

支气管哮喘豚鼠肺组织中 KLF2 的表达及意义*

彭文芳^{1,2} 戴爱国^{2△} 胡瑞成² 朱黎明²

(1 南华大学研究生院 湖南衡阳 421001 2 湖南省老年医院 - 湖南省老年医学研究所呼吸疾病研究室 湖南长沙 410016)

摘要 目的 探讨锌指 Krü ppe1 样转录因子 2(KLF2)在豚鼠支气管哮喘肺组织中的表达及意义。方法 :30 只健康雄性豚鼠 ,按随机数字表法分为对照组(A 组)、哮喘组(B 组)及地塞米松治疗组(C 组) ,每组 10 只。卵清蛋白致敏复制哮喘模型。观察豚鼠肺组织病理学改变 BALF 细胞总数及分类计数 ;采用原位杂交和 RT-PCR 检测肺组织中 KLF2 的 mRNA 表达情况 ,免疫组化和 Western blot 检测肺组织中 KLF2 的蛋白表达水平。结果 (1)哮喘组豚鼠 BALF 中细胞总数、嗜酸性粒细胞百分比(EOS%)、中性粒细胞百分比(NEU%)显著高于对照组(P<0.01) ,哮喘组肺组织可见大量炎症细胞浸润 ,及明显气道重塑改变 ,而地塞米松治疗组 BALF 炎细胞浸润及肺组织病理改变较哮喘组明显减轻 (2)KLF2mRNA 和蛋白在哮喘组表达显著低于对照组 ,在地塞米松治疗组中的表达明显高于哮喘组,3 组差异均有统计学意义 (P 均 <0.01) (3)KLF2 蛋白以及 mRNA 与肺泡灌洗液炎细胞总数及 EOS%、NEU%呈负相关。结论 :KLF2 在支气管哮喘急性发作期模型中表达明显下降 ,而地塞米松治疗后 KLF2 的表达上调 ,提示 KLF2 可能在支气管哮喘的发病机制与防治中起重要作用。

关键词 支气管哮喘 ;锌指 Krü ppe1 样转录因子 2

中图分类号 :Q95-3 ,R562.25 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)07-1235-06

Expression of KLF2 in Lung Tissue of Guinea Pigs with Bronchial Asthma and Its Significance*

PENG Wen-fang^{1,2}, DAI Ai-guo^{2△}, HU Rui-cheng², ZHU Li-ming²

(1 Graduate School of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China;

2 Department of Respiratory Medicine, Hunan Institute of Gerontology, Hunan Province Geriatric Hospital, Changsha 410016, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression and significance of KLF2 in lung tissue of guinea pigs with Bronchial Asthma. **Methods:** Thirty healthy male guinea pigs were randomly divided into 4 groups: the control group (group A), asthmatic group (group B), Dexamethasone group (group C), 10 guinea pigs in each group. The asthmatic model was established by the ovalbumin challenge method. Before determining the total number of BALF cells and cells classification the changes in lung histopathology were observed. Expressions of KLF2 mRNA in lung tissue were assayed by in situ hybridization and by RT-PCR; Expressions of KLF2 protein were detected by immunohistochemistry and by Western blot. **Results:** (1)The total number of inflammatory cells and EOS%, NEU% in BALF of asthma group were significantly higher than those of control group (P<0.01), and large numbers of inflammatory cell infiltration and obviously bronchiole remodeling response could be seen in this group. However, all these changes were obvious decreased after Dexamethasone treatment. (2) Protein and mRNA expressions of KLF2 in asthma group significantly higher than those in control group (P<0.01), and those in Dexamethasone group was markedly increased compared to asthma group (all P < 0.01). (3) Linear correlation analysis showed that KLF2mRNA and protein was negatively correlated with EOS%, NEU% and the total number of inflammatory cells in BALF (r = 0.524, P < 0.01). **Conclusions:** In acute exacerbation of Bronchial Asthma model induced by ovalbumin, the study showed that asthmatic guinea pigs have significantly decreased expressions of KLF2, which up-regulated by Dexamethasone treatment group, suggesting that KLF2 may play an important role in the pathogenesis and prevention of Bronchial Asthma.

Key words: Bronchial Asthma; Krü ppe1-like factor transcription factor 2

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R562.25 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)07-1235-06

前言

Krü ppe1 样锌指转录因子 (Krü ppe1-like transcription fac-

tors, KLFs) 是 Spl/ Krü ppe1 样转录因子 (Spl-like and Krü ppe1-like transcription factors, Spl/KLFs) 家族中的一个亚家族^[1]。KLFs 是一类结合 DNA 的锌指核转录因子 ,因其与果蝇

* 基金项目 湖南省医药卫生科研计划课题项目(B2010-089) 2005 年第八批省级科技计划项目(05JT1024) ;

湖南省医药卫生科研计划课题项目(B2007169)

作者简介 彭文芳(1983-) ,女 ,硕士 ,医师 ,主要研究方向 :支气管哮喘的发病机制与防治 ,Tel:15717311135

△通讯作者 戴爱国 ,Email: daiaiguo2003@163.com

(收稿日期 2011-02-02 接受日期 2011-02-25)

Krü ppe1 锌指转录因子的 DNA 结合域高度同源而得名。迄今已发现 17 种哺乳类 KLF, 按发现先后分别命名为 KLF1-KLF17^[2]。在哺乳动物中, KLFs 可调控细胞增殖、迁移、凋亡和分化等, 它们对早期胚胎发育也至关重要。Krü ppe1 样转录因子 2(KLF2) 是当前研究的热点, 由于最初被发现主要在肺中高表达, 因此也被称为肺 Krü ppe1 样转录因子(LKLF)^[3]。目前认为在调控血管内皮的发育及病理过程中起关键作用, 被广泛应用于心血管疾病的研究中。其实早在 1999 年^[4]已有研究证实 KLF2 在正常肺的发育中起关键作用, 但一直以来很少有人将 KLF2 应用于肺部疾病的研究。直到 2008 年 Saavedra 等^[5]首次将 KLF2 应用于炎症性气道疾病的研究中, 发现 KLF2 在正常肺的小气道中广泛表达, 它可以抑制一些关键促炎症细胞因子如 NF- κ B、AP-1^[6]表达及 IL-8 的释放, 具有重要的抗炎作用。近年来还发现 KLF2 具有重要的抗氧化作用, 能调控许多抗氧化酶如 HO-1^[7]和抗氧化转录因子 Nrf2^[8]的表达。本室前期研究表明^[9], Nrf2 的表达在支气管哮喘发病机制中起重要作用。支气管哮喘是一种慢性气道炎症性疾病, 与氧化抗氧化失衡机制密切相关。但 KLF2 在支气管哮喘中的作用尚无研究。本实验采用 OVA 致敏激发复制支气管哮喘急性发作豚鼠模型, 观察豚鼠肺组织病理形态学改变、BALF 中炎细胞总数、细胞分类计数变化及 KLF2 在肺组织中的表达变化, 并探讨其在支气管哮喘发病机制及防治中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

卵清蛋白购自 Sigma, KLF2 兔多克隆抗体购自 Santa Cruz, β -肌动蛋白(Beta-actin)抗体购自武汉博士德生物工程有限公司, SP 免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; KLF2 原位杂交试剂盒、DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; ROS 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 总蛋白提取试剂盒、BCA 法蛋白定量检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司; KLF2、Beta-actin 上、下游引物由上海捷瑞生物工程有限公司引物合成部设计合成; 总 RNA 抽提试剂 (TRIZOL) 购自 Invitrogen, RT 试剂盒(MBI K1622--RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) 购自 MBI Fermentas, PCR MasterMix、DNA marker 购自索莱宝公司。

1.2 方法

1.2.1 豚鼠哮喘模型的建立及分组 30 只健康雄性清洁级豚鼠(湖南中医药大学实验动物中心供), 体重 200-250g, 按随机数字表法分为对照组(A 组)、哮喘组(B 组)及地塞米松治疗组(C 组), 每组 10 只。B 组第 1 天腹腔内注射 10% 卵清蛋白生理盐水 1 ml, 致敏 14 天, 第 15 天起每天上午给予 1% 卵清蛋白生理盐水并参照文献^[10]超声雾化吸入诱发哮喘, 每次雾化吸入的持续时间直至豚鼠出现哮喘症状为止, 每天 1 次, 共 14 天。A 组以生理盐水替代卵清蛋白溶液与 B 组同步实验。C 组致敏及诱发方法同 B 组, 并于第 16 天起每次诱发前 30 min 腹腔注射地塞米松 1.5 mg/kg, 连续 14 天。

1.2.2 支气管肺泡灌洗液细胞总数 / 细胞分类 末次雾化吸入结束后立即以 2% 戊巴比妥钠(2 ml/kg) 腹腔注射麻醉豚鼠, 暴露气管、主支气管, 在气管分叉处夹闭左主支气管, 于气管正中

作一小切口将静脉输液管改良的肺泡灌洗管插入右主支气管, 用 4 ml 生理盐水灌洗, 每次气道内反复注入、回抽 3 次, 回收率 > 80% 以上即为支气管肺泡灌洗液 (Bronchoalveolar lavage fluid, BALF), 取 BALF 20 μ l 用以细胞计数, 余 EP 管分装, 液氮罐转移至 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。解冻后离心管中以 1500 r/min 离心 10 min, 沉淀用 PBS 缓冲液重悬, 细胞涂片, 苏木精-伊红 (HE) 染色至少计数 200 个, 观察细胞分类情况。

1.2.3 肺组织形态学观察 约 10 分钟内收集好 BALF 后, 放血处死豚鼠, 立即切除右肺, 液氮罐转移至 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存用于行逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)及 Western blot 分析。同时向未灌洗的左肺灌注 4% 多聚甲醛(含 1% DEPC 水) 1~2 mL, 结扎取下置于 4% 多聚甲醛中固定, 脱水, 石蜡包埋, 切片, 厚度 4 μ m, 行苏木精-伊红(HE)染色及免疫组化、原位杂交实验, 光镜下观察。

1.2.4 肺组织 KLF2 免疫组织化 (IHC) 学检测 操作步骤按 SP 染色试剂盒说明书操作, 一抗用 PBS 稀释 (比例为 1:100), 采取 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜孵育一抗, DAB 显色, 苏木精复染, 封片, 镜下观察, 阳性结果显棕黄色。用显微显影系统(日本 Olympus 公司)采集图像, 每只豚鼠选 3 张结构完整的切片, 每张切片以单盲法随机选 5 支管径 100~200 μ m 的细支气管、肺泡, 以 JD 系列病理图文形态分析系统(江苏省捷达科技发展有限公司)检测并计算阳性信号平均吸光度(A)值作为每只动物 KLF2 表达相对强度。

1.2.5 肺组织 KLF2 的原位杂交(ISH)检测 地高辛标记的多相寡核苷酸探针。KLF2 mRNA 序列为: (1)5'-ATCCT GCCGT CCTTC TCCAC TTTCG CCAGC CCGTG-3' (2)5'-CGCGG CCTGC AGGAG CGCTG GCCGC GCGCC GAACC-3' 具体步骤按照原位杂交检测试剂盒说明书操作, DAB 显色, 苏木精复染。检测方法同免疫组化。

1.2.6 免疫印迹法 (Western blot) 检测肺组织 KLF2 蛋白表达 冰箱中取出豚鼠右肺组织约 0.1 g 于研钵内液氮中充分研磨加入 800 μ l 裂解缓冲液冰上裂解 30 分钟, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min, 离心 30 分钟, 取上清液即为肺组织总蛋白溶液, 采用 BCA 蛋白浓度测定法进行蛋白定量, 样品分装, 贮存于 -80 $^{\circ}$ C 中待用。每孔加入等量蛋白样品, 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶恒电压电泳, 电压积层胶 80 V, 分离胶 120 V。用 280 mA 恒电流转移 50 分钟, 将蛋白质自凝胶转印到 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后, 加入 1:500 稀释的一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。封闭液漂洗后加入 1:5000 稀释的辣根酶标记羊抗兔二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司), 室温下摇床杂交 1 h。漂洗后增强化学发光法发光 X 线胶片显影, 图象分析系统(上海 Tanon Gis22010)对扩增产物条带吸光度半定量, 计算待测条带的吸光度与内参照 β -肌动蛋白(β -actin)的吸光度比值。

1.2.7 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测肺组织 KLF2 mRNA 取右肺组织约 100 mg, 用 TRIZOL 试剂提取总 RNA, 检测其浓度及质量, 按 RT 试剂盒说明书逆转录合成 cDNA 后进行 PCR 或保存在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。扩增引物由上海捷瑞生物工程有限公司引物合成部设计合成。KLF2 sense: CAAGACCTA-CACCAAGAGTTC antisense: ACAAGTGGCACTGGAAGG 扩增长度: 170 bp, 扩增范围: 328-997; 建议退火温度: 57.1 $^{\circ}$ C。

Beta-actin sense: ACGGTCAGGTCATCACTATC antisense: TAGAGCCACCAATCCACAC 扩增长度 303 bp, 扩增范围: 812-1114, 建议退火温度 56.4 °C。PCR 反应条件 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 反应 28 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min, 各样品同时扩增。RT-PCR 产物经 2% 的琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL 溴化乙锭)电泳, 并在凝胶成像系统扫描分析扩增产物条带, 分别测定各扩增带吸光度值, 将目的基因的扩增条带与内参照 β-actin 扩增条带吸光度比值作为其 mRNA 表达水平的相对指标。

1.3 统计学处理

计量资料数据用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。计量资料行方差齐性检验后, 多组样本比较采用单因素方差分析, LSD 法行两两比较; 相关性分析采用直线相关法。P<0.05 认为差异有统计学意义。

表 1 各组豚鼠 BALF 中细胞总数与分类计数比较

Table 1 The total cell number and the proportion of inflammatory cells in BALF of guinea pig in each groups($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Total cells($\times 10^7L^{-1}$)	EOS%	NEU%	LYM%	MΦ%
A	10	31.50± 4.74	0.58± 0.06	2.53± 0.36	6.56± 0.27	89.10± 3.07
B	9	105.56± 9.50*	32.72± 2.59*	17.08± 1.15*	10.29± 1.59*	38.89± 3.301*
C	10	42.50± 6.69*△	5.54± 0.22*△	9.52± 0.28△	7.59± 0.24**△	76.60± 2.95△

*与 A 组比较, *P<0.01, **P<0.05; △与 B 组比较, △P<0.01。LYM: lymphocyte, MΦ: macrophage

Note: *P<0.01, **P<0.05 versus group A; △P<0.01 versus group B

2.3 各组豚鼠肺组织病理学改变 HE 染色显示

A 组豚鼠肺组织结构完整, 细支气管形态规则, 粘膜上皮完整, 基层层和平滑肌完整, 未出现增殖, 支气管腔内分泌物少, 肺泡形态正常, 支气管、肺泡壁及血管周围炎症细胞浸润少见。B 组细支气管管腔狭窄, 腔内有大量脱落的上皮细胞, 黏膜皱折增多, 上皮水肿, 杯状细胞显著增多, 腺体增生肥大, 基底

2 结果

2.1 豚鼠哮喘模型建立

卵清蛋白雾化期间 B 组和 C 组豚鼠均出现毛发竖立, 肌肉抽动, 俯伏不动症状, 随后 B 组豚鼠表现出明显的呼吸急促、烦躁不安、打喷嚏、腹肌抽搐、二便失禁等哮喘症状, 严重者呼吸减慢或节律不齐甚至死亡, C 组也出现上述表现, 症状较轻, A 组无上述症状。其中 B 组一只豚鼠于第 1 天雾化时死亡, 死前明显发绀和喘息, 死因考虑呼吸衰竭。

2.2 豚鼠 BALF 中炎细胞总数和分类计数

B 组 BALF 中炎细胞总数 Total cells ($\times 10^7L^{-1}$), Eosinophil (EOS)%, Neutrophil (NEU)% 显著高于 A 组(P<0.01), C 组细胞总数、EOS%、NEU% 与 B 组比明显降低(P<0.01), 与 A 组比增加(P 均<0.01)(表 1)。

膜、平滑肌明显增厚, 损伤甚至断裂, 细支气管周围和黏膜层及肺泡壁大量炎症细胞浸润, 以中性粒细胞、嗜酸粒细胞和淋巴细胞多见。C 组支气管黏膜仍有比较明显的水肿, 但管周炎症细胞浸润较 B 组豚鼠明显减轻, 腔内有少量的上皮细胞和炎症细胞。(图 1)

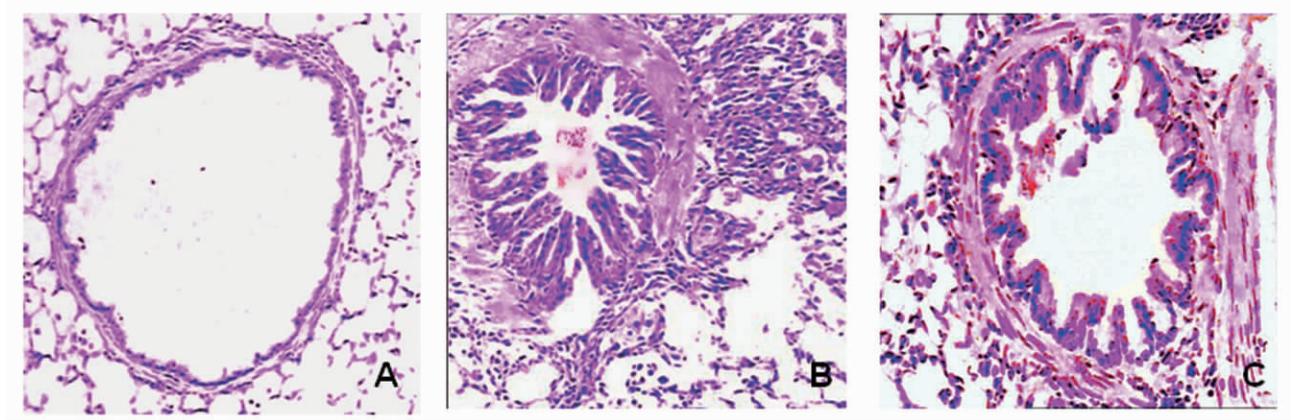


图 1 豚鼠支气管肺组织病理改变(HE× 200) A 对照组 B 哮喘组 C 地塞米松治疗组

Fig.1 The bronchiole and lung tissue pathology change of guinea pig (HE staining × 200) A: Control group B: Asthma group C: Dexamethasone group

2.4 肺组织 KLF2 mRNA 的表达

原位杂交显示(表 2, 图 2) KLF2 mRNA 在豚鼠肺组织中普遍表达, 主要见于平滑肌层和上皮细胞胞浆, 炎细胞胞浆和胞核均有表达。A 组细支气管中表达最强, B 组表达最弱, C 组

表达较 B 组强但弱于 A 组, 三组表达差异有统计学意义(P 均<0.01)。RT-PCR 显示三组肺组织中 KLF2 mRNA 表达与原位杂交所观察到的 KLF2 mRNA 变化趋势一致(表 2, 图 3)。

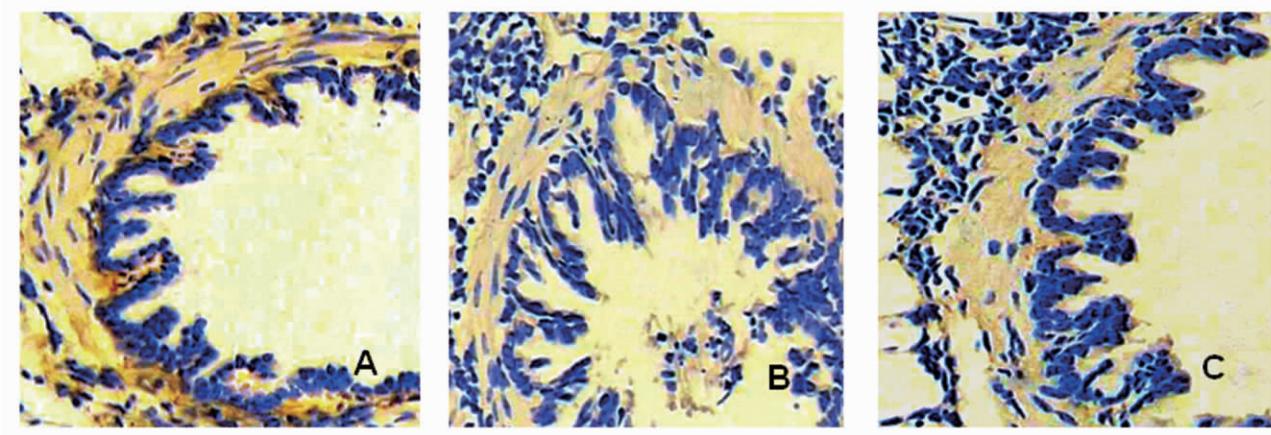


图2 原位杂交检测各组豚鼠肺组织细支气管 KLF2mRNA 表达(DAB× 200)A 对照组 B 哮喘组 C 地塞米松治疗组

Fig.2 In situ hybridization analysis of KLF2mRNA expression in Bronchia mucosa and smoothmusclelayer of guinea pigs' lung tissue(DAB× 200). A: Control group B: Asthma group C: Dexamethasone group

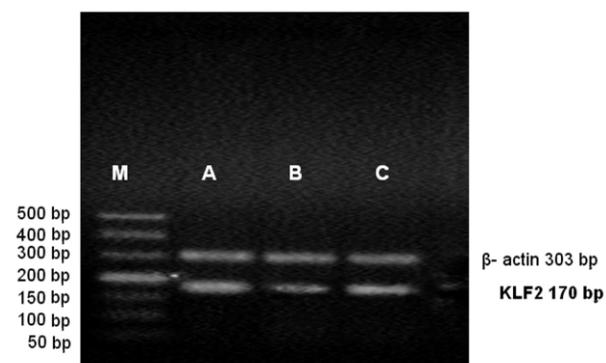


图3 RT-PCR 检测各组豚鼠肺组织中 KLF2mRNA 表达 A 对照组 B : 哮喘组 C 地塞米松治疗组

Fig.3 Expression of KLF2 mRNA in lung tissue of guinea pigs detected by RT-PCR.

A: Control group B: Asthma group C: Dexamethasone group

2.5 肺组织 KLF2 蛋白表达

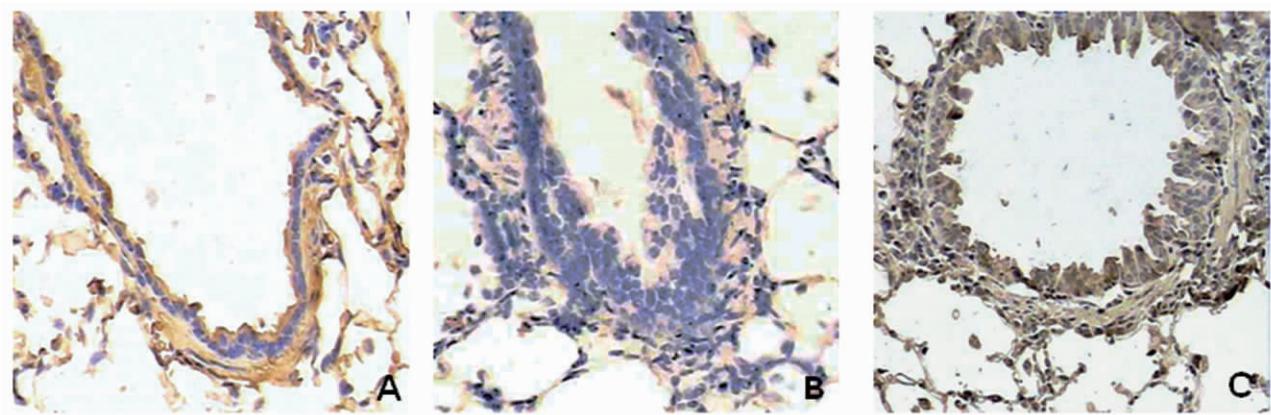


图4 免疫组化检测各组豚鼠肺组织细支气管 KLF2 蛋白表达(DAB× 200)A 对照组 B 哮喘组 C 地塞米松治疗组

Fig.4 Immunohistochemistry analysis of KLF2 protein expression in lung tissue, bronchiole of guinea pigs (DAB× 200). A: Control group B: Asthma group C: Dexamethasone group

3 讨论

支气管哮喘发病机制与气道炎细胞浸润增加 粘液分泌过多有关^[10]。支气管哮喘急性发作时主要病理变化是支气管和细

支气管气道黏膜充血水肿,黏液腺体的肥大增生,支气管平滑肌痉挛,使管腔狭窄,分泌物堆积,细支气管周围大量炎性细胞浸润。本实验用卵清蛋白(OVA)致敏激发复制豚鼠支气管哮喘急性发作期模型,光镜下肺组织病理形态学改变结果符合支气管哮喘表现。OVA^[10]诱导的哮喘认为是一种以慢性气道炎症为特点的疾病,淋巴细胞、嗜酸性粒细胞(EOS)、巨噬细胞和中性粒细胞浸润支气管腔。EOS是哮喘过敏性气道炎症的标志物,在其发病机制中起重要作用。本研究发现哮喘组BALF中炎细胞总数显著高于对照组,细胞分类计数显示以嗜酸性粒细胞百分比(EOS%)增加为主,中性粒细胞百分比(NEU%)增加也比较明显,而地塞米松治疗组较哮喘组明显减少。进一步证实气道炎症反应在支气管哮喘的发病机制中的重要作用,嗜酸性粒细胞为主要炎性反应细胞。

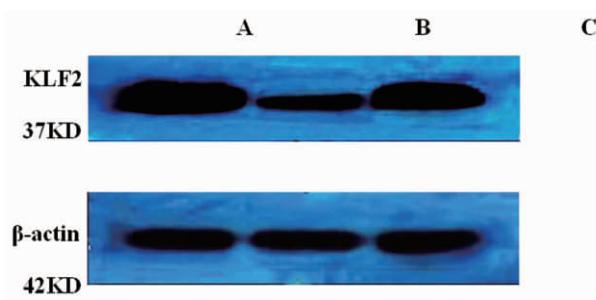


图5 Western blot 检测肺组织各组豚鼠肺组织中 KLF2 蛋白表达
Fig. 5 Western blot analysis of KLF2 protein expression in lung tissue of guinea pigs. A: Control group B: Asthma group C: Dexamethasone group

表2 各组肺组织中 KLF2 mRNA、蛋白质表达($\bar{x} \pm s$)
Tab.2 The mRNA and Protein expressions of KLF2 in lung tissue of guinea pigs($\bar{x} \pm s$)

Group	n	KLF2 protein		KLF2 mRNA	
		Immunohistochemistry	Western blot	In Situ Hybridization	RT-PCR
A	10	0.453 ± 0.036	1.600 ± 0.011	0.287 ± 0.120	1.365 ± 0.011
B	9	0.295 ± 0.017*	1.080 ± 0.051*	0.195 ± 0.080*	1.056 ± 0.007*
C	10	0.394 ± 0.016*△	1.149 ± 0.010*△	0.247 ± 0.110*△	1.285 ± 0.028*△
F		94.837	807.982	115.295	714.663
P		0.000	0.000	0.000	0.000

注: *与A组比较, *P均<0.01; △与B组比较, △P均<0.01

Note: *P<0.01 versus group A; △P<0.01 versus group B A: Control group B: Asthma group C: Dexamethasone group

近几年哮喘患病率显著增加^[11],但其病因和发病机制还不完全清楚。持续性气道炎症和气道高反应是构成危重患者发病率、死亡率主要原因。流行病学证实体内各种炎症刺激物诱导气道产生 ROS,引起氧化应激,造成组织损伤。许多研究明确显示氧化应激是哮喘炎症反应的重要结果^[12,13],与肺组织抗氧化活性改变^[14]和气道高反应^[15]的发展有关。研究已明确^[11],气道上皮氧化应激刺激分子信号级联,活化 NF-κB 转录炎症标志物如(IL-6, IL-8)、巨噬细胞炎性蛋白质(MIP-2)、粒细胞巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)、细胞间黏附分子(ICAM-1)等他们不仅直接引发炎症反应还可促进炎细胞浸润。浸润的嗜酸性粒细胞、T 淋巴细胞进一步分泌各种细胞因子、趋化因子及其他炎症标志物引起气道狭窄,气道高反应及气道重塑。糖皮质激素是目前治疗哮喘最有效的抗炎药物,其中地塞米松是临床应用最普遍的抗哮喘药之一。但目前还没有很好的抗氧化剂治疗措施。

目前很多研究^[7,8,16]表明 KLF2 具有抗氧化作用。在血管内皮细胞抗动脉粥样硬化中起重要作用。Nrf2 是目前发现的最重要的抗氧化转录因子,可以调控多种抗氧化基因的表达,在体内抗氧化防御中起关键作用。本室前期研究^[9]也显示在支气管哮喘肺组织中 Nrf2 上调抗氧化基因 γ-GCS 的表达。在研究血管内皮细胞保护机制中已证实 KLF2 可增加 Nrf2 的表达及其核定位从而增加 Nrf2 的抗氧化活性^[8]; 他汀类药物介导的 HO-1 的活化、表达上调及其相关抗氧化效应抵抗 ROS 和 H₂O₂

介导的血管内皮氧化损伤,依赖于 KLF2 的参与,敲除 KLF2,则他汀类药物介导的 HO-1 及其抗氧化保护细胞的效应减弱^[7]。可见 KLF2 作为重要的辅助因子调节抗氧化剂 Nrf2 及其靶基因表达,间接发挥抗氧化作用。

本研究结果显示, KLF2 mRNA 和蛋白质在正常对照肺组织中呈强阳性表达,而在哮喘组表达显著降低呈弱阳性表达,地塞米松治疗组 KLF2 表达增加呈阳性表达,三组表达差异具有统计学意义。相关分析显示,肺组织 KLF2 蛋白与 KLF2 mRNA 表达水平呈正相关,而 KLF2 蛋白及 mRNA 在各组间表达变化与肺泡灌洗液中炎细胞总数、EOS%、NEU%在各组间的变化均呈负相关。支气管哮喘急性发作期 KLF2 表达下调,说明支气管哮喘发病过程中存在氧化应激,大量炎细胞浸润产生大量的 ROS,激发氧化应激导致宿主抗氧化能力下降。Cluzel 等^[17]研究也发现哮喘患者外周血及肺泡灌洗液中的炎细胞比对照组产生更多超氧化物自由基。稳定的哮喘急性发作时,外周血和肺泡灌洗液的抗氧化能力是降低的^[18]。最近 Al-Afaleg 等^[19]研究显示哮喘患者 GSH-α-生育酚,谷胱甘肽过氧化物酶及总的抗氧化剂比对照组显著降低。ROS 通过活化促炎信号途径在炎症反应中起关键作用。同时内源性抗氧化机制减弱,氧化还原介导的炎症反应失衡导致慢性及更严重的炎症状态^[19]。综上所述说明哮喘组炎细胞介导 ROS 产生增加,导致总的抗氧化能力下降, KLF2 可能作为一种抗氧化基因在支气管哮喘发病过程中抵抗氧化应激诱导的损伤。因地塞米松能抑制

嗜酸性粒细胞浸润,在哮喘中发挥抗炎作用。地塞米松治疗组中 KLF2 表达增加,说明地塞米松可能通过减轻气道炎症,减少炎症介质的产生,降低 ROS 水平,从而增强机体抗氧化作用,上调 KLF2 表达。

Saavedra 等^[5]首次将 KLF 应用于炎症性气道疾病的研究中,发现 KLF 在正常肺的小气道中广泛表达,但 KLF 在中性粒细胞主导的气道疾病如肺囊性纤维化、COPD 中表达缺失。KLF 作为一种转录因子,存在人类细支气管,调节抑制一些关键促炎症细胞因子如 NF- κ B、AP-1^[6] 表达及 IL-8 的释放,具有重要的抗炎作用。但反过来被嗜中性粒细胞和 TNF- α 抑制。认为中性粒细胞通过抑制气道上皮细胞 KLF,促进 IL-8 的释放有助于自己的过度募集,导致气道上皮炎症反应的持续存在。本研究也发现哮喘组 BALF 中 NEU% 明显升高,说明 KLF2 表达下降可能与气道中 NEU% 升高有关。而地塞米松也能抑制嗜中性粒细胞向炎症部位的积聚,从而减少气道炎细胞中 NEU% 增加 KLF2 的表达,在哮喘中发挥抗炎作用。

综上所述,氧化抗氧化失衡机制与炎症机制相辅相成,共同参与支气管哮喘的发生、发展、演变过程并决定其疗效和预后。而本实验研究的 KLF2 在调节抗炎和抗氧化两方面都发挥重要作用,将为支气管哮喘的发病机制和防治开辟新蓝图。但 KLF2 在支气管哮喘发挥抗炎抗氧化作用的具体机制及其与本实验室前期研究的转录因子 Nrf2 之间的相互关系均有待进一步的研究验证。

参考文献(Reference)

- [1] Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J. Spl and Kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer[J]. J Cell Physiol, 2001,188(2):143-160
- [2] Jane van Vliet, Linda A·Crofts, Kate G R·Quinlan, et al. Human KLF17 is a new member of the Sp/KLF family of transcription factors [J]. Genomics, 2006,87 (4) :474-482
- [3] Carlson CM, Endrizzi BT, Wu J, et al. Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration[J]. Nature, 2006,442(7100):299-302
- [4] Wani MA, Wert SE, Lingrel JB. Lung Kruppel-like factor, a zinc finger transcription factor, is essential for normal lung development[J]. J Biol Chem, 1999, 274 (30) : 21180-21185
- [5] Saavedra MT, Patterson AD, West J, et al. Abrogation of anti-inflammatory transcription factor KLF in neutrophil-dominated airways[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008, 38 (6): 679-688
- [6] Boon RA, Fledderus JO, Volger OL, et al. KLF2 suppresses TGF- β signaling in endothelium through induction of Smad7 and inhibition of AP-1[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27: 532-539
- [7] Ali F, Hamdulay SS, Kinderlerer AR, et al. Statin-mediated cytoprotection of human vascular endothelial cells: a role for Kruppel-like factor 2-dependent induction of heme oxygenase-1 [J]. J Thromb Haemost, 2007, 5 (12) : 2537-2546
- [8] Fledderus JO, Boon RA, Volger OL, et al. KLF2 primes the antioxidant transcription factor Nrf2 for activation in endothelial cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28 (7) : 1339-1346
- [9] 张秀峰,戴爱国,胡瑞成. Nrf2/Bach1 调控支气管哮喘豚鼠肺组织 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶的表达[J].中华结核和呼吸杂志, 2008, 31 (11) : 853-855
Zhang Xiu-feng, Dai Ai-guo, Hu Rui-cheng. The regulation of Nrf2/Bach1 on γ -glutamylcysteine synthetase in guinea pigs' lung tissue of bronchial asthma [J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2008,31(11):853-855
- [10] Jung JY, Lee KY, Lee MY, et al. Antioxidant and antiasthmatic effects of saucerneol D in a mouse model of airway inflammation [J]. Int Immunopharmacol, 2011, Feb 2[Epub ahead of print]
- [11] Yadav UC, Ramana KV, Aguilera-Aguirre L, et al. Inhibition of aldose reductase prevents experimental allergic airway inflammation in mice [J]. PLoS One, 2009,4(8):e6535
- [12] Bowler RP. Oxidative stress in the pathogenesis of asthma [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2004,4(2):116-22
- [13] Caramori G, Papi A. Oxidants and asthma[J]. Thorax, 2004,59:170-3.
- [14] Sackesen C, Ercan H, Dizdar E, Soyer O, Gumus P, Tosun BN, et al. A comprehensive evaluation of the enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems in childhood asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2008,122:78-85
- [15] Saleh D, Ernst P, Lim S, Barnes PJ, Giaid A. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of NO synthase: effect of inhaled glucocorticoid[J]. FASEB J, 1998,12: 396 929-37
- [16] Boon RA, Horrevoets AJ. Key transcriptional regulators of the vasoprotective effects of shear stress [J]. Hamostaseologie, 2009,29 (1): 39-40, 41-3
- [17] Cluzel M, Damon M, Chanaz P, Bonsquet J, Crastes de Paulet A, Michel FB, et al. Enhanced alveolar cell luminol-dependent chemiluminescence in asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 1987,80:195-201
- [18] Debley JS, Stamey DC, Cochrane ES, Gama KL, Redding GJ. Exhaled nitric oxide, lung function, and exacerbations in wheezy infants and toddlers [J]. Seattle, Wash J Allergy Clin Immunol, 2010,125(6): 1228-34
- [19] Al-Afaleg NO, Al-Senaigy A, El-Ansary A. Clin Biochem. Oxidative stress and antioxidant status in Saudi asthmatic patients [J]. Clin Biochem, 2011 Feb 12. [Epub ahead of print]