

FIZZ1 及 NOTCH1 在哮喘中的作用

栾斌 冯晓霞 杨玉霞 张志英

(郑州大学第三附属医院儿内科,河南 郑州 450052)

[摘要] 目的 探讨气道重塑中低氧诱导的有丝分裂因子(FIZZ1)和 NOTCH1 的表达及罗格列酮的干预作用。方法 健康6~8周龄雄性 Sprague-Dawley 大鼠45只,分为哮喘组、对照组及罗格列酮干预组。制备肺组织石蜡切片进行病理学检查,免疫组化测定各组气道重塑特异性指标 a-肌动蛋白(a-SMA)在肺组织中的表达,用 RT-PCR 方法测定各组肺组织中 FIZZ1-mRNA 及 NOTCH1-mRNA 的表达。结果 哮喘组出现气道重塑的特征性改变,罗格列酮干预组气道病理学改变较哮喘组减轻。哮喘组 a-SMA、FIZZ1-mRNA 及 NOTCH1-mRNA 表达较对照组增高,罗格列酮干预后表达均显著降低,但仍高于对照组。a-SMA 蛋白的表达与 FIZZ1-mRNA 及 NOTCH1-mRNA 的表达均呈正相关(r 分别为 0.826 和 0.9, $P < 0.01$), FIZZ1-mRNA 及 NOTCH1-mRNA 的表达成正相关($r = 0.76$, $P < 0.01$)。结论 FIZZ1 及 NOTCH1 可促使 a-SMA 表达增强,是引起哮喘早期气道重塑的重要炎症因子。罗格列酮可缓解气道重塑的过程。
[中国当代儿科杂志,2011,13(3):219-222]

[关键词] 哮喘; a-肌动蛋白; 低氧诱导的有丝分裂因子; NOTCH1; 大鼠
[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2011)03-0219-04

Roles of FIZZ1 and NOTCH1 in asthma

LUAN Bin, FENG Xiao-Xia, YANG Yu-Xia, ZHANG Zhi-Ying. Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Email: luanbin0588@tom.com)

Abstract: Objective To investigate the roles of FIZZ1 and NOTCH1 in the pathogenesis of asthma and the effect of rosiglitazone on airway remodeling. **Methods** Forty-five healthy 6 to 8-week-old Sprague-Dawley rats were randomly divided into a control group and asthma groups with and without rosiglitazone treatment. The paraffin slices of lung tissues were made to assess the histological changes. a-SMA protein, a specific marker of airway remodeling, in lung tissues was measured by immunohistochemistry. FIZZ1-mRNA and NOTCH1-mRNA expression in lung tissues was measured by RT-PCR. **Results** The characteristic changes of airway remodeling were observed in the untreated asthma group. The histological changes in the airway were less severe in the rosiglitazone treated asthma group. Positive a-SMA staining, FIZZ1-mRNA and NOTCH1-mRNA were highly expressed in peribronchial lung sections isolated from the untreated asthma group. Rosiglitazone treatment decreased significantly the expression of a-SMA protein, FIZZ1-mRNA and NOTCH1-mRNA compared with the untreated asthma group, but the expression of a-SMA protein, FIZZ1-mRNA and NOTCH1-mRNA in the rosiglitazone treated asthma group remained higher than the control group. a-SMA expression was positively correlated with FIZZ1-mRNA ($r = 0.826$, $P < 0.01$) and NOTCH1-mRNA expression ($r = 0.9$, $P < 0.01$). FIZZ1-mRNA expression was positively correlated with NOTCH1-mRNA expression ($r = 0.76$, $P < 0.01$). **Conclusions** FIZZ1 and NOTCH1 may induce an increase in a-SMA expression. FIZZ1 and NOTCH1 play a critical role in the process of airway remodeling. Rosiglitazone treatment may inhibit airway remodeling in asthmatic rats.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (3):219-222]

Key words: Asthma; a-SMA; FIZZ1; NOTCH1; Rats

气道重塑在哮喘发病过程中起重要作用,是支气管哮喘的重要病理特征之一。气道重塑过程中平滑肌细胞增生肥大,胶原沉积,上皮纤维化,成纤维细胞增殖并且分化为特异性表达 a-肌动蛋白(a-smooth muscle actin, a-SMA)的肌成纤维细胞, a-SMA目前被认为是早期气道重塑中的重要指标。研究显示肺间质纤维化的病理过程也包括平滑肌增生、肥大、胶原沉积及纤维细胞的形成^[1],这些与哮喘早期气道重塑的病理过程相似,因此某些参与肺间质纤维化的重要炎症因子,可能在哮喘早期气道

[收稿日期]2010-08-17;[修回日期]2010-09-15
[作者简介]栾斌,男,主任医师。

重塑中也同样发挥重要的作用。低氧诱导的有丝分裂因子(FIZZI)是2000年首次在过敏性炎症中发现的独立新基因^[2],NOTCH1是一种单次跨膜受体蛋白,可影响多种细胞的分化、增殖和凋亡^[3]。近期研究显示在肺纤维化过程中二者均对于肌成纤维细胞分化有很大的促进作用,而且NOTCH1信号系统参与了FIZZI诱导成纤维细胞分化的过程^[4-5]。但二者在支气管哮喘的发生中是否发挥作用,作用机制及相关性还了解甚少。众多的文献均表明噻唑烷二酮(TZD)类药物如罗格列酮可抑制抵抗素的表达^[6]。本研究通过检测支气管哮喘模型大鼠肺组织中a-SMA蛋白及FIZZI基因、NOTCH1基因表达,探讨FIZZI及NOTCH1信号在支气管哮喘发病中的作用,及罗格列酮对气道重塑的干预作用,旨在为支气管哮喘的发病机制及治疗寻找一种新的研究方向。

1 材料与方法

1.1 动物及试剂

健康SDF级6~8周龄雄性Sprague-Dawley大鼠45只(由郑州大学动物中心提供);罗格列酮(商品名:文迪雅,葛兰素史克公司);兔抗大鼠a-SMA多克隆抗体抗(北京博奥森生物技术有限公司);SP及DAB显色试剂盒(北京中山生物有限公司);Tripure及RT-PCR试剂盒(北京全式金生物技术有限公司);PCR GeneAmp System(美国Applied Biosystems)。

1.2 实验方法

1.2.1 模型建立 参考文献^[7]并加以改进建立哮喘模型。将45只大鼠随机分为哮喘组、罗格列酮干预组(干预组)和对照组,每组15只。哮喘组:将卵清蛋白100 mg和氢氧化铝100 mg溶于生理盐水1 mL中配成新鲜凝胶,于第1、8及15天在大鼠双侧腹股沟皮下注射各0.2 mL,同时腹腔注射0.6 mL,共计1 mL;第22天开始将大鼠置于有机玻璃盒中,每天雾化吸入2%卵蛋白30 min,连续14 d。干预组:致敏和激发同哮喘组,于雾化第7天开始每天10 mg/kg罗格列酮(混悬于5%羧甲基纤维素钠0.2 mL中)灌胃,共7 d。对照组:用等量生理盐水双侧腹股沟皮下注射、腹腔注射和雾化吸入,余同哮喘组。哮喘组大鼠发作时表现为烦躁不安,活动频繁,呼吸急促,缩胸收腹,点头呼吸及大小便失禁等。

1.2.2 病理切片制备 3组大鼠均在末次雾化24 h后收集标本。将大鼠用1.5%的戊巴比妥

40 mg/kg麻醉后处死,切取大鼠左肺一叶,放入4%的甲醛溶液中,固定24 h以上,按矢状面在中外1/3处制备石蜡切片。石蜡切片60℃烤2 h后,二甲苯脱蜡,酒精梯度脱水后,常规苏木素-伊红染色。

1.2.3 免疫组织化学法检测a-SMA表达 石蜡切片脱蜡至水,滴加3% H₂O₂,室温孵育40 min,PBS浸泡进行抗原修复;加血清封闭,室温孵育40 min,加入兔抗大鼠a-SMA多克隆抗体一抗4℃过夜后室温放置40 min,PBS浸泡后加二抗,37℃孵育40 min;PBS浸泡后加辣根酶、显色剂、苏木素染色显色。

1.2.4 RT-PCR检测FIZZI-mRNA及NOTCH1-mRNA在肺组织中的表达 取大鼠右叶肺组织,用Trizol试剂方法提取总RNA,逆转录后进行PCR反应,产物在2%琼脂糖凝胶上电泳。FIZZI上游引物:5-CAACCTGTTCCCTTCTCA-3;下游引物:5-AC-CAGTAGCAGTCATCCC-3;扩增产物215 bp。NOTCH1上游引物:5-AGAATGAGGACTGGGTGA;下游引物:GCTAAGAAGGCGATACAA;扩增产物312 bp。GAPDH(内参)上游引物:GCACCGTCAAGGCT-GAGAAC,下游引物:TGGTGAAGACGCCAGTGGA,扩增产物138 bp。

1.3 统计学分析

用SPSS 17.0统计软件进行统计学分析。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数的比较采用单因素方差分析,两变量的相关分析用Pearson相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织形态学观察

本研究发现哮喘组气道壁及气道平滑肌明显增厚,管腔狭窄,管壁黏膜下及管壁周围炎性细胞浸润。干预组上皮破坏、气道壁增厚、管腔狭窄减轻,管壁黏膜下及管壁周围少量炎性细胞浸润。对照组无上皮破坏、气道壁增厚、气管腔狭窄及炎性细胞浸润等变化。见图1。

2.2 肺组织a-SMA的表达

3组均有a-SMA褐色阳性表达,其中对照组表达较弱,哮喘组、干预组a-SMA表达均较对照组明显增多($P < 0.05$),但干预组的a-SMA表达弱于哮喘组($P < 0.05$)。见表1,图2,图3。

2.3 肺组织中FIZZI-mRNA、NOTCH1-mRNA的表达

FIZZI-mRNA、NOTCH1-mRNA在哮喘组及干预组的表达均较对照组高($P < 0.05$),其中干预组的表

达低于哮喘组($P < 0.05$)。见表 1、图 4。

2.4 相关性分析

肺组织内 FIZZ1-mRNA、NOTCH1-mRNA 的表达与 a-SMA 表达呈正相关(r 分别为 0.826 和 0.9, $P < 0.01$);肺组织内 FIZZ1-mRNA 的表达与 NOTCH1-mRNA 的表达呈正相关($r = 0.76, P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠 a-SMA、FIZZ1-mRNA 及 NOTCH1-mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	a-SMA(%)	FIZZ1-mRNA	NOTCH1-mRNA
对照组	15	11 ± 5	0.204 ± 0.06	0.252 ± 0.17
哮喘组	15	36 ± 6 ^a	0.406 ± 0.01 ^a	0.881 ± 0.14 ^a
干预组	15	22 ± 5 ^{a,b}	0.295 ± 0.05 ^{a,b}	0.554 ± 0.68 ^{a,b}
<i>F</i> 值		79.508	54.496	59.857
<i>P</i> 值		< 0.05	< 0.05	< 0.05

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

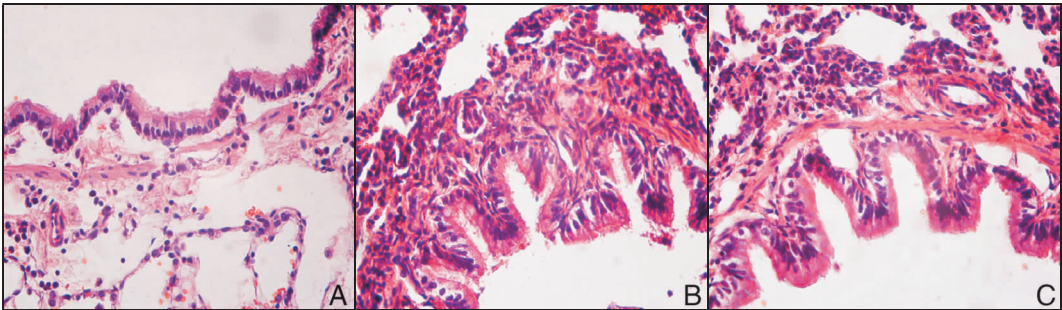


图 1 各组大鼠肺部炎症表现(苏木素-伊红染色,×400) A:对照组,无上皮破坏、气道壁增厚、气管腔狭窄、管壁黏膜下及管壁周围炎性细胞浸润等变化;B:哮喘组,上皮破坏,气道壁增厚,气管腔狭窄明显,管壁黏膜下及管壁周围大量炎性细胞浸润;C:干预组,上皮破坏,气道壁增厚,气管腔狭窄减轻,管壁黏膜下及管壁周围少量炎性细胞浸润。

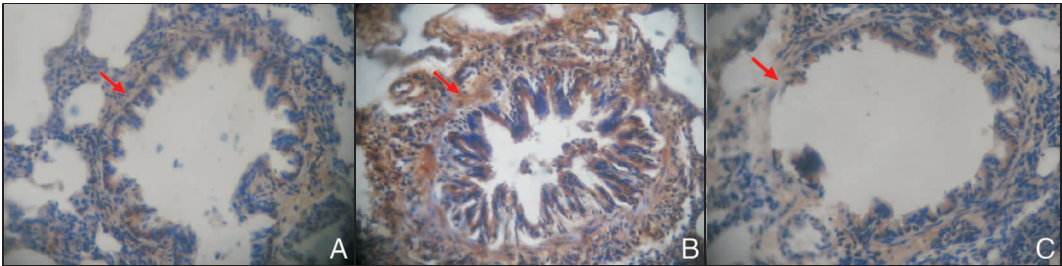


图 2 各组大鼠肺组织 a-SMA 蛋白的表达(免疫组化,×400) A:对照组,a-SMA 呈弱阳性表达;B:哮喘组,a-SMA 呈强阳性表达;C:干预组,罗格列酮干预后,a-SMA 表达减弱。箭头所指为褐色阳性细胞。

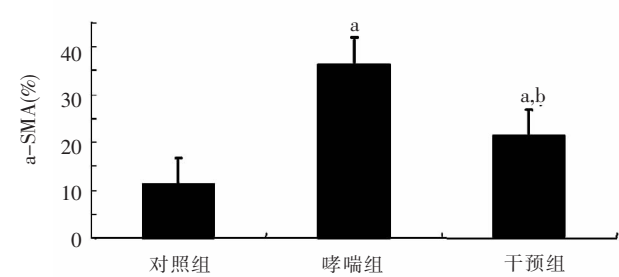


图 3 a-SMA 在肺组织的表达

a:与对照组相比, $P < 0.05$;b:与哮喘组相比, $P < 0.05$

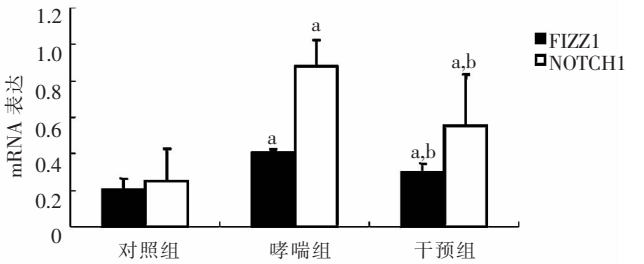


图 4 FIZZ1-mRNA 及 NOTCH1-mRNA 在肺组织中的表达

a:与对照组相比, $P < 0.05$;b:与哮喘组相比, $P < 0.05$

3 讨论

哮喘早期气道重塑是由 Huber 等在 1922 年首先提出的,近年来许多病理和形态学研究也进一步证实了哮喘气道结构的变化^[8]。气道重塑的主要

特征包括气道壁增厚和基质沉积,平滑肌增生和肥大,胶原沉积,上皮下纤维化等。气道炎症导致上皮细胞损伤,促进炎症因子释放,刺激成纤维细胞活化,转化成肌成纤维细胞^[9]。肌成纤维母细胞是介于成纤维细胞和平滑肌细胞之间的一种高度活跃的间质细胞,可破坏细胞外基质内环境稳定,促进胶原

沉积,促使气道收缩的能力下降,并且特征性地表达 a-SMA,最终引起管腔的过度狭窄。因此,a-SMA 被认为是早期气道重塑中的重要指标。本研究中,哮喘组 a-SMA 蛋白大量表达,说明哮喘组大鼠早期气道壁成纤维细胞增多,发生了气道重塑现象。

FIZZ1 和抵抗素一样都包括 N 末端信号序列和保守的半胱氨酸残基,故又被称为类抵抗素家族成员^[10]。近期研究显示 FIZZ1 在肺成纤维化过程中对于肌成纤维母细胞分化有很大的促进作用^[1]。NOTCH1 是一种单次跨膜受体蛋白,参与调节各种细胞分化发育及调控的信号途径,其对细胞凋亡、增殖、分化具有广泛的影响。近期研究显示 NOTCH1 能够调节平滑肌细胞的增殖、迁移和生存,并可以通过多种细胞调节 a-SMA 的表达和分化^[11-16]。本研究中,哮喘组 a-SMA、FIZZ1-mRNA 及 NOTCH1-mRNA 表达较高,而且 FIZZ1-mRNA 及 NOTCH1-mRNA 的表达强度与 a-SMA 蛋白的表达水平呈正相关。表明 FIZZ1 及 NOTCH1 可能诱导肺成纤维细胞的活化并促其向肌成纤维细胞分化,导致 a-SMA 增多,引起管腔收缩和管壁增厚僵硬,参与调控哮喘早期气道重塑的发生。

罗格列酮属噻唑烷二酮类口服药物,是高选择性的过氧化酶体增殖活化受体的强效激动剂。目前主要应用于糖尿病的治疗。文献表明罗格列酮可抑制抵抗素的表达^[6]。本研究中罗格列酮干预组肺组织 FIZZ1-mRNA 的表达较哮喘组降低,进一步证实罗格列酮可通过抑制 FIZZ1 的表达,使 a-SMA 蛋白表达减轻,从而抑制气道重塑的发生。

新近的研究证实 NOTCH1 信号系统参与了 FIZZ1 诱导成纤维细胞分化的过程,对于 FIZZ1 诱导成纤维细胞分化起着非常重要的作用,两者呈正相关性^[5]。本研究中罗格列酮干预后 NOTCH1-mRNA 的表达较哮喘组降低;且 NOTCH1-mRNA 与 FIZZ1-mRNA 表达的相关性分析发现两者呈正相关,进一步证实:在哮喘气道重塑过程中,NOTCH1 及 FIZZ1 可共同调节 a-SMA 蛋白的表达,促进气道重塑的发生,具体机制有待于进一步研究。

综上所述,FIZZ1 及 NOTCH1 可通过促进哮喘气管内成纤维细胞转变表型,促进气道重塑的发生,是促进气道重塑的重要炎症因子,且二者具有协同性。罗格列酮可降低 FIZZ1 的表达,抑制气道重塑的发生。

[参 考 文 献]

[1] Liu T, Dhanasekaran SM, Jin H, Hu B, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, et al. FIZZ1 stimulation of myofibroblast differentiation[J]. Am J Pathol, 2004, 164(4): 1315-1326.

[2] Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, Baker TW, Gurney A, Henzel W, et al. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated With pulmonary inflammation, defines a new gene family[J]. EMBO J, 2000, 19(15): 4046-4055.

[3] Axelson H. Notch signaling and cancer: emerging complexity[J]. Semin Cancer Biol, 2004, 14(5): 317-319.

[4] Katsuma S, Nishi K, Tanigawara K, Ikawa H, Shiojima S, Takagaki K, et al. Molecular monitoring of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by cDNA microarray-based gene expression profiling [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 288(4): 747-751.

[5] Liu T, Hu B, Choi YY, Chung M, Ullenbruch M, Yu H, et al. Notch1 signaling in FIZZ1 induction of myofibroblast differentiation [J]. Am J Pathol, 2009, 174(5): 1745-1755.

[6] Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, et al. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by gamma activators[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 300(2): 472-476.

[7] 栾斌,黄先杰,乔俊英. SDF-1 及 CXCR4 在哮喘小鼠肺组织中的表达及布地奈德的干预作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(3): 215-218.

[8] An SS, Bai TR, Bates JH, Black JL, BrownRH, Brusasco V, et al. Airway smooth muscle dynamics: a common pathway of airway obstruction in asthma[J]. Eur Respir J, 2007, 29(5): 834-860.

[9] Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, et al. Airway remodeling in asthma[J]. Chest, 2003, 123(3 Suppl): 417S-422S.

[10] Gerstmayr B, Küsters D, Gebel S, Müller T, Van Miert E, Hofmann K, et al. Identification of RELMgamma, a novel resistin-like molecule with a distinct expression pattern[J]. Genomics, 2003, 81(6): 588-595.

[11] Sweeney C, Morrow D, Birney YA, Coyle S, Hennessy C, Scheller A, et al. Notch 1 and 3 receptor signaling modulates vascular smooth muscle cell growth, apoptosis, and migration via a CBF-1/RBP-Jk dependent pathway [J]. FASEB J, 2004, 18(12): 1421-1423.

[12] Havrda MC, Johnson MJ, O'Neill CF, Liaw L. A novel mechanism of transcriptional repression of p27kip1 through Notch/HRT2 signaling in vascular smooth muscle cells[J]. Thromb Haemost, 2006, 96(3): 361-370.

[13] Wang W, Prince CZ, Hu X, Pollman MJ. HRT1 modulates vascular smooth muscle cell proliferation and apoptosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 308(3): 596-601.

[14] Doi H, Iso T, Sato H, Yamazaki M, Matsui H, Tanaka T, et al. Jagged1-selective notch signaling induces smooth muscle differentiation via a RBP-Jkappa-dependent pathway [J]. J Biol Chem, 2006, 281(39): 28555-28564.

[15] Nosedà M, Fu Y, Niessen K, Wong F, Chang L, McLean G, et al. Smooth muscle alpha-actin is a direct target of Notch/CSL[J]. Circ Res, 2006, 98(12): 1468-1470.

[16] Proweller A, Pear WS, Parmacek MS. Notch signaling represses myocardin-induced smooth muscle cell differentiation [J]. Biol Chem, 2005, 280(10): 8994-9004.

(本文编辑:俞 燕)