

过氧化物酶体增植物激活受体 γ 对哮喘小鼠 气道平滑肌细胞增殖的影响

谷名晓 刘选成 江璐

(青岛市妇女儿童医院新生儿科,山东 青岛 266034)

【摘要】目的 探讨过氧化物酶体增植物激活受体 γ (PPAR γ) 激动剂罗格列酮对支气管哮喘小鼠肺组织细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1) 的表达及气道平滑肌细胞 (ASMC) 增殖的影响。**方法** 将 30 只清洁级 BALB/c 小鼠随机分为对照组、哮喘组和罗格列酮干预组,每组 10 只。卵清蛋白 (OVA) 致敏和激发建立哮喘小鼠模型,干预组在每次激发前 1 h 通过灌胃给予小鼠罗格列酮 (5 mg/kg) 进行干预,对照组小鼠以生理盐水代替 OVA 致敏和激发。显微镜下计数小鼠支气管肺泡灌洗液 (BLAF) 中的白细胞及嗜酸性粒细胞 (EOS); 苏木精-伊红染色观察气道结构改变;免疫组化染色检测 CyclinD1 蛋白的表达水平;逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 法检测 CyclinD1 mRNA 表达变化;图像分析软件测定管腔基底膜周长 (Pbm)、气管壁总面积 (WAt)、气道平滑肌面积 (WAm) 和 ASMC 核数 (N),结果以 Pbm 标准化。**结果** 与对照组相比,哮喘组小鼠 BALF 中白细胞总数及 EOS 百分比显著增加,CyclinD1 mRNA 和蛋白表达亦显著增高,而干预组可降低上述改变,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。此外,与对照组相比,哮喘组小鼠 WAt/Pbm、WAm/Pbm 和 N/Pbm 显著增加,而罗格列酮干预可减少上述比值,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 罗格列酮可通过抑制 ASMC 的增殖,延缓气道重塑的进程,从而预防和治疗慢性哮喘。

[中国当代儿科杂志,2013,15(7):583-587]

【关键词】 支气管哮喘;过氧化物酶体增植物激活受体 γ ;细胞周期蛋白 D1;罗格列酮;小鼠

Effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on proliferation of airway smooth muscle cells in mice with asthma

GU Ming-Xiao, LIU Xuan-Cheng, Jiang Lu. Department of Neonatology, Qingdao Women and Children's Hospital, Qingdao Shandong 266034, China (Email:lgmx369@126.com)

Abstract: Objective To investigate the effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ) agonist rosiglitazone on the expression of cyclin D1 in lung tissue, and the proliferation of airway smooth muscle cells (ASMCs) in mice with bronchial asthma. **Methods** Thirty clean BALB/c mice were randomly divided into control group ($n = 10$), asthma group ($n = 10$), and rosiglitazone treatment group ($n = 10$). A mouse model of asthma was established by ovalbumin (OVA) sensitization and challenge. The treatment group received rosiglitazone (5 mg/kg) by gavage 1 hour before each challenge and the control group received saline instead of OVA sensitization and challenge. Leukocytes and eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were counted under a microscope. Airway structural changes were observed by hematoxylin-eosin staining. Protein and mRNA expression levels of cyclin D1 were measured by immunohistochemical staining and RT-PCR. Perimeter of the basement membrane (Pbm), total bronchial wall area (WAt), airway smooth muscle area (WAm), and number of nuclei in ASMCs (N) were determined using image analysis software, and WAt/Pbm, WAm/Pbm, and N/Pbm were calculated. **Results** Compared with the control group, the asthma group showed significant increases in the total number of leukocytes and percentage of eosinophils in BALF, as well as in the mRNA and protein expression of cyclin D1, but changes in these indices were significantly reduced in the rosiglitazone treatment group ($P < 0.05$). In addition, compared with the control group, the asthma group had significantly increased WAt/Pbm, WAm/Pbm, and N/Pbm, but rosiglitazone significantly decreased these ratios ($P < 0.05$). **Conclusions** Rosiglitazone may delay the process of airway remodeling by inhibiting the proliferation of ASMCs, so it can be used for preventing and treating chronic asthma. [Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(7):583-587]

Key words: Bronchial asthma; Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma; Cyclin D1; Rosiglitazone; Mice

[收稿日期]2012-11-25;[修回日期]2013-01-05
[作者简介]谷名晓,女,硕士,住院医师。

气道重塑是哮喘的特征性改变,可造成不可逆气流阻塞及肺功能持续下降,其中气道平滑肌细胞 (airway smooth muscle cell, ASMC) 的增殖是导致气道结构改变的病理学基础,对气道重塑的发生发展发挥重要作用^[1]。如何阻断 ASMC 增殖以达到控制哮喘气道重塑的发生,已经成为哮喘研究的热点。CyclinD1 是细胞周期进程由 G1 期向 S 期转化过程中的一种重要的调控蛋白,能够促进 ASMC 增殖,与哮喘的发生密切相关^[2]。近几年的研究发现^[3,4],过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 激动剂在多种器官和疾病中发挥抗炎、抗重建作用,但在哮喘中的气道炎症和重建中的作用尚缺乏统一的认识。本实验通过建立慢性哮喘小鼠模型,观察 PPAR γ 对哮喘小鼠肺组织 CyclinD1 的表达变化及对气管壁总面积 (WAt)、气道平滑肌面积 (WAm)、ASMC 核数 (N) 的影响,探讨 PPAR γ 对 ASMC 增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

30 只清洁级雌性 6~8 周龄 BALB/c 小鼠由徐州医学院实验动物中心提供;卵清蛋白 (OVA, 美国 Sigma 公司)、氢氧化铝 (上海金山化工厂)、罗格列酮 (葛兰素史克公司)、小鼠抗 CyclinD1 单克隆抗体 (美国 santa cruz 公司)、免疫组化试剂盒及二氨基联苯 (DAB) 显色试剂盒 (北京中杉生物技术有限公司)、高纯度总 RNA 快速提取试剂盒 (上海捷瑞生物工程有限公司)、AMV 一步法逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 系统 (上海捷瑞生物工程有限公司)、超声雾化器 (上海鱼跃医疗设备有限公司)、显微镜 (OLYMPUS, 日本)、图像采集及分析 (Leica Qwin, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 分组及哮喘模型的建立 30 只小鼠随机分为 3 组,即对照组、哮喘组和罗格列酮干预组,每组 10 只。模型制备参考文献^[5]并加以改进。哮喘组和干预组小鼠分别于第 0 天和第 14 天腹腔注射生理盐水致敏液 0.2 mL [含 OVA 25 μ g, Al(OH)₃ 1 mg],自第 22 天开始将小鼠置于雾化箱中,每天 1 次雾化吸入 2% OVA (Ⅱ级) 生理盐水溶液,每次 30 min,持续 4 周,观察小鼠反应,出现烦躁不安、呼吸急促、频繁抓鼻、打喷嚏、大小便失禁和腹肌痉挛等阳性反应提示模型构建成功。对照组小鼠以生理盐水代替 OVA 致敏和激发。干预组在每次雾化前

1 h 给予罗格列酮生理盐水混悬液 (5 mg/kg) 灌胃,对照组和哮喘组小鼠生理盐水灌胃对照。

1.2.2 标本收集 末次雾化激发 24 h 后,以 5% 的水合氯醛 0.4 mL 腹腔注射麻醉小鼠,分离气管,插入套管针,暴露胸腔,结扎右主支气管,用生理盐水 0.3 mL 灌洗左肺,收集支气管肺泡灌洗液 (BALF),取少许于低倍显微镜下采用细胞计数板计数白细胞 (WBC) 总数;另取 BLAF 悬液的沉淀物 0.2 mL 涂片,行瑞氏染色,在油镜下选择染色良好的区域,计数 200 个白细胞 (WBC) 及其中的嗜酸性粒细胞 (EOS) 个数,求出 EOS 百分比。每个标本均观察 5 个玻片。取左肺组织,置于甲醛中固定,经脱水、包埋制成蜡块,切片后行苏木精-伊红 (HE) 染色和免疫组化染色。取右肺组织,迅速放入液氮中速冻后,保存在 -80℃ 冰箱中准备总 RNA 提取。

1.2.3 形态学观察 组织块经甲醛固定后,酒精梯度脱水,石蜡包埋,切片厚度 4 μ m,行 HE 染色,显微镜下观察形态变化。

1.2.4 CyclinD1 蛋白免疫组化染色 采用 SP 法检测 CyclinD1 蛋白表达,4 μ m 厚度切片,经脱蜡、水洗后用 3% 的过氧化氢去除内源性氧化酶,枸橼酸盐缓冲液煮沸抗原修复,正常山羊血清 37℃ 封闭 20 min,1:100 小鼠抗 CyclinD1 单克隆抗体 4℃ 过夜 (阴性对照用 PBS 代替),滴加相应的二抗 37℃ 孵育 25 min,DAB 显色,苏木素复染,脱水,透明,封片,显微镜下观察。图像分析软件测定 CyclinD1 灰度值。

1.2.5 图像采集 每个样本随机选取 10 张切片,切片在显微镜下放大 100 倍,每张切片随机选取直径 100~200 μ m 完整的小支气管横截面 30 个,测量管腔基底膜周长 (Pbm)、WAt、WAm 及 N,结果以 Pbm 标准化,分别为 WAt/Pbm、WAm/Pbm 和 N/Pbm。测定 CyclinD1 的灰度值,每个样本随机取 5 张切片,每张切片随机取 5 个气道横截面图像,每个气道测 5 个灰度值,减去空白灰度值取绝对数,平均后作为该标本的 CyclingD1 灰度值。

1.2.6 RT-PCR 法检测肺组织 CyclinD1 mRNA 基因表达 采用高纯度总 RNA 快速提取试剂盒,按照说明书提取各组小鼠肺组织总 RNA,将提取的总 RNA 逆转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板扩增 CyclinD1。反应条件为:94℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 15 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。Cyclin D1 上游引物序列:5'-GAGAAGTTGTGCATCTACAC-3',下游引物序列:5'-GAAGGGCTTCAACTGTTCC-3',产物长度 400 bp, β -actin 的上游引物序列:5'-TCTACCATGAGCTGCGT-

GTG-3',下游引物序列:5'-GGTCAGGATCTTCAT-GAGGT-3',产物长度314 bp。PCR产物进行1.5%的琼脂糖凝胶电泳后,紫外灯下观察拍照,目的条带用图像分析系统作光密度测定, β -actin为内参,CyclinD1与 β -actin灰度的比值作为CyclinD1 mRNA的相对含量进行半定量分析。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件对数据进行统计学分析,计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用SNK-*q*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BALF 中 WBC 总数及 EOS 百分比

哮喘组WBC总数、EOS百分比比较对照组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),干预组较哮

喘组明显降低,但仍高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 各组小鼠 WBC 总数及 EOS 百分比 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	WBC 总数($\times 10^5/\text{mL}$)	EOS 百分比(%)
对照组	10	12.4 $\pm$ 1.9	0.8 $\pm$ 0.5
哮喘组	10	30.1 $\pm$ 2.1 ^a	9.5 $\pm$ 1.1 ^a
干预组	10	21.1 $\pm$ 2.8 ^{a,b}	2.9 $\pm$ 0.9 ^{a,b}
F 值		151.92	418.13
P 值		<0.05	<0.05

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

2.2 肺组织病理学改变

光镜下对照组小鼠气道上皮完整,无炎性细胞浸润及平滑肌层增厚等改变;哮喘组小鼠气道上皮细胞破坏,黏膜下及管壁周围有大量炎性细胞浸润,黏膜下胶原沉积,平滑肌层增厚;干预组气道炎症和

气道重塑状况较哮喘组明显减轻。见图1。

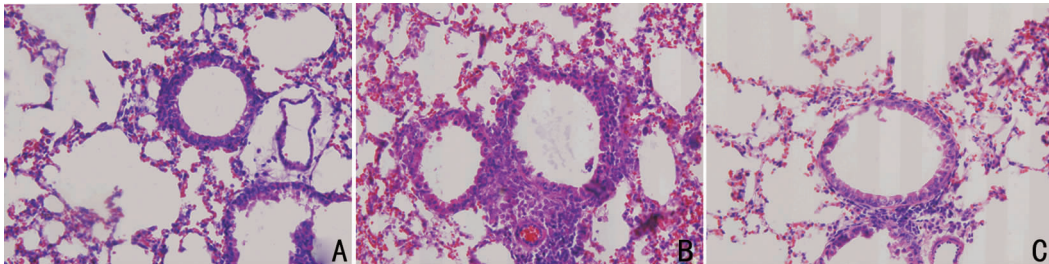


图1 各组小鼠组织病理学改变(苏木精-伊红染色,×400) A:对照组,气道上皮完整,未见明显炎症改变;B:哮喘组,可见气道周围大量炎性细胞浸润,气道上皮破坏,平滑肌层增厚;C:干预组,气道炎症及上皮破坏程度、气道重塑状况较哮喘组明显减轻。

2.3 肺组织 CyclinD1 蛋白的表达

CyclinD1在三组小鼠的ASMC、上皮细胞、成纤维细胞中皆有表达,主要表达部位在细胞核,阳性表达为棕黄色颗粒,本实验主要研究在ASMC中的表

达。灰度值测定显示哮喘组CyclinD1表达较对照组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),干预组的表达较哮喘组明显降低,但仍高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图2、表2。

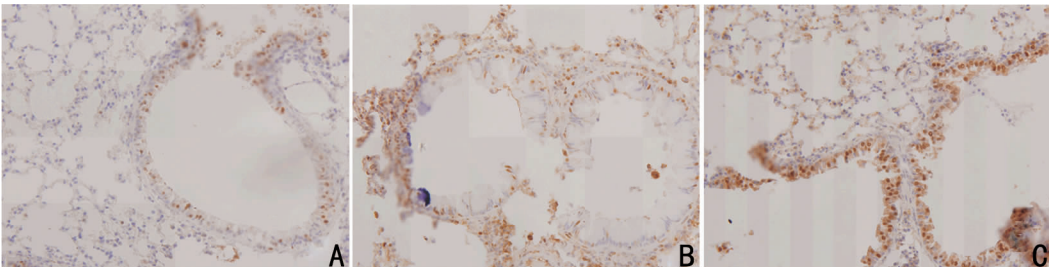


图2 各组小鼠 CyclinD1 蛋白表达(DAB显色,×400) A:对照组,气道平滑肌细胞及气道上皮细胞均有少量CyclinD1表达;B:哮喘组,气道平滑肌细胞及气道上皮细胞CyclinD1表达明显增多;C:干预组,CyclinD1表达较哮喘组明显减少。图中棕黄色颗粒系CyclinD1阳性表达。

2.4 肺组织中 CyclinD1 mRNA 的表达

哮喘组 CyclinD1 mRNA 相对表达量较对照组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),干预组表达量较哮喘组明显降低,但仍高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图3、表2。

2.5 图像分析结果

哮喘组 WAt/Pbm、WAm/Pbm 和 N/Pbm 较对照组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),干预组较

哮喘组明显减低,但仍高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

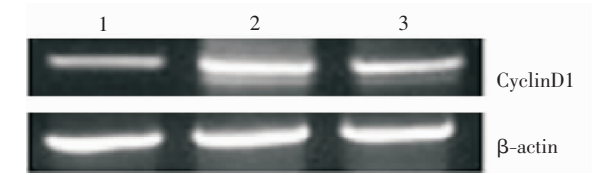


图3 各组小鼠肺组织内 CyclinD1 扩增产物电泳图
1:对照组;2:哮喘组;3:干预组。

表2 3组小鼠图像分析及 CyclinD1 mRNA 和蛋白表达结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	WAt/Pbm($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)	WAm/Pbm($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)	N/Pbm(个/mm)	CyclinD1 蛋白灰度值	CyclinD1/ β -actin
对照组	10	4.8 $\pm$ 0.9	1.5 $\pm$ 0.5	3.1 $\pm$ 0.8	34 $\pm$ 6	0.5 $\pm$ 0.7
哮喘组	10	14.1 $\pm$ 1.5 ^a	5.7 $\pm$ 0.8 ^a	8.0 $\pm$ 0.9 ^a	63 $\pm$ 5 ^a	1.0 $\pm$ 0.8 ^a
干预组	10	9.3 $\pm$ 1.6 ^{a,b}	3.5 $\pm$ 1.9 ^{a,b}	6.1 $\pm$ 0.9 ^{a,b}	52 $\pm$ 5 ^{a,b}	0.7 $\pm$ 0.6 ^{a,b}
F 值		115.94	112.44	83.50	83.33	122.94
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

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

3 讨论

气道重塑是指在丝裂原的持续刺激下气道壁发生的以上皮细胞破坏、腺体增生肥大、ASMC 增殖、细胞外基质沉积、基底膜增厚为主要特征的一系列结构改变。其中 ASMC 增殖起着重要作用,它不仅加重气道狭窄,还加重气道高反应性^[6]。ASMC 在促分裂物质的持续作用下不仅出现增生、肥大,导致气流受限,同时可以发生表型的转换,由单纯的收缩型转变为合成分泌型,释放出 IL-1、IL-2、IFN- γ 等细胞因子,组胺、血栓烷素 A2 等炎症介质,并表达 CD44、ICAM-1 等细胞黏附分子及 B7-1、B7-2 等共刺激分子进一步促进气道重塑的发展^[7]。故早期干预有效防止 ASMC 增殖是延缓气道重塑的关键,对 ASMC 增殖机制的研究有助于寻找哮喘治疗的新方向。

CyclinD1 是哺乳类动物细胞周期中的关键正性调控蛋白,它与细胞周期依赖性激酶(CDK4/CDK6)结合形成二元复合物,使视网膜瘤蛋白(pRb)磷酸化,磷酸化 pRb 释放其结合的核转录因子 E2F,游离的 E2F 进入核内结合一系列具有特殊序列的基因启动子区,促进这些基因的表达,这些基因的产物促进细胞通过 G1/S 限制点,进入增殖状态^[8]。体外研究发现 CyclinD1 过度表达可引起 ASMC 的增殖。增殖的 ASMC 释放出的炎症介质组胺、缓激肽等可以自分泌的方式作用于 ASMC 表面的 G 蛋白偶联受体,

通过 PI3K 信号通路促进细胞内 CyclinD1 的表达,引起 ASMC 增殖^[9]。本实验结果显示哮喘组小鼠 CyclinD1 蛋白及 mRNA 的表达均较对照组明显升高,同时哮喘组小鼠炎性细胞数目及管壁周围炎性细胞浸润程度较干预组增强,图像分析结果也提示哮喘组小鼠 WAt/Pbm、WAm/Pbm 和 N/Pbm 较对照组明显升高,且两者变化方向一致,提示 CyclinD1 在哮喘小鼠体内肺组织中的表达增加,促进 ASMC 的增殖。

PPAR γ 激动剂罗格列酮系噻唑烷二酮类药物,作为胰岛素增敏剂,常用于治疗 2 型糖尿病。近年研究发现 PPAR γ 被激活后,能明显抑制 EOS、树突状细胞和中性粒细胞等多种炎症细胞的活化,抑制气道上皮细胞和平滑肌细胞的增殖^[10]。本实验中,干预组白细胞总数、EOS 百分比、气道上皮破坏程度较哮喘组都有明显的降低和改善,且通过比较两组 CyclinD1 表达的差异推测 PPAR γ 激动剂可以通过下调 CyclinD1 的表达进而抑制 ASMC 的增殖。其作用机制可能有三种途径:(1)通过抑制炎症介质表达,减弱胞外刺激信号的作用而下调 CyclinD1 的表达;(2)可能与诱发酶依赖的 CyclinD1 降解途径有关^[11];(3)启动相关负调控蛋白^[12],提高细胞周期负调节蛋白的表达,抑制 pRb、CyclinD1 活性,减轻平滑肌细胞的增殖。

本实验通过研究罗格列酮对 ASMC 增殖的影响为其对哮喘的治疗提供了理论依据。但其抗哮喘用途的剂量及疗程有必要进行大规模的临床试验。且罗格列酮用于哮喘治疗的同时,因其具有降血糖作

用,故其广泛使用所引发的低血糖危害及长期使用可能带来的肝肾毒性、导致水肿及造成心功能不全的危险均不容忽视。

[参 考 文 献]

[1] Fahy JY, Corry DB, Boushey HA. Airway inflammation and remodeling in asthma[J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2000, 6(1): 15-20.

[2] Mcmillan SJ, Xanthou G, Lloyd CM. Manipulation of allergen-induced airway remodeling by treatment with anti-TGF- β antibody: effect on the Smad signaling pathway[J]. *J Immunol*, 2005, 174(9):5774-5780.

[3] Lee KS, Park SJ, Hwang PH, Yi HK, Song CH, Chai OH, et al. PPAR- γ modulates allergic inflammation through up-regulation of PTEN[J]. *FASEB J*, 2005, 19(8): 1033-1035.

[4] Honda K, Marquillies P, Capron M, Dombrowicz D. Peroxisome proliferator-activated receptor γ is expressed in airways and inhibits features of airway remodeling in mouse asthma model[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 113(5): 882-888.

[5] Kips JC, Anderson GP, Fredberg JJ, Herz U, Inman MD, Jordana M, et al. Murine models of asthma[J]. *Eur Respir J*, 2003, 22(2): 374-382.

[6] 孙妍,王金荣,韩秀珍,李化兵,孙立锋,陈星,等. 布地奈德对慢性支气管哮喘小鼠肺组织 HIF-1 α 和 VEGF 表达及气

道重塑的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2012, 14(8): 622-627.

[7] Tliba O, Amrani Y, Panettieri RA. Is airway smooth muscle the “missing link” modulating airway inflammation in asthma? [J]. *Chest*, 2008, 133(1): 236-242.

[8] Pelaia G, Renda T, Gallelli L. Molecular mechanisms underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: implications for asthma[J]. *Respir Med*, 2008, 102(8): 1173-1181.

[9] Gosens R, Roscioni SS, Dekkers BG, Pera T, Schmidt M, Schaafsma D, et al. Pharmacology of airway smooth muscle proliferation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 585(2-3):385-397.

[10] Ward JE, Gould H, Harris T, Bonacci JV, Stewart AG. PPAR gamma ligands, 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2 and rosiglitazone regulate human cultured airway smooth muscle proliferation through different mechanisms [J]. *Br J Pharmacol*, 2004, 141(3): 517-525.

[11] Qiu LQ, Sinniah R, Hsu SI. Role of differential and cell type-specific expression of cell cycle regulatory proteins in mediating progressive glomerular injury in human IgA[J]. *Nephropathy Lab Invest*, 2004, 84(9): 1112-1125.

[12] Ueno T, Teraoka N, Takasu S, Nakano K, Takahashi M, Yamamoto M, et al. Suppressive effect of Pioglitazone, a PPAR gamma ligand, on azoxymethane-induced colon aberrant crypt foci in KK-Ay Mice[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(8): 4067-7403.

(本文编辑:周勇)