

· 实验研究 ·

缬沙坦恢复哮喘大鼠气道肝细胞生长因子的生成及其意义

栾斌, 宋丽

(郑州大学第三附属医院儿内科, 河南 郑州 450052)

[摘要] 目的 探讨血管紧张素受体拮抗剂(AT1)缬沙坦,对恢复哮喘大鼠气道肝细胞生长因子(HGF)的生成与哮喘气道重塑的关系和意义。方法 SD清洁级大鼠32只,体重在 100 ± 10 g,随机分为4组:A组:正常对照组,B组:卵蛋白(OVA)激发2周组,C组:OVA激发4周组,D组:OVA激发4周后缬沙坦干预组。用免疫组化法测定各组大鼠气道的HGF,AngII和TGF- β_1 的表达变化,苏木精-伊红染色观察气道病理变化。结果 A组HGF较B组有明显差异[(5.49 ± 1.34)% vs (10.69 ± 0.96)%, $P < 0.05$],C组为(11.85 ± 0.87)%,较A组升高($P < 0.05$),D组为(15.58 ± 1.06)%,较B组、C组升高。AngII和TGF- β_1 的表达则随着OVA激发时间的延长而增加,在使用缬沙坦后两者都明显下降。经抗原致敏和激活的大鼠气道上皮脱落炎症细胞堆积呈现明显的病理改变,而缬沙坦干预组的病理改变较轻,上皮细胞较完整,炎症细胞和纤维细胞较少。结论 ①HGF随着气道重塑变化浓度有所改变,说明早期HGF即有保护气道作用,和TGF- β_1 呈负相关性,有拮抗纤维化的作用;②AT1可改善气道重塑过程,可能是通过升高气道HGF水平达到抗纤维化的作用。

[中国当代儿科杂志,2006,8(6):482-485]

[关键词] 缬沙坦;肝细胞生长因子;气道重塑;转化生长因子;大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)06-0482-04

Effect of valsatan on hepatocyte growth factor in the airways of asthmatic rats

LUAN Bin, SONG Li. Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Email:luanbin0588@tom.com)

Abstract: **Objective** To study the effect of valsatan (angiotensin II receptor antagonist, AT1) on hepatocyte growth factor (HGF) in the airways and airway remodeling in asthmatic rats. **Methods** Thirty-two rats were randomly assigned into A-D four groups. Group A was normal control without treatment. Groups B-D were challenged by ovalbumin (OVA) for 2 weeks, 4 weeks and 4 weeks respectively to induce asthma. Group D received intragastric administration of valsatan (30 μ g/kg daily for 4 weeks) after OVA challenge. The expressions of HGF, angiotensin II (AngII) and transforming growth factor (TGF- β_1) in the airways were detected by immunohistochemical staining. The pathological changes of airways were observed by Haematoxylin & Eosin staining. **Results** The HGF expression of Group B was significantly higher than that of Group A ($10.69 \pm 0.96\%$ vs $5.49 \pm 1.34\%$; $P < 0.05$). Group C also showed an increased HGF level ($11.85 \pm 0.87\%$) compared with Group A ($P < 0.05$). The HGF level in Group D ($15.58 \pm 1.06\%$) was significantly higher than that of both Group B and Group C ($P < 0.05$). The expressions of TGF- β_1 and AngII increased with the challenged time, while valsatan treatment decreased significantly the levels of both. Valsatan treatment attenuated airway injuries of asthmatic rats induced by OVA sensitization/challenge. **Conclusions** HGF has protective effects on airways and anti-fibrotic effects. Valsatan can improve airway remodeling possibly by increasing HGF levels in asthmatic rats.

[Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8(6):482-485]

Key words: Valsatan; Hepatocyte growth factor; Airway remodeling; Transforming growth factor; Rats

气道重塑是哮喘两大特征之一,是顽固性哮喘的病理基础。参与哮喘气道重塑过程的多种细胞、细胞因子和炎症介质,构成了一个复杂的网络^[1]。肝细胞生长因子(HGF)是间质细胞合成和分泌的一种多功能细胞因子。近年来,HGF在肝脏细胞再

生、肾病、心肌梗死后心室细胞重塑等方面得到广泛研究^[2-4],并已证实肝细胞生长因子有促进血管生成、抗纤维化、促进胶原分解等作用。转化生长因子(TGF- β_1)、血管紧张素 II(AngII)对HGF的生成有抑制作用。本实验目的是观察大鼠气道结构出现纤

[收稿日期]2006-4-2;[修回日期]2006-8-25

[作者简介]栾斌,大学,主任医师,硕士生导师,儿内科主任。主攻方向:儿科呼吸系统疾病。

维化等改变后,使用血管紧张素受体拮抗剂缬沙坦 (Val)能否提升 HGF 的表达,对改善哮喘大鼠气道重塑有何影响,以及 TGF- β 1、AngII 和 HGF 的关系在哮喘气道重塑中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

鸡卵清白蛋白 (OVA、美国 Sigma 公司)、雾化器、兔抗大鼠单克隆 HGF, TGF- β 1, AngII 抗体 (武汉博士德生物技术有限公司)、Val (瑞士 Novartis Pharma Stein AG 生产)、灌胃针、计算机图像分析系统。

1.2 分组及模型制备方法

雄性清洁级 SD 大鼠 32 只 (郑州大学医学院动物实验中心提供),体重 100 ± 10 g,按随机化原则将动物分为正常对照组 (A 组)、OVA 激发 2 周组 (B 组)、OVA 激发 4 周组 (C 组)、Val 干预组 (D 组)。

哮喘组 (B ~ D 组) 大鼠分别在第 1 天和第 14 天用 10% OVA 氢氧化铝溶液 (100 mg OVA: 100 mg 氢氧化铝) 1 mL 腹腔注射致敏,共 2 次;第 16 天用 1% OVA 生理盐水雾化吸入激发,1 次/d, 20 min/次, B 组用 OVA 连续激发 3 d 后再激发 2 周 (3 次/周),共 9 次, C 组 OVA 连续激发 3 d 后再激发 4 周 (3 次/周),共 15 次; D 组同 C 组,激发 15 次后用 Val 灌胃 4 周,1 次/d, 30 μ g/kg。

1.3 标本制备

各组大鼠用 100 mg/只苯巴比妥腹腔注射处死。取左肺外周肺组织,平行、垂直于气道取材。10% 甲醛固定组织 24 h,酒精梯度脱水,石蜡包埋做 5 μ m 厚切片,分别做苏木素-伊红染色和免疫组化染色。

1.4 结果观察和测量

镜下观察 4 组大鼠气道的形态改变;形态学检测应用计算机病理图像分析系统进行分析处理,每张切片找两个完整同级支气管,在低倍镜下 (10×10) 分别测定支气管上皮层厚度、平滑肌厚度,最后取其平均值,单位为 μ m。免疫组化结果应用计算机图像病理分析系统在高倍镜视野 (10×40) 进行观察及分析处理,每张切片找两个同级支气管,计数 10 个视野下气道上皮、气道周围及肺泡区染色阳性细胞的百分比,最后取平均值作为测定结果。气道壁的免疫组化和形态学指标测定在同张切片上两个同级支气管上进行。

1.5 统计学分析

用 SPSS10.0 统计软件进行分析,实验数据用均

数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $\alpha = 0.05$ 为检验标准。

2 结果

2.1 一般情况观察

致敏组大鼠在经过抗原刺激后,有不同程度呼吸困难、烦躁不安、打喷嚏增多和饮水量增加。对照组无异常改变。

2.2 病理学观察

在高倍镜 (10×40) 下可见,经抗原致敏和激发后,大鼠气道上皮脱落、不完整;炎性细胞大量堆积,黏膜皱褶增多伸到管腔中央;气道黏液分泌增多;气道周围小血管壁也不完整,血管结构比较紊乱,血管壁也有不同程度增厚。胶原沉积明显,气道壁周围平滑肌细胞肥大排列紊乱,可见大量纤维细胞。Val 干预组以上情况明显改善,气道壁上皮较完整,厚度减轻;平滑肌细胞排列整齐,较少肥大;炎性细胞和纤维细胞减少。气道周围小血管上皮较完整,厚度有所减轻。

2.3 图像分析结果

B 组和 C 组大鼠气道壁厚度、平滑肌厚度较 A 组明显增厚 ($P < 0.05$), D 组大鼠以上指标较 B 组和 C 组有明显下降 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠气道壁上皮、平滑肌厚度 (μ m)

组别	例数	上皮厚度	平滑肌厚度
A 组	8	11.84 ± 0.73	13.18 ± 0.90
B 组	8	12.75 ± 0.83^a	14.77 ± 0.72^a
C 组	8	13.11 ± 0.93^a	16.52 ± 0.51^a
D 组	8	12.41 ± 0.77^b	14.15 ± 1.35^b

a 与 A 组比较 $P < 0.05$; b 与 B 组、C 组比较 $P < 0.05$

2.4 免疫组化结果

A 组 TGF- β 1, AngII 和 HGF 表达很少。D 组 HGF 表达较 B 组、C 组有明显升高 ($P < 0.05$); TGF- β 1 和 AngII 有明显下降 ($P < 0.05$),见表 2。

表 2 气道 HGF, AngII, TGF 阳性百分数表达

($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数	HGF 阳性数	AngII 阳性数	TGF- β 1 阳性数
A 组	8	5.49 ± 1.34	1.46 ± 0.43	1.30 ± 0.32
B 组	8	10.69 ± 0.96^a	5.47 ± 0.94^a	11.02 ± 1.25^a
C 组	8	11.85 ± 0.87^a	7.05 ± 0.18^a	15.08 ± 1.22^a
D 组	8	15.58 ± 1.06^b	2.00 ± 0.12^b	8.23 ± 1.32^b

注: a 和 A 组比较 $P < 0.05$; b 和 B 组、C 组比较 $P < 0.05$

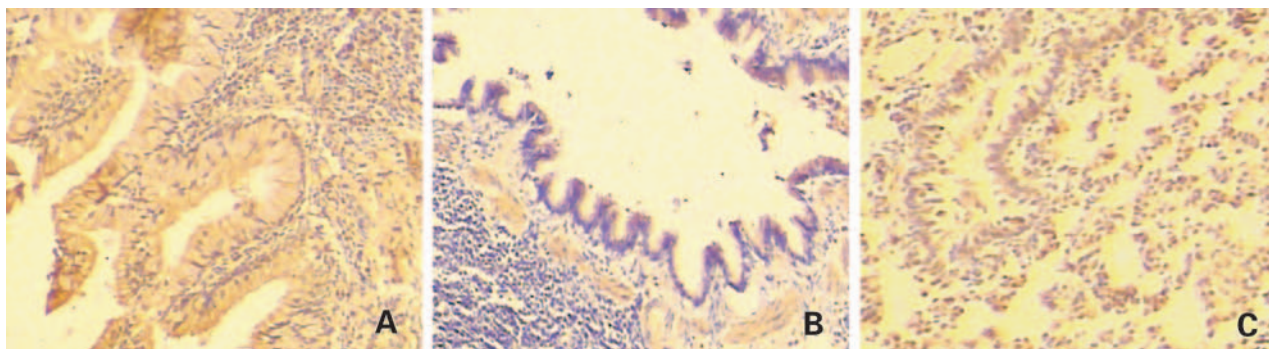


图1 各期哮喘大鼠气道 HGF 阳性表达(ABC 法染色 1×10) A:在 OVA 激发 2 周时,HGF 在大鼠气道中的阳性表达数最高,可见满视野黄色 HGF 染色细胞;B:在激发 4 周时,阳性数表达有所下降;C:在药物干预组又可见满视野的黄色 HGF 染色细胞,即 HGF 的阳性表达又上升。

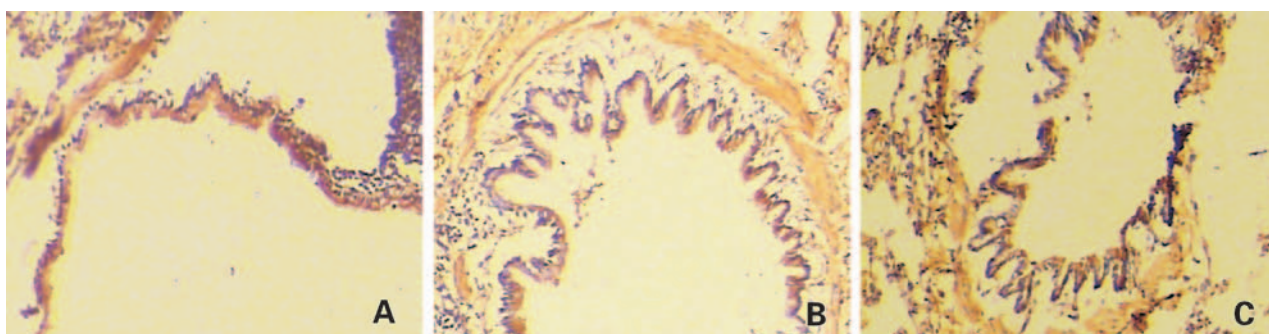


图2 各期哮喘大鼠气道 Ang 阳性表达(ABC 法染色 1×10) A:OVA 激发 2 周时 Ang 的表达;B:OVA 激发 4 周时 Ang 在气道上的表达,随着激发时间的增加,Ang 在气道上皮中的表达逐渐增加,即黄色染色细胞逐渐增多;C:在药物干预组,表达明显下降。

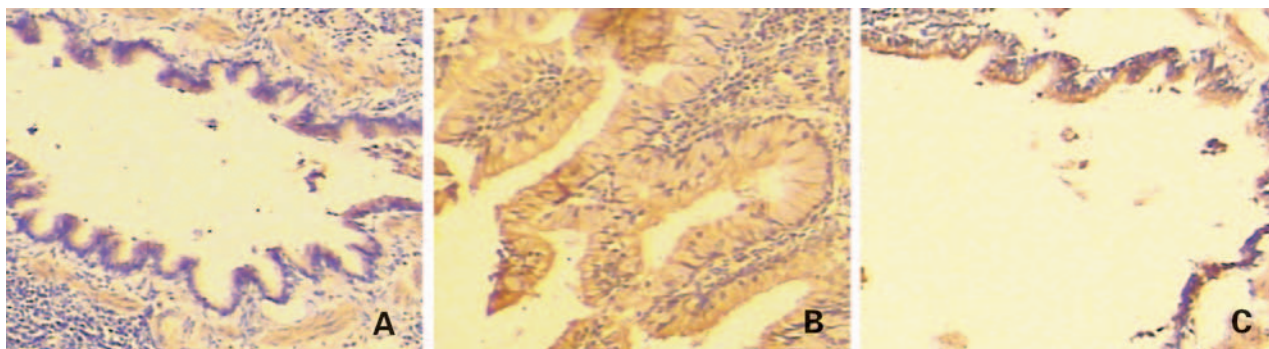


图3 各期哮喘大鼠气道 TGF 阳性表达(ABC 法染色 1×10) A:OVA 激发 2 周时 TGF 在气道上的表达,即黄色染色细胞;B:OVA 的激发 4 周时,随着激发时间的增加,TGF 在气道上皮中的表达逐渐增加,即黄色染色细胞增多;C:在药物干预组,表达明显下降。

3 讨论

肾素-血管紧张素系统(RAS)已证实与哮喘气道重塑有关。RAS 通过它的一个主要效应因子 AngII 来发挥作用。AngII 是个多功能多肽,与其 1 型受体结合发挥其各种功能,参与众多生理和病理过程。实验证明^[5],AngII 能够提升平滑肌细胞中转化生长因子(TGF- β_1) mRNA 的转录过程来增加 TGF- β_1 的表达。同时 AngII 还可以直接刺激 TGF-

β_1 的分泌和 TGF- β_1 的活化,而 TGF- β_1 已被证实是哮喘气道重塑过程重要的始动和过程细胞因子^[6]。缬沙坦(Val)是一种口服的、选择性作用于 AngII 1 型受体的药物,与传统的 ACEI(羧甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶抑制剂)类药物相比,缬沙坦的效果更好,副作用更少。

HGF 是近年来倍受关注的细胞生长因子之一,因对肝脏细胞有很强的增生能力而得名^[7]。HGF 的特异性受体 C-met 是由原癌基因 C-met 编码的蛋白,HGF 与 C-met 广泛存在于各种组织和细胞中,

HGF 和 C-met 结合发挥多种生物学作用。HGF 促进细胞分裂增殖,有很强的细胞再生能力;在疾病急性损伤期可在受损部位表达量明显上升,已证实 HGF 是通过上调 bcl-2 来抑制上皮细胞的凋亡起到对上皮细胞受到急性损伤时的保护性作用^[8]。内源性 HGF 的产生也受到许多因素的调控,TGF- β_1 和 AngII 对 HGF 的产生有很强的抑制作用^[9]。

气道重塑是哮喘患者的特征。支气管在反复抗原刺激后,气道周围有大量炎症细胞和炎性介质,气道壁上皮脱落,平滑肌细胞增生和肥大,气道周围纤维化,胶原沉积,另外还包括气道黏膜血管扩张,血管重新生成等病理变化,这种气道结构和血管结构的改变统称为气道重塑。本实验中,SD 大鼠经过 OVA 反复刺激可出现气道重塑的病理改变,以激发 4 周后改变尤为明显。

本实验假设在哮喘发病过程中,因 AngII 随着抗原刺激的时间延长而表达量增加,逐渐抑制肺局部组织 HGF 的分泌,从而抑制 HGF 对上皮的保护^[10],最终导致气道重塑的发生。本实验数据可以看出,在激发 2 周组和激发 4 周组大鼠气道,AngII 和 TGF- β_1 的表达是逐渐上升的,而 HGF 在激发 2 周时表达增加,在激发 4 周时表达量较药物干预组下降。病理学观察认为在激发 4 周后,大鼠已出现较为明显的气道重塑现象。在出现气道重塑改变后,使用 Val 后,气道中 HGF 的表达有所上升,AngII 和 TGF- β_1 表达下降;相应病理学变化是,使用 Val 后大鼠气道壁较完整,纤维细胞减少,气道重塑程度减轻。说明随着气道重塑程度加重,AngII 的增多,促进了 TGF- β_1 的分泌,二者都抑制了 HGF 的分泌和生物学作用,从而加速气道重塑的进程。使用 Val 后,AngII 和 TGF- β_1 表达明显下降,失去抑制的 HGF 分泌重新增加,促进了上皮的修复和增生,改善了气道纤维化和胶原物质的沉积^[11]。同时也促进了气道壁小血管上皮的完整,加速新生小血管,改善肺的血循环。

可见 TGF- β_1 -AngII-HGF 这三者之间的平衡在哮喘气道重塑过程中有重要作用,HGF 对哮喘的急性发病期有保护性作用^[12],如果在哮喘患者等过敏体质受到抗原刺激前提高 HGF 的表达,可能会起到很好的抵制作用,HGF 在哮喘中的作用和疗效有待

于进一步的研究。Val 具有提升 HGF 的作用,同时特异阻断 AngII,有较好的抗纤维化作用,同时改善局部血液循环,为今后较好的改善哮喘气道重塑提供一个新的方法和途径。

[参 考 文 献]

- [1] 姚彬,蒲增惠,李文,陶建飞. 细胞因子网络与支气管哮喘[J]. 医学综述,2002,8(12):702-707.
- [2] Wang Y, Ahmad N, Wani MA, Ashraf M. Hepatocyte growth factor prevents ventricular remodeling and dysfunction in mice via Akt pathway and angiogenesis[J]. J Mol Cell Cardiol, 2004, 37(5): 1041-1052.
- [3] Yang J, Dai C, Liu Y. A novel mechanism by which hepatocyte growth factor blocks tubular epithelial to mesenchymal transition[J]. J Am Soc Nephro, 2005,16(1): 68-78.
- [4] 韩子明,邢燕,五宏伟,梁秀珍,周建华. 缬沙坦对阿霉素肾病肾硬化大鼠细胞凋亡及 Fas 和 FasL 表达的影响[J]. 中国当代儿科杂志,2003,5(4): 306-310.
- [5] Mckey S, de Jongste JC, Saxena PR, Sharma HS. Angiotensin II induces hypertrophy of human airway smooth muscle cells; expression of transcription factors and transforming growth factor- β_1 [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998,18(6): 823-833.
- [6] 李明才,何韶衡. 转化生长因子- β 与哮喘[J]. 生化与医学,2003,23(1): 57-59.
- [7] Boros P, Miller CM. Hepatocyte growth factor: a multifunctional cytokine[J]. Lancet, 1995, 345(8945): 293-295.
- [8] Yamamoto K, Morishita R, Hayashi S, Matsumoto H, Nakagami H, Moriguchi A, et al. Contribution of Bcl-2, but not Bcl-xL and Bax, to antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor in hypoxia-conditioned human endothelial cells[J]. Hypertension, 2001, 37(5): 1341-1348.
- [9] Matsumoto K, Tajima H, Okazaki H, Nakamura T. Negative regulation of hepatocyte growth factor gene expression in human lung fibroblasts and leukemic cell by transforming growth factor- β_1 and glucocorticoids[J]. J Biol Chem, 1992, 267(35): 24917-24920.
- [10] Du YC, Xu JY, Zhang SJ. Effects of angiotensin II receptor antagonist on expression of collagen III, collagen V, and transforming growth factor β_1 in the airway walls of sensitized rats[J]. Chin Med J (Engl), 2004, 117(6): 908-912.
- [11] Neuss S, Becher E, Woltje M, Tietze L, Jähnen-Dechent W. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing[J]. Stem Cells, 2004, 22(3): 405-414.
- [12] Ware LB, Mattay MA. Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation, and repair[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 282(5): L924-940.

(本文编辑:吉耕中)