

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.02.011

转化生长因子 $\beta 1$ 在呼吸道感染中的抗炎机理

纪 红, 郭威早, 严之红

(航天中心医院高干二科, 北京 100049)

【摘要】目的:探索转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF $\beta 1$) 的信号通路与呼吸道感染性炎症反应的关系以及对呼吸系统免疫功能的影响。**方法:**采用 2 级符合清洁动物标准的 BACB/C 小鼠建立铜绿假单胞菌感染模型, 以 LY364947 (4-[3-(2-嘧啶基)-1 氢-吡唑-4-基]-喹啉) 阻断 TGF $\beta 1$, 在 TGF $\beta 1$ 阻断和非阻断状态下观察感染动物模型的炎症反应以及肺组织的病理变化, 同时以 Western blot 分析细胞因子 CD4 和 CD8 含量的变化。**结果:**阻断 TGF $\beta 1$ 后, 小鼠肺组织中 p38 激酶的磷酸化减至对照组 10% 以下, 实验动物感染模型的炎症有所增强, CD4 水平显著升高 ($P=0.004$), 而 CD8 的水平无显著变化。**结论:**TGF $\beta 1$ 在呼吸道感染的炎症反应中具有抑制性调节作用, TGF $\beta 1$ 阻断可能会使呼吸道感染的免疫调节功能有所增强。

【关键词】转化生长因子 $\beta 1$; 呼吸道; 感染; 免疫调节

【中国图书分类法分类号】R562.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-07-09

Anti-inflammation mechanisms of transforming growth factor $\beta 1$ in experimental respiratory tract infection

JI Hong, GUO Weizao, YAN Zhihong

(the Second Department of Senior Officials, Aerospace Central Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate the relationship between transforming growth factor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) signaling pathway and respiratory tract infection induced inflammation and to explore the effects of TGF $\beta 1$ on immunological function of respiratory system. **Methods:** BACB/C mice fulfilling grade II clean animal criteria were artificially infected with pseudomonas aeruginosa while TGF $\beta 1$ was blocked with LY364947 (4-[3-(2-pyridinyl)-1H-pyrazol-4-yl]-quinoline). Inflammation reactions of the infected mice and pathological changes of pulmonary tissue were histochemically evaluated when TGF $\beta 1$ was blocked and unblocked respectively. CD4 and CD8 levels were tested through Western blot. **Results:** Blocking of TGF $\beta 1$ obviously blunted the phosphorylation of p38 (10% lower than the control levels), significantly intensified the inflammation reaction and increased the CD4 levels but didn't affect CD8 levels. **Conclusions:** TGF $\beta 1$ has inhibitory effect on respiratory tract infection induced inflammation and TGF $\beta 1$ blockers may enhance the immune regulation of respiratory tract infection.

【Key words】transforming growth factor $\beta 1$; respiratory tract; infection; immune regulation

转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF $\beta 1$) 是具有多种功能的蛋白质, 在细胞的生长和分化中发挥重要作用。TGF $\beta 1$ 的编码基因有多种名称及代号, 本文根据人类基因组命名委员会的命名, 采用国际标准代号 TGF $\beta 1$ 。TGF $\beta 1$ 与呼吸道及呼吸道感染所引发的炎症反应具有极为密切的关系, 并且这种关系背后的机制为呼吸道感染的治疗提供了一种全新的途径^[1]。研究观察即发现, 呼吸道上皮细胞表面黏液中的 TGF $\beta 1$ 相当于血浆中的 15 倍^[2]。随后的观察研究发现 TGF $\beta 1$ 在感染中重要的调节作用^[3], 但这种调节作用又表现出高度的复杂

性甚至矛盾的二维型^[4-5], 对其分子生物学机制的认识也不清楚。与此同时研究显示, TGF $\beta 1$ 与感染中的炎症反应及免疫功能改变表现出密切的相关^[6-7]。然而, 迄至目前, 对于 TGF $\beta 1$ 在呼吸道感染中的作用远未达成一致, 相应的分子机制也未阐述清楚。本研究通过分子信号传导的方法, 在实验性呼吸道感染中对 TGF $\beta 1$ 的分子病理学机制进行了探讨。

1 对象与方法

1.1 TGF $\beta 1$ 特异性阻断

4 周龄雄性 BACB/C 小鼠 12 只随机分为 2 组, 即对照组和阻断组, 每组 6 只。阻断组将 1 mg TGF $\beta 1$ 阻断剂 (批号: LY364947, 美国 Tocris Bioscience 公司) 以 5 ml DMSO 配成 0.2 g/L 的溶液, 按 1 mg/kg 给予腹腔注射, 隔天 1 次, 共注射

作者介绍: 纪 红, Email: renxinji@hotmail.com,

研究方向: 呼吸性疾病。

通信作者: 郭威早, Email: gwz501@hotmail.com。

基金项目: 航天中心医院 2010 院科研基金资助项目 (编号: 20100821)。

7次;对照组同期注射等量生理盐水。以 Western blot 的方法测定 TGF β 1 下游信号分子 p38 的磷酸化程度作为 TGF β 1 信号通路活动水平的指标,p38 磷酸化程度采用总 p38 和磷酸化 p38 的比率表示。TGF β 1 通路的信号强度与对照比下降 50% 为有效阻断。

1.2 呼吸道感染模型建立

所有小鼠在麻醉状态下行气管切开,以铜绿假单胞菌 PA61 菌株经培养收集后所制成的悬液(约 10^7 CFU/ml)50 μ l 定量滴入,缝合创口。小鼠苏醒后继续饲养 72 h,处死分离肺组织,部分置于甲醛固定液中保存用于组织化学观察分析,部分低温保存用于 Western blot 分析。

1.3 小鼠肺组织的组织化学观察

按常规方法进行小鼠肺组织的组织切片及染色,基本步骤如下:存于 10% 甲醛固定液的肺组织经 70% 和 80% 乙醇各脱水 1 次,再经 95% 和 100% 乙醇各脱水 2 次,然后经二甲苯透明化处理后进行石蜡浸透和包埋。3~5 μ m 厚切片后进行苏木精染色,再经伊红复染,切片以光学显微镜观察。

1.4 Western blot

Western blot 根据本组既往研究采用的方法进行^[9],针对肺组织特点进行适应性调整:将 100 mg 小鼠肺组织浸入 1 ml 0 $^{\circ}$ C 裂解缓冲液,匀浆后通过 Virtis 超声细胞粉碎仪进行超声剪切(该机强度设置为 2.0,1 s/次 $\times$ 10 次),以 14 000 $\times$ g 离心 5 min 去除不溶性沉渣。蛋白浓度测定采用 BCA 蛋白试剂盒(美国 Pierce 公司),以浓度为 8%~16% SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离,然后电转移至硝酸纤维素膜。硝酸纤维素膜上的非特异结合通过杂交液屏蔽。杂交液成分为:Tris 缓冲盐水(pH 7.5),0.1% 吐温 20,5% 脱脂牛奶。p38、磷酸化 p38、CD4 及 CD8 抗体(美国 Santa Cruz 公司),实验中以 1:500 稀释。次级抗体为辣根过氧化物酶耦联的抗小鼠(p38 和磷酸化 p38)抗体或抗山羊(CD4 和 CD8)抗体。免疫复合物使用 Amersham ECL 加强型试剂盒。Western blot 的定量分析采用 Syngene 凝胶建档及分析系统进行。

1.5 统计学方法

资料收集,一般统计计算(均值、标准差及标准误等)和统计作图采用美国 Microsoft 公司 Excel 2003 进行,双侧配对 t 检验采用 SPSS 11.5 进行。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧),以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 LY364947 对 TGF β 1 具有极显著阻断作用

以 Western blot 检测总 p38 和磷酸化 p38,对比荧光自显影吸光度获得磷酸化水平。经 TGF β 1 阻断剂 LY364947 处理后的小鼠,其肺组织中的磷酸化 p38 含量减至对照组的 10% 以下(图 1),停止注射后有缓慢上升,但在 1 周内回升不超过对照水平的 25%。

2.2 在 TGF β 1 阻断状态下,小鼠肺组织对于感染的炎症反应增强

经组织化学观察,相比对照组,TGF β 1 阻断组的炎性细胞渗出增多,肺泡表面的光滑度减低(图 2)。

TGF β 1 被阻断后,CD4 水平显著提高;感染 72 h 之后,

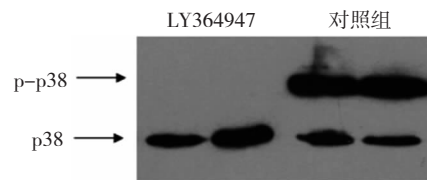


图 1 TGF β 1 阻断剂 LY364947 处理小鼠后 p38 磷酸化的变化
Fig.1 Changes in phosphorylation levels of p38 after treatment with TGF β 1 antagonist LY364947

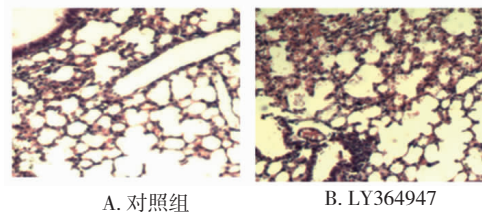


图 2 在 TGF β 1 被阻断 (LY364947) 和对照 (DMSO) 两种状态下,小鼠肺组织在铜绿假单胞菌实验性感染后的组织切片观察 (200 $\times$)

Fig.2 Observation on murine lung tissue slices after artificial infection of pseudomonas aeruginosa with TGF β 1 being blocked (LY364947) and without being blocked (DMSO) (200 $\times$)

经 Western blot 分析,阻断组小鼠肺组织的 CD4 水平较对照组提高了 $(160 \pm 60)\%$ ($P < 0.01$)。与此同时,CD8 在肺组织中的水平没有显著变化 ($P > 0.05$, 见图 3)。

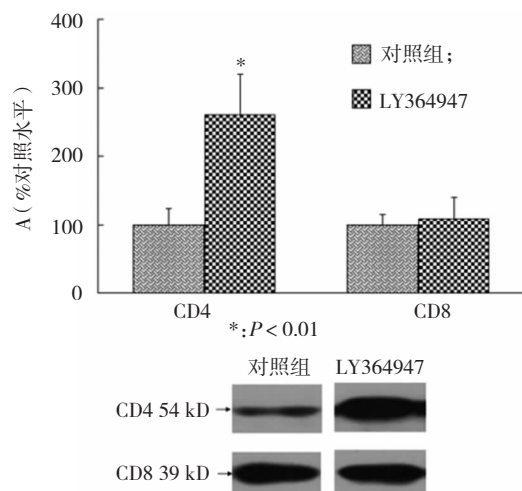


图 3 在 TGF β 1 被阻断 (LY364947) 和对照 (DMSO) 两种状态下,实验性感染小鼠肺组织中 CD4 及 CD8 水平的变化
Fig.3 Changes in levels of CD4 and CD8 after artificial lung infection in mice with TGF β 1 being blocked (LY364947) and without being blocked (DMSO) (200 $\times$)

3 讨 论

转化生长因子的研究非常广泛,但其与呼吸道感染关系研究较少。本研究基于铜绿假单胞菌实验性呼吸道感染小鼠,观察了 TGF β 1 对于感染引发炎

症的影响,并进一步探讨了相关的分子机制。本研究选择铜绿假单胞菌作为实验性感染的菌株,因为:①铜绿假单胞菌是肺感染研究中最具代表性的感染模型之一^[9];②临床呼吸道感染中,尤其是慢性感染,铜绿假单胞菌也是常见菌株之一^[10];③在实验技术上,该菌株是少数可以通过滴灌产生感染模型的菌株^[9],避免了复杂的技术操作并可减低研究成本。

LY364947(化学名为:4-[3-(2-噻啉基)-1-氢-吡唑-4-基]-喹啉)作为 TGFβ1 受体的特异性阻断剂,在本研究中对 TGFβ1 表现出极为显著的阻断作用,由此提供了 TGFβ1 功能存在和功能消失的 2 种对应状态,对观察 TGFβ1 在感染中的调节作用提供了对比极为鲜明的 2 种背景。在 TGFβ1 阻断的状态下,小鼠肺组织对实验性感染的炎症反应有所增强,与国外报道一致^[11]。由于在 TGFβ1 与炎症关系中,免疫调节功能是重要的一个方面^[12-14],本研究采用 Western blot 的方法分析了 2 个重要的免疫调节相关细胞因子 CD4 和 CD8。结果显示,TGFβ1 阻断状态下,CD4 水平大幅提高而 CD8 无显著改变。由于 CD4 主要存在于辅助性、调节性 T 细胞表面,所以与免疫调节关系密切。这一结果提示,TGFβ1 阻断的状态下,免疫调节功能具有明显增强的潜在可能性。

本研究结果也在一定程度上印证了 TGFβ1 在感染中调节作用的高度复杂性^[15]。在炎症反应方面,TGFβ1 的阻断后炎症反应有所强化,然而 CD4 的显著增高提示免疫调节功能有所增强。这里必须注意的是,在本研究中,TGFβ1 被阻断程度非常高,使 TGFβ1 远离了生理状态的水平,属于一种实验性极端状况。尽管对于研究结果更清晰的解读需要后续深入的研究,但现阶段的结果提示 TGFβ1 在呼吸道感染中的影响作用确定而重要。另一方面需要注意的是,炎症反应和抗感染既有联系又有明显的区别,TGFβ1 的阻断虽然导致了炎症反应的恶化,但也可能增加了肺组织的抗感染能力,因为 TGFβ1 的免疫抑制功能可能使抗感染能力减弱^[16]。而本研究结果中免疫调节功能的增强也提示肺组织抗感染的改善。

参 考 文 献

- [1] Niu N, Le Goff M K, Li F, et al. A novel pathway that regulates inflammatory disease in the respiratory tract[J]. *J Immunol*, 2007, 178(6): 3846-3855.
- [2] Yamauchi K, Martinet Y, Basset P, et al. High levels of transforming growth factor-β are present in the epithelial lining fluid of the normal human lower respiratory tract[J]. *Am Rev Respir Dis*, 1988, 137(6): 1360-1363.
- [3] Wahl S M, Costa G L, Mizel D E, et al. Role of transforming growth factor beta in the pathophysiology of chronic inflammation[J]. *J Periodontol*, 1993, 64(5s): 450-455.
- [4] Roberson E C, Tully J E, Guala A S, et al. Influenza induces endoplasmic reticulum stress, caspase-12-dependent apoptosis, and c-Jun N-terminal kinase-mediated transforming growth factor-β release in lung epithelial cells[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 46(5): 573-581.
- [5] Wahl S M. Transforming growth factor beta (TGF-β) in inflammation: a cause and a cure[J]. *J Clin Immunol*, 1992, 12(2): 61-74.
- [6] Ohno I, Nitta Y, Yamauchi K, et al. Transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) gene expression by eosinophils in asthmatic airway inflammation[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996, 15(3): 404-409.
- [7] Roman J, Jeon Y J, Gal A, et al. Distribution of extracellular matrices, matrix receptors, and transforming growth factor-β 1 in human and experimental lung granulomatous inflammation[J]. *Am J Med Sci*, 1995, 309(3): 124-133.
- [8] 纪红, 郭威早, 严之红. 洛伐他丁对心肌细胞外信号调节激酶信号传导水平及心脏营养素-1 表达的影响[J]. *中国临床医学*, 2011, 18(3): 310-313.
- [9] Ji H, Guo W Z, Yan Z H. Influence of Lovastatin on activity levels of myocardial ERK signaling transduction and expression of cardiotrophin-1[J]. *Chinese Journal of Clinical Medicine*, 2011, 18(3): 310-313.
- [10] Bakker-Woudenberg I A. Experimental models of pulmonary infection[J]. *J Microbiol Methods*, 2003, 54(3): 295-313.
- [11] Barbier M, Oliver A, Rao J, et al. Novel phosphorylcholine-containing protein of pseudomonas aeruginosa chronic infection isolates interacts with airway epithelial cells[J]. *J Infect Dis*, 2008, 197(3): 465-473.
- [12] Fattouh R, Midence N G, Arias K, et al. Transforming growth factor-β regulates house dust mite-induced allergic airway inflammation but not airway remodeling[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 177(6): 593-603.
- [13] Haneda K, Sano K, Tamura G, et al. Transforming growth factor-β secreted from CD4(+) T cells ameliorates antigen-induced eosinophilic inflammation: a novel high-dose tolerance in the trachea[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999, 21(2): 268-274.
- [14] Thornburg N J, Shepherd B, Crowe J E Jr. Transforming growth factor beta is a major regulator of human neonatal immune responses following respiratory syncytial virus infection[J]. *J Virol*, 2010, 84(24): 12895-12902.
- [15] Weehuizen T A, Wieland C W, van der Windt G J, et al. Expression and function of transforming growth factor beta in melioidosis[J]. *Infect Immun*, 2012, 80(5): 1853-1857.
- [16] Wahl S M. Transforming growth factor-β: innately bipolar[J]. *J Clin Immunol*, 2007, 19(1): 61-74.
- [17] Williams A E, Humphreys I R, Cornere M, et al. TGF-β prevents eosinophilic lung disease but impairs pathogen clearance[J]. *Microbes Infect*, 2005, 7(3): 365-374.

(责任编辑: 关蕴良)