

## 异丁司特对哮喘豚鼠气道嗜酸性粒细胞凋亡的作用及其机制

徐 珊, 吕伟红, 张洪泉\*

(扬州大学医药研究所, 江苏 扬州 225001)

**摘要:** 研究异丁司特 (ibudilast) 对哮喘豚鼠气道嗜酸性粒细胞 (eosinophil, EOS) 凋亡的作用及其机制。采用卵白蛋白致敏法制备豚鼠哮喘模型。收集支气管肺泡灌洗液 (BALF) 并进行白细胞计数及分类计数, TUNEL 技术原位检测 EOS 凋亡, RT-PCR 技术检测 EOS 的 Fas mRNA 表达, 酶联免疫吸附 (ELISA) 法测定 BALF 中粒细胞-巨噬细胞刺激因子 (GM-CSF) 及白介素-5 (IL-5) 的含量。结果表明, 异丁司特可明显减少哮喘豚鼠的白细胞总数和 EOS 数目; 在异丁司特剂量组, EOS 凋亡细胞明显增多, Fas mRNA 的表达显著增强, BALF 中 GM-CSF、IL-5 含量显著降低, 与模型组比较有显著性差异。因此, 异丁司特抑制哮喘豚鼠气道 EOS 数目的增加、诱导 EOS 凋亡、增强 Fas mRNA 的表达、降低 GM-CSF、IL-5 含量可能是其拮抗哮喘的重要机制。

**关键词:** 哮喘; 异丁司特; 嗜酸性粒细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 07-0737-04

## Effect of ibudilast on apoptosis of airway eosinophil in asthmatic guinea pigs

XU Shan, LÜ Wei-hong, ZHANG Hong-quan\*

(Medical and Pharmaceutical Institute, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

**Abstract:** This study is to investigate the effect of ibudilast on apoptosis of airway eosinophil in asthmatic guinea pigs and its mechanism. Experimental asthma model of guinea pigs was induced with ovalbumin (OVA). Differential count in BALF was examined. The apoptosis of eosinophils (EOS) was labeled with TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) technique. Fas mRNA expression of EOS was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The quantification of GM-CSF and IL-5 in BALF was conducted with ELISA. After treatment of ibudilast, the number of EOS and the quantification of GM-CSF and IL-5 decreased significantly. The number of apoptotic cells as well as Fas mRNA expression of EOS obviously increased. The results indicated that anti-asthma mechanisms of ibudilast can antagonize asthma through decreasing the number of EOS, inducing apoptosis of EOS, enhancing Fas mRNA expression of EOS and reducing the content of GM-CSF and IL-5.

**Key words:** asthma; ibudilast; eosinophil; apoptosis

支气管哮喘 (简称哮喘) 是一种以嗜酸性粒细胞 (EOS)、肥大细胞反应为主的气道变应性炎症与气道反应性增高为特征性疾病。EOS 的聚集、活化是导致哮喘气道炎症的重要因素。近来研究发现, EOS 凋亡是消除 EOS 浸润为主的气道炎症的一条途

径。白三烯类 (LTs) 是一种强效炎症介质, 参与了哮喘的气道慢性炎症反应, 在哮喘发作中起关键作用。如能抑制 LTs 的合成或阻断 LTs 与其受体的结合, 可为支气管哮喘的预防和治疗提供新的途径。

异丁司特 (ibudilast) 是一种白三烯拮抗剂, 是新型非甾体类抗炎、抗哮喘药<sup>[1]</sup>。研究发现, 异丁司特能通过抑制炎性介质释放、扩张支气管、降低支气

收稿日期: 2009-02-03.

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-514-87978821, E-mail: hqzhangyz@126.com

管高反应性等拮抗哮喘或控制哮喘症状<sup>[2, 3]</sup>, 但其对哮喘豚鼠气道嗜酸性粒细胞凋亡影响的研究未见报道。本实验研究异丁司特对哮喘豚鼠气道嗜酸性粒细胞凋亡的作用及其机制, 为进一步阐明异丁司特拮抗哮喘作用机制及指导临床用药提供依据。

## 材料与方 法

**实验动物** Hartley 豚鼠 40 只, 雌雄各半, 体重 250~350 g, 由扬州大学实验动物中心提供。动物于实验前适应环境 1 周, 控制室温 20~22 °C, 给予充足的标准饲料和青菜饲养, 光照充分。

**药品与试剂** 异丁司特 (ibudilast) 由天津药物研究院提供 (临用前 0.5% 羧甲基纤维素钠配成所需浓度的混悬液); 地塞米松 (重庆药友制药有限责任公司); 卵白蛋白 (OVA, 美国 Sigma 公司); TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒 (瑞典 Pharmacia 公司); RT-PCR 试剂盒 (加拿大 BBI 公司); GM-CSF、IL-5 ELISA 检测试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司)。

**器材与仪器** YLS-8A 型多功能诱咳雾化仪, 山东医学科学院设备站; XDS-1B 型生物显微镜, 日本 Olympus 光学仪器有限公司; Model 550 型台式冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; LRH-250A 型生化培养箱, 广东省医疗器械厂; Biometra 梯度 DNA 扩增仪, 德国 Biotron 公司产品; Bio-Rad 550 型酶标仪, 日本 Bio-Rad 公司。

**哮喘模型的制备及分组** 实验动物随机分为 5 组 ( $n=8$ ): 正常对照组, 哮喘模型组, 异丁司特 10 和 30  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量组, 以及地塞米松 (DXM) 给药组 (10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。参照文献<sup>[4]</sup>方法并加以改进: 正常对照组以生理盐水代替卵白蛋白注射和雾化吸入, 激发前 2 h 灌胃 0.5% 羧甲基纤维素钠。其余各组于实验第 1 天给豚鼠腹腔注射 5% 卵白蛋白 (OVA) 1 mL, 同时双后肢分别肌内注射 5% 卵白蛋白 0.4 mL。第 15 天起用 1% 卵白蛋白雾化吸入激发哮喘, 每天 1 次, 连续 1 周, 以出现呛咳、憋喘、呼吸加快、点头运动等症状为激发成功, 每次激发时间不超过 30 s。模型组激发前 2 h 灌胃 0.5% 羧甲基纤维素钠, 异丁司特各剂量组激发前 2 h 分别灌胃不同剂量的药物, DXM 组激发前 2 h 腹腔注射 DXM 10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ <sup>[5]</sup>。

**BALF 白细胞计数和分类计数** 各组动物于最后一次引喘后 24 h 处死, 立即进行气管分离, 行气管插管, 用 pH 7.4 的缓冲液 5 mL 灌洗豚鼠支气管肺泡, 收集支气管肺泡灌洗液, 共 3 次, 每次回收率 90% 以

上。BALF 回收液 4 °C、1 200  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min 分离细胞, 离心沉淀细胞用生理盐水冲洗并调整细胞数为  $1.0\times 10^6/\text{L}$ , 在细胞计数板上计数细胞总数。

**嗜酸性粒细胞的分离** 在 5 mL 离心管中依次加入密度为 1.105、1.080  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 Percoll 液各 1 mL, 最后加入上述细胞悬液 1 mL。960  $\times g$  离心 15 min (20 °C), 离心完毕后, 回收不同密度 Percoll 液交界面的细胞层, 即为嗜酸性粒细胞。用 D-Hanks 液 1 500  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心洗涤 10 min, 洗涤 2 次后, 再分别用 D-Hanks 液 1 mL 重悬。取少许细胞于多聚赖氨酸处理过的载玻片上, 制备细胞涂片用于细胞凋亡检测。调整细胞数至约  $2\times 10^6/\text{mL}$ , 取 1 mL 进行 RT-PCR。

**TUNEL 检测嗜酸性粒细胞凋亡** 严格按照 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作, 以细胞核中有棕色颗粒者 (以 DAB 为底物) 为阳性细胞。由同一观察者在每张细胞涂片中随机选取 5 个高倍视野 ( $\times 200$  倍), 分别计数凋亡细胞数目, 计算每个视野中的细胞凋亡率 (凋亡细胞/细胞总数  $\times 100\%$ ), 计算平均值作为该切片的代表值。

**RT-PCR 检测 Fas mRNA 表达** Fas 上游引物: 5'-CAA GGG ACT GAT AGC ATC TTT GAG G-3'; Fas 下游引物: 5'-TGT GAA AGT CCA GAA CCC TAA GG-3', 扩增产物长度为 328 bp。 $\beta$ -Actin 上游引物: 5'-CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA C-3';  $\beta$ -actin 下游引物: 5'-AGG GTA CAT GTG GTG CCG CCA GA-3', 扩增产物长度为 587 bp。按试剂盒说明书完成操作, 运用 Bio-Rad 凝胶图像系统进行分析, 对电泳条带进行密度扫描, 计算 Fas 与内标  $\beta$ -actin 积分光密度的比值 (Fas/ $\beta$ -actin)。

**BALF 中 GM-CSF、IL-5 含量的测定** 酶联免疫吸附 (ELISA) 法测定 GM-CSF 及 IL-5 的含量, 具体方法严格按试剂盒说明书进行操作。

**统计学处理** 所有数据均用  $\bar{x}\pm s$  表示, 组间比较采用配对  $t$  检验。

## 结 果

### 1 异丁司特对哮喘豚鼠 BALF 中白细胞计数和分类计数的影响

哮喘模型组 BALF 中白细胞总数和 EOS 所占比例均明显升高, 与正常对照组比较有显著性差异 ( $P<0.01$ ); 异丁司特各剂量组能显著减少哮喘豚鼠 BALF 中白细胞总数和 EOS 所占比例, 与模型组比较有显著性差异 ( $P<0.01$ )。见表 1。

## 2 异丁司特对哮喘豚鼠嗜酸性粒细胞凋亡的影响

哮喘模型组豚鼠气道 EOS 凋亡明显减少, 凋亡指数显著低于正常对照组 ( $P < 0.01$ ); 给予异丁司特治疗后, 各剂量组凋亡细胞明显增多, 凋亡指数与哮喘模型组相比均有显著差异 ( $P < 0.01$ )。见表 2 和图 1。凋亡指数 = 凋亡细胞 / 细胞总数  $\times 100\%$ 。

**Table 1** Effect of ibudilast on leucocyte count in BALF of asthmatic guinea pigs

Group	Dose /mg·kg <sup>-1</sup>	Leucocyte /mL ( $\times 10^{-8}$ )	EOS/%	Neutrophil/%
Normal control	-	2.41 $\pm$ 0.08	1.55 $\pm$ 0.22	64.59 $\pm$ 1.53
Asthma control	-	11.19 $\pm$ 1.28**	15.38 $\pm$ 2.20**	86.53 $\pm$ 2.48**
Ibudilast	10	8.05 $\pm$ 0.98 <sup>△△</sup>	11.13 $\pm$ 1.99 <sup>△△</sup>	76.13 $\pm$ 1.57 <sup>△△</sup>
	30	5.51 $\pm$ 0.70 <sup>△△</sup>	8.99 $\pm$ 1.42 <sup>△△</sup>	69.82 $\pm$ 1.48 <sup>△△</sup>
DXM	10	4.52 $\pm$ 0.71 <sup>△△</sup>	8.81 $\pm$ 1.00 <sup>△△</sup>	65.70 $\pm$ 1.04 <sup>△△</sup>

BALF was recovered by flushing PBS 5 mL into lung via trachea for three times.  $n = 8$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs normal control group; <sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs asthma control group

**Table 2** Effect of ibudilast on apoptosis and Fas mRNA expression of eosinophil

Group	Dose /mg·kg <sup>-1</sup>	Apoptosis index of EOS /%	Fas/ $\beta$ -actin
Normal control	-	9.28 $\pm$ 0.33	0.92 $\pm$ 0.05
Asthma control	-	5.47 $\pm$ 0.88**	0.55 $\pm$ 0.04**
Ibudilast	10	7.38 $\pm$ 0.35 <sup>△△</sup>	0.74 $\pm$ 0.22 <sup>△△</sup>
	30	8.40 $\pm$ 0.26 <sup>△△</sup>	0.83 $\pm$ 0.05 <sup>△△</sup>
DXM	10	10.59 $\pm$ 1.75 <sup>△△</sup>	1.12 $\pm$ 0.10 <sup>△△</sup>

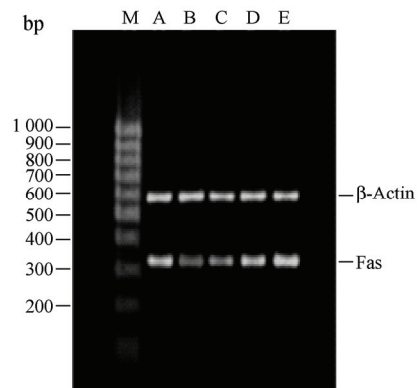
The apoptosis of eosinophil was labeled with TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) technique.  $n = 8$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs normal control group; <sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs asthma control group

## 3 异丁司特对哮喘豚鼠嗜酸性粒细胞 Fas mRNA 表达的影响

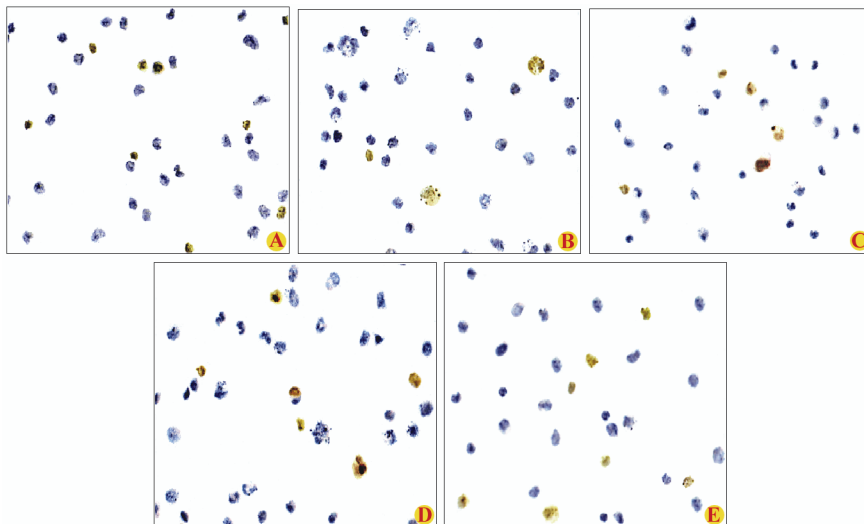
正常对照组 EOS 可检测到 Fas mRNA 表达, 哮喘模型组豚鼠气道嗜酸性粒细胞 Fas mRNA 表达明显减少; 给予异丁司特治疗后, 各剂量组 EOS 的 Fas mRNA 表达显著增加, 与哮喘模型组相比均有显著差异, 见表 2 和图 2。

## 4 异丁司特对哮喘豚鼠 BALF 中 GM-CSF、IL-5 含量的影响

哮喘模型组 BALF 中 GM-CSF、IL-5 含量明显升高, 与正常对照组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 异丁司特各剂量组能显著降低哮喘豚鼠 BALF 中 GM-CSF、IL-5 含量, 与模型组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。见表 3。



**Figure 2** Effect of ibudilast on Fas mRNA expression of eosinophil. Fas mRNA expression of eosinophil was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The 1.5% agarose gel was used for electrophoresis of the RT-PCR fragments of Fas mRNA and  $\beta$ -actin. M: DNA marker; A: Normal control; B: Asthma control; C: Ibudilast (10 mg·kg<sup>-1</sup>); D: Ibudilast (30 mg·kg<sup>-1</sup>); E: DXM (10 mg·kg<sup>-1</sup>)



**Figure 1** Effect of ibudilast on apoptosis of eosinophil in BALF by TUNEL. A: Normal control; B: Asthma control; C: Ibudilast (10 mg·kg<sup>-1</sup>); D: Ibudilast (30 mg·kg<sup>-1</sup>); E: DXM (10 mg·kg<sup>-1</sup>)

**Table 3** Effect of ibudilast on GM-CSF and IL-5 formation in BALF

Group	Dose/mg·kg <sup>-1</sup>	GM-CSF/ng·L <sup>-1</sup>	IL-5/ng·L <sup>-1</sup>
Normal control	-	85.32 ± 3.26	67.65 ± 2.15
Asthma control	-	187.48 ± 10.71**	141.70 ± 7.78**
Ibudilast	10	165.54 ± 9.94 <sup>△△</sup>	110.95 ± 6.57 <sup>△△</sup>
	30	104.32 ± 3.07 <sup>△△</sup>	83.53 ± 3.23 <sup>△△</sup>
DXM	10	98.89 ± 3.18 <sup>△△</sup>	73.77 ± 2.35 <sup>△△</sup>

$n=8$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs normal control group; <sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs asthma control group

## 讨论

支气管哮喘是一种气道慢性炎症性疾病。在哮喘气道炎症中,大量的炎性细胞(如嗜酸细胞、淋巴细胞、中性粒细胞、肥大细胞等)和多种炎性介质参与其病理过程。目前认为 EOS 是气道变应性炎症反应的主要效应细胞,其他细胞多数通过 EOS 而产生效应。EOS 聚集、活化及其释放高毒性阳离子蛋白在哮喘气道炎症的形成中发挥重要的作用<sup>[6,7]</sup>。细胞凋亡或称程序性细胞死亡,是人体重要的生理过程,对于维持机体稳定,如细胞的增殖、分化、迁移至关重要。研究发现嗜酸性粒细胞聚集增加和凋亡延迟是肺内 EOS 浸润的重要因素,而减少肺内 EOS 浸润则促进哮喘气道炎症的消退<sup>[8,9]</sup>。

Fas 抗原又称凋亡抗原、Apo-1 或 CD95,是一种跨膜糖蛋白,属肿瘤坏死因子受体超家族,具有很强的凋亡诱导作用。Fas 蛋白可在嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、中性粒细胞和单核细胞上表达。研究发现, EOS 可恒定地表达 Fas 抗原,抗 Fas 单抗在体外应用可加速 EOS 凋亡<sup>[10]</sup>。细胞因子 GM-CSF、IL-5 主要由 Th<sub>2</sub> 淋巴细胞产生,是促进 EOS 趋化、活化及释放炎性介质的细胞因子。GM-CSF、IL-5 在支气管哮喘中均见表达增加,它们通过抑制细胞凋亡而显著促进 EOS 生存,这至少在体外实验中获得大量证明<sup>[11]</sup>。

本研究结果表明,正常豚鼠气道 EOS 存在一定量的 Fas mRNA 表达,而哮喘豚鼠 EOS 表达 Fas 明显下降,同时细胞凋亡减少, BALF 中 EOS 数量以及 GM-CSF、IL-5 含量显著升高,与正常对照组相比均有显著差异;给予异丁司特治疗后, Fas 抗原表达增加, EOS 凋亡增多,细胞凋亡指数也升高, BALF 中 EOS 数量以及 GM-CSF、IL-5 含量也显著下降。说

明异丁司特可能通过抑制哮喘豚鼠气道 EOS 数目的增加、诱导 EOS 凋亡、增强 Fas mRNA 的表达、降低 GM-CSF、IL-5 含量,从而对哮喘起拮抗作用。

## References

- [1] Xiong SD, Liu HG, Zhang ZX, et al. A double blind, double dummy, randomized, controlled trial of ibudilast sustained-release capsule in treatment of asthma or chronic asthmatic bronchitis [J]. Chin New Drugs J (中国新药杂志), 2001, 10: 113-115.
- [2] Chihara J, Urayama O, Kayaba H, et al. Inhibitory effect of ibudilast (KC-404) on the expression of the  $\beta_2$  integrin family on an eosinophilic cell line (EoL-1) [J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 1998, 81: 448-450.
- [3] Ichinose M, Kimura K, Takahashi T, et al. Antiasthma drug, ibudilast, inhibits neurogenic plasma extravasation in guinea-pig airways [J]. Am Rev Respir Dis, 1993, 148: 431-434.
- [4] Zhang HQ, Lin AP, Ge XQ, et al. Effect of bambuterol on experimental asthma and its mechanism in guinea pigs [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther (中国临床药理学与治疗学), 2001, 6: 339-342.
- [5] Wen XN, Meng SX. Ibudilast, a new leukotriene antagonist and phosphodiesterase inhibitor [J]. Chin New Drugs J (中国新药杂志), 2004, 13: 1413-1417.
- [6] Harsha HK, Douglas SR. The role of eosinophils in airway tissue remodeling in asthma [J]. Curr Opin Immunol, 2007, 19: 681-686.
- [7] Kay AB. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma [J]. Trends Mol Med, 2005, 25: 140-146.
- [8] Oliver N, Gerald H, Dunja G, et al. Regulation of NGF and BDNF by dexamethasone and theophylline in human peripheral eosinophils in allergics and non-allergics [J]. Regul Peptide, 2005, 132: 74-79.
- [9] Walsh GM. Eosinophil apoptosis: mechanisms and clinical relevance in asthmatic and allergic inflammation [J]. Br J Haematol, 2000, 111: 61-67.
- [10] Segal M, Niazi S, Simons MP, et al. Bid activation during induction of extrinsic and intrinsic apoptosis in eosinophils [J]. Immunol Cell Biol, 2007, 85: 518-524.
- [11] Tai PC, Sun L, Spry CJ. Effect of IL-5, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IL-3 on the survival of human blood eosinophils *in vitro* [J]. Clin Exp Immunol, 1991, 85: 312-316.