.4 \pm 5.0#	2.37 \pm 0.79*
肥胖对照组	8	63.9 \pm 6.6*▲	2.52 \pm 0.69*▲
肥胖哮喘组	8	116.5 \pm 13.6#*▲*	14.47 \pm 1.25#*▲*
肥胖干预组	8	65.4 \pm 7.2*▲	7.23 \pm 0.90*▲#

*: $P < 0.05$, 与正常对照组比较; #: $P < 0.05$, 与正常哮喘组比较; ▲: $P < 0.05$, 与正常干预组比较; ☆: $P < 0.05$, 与肥胖对照组比较; ★: $P < 0.05$, 与肥胖哮喘组比较。

2.4 各组大鼠肺组织瘦素蛋白表达、血清、BALF 及细胞上清液中瘦素浓度的比较 血清和 BALF 及培养的 ASMC 上清液中瘦素浓度, 肥胖哮喘组瘦素表达高于正常哮喘组, 同时正常哮喘组和肥胖哮喘组分别高于正常对照组和肥胖对照组 ($P < 0.05$), 正常干预组和肥胖干预组瘦素表达明显低于正常哮喘

组和肥胖哮喘组 ($P < 0.05$)。见表 2~3 和图 4~5。

表 2 6 组大鼠血清、BALF 和细胞上清液中瘦素浓度的比较 ($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	n	血清	BALF	上清液中
正常对照组	8	31.7 \pm 1.0	10.4 \pm 0.8	1 321.2 \pm 17.4
正常哮喘组	8	33.6 \pm 1.3	11.3 \pm 0.9	1 436.8 \pm 9.6
正常干预组	8	25.9 \pm 1.4#	8.5 \pm 0.7#	1 395.5 \pm 11.5#
肥胖对照组	8	44.3 \pm 2.2*#	14.2 \pm 1.0*#	1 478.1 \pm 7.9*
肥胖哮喘组	8	52.6 \pm 3.4#*▲	16.2 \pm 1.1#*▲	1 581.5 \pm 9.3#*▲
肥胖干预组	8	34.3 \pm 1.2*▲☆	10.7 \pm 0.8*▲	1 415.6 \pm 17.0*▲☆

*: $P < 0.05$, 与正常对照组比较; #: $P < 0.05$, 与正常哮喘组比较; ▲: $P < 0.05$, 与正常干预组比较; ☆: $P < 0.05$, 与肥胖对照组比较; ★: $P < 0.05$, 与肥胖哮喘组比较。

表 3 6 组大鼠肺组织及 ASMC 瘦素蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肺组织	ASMC
正常对照组	8	0.28 \pm 0.06	0.45 \pm 0.02
正常哮喘组	8	0.47 \pm 0.02	0.57 \pm 0.07
正常干预组	8	0.31 \pm 0.03#	0.49 \pm 0.06#
肥胖对照组	8	0.41 \pm 0.05*	0.53 \pm 0.03*
肥胖哮喘组	8	0.62 \pm 0.05#*▲	0.72 \pm 0.05#*▲
肥胖干预组	8	0.47 \pm 0.05*▲	0.56 \pm 0.05*▲

*: $P < 0.05$, 与正常对照组比较; #: $P < 0.05$, 与正常哮喘组比较; ▲: $P < 0.05$, 与正常干预组比较; ☆: $P < 0.05$, 与肥胖对照组比较; ★: $P < 0.05$, 与肥胖哮喘组比较。

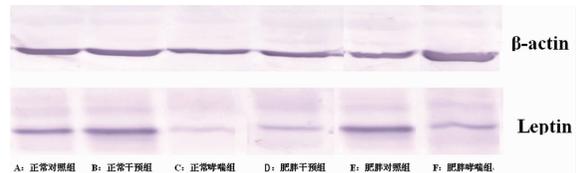


图 4 Western blot 检测各组大鼠肺组织瘦素 (Leptin) 蛋白的表达 (哮喘组大鼠 Leptin 蛋白表达增加, 阿奇霉素干预后 Leptin 蛋白表达减少)

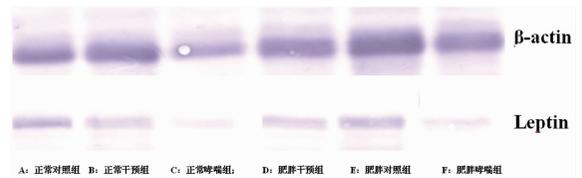


图 5 Western blot 检测大鼠 ASMC 内瘦素 (leptin) 蛋白的表达

3 讨论

流行病学调查提示肥胖和超重可增加哮喘发生的危险性, 《全球哮喘防治创议 (GINA)》将肥胖列为支气管哮喘的独立危险因素。肥胖对哮喘的影响表现为脂肪组织可以分泌多种促炎因子如 Leptin、肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- β_1 和 C-反应蛋白, 这些炎症因子都可以加重哮喘炎症的发生^[7]。本研究结果显示, 肥胖哮喘组 BALF 中白细胞总数及中性粒细胞数较单纯哮喘组增高, 且 HE 切片显示前者炎症反

应明显加重,气道及血管周围大量炎症细胞浸润更为明显,进一步支持肥胖加重了哮喘大鼠的肺部炎症反应。

肥胖患者脂肪组织分泌的炎症因子中,瘦素是这些致炎因子中的核心成员,瘦素在肥胖患者体内明显增加,而且是重要的炎症调节因子,其生物学效应是通过与相应的瘦素受体结合后发挥的。小鼠和人的肺泡和支气管上皮细胞均存在瘦素受体^[8]。既往对哮喘的研究结果亦发现瘦素导致多种细胞因子、炎症介质增加以及气道反应性升高^[9]。本研究结果发现,瘦素升高的大鼠肺组织表现出更为严重的炎症细胞浸润,这表明瘦素在哮喘的发生和发展中起重要作用;血清和 BALF 以及培养的大鼠 ASMCM 中瘦素浓度均较肥胖对照组显著升高;而体质质量正常哮喘组大鼠较正常对照组也有升高的趋势。研究表明瘦素能够促进哮喘气道炎症的发展,而气道炎症又引起瘦素产生的增加^[10]。本研究表明,肥胖哮喘大鼠体内瘦素表达水平明显增加。

大环内酯类抗生素(macrolide antibiotics, MA)作用广泛,除具有良好的抗菌活性外,还表现出较强的非特异性抗炎平喘、免疫调节等非抗菌作用^[11]。目前,已有 MA 作用于气道炎症性疾病的研究^[12]。阿奇霉素是新型大环内酯类抗生素,抗菌谱广,半衰期长达 2~3 d,有明显的抗生素后反应。Beigelman 等^[13-14]研究发现,阿奇霉素可减轻纤维囊性变小鼠中性粒细胞的浸润并抑制多种细胞因子的释放,如白细胞介素-8、肿瘤坏死因子- α 等,具有类激素样抗炎活性。Beigelman 等^[14]研究发现阿奇霉素可以减轻非感染的哮喘小鼠气道炎症反应,抑制了 BALF 内炎症细胞因子和趋化因子的表达,如白细胞介素-13、白介素-5 等;减轻了黏液细胞的化生。有研究表明瘦素可以调节血小板衍生生长因子诱导的人 ASMCM 的迁移和增殖以及白细胞介素-13 诱导的嗜酸性粒细胞趋化因子的产生^[15]。阿奇霉素可以抑制 ASMCM 的增殖,还可以松弛 ASMCM 的紧张性^[16-17]。本研究也发现,阿奇霉素干预后,肥胖哮喘大鼠 BALF 和血清中细胞总数和中性粒细胞数减少,瘦素表达与正常对照组比较明显减低,大鼠气道炎症反应减轻。同时本研究发现,阿奇霉素减少了细胞上清液中瘦素的表达。

本研究发现,肥胖哮喘大鼠瘦素表达增加,阿奇霉素干预后瘦素表达减少,从而为肥胖相关的难治性哮喘提供理论依据,但阿奇霉素是否可以用于哮喘等炎症性疾病的治疗,缓解肥胖哮喘的临床症状,有待进一步研究。

参考文献:

[1] Omar T, Yassine A, Reynold A, et al. Is airway smooth muscle the "Missing Link" modulating airway inflammation in asthma[J]. *Chest*, 2008, 133(1): 236-242.

[2] Shore SA. Obesity and asthma; possible mechanisms[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 121(5): 1087-1093.

[3] Beuther DA, Weiss ST, Sutherland ER. Obesity and asthma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 174(2): 112-119.

[4] Hahn DL. Macrolide therapy in asthma; limited treatment, long-term improvement[J]. *Eur Respir J*, 2009, 33(1): 171-

181.

[5] Mito N, Kitada C, Hosoda T, et al. Effect of diet-induced obesity on ovalbumin-specific immune response in a murine asthma model[J]. *Metabolism*, 2002, 51(10): 1241-1246.

[6] Palmans E, Pauwels RA, Kips JC. Repeated allergen exposure changes collagen composition in airways of sensitized Brown Norway rats[J]. *J Eur Respir J*, 2002, 20(2): 280-285.

[7] Mclachlan CR, Poulton R, Car G, et al. Adiposity, asthma, and airway inflammation[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 119(3): 634-639.

[8] Johnston RA, Theman TA, Terry RD, et al. Pulmonary responses to acute ozone exposure in fasted mice: effect of leptin administration[J]. *J Appl Physiol*, 2007, 102(1): 149-156.

[9] Johnston RA, Theman TA, Terry RD, et al. Pulmonary responses to acute ozone exposure in fasted mice: effect of leptin administration[J]. *J Appl Physiol*, 2007, 102(1): 149-156.

[10] Cao J, Chen JH, Zhu SY. Effects of leptin on airway-inflammation and the expression of Th1/Th2 cytokines in asthma rats[J]. *Chin J Tuberc Resp Dis*, 2009, 32(3): 171-176.

[11] Idris SF, Chilvers ER, Haworth C, et al. Azithromycin therapy for neutrophilic airways disease: myth or magic[J]. *Thorax*, 2009, 64(3): 186-189.

[12] Legssyer R, Huaux F, Lebacqz J. Azithromycin reduces spontaneous and induced inflammation in Della F508 cystic fibrosis mice[J]. *Respir Res*, 2006, 7: 134.

[13] Beigelman A, Gunsten S, Mikols CL, et al. Azithromycin attenuates airway inflammation in a noninfectious mouse model of allergic asthma[J]. *Chest*, 2009, 136(2): 498-506.

[14] Bruno A, Pace E, Chanez P, et al. Leptin and leptin receptor expression in asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124(2): 230-237.

[15] Nair P, Radford K, Fanat A, et al. The effects of leptin on airway smooth muscle responses[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 39(4): 475-481.

[16] Vanaudenaerde BM, Wuyts WA, Geudens N, et al. Macrolides inhibit IL17-induced IL8 and 8-isoprostane release from human airway smooth muscle cells[J]. *Am J Transplant*, 2007, 7(1): 76-82.

[17] Zuyderduyn S, Sukkar MB, Fust A. Treating asthma means treating airway smooth muscle cells[J]. *Eur Respir J*, 2008, 32(2): 265-274.