

表皮生长因子受体对哮喘小鼠气道重塑的影响及机制

李晓辉 栾斌

(郑州大学第三附属医院,河南 郑州 450052)

[摘要] **目的** 探讨哮喘小鼠气道重塑与表皮生长因子受体(EGFR)、肝素结合性表皮生长因子(HB-EGF)的关系以及EGFR酪氨酸激酶抑制剂(AG1478)对气道重塑的干预作用。**方法** 建立哮喘小鼠气道重塑模型,对肺组织切片行Masson和过碘酸雪夫(PAS)染色分别显示胶原沉积和气道黏膜杯状细胞增生情况。应用免疫组化和RT-PCR方法分别检测HB-EGF的蛋白和EGFR、HB-EGF mRNA表达的变化。**结果** 哮喘组出现气道重塑的特征性改变,HB-EGF、EGFR表达水平增高。AG1478干预组较哮喘组气道重塑有所改善,EGFR、HB-EGF表达降低($P<0.05$)。**结论** EGFR参与哮喘小鼠气道重塑,其酪氨酸激酶抑制剂AG1478可缓解气道重塑过程。AG1478可能通过下调EGFR及HB-EGF的表达以及抑制依赖于EGFR下游的细胞信号转导级联反应来缓解哮喘气道重塑过程。
[中国当代儿科杂志,2010,12(2):137-140]

[关键词] 表皮生长因子受体;肝素结合性表皮生长因子;哮喘;气道重塑;小鼠
[中图分类号] R562.2⁺5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)02-0137-04

Effect of epidermal growth factor receptor on airway remodeling in asthmatic mice and its mechanism

LI Xiao-Hui, LUAN Bin. Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Luan B, Email:turtle1068@126.com)

Abstract: Objective To explore the relationship of airway remodeling with epidermal growth factor receptor (EGFR) and heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) levels in asthmatic mice and the effect of EGFR tyrosine kinase inhibitor (AG1478) on airway remodeling. **Methods** Twenty-four male BALB/c mice were randomly divided into three groups: normal control, asthma, AG1478-treated. Mice were sensitized and challenged with ovalbumin (OVA) and a mouse model of asthma was prepared. Collagen deposition was determined in Masson-stained lung sections. Periodic acid Schiff (PAS) staining was used to observe the proliferation of goblet cells. Immunohistochemistry was used to determine the protein expression of HB-EGF. RT-PCR was used to determine the mRNA expression of HB-EGF and EGFR. **Results** The characteristic changes of airway remodeling occurred in the asthma group. The expression of HB-EGF and EGFR in the epithelial cells of bronchi in the asthma group was significantly higher than that in the normal control group. Compared with the asthma group, the AG1478-treated group had decreased inflammation reactions, decreased collagen deposition and proliferation of goblet cells and lower expression of EGFR and HB-EGF. **Conclusions** EGFR tyrosine kinase inhibitor (AG1478) ameliorates the progression of airway remodeling in mice with asthma by inhibitions of EGFR and HB-EGF expression and EGFR signal pathway.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (2):137-140]

Key words: Epidermal growth factor receptor; Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor; Asthma; Airway remodeling; Mice

哮喘病人气道出现的特征性结构改变称为气道重塑,包括气道上皮细胞的脱落,上皮下纤维化,杯状细胞的超常增生,黏液过度分泌,气道平滑肌细胞增殖等^[1]。气道重塑与疾病的严重程度相关,引起不可逆的气流阻塞和肺功能持续性下降。有报道表皮生长因子受体(EGFR)及其配体(HB-EGF,TGF-α)在哮喘气道上皮表达增高^[2],参与哮喘气道结构改变的多个环节,在气道重塑中发挥重要作用。本研究旨在探讨哮喘小鼠气道重塑与EGFR、HB-EGF的关系以及EGFR酪氨酸激酶抑制剂(AG1478)的治疗作用。

[收稿日期]2009-09-04;[修回日期]2009-10-10
[作者简介]李晓辉,女,硕士研究生。
[通讯作者]栾斌,主任医师。

1 材料与方法

1.1 实验材料

清洁级 BALB/c 小鼠 24 只,雄性,6~8 周龄,体重(15±2)g,购于河北省实验动物中心,许可证号:SCXK(冀)2008-1-003。鸡卵清蛋白(ovalbumin, OVA),购于 Sigma 公司。AG1478 购于 Cayman 公司。Trizol 购于美国 Invitrogen 公司,反转录试剂盒和 PCR 试剂购于北京全式金生物技术有限公司。山羊抗小鼠 HB-EGF 抗体购于 Santa Cruz 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠哮喘模型的建立 按随机数字法将 24 只动物分为正常对照组、哮喘模型组、AG1478 干预组 3 组,每组 8 只。小鼠适应性饲养 1 周后,按照参考文献^[3]方法加以改进,哮喘组、AG1478 干预组小鼠分别在第 1、8、15 天腹腔内注射抗原混合液 0.2 mL(含氢氧化铝 1 mg 和 OVA 20 μg)致敏,第 22 天开始雾化吸入 1% OVA 激发,隔日 1 次,每次 30 min,持续至第 35 天,共计 7 次。AG1478 干预组每次激发前 1 h 给予腹腔内注射 AG1478(15 mg/kg)^[2]。正常对照组小鼠的腹腔内注射和雾化吸入均用生理盐水代替,次数同前。

1.2.2 肺组织标本制备 各组小鼠于末次雾化结束后 24 h 内用戊巴比妥钠腹腔内注射进行麻醉,迅速开胸结扎左肺门,取下左肺,置于液氮冻存,留作 RT-PCR 用,右肺生理盐水冲洗后取中叶,置于 10% 甲醛溶液固定 24 h,酒精梯度脱水,石蜡包埋,做厚度 5 μm 切片,分别做 Masson 染色、过碘酸雪夫(PAS)染色和免疫组织化学染色。

1.2.3 免疫组织化学观察 HB-EGF 蛋白的表达

使用免疫组织化学过氧化物酶标记的链霉卵白素法进行检测。

1.2.4 RT-PCR 测定 EGFR、HB-EGF mRNA 的表达 右肺组织用 Trizol 提取总 RNA。以逆转录试剂盒合成 DNA,而后进行 PCR 扩增。目的基因引物序列:HB-EGF(PCR 产物为 180 bp)上游引物:5'-ATG CCT CAG GAA ATA CAA G-3',下游引物:5'-GTC CCA CGA TGA CAA GAA-3',退火温度为 50℃。EGFR(PCR 产物为 304 bp)上游引物:5'-TCA TTG CCC TCA ACA CCG-3',下游引物:5'-ATG CCA TCT TCC ACT TCG T-3',退火温度为 52℃。内参 β-肌动蛋白(PCR 产物为 432 bp)上游引物:5'-TCA GGT CAT CAC TAT CGG CAA T-3',下游引物:5'-AAA GAA AGG GTG TAA AAC GCA-3',退火温度

55℃。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像系统中观察。

1.2.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件,各种数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较采用单因素方差分析及 LSD-*t* 检验,两变量的相关性采用 Pearson 相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般情况观察

哮喘组经过 OVA 反复激发后,出现易激惹、烦躁不安、呼吸急促、腹肌抽搐、大小便失禁症状。正常对照组无明显异常反应。AG1478 干预组也出现哮喘组相似症状,但程度明显较轻。

2.2 病理形态学观察

普通光镜下(×200)观察,哮喘组小鼠气道壁及气道平滑肌明显增厚,管腔狭窄,气道上皮受损、脱落,上皮下胶原沉积明显,杯状细胞数量增加,黏液分泌增多,气道周围有大量炎性细胞浸润。AG1478 干预组改变与哮喘组相似,但程度明显较轻。正常对照组未见明显的病理形态学改变。

2.3 肺组织中 EGFR 和 HB-EGF mRNA 的表达

应用 RT-PCR 检测显示,哮喘组 EGFR 和 HB-EGF mRNA 表达量分别为 0.72 ± 0.12 和 0.62 ± 0.11 ,明显高于正常对照组(0.23 ± 0.08 和 0.19 ± 0.07),AG1478 干预组表达量为 0.42 ± 0.09 和 0.34 ± 0.10 ,较哮喘组明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

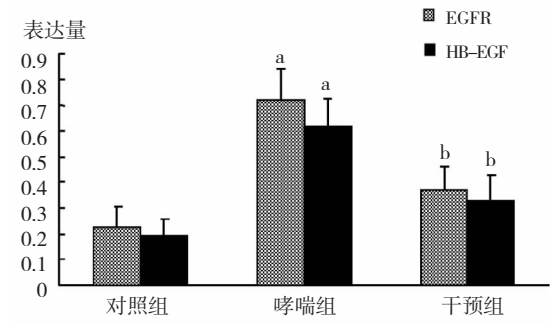


图 1 3 组小鼠肺组织 EGFR 和 HB-EGF mRNA 的表达 a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与哮喘组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 肺组织 HB-EGF 蛋白的表达、平均胶原沉积面积和平均杯状细胞数

HB-EGF 免疫组化染色阳性表达呈棕黄色,主要表达于气管黏膜上皮细胞(图 2)。胶原沉积

(Masson 染色) 阳性部位为绿色(图3)。上皮杯状细胞(PAS 染色) 阳性部位为紫红色(图4)。哮喘组气道 HB-EGF 蛋白的表达、平均胶原沉积面积和平均杯状细胞数均高于正常对照组和 AG1478 干预组,AG1478 干预组与哮喘组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 3组小鼠肺组织 HB-EGF 蛋白表达量、平均胶原沉积面积和平均杯状细胞

组别	鼠数	HB-EGF	胶原面积	杯状细胞数
正常对照组	8	0.20 ± 0.05	2.81 ± 0.47	9.39 ± 1.54
哮喘组	8	0.59 ± 0.11 ^a	6.82 ± 0.95 ^a	17.06 ± 3.13 ^a
AG1478 干预组	8	0.33 ± 0.08 ^{a,b}	4.01 ± 0.81 ^{a,b}	13.33 ± 2.08 ^{a,b}
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与哮喘组比较, $P < 0.05$

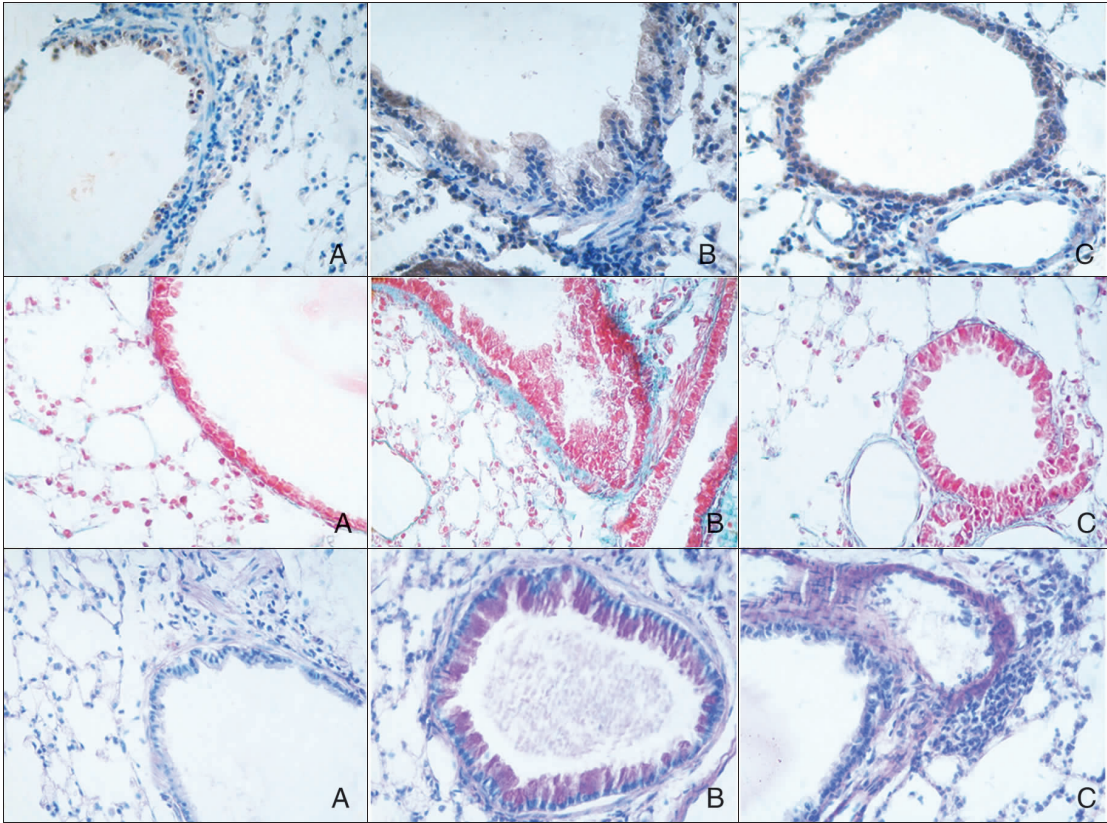


图2(上排) 各组小鼠气道上皮 HB-EGF 的表达(免疫组化, ×400) A: 正常对照组, 呈弱阳性表达; B: 哮喘组, 上皮细胞增厚, 呈强阳性表达; C: AG1478 干预组, 表达较哮喘组减弱。阳性细胞为棕黄色。

图3(中排) 气道上皮胶原沉积(Masson, ×400) A: 正常对照组, 上皮细胞下少见胶原; B: 哮喘组, 上皮细胞下胶原沉积明显增多; C: AG1478 干预组, 胶原沉积较哮喘组明显减少。胶原沉积部位为绿色。

图4(下排) 气道上皮杯状细胞(PAS, ×400) A: 正常对照组, 少见杯状细胞; B: 哮喘组, 上皮细胞上杯状细胞明显增多; C: AG1478 干预组, 杯状细胞数较哮喘组明显减少。紫红色为杯状细胞。

2.5 相关性分析结果

EGFR 与胶原沉积面积和杯状细胞数的相关系数 r 分别为 0.657 和 0.522, $P < 0.01$, 说明 EGFR 与两者呈正相关。

3 讨论

EGFR 通过结合其配体(EGF、HB-EGF、TGF- α 、AR 等)调节上皮细胞的迁移、增殖、分化及存活,在支气管上皮组织修复过程中发挥重要作用。哮喘气

道上皮 EGFR 持续的高表达水平可导致上皮细胞一直保持“修复”表现型^[4],此表型增强了炎症介质和细胞因子的表达和释放^[5]。EGFR 的表达量主要在结构性损伤区域增高,且增高程度与哮喘的严重性相关^[6]。其配体中 HB-EGF 是多种细胞的促有丝分裂原,与 EGFR 结合后激活酪氨酸激酶及其下游的 MEK-MAPK 细胞信号转导途径促进气道平滑肌细胞和纤维母细胞的分裂增殖和迁移,参与上皮纤维化的过程^[2]。气道壁的增厚和平滑肌的收缩最终导致气道不可逆的缩窄,这也是引起哮喘症状和

生理变化的基础。本实验结果显示 EGFR、HB-EGF 在哮喘小鼠肺组织表达明显增高,与上皮下胶原沉积面积和杯状细胞数量呈正相关,表明两者促进气道结构细胞的分裂增殖和黏液的过度分泌,参与哮喘气道重塑过程。

AG1478 是人工合成的小分子蛋白酪氨酸激酶 (protein tyrosine kinase) 抑制剂,对 EGFR 具有高度选择性,体外实验表明,AG1478 通过阻断 EGFR 介导的信号转导通路,使多种效应细胞(包括气道上皮细胞,气道平滑肌细胞及血管平滑肌细胞等)的增殖受到抑制,并诱发细胞凋亡^[7]。本实验观察了 AG1478 对哮喘气道重塑的治疗作用,结果显示 AG1478 干预组 EGFR、HB-EGF 表达量较哮喘组明显降低,上皮下胶原沉积面积,杯状细胞数量及气道平滑肌增厚程度较哮喘组明显减轻。提示 AG1478 可能通过下调 EGFR、HB-EGF 的表达以及抑制依赖于 EGFR 下游的细胞信号转导级联反应来缓解哮喘气道重塑过程。

临床上广泛使用糖皮质激素类缓解哮喘发作症状,有报道激素的抗炎治疗未能明显地降低哮喘气道上皮细胞 EGFR 的表达^[4],从这一方面来看,激素治疗对其的不显效性可以用来解释那些已经接受了规律的皮质激素治疗的哮喘患者仍然出现了气道重塑的现象。

另外,Busse 等^[8]研究证实 AG1478 能够抑制白三烯类诱发的哮喘样综合症状,减少气道胶原沉积和黏液积聚,有利于重症哮喘气道的变态反应性和组织重塑的缓解。由此可见,多种分子效应集中于 EGFR 途径,促进哮喘气道高反应性、炎症及重塑的发展^[9],抑制其活性可在一定程度上减缓哮喘气道

重塑的发生,为寻找新的治疗方法提供思路。

[参 考 文 献]

[1] Sumi Y, Hamid Q. Airway remodeling in asthma[J]. Allergol Int, 2007, 56(4):341-348.

[2] Tamaoka M, Hassan M, McGovern T, Ramos-Barbon D, Jo T, Yoshizawa Y et al. The epidermal growth factor receptor mediates allergic airway remodeling in the rat [J]. Eur Respir J, 2008, 32(5):1213-1223.

[3] Du Q, Chen Z, Zhou LF, Zhang Q, Huang M, Yin KS. Inhibitory effects of astragaloside IV on ovalbumin-induced chronic experimental asthma[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2008, 86(7):449-457.

[4] Puddicombe SM, Polosa R, Richter A, Krishna MT, Howarth PH, Holgate ST, Davies DE. Involvement of the epidermal growth factor receptor in epithelial repair in asthma[J]. FASEB J, 2000(7), 14:1362-1374.

[5] Hamilton LM, Puddicombe SM, Dearman RJ, Kimber I, Sandstrom T, Wallin A et al. Altered protein tyrosine phosphorylation in asthmatic bronchial epithelium[J]. Eur Respir J, 2005, 25(6):978-985.

[6] Fedorov IA, Wilson SJ, Davies DE, Holgate ST. Epithelial stress and structural remodelling in childhood asthma[J]. Thorax, 2005, 60(10):389-394.

[7] Ellis AG, Nice EC, Weinstock J. High-performance liquid chromatographic analysis of the tyrphostin AG1478, a specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in mouse plasma[J]. Chromatogr B Biomed Sci, 2001, 754(1):193-199.

[8] Busse D, Doughty RS, Ramsey TT, Russell WE, Price JO, Flanagan WM et al. Reversible G1 arrest induced by inhibition of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase requires up-regulation of p27 Kip1 independent of MAPK activity [J]. J Biol Chem, 2000, 275(10):6987-6995.

[9] Vargaftig BB, Singer M. Leukotrienes mediate part of Ova-induced lung effects in mice via EGFR[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 285(6):L808-L818.

(本文编辑:黄 榕)