

论著·实验研究

全反视黄酸对哮喘大鼠气道反应性和气道重塑的影响

李文开 李云 钟礼立

(湖南省人民医院儿科,湖南 长沙 410005)

[摘要] 目的 观察全反视黄酸(ATRA)对哮喘大鼠气道反应性、气道重塑和肺组织基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达的影响。方法 40只大鼠随机分为5组,每组8只:盐水组、模型组、ATRA组、棉籽油组和布地奈德(BUD)组。后4组经卵清蛋白(OVA)致敏14d后激发6周,构建大鼠慢性哮喘模型。ATRA组、棉籽油组和BUD组每次激发前分别给予ATRA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、棉籽油 1 mL和BUD 0.32 mg/kg 。5组大鼠行气道反应性检测,并测定肺组织MMP-9表达和气道重塑情况。结果 ATRA干预组的气道反应性与盐水组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),MMP-9表达高于盐水组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。ATRA干预组的气道反应性和MMP-9表达均明显低于模型组,气道重塑改变减轻,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 早期预防性ATRA干预通过减少肺组织MMP-9表达,可在一定程度上减轻哮喘大鼠的气道重塑和气道高反应性。[中国当代儿科杂志,2011,13(10):827-831]

[关键词] 哮喘;全反视黄酸;气道反应性;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(2011)10-0827-05

Effects of all-trans retinoic acid on airway responsiveness and airway remodeling in rats with asthma

LI Wen-Kai, LI Yun, ZHONG Li-Li. Department of Pediatrics, Hunan People's Hospital, Changsha 410005, China (Li Y, Email: liyunpd@163.com)

Abstract: Objective To study the effects of all-trans retinoic acid (ATRA) on airway responsiveness, airway remodeling and expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) protein in rats with asthma. **Methods** Forty rats were randomly divided into five groups: asthma model, normal saline (control), ATRA treatment, cotton oil treatment and budesonide treatment ($n = 8$ each). Asthma was induced by ovalbumin sensitization and challenge in the asthma model, and the ATRA, cotton oil or budesonide treatment groups. ATRA (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$), cotton oil (1 mL) or budesonide (0.32 mg/kg) was administered before ovalbumin challenge in the three treatment groups. Airway responsiveness was assessed. The lung tissues were sampled to detect airway remodeling and the expression of MMP-9 protein by immunohistochemistry. **Results** The expression of MMP-9 in lung tissues in the ATRA treatment group was significantly higher than that in the control group, but the airway responsiveness in the ATRA treatment group was not significantly different from that in the control group. The airway responsiveness and the expression of MMP-9 in lung tissues were significantly reduced in the ATRA treatment group compared with the asthma model group. The airway remodeling was significantly improved in the ATRA treatment group compared with the asthma model group. **Conclusions** ATRA may alleviate airway hyperresponsiveness and airway remodeling possibly through decreasing the protein expression of MMP-9 in rats with asthma. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (10):827-831]

Key words: Asthma; All-trans retinoic acid; Airway responsiveness; Airway remodeling; Rats

支气管哮喘是全球范围内严重危害公共健康的常见病之一。哮喘的防治工作中,规范化吸入糖皮质激素控制气道炎症已取得较好的效果,然而仍存在部分对激素治疗不敏感患者,因此探索新的激素替代药物或辅助哮喘治疗药物成了一种必然。全反

视黄酸(ATRA)是维生素A的中间代谢产物,主要用于治疗皮肤病和急性早幼粒细胞白血病,既往的研究显示,ATRA还能明显抑制哮喘动物气道炎症^[1],ATRA能否降低哮喘气道反应性和改善气道重塑,国内外报道不多,本研究观察早期运用ATRA

[收稿日期]2011-02-12;[修回日期]2011-05-09

[作者简介]李文开,男,硕士研究生,主治医师。

[通信作者]李云,主任医师。

对哮喘大鼠气道反应性和气道重塑的影响,并进一步探讨其对气道重塑影响的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂用品和动物分组

卵清蛋白(OVA)、ATRA和棉籽油(CO)均由美国Sigma公司提供;山羊抗大鼠基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)多克隆抗体由北京中杉金桥生物技术有限公司提供;气道阻力与肺顺应性检测系统由美国BUXCO公司提供。4周龄Sprague-Dawley(SD)大鼠40只,体重 200 ± 20 g,由湖南农业大学动物部提供。随机分为5组,每组8只动物:盐水组、模型组、ATRA组(溶解于CO后腹腔注射)、CO组和布地奈德(BUD)组。

1.2 方法

1.2.1 大鼠哮喘模型制备及标本采集 5组大鼠中,除盐水组以外的其余4组大鼠第1天腹腔注射10% OVA混合液1 mL(含OVA 100 mg、氢氧化铝100 mg及灭活百日咳杆菌苗 5×10^9 个作为免疫佐剂)致敏。2周后再以OVA进行激发,2% OVA雾化泵吸入,10 min/次,每周3次,激发时间为6周,构建大鼠慢性哮喘模型^[2-3]。盐水组致敏、激发均以生理盐水代替。ATRA和CO组每次激发前分别用ATRA 50 μ g/kg和CO 1 mL腹腔注射。BUD组每次激发前用BUD溶液0.64 mL/kg(含布地奈德0.32 mg)加生理盐水至2 mL雾化泵吸入,每次10 min,每周3次,共6周。末次激发24 h内用10%水合氯醛4 mL/kg腹腔注射麻醉动物,气管插管行气道反应性测定后,处死大鼠取肺组织,用免疫组化方法测定肺组织MMP-9的表达、结合病理学的苏木精-伊红(HE)染色、Masson染色分析气道重塑情况。

1.2.2 气道反应性测定 气道反应性用Buxco气道阻力与肺顺应系统(包括Buxco BioSystem XA Windows软件和Buxco全身体积描记器)进行测定。大鼠麻醉后,仰卧固定,正中剪开颈部皮肤,暴露气管,行气管插管。将大鼠密封放在体积描记器内记录基线阻力值,随后通过内嵌式雾化给药系统依次雾化吸入生理盐水与浓度为0.01 mg/mL、0.02 mg/mL、0.04 mg/mL、0.08 mg/mL和0.16 mg/mL的盐酸组胺后20 s,分别记录气道阻力值,阻力值回到基线后再行下一梯度浓度的刺激,系统通过传感器采集数据,经过系统处理,直接记录气道阻力值,与吸入组胺浓度为0 mg/mL即生理盐水时的气道阻力相比

(基础气道阻力),表示气道阻力的变化、代表气道反应性。

1.2.3 肺组织病理切片、染色、图像分析 5组大鼠测定完气道阻力后,打开胸腔,取右上肺,4%多聚甲醛固定24 h,石蜡切片后HE和Masson染色观察病理学改变。参照Temelkovski等^[4]报道方法半定量评定支气管周围炎性细胞浸润程度。0分:支气管周围几乎无炎性细胞;1分:支气管周围散在少许炎性细胞;2分:支气管周围较多分布不均的炎性细胞但未聚集成团;3分:支气管周围大量炎性细胞,分布较均匀,但少见聚集成团;4分:支气管周围几乎大量炎性细胞聚集成团;每组评定 ≥ 20 个气道。并计数单位基底膜面积气管周炎性细胞数,每组计数 ≥ 20 个气道。Masson染色切片测量胶原沉积,参照Shen等^[5]报道方法进行,以固定颜色模式界定胶原,在色调、饱和度、颜色强度等条件下测定气道壁胶原面积(Wac),结果以占支气管基底膜周径的胶原面积(Wac/Pbm, $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)表示,每组测定 ≥ 20 个气道。

1.2.4 肺组织免疫组化染色 二步法免疫组化染色,采用彩色病理图文分析系统对肺组织支气管上皮的MMP-9蛋白表达水平进行半定量分析。光学显微镜下观察:细胞浆呈现褐色或棕黄色颗粒为阳性细胞,每张切片任选5个视野拍片($\times 100$),采用YPS-2000系列彩色病理图文分析系统对MMP-9蛋白表达水平进行半定量分析,以平均阳性面积作为MMP-9在肺组织中蛋白的表达值。

1.3 统计学分析

采用SAS 9.1.3软件进行统计学分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析或秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 气道反应性测定

各组大鼠基础气道阻力差异无统计学意义($P > 0.05$),对生理盐水激发无明显反应。用盐酸组胺激发后,各组大鼠气道阻力随激发浓度增高而增高,组胺浓度为0.01 mg/mL和0.02 mg/mL时,各组大鼠气道阻力变化值差异无统计学意义($P > 0.05$);当组胺浓度 ≥ 0.04 mg/mL时,在同一浓度组胺激发下,ATRA组气道阻力明显低于模型组和CO组(均 $P < 0.05$),与盐水组及BUD组比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$);模型组与CO组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 各组大鼠吸入不同浓度组胺后的气道阻力变化值 ($n=8, \bar{x} \pm s, \text{cm H}_2\text{O} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)

组别	组胺浓度					
	0 mg/mL	0.01 mg/mL	0.02 mg/mL	0.04 mg/mL	0.08 mg/mL	0.16 mg/mL
盐水组	1	1.43 ± 0.12	1.95 ± 0.15	2.08 ± 1.01	2.25 ± 0.70	3.17 ± 1.77
模型组	1	1.55 ± 0.09	2.20 ± 0.13	4.09 ± 0.74 ^a	5.77 ± 0.82 ^a	6.11 ± 0.95 ^a
ATRA 组	1	1.56 ± 0.16	2.12 ± 0.17	2.92 ± 0.85 ^b	3.65 ± 1.58 ^b	4.50 ± 1.32 ^b
CO 组	1	1.58 ± 0.13	2.03 ± 0.26	4.42 ± 1.24 ^{a,c}	5.62 ± 1.64 ^{a,c}	6.78 ± 1.53 ^{a,c}
BUD 组	1	1.48 ± 0.08	1.94 ± 0.28	2.76 ± 0.68 ^{b,d}	3.15 ± 0.92 ^{b,d}	4.40 ± 1.03 ^{b,d}
<i>F</i> 值		4.348	3.278	6.321	8.652	5.932
<i>P</i> 值		>0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:1 表示盐水测定的基数值。a:与盐水组比较, $P < 0.05$; b:与模型组比较, $P < 0.05$; c:与 ATRA 组比较, $P < 0.05$; d:与 CO 组比较, $P < 0.05$

2.2 病理组织学改变

HE 染色观察大鼠支气管管周炎性细胞浸润程度显示,盐水组支气管管壁完整,管周仅见极少量炎性细胞浸润;模型组支气管管壁破坏严重,管周大量炎性细胞浸润,部分聚集成团;ATRA 组支气管管壁较完整,管周炎性细胞浸润较少;CO 组支气管管壁破坏严重,管周大量炎性细胞浸润;BUD 组支气管管壁较完整,管周见少量炎性细胞浸润。ATRA 组支气管周围炎性细胞浸润程度、支气管壁周围 EOS 均较模型组明显降低 ($P < 0.05$),但仍高于盐水组 ($P < 0.05$),而与 BUD 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);CO 组与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2,图 1。

肺组织 Masson 染色观察发现,盐水组胶原沉积较少,模型组支气管壁胶原沉积多,ATRA 组胶原沉积较模型组明显降低 ($P < 0.05$),但仍高于盐水组 ($P < 0.05$),而与 BUD 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。CO 组与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2,图 2。

2.3 肺组织 MMP-9 蛋白的表达

盐水组仅有极少量 MMP-9 蛋白表达,模型组大量表达 MMP-9 蛋白,ATRA 组 MMP-9 表达弱于模型组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而与 BUD 组的 MMP-9 表达相似 ($P > 0.05$)。见表 2。

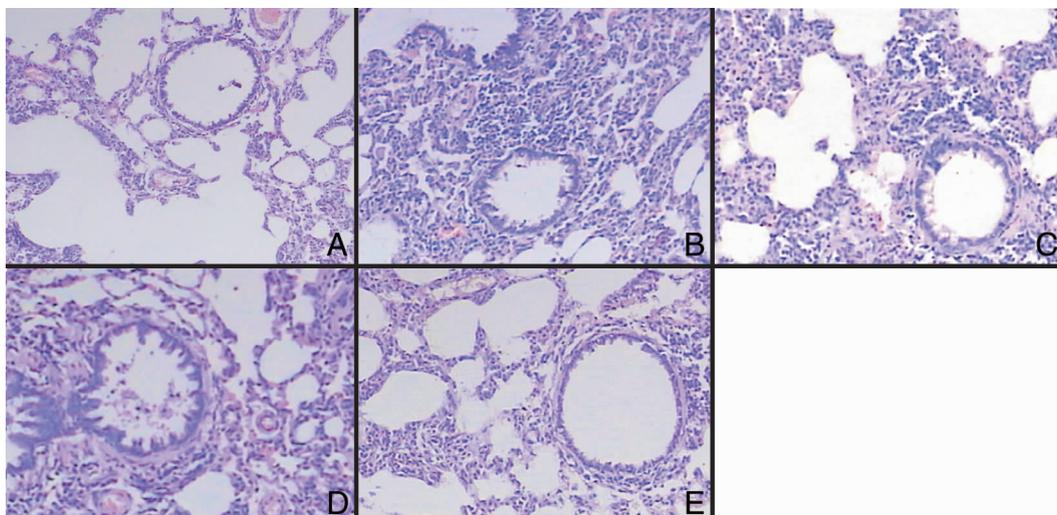


图1 支气管管周炎性细胞浸润(HE, ×100) A:盐水组,支气管管壁完整,管周仅见极少量炎性细胞浸润;B:模型组,支气管管壁破坏严重,管周大量炎性细胞浸润;C:ATRA 组,支气管管壁较完整,管周炎性细胞较模型组明显减少;D:CO 组,支气管管壁破坏严重,管周大量炎性细胞浸润;E:BUD 组,支气管管壁较完整,管周见少量炎性细胞浸润。

表2 各组炎性细胞浸润、气道胶原沉积、肺组织 MMP-9 蛋白表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	炎性细胞浸润	EOS(个/mm ²)	胶原沉积面积 (Wac/Pbm, $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)	MMP-9 蛋白表达量
盐水组	8	0.35 ± 0.09	6.16 ± 1.89	4.32 ± 0.92	1.03 ± 0.12
模型组	8	3.48 ± 0.15 ^a	878.68 ± 90.71 ^a	25.22 ± 1.56 ^a	14.87 ± 2.86 ^a
ATRA 组	8	1.29 ± 0.07 ^{a,b}	118.12 ± 21.25 ^{a,b}	14.18 ± 1.98 ^{a,b}	7.01 ± 1.79 ^{a,b}
CO 组	8	3.40 ± 0.14 ^{a,c}	857.53 ± 89.31 ^{a,c}	26.14 ± 1.13 ^{a,c}	12.87 ± 4.03 ^{a,c}
BUD 组	8	1.23 ± 0.10 ^{a,b,d}	115.64 ± 23.15 ^{a,b,d}	13.87 ± 1.18 ^{a,b,d}	6.30 ± 1.14 ^{a,b,d}
<i>F</i> 值		56.17	624.37	586.01	84.84
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

a: 与盐水组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与 ATRA 组比较, $P < 0.05$; d: 与 CO 组比较, $P < 0.05$

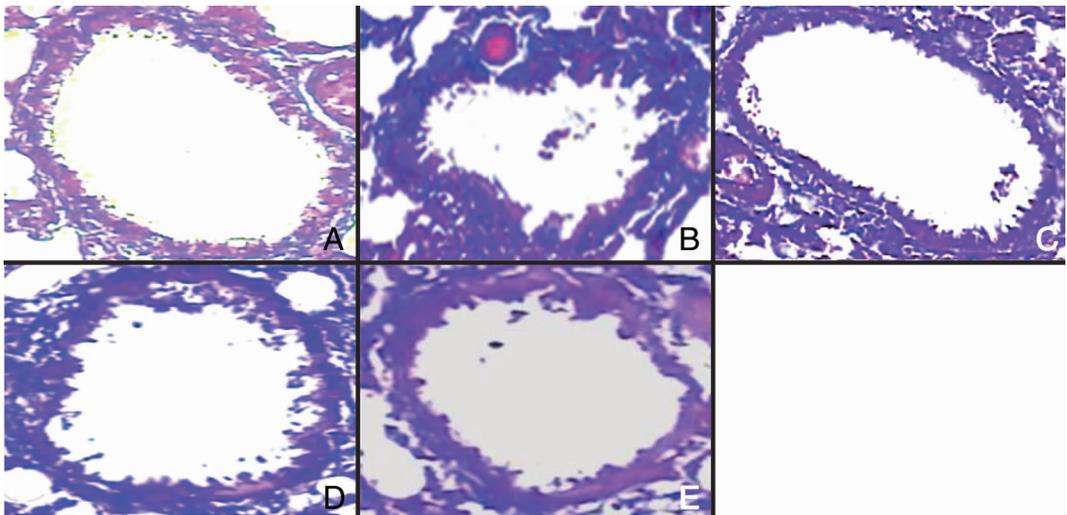


图2 Masson 三色染色观察气道胶原沉积($\times 100$) A: 盐水组, 气道上皮无明显胶原沉积; B: 模型组, 气道上皮见大量胶原沉积; C: ATRA 组, 气道胶原沉积较模型组明显减少; D: CO 组, 气道胶原沉积显著; E: BUD 组, 气道见少量胶原沉积。蓝色部分即为胶原沉积。

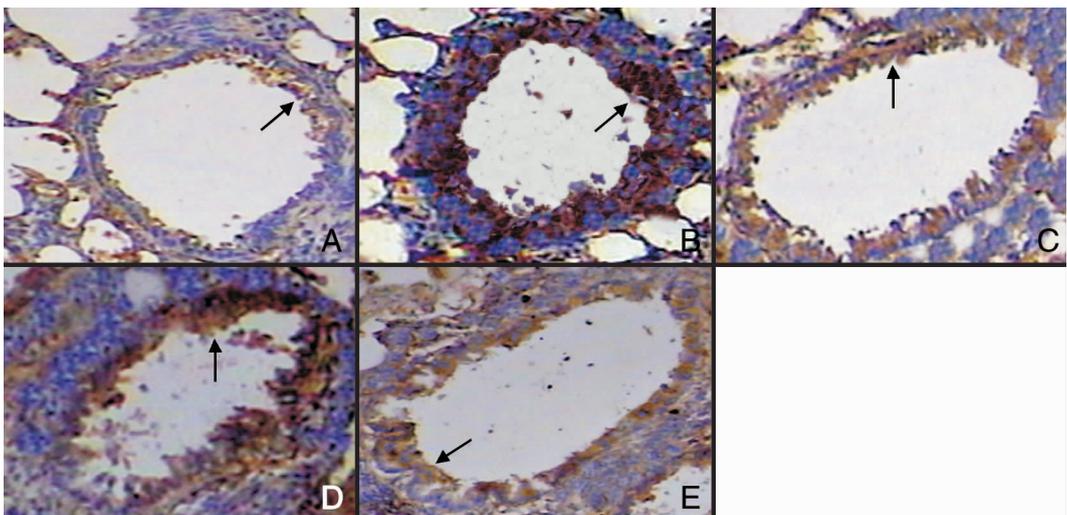


图3 气道上皮细胞 MMP-9 蛋白表达(免疫组化, $\times 100$) 光学显微镜下观察: 气道上皮细胞浆呈现褐色或棕黄色颗粒为阳性细胞, 图中箭头所示。A: 盐水组, 气道上皮少量表达 MMP-9 蛋白; B: 模型组, 气道上皮细胞大量表达 MMP-9 蛋白; C: ATRA 组, 气道上皮细胞表达 MMP-9 较模型组明显减少; D: CO 组, 气道上皮细胞大量表达 MMP-9 蛋白; E: BUD 组, 气道上皮细胞表达 MMP-9 较模型组明显减少。

3 讨论

气道重塑被认为是气道慢性炎症反复损伤的结果,与气道炎症和气流高反应一起,是支气管哮喘的三大主要特征。上皮下胶原和细胞外基质在气道壁沉积过多是引起气道重塑和气流阻塞的主要原因之一^[6]。气道基底膜是气道上皮下细胞外基质所特有的一薄层,被认为是哮喘气道重塑的始发位置^[7]。基质金属蛋白酶被认为是降解细胞外基质的关键酶^[8],MMP-9 作为其重要成员之一,其作用主要是降解气道基底膜促进细胞迁移、参与气道炎症反应,降解包括基底膜在内的细胞外基质而促进气道重塑。MMP-9 通过降解细胞外基质有力地促进嗜酸性粒细胞、肥大细胞、淋巴细胞等炎症细胞通过基底膜的移行进行跨膜迁移而参与气道炎症反应^[9]。有研究发现哮喘患者气道胶原沉积比健康人增多,表达更多的 MMP-9 蛋白,且胶原沉积的面积与 MMP-9 蛋白的量显著相关^[10-11]。因此认为哮喘患者 MMP-9 的表达增多可使气道胶原沉积增多,造成气道纤维化,从而导致支气管哮喘气道重塑^[12]。本研究免疫组化显示模型组大鼠肺组织 MMP-9 蛋白表达增加,提示 MMP-9 参与了哮喘气道炎症和气流高反应中气道上皮下胶原和基底膜沉积,与文献报道一致^[13]。

新近研究认为,自身免疫反应是支气管哮喘的另一种发病机制^[13]。ATRA 为体内维生素 A 的活性代谢产物,有维持免疫器官上皮细胞生理功能和组织上皮细胞的分化发育的作用,金红芳等^[1]证实 ATRA 能抑制哮喘大鼠的气道炎症。本研究应用 ATRA 腹腔注射进行预防性干预,发现 ATRA 组大鼠在相同浓度盐酸组胺激发下气道阻力变化值低于哮喘模型组;支气管管周白细胞总数和 EOS 百分比下降,炎症程度下降,气道壁结构改变减轻,气道胶原沉积减少,提示 ATRA 能降低气道高反应性,有效抑制哮喘气道炎症,并通过减少气道上皮下胶原和细胞外基质的沉积来改善气道重塑。免疫组化显示大鼠肺组织 MMP-9 蛋白表达下降,提示 ATRA 能有效抑制哮喘肺组织 MMP-9 蛋白的表达,降低哮喘的气道高反应性,有效的抑制哮喘气道炎症,改善气道重塑,这与糖皮质激素 BUD 的作用类似^[14],其可能的原因是早期预防性腹腔注射 ATRA 抑制变应原诱导的大鼠哮喘模型中 MMP-9 在肺组织中的表达,从而通过减少气道胶原沉积抑制哮喘气道重塑,为临床上运用 ATRA 治疗哮喘提供理论依据。

志谢:特别感谢中南大学湘雅医学院机能实验室秦晓群教授与刘持博士的大力帮助。

[参 考 文 献]

- [1] 金红芳,方红,王宏伟. 全反式维甲酸抗支气管哮喘大鼠气道炎症的作用及机制[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2004, 9(27): 67-68.
- [2] Locke NR, Royce SG, Wainwright JS, Samuel CS, Tang ML. Comparison of airway remodeling in acute, subacute, and chronic models of allergic airways disease [J]. J Immunol, 2006, 176(11):6553-6559.
- [3] 刘珊珊,贺湘玲,钟礼立. 哮喘大鼠 8-异前列腺素 F2 α 水平变化的实验研究[J]. 医学临床研究, 2008, 25(5): 881-882.
- [4] Temelkovski J, Hogan SP, Shepherd DP, Foster PS, Kumar RK. An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen [J]. Thorax, 1998, 53(10):849-856.
- [5] Shen H, O'Byrne PM, Ellis R, Wattie J, Tang C, Inman MD. The effects of intranasal budesonide on allergen-induced production of interleukin-5 and eotaxin, airways, blood, and bone marrow eosinophilia, and eosinophil progenitor expansion in sensitized mice[J]. Respir Crit Care Med, 2002, 166(2):146-153.
- [6] Yamauchi K, Inoue H. Airway remodeling in asthma and irreversible airflow limitation-ECM deposition in airway and possible therapy for remodeling [J]. Allergol Int, 2007, 56(4):321-329.
- [7] Ohbayashi H, Shimokata K. Matrix metalloproteinase-9 and airway remodeling in asthma [J]. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005, 4(2):177-181.
- [8] Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, Profita M, Chanez P, Bellia V, et al. Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis[J]. Respir Crit Care Med, 1998, 158(6):1945-1950.
- [9] Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling [J]. Respir Cell Mol Biol, 2003, 28(1):12-24.
- [10] Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LF, Elliot J, Lindeman JH, Ferreira DS, et al. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma [J]. Eur Respir J, 2008, 32(1):61-69.
- [11] Margulis A, Nocka KH, Brennan AM, Deng B, Fleming M, Goldman SJ, et al. Mast cell-dependent contraction of human airway smooth muscle cell-containing collagen gels: influence of cytokines, matrix metalloproteases, and serine proteases [J]. J Immunol, 2009, 183(3): 1739-1750.
- [12] Dolhnikoff M, da Silva LF, de Araujo BB, Gomes HA, Fernezian S, Mulder A, et al. The outer wall of small airways is a major site of remodeling in fatal asthma [J]. Allergy Clin Immunol, 2009, 123(5): 1090-1097.
- [13] Mookerjee I, Hewitson TD, Halls ML, Summers RJ, Mathai ML, Bathgate RA, et al. Relaxin family peptide receptor-1 protects against airway fibrosis during homeostasis but not against fibrosis associated with chronic allergic airways disease [J]. Endocrinology, 2009, 150(3):1495-1502.
- [14] 孔祥永,栾斌,贾天明,冯建飞,王秀芳,王西阁,等. 地塞米松对实验性哮喘大鼠气道细胞 DNA 合成和气流高反应性的影响 [J]. 中国当代儿科杂志, 2002, 4(2): 81-83.

(本文编辑:俞 燕)