

血栓素 A_2 在抗原引起气道嗜酸性粒细胞浸润中的作用

The Role of Thromboxane A_2 in Antigen-induced Eosinophil Infiltration into the Airways

阳显惠 柳广南 许辉 邱正蓉

Yang Xianhui Liu Guangnan Xu Hui Qiu Zhengrong

(广西医科大学第一附属医院呼吸内科 南宁市滨湖路 6号 530021)

(Department of Respiratory, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical Univ., 6 Binhulu, Nanning, 530027)

摘要 为观察血栓素 A_2 (TX A_2) 合成酶抑制剂 OKY-046及 TX A_2 受体拮抗剂 S-1452对嗜酸性粒细胞 (EOS) 浸润气道的影响, 探讨 TX A_2 在 EOS浸润过程的作用, 应用鸡卵白蛋白 (OVA) 致敏和反复雾化吸入刺激小鼠以复制过敏性气道炎症模型。除对照组外, 各实验组小鼠于每天 OVA刺激前分别给予不同剂量 OKY-046或 S-1452腹腔注射, 计数支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中 EOS数量并测定 BALF中 TXB₂ 和 6-酮-前列腺素 F_{1 α} (6-Keto-PGF_{1 α}) 水平。结果, 致敏小鼠给予 OVA刺激后 BALF中 EOS数, TXB₂ 和 6-Keto-PGF_{1 α} 水平均显著升高, 当以 OKY-046或 S-1452处理后, BALF中的 EOS明显减小, 并呈剂量相关性, 而且 OKY-046尚能引起 TXB₂ 水平呈剂量相关性降低。表明, TX A_2 对于 EOS浸润到呼吸道具有明显的趋化作用, 其合成酶抑制剂或受体拮抗剂对于临床治疗哮喘者可能会具有重要的价值。

关键词 血栓素 哮喘 嗜酸性粒细胞 趋化因子 动物实验

中图分类号 R 562.25; R-332

Abstract To investigate the effects of a thromboxane (TX) A_2 synthetase inhibitor OKY-046 and TX A_2 receptor antagonist S-1452 on antigen-induced eosinophil infiltration into the airways, and study the role of TX A_2 in this infiltration process, the BALB/c mouse model of asthma was established by immunizing and then challenging the animals with 5% ovalbumin (OVA) repeatedly. The experimental groups were treated with different doses of OKY-046 or S-1452 respectively before OVA treatment, except the normal control groups. The numbers of eosinophil in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from each group were counted, and the concentrations of TXB₂ and 6-Keto-PGF_{1 α} were detected. The numbers of eosinophil and the concentrations of TXB₂ and 6-Keto-PGF_{1 α} in BALF of asthma groups were increased significantly in mice pretreated with OKY-046 or S-1452, producing a dose-related decrease in eosinophil numbers, and in mice retreated with OKY-046, also producing a dose-related decrease in TXB₂ concentrations. It suggests that thromboxane A_2 is chemotactic to which the eosinophils infiltrate into the airways. Thromboxane synthetase inhibitor and thromboxane receptor antagonist will be of great value in treatment of asthmatics.

Key words thromboxane, asthma, eosinophil, chemotactic factor, animal experiment

嗜酸性粒细胞 (EOS) 在支气管哮喘气道的炎症过程中所起的作用越来越受到重视。一些 EOS颗粒蛋白如主要碱基蛋白等可以损害人气道上皮细胞并促使气道反应性增高, 还可直接引起气道平滑肌收缩。近年来也注意到血栓素 A_2 (TX A_2) 对气道平滑

肌也具有较弱的收缩作用^[2], 因而认为 TX A_2 也参与了哮喘的发病过程, 但关于 TX A_2 和 EOS浸润气道之间的关系的研究, 国外报道甚少, 国内则尚未见到, 在本研究中, 我们应用鸡卵蛋白 (OVA) 致敏和刺激小鼠以复制过敏性气道炎症模型, 探讨了一种 TX A_2 合成酶选择性抑制剂 OKY-046{ (E)-3-[4-(1-imidazolymethyl) phenyl] phenyl } -2-propenoid acid hy-

drochloride monohydrate} 以及一种 TXA₂ 受体拮抗剂 S-1452 于 [calcium (IR, 2S, 3S, 4S) - (5Z) - 7- ((phenylsulphony) amino) bicyclo - [2. 2. 1] hept-2yl) hept-s-enoate dihydrate] 对抗原引起气道 EOS 浸润的影响, 最终目的在于为临床治疗哮喘患者提供新的途径

1 材料和方法

1.1 动物模型复制

按照我们以前所报道的方法^[3]给 6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠腹腔注射 OVA (购自美国 Sigma 公司) 10⁶ g 及氢氧化铝 20 mg (悬于 0.2 mL 生理盐水中), 2 周后再注射 1 次同样药物及剂量, 第 2 次注射 2 周后将每只小鼠单独置于 50 mL 塑料管中, 给以 5% OVA (溶于生理盐水) 雾化吸入刺激, 每天 20 min, 共 6 d 雾化动力由 7L/min 的压缩空气提供

1.2 动物分组与给药方法

48 只小鼠随机分为 8 组, 每组 6 只, 阴性对照组以生理盐代替 OVA 致敏和刺激小鼠; 阳性对照组给予 OVA 致敏和刺激, 但不给 OKY-046 或 S-1452 用药 (以生理盐水代之); 取 3 组小鼠作 OKY-046 治疗组, 此 3 组每天于雾化前分别给予 1 mg/kg, 10 mg/kg 和 100 mg/kg 剂量的 OKY-046 的腹腔注射; 余下的 3 组为 S-1452 治疗组, 雾化前分别给予 0.2 mg/kg, 2 mg/kg 和 20 mg/kg 剂量的 S-1452 腹腔注射。OKY-046 和 S-1452 均为日本大阪小野药品株式会社产品。

1.3 BALF 收集和 EOS 计数

最后一次刺激 24 h 后将小鼠处死, 各组小鼠均以一小导管形气管插管, 用生理盐水反复进行冲洗直至收集到 2 mL BALF。计数 BALF 中有核细胞总数 (至少计数 300 个细胞) 并进行细胞分类, 最后计算出 EOS 数。

1.4 TXB₂ 和 6-Keto-PGF_{1α} 水平测定

TXB₂ 和 6-Keto-PGF_{1α} 水平的测定采用放射免疫测定法, 两者的放免测定药盒均购自解放军总医院东亚免疫技术研究所, 并按药盒的附说明书进行操作。

1.5 统计学处理

数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 各组资料比较采用方差分析和 *q* 检验

2 结果

各组 BALF 和 EOS 数, TXB₂ 和 6-Keto-PGF_{1α} 水平见表 1

可以看出, 正常小鼠未给抗原致敏和刺激时, 其

BALF 见不到 EOS, 测不到 TXB₂, 6-Keto-PGF_{1α} 水平也相当低; 致敏小鼠给予 OVA 刺激后 BALF 中 EOS 随即大量增多, TXB₂ 和 6-Keto-PGF_{1α} 水平亦相应升高; 我们还可以看出, 当给予 OKY-046 或 S-1452 腹腔注射后 BALF 中的 EOS 随之减少, 并且均呈明显的剂量相关性 此外, OKY-046 尚可引起 TXB₂ 呈剂量相关性降低

表 1 各组 BALF 中 EOS 数, TXB₂ 和 6-Keto-PGF_{1α} 水平的比较

Table 1 The comparison of Eos number, TXB₂ and 6-Keto-PGF_{1α} in BALF

组别 Group	EOS ($\times 10^8$ /L)	TXB ₂ (ng/L)	6-Keto-PGF _{1α} (ng/L)
阴性对照组 Negative Control			272 ± 112.9 [†]
阳性对照组 Positive control	6.53 ± 0.64	216.9 ± 32.1	536.9 ± 143.5
OKY-046 治疗组 Therapy of OKY-046			
1 mg/kg	4.79 ± 0.57	166.6 ± 28.9	515.2 ± 138.4
10 mg/kg	3.95 ± 0.45 [*]	124.8 ± 28.8	521.0 ± 136.3
100 mg/kg	2.94 ± 0.39 ^{**}	80.7 ± 26.5 [*]	451.1 ± 123.1
S-1452 治疗组 Therapy of S-1452			
0.2 mg/kg	5.18 ± 0.50 [†]	197.7 ± 32.3 [†]	543.0 ± 130.0
2 mg/kg	3.29 ± 0.52 [*]	188.3 ± 27.7	562.8 ± 115.6
20 mg/kg	2.23 ± 0.59 ^{**}	179.2 ± 33.5 [*]	556.7 ± 102.8

各组与阳性对照比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with positive control * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论

TXA₂ 是花生四烯酸经环氧化酶途径生成的代谢产物, TXA₂ 不但可促使血小板聚集, 还可以引起血管及气道平滑肌的收缩, 并促使气道反应性增高, 另外, TXA₂ 还可促使气道分泌增多, 血管渗透性增高, 从而加重气道的炎症反应, 而 PGE₂ 的作用几乎与 TXA₂ 的作用相反^[4]。

在本实验中, 我们发现正常的对照小鼠呼吸道几乎无 EOS 浸润, 当致敏小鼠给予反复抗原刺激后即出现大量 EOS 浸润到呼吸道, 使 BALF 中 EOS 数急剧升高 OKY-046 可以明显地抑制这种抗原引起的 EOS 浸润现象, 而且呈明显的剂量相关性 OKY-046 剂量越大, 其抑制作用就越强。OKY-046 的剂量 1 mg/kg, 10 mg/kg 和 100 mg/kg 分别导致 BALF 中 EOS 数下降 26.6%, 39.3% 和 55.0%。S-1452 也以相似的方式抑制了 EOS 对气道浸润, 其剂量 0.2 mg/kg, 2 mg/kg 和 20 mg/kg 分别导致 EOS 数

下降 20.7%、49.6%和 65.8%。

有研究指出,处于过敏状态的肺组织可以释放多量 TXA₂^[5]。由于 TXA₂极不稳定,半衰期仅约 30 s,它在体内很快水解为稳定的而无明显生物活性 TXB₂^[4]。因此, TXB₂的变化即反映 TXA₂的变化, PGE₂主要在血管内皮细胞中生成并释放, PGE₂亦极不稳定,很快被水解成无活性的 6-Keto-PGF_{1α}^[4],由于 TXA₂和 PGE₂的作用几乎相反,所以,在哮喘的病理生理机制中, TXA₂/PGE₂比例动态平衡是一个重要的调节机制。我们的结果显示正常小鼠 BALF 中未能检测到 TXB₂,当致敏小鼠给予反复抗原刺激后 TXB₂即大量出现。OKY-046由于能抑制 TXA₂合成酶的活性,从而使生成的 TXA₂量减少,表现为 OKY-046腹腔注射后 TXB₂明显减少而且也呈剂量相关性。作为 TXA₂受体拮抗剂的 S-1452对 TXB₂水平并无多大的影响。各组小鼠 S-1452用药后 TXB₂水平与阳性对照组水平相差不大,我们也注意到 OKY-046或 S-1452用药后实验小鼠 BALF 中 6-Keto-PGF_{1α}水平均无明显变化,这是可以理解的,因为无论是 OKY-046还是 S-1452,对 PGE₂的生成或 6-Keto-PGF_{1α}的消除均无影响, S-1452主要的作用是竞争性地抑制 TXA₂与其相应的受体相结合^[7]从而阻止其发挥效能,我们的结果证实了致敏小鼠经抗原刺激后 TXB₂/6-Keto-PGF_{1α}比值增大,而 OKY-046由于抑制 TXB₂的生成从而使该比值趋于减少。

综上所述,可以认为无论是应用 OKY-046抑制

TXA₂的生成,还是应用 S-1452阻断 TXA₂的作用,均可抑制抗原引起 EOS对气道的浸润,这些结果一方面提示 TXA₂对 EOS在气道的聚集有明显的趋化作用,另一方面也说明 TXA₂合成酶抑制剂及其受体拮抗剂对于治疗哮喘患者可能会有重要的临床价值

参考文献

- 1 Gleich G J. The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. *J Allergy Clin Immunol*, 1990, 85: 422.
- 2 Manning P J, Stevens W H, Cockcroft D M et al. The role of thromboxane in allergen-induced asthmatic responses. *Eur Respir J*, 1991, 4: 66.
- 3 施焕中,陈一强,许辉等.过敏性气道炎症动物模型的复制. *广西医科大学学报*, 1996, 13 (2): 15.
- 4 府军.炎症介质与哮喘.见:钟南山,府军,朱元珩主编,现代呼吸病进展.北京:中国医学科技出版社, 1994. 388~ 399.
- 5 Schulman E S, Newball H H, Demers L M et al. Anaphylactic release of thromboxane A₂, prostaglandin D₂, and prostacycline from human lung paranchyma. *Am Rev Respir Dis*, 1981, 124: 402.
- 6 Ogdletree M L. Overview of physiological and pathophysiological effects of thromboxane A₂. *Federation Pro*, 1987, 46: 133.
- 7 Hanasaki K, Arita H. Characterization of a new compound, S-1452, as a specific TXA₂ receptor antagonist in platelets. *Thromb Res*, 1988, 50: 365.

(责任编辑: 邓大玉 蒋汉明)

第二届地中海贫血国际学术研讨会在邕举行

由广西医科大学和泰国 Mahidol大学科学技术发展研究所地中海贫血研究中心共同组织,并得到广西壮族自治区人民政府和泰国国家研究委员会等单位协助,“第二次中国地中海贫血国际会议”已于 1998年 10月 14日至 16日在广西南宁市召开,来自 20个国家和地区的 124名代表,就地中海贫血的流行病学、α地中海贫血、β地中海贫血、血栓栓塞与低氧血症、细胞生物学与实验诊断、异常血红蛋白、铁超载与螯合剂、治疗进展、预防与监控、基因治疗十个专题进行了大会交流和讨论,这是自 1987年上海第一次地中海贫血国际会议以来在中国举办的第二次国际会议,会议的召开促进了地中海贫血研究的合作和友谊。

(林伟雄)