

论著·实验研究

Hes-1 与哮喘大鼠气道炎症和气道重塑的关系研究

强巴措珍^{1,2} 谢亮¹ 刘瀚旻¹ 范志宇¹ 陈莉娜¹

(1. 四川大学华西第二医院儿科, 四川 成都 610041; 2. 拉萨市人民医院儿科, 西藏 拉萨 850000)

[摘要] **目的** 观察 Sprague-Dawley (SD) 大鼠哮喘模型中 Notch 信号通路靶基因 Hes-1 的表达变化及与气道炎症和气道重塑的关系, 初步探讨其在支气管哮喘发病中的作用。**方法** 将 48 只 SD 大鼠随机分成对照组和哮喘组, 采用卵白蛋白致敏及激发建立哮喘模型, 对照组以生理盐水替代致敏液, 两组依据激发后不同处理时间点各分为 4 周、8 周、12 周 3 个亚组, 每组 8 只大鼠。光镜观察肺组织病理变化并检测支气管平滑肌厚度 (Wam); ELISA 法检测大鼠血清和支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中 IL-4 和 INF- γ 水平; 分别采用免疫组织化学和实时荧光定量 PCR 检测 Hes-1 蛋白及 mRNA 的表达水平。**结果** 随着激发后时间的延长, 哮喘组大鼠 Wam 逐渐增加, 血清和 BALF 中 INF- γ 水平逐渐降低、IL-4 水平逐渐增加, 且与同时点对照组相比差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。哮喘大鼠 Hes-1 蛋白及 mRNA 的水平随着激发时间延长而逐步增高, 且均高于同时点对照组 (均 $P<0.05$)。哮喘组 Hes-1 蛋白及其 mRNA 的表达与 Wam 呈正相关, 与血清及 BALF 中 IL-4 的浓度亦呈正相关, 而与血清及 BALF 中 INF- γ 的浓度呈负相关 (均 $P<0.05$)。**结论** Hes-1 蛋白及其 mRNA 的表达增加与哮喘大鼠气道炎症因子水平和气道平滑肌重塑密切相关, 并可能参与了哮喘的发生。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(6): 648-653]

[关键词] 哮喘; Hes-1; 气道炎症; 气道重塑; 大鼠

Relationship between Hes-1 and airway inflammation and remodeling in a rat model of asthma

QIANG Ba-Cuo-Zhen, XIE Liang, LIU Han-Min, FAN Zhi-Yu, CHEN Li-Na. Department of Pediatrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China (Chen L-N, Email: chenln66@163.com)

Abstract: Objective To study the changes of Hes-1, the target gene of Notch signaling pathway, and its relationship with airway inflammation and remodeling in a rat model of asthma. **Methods** Forty-eight rats were randomly divided into an asthma group and a control group. The rats in the asthma group were sensitized and challenged by ovalbumin (OVA), and normal saline was used in the control group. Two groups were further divided into 3 subgroups according to time points after challenging, i.e. 4 weeks, 8 weeks and 12 weeks ($n=8$ rats each). Pathological changes of lungs were observed by light microscopy and the thickness of bronchial smooth muscle layer (Wam) was measured. The levels of IL-4 and INF- γ in rat serum and bronchoalveolar lavage fluids (BALF) were measured using ELISA. Expression levels of Hes-1 protein and mRNA were determined by immunohistochemistry and quantitative real-time PCR respectively. **Results** Together with the extension of challenging, the Wam of rats in the asthma group increased, a decrease of INF- γ level and an increase of IL-4 level in serum and BALF were also observed, and the differences were statistically significant compared with those in the corresponding control group ($P<0.05$). Hes-1 protein and mRNA levels also increased gradually after OVA challenging and were higher than those in the control group ($P<0.05$). The levels of Hes-1 protein and mRNA were positively correlated with Wam and IL-4 in serum and BALF, but were inversely correlated with INF- γ in serum and BALF ($P<0.05$). **Conclusions** Levels of Hes-1 protein and mRNA increased, which were closely related with the levels of airway inflammatory factors and remodeling of airway smooth muscle. Hes-1 may play an important role in the pathogenesis of asthma.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(6): 648-653]

Key words: Asthma; Hes-1; Airway inflammation; Airway remodeling; Rats

[收稿日期] 2013-11-18; [接受日期] 2014-02-14

[基金项目] 四川省卫生厅项目 (100363、110439)。

[作者简介] 强巴措珍, 女, 大学, 主治医师。

[通信作者] 陈莉娜, 女, 副主任医师。

气道炎症和气道重塑是支气管哮喘重要的病理生理特征^[1],其发生机制复杂,目前仍未完全阐明。许多证据显示,Th1/Th2细胞免疫功能紊乱是支气管哮喘发病的中心环节,导致多种细胞因子和炎症介质的产生,参与了气道炎症和气道重塑的发生、发展。Th1/Th2细胞的分化受到许多因素影响,其中Notch信号通路通过激活靶基因Hes-1等也参与了Th细胞分化的调节^[2],但是其与支气管哮喘气道炎症和气道重塑间的关系研究甚少,国内尚未见报道。因此,本研究拟建立大鼠哮喘模型,观察Hes-1的表达变化及与哮喘大鼠气道炎症和气道重塑间的关系,以期阐明哮喘发病机制及寻求新的治疗方法提供思路和依据。

1 资料与方法

1.1 实验动物及材料

清洁级雄性Sprague-Dawley (SD)大鼠由四川大学华西医学中心实验动物中心提供;卵白蛋白(OVA)购自美国Sigma公司,白细胞介素4(IL-4)、INF- γ ELISA试剂盒购自美国Invitrogen公司,小鼠抗大鼠Hes-1单克隆抗体为英国Abcam公司产品。

1.2 动物分组与哮喘模型的建立

生后6周龄雄性SD大鼠48只,平均体重 149 ± 12 g,按随机数字表法随机分为对照组和哮喘组,两组依据不同处理时间点各分为4周、8周、12周3个亚组,每组8只大鼠。哮喘大鼠气道重塑模型的建立参考文献方法^[3]并加以改良:

(1)致敏:第1天和第8天腹腔注射1 mL 0.1% OVA (1 mg)加Al(OH)₃ (100 mg)混合液致敏;

(2)激发:第15天开始以1% OVA雾化吸入激发,每次35 min,隔天1次,分别激发4周、8周及12周。在相应时间点致敏与激发时以生理盐水代替OVA建立对照组。

1.3 标本收集

末次激发后2 h,予大鼠10%水合氯醛400 mg/kg腹腔注射麻醉,心脏穿刺取血后标本于4℃静置2 h,3000 r/min离心15 min,吸取血清于-80℃保存备用。即刻打开胸腔,暴露肺组织,气管切开插管,结扎右主支气管,用2 mL生理盐水于气管插管处注入,缓慢灌洗左肺,并用手指

轻轻按摩肺组织约30 s后回收支气管肺泡灌洗液(BALF),共3次,保留回收率高于80%的标本,1800 r/min离心15 min,取上清分装于EP管中,-80℃保存备用。切取右肺近肺门组织,4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋切片,进行苏木精-伊红(HE)染色及免疫组织化学检测;其余肺组织液氮保存用于PCR检测。

1.4 支气管平滑肌厚度的测定

参照文献^[3]方法,在200倍光镜下,每只大鼠随机取3张切片,挑选每张切片中有完整横断面的中小支气管3支,应用Image Pro Plus图像分析软件测量基底膜周径(Pbm),单位长度基底膜的平滑肌厚度(Wam, $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)=[平滑肌外缘内气管厚度(Wam1)-平滑肌内缘内气管厚度(Wam2)]/Pbm。

1.5 IL-4和INF- γ 浓度的测定

应用酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定血清和BALF中IL-4、INF- γ 的浓度,测定方法按产品说明书进行操作。

1.6 免疫组织化学法检测肺组织Hes-1蛋白的表达

切片经常规脱蜡至水,水化,微波修复,阻断内源性过氧化氢酶和非特异性反应,滴加小鼠抗大鼠Hes-1单克隆抗体(稀释度为1:200),4℃过夜;洗涤后滴加二抗及SP工作液,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,脱水,透明,树胶封片。阳性结果呈棕黄色,集中表达于气道上皮细胞、平滑肌细胞胞浆。每只大鼠随机取3张切片,每张切片随机选择3个200倍镜下支气管视野,应用Image Pro Plus图像分析软件测定阳性部位的平均吸光度(OD),用以代表阳性部位的蛋白表达水平。

1.7 实时荧光定量PCR法检测肺组织Hes-1 mRNA的变化

大鼠肺组织加入TRIzol进行总RNA提取,其后采用Two-Step Real Time-PCR试剂盒(大连宝生生物公司)合成cDNA用于PCR扩增。根据NCBI Genbank中大鼠Hes-1、GAPDH基因序列设计引物(上海生工生物工程公司)(表1)。在FTC2000型荧光定量PCR仪上进行PCR反应:94℃预变性2 min;94℃变性20 s,56℃退火30 s,60℃延伸40 s,进行45个循环。得到样品的Ct

值（每个反应管内荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数）。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行统计分析 $[\Delta\Delta Ct = (Ct_{哮喘组Hes-1} - Ct_{哮喘组GAPDH}) - (Ct_{对照组Hes-1} - Ct_{对照组GAPDH})]$ 。

1.8 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件对数据进行统计学分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，两组均数间的比较采用 t 检验；多组均数间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用Bonferroni法；变量间的相关分析采用Pearson相关分析， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE染色观察肺组织病理改变及Wam测定

对照组大鼠肺组织结构完整，支气管管腔形态规则，黏膜上皮完整，少见炎性细胞浸润。哮喘组大鼠黏膜下、支气管及血管周围大量的炎性细胞浸润、黏膜下水肿、黏液腺增生、支气管壁明显增厚，基底膜增厚且不规则，支气管平滑肌增厚，各时间点Wam均明显高于相应时间点对照组（均 $P < 0.01$ ）；且随着激发时间延长，哮喘组Wam逐渐增厚，与4周时相比，8周及12周时Wam差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。对照组不同时间点Wam的差异均无统计学意义（ $P > 0.05$ ），见表2和图1。

表1 PCR反应中所用引物序列

基因	引物序列(5'→3')
Hes-1	上游: TGAAGCACCTCCGGAACCTGCA
	下游: GGTATGTCAGTTGGCCAGGTGG
GAPDH	上游: AAGCTCATTTCTGCTATGACA
	下游: TCTTACTCCTTGAGGCCATGT

2.2 血清和BALF中IL-4和INF- γ 浓度的比较

哮喘组血清、BALF中的IL-4浓度均明显高于同时间点对照组（均 $P < 0.05$ ），随着激发时间延长，IL-4浓度逐渐升高，与4周时相比，8周及12周时IL-4浓度均显著升高（均 $P < 0.01$ ）。哮喘组血清和BALF中的INF- γ 浓度均低于同时间点对照组（均 $P < 0.01$ ），且随着激发时间延长，INF- γ 浓度逐渐降低，与4周时相比，8周及12周时INF- γ 浓度均显著降低（均 $P < 0.01$ ）。见表3~4。

2.3 各组大鼠肺组织Hes-1蛋白表达结果

Hes-1蛋白阳性结果呈棕黄色，主要表达于支气管上皮细胞和平滑肌细胞。哮喘组的蛋白表达均明显高于同时间点对照组（均 $P < 0.01$ ），且随着激发时间延长，Hes-1蛋白阳性表达增加，与4周时相比，8周及12周时Hes-1蛋白水平均显著升高（均 $P < 0.01$ ）。对照组各时间点间Hes-1蛋白表达差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。见表5和图2。

2.4 各组大鼠肺组织Hes-1 mRNA表达结果

哮喘组Hes-1 mRNA的表达均明显高于同时间点对照组（均 $P < 0.05$ ），且随着激发时间延长，Hes-1 mRNA表达水平增高，与4周时相比，8周及12周时Hes-1 mRNA水平均显著升高（均 $P < 0.01$ ）。对照组各时间点Hes-1 mRNA表达差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。见表6。

表2 各组大鼠不同时间点Wam结果 ($\bar{x} \pm s, \mu m^2/\mu m$)

组别	鼠数	4周	8周	12周	F值	P值
对照组	8	7.3 $\pm$ 2.1	7.8 $\pm$ 1.5	8.2 $\pm$ 1.0	0.473	0.6
哮喘组	8	10.5 $\pm$ 1.6	13.0 $\pm$ 1.0 ^a	14.4 $\pm$ 1.5 ^a	12.328	0.001
t 值		-2.945	-7.162	-8.527		
P值		0.015	<0.01	<0.01		

注：a为与同组4周时相比， $P < 0.05$ 。

表3 血清中IL-4和INF- γ 浓度 ($\bar{x} \pm s, pg/mL$)

组别	鼠数	IL-4 浓度			F值	P值	INF- γ 浓度			F值	P值
		4周	8周	12周			4周	8周	12周		
对照组	8	29.3 $\pm$ 1.0	33.0 $\pm$ 0.3	33.4 $\pm$ 0.6	67.906	0.064	68.3 $\pm$ 0.7	76.6 $\pm$ 2.7	74.3 $\pm$ 1.2	19.730	0.001
哮喘组	8	32.5 $\pm$ 1.2	37.0 $\pm$ 0.7 ^a	59.5 $\pm$ 1.1 ^a	1332.586	<0.001	57.6 $\pm$ 1.8	36.5 $\pm$ 2.1 ^a	26.2 $\pm$ 2.1 ^a	208.482	<0.001
t 值		-4.95	-12.14	-57.06			9.91	20.29	39.28		
P值		<0.01	<0.01	<0.01			<0.01	<0.01	<0.01		

注：a为与同组4周时相比， $P < 0.01$ 。

表4 BALF中IL-4和INF- γ 浓度 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	鼠数	IL-4 浓度			F 值	P 值	INF- γ 浓度			F 值	P 值
		4 周	8 周	12 周			4 周	8 周	12 周		
对照组	8	42.2 $\pm$ 1.2	44.3 $\pm$ 1.4	48.1 $\pm$ 1.1	43.05	<0.001	34.83 $\pm$ 1.76	35.03 $\pm$ 0.21	35.15 $\pm$ 1.06	0.062	0.940
哮喘组	8	44.1 $\pm$ 1.0	49.2 $\pm$ 0.7 ^a	62.3 $\pm$ 1.7 ^a	370.25	<0.001	24.96 $\pm$ 1.15	13.36 $\pm$ 0.74 ^a	11.63 $\pm$ 0.96 ^a	180.496	<0.001
t 值		-2.99	-7.93	-19.42			8.10	48.99	32.74		
P 值		0.01	<0.01	<0.01			<0.01	<0.01	<0.01		

注: a 为与同组 4 周时相比, $P < 0.01$ 。

表5 大鼠肺组织 Hes-1 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	4 周	8 周	12 周	F 值	P 值
对照组	8	0.169 $\pm$ 0.005	0.169 $\pm$ 0.021	0.174 $\pm$ 0.006	0.522	0.618
哮喘组	8	0.230 $\pm$ 0.015	0.322 $\pm$ 0.014 ^a	0.433 $\pm$ 0.020 ^a	117.281	<0.001
t 值		-6.865	-15.237	-21.260		
P 值		0.002	<0.001	0.001		

注: a 为与同组 4 周时相比, $P < 0.01$ 。

表6 大鼠肺组织 Hes-1 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	4 周	8 周	12 周	F 值	P 值
对照组	8	0.42 $\pm$ 0.05	0.64 $\pm$ 0.22	0.54 $\pm$ 0.14	1.56	0.285
哮喘组	8	1.16 $\pm$ 0.22	1.92 $\pm$ 0.27 ^a	2.71 $\pm$ 0.29 ^a	26.321	0.001
t 值		-5.72	-6.37	-11.65		
P 值		0.02	<0.01	<0.01		

注: a 为与同组 4 周时相比, $P < 0.01$ 。

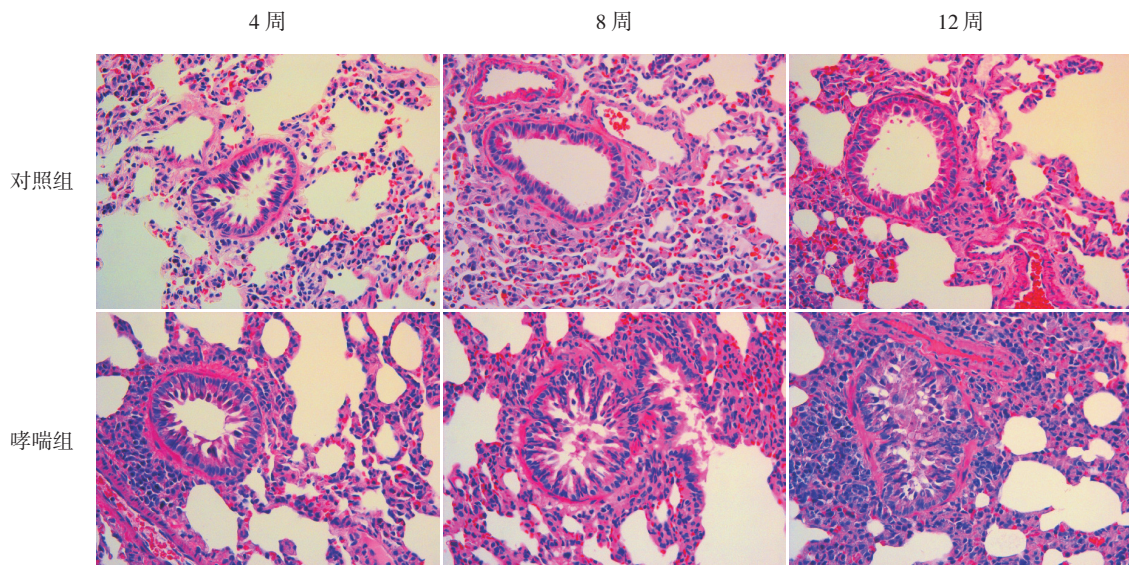


图1 各组大鼠肺组织苏木精-伊红染色结果($\times 400$) 对照组大鼠支气管管腔通畅,黏膜上皮完整,少见炎性细胞浸润,基底膜厚度正常、一致。哮喘组大鼠支气管上皮及周围见大量炎性细胞浸润,黏膜水肿、黏液腺增生,支气管平滑肌增厚、管腔狭窄,且随着激发时间延长上述改变愈加明显。

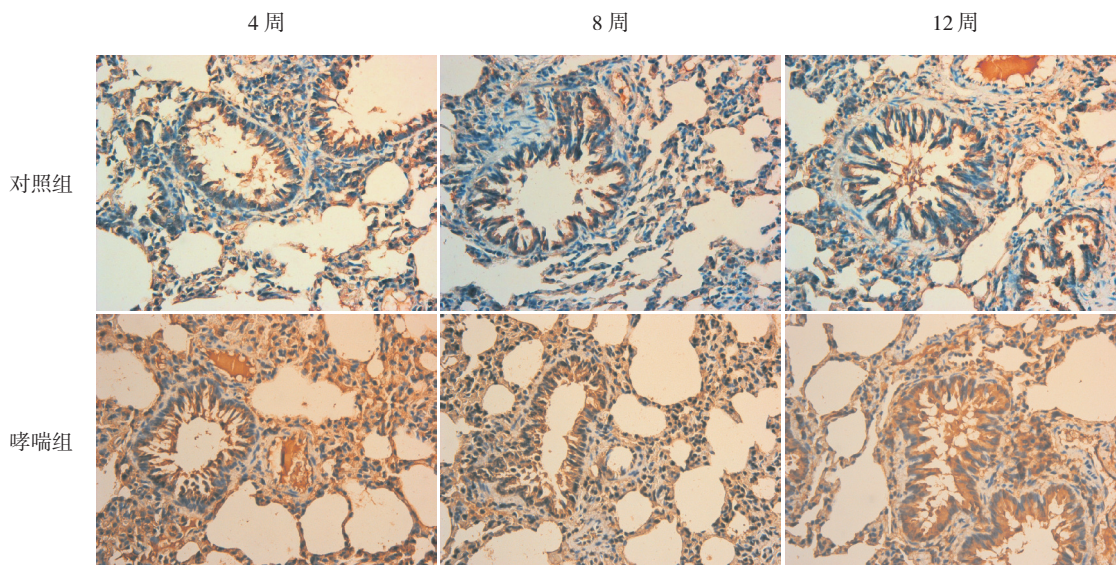


图2 各组大鼠肺组织 Hes-1 蛋白的表达 (DAB 显色, $\times 400$) 对照组大鼠肺组织中 Hes-1 蛋白表达少; 而在哮喘组大鼠支气管上皮细胞、平滑肌细胞上 Hes-1 蛋白表达增多, 且随着激发时间延长 Hes-1 蛋白表达明显增多。Hes-1 蛋白阳性结果呈棕黄色。

2.5 相关性分析

哮喘组 Hes-1 蛋白和 mRNA 的表达与 Wam 呈正相关 (分别 $r=0.833$ 、 0.839 , 均 $P<0.01$) ; 哮喘组 Hes-1 mRNA 的表达与血清及 BALF 中 $\text{INF-}\gamma$ 的浓度呈负相关 (分别 $r=-0.929$ 、 -0.858 , 均 $P<0.01$) , 与血清及 BALF 中 IL-4 水平呈正相关 (分别 $r=0.883$ 、 0.924 , 均 $P<0.01$) ; 哮喘组 Hes-1 蛋白的表达与血清及 BALF 中 $\text{INF-}\gamma$ 的浓度呈负相关 (分别 $r=-0.946$ 、 -0.888 , 均 $P<0.01$) , 与血清及 BALF 中 IL-4 水平呈正相关 (分别 $r=0.938$ 、 0.946 , 均 $P<0.01$) 。

3 讨论

支气管哮喘是一种影响儿童健康和生长发育最常见的慢性呼吸道疾病。有研究显示, 哮喘发病的中心环节是由于 Th2 细胞过度活化, 释放细胞因子, 并激活多种炎症细胞和结构细胞共同参与的气道慢性炎症, 炎症持续存在并且损伤反复进行修复, 最后引起气道重塑, 是导致难治性哮喘重要的病理生理学基础^[4]。因此, 为阻断哮喘的发生、发展, 有必要深入研究影响 Th2 细胞活化的机制并寻求相应的解决办法。

Th 细胞分化受到许多因素调节, 近年来 Notch 信号通路的作用倍受关注。完整的 Notch 信

号通路包括 Notch 受体、配体、细胞内效应分子、其他效应物及调节分子等。Notch 受体是一组异二聚体组成的细胞表面受体, 哺乳动物中共发现 4 种 Notch 受体, 分别为 Notch1~4, Notch 配体与受体一样为 I 型跨膜蛋白, 当配体与受体结合后, Notch 受体发生 2 次蛋白水解, 其后释放出 Notch 胞内结构域 NICD 移至核内, 激活下游基因如 Hes-1 等转录。目前许多研究显示 Notch 信号通路促进了 Th2 细胞的分化。当肺树突突细胞受屋尘螨刺激后, Notch 配体 Jagged2 上调, 促进了 Th2 细胞分化^[5]; Notch 信号通路抑制剂 GSI 可减轻哮喘小鼠气道嗜酸性粒细胞浸润、杯状细胞化生等炎症反应及气道反应性, 降低血中 IgE 水平; 体外培养的 BALF 细胞经 GSI 处理后 Th2 细胞反应减轻, Th1 细胞因子水平增高^[6]。哮喘小鼠肺内 Notch 基因表达增高^[7], 经 Notch 信号通路另一种抑制剂 MW167 处理后, 血及 BALF 中 IL-4 水平降低, 肺内 T 细胞中 IL-4mRNA 表达减少^[8]。与文献报道类似, 本研究中大鼠经 OVA 致敏及反复激发后, 肺组织表现出典型哮喘的改变, BALF 及血清中 Th1 细胞因子 $\text{INF-}\gamma$ 水平降低, 而 Th2 细胞因子水平 IL-4 升高; 同时哮喘大鼠 Notch 信号通路效应因子 Hes-1 蛋白及 mRNA 水平较对照组明显升高, 随着激发时间延长, 增高趋势越明显; 此外, Hes-1 蛋白及 mRNA 表达与 Th2 炎症因子 IL-4 水平呈正相

关,与Th1细胞因子INF- γ 水平呈负相关,提示Hes-1与哮喘大鼠Th2细胞功能亢进有密切联系,参与了哮喘气道慢性炎症的发生。

气道在慢性炎症的刺激下,可发生结构改变即气道重塑,其发生与气道内炎性细胞释放的炎症促进因子和生长因子有关。气道重塑的重要表现之一是气道平滑肌细胞在炎症刺激下增生、增厚^[4,9]。国内有文献报道Notch1促进了哮喘气道重塑,哮喘大鼠Notch1基因表达增加,并与气道重塑特异性指标 α -肌动蛋白呈正相关^[10]。本研究中,哮喘大鼠随着激发时间延长,炎症细胞浸润,气道平滑肌厚度也逐渐增加,符合气道重塑表现,与文献报道类似;同时气道平滑肌厚度与Notch信号通路靶基因Hes-1蛋白及mRNA水平呈正相关,提示Hes-1参与了哮喘大鼠气道重塑的发生。

综上所述,本研究中Notch信号通路靶基因Hes-1蛋白及mRNA表达与哮喘大鼠气道炎症因子水平和气道重塑密切相关,可能参与了哮喘的发生,阻断该信号通路可能对哮喘有潜在的治疗价值。

[参考文献]

- [1] Zhang WX, Li CC. Airway remodeling: a potential therapeutic target in asthma[J]. World J Pediatr, 2011, 7(2): 124-128.
- [2] Amsen D, Antov A, Flavell RA. The different faces of Notch in T-helper-cell differentiation[J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(2): 116-124.
- [3] 张维溪,戴欢,贺孝良,等.糖皮质激素调控哮喘大鼠气道重塑中TGF β 1/Smad信号通路的研究[J].中国药理学通报, 2009, 25(9): 1142-1146.
- [4] Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I. Pathology of asthma[J]. Front Microbiol, 2013, 4: 263.
- [5] Krishnamoorthy N1, Oriss TB, Paglia M, et al. Activation of c-Kit in dendritic cells regulates T helper cell differentiation and allergic asthma[J]. Nat Med, 2008, 14(5): 565-573.
- [6] Kang JH, Kim BS, Uhm TG, et al. Gamma-secretase inhibitor reduces allergic pulmonary inflammation by modulating Th1 and Th2 responses[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179(10): 875-882.
- [7] 周敏,郭雪君. Notch基因在支气管哮喘模型小鼠肺中的表达[J]. 诊断学理论与实践, 2006, 5(6): 515-518.
- [8] 周敏,郭雪君. γ -分泌酶抑制剂阻断Notch信号对支气管哮喘模型小鼠气道炎症的影响[J]. 中华哮喘杂志(电子版), 2012, 6(1): 7-11.
- [9] 崇蕾,李昌崇,张维溪. Notch信号通路及其在支气管哮喘中的作用[J]. 中华哮喘杂志(电子版), 2011, 5(3): 197-200.
- [10] 栾斌,冯晓霞,杨玉霞,等. FIZZ1及NOTCH1在哮喘中的作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(3): 219-222.

(本文编辑:万静)