

• 药理与临床 •

隐孔菌多糖对致敏小鼠肺组织趋化因子 mRNA 和 α -肿瘤坏死因子 mRNA 表达的影响

陈黎¹, 谢诒诚¹, 柯传奎², 谢强敏^{1*}

(1. 浙江大学药学院 浙江大学城市学院, 浙江 杭州 310058; 2. 杭州赐富生物技术有限公司, 浙江 杭州 310053)

摘要:目的 观察致敏小鼠抗原攻击后肺组织趋化因子 (eotaxin) mRNA、 α -肿瘤坏死因子 (TNF- α) mRNA 表达的时程关系以及隐孔菌多糖 (*Cryptopus Polysaccharide*, CP) 对表达的影响。方法 采用半定量 RT-PCR 法测定肺组织 eotaxin mRNA 和 TNF- α mRNA 表达, 并通过观察支气管肺灌洗液 (BALF) 中白细胞总数和嗜酸性粒细胞的数目验证 eotaxin mRNA 和 TNF- α mRNA 表达增多的功能。结果 致敏小鼠抗原攻击 8 h 后肺组织 TNF- α mRNA 表达和 24 h 后 eotaxin mRNA 表达达到高峰, 与对照小鼠比较明显增多, BALF 中白细胞总数和嗜酸性粒细胞数目相应增加。CP 3、10、30 mg/kg 呈剂量依赖抑制 TNF- α mRNA 和 eotaxin mRNA 表达以及炎症细胞在气道的聚集。结论 CP 抑制肺组织 TNF- α mRNA 和 eotaxin mRNA 表达可能是其抗过敏性炎症的作用机制。
关键词: 隐孔菌多糖; eotaxin mRNA; TNF- α mRNA; 哮喘

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2007)12-1832-04

Effect of *Cryptopus polysaccharide* on eotaxin mRNA and TNF- α mRNA expression in lung tissue of sensitized mice

CHEN Li¹, XIE Yi-cheng¹, KE Chuan-kui², XIE Qiang-Min¹

(1. School of Pharmacy, Zhejiang University, College of City, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

2. Hangzhou Cifu Biotechnology Co., Ltd., Hangzhou 310053, China)

Abstract: Objective To study the time-course relationship of eotaxin mRNA and TNF- α mRNA expression in the lung tissue of sensitized mice after antigen challenge and the effects of *Cryptopus polysaccharide* (CP) on these expression. **Methods** Eotaxin mRNA and TNF- α mRNA expression was determined by semi-quantitative RT-PCR. The function implications of eotaxin mRNA and TNF- α mRNA expression were examd by detecting the number of total leucocyte and eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). **Results** Peak level of TNF- α mRNA expression appeared at 8 h and eotaxin mRNA expression at 24 h in the lung tissue of sensitized mice after antigen challenge. Compared with the control group, total numbers of leukocyte and eosinophil in BALF increased in sensitized mice. CP 3, 10, and 30 mg/kg inhibited eotaxin mRNA and TNF- α mRNA expression, and inflammatory cells accumulation in airway of the sensitized mice in a dose-dependent manner. **Conclusion** The mechanism of inhibitory effects of CP on eotaxin mRNA and TNF- α mRNA expression may be related to the anti-allergic inflammation.

Key words: *Cryptopus polysaccharide* (CP); eotaxin mRNA; TNF- α mRNA; asthma

前期研究已经证明隐孔菌发酵物对单纯小鼠哮喘模型和脾虚证小鼠哮喘模型的气道高反应和气道炎症反应有明显的抑制作用^[1], 为了进一步明确物质中的有效成分, 本课题组对其成分进行了分离和筛选, 初步证明隐孔菌多糖 (*Cryptopus polysaccharide*, CP) 是主要的抗过敏性炎症成分,

CP 能明显抑制致敏豚鼠抗原攻击引起的气道收缩反应, 抑制血小板活化因子 (PAF) 诱导的嗜酸性粒细胞 (EOS) 趋化以及抑制 EOS 的释放^[2]。本实验应用哮喘模型研究 CP 抗过敏性炎症的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物: BALB/c 小鼠 100 只, 体重 22~24 g, 雌

收稿日期: 2007-04-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30671919); 浙江省科技厅重大科技攻关项目 (2005C21072)

作者简介: 陈黎 (1977-), 女, 浙江萧山人, 药学专业硕士生, 工程师, 研究方向为中药、天然药物新药及保健食品开发。

E-mail: chenlicary@yahoo.com.cn

* 通讯作者 谢强敏 Tel: (0571) 88208231 E-mail: xieqm@zju.edu.cn

雄各半,清洁级,购于上海斯莱克实验动物有限公司,许可证号:SCXK(沪)2003-0003。实验期间饲养于浙江大学实验动物中心,清洁级环境,室温 25℃,湿度 75%,12 h 灯光,12 h 黑暗,无卵白蛋白清洁饲料喂养。

1.2 药品与试剂:卵白蛋白(V级,美国 Sigma 公司,批号:113k7001);磷酸地塞米松钠盐(DXM,浙江医药股份公司);Trizol(Gibco 公司);逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒;趋化因子(eotaxin)和 α -肿瘤坏死因子(TNF- α) mRNA 引物由上海生工生物工程服务有限公司合成,引物序列及 PCR 产物长度见表 1。隐孔菌多糖(CP,相对分子质量 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$,质量分数 87%)由杭州赐富生物技术有限公司提供。

表 1 细胞因子引物序列及 PCR 产物长度

Table 1 Primer sequences and length of PCR product of cytokine

细胞因子		引物序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	正向	CTGGTGCTGAGTATGTCGTG	296
	反向	CAGTCTTCTGAGTGGCAGTG	
eotaxin	正向	AGAGGCTGAGATCCAAGCAG	263
	反向	CAGATCTTCTTGCCCAACCT	
TNF- α	正向	AACTAGTGGTGCCAGCCGAT	325
	反向	CTTCACAGAGCAATGACTCC	

1.3 仪器:雾化吸入器(BARI, MASTER,德国),冷冻离心机(Eppendorf Centrifuge 5840R,德国),显微镜(Olympus BX51,日本),PCR仪(Eppendorf,德国),核酸紫外分析仪(Eppendorf,德国),凝胶成像系统(UVP 有限公司,英国)。

1.4 小鼠哮喘模型的建立:将卵白蛋白溶于 10% 氢氧化铝凝胶(自制)中,配制成 0.2% 卵白蛋白溶液。每只小鼠两后足掌各注射 0.05 mL,前足掌各注射 0.01 mL,两后腿 sc 0.03 mL,两侧腹股沟各 sc 0.03 mL,每只小鼠共注射 0.24 mL 进行致敏。10 d 后将卵白蛋白溶于 1% 氢氧化铝凝胶中,配制成 0.2% 卵白蛋白溶液,每只小鼠 ip 0.2 mL 以加强致敏 1 次。致敏第 30 天抗原攻击,将致敏小鼠置于 50 cm \times 50 cm \times 30 cm 有机玻璃密闭箱内,用雾化吸入器雾化 1% 卵白蛋白(用生理盐水配制)60 min。

1.5 分组、给药剂量及方式:①时程关系研究:40 只小鼠,每个时间点 5 只,共 8 个时间点。②CP 的作用研究:60 只小鼠,分为 6 组,每组 10 只。阴性对照组(不致敏,生理盐水 5 mL/kg);模型组(生理盐水 5 mL/kg);DXM 组(1.0 mg/kg);CP(3、10、30 mg/kg)组;均于抗原攻击前 30 min 采用 iv 给药。

1.6 样本的采集与制备:①时程关系研究:分别于

抗原攻击前,攻击后 1、2、4、8、24、72、96 h 8 个时间点各取 5 只小鼠乙醚麻醉后放血脱臼处死,打开胸腔,取出全肺,用生理盐水洗净后立即存放于液氮中备用。②CP 的作用研究:于抗原攻击后 24 h (eotaxin mRNA 表达的最高点的 TNF- α mRNA 表达的次高点)用乙醚麻醉后放血脱臼处死,打开胸腔,气管插管,结扎肺门,由右侧主支气管,用 1% 牛血清-生理盐水溶液 1 mL 灌洗支气管肺泡,来回冲洗左侧肺 3 次,收集支气管肺泡灌洗液(BALF)。BALF 白细胞计数和分类计数;混匀收集的 BALF,取 0.1 mL 与白细胞稀释液 1:1 稀释,用细胞计数板计数炎症细胞,涂片用嗜酸性粒细胞特殊染色后用显微镜作分类计数。右侧肺组织分离,用生理盐水洗净后立即存放于液氮中备用。

1.7 RT-PCR 反应

1.7.1 肺组织总 RNA 抽提:取 100 mg 肺组织加 1 mL Trizol 于冰浴下制作匀浆,经氯仿处理,异丙醇沉淀,75% 乙醇洗涤后,略干燥,溶于 DEPC 100 μ L 处理水。经核酸紫外分析仪检测,根据 A_{260}/A_{280} 值,确定样品中 RNA 纯度和量。

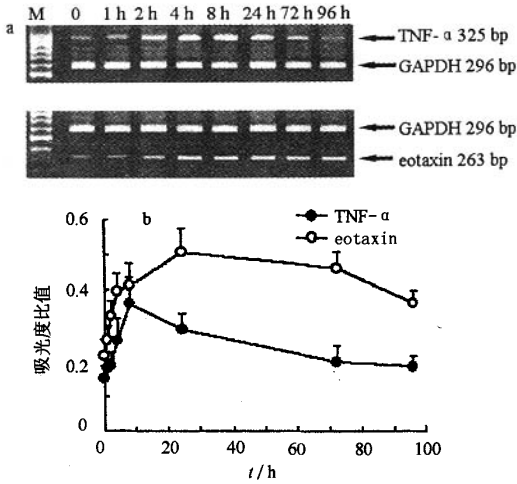
1.7.2 逆转录步骤:应用 M-MLV 逆转录酶,20 μ L 反应体系。置 PCR 仪中 42℃ 反应 60 min,72℃ 变性 10 min。

1.7.3 PCR 步骤:建立 25 μ L 反应体系,94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,最后 72℃ 再延伸 10 min,扩增 35 个循环。PCR 产物检测采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,以 GAPDH 为阳性对照,经凝胶成像分析系统成像、条带密度扫描,以吸光度 eotaxin/GAPDH 和 TNF- α /GAPDH 值进行半定量分析。

1.8 统计学方法:用 SPSS 10.0 统计实验数据,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 Student-Newman-Keuls 进行检验。

2 结果

2.1 致敏小鼠抗原攻击后肺组织 TNF- α mRNA 和 eotaxin mRNA 表达的时程关系:致敏小鼠用抗原 1% 卵白蛋白气雾吸入攻击 1 h,可见肺组织的 TNF- α mRNA 和 eotaxin mRNA 表达在 2~4 h 内开始迅速上升,TNF- α mRNA 的表达在攻击后 8 h 达到峰值,然后快速下降,72 h 基本恢复到抗原攻击前的水平;而 eotaxin mRNA 表达在 24 h 达到峰值,然后逐步缓慢下降,在抗原攻击 72 h 与抗原攻击前比较还处于较高的水平,到 96 h 才有明显的下降过程,见图 1。



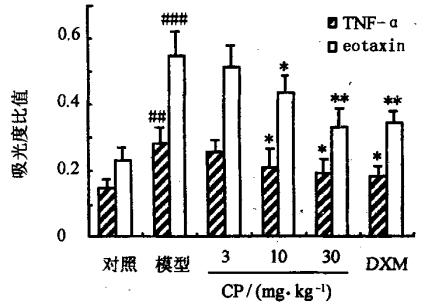
a-凝胶电泳图 M-100 bp DNA 梯形标记 0-抗原攻击前
b-凝胶的密度分析
a-electrophoretogram of agarose gel M-100 bp DNA
Ladder Markers Lane 0-before antigen challenge
b-densitometric analysis of gel

图 1 致敏小鼠抗原攻击后肺组织 TNF-α mRNA 和 eotaxin mRNA 表达的时程关系 (n=5)
Fig. 1 Time-course relationship of TNF-α mRNA and eotaxin mRNA expression in lung tissue of sensitized mice (n=5)

2.2 CP 对致敏小鼠肺组织 eotaxin mRNA 和 TNF-α mRNA 表达的影响:模型组肺组织 eotaxin mRNA 和 TNF-α mRNA 表达水平分别显著高于对照组 ($P < 0.001, 0.01$)。CP 呈剂量依赖抑制 TNF-α 和 eotaxin mRNA 表达,CP (10、30 mg/kg) 对 eotaxin mRNA 表达的抑制率分别为 18.8% 和 39.3% ($P < 0.05, 0.01$),CP (10、30 mg/kg) 对 TNF-α mRNA 表达的抑制率分别为 28.68% 和 32.4% ($P < 0.05$);DXM 对 eotaxin mRNA 和 TNF-α mRNA 表达的抑制率分别为 37.4% 和 36.7%;CP 3 mg/kg 对 eotaxin mRNA 和 TNF-α mRNA 表达的抑制作用与模型组比较无明显差异 ($P > 0.05$)。结果见图 2。

2.3 CP 对致敏小鼠抗原攻击后气道炎症细胞聚集的抑制作用:模型组 BALF 中的白细胞总数和嗜酸性粒细胞比阴性对照组明显增多。CP 呈剂量依赖抑制气道白细胞总数和嗜酸性粒细胞聚集,CP 3、10、30 mg/kg 对白细胞总数的抑制率分别为 23.8% ($P > 0.05$)、34.7% ($P < 0.05$) 和 45.8% ($P < 0.01$),对嗜酸性粒细胞的抑制率分别为 22.7% ($P > 0.05$)、33.4% ($P < 0.05$) 和 45.0% ($P < 0.01$);DXM 对白细胞总数和嗜酸性粒细胞的

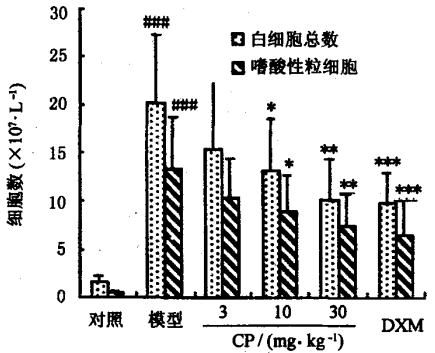
抑制率分别为 51.2% ($P < 0.01$)、51.7% ($P < 0.01$)。结果见图 3。



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

图 2 CP 对致敏小鼠抗原攻击后肺组织 TNF-α mRNA 和 eotaxin mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 2 Effect of CP on TNF-α mRNA and eotaxin mRNA expression in lung tissue of sensitized mice after antigen challenge ($\bar{x} \pm s, n=10$)



与对照组比较: *** $P < 0.001$
与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
*** $P < 0.001$ vs control group
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group

图 3 CP 对致敏小鼠抗原攻击后支气管肺灌洗液中白细胞总数和嗜酸性粒细胞聚集的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 3 Effect of CP on accumulation of total leucocytes and eosinophils in BALF in sensitized mice after antigen challenge ($\bar{x} \pm s, n=10$)

3 讨论

支气管哮喘是一种由多种细胞、细胞因子和炎症介质引起的,以气道高反应为特征的炎症性疾病,细胞因子和趋化因子在哮喘的炎症形成中起重要作用。其中 eotaxin 和 TNF-α 是哮喘发病过程中的重要因素,也是寻找抗炎性哮喘药物的新靶点。

eotaxin 属于 C-C 类趋化因子,对 EOS 具有选

择性的趋化作用,在过敏性炎症反应中,eotaxin 能特异地募集、趋化 EOS^[3,4]。eotaxin 不仅能激活 EOS,且能刺激骨髓生成和释放更多的 EOS,它通过与 EOS 表面上特异性受体 CCR3 相互作用可激活丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 途径使 EOS 脱颗粒^[5]。eotaxin mRNA 主要表达于呼吸道上皮细胞以及多种炎性细胞,如淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞^[6]。在变态反应中,这些炎症细胞释放 eotaxin 进而引起气道 EOS 浸润^[5,6]。研究表明哮喘患者在变应原攻击后,肺组织的 eotaxin mRNA 的表达明显增加^[6,7]。本实验证明了小鼠哮喘模型组肺组织中的 eotaxin mRNA 表达显著升高,于抗原攻击后 24 h 达到高峰,BALF 中的 EOS 也明显增多,已有实验证明人和致敏小鼠在变应原的攻击下 EOS 气道聚集峰值也发生于 24~48 h^[8,9]。提示 eotaxin mRNA 表达增加的时程与 EOS 气道聚集变化的相关性,eotaxin 是诱导 EOS 气道聚集的主要趋化因子。

TNF- α 是一种主要由肥大细胞、EOS、内皮细胞、巨噬细胞、平滑肌细胞、T 细胞等产生的具有广泛生物学活性的前炎细胞因子。本实验证实了小鼠哮喘模型组肺组织中的 TNF- α mRNA 表达显著升高,表达的高峰出现于抗原攻击后的 4~8 h,明显早于 eotaxin mRNA 表达高峰时间,表明 TNF- α 是一个哮喘发病时较早启动的细胞因子之一,对激发其他炎性因子的分泌具有重要作用^[10],至于 TNF- α mRNA 与 eotaxin mRNA 表达增加的因果关系以及信号传导途径还需要进一步研究。TNF- α mRNA 过度表达可使 EOS 表面的受体与血管内皮细胞表面上的配体(即内皮细胞表达的黏附分子)相互作用,促进 EOS 与内皮细胞黏附,跨膜进入肺组织和气道腔^[10]。TNF- α 还参与诱导哮喘气道炎症时肺巨噬细胞、中性粒细胞、肥大细胞、内皮细胞等多种炎症与非炎症细胞表达诱导型一氧化氮合酶 (iNOS),该酶被诱导后可持续大量产生 NO,过量 NO 可使气道充血、上皮剥落,加重血浆渗漏,感觉神经末梢暴露,造成肺上皮细胞及组织损伤,引起气道高反应,导致哮喘发病,因此目前认为哮喘治疗中 TNF- α 靶点药物的开发有应用前景,糖皮质激素作用与降低 TNF- α mRNA 表达有关,因而具有良好的抗炎作用^[11]。

隐孔菌在民间用于治疗气管炎和哮喘。因该菌为腐生真菌,生态环境严格,以致蕴藏量少,资源紧缺,故对隐孔菌发酵培养来作为新药源的开发。通过与野生隐孔菌比较,发酵培养隐孔菌化学成分基本

上与野生隐孔菌相似^[12]。最近笔者对其成分进行了分离和筛选,初步证明隐孔菌多糖 (Cryptoporus polysaccharide, CP) 是主要的抗过敏性炎症成分,但其作用机制还不清楚。本实验结果表明 CP 呈剂量依赖抑制 eotaxin 和 TNF- α mRNA 表达,提示 CP 可能影响趋化因子 eotaxin 和细胞因子 TNF- α 的转录过程,从而减少 eotaxin 和 TNF- α 的生成,进而抑制 EOS 的气道聚集。

上述结果表明 CP 抑制肺组织 eotaxin 和 TNF- α mRNA 表达可能是其抗过敏性炎症的作用机制。

References:

- [1] Bao Z S, Li H Q, Shao C S, et al. Effects of *Cryptoporus volvatus* ferment substance on airway hyperresponsiveness and inflammation in asthmatic mice with spleen-deficiency syndrome [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36 (9): 1356-1360.
- [2] Zhao X Y, Xie Q M, Chen J Q, et al. Inhibitory effects of *Cryptoporus polysaccharide* on airway constriction, eosinophil release, and chemotaxis in guinea pigs [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25(4): 503-507.
- [3] Fujisawa T, Kato Y, Nagase H, et al. Chemokines induce eosinophil degranulation through CCR-3 [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 106(3): 507-513.
- [4] Menzies G A, Robinson D S. Eosinophil chemokines and chemokine receptors: Their role in eosinophil accumulation and activation in asthma and potential as therapeutic targets [J]. *J Asthma*, 2001, 38(8): 605-613.
- [5] Inman M D, Ellis R, Wattie J, et al. Allergen-induced increase in airway responsiveness, airway eosinophilia, and bone-marrow eosinophil progenitors in mice [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999, 21(4): 473-479.
- [6] Oyamada H, Kamada Y, Kuwasaki T, et al. CCR3 mRNA expression in bronchial epithelial cells and various cells in allergic inflammation [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1999, 120(Suppl 1): 45-47.
- [7] Lilly C M, Nakamura H, Belostotsky O I, et al. Eotaxin expression after segmental allergen challenge in subjects with atopic asthma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163 (7): 1669-1675.
- [8] Lommatzsch M, Julius P, Kuepper M, et al. The course of allergen-induced leukocyte infiltration in human and experimental asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 118 (1): 91-97.
- [9] Bandeira M C, Herbst A, Weller P E. Eotaxins: Contributing to the diversity of eosinophil recruitment and activation [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 24(6): 653-657.
- [10] Mukhopadhyay S, Hoidal J R, Mukherjee T K. Role of TNF- α in pulmonary pathophysiology [J]. *Respir Res*, 2006, 7: 125.
- [11] Cazzola M, Polosa R. Anti-TNF- α and Th1 cytokine-directed therapies for the treatment of asthma [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2006, 6(1): 43-50.
- [12] Wu J Z, Chen W L, Huang N L, et al. Analysis and comparison of compositions between fermentation cultured and wild *Cryptoporus volvatus* [J]. *J Fujian Coll Tradit Chin Med* (福建中医学院学报), 1997, 7(2): 21-26.

隐孔菌多糖对致敏小鼠肺组织趋化因子mRNA和 α -中瘤坏死因子mRNA表达的影响

作者: 陈黎, 谢谄诚, 柯传奎, 谢强敏, CHEN Li, XIE Yi-cheng, KE Chuan-kui, XIE Qiang-Min
作者单位: 陈黎, 谢谄诚, 谢强敏, CHEN Li, XIE Yi-cheng, XIE Qiang-Min(浙江大学药学院, 浙江大学城市学院, 浙江, 杭州, 310058), 柯传奎, KE Chuan-kui(杭州赐富生物技术有限公司, 浙江, 杭州, 310053)
刊名: 中草药 **ISTIC PKU**
英文刊名: CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS
年, 卷(期): 2007, 38(12)

参考文献(12条)

1. Bao Z S;Li H Q;Shao C S Effects of Cryptoporus volvatus ferment substance on airway hyperresponsiveness and inflammation in asthmatic mice with spleen-deficiency syndrome[期刊论文]-中草药 2005(09)
2. Zhao X Y;Xie Q M;Chen J Q Inhibitory effects of Cryptoporus polysaccharide on airway constriction, eosinophil release, and chemotaxis in guinea pigs[外文期刊] 2004(04)
3. Fujisawa T;Kato Y;Nagase H Chemokines induce eosinophil degranulation through CCR-3[外文期刊] 2000(03)
4. Menzies G A;Robinson D S Eosinophil chemokines and chemokine receptors:Their role in eosinophil accumulation and activation in asthma and potential as therapeutic targets[外文期刊] 2001(08)
5. Inman M D;Ellis R;Wattie J Allergen-induced increase in airway responsiveness, airway eosinophilia, and bone-marrow eosinophil progenitors in mice[外文期刊] 1999(04)
6. Oyamada H;Kamada Y;Kuwasaki T CCR3 mRNA expression in bronchial epithelial cells and various cells in allergic inflammation 1999(z1)
7. Lilly C M;Nakamura H;Belostotsky O I Eotaxin expression after segmental allergen challenge in subjects with atopic asthma[外文期刊] 2001(07)
8. Lommatzsch M;Julius P;Kuepper M The course of allergen-induced leukocyte infiltration in human and experimental asthma[外文期刊] 2006(01)
9. Bandeira M C;Herbst A;Weller P E Eotaxins:Contributing to the diversity of eosinophil recruitment and activation 2001(06)
10. Mukhopadhyay S;Hoidal J R;Mukherjee T K Role of TNF- α in pulmonary pathophysiology[外文期刊] 2006
11. Cazzola M;Polosa R Anti-TNF- α and Th1 cytokinedirected therapies for the treatment of asthma[外文期刊] 2006(01)
12. Wu J Z;Chen W L;Huang N L Analysis and comparison of compositions between fermentation cultured and wild Cryptoporus volvatus 1997(02)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200712026.aspx