

哮喘大鼠气道重塑中尾加压素-Ⅱ的表达变化

梁亚峰 张维溪 李昌崇 王小明 革丽莎

(温州医学院附属育英儿童医院呼吸科,浙江 温州 325027)

[摘 要] 目的 研究哮喘大鼠气道重塑血清和支气管肺泡灌洗液(BALF)中尾加压素-Ⅱ(U-II)含量的变化及其作用。方法 32只雄性Sprague-Dawley大鼠随机分为正常对照组、哮喘2周组、哮喘4周组和哮喘8周组,每组8只。以卵清白蛋白(OVA)致敏与激发建立哮喘大鼠气道重塑模型,图像分析技术测量大鼠支气管壁总面积和平滑肌面积,计算单位基底膜周径(Pbm)的支气管壁厚度(Wat)和平滑肌厚度(Wam),ELISA法测定血清和BALF中U-II的含量。结果 哮喘各组Wat及Wam均明显高于正常对照组($P<0.01$);哮喘组血清和BALF中U-II含量均显著高于正常对照组($P<0.01$),其中哮喘8周组血清和BALF中U-II含量显著高于哮喘4周组和哮喘2周组($P<0.01$),哮喘4周组也显著高于哮喘2周组($P<0.01$)。各组大鼠BALF中的U-II含量与Wat及Wam呈正相关,BALF与血清中U-II含量亦呈正相关。结论 哮喘大鼠气道重塑血清和BALF中U-II含量增加;且U-II含量的变化与气道重塑相关。 [中国当代儿科杂志,2010,12(4):287-289]

[关键词] 尾加压素;哮喘;气道重塑;大鼠
[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2010)04-0287-04

Changes in urotensin-II expression in airway remodelling in asthmatic rats

LIANG Ya-Feng, ZHANG Wei-Xi, LI Chang-Chong, WANG Xiao-Ming, GE Li-Sha. Department of Respiratory Diseases, Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 325027, China (Li C-C, Email: wzlichch@21cn.com)

Abstract: Objective To study the role of urotension-II in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in the process of airway remodelling in asthmatic rats. **Methods** Thirty-two male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal control and 2-week, 4-week and 8-week asthmatic groups (OVA inhalation of 2, 4 and 8 weeks respectively). Rats were sensitized and challenged by OVA to establish a model of asthma. The bronchial wall thickness and the airway smooth muscle thickness were measured by image analysis system. The urotension-II contents in serum and BALF were determined using ELISA. **Results** The bronchial wall thickness and the airway smooth muscle thickness in the three asthmatic groups significantly increased compared with those in the normal control group ($P<0.01$). The urotension-II contents in serum and BALF in the three asthmatic groups also increased significantly compared with those in the normal control group ($P<0.01$). The urotension-II contents in serum and BALF in the 8-week asthmatic group were the highest, followed by the 4-week and the 2-week asthmatic groups ($P<0.01$). BALF urotension-II contents were positively correlated with the bronchial wall thickness and the airway smooth muscle thickness as well as serum U-II contents in the four groups. **Conclusions** The urotension-II contents in serum and BALF in the process of airway remodeling increase in asthmatic rats. The changes in serum and BALF urotension-II contents may be associated with airway remodeling in asthmatic rats. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (4):287-289]

Key words: Urotensin; Asthma; Airway remodeling; Rats

气道炎症和气道重塑(airway remodeling)是支气管哮喘(简称哮喘)的两个主要病理学特征。尾加压素-Ⅱ(U-II)是一类重要的内源性血管活性物质^[1],近年发现,U-II除了收缩血管外,还具有收缩气道和促增殖效应^[2]。U-II被认为参与了哮喘的发病机制。

[收稿日期]2009-09-22;[修回日期]2009-12-07
[基金项目]国家自然科学基金项目(30271383);浙江省教育厅基金项目(Y20070906)。
[作者简介]梁亚峰,男,硕士研究生。
[通信作者]李昌崇,教授。

1 材料和方法

1.1 大鼠哮喘模型的复制

清洁级雄性 Sprague-Dawley 大鼠 32 只(温州医学院实验动物中心),体重(100 ~ 120 g),随机分成 4 组(每组 8 只):正常对照组、哮喘 2 周组、哮喘 4 周组、哮喘 8 周组。哮喘模型的制备参照文献^[3]。哮喘组在第 1 天和第 8 天腹腔注射 1.5 mL OVA/Al(OH)₃ 混合液(内含 OVA 1 mg 和 Al(OH)₃100 mg),第 15 天开始 1% OVA 雾化吸入,隔天一次,每次 30 min。各组雾化吸入的时间分别为 2 周、4 周和 8 周。正常对照组以生理盐水代替 OVA/Al(OH)₃ 混合液或 1% OVA 雾化液予腹腔注射和雾化吸入,雾化时间为 4 周。

1.2 动物处理

末次雾化吸入 12 h 内,10%水合氯醛(4 mL/kg)腹腔麻醉,股动脉取血,全血离心(4℃,2 000 rpm,离心 15 min),吸取血清分装,置于 - 70℃ 保存备用。剪开胸腔,迅速分离肺组织,结扎右主支气管,经气管行左肺灌洗。10 mL 生理盐水分 3 次灌洗,约 30 s 后回收支气管肺泡灌洗液(BALF),回收率高于 80%,灌洗液处理方法同血清。切取右肺肺门上段肺组织,浸入中性多聚甲醛固定,常规石蜡包埋及切片(厚约 5 μm),苏木精-伊红染色观察。

1.3 支气管管壁厚度和平滑肌厚度测量

每只大鼠选择 3 支直径 1 000 ~ 1 500 μm 支气管,用彩色医学图像分析技术测定支气管基底膜周径(Pbm)、支气管总面积(At)、管腔面积(Ac)、平滑肌外缘内气管面积(AMe)、平滑肌内缘内气管面积(AMi)。

计算公式:支气管壁厚度(Wat) = (At-Ac)/Pbm;平滑肌厚度(Wam) = (AMe-AMi)/Pbm。

1.4 血清及 BALF 中 U-II 含量的检测

采用 ELISA 法检测大鼠血清及 BALF 中 U-II 含量,所有标本按照试剂盒说明书操作步骤进行。大鼠 U-II ELISA 试剂盒由美国 R&D 公司提供,使用 Bio-Tek 酶标仪在 450 nm 处测量吸光强度。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 13.0 软件进行分析。数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组样本均数比较采用单因素方差分析,均数间两两比较采用 *q* 检验;两变量相关分析采用直线相关法,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 Wat 及 Wam 的变化

哮喘各组 Wat 及 Wam 与正常对照组比较均明显增厚,差异有统计学意义(*P* < 0.01);随着 OVA 雾化吸入时间的增加 Wat 和 Wam 逐渐增厚,其中哮喘 8 周组明显高于 4 周组和 2 周组(*P* < 0.01)。见表 1。

表 1 各组大鼠 Wat 及 Wam 的变化 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)

组别	鼠数	Wat	Wam
正常对照组	8	30.46 ± 1.05	12.12 ± 0.77
哮喘 2 周组	8	49.19 ± 1.79 ^a	18.61 ± 1.41 ^a
哮喘 4 周组	8	53.56 ± 2.44 ^{a,b}	22.02 ± 1.63 ^{a,b}
哮喘 8 周组	8	64.01 ± 2.58 ^{a,b,c}	27.98 ± 2.53 ^{a,b,c}
<i>F</i> 值		371.47	120.31
<i>P</i> 值		< 0.01	< 0.01

a: 与正常对照组比较, *P* < 0.01; b: 与哮喘 2 周组比较, *P* < 0.01; c: 与哮喘 4 周组比较, *P* < 0.01

2.2 各组大鼠血清及 BALF 中 U-II 的含量变化

哮喘各组血清、BALF 中 U-II 的含量均高于正常对照组(*P* < 0.01);而且随着 OVA 雾化吸入时间的增加,血清和 BALF 中 U-II 的含量也逐渐增高。哮喘 8 周组明显高于 4 周和 2 周组(*P* < 0.01)。见表 2。

表 2 各组大鼠血清及 BALF U-II 含量的比较 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/mL}$)

组别	鼠数	血清	BALF
正常对照组	8	8.23 ± 0.57	2.88 ± 0.38
哮喘 2 周组	8	48.23 ± 4.41 ^a	56.06 ± 2.82 ^a
哮喘 4 周组	8	73.61 ± 8.09 ^{a,b}	78.51 ± 3.62 ^{a,b}
哮喘 8 周组	8	102.2 ± 12.96 ^{a,b,c}	131.15 ± 7.01 ^{a,b,c}
<i>F</i> 值		200.72	1286.31
<i>P</i> 值		< 0.01	< 0.01

a: 与正常对照组比较, *P* < 0.01; b: 与哮喘 2 周组比较, *P* < 0.01; c: 与哮喘 4 周组比较, *P* < 0.01

2.3 大鼠 U-II 含量与 Wat 及 Wam 的关系

BALF 中 U-II 含量与 Wat 呈正相关(*r* = 0.919, *P* < 0.01),与 Wam 也呈正相关(*r* = 0.927, *P* < 0.01)。

2.4 大鼠 BALF 与血清中 U-II 含量的关系

BALF 中 U-II 含量与血清 U-II 含量呈正相关(*r* = 0.942, *P* < 0.01)。

3 讨论

新近研究发现,神经信号通路通过调控炎症细胞、结构细胞、细胞因子和炎性介质的作用,参与哮喘气道重塑的形成。参与哮喘气道重塑的神经信号通路包括丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)神经信号通路、蛋白激酶C(PKC)神经信号通路、smad神经信号通路和U-II神经信号通路^[4]。

U-II被证实存在于鱼类、啮齿类、灵长类及人类,是一重要的内源性血管活性物质,可促进气道平滑肌细胞增殖。Russell等^[5]证明在人体中,肺脏是U-II的主要来源之一。近年来,人们对U-II的心血管作用研究较深入,但在气道的生物学方面的作用尚未阐明。本研究显示,经过不同时间的雾化,哮喘大鼠的血清和BALF中U-II含量较正常对照组均明显升高。哮喘大鼠血清和BALF中U-II的含量增高,与张辉等^[6]及李建东等^[7]的临床研究一致。另外,各哮喘组之间U-II含量差异亦有统计学意义,并且随雾化时间的延长呈现增加的趋势,表明随着时间的延长,哮喘大鼠U-II含量存在动态变化,并且始终维持在较高水平。对不同组大鼠气道壁的厚度测量后发现,哮喘大鼠的Wat和Wam也呈现增加的趋势,且均高于正常对照组。哮喘大鼠血清和BALF中U-II含量的变化与Wat和Wam的变化基本一致,相关分析表明BALF中U-II的含量变化与Wat和Wam呈正相关。本研究认为血清与BALF中U-II含量的升高,尤其是分泌到气道内的U-II含量的升高,且长时间维持在较高水平,与气道壁的增厚密切相关,表明U-II可能是引起气道重塑的重要因素之一。PKC、MAPK和smad神经信号通路在平滑肌细胞增殖中均起着重要的信号转导作用。有研究发现,MAPK抑制剂PD98059可以浓度依赖性地抑制U-II诱导的肺动脉收缩^[8]。在哮喘发病中U-

II信号通路与上述信号通路的相互作用有待进一步阐述。BALF与血清中U-II含量存在相同的变化趋势,相关性分析表明两者之间存在显著的相关性。提示哮喘时肺组织和炎症细胞合成、分泌U-II增加,引起血清和分泌到气道内的U-II明显增多,从而与其他因子共同参与气道的病理生理过程。

气道平滑肌细胞增生/肥大是哮喘气道重塑典型的病理特征,深入研究U-II的促气道平滑肌细胞增殖的病理生理作用及作用机制,对预防和治疗哮喘有重要意义,为临床治疗提供新的作用靶点。

[参 考 文 献]

[1] Shenouda A, Douglas SA, Ohlstein EH, Giaid A. Localization of urotensin-II immunoreactivity in normal human kidneys and renal carcinoma [J]. J Histochem Cytochem, 2002, 50(7): 885-889.

[2] Chen YH, Zhao MW, Yao WZ, Pang YZ, Tang CS. The signal transduction pathway in the proliferation of airway smooth muscle cells induced by urotensin II[J]. Chin Med J, 2004, 117(1): 37-41.

[3] 管小俊, 张维溪, 李昌崇, 郑仰明, 林立, 叶乐平, 等. 细胞外信号调节激酶和转化生长因子 $\beta 1$ 在哮喘气道重塑中的作用以及糖皮质激素的作用[J]. 中华医学杂志, 2007, 87(25): 1767-1772.

[4] 张维溪, 李昌崇. 气道重塑与儿童哮喘[J]. 中华儿科杂志, 2006, 44(8): 632-633.

[5] Russell FD, Meyers D, Galbraith AJ, Bett N, Toth I, Kearns P, et al. Elevated plasma levels of human urotensin-II immunoreactivity in congestive heart failure[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285(4): H1576-1581.

[6] 张辉, 张靖溥. 尾加压素 II 与支气管哮喘患者的相关性研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(7): 426.

[7] 李建东, 于忠和, 刘伯英, 郝淑玲. 支气管哮喘患者血浆尾加压素 II、肾上腺髓质素水平的变化及其临床意义[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(12): 797.

[8] 陈少贤, 薛必成, 龚永生, 范小芳, 胡良刚, 陈彦凡, 等. 大鼠尾加压素 II 收缩大鼠离体肺主动脉环与 MAPK 相关[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(10): 1365-1368.

(本文编辑:黄 榕)

黄芪甲甙对骨髓间充质干细胞分泌干细胞因子的影响

谭艳芳¹ 殷小成¹ 熊玉娟² 王艳¹

(1. 南华大学附属第一医院儿科, 湖南 衡阳 421001; 2. 湖南省儿童医院康复科, 湖南 长沙 410000)

[摘要] **目的** 初步探讨中药黄芪甲甙对大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)表达细胞因子的影响。**方法** 全骨髓贴壁法和单克隆培养法分离培养大鼠 MSCs, 间接免疫荧光法鉴定其生物学特性, 用 MTT 法检测黄芪甲甙对 MSCs 增殖的影响, RT-PCR 方法检测多种细胞因子的表达及黄芪甲甙对细胞因子的影响。**结果** 成功分离出大鼠 MSCs, 有干细胞因子(SCF)、血小板生成素(TPO)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、转化生长因子(TGF-β1)的表达, 不表达白介素-3(IL-3); 加入不同浓度的黄芪甲甙与 MSCs 共培养 24、48、72 h 后, 以 200 mg/mL 黄芪甲甙组 72 h 增殖作用最明显($P < 0.05$); RT-PCR 分析示黄芪甲甙培养组 MSCs 分泌 SCF mRNA 高于未加黄芪甲甙的对照组($P < 0.01$), 其余细胞因子表达量与对照组相比差异无统计学意义。**结论** 黄芪甲甙能促进 MSCs 体外增殖, 并可以诱导和促进 MSCs 分泌 SCF, 这可能揭示了其促进 MSCs 增殖和分化的部分机制。

[中国当代儿科杂志, 2010, 12(4): 290 - 292]

[关键词] 黄芪甲甙; 干细胞因子; 间充质干细胞
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008 - 8830(2010)04 - 0290 - 03

Stem cell factor secretion by bone mesenchymal stem cells stimulated with astragaloside IV

TAN Yan-Fang, YIN Xiao-Cheng, XIONG Yu-Juan, WANG Yan. Department of Pediatrics, First Hospital, Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001 (Yin X-C, Email: xcyin108@sina.com)

Abstract: Objective To study the effect of astragaloside IV on the expression of cytokines in bone mesenchymal stem cells (MSCs) in rats. **Methods** MSCs were isolated from Wistar rats by the method of adhesive cultivation and clone, and then their biological activities were assessed using indirect immunofluorescence. Proliferation of MSCs stimulated with astragaloside IV was ascertained by the MTT method. Expression of cytokines was ascertained using RT-PCR in MSCs with astragaloside IV stimulation or not. **Results** MSCs were effectively isolated and purified *in vitro*, and had expression of many cytokines except IL-3, such as stem cell factor (SCF), thrombopoietin (TPO), granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and transforming growth factor (TGF-β1). Astragaloside IV stimulation promoted MSCs proliferation, and 200 mg/mL astragaloside IV treatment produced a peak effect 72 hrs after culture. The SCF expression in MSCs stimulated with astragaloside IV increased significantly compared with that in MSCs without astragaloside IV stimulation. **Conclusions** Astragaloside IV may promote MSCs proliferation and increase SCF secretion *in vitro*. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (4): 290 - 292]

Key words: Astragaloside IV; Stem cell factor; Mesenchymal stem cell

机体正常的造血活动依赖于造血细胞和支持造血细胞生长发育的造血微环境的相互作用。源于骨髓中的间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是造血微环境的重要组成部分, 它通过与造血细胞直接接触, 分泌细胞外基质及多种细胞因子调控造血, 其结构和功能的完整性对于保持机体在生理状况下尤其是应激状态下造血的稳定性具有十分重要的作用。以往研究表明, 黄芪甲甙可以影响

MSCs 增值并诱导其分化^[1], 本研究以大鼠 MSCs 为对象, 探讨黄芪甲甙对 MSCs 增殖活性及部分细胞因子表达的影响, 从而探索其促增殖和诱导分化的生物学机制, 为黄芪甲甙在临床血液病中的应用提供实验依据。

[收稿日期] 2009 - 07 - 14; [修回日期] 2009 - 10 - 12
[作者简介] 谭艳芳, 女, 硕士研究生, 住院医师。
[通信作者] 殷小成, 副主任医师。