

论著·临床研究

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 在哮喘患者淋巴细胞中的表达张春容¹, 赵 燕², 王导新^{2 Δ}

(1. 重庆医科大学附属永川医院急诊科 402160; 2. 重庆医科大学附属第二医院呼吸内科 400016)

摘要:目的 探索过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 在哮喘患者淋巴细胞中的表达特点。方法 收集健康体检者(健康对照组)和哮喘患者(哮喘组)治疗前、治疗后 2 d 和 4 d 外周血标本, 分离淋巴细胞, 定量聚合酶链式反应测定 PPAR γ 表达水平, 并分析诱导痰中嗜酸性粒细胞比例; 酶联免疫吸附法测定痰标本上清中白细胞介素-5(IL-5) 水平。结果 与健康对照组比较, 哮喘组患者治疗前嗜酸性粒细胞比例和 IL-5 水平均较高, PPAR γ mRNA 表达水平最低。治疗后, 随着 PPAR γ 表达的逐步升高, 诱导痰中嗜酸性粒细胞比例和 IL-5 水平逐步下降。结论 PPAR γ 在哮喘患者淋巴细胞低表达, 哮喘患者气道炎症的减轻可能与 PPAR γ 的上调有关。PPAR γ 的抗炎作用可能是通过抑制 Th2 细胞功能实现的。

关键词:哮喘; 淋巴细胞; PPAR γ

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.09.014

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)09-1063-03

Preliminary study on peroxisome proliferator activated receptor gamma of lymphocytes in patients with asthma

Zhang Chunrong¹, Zhao Yan², Wang Daoxin^{2 Δ}

(1. Department of Emergency, the Affiliated Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China; 2. Department of Respiration Medicine, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China.)

Abstract: Objective To explore the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ) expression characteristic of lymphocytes in patients with asthma. **Methods** Collected blood samples from healthy subjects(health control group) and asthmatic patients(asthmatic group) before treatment, 2 and 4 days after treatment. Expression levels of PPAR γ tested with Q-PCR. Analyzed eosinophil percentage of induced sputum, IL-5 concentration in sputum supernatant measured with ELISA kits. **Results** Compared with healthy control group, the eosinophil percentage and IL-5 concentration were higher in asthmatic group before treatment; meanwhile the expression level of PPAR γ was at the lowest. After treatment, PPAR γ gradually increased accompanied with eosinophil percentage and IL-5 concentration gradually decreased. **Conclusion** Asthmatic patients had a lowest PPAR γ expression level. Their recovery perhaps attributed to the up-regulation of PPAR γ in lymphocytes. The anti-inflammatory effect of PPAR γ achieved might be via inhibiting the function of Th2 cells.

Key words: asthma; lymphocytes; PPAR gamma

支气管哮喘是慢性气道炎症性疾病, 其发病过程涉及多种细胞及细胞组分。其中, 肺组织内原有的 Th1/Th2 免疫应答失衡, 主要是 Th2 细胞介导的免疫应答增强致气道嗜酸性粒细胞聚集增多和气道高反应性, 是重要发病机制^[1]。过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) 属于核激素受体超家族成员, 分为 3 个亚型, 其中, PPAR γ 具有调节脂肪代谢、抗炎和调节免疫等多种生物学效应^[2-3]。且其在肺内多种细胞如树突状细胞、巨噬细胞等广泛表达, 是肺内炎症和免疫调节可能的作用靶点。本实验拟探讨哮喘患者淋巴细胞 PPAR γ 表达的变化, 旨在从哮喘发病的机制入手寻求新的治疗药物, 阻止疾病进展, 使哮喘患者获得最佳的临床疗效。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 10 月至 2013 年 6 月在重庆医科大学附属永川医院住院治疗的 42 例哮喘患者为研究对象(哮喘组)。入选标准: 符合中华医学会呼吸病学分会哮喘学组的诊断标准, 即(1)有典型的哮喘病史大于 1 年; (2)支气管激发试验阳性或支气管舒张试验阳性。排除标准: (1)合并严重的心、肝、肾功能不全; (2)合并支气管扩张、肺结核、尘肺等慢

性肺病疾病者; (3)合并恶性肿瘤; (4)病程中病情加重, 需气管插管辅助通气和重症监护。沙丁胺醇为受试者惟一急救药物。将同期在本院体检的 40 名健康者作为对照(健康对照组)。排除标准: (1)身体各部位有可疑感染病灶; (2)血常规白细胞计数大于 10×10^9 个/L, 或炎症细胞(中性粒细胞、嗜酸性粒细胞)大于参考值上限。两组受试者的基线资料见表 1。

表 1 受试者一般资料

组别	n	年龄 (岁)	性别 (男/女)	病程 (年)	吸烟 [n(%)]	家族史 [n(%)]
哮喘组	42	42.8 \pm 13.6	19/23	21.2 \pm 13.8	12(28.6)	14(33.3)
健康对照组	40	36.9 \pm 20.4	22/18	—	14(35.0)	—

—: 此项无数据。

1.2 方法

1.2.1 病史采集内容 采集内容包括年龄、性别、病程、吸烟史、家族史等。住院患者采用甲泼尼龙 40~100 mg/d 治疗 1~5 d, 在糖皮质激素治疗前、治疗后 2 d 和 4 d 分别留取相应标本进行检测分析。

1.2.2 定量聚合酶链式反应(Q-PCR)检测外周血淋巴细胞

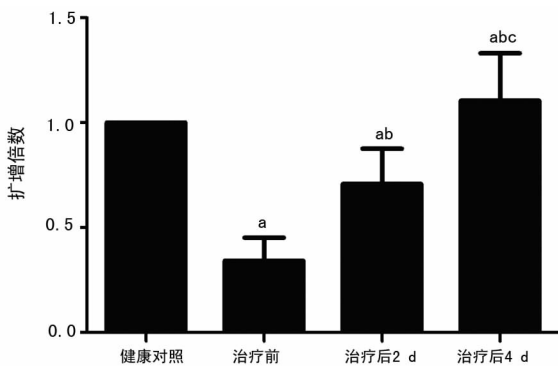
PPAR γ mRNA 表达情况 收集 40 名健康受试者外周血标本, 1:1 加入淋巴细胞分离液, 收集白膜层。使用 TAKARA 试剂盒提取 42 名哮喘患者治疗前, 治疗后 2 d 和治疗后 4 d 淋巴细胞总 RNA。PPAR γ 基因上游引物 5'-CAA GCC CAG TCC TTT CTG TG-3', 下游引物 5'-AGT GAA GGA ATC GCT TTC CG-3'。 β -actin 上游引物 5'-CTG GGA CGA CAT GGA GAA AA-3', 下游引物 5'-AGG AAG GCT GGA AGA GTG C-3'。按美国罗氏公司 SyberGreen I 试剂盒说明书操作, 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 共 42 个循环。

1.2.3 痰诱导及标本收集 按文献[4]推荐方法进行诱导痰细胞学分类和计数。入选患者诱导前 15 min 吸入沙丁胺醇 400 μ g, 然后给予超声雾化吸入 3% 高渗盐水, 2~5 min 后, 指导患者主动排痰, 并收集痰液。加入 4 倍体积的 0.1% 二硫苏糖醇, 37 °C 水浴 10 min, 2 000 r/min 离心 5 min。细胞沉淀涂片, 瑞氏-吉姆萨混合染液染色 10 min, 光镜下对不少于 400 个非鳞状上皮细胞进行分类和计数。细胞分类的正常上限: 嗜酸性粒细胞比例为 0.5%, 中性粒细胞比例为 65%。诱导痰上清收集冻存于 -70 °C 冰箱用于细胞因子白细胞介素-5(IL-5) 检测, 酶联免疫吸附法测定 IL-5 水平。

1.3 统计学处理 采用 Graphpad5.0 软件进行统计学分析和作图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组计量资料方差齐时组间比较采用单因素方差分析; 方差不齐时采用秩和检验分析。双侧检验, 检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者治疗前后 PPAR γ 基因表达特点 以健康对照组淋巴细胞中 PPAR γ 基因扩增平均 CT 值为比较基准, 按 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算治疗前、治疗后 2 d 和治疗后 4 d 各组平均的 PPAR γ 基因表达倍数。与健康对照组比较, 哮喘组患者在治疗前 PPAR γ 表达最低, 治疗后 PPAR γ 基因表达逐步上调。见图 1。

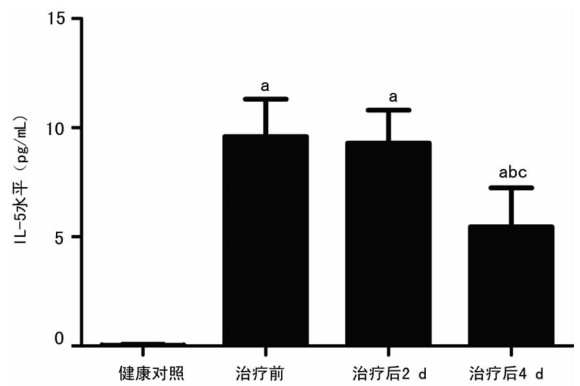


$a: P<0.05$, 与健康对照比较; $b: P<0.05$, 与治疗前比较; $c: P<0.05$, 与治疗 4 d 组比较。

图 1 PPAR γ mRNA 在受试者淋巴细胞中的扩增倍数

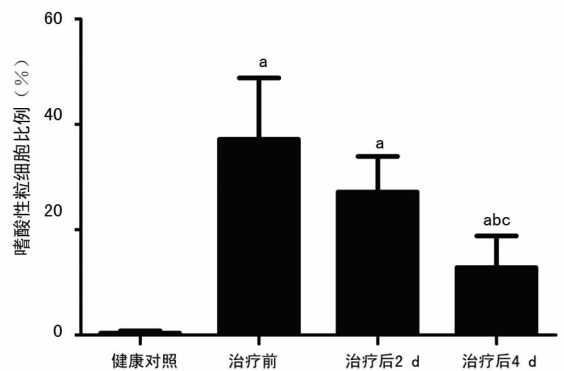
2.2 患者治疗前后诱导痰上清 IL-5 水平 健康对照组诱导痰上清 IL-5 水平极低, 部分标本低于试剂盒检测下限不能测出。哮喘组患者治疗前和治疗后 2 d 诱导痰上清仍能测出较高水平的 IL-5, 两组之间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。在治疗后 4 d, IL-5 水平显著下降。见图 2。

2.3 患者治疗前后诱导痰嗜酸性粒细胞比例分析 健康对照组人群诱导痰嗜酸性粒细胞比例均在正常参考值范围内。哮喘组患者痰嗜酸性粒细胞比例在治疗前最高, 治疗后 2 d 逐渐下降, 治疗后 4 d 显著降低。见图 3。



$a: P<0.05$, 与健康对照比较; $b: P<0.05$, 与治疗前比较; $c: P<0.05$, 与治疗 4 d 比较。

图 2 ELISA 检测受试者诱导痰上清中 IL-5 水平



$a: P<0.05$, 与健康对照比较; $b: P<0.05$, 与治疗前比较; $c: P<0.05$, 与治疗 4 d 比较。

图 3 受试者诱导痰中嗜酸性粒细胞比例

3 讨论

哮喘自身发病机制复杂, 固有免疫缺陷、适应性免疫应答失衡和植物神经功能紊乱都一定程度参与疾病的发生进展。此外, 文献报道性别、肥胖、吸烟、感染等多种因素均对哮喘发病有影响[4-7]。有必要从哮喘发病的根本免疫机制入手, 寻求可能有效的治疗靶点或方案。活化的 Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5 和 IL-13, 参与炎症细胞的募集、气道高反应性的诱发、黏液高分泌和气道重塑等多个哮喘病理过程。文献报道可根据哮喘患者痰中 IL-5 mRNA 水平划分病情轻重等级, 因此本实验选择 IL-5 为 Th2 细胞功能的检测指标[8]。

实验结果显示, 哮喘急性发作时, 诱导痰中嗜酸性粒细胞比例增加同时诱导痰上清中检测到 IL-5 水平显著增高。两项指标的变化趋势一致。Th2 细胞通过分泌 IL-5 等细胞因子募集嗜酸性粒细胞至气道, 参与哮喘的发病。而嗜酸性粒细胞作为主要的效应细胞, 聚集在气道和血管周围, 维持哮喘的慢性炎症状态, 并诱发气道高反应性, 是哮喘急性发作的重要原因。也有文献报道, IL-5 不仅对嗜酸性粒细胞有募集作用, 还能抑制凋亡, 将其存活时间由 4 d 延长至 2 周[9]。

分离外周血淋巴细胞进行基因表达水平检测, 结果提示哮喘组患者 PPAR γ mRNA 表达水平在入院时显著低于健康对照组。经过治疗, 其表达逐渐增高, 甚至有部分患者在治疗后 4 d 已表现出比健康对照组更高的水平。PPAR γ 的表达与嗜酸性粒细胞比例和 IL-5 水平的变化趋势相反。推测 PPAR γ 的抗炎作用可能是通过抑制 Th2 细胞功能, 降低 IL-5 的分泌实现的。这同周炜等[10]的报道一致: 支气管哮喘及喘息性肺炎患儿外周血 PPAR γ 表达减少, 可使炎症信号转导增强, 导

致患儿哮喘发作和发生喘息。分离培养哮喘患者外周血 T 淋巴细胞,使用以罗格列酮为代表的噻唑烷二酮类药物特异激活 PPAR γ 后,IL-4 分泌水平较健康者显著降低,与 T 细胞转录信号相关的 p-STAT6 蛋白表达明显降低,且两者表达水平呈正相关^[11]。

在用卵清蛋白致敏和激发的小鼠哮喘模型中,罗格列酮通过核因子- κ B(NF- κ B)通路抑制 T 细胞因子和血清相应卵清蛋白抗体的产生,并能降低气道高反应性和气道炎症水平,发挥保护作用^[12]。虽然已有不少研究证实激活 PPAR γ 对哮喘动物模型有确切的保护作用,但仍存在一些局限。PPAR γ 作为核受体超家族的一员,能调控多种细胞的增殖分化。基于此,尚无法在 PPAR γ 基因敲除动物体内验证其对哮喘的保护作用。仍需要大量关于 PPAR γ 与哮喘的基础研究和临床研究进一步验证可能的作用机制和作用效能。同时注意噻唑烷二酮类药物对血糖的影响。

综上所述,哮喘患者急性发作时 Th2 细胞激活,分泌高水平 IL-5,募集嗜酸性粒细胞至气道周围聚集。随着 PPAR γ 表达水平的上调,哮喘的气道炎症程度降低,IL-5 分泌减少。PPAR γ 对哮喘的保护作用可能是通过抑制效应性 T 细胞的功能实现的。PPAR γ 是哮喘患者可能的新的治疗靶点,其激动剂有望用于临床,使患者获得良好的临床控制。

参考文献:

- [1] Jacobsen EA, Zellner KR, Colbert D, et al. Eosinophils regulate dendritic cells and Th2 pulmonary immune responses following allergen provocation[J]. J Immunol, 2011,187(11):6059-6068.
- [2] Glass CK, Saijo K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells[J]. Nat Rev Immunol, 2010,10(5):365-376.
- [3] Kim SH, Hong JH, Lee YC. Ursolic acid, a potential PPAR γ agonist, suppresses ovalbumin-induced airway inflammation and Penh by down-regulating IL-5, IL-13, and IL-17 in a mouse model of allergic asthma[J]. Eur J

Pharmacol, 2013,701(1/3):131-143.

- [4] 赵燕,程晓明,林科雄,等.哮喘急性加重和糖皮质激素治疗对诱导痰炎症细胞分类及表型的影响[J].第三军医大学学报,2013,35(18):1968-1971.
- [5] Krishnamoorthy N, Khare A, Oriss TB, et al. Early infection with respiratory syncytial virus impairs regulatory T cell function and increases susceptibility to allergic asthma[J]. Nat Med, 2012,18(10):1525-1530.
- [6] Pietinalho AI, Pelkonen A, Ryttilä P. Linkage between smoking and asthma[J]. Allergy, 2009, 64(12):1722-1727.
- [7] Scott HA, Gibson PG, Garg ML, et al. Airway inflammation is augmented by obesity and fatty acids in asthma[J]. Eur Respir J, 2011,38(3):594-602.
- [8] Islam SA, Chang DS, Colvin RA, et al. Mouse CCL8, a CCR8 agonist, promotes atopic dermatitis by recruiting IL-5+ T(H)2 cells[J]. Nat Immunol, 2011,12(2):167-177.
- [9] 宋晓丹,张明,欧维琳.支气管哮喘患者嗜酸性粒细胞凋亡延迟及其影响因素研究进展[J].实用儿科临床杂志,2010,22(22):1753-1755.
- [10] 周炜,季伟,储鑫,等.过氧化物酶体增殖活化受体- γ 在儿童喘息性疾病的表达及意义[J].中国小儿急救医学,2013,20(4):406-407.
- [11] 杨海华,王文军,向旭东,等. PPAR- γ 激动剂对哮喘急性发作期患者 T 淋巴细胞磷酸化 STAT6 影响的体外实验研究[J].中国呼吸与危重监护杂志,2008,7(5):346-349.
- [12] Park SJ, Lee KS, Kim SR, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist down-regulates IL-17 expression in a murine model of allergic airway inflammation[J]. J Immunol, 2009,183(5):3259-3267.

(收稿日期:2013-11-02 修回日期:2014-01-05)

(上接第 1062 页)

明显丢失之前反映患者的骨转换水平,可以作为预测骨丢失速度的指标之一,有助于预测骨折风险。本研究发现 BMD 在恶性肿瘤骨转移与无骨转移二组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),考虑与选择的患者大多为老年人有关。

综上所述,uNTx 和 sBAP 的水平可以作为临床辅助诊断肿瘤骨转移的参考指标,从而弥补传统的肿瘤标记物和影像学检查对骨转移病灶诊断和评价的不足。恶性肿瘤患者中,将骨生化指标与 BMD 检测联合应用,可及时监测骨量的降低并予以干预,减少骨质疏松及骨折的发生。本研究中,由于观察例数和随访时间有限,骨代谢生化指标与骨相关事件的风险和肿瘤相关死亡风险的关系还有待进一步追踪研究。

参考文献:

- [1] Rybak LD, Rosenthal DI. Radiological imaging for the diagnosis of bone metastases[J]. Q J Nucl Med, 2001,45(1):53-64.
- [2] Peterson J, Kransdorf MJ, O'Connor MI. Diagnosis of occult bone metastases: positron emission tomography[J]. Clin Orthop Relat Res, 2003,(415 Suppl):S120-128.
- [3] 吕青,肖融.骨转移生化指标在乳腺癌诊治中的应用[J].

中国普外基础与临床杂志,2004,11(1):29-31.

- [4] Izumi M, Nakanishi Y, Takayama K, et al. Diagnostic value of bone-turnover metabolites in the diagnosis of bone metastases in patients with lung carcinoma[J]. Cancer, 2001,91(8):1487-1493.
- [5] Peyruchaud O. Mechanisms of bone metastasis formation[J]. J Soc Biol, 2007,201(3):229-236.
- [6] Cawthorn TR, Amir E, Broom R, et al. Mechanisms and pathways of bone metastasis: challenges and pitfalls of performing molecular research on patient samples[J]. Clin Exp Metastasis, 2009,26(8):935-943.
- [7] Brown JE, Cook RJ, Major P, et al. Bone turnover markers as predictors of skeletal complications in prostate Cancer, lung Cancer, and other solid tumors[J]. J Natl Cancer Inst, 2005,97(1):59-69.
- [8] Ali SM, Demers LM, Leitzel K, et al. Baseline serum NTx levels are prognostic in metastatic breast Cancer patients with bone-only metastasis[J]. Ann Oncol, 2004,15(3):455-459.

(收稿日期:2013-10-15 修回日期:2014-01-05)