

## TIM-1 对哮喘小鼠气道 MUC5AC 及 Th2 细胞因子表达的影响

强丽霞<sup>1</sup>, 金寿德<sup>2</sup>, 唐 昊<sup>1</sup>, 李 兵<sup>1</sup>, 修清玉<sup>1</sup>, 石昭泉<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学长征医院呼吸内科, 上海 200003

2. 哈尔滨医科大学附属第四医院呼吸内科, 哈尔滨 150001

**[摘要]** **目的** 研究 T 细胞免疫球蛋白-黏蛋白-1(TIM-1)表达对哮喘小鼠气道 MUC5AC 及 Th2 细胞因子的作用, 探讨气道黏液高分泌的机制。**方法** 30 只健康雌性 C57BL/6 小鼠, 按随机数字表法分为正常、哮喘模型组(哮喘组)和哮喘模型+TIM-1 抗体处理组(TIM-1 抗体组), 每组 10 只。检测小鼠外周血单个核细胞(PBMCs)TIM-1<sup>+</sup>细胞比例、气道 MUC5AC mRNA 表达、肺泡灌洗液(BALF)中 IL-13、IL-4、IL-5 水平及黏液细胞数量和细胞体积的改变。**结果** (1)哮喘组及 TIM-1 抗体组小鼠外周血 PBMCs 中 TIM-1<sup>+</sup>细胞比例(11.20%, 5.11%)均高于正常组(0.64%,  $P < 0.05$ ), 且 TIM-1 抗体组低于哮喘组( $P < 0.05$ )。(2)哮喘组及 TIM-1 抗体小鼠气道黏液细胞 MUC5AC mRNA 相对表达( $17.3 \pm 1.4$ ,  $5.6 \pm 0.3$ )及 IL-13 [ $16.80 \pm 0.63$  ng/ml, ( $5.70 \pm 0.64$ ) ng/ml]、IL-4 [ $614.72 \pm 117.39$  pg/ml, ( $325.78 \pm 86.54$ ) pg/ml]、IL-5 [ $1681.13 \pm 613.55$  pg/ml, ( $513.42 \pm 86.87$ ) pg/ml]水平均高于正常组[ $1.09 \pm 0.25$  ng/ml, ( $17.56 \pm 3.01$ ) pg/ml, ( $30.78 \pm 9.67$ ) pg/ml], TIM-1 抗体组小鼠上述指标低于哮喘组( $P < 0.05$ )。(3)气道 MUC5AC 及 IL-13 表达与 TIM-1<sup>+</sup>细胞表达均呈正相关( $r_1 = 0.946$ ,  $P_1 = 0.004$ ;  $r_2 = 0.984$ ,  $P_2 = 0.000$ )。**结论** 哮喘小鼠外周血 TIM-1<sup>+</sup>细胞升高, 可致气道黏液过度分泌; 抑制 TIM-1 表达可减少哮喘气道黏液高分泌。调节 TIM-1 表达有可能成为减少黏液高分泌及治疗哮喘的新途径。

**[关键词]** T 细胞免疫球蛋白-黏蛋白-1; MUC5AC; Th2 细胞因子; 哮喘

**[中图分类号]** R 562.25

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2012)06-0581-04

### Effect of T cell Ig and mucin 1 on expression of MUC5AC and Th2 cytokine in airway of asthmatic mice

QIANG Li-xia<sup>1</sup>, JIN Shou-de<sup>2</sup>, TANG Hao<sup>1</sup>, LI Bing<sup>1</sup>, XIU Qing-yu<sup>1</sup>, SHI Zhao-quan<sup>1\*</sup>

1. Department of Respiratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Department of Respiratory Medicine, Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of T cell Ig and mucin 1 (TIM-1) on MUC5AC and Th2 cytokine expression in the airway of asthmatic mice, so as to understand the mechanism of airway mucus hypersecretion. **Methods** Thirty healthy female C57BL/6 mice were randomly divided into control, asthmatic and TIM-1 mAb treated groups, with 10 mice in each group. The proportion of TIM-1 positive cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), MUC5AC mRNA expression in the airway, levels of IL-13, IL-4 and IL-5 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and the number and volume of airway mucous cells were examined in the three groups. **Results** The proportions of PBMCs TIM-1 positive cells in asthmatic(11.20%) and TIM-1 mAb treated (5.11%) mice were significantly higher than that in the control group (0.64%,  $P < 0.05$ ), and that in TIM-1 mAb treated mice was significantly lower than that in the asthmatic mice ( $P < 0.05$ ). (2) MUC5AC mRNA expression in the airway mucous cells in the asthmatic ( $17.3 \pm 1.4$ ) and TIM-1 mAb treated ( $5.6 \pm 0.3$ ) mice were significantly higher than that in control mice ( $P < 0.05$ ). The BALF levels of IL-13 (ng/ml), IL-4 (pg/ml), and IL-5 (pg/ml) were  $16.80 \pm 0.63$ ,  $614.72 \pm 117.39$ , and  $1681.13 \pm 613.55$  in the asthmatic, and were  $5.70 \pm 0.64$ ,  $325.78 \pm 86.54$ , and  $513.42 \pm 86.87$  in TIM-1 mAb treated mice, respectively, which were all significantly higher than those in the control mice ( $[1.09 \pm 0.25]$  ng/ml for IL-13,  $[17.56 \pm 3.01]$  pg/ml for IL-4, and  $[30.78 \pm 9.67]$  pg/ml for IL-5,  $P < 0.05$ ). And all the above parameters in the TIM-1 mAb treated mice were significantly lower than those in the asthmatic mice ( $P < 0.05$ ). (3) MUC5AC and IL-13 expression in the airway was positively correlated with TIM-1 positive cells in asthmatic mice ( $r_1 = 0.946$ ,  $P_1 = 0.004$ ;  $r_2 = 0.984$ ,  $P_2 = 0.000$ ). **Conclusion** TIM-1 positive cells are increased in PBMCs in asthmatic mice,

**[收稿日期]** 2012-02-20

**[接受日期]** 2012-04-27

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30670912), 上海市自然科学基金(11ZR1448600). Supported by National Natural Science Foundation of China (30670912) and Natural Science Foundation of Shanghai (11ZR1448600).

**[作者简介]** 强丽霞, 硕士生. E-mail: lx.qiang@163.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885323, E-mail: zshi2005@yahoo.com.cn

which can result in airway mucous cell metaplasia and mucus hypersecretion. Inhibition of TIM-1 expression can reduce mucus hypersecretion. Regulation of TIM-1 might be a novel approach for asthma treatment.

[Key words] T cell Ig and mucin 1; MUC5AC; Th2 cytokines; asthma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(6): 581-584]

支气管哮喘(简称哮喘)是由环境因素和个体多基因因素共同作用下的气道慢性炎症性疾病。哮喘时的气道黏液高分泌是其重要的病理生理特征,也常常是导致哮喘急性发病并致死的主要原因<sup>[1]</sup>。气道黏液细胞(主要为杯状细胞)是合成和分泌黏液的主要细胞;哮喘时的黏液细胞增殖和化生是哮喘气道重塑的重要组成部分。黏液的主要成分是黏蛋白,其中黏蛋白5AC(MUC5AC)基因的过度表达是哮喘时黏液细胞化生及黏液高分泌的主要原因<sup>[2]</sup>。哮喘时 MUC5AC 表达水平明显上调<sup>[3]</sup>。T 细胞免疫球蛋白-黏蛋白-1(T cell Ig and mucin 1, TIM-1) 基因是近年新发现的哮喘易感基因,主要表达于活化的 CD4<sup>+</sup> T 细胞,并优势表达于 Th2 细胞,调节 Th2 细胞因子生成,在哮喘发生发展中起重要作用<sup>[4]</sup>。IL-13 被认为是重要的 Th2 细胞因子,介导黏蛋白 MUC5AC 表达,对气道黏液过度分泌起关键性作用<sup>[5]</sup>。本研究通过分析小鼠哮喘模型经鼻滴注 TIM-1 抗体后外周血单个核细胞(PBMCs)中 TIM-1 表达对分泌 Th2 细胞因子水平及肺组织 MUC5AC mRNA 表达的影响,探讨调节 TIM-1 表达对气道黏液高分泌及在哮喘治疗中的作用。

## 1 材料和方法

1.1 动物分组及处理 30 只 6 周龄清洁级健康雌性 C57BL/6 小鼠,购买并饲养于第二军医大学实验动物中心,体质量(18±2) g,按随机数字表法分为 3 组,即正常组、哮喘组和 TIM-1 抗体组,每组 10 只。哮喘模型建立参照文献<sup>[6]</sup>方法并加以改进。哮喘组和 TIM-1 抗体组均在第 1 天和第 8 天分别腹腔注射 0.5 ml 含 20 μg 卵蛋白(OVA, V 级,美国 Sigma 公司)及 2 mg 氢氧化铝凝胶(美国 Pierce 公司)的磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)进行致敏。从第 15 天起将小鼠置于 45 cm×16 cm×16 cm 大小的雾化箱,通过超声雾化器(中国江苏,鱼跃 402AD)向雾化箱中注入 2.5% 的 OVA 溶液雾化 30 min 进行激发,每天 1 次,连续 3 d。正常组以 PBS 代替 OVA 腹腔注射和雾化吸入。TIM-1 抗体组在末次激发后 3 d(第 21 天)经鼻腔滴注 100 μg 小鼠 TIM-1 抗体(clone 222414, R&D) 50 μl,哮喘组和正常组分别滴注等容积 100 μg 同种对照大鼠 IgG<sub>2B</sub> 抗体(clone 141945, R&D)。

1.2 流式细胞仪检测外周血 PBMCs 中 TIM-1<sup>+</sup> 细胞比例 经鼻滴注上述液体 24 h 后,摘除小鼠眼球取血,收集于枸橼酸钠抗凝管中。取离心管加 0.5 ml 淋巴细胞分离液;缓慢加入血样;2 240×g 离心 20 min;吸出白膜层,加入 PBS 中,1 028.8×g 离心 5 min;弃上清后加入生物素标记的抗小鼠 TIM-1 抗体(eBioscience) 1 μl,4℃ 孵育 1 h;加 1 ml PBS,2 240×g 离心 3 min,重复 2 次;加入藻红蛋白-抗生物素(PE)结合的二抗(eBioscience) 1 μl,4℃ 孵育 1 h;加 1 ml PBS,2 240×g 离心 3 min,重复 2 次;根据 BD FACS-Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)操作流程检测细胞悬液中 TIM-1<sup>+</sup> 细胞比例。

1.3 ELISA 检测肺泡灌洗液中 IL-13、IL-4、IL-5 表达 放血后的小鼠,固定于实验台,切开颈部皮肤,暴露气管,进行气管切开、气管插管,将 1.5 ml 冷生理盐水分 3 次缓慢注入肺内,并缓慢回吸收,获得肺泡灌洗液(BALF),将其收集于 1.5 ml EP 管中,经 1 029×g 离心 10 min,收集上清液,ELISA 法检测细胞因子的表达水平。采用小鼠 Quantikine(美国 R&D)试剂盒检测 IL-13 的表达;根据试剂盒(Invitrogen)操作说明,分别检测 IL-4 和 IL-5 的表达水平。

1.4 阿尔辛蓝-过碘酸雪夫(AB-PAS)染色分析气道黏液细胞 分离肺组织,将右肺置于液氮中备用,甲醛溶液固定左肺。固定好的左肺叶切成约 0.3 cm 厚组织切片,石蜡包埋后制成厚约 5 μm 的组织切片,脱蜡、脱水,AB-PAS 染色,观察气道黏液细胞(显示为蓝紫色)。

1.5 实时 RT-PCR 检测 MUC5AC mRNA 表达 取液氮保存的肺组织,采用 TRIzol 试剂(美国 Gibco 公司)提取各组小鼠肺组织总 RNA。取 2 μg RNA 反转录合成 cDNA,其中 4 μl cDNA 为模板,扩增 MUC5AC。反应条件:94℃ 预变性 2 min 后,94℃ 变性 45 s,52℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min。取 3 μl 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(EB)显色,以 β 肌动蛋白(β-actin)为内参照,MUC5AC 与 β-actin 光密度的比值作为 MUC5AC mRNA 的相对含量进行半定量分析。MUC5AC 引物序列:正义 5'- CAG CAT CAT CAA CAG CGA AAC-3', 反义 5'- TAG TCA CAG AAC AGT GGG CAG A-3'; β-actin 引物序列:正义 5'- CAT TGT GAT GGA CTC CGG AGA CGG-3', 反义

5'-CAT CTC CTG CTC GAA GTC TAG AGC-3'。引物均由上海科医联创生物科技有限公司合成。

1.6 统计学处理 所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 16.0 统计软件处理数据, 各组计数资料采用  $\chi^2$  检验, 计量数据采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间两两比较采用 LSD 法。两变量的相关性分析采用等级 Pearson 相关法。检验水平 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 外周血 PBMCs 中 TIM-1<sup>+</sup> 细胞比例 流式细胞术检测结果显示, 哮喘组小鼠 PBMCs TIM-1<sup>+</sup> 细胞比例 (11.20%) 高于正常组小鼠 (0.64%), TIM-1 抗体组小鼠 PBMCs 中 TIM-1<sup>+</sup> 细胞比例为 5.11%, 低于哮喘组 ( $P < 0.05$ , 图 1)。

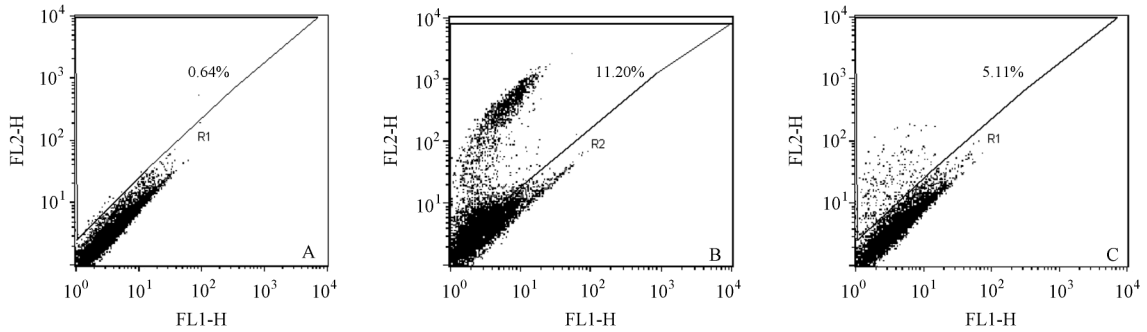


图 1 小鼠 TIM-1 抗体对外周血单个核细胞 TIM-1<sup>+</sup> 细胞比例的影响

Fig 1 Effect of mouse TIM-1 antibody on TIM-1<sup>+</sup> cell ratio in peripheral blood mononuclear cells

A: Normal mouse; B: Asthmatic mouse; C: TIM-1 mAb treated mouse

2.2 BALF 中 IL-13、IL-4 和 IL-5 的表达 哮喘小鼠 BALF 中 IL-13、IL-4 和 IL-5 的表达分别为 (16.80 ± 0.63) ng/ml、(614.72 ± 117.39) pg/ml、(1 681.13 ± 613.55) pg/ml, 较正常组 [(1.09 ± 0.25) ng/ml、(17.56 ± 3.01) pg/ml、(30.78 ± 9.67) pg/ml] 升高 ( $P < 0.05$ ); 滴入 TIM-1 抗体组小鼠 BALF 中 IL-13、IL-4 和 IL-5 的表达分别下降为 (5.70 ± 0.64) ng/ml、(325.78 ± 86.54) pg/ml、

(513.42 ± 86.87) pg/ml, 与哮喘组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

2.3 气道上皮黏液细胞改变 如图 2 所示, 正常小鼠气道上皮细胞极少被染成蓝紫色, 说明黏液细胞极少 (图 2A); 哮喘组小鼠气道可见大量上皮细胞被染成蓝紫色 (图 2B, 箭头所示), 且细胞体积较大; TIM-1 抗体组小鼠气道上皮被染成蓝紫色的细胞较哮喘组小鼠明显减少 (图 2C)。

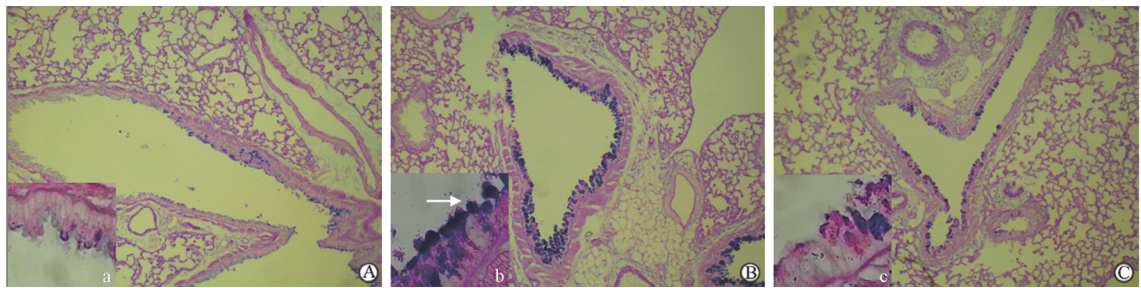


图 2 气道上皮黏液细胞病理图片

Fig 2 Pathological findings of airway epithelial mucus cells (AB-PAS staining)

A, a: Normal mouse; B, b: Asthmatic mouse. Mucous cells were stained to amethyst with large volume (arrowhead); C, c: TIM-1 mAb mouse. Original magnification: ×200(A, B, C); ×400(a, b, c)

2.4 MUC5AC mRNA 表达 结果显示, 哮喘组和 TIM-1 抗体组的小鼠肺组织 MUC5AC mRNA 水平均高于正常组 (17.26 ± 1.43, 5.57 ± 0.26 vs 1.0,  $P < 0.05$ ), 且 TIM-1 抗体组低于哮喘组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

2.5 相关性分析 实验结果显示, 哮喘组小鼠 PBMCs 中 TIM-1<sup>+</sup> 细胞比例与 BALF 中 IL-13 水平及肺组织中 MUC5AC 表达水平呈正相关性 ( $r_1 = 0.946, P_1 = 0.004; r_2 = 0.984, P_2 = 0.000$ )。

### 3 讨论

气道黏液高分泌是哮喘的主要病理生理特征之一。黏液分泌过度不仅阻塞气道、加重呼吸道感染,更易致病情恶化,甚至导致哮喘患者死亡<sup>[1]</sup>。黏液的主要组分是黏蛋白、水、离子和脂类。黏蛋白的含量决定了黏液的黏稠度。黏蛋白的合成由黏蛋白基因调控,目前已识别出的黏蛋白基因有20余种,气道黏蛋白的合成主要由MUC5AC和MUC5B调控,尤以MUC5AC为主<sup>[7-8]</sup>,甚至有研究显示,在哮喘小鼠模型,MUC5AC是唯一明显增高的黏蛋白基因<sup>[9]</sup>。Th2细胞因子可引起气道炎症、黏液过度分泌及黏蛋白MUC5AC表达增高或改变,在哮喘发生发展中起关键性作用<sup>[10]</sup>,构成了哮喘时的气道重塑组分<sup>[11]</sup>。

TIM-1最初发现于甲型肝炎和肾脏损伤者,是TIM家族中最先被鉴定出的成员。尽管已经确认,TIM-1是哮喘的易感基因之一<sup>[2]</sup>,与哮喘的发病密切相关,但其与哮喘时黏液高分泌的相关性尚不清楚。本研究应用经鼻滴注抗体方式对哮喘小鼠进行干预,观察TIM-1抗体对Th2细胞因子、黏蛋白MUC5AC表达及黏液细胞的影响。结果显示,抗原诱导的哮喘小鼠模型PBMCs中TIM-1<sup>+</sup>细胞比例较正常小鼠明显升高,BALF中Th2细胞因子、肺组织MUC5AC mRNA表达及气道黏液细胞明显升高。经鼻滴入TIM-1特异抗体24h后,上述指标均显著下降。本实验结果与国外实验结果相似<sup>[13]</sup>,Encinas等<sup>[13]</sup>研究小组发现通过腹腔注射小鼠TIM-1抗体可降低哮喘小鼠气道Th2炎症反应。本实验不仅证实了TIM-1抗体可抑制Th2细胞因子生成、黏蛋白基因表达,且改变了传统腹腔注射的方式,采用鼻腔滴注局部给药方式,作用快、用量少。

本实验与以往基因治疗研究不同,着眼于Th2细胞分化上游,通过TIM-1抗体抑制TIM-1<sup>+</sup>表达,直接抑制CD4<sup>+</sup>T细胞向Th2细胞分化,减少Th2细胞因子的形成,减轻气道的炎症反应;并通过抑制MUC5AC表达减少气道黏液细胞化生,减轻哮喘气道重塑,对哮喘的治疗尤其对减少黏液高分泌具有更优越的意义。

### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

### [参考文献]

- [1] Kuyper L M, Paré P D, Hogg J C, Lambert R K, Ionescu D, Woods R, et al. Characterization of airway plugging in fatal asthma[J]. *Am J Med*, 2003, 115: 6-11.
- [2] Rose M C, Voynow J A. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease[J]. *Physiol Rev*, 2006, 86: 245-278.
- [3] Evans C M, Kim K, Tuvim M J, Dickey B F. Mucus hypersecretion in asthma: causes and effects [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2009, 15: 4-11.
- [4] Freeman G J, Casanovas J M, Umetsu D T, DeKruyff R H. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity[J]. *Immunol Rev*, 2010, 235: 172-189.
- [5] Whittaker L, Niu N, Temann U A, Stoddard A, Flavell R A, Ray A, et al. Interleukin-13 mediates a fundamental pathway for airway epithelial mucus induced by CD4 T cells and interleukin-9[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 27: 593-602.
- [6] Lee M Y, Seo C S, Lee N H, Ha H, Lee J A, Lee H, et al. Anti-asthmatic effect of schizandrin on OVA-induced airway inflammation in a murine asthma model [J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10: 1374-1379.
- [7] Kirkham S, Sheehan J K, Knight D, Richardson P S, Thornton D J. Heterogeneity of airways mucus: variations in the amounts and glycoforms of the major oligomeric mucins MUC5AC and MUC5B [J]. *Biochem J*, 2002, 361(Pt 3): 537-546.
- [8] Tan Y F, Zhang W, Yang L, Jiang S P. The effect of formoterol on airway goblet cell hyperplasia and protein Muc5ac expression in asthmatic mice [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Scil*, 2011, 15: 743-750.
- [9] Young H W, Williams O W, Chandra D, Bellinghausen L K, Pérez G, Suárez A, et al. Central role of Muc5ac expression in mucous metaplasia and its regulation by conserved 5' elements [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 37: 273-290.
- [10] Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis [J]. *Immunol Rev*, 2004, 202: 175-190.
- [11] Grainge C L, Lau L C, Ward J A, Dulay V, Lahiff G, Wilson S, et al. Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma [J]. *N Engl J Med*, 2011, 364: 2006-2015.
- [12] Rodriguez-Manzanet R, DeKruyff R, Kuchroo V K, Umetsu D T. The costimulatory role of TIM molecules [J]. *Immunol Rev*, 2009, 229: 259-270.
- [13] Encinas J A, Janssen E M, Weiner D B, Calarota S A, Nieto D, Moll T, et al. Anti T-cell Ig and mucin domain containing protein 1 antibody decreases TH2 airway inflammation in a mouse model of asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116: 1343-1349.

[本文编辑] 尹 茶