

孟鲁司特对幼年哮喘气道重塑大鼠感觉神经肽受体 NK1R 表达的影响

魏兵¹ 尚云晓² 李森² 张晗²

(1. 中国人民解放军第二〇二医院儿科, 辽宁 沈阳 110812;
2. 中国医科大学附属盛京医院儿科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的 探讨孟鲁司特对幼年哮喘气道重塑大鼠中感觉神经肽受体 NK1R 表达的影响。方法 24 只 Sprague-Dawley (SD) 大鼠随机分为对照组、哮喘组和孟鲁司特组, 每组 8 只。应用卵白蛋白 (OVA) 雾化吸入法建立哮喘大鼠模型, 对照组大鼠应用生理盐水代替致敏液和 1% OVA, 孟鲁司特组于每次激发前 2 h 以孟鲁司特 (15 mg/kg) 灌胃, 共持续 8 周。采用免疫组化、real-time PCR 和 Western blot 等方法, 从 mRNA 和蛋白水平动态观察 NK1R 在哮喘大鼠气道重塑中的表达水平及孟鲁司特对其表达的影响。结果 哮喘组 NK1R mRNA 及蛋白的表达水平较对照组明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 孟鲁司特干预后 NK1R mRNA 及蛋白表达水平较哮喘组减少 ($P < 0.05$), 但仍高于对照组 ($P < 0.01$)。结论 哮喘诱发大鼠气道 NK1R 的表达增加, 孟鲁司特能够下调哮喘大鼠气道重塑中 NK1R 的表达水平。
[中国当代儿科杂志, 2013, 15(4): 298 - 301]

[关键词] 哮喘; 气道重塑; 感觉神经肽受体; 孟鲁司特; 大鼠

Effect of montelukast on the expression of neurokinin-1 receptor in young asthmatic rats with airway remodeling

WEI Bing, SHANG Yun-Xiao, LI Miao, ZHANG Han. Department of Pediatrics, 202 Military Hospital of People's Republic of China, Shenyang 110812, China (Email: weib71@sina.com)

Abstract: Objective To investigate the effect of montelukast on the expression of sensory neuropeptide (neurokinin-1) receptor (NK1R) in young asthmatic rats with airway remodeling. **Methods** Twenty-four Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group ($n = 8$), asthma ($n = 8$), and montelukast groups ($n = 8$). A rat model of asthma was induced by ovalbumin (OVA) inhalation. Normal saline was used instead of sensitizing solution and 1% OVA in the control group. Each rat in the montelukast group was given montelukast (15 mg/kg) by gavage 2 h before OVA inhalation. All rats received their respective treatments for 8 weeks. Immunohistochemistry, real-time PCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression levels of NK1R in asthmatic airway remodeling and to evaluate the effect of montelukast on NK1R expression. **Results** The asthma group showed significantly higher mRNA and protein expression levels of NK1R than the control group ($P < 0.01$). The mRNA and protein expression levels of NK1R in the montelukast group were significantly lower than in the asthma group ($P < 0.05$), but significantly higher than in the control group ($P < 0.01$). **Conclusions** Rats with induced asthma have upregulated NK1R expression in the airway, and montelukast can downregulate NK1R expression during airway remodeling. [Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(4): 298 - 301]

Key words: Asthma; Airway remodeling; Sensory neuropeptide receptor; Montelukast; Rats

支气管哮喘(简称哮喘)是严重影响人体健康的慢性呼吸道炎症性疾病,其患病率和病死率近年有上升趋势。近年研究发现,哮喘不仅存在着气道炎症,还包括气道结构的改变,即气道重塑(airway remodeling),其病理改变主要表现为平滑肌和基底

膜增厚,气道重塑是诱发气道高反应性和哮喘慢性化的主要原因。因此,哮喘气道重塑的机制及治疗已成为当前国内、外研究的重点^[1]。

气道的神经调节系统比先前的认识复杂得多,除了经典的肾上腺素能和胆碱能神经系统外,还存

[收稿日期] 2012 - 07 - 22; [修回日期] 2012 - 10 - 02
[基金项目] 辽宁省博士启动基金(20121115)。
[作者简介] 魏兵,女,博士,副主任医师。
[通信作者] 尚云晓,教授。

在一种非肾上腺素能非胆碱能(NANC)神经系统,现研究认为后者在控制人类气道功能上可能也起着重要作用。非胆碱能兴奋性神经通道是由无髓鞘传入迷走神经纤维构成,其递质是感觉神经肽,包括P物质(SP)、神经激肽A(NKA)、神经激肽B(NKB)等,并通过相应的受体发挥作用。尚云晓等^[2-6]研究表明,感觉神经肽与小儿哮喘的发作及缓解关系极为密切,而且发现豚鼠哮喘模型急性期的支气管中感觉神经肽受体NK1R表达增多。但其在哮喘气道重塑各阶段的表达尚少见报道。

本实验应用卵白蛋白(OVA)对Sprague-Dawley(SD)大鼠在不同时间进行激发,通过real-time PCR、免疫组化、Western blot等方法,动态观察感觉神经肽受体NK1R在哮喘气道重塑中的表达及孟鲁司特对其的影响,旨在探讨哮喘气道重塑的发生与感觉神经肽受体表达的内在联系,为寻求哮喘气道重塑的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

24只周龄为4~6周的健康幼年雌性SD大鼠,体重60~80 g,购于中国医科大学实验动物中心。随机分为对照组、哮喘组和孟鲁司特组,每组8只。

1.2 动物模型建立

参考文献^[7-8],分别于第1天、第8天向大鼠腹腔注射抗原致敏液1 mL(含OVA 100 mg、氢氧化铝100 mg)(OVA购自美国Sigma公司,氢氧化铝购自沈阳化工三厂)。从第15天开始进行激发,将大鼠置于一自制密闭容器(20 cm×20 cm×20 cm)中,以1% OVA超声雾化吸入,每次30 min,每周3次,共持续8周。对照组大鼠应用生理盐水代替致敏液和1% OVA,孟鲁司特组大鼠在每次激发前2 h以孟鲁司特(15 mg/kg)灌胃。

1.3 标本采集与保存

每组大鼠于末次激发24 h内腹腔注射1%戊巴比妥钠40 mg/kg麻醉,右肺中叶置于4%多聚甲醛中用于免疫组化染色。剩余气管及肺组织于-80℃冰箱保存用于抽提总RNA、蛋白。

1.4 免疫组化法检测支气管NK1R的表达

兔抗大鼠NK1R(购自Santa Cruz公司)稀释度1:100。按试剂盒说明书常规免疫组化染色,中性树脂胶封片,显微镜下观察,阳性结果呈棕黄色。

1.5 Real-time quantitative PCR 检测 NK1R 的 mRNA 表达

用SYBR Green I荧光染料嵌合法,分别制作目的基因(NK1R)和管家基因(GAPDH)的标准曲线。利用标准曲线对样品中的目的基因和管家基因分别进行定量。待测基因mRNA的相对表达量=待测基因拷贝数/GAPDH基因拷贝数。NK1R引物序列:上游5'-ACCAACACCTCTGAGTCTAA-3';下游5'-TGCTCACTGTCTCATTCT-3',片段长度154 bp。GAPDH引物序列:上游5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3';下游5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3',产物长度142 bp。反应条件:95℃变性30 s;95℃ 6 s,60℃ 20 s,共40个循环。引物由Invitrogen英骏生物技术有限公司合成。

1.6 Western blot 检测 NK1R 蛋白的表达

大鼠肺组织匀浆离心取上清液即为肺组织总蛋白溶液,采用BCA法进行蛋白定量,10% SDS聚丙烯酰胺凝胶恒压电泳,电压积层胶80 V,分离胶120 V。用280 mA恒电流转移50 min。一抗兔抗大鼠NK1R稀释倍数1:400,碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗稀释倍数1:2000,酶显法显色。采用FlourChem V 2.0凝胶成像分析软件(America)分析,记录每条蛋白电泳带的灰度值,进行定量分析。蛋白含量=样本目的蛋白灰度值/同一样本β-actin灰度值。

1.7 统计学分析

应用SPSS 13.0统计软件对数据进行统计学分析,正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠支气管中NK1R的定位表达

免疫组化结果显示,哮喘组大鼠支气管上皮、平滑肌及其周围组织可见大量的NK1R阳性细胞,以胞浆及胞膜着色为主。见图1。

2.2 各组大鼠气管中NK1R mRNA及蛋白表达的动态变化

哮喘组NK1R mRNA及蛋白表达均高于对照组($P < 0.01$),孟鲁司特干预后NK1R mRNA、蛋白表达较哮喘组明显减少($P < 0.05$),但仍高于对照组($P < 0.01$)。见表1、图2。

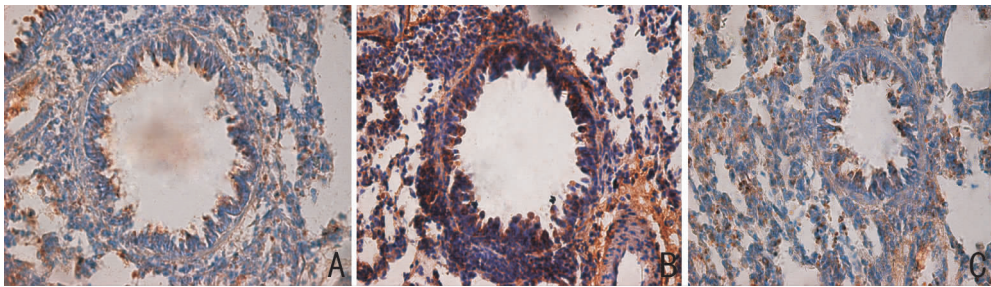


图1 各组大鼠支气管 NK1R 免疫组化染色 (×400) A 为对照组,NK1R 免疫组化染色呈阴性;B 为哮喘气道重塑组,NK1R 主要表达在支气管上皮、平滑肌及肺泡;C 为孟鲁斯特治疗组,NK1R 呈弱阳性表达。细胞膜及胞浆内棕褐色颗粒为 NK1R 阳性细胞。

表1 各组大鼠气管中 NK1R 的 mRNA、蛋白表达的动态变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NK1R mRNA	NK1R 蛋白
对照组	8	0.0199 ± 0.0002	0.3401 ± 0.0012
哮喘组	8	0.0336 ± 0.0003 ^a	0.6424 ± 0.0049 ^a
孟鲁司特组	8	0.0299 ± 0.0002 ^{a,b}	0.6041 ± 0.0038 ^{a,b}
F 值		8.69	10.82
P 值		<0.01	<0.01

a:与对照组比较, $P < 0.01$,b:与哮喘组比较, $P < 0.05$

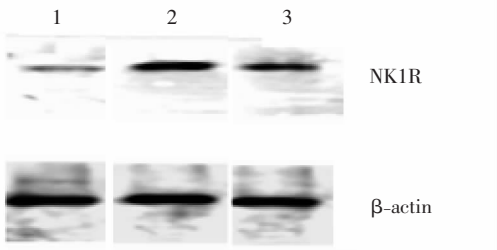


图2 Western blot 检测各组大鼠气管中 NK1R 蛋白的表达 1. 对照组;2. 哮喘组;3. 孟鲁司特组。

3 讨论

本研究前期应用 OVA 作为致敏原,以氢氧化铝为免疫佐剂,反复激发,于雾化 8 周后处死大鼠,支气管的病理图像分析及羟脯氨酸测定结果显示,哮喘各组大鼠支气管壁、平滑肌层均较对照组明显增厚,羟脯氨酸含量增高,尤以 8 周表现最为明显,表明哮喘气道重塑模型制作成功,吸入布地奈德或胃管注入孟鲁司特对于气道重塑的病理表现有明显的抑制作用^[9-10]。

感觉神经肽与哮喘发病密切相关,它可引起神经源性气道炎症。目前认为与哮喘关系较为密切的感觉神经肽有 SP、NKA、NKB 及降钙素基因相关肽 (CGRP)。而 SP、NKA、NKB 又被称为速激肽。根据各种速激肽对其受体的亲和力不同,将受体分为 NK1、NK2、NK3 三种亚型,这三种受体蛋白已分离和克隆成功。各型受体与速激肽亲和性的顺序是,NK1

受体:SP > NKA > NKB,NK2 受体:NKA > NKB > SP,NK3 受体:NKB > NKA > SP,速激肽家族的三种受体都能和 SP 相结合,每一种速激肽受体都有其特异的亲和力,并对其其它的速激肽也有一定的亲和性。大鼠和人的 SP 受体由 407 个残基组成,具有高度同源性,仅有 22 个残基不同。NK1R 分布在中枢神经系统和外周组织,NK2R 分布于外周组织、NK3R 分布于中枢神经系统。在呼吸道,NK1R 可见于气道平滑肌、黏膜下腺、血管内皮,一些炎性细胞也表达 NK1R。

本研究结果显示哮喘各组均较同期对照组 NK1R 的 mRNA、蛋白表达明显增加,并且哮喘组随抗原激发时间的延长 NK1R 的 mRNA、蛋白表达也增加,提示感觉神经肽受体可能在哮喘气道重塑的发生中起着重要的作用,哮喘组对感觉神经肽的敏感性较对照组高。

白三烯 (LTs) 是花生四烯酸的代谢产物,与受体结合可导致气道平滑肌痉挛、血浆渗出、黏液分泌和炎性细胞活化,其促支气管收缩作用是组织胺的 1000 倍,在哮喘发病中起着重要作用。除此之外,白三烯还能促进人的气道结构细胞如上皮细胞、支气管平滑肌细胞的有效分裂,促进杯状细胞增生、胶原沉积、上皮下层纤维化,从而促进慢性哮喘患者的气道重塑。在过敏原致敏的动物模型,这种作用能被 LTs 受体拮抗剂所抑制^[11-16]。孟鲁司特是新一代强效的选择性白三烯 D4 (LTD4) 受体拮抗剂,可阻断白三烯与受体的结合,从而阻断器官对白三烯的反应。本研究显示,孟鲁司特组 NK1R 的 mRNA、蛋白表达均减少,提示 LTs 受体拮抗剂下调 NK1R 的 mRNA、蛋白表达可能是其改善气道重塑的作用机制之一。

因此,调控感觉神经肽受体从而使感觉神经肽导致神经源性气道炎症作用降至最低,可能有助于哮喘气道重塑的防治,深入研究感觉神经肽及其受体在哮喘气道重塑发生中的机制可为选择更有效的针对性防治措施提供新的理论依据。

[参 考 文 献]

[1] Tagaya E, Tamaoki J. Mechanisms of airway remodeling in asthma [J]. Allergol Int, 2007, 56(4): 331-340.

[2] 尚云晓,蔡栩栩,韩晓华,赵淑琴,孔淑卿,魏克伦. 神经激肽 A 在哮喘儿童血浆含量变化的动态研究[J]. 中华儿科杂志, 2003, 41(6): 457-459.

[3] 尚云晓,韩晓华,赵淑琴,蔡栩栩. 神经激肽 B 在支气管哮喘中的含量变化[J]. 中国医科大学学报, 2003, 32(6): 481-482.

[4] 尚云晓,王艳,蔡栩栩,赵淑琴,魏克伦. 烟雾暴露对哮喘豚鼠肺组织中 P 物质含量及基因表达的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2004, 27(4): 279-280.

[5] 尚云晓,张晗,韩晓华,赵淑琴. 糖皮质激素对哮喘豚鼠血浆、肺组织中神经激肽 A 含量的影响及其分子机制[J]. 中华儿科杂志, 2005, 43(6): 418-420.

[6] 李森,尚云晓. 哮喘豚鼠气道内 NK-1R mRNA 表达及其含量的研究[J]. 中国医科大学学报, 2005, 34(6): 502-504.

[7] 梁亚峰,张维溪,李昌崇,王小明,草丽莎. 哮喘大鼠气道重塑中尾加压素 2 II 的表达变化[J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(4): 287-289.

[8] 栾斌,冯晓霞,杨玉霞,张志英. FIZZI 及 NOTCH1 在哮喘中的作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(3): 219-222.

[9] 魏兵,尚云晓,李森,张晗,李娜. 吸入布地奈德对幼年大鼠气道重塑的影响[J]. 中国美容医学, 2011, 20(6): 76-78.

[10] 魏兵,尚云晓,李森,张晗,张克,马明. 孟鲁司特对幼年大鼠气道重塑的影响[J]. 儿科药理学杂志, 2012, 18(3): 5-7.

[11] Vanacker NJ, Palmans E, Kips JC, Pauwels RA. Fluticasone inhibits but does not reverse allergen induced structural airway changes[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(3 Pt 1): 674-679.

[12] Mehrotra AK, Henderson WR Jr. The role of leukotrienes in airway remodeling[J]. Curr Mol Med, 2009, 9(3): 383-391.

[13] Bossé Y, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. Cysteinyl leukotrienes in asthmatic airway smooth muscle cell hyperplasia[J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2009, 102(1): 16-21.

[14] Potter-Perigo S, Baker C, Tsoi C, Braun KR, Isenhath S, Altman GM, et al. Regulation of proteoglycan synthesis by leukotriene d4 and epidermal growth factor in bronchial smooth muscle cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004, 30(1): 101-108.

[15] Henderson WR Jr, Tang LO, Chu SJ, Tsao SM, Chiang GK, Jones F, et al. A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 165(1): 108-116.

[16] Muz MH, Deveci F, Bulut Y, Ilhan N, Yekeler H, Turgut T. The effects of low dose leukotriene receptor antagonist therapy on airway remodeling and cysteinyl leukotriene expression in a mouse asthma model[J]. Exp Mol Med, 2006, 38(2): 109-118.

(本文编辑: 万静)

· 消息 ·

2013“心心相系”心血管高级研修班招生简章

为贯彻实施国家关于“开展先天性心脏病医疗保障试点”的新农合战略,上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心秉承医院“培训－培训者”理念,特设立“心心相系－心血管高级研修班”,从而使得现代医学技术能更快、更广泛地辐射广大边远地区,为更多的先心病患儿提供优质的医疗服务。

招生要求:

进修医师:曾有我院心胸外科专业进修经历者优先考虑。

心胸外科——三级医院,本科及以上学历,主治医生,45 岁以下,从事心胸外科专业工作 5 年以上。

术后监护——三级医院,本科及以上学历,主治医生,45 岁以下,从事心胸外科或重症监护专业工作 5 年以上。

体外循环——三级医院,本科及以上学历,40 岁以下,从事医师工作 3 年以上。研究生学历者,上述条件可酌情放宽。

进修护士:三级医院,大专及以上学历,从事心血管护理专业工作 3 年以上。曾有我院心胸外科专业进修经历者优先考虑。

培训科目:①心胸外科医生:手术、体外循环、术后监护;②心胸外科护士:术后护理

培训时间:2013 年 8 月至 2014 年 7 月(一年)

奖 学 金:一旦被录取,均属获得奖学金者,将享有免收进修费、住宿费并给予生活津贴(医生 10000 元/年,护士 8000 元/年)。

报名办法:请报名者将个人简历、申请表、一位正高级职称医师推荐信、盖有单位公章的介绍信于 2013 年 5 月 1 日前寄联系人。2013 年 6 月中旬举行面试(面试地点及时间另行通知)

联系地址:上海东方路 1678 号(200127)上海儿童医学中心科教部

电 话:021-38626161×83082/83181 传真:021-50904612。申请表可从医院网站下载:www.scmc.com.cn

联 系 人:陆老师/王老师

上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心
2013 年 3 月