

论著·实验研究

神经激肽-1受体拮抗剂 WIN62577 对哮喘气道重塑大鼠气管平滑肌细胞迁移的影响

魏兵¹ 刘亚丽¹ 张超¹ 尚云晓² 张晗² 李森²

(1. 沈阳军区总医院儿科, 辽宁 沈阳 110016; 2. 中国医科大学附属盛京医院儿科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] **目的** 探讨哮喘气道重塑大鼠中气管平滑肌细胞迁移的变化及神经激肽-1受体(NK-1R)拮抗剂 WIN62577 对其的影响。**方法** 将 Sprague-Dawley (SD) 大鼠随机分为对照组和哮喘气道重塑组, 应用卵清蛋白对模型组大鼠激发 8 周, 原代培养纯化气管平滑肌细胞(ASMC), 通过免疫荧光、实时定量 PCR 等方法, 检测 ASMC 中 NK-1R 的表达, 并给予不同剂量 WIN62577 干预, 应用 transwell 小室检测 ASMC 迁移的变化。**结果** 哮喘气道重塑组 ASMC 中 NK-1R 主要分布在细胞质和细胞膜, 其 mRNA 的表达高于对照组 ($P<0.01$)。哮喘气道重塑组 ASMC 迁移数目较对照组明显增高 ($P<0.01$), 而分别给予不同浓度 (10^{-11} mol/L、 10^{-10} mol/L、 10^{-9} mol/L、 10^{-8} mol/L) 的 WIN62577 干预后 ASMC 迁移数目较哮喘气道重塑组明显减少 ($P<0.05$)。**结论** NK-1R 能通过促进 ASMC 迁移能力而影响哮喘气道重塑。 [中国当代儿科杂志, 2015, 17(11): 1248-1252]

[关键词] 哮喘; 气道重塑; 细胞迁移; NK-1R 拮抗剂; 大鼠

Effects of NK-1R inhibitor WIN62577 on the migration of airway smooth muscle cells in asthmatic rats with airway remodeling

WEI Bing, LIU Ya-Li, ZHANG Chao, SHANG Yun-Xiao, ZHANG Han, LI Miao. Department of Pediatrics, General Hospital of Shenyang Military Area Command, Shenyang 110016, China (Email: weib71@sina.com)

Abstract: Objective To study the changes in the migration of airway smooth muscle cells (ASMC) in asthmatic rats with airway remodeling and the effect of NK-1R inhibitor WIN62577 on the migration of ASMC. **Methods** Sprague-Dawley rats were randomly assigned into two groups: airway remodeling induced by asthma and normal control. ASMC from rats with asthma and airway remodeling induced by ovalbumin (OVA) inhalation for 8 weeks were primary cultured and purified. Immunofluorescence and real-time PCR were used to measure the expression of NK-1R. With NK-1R inhibitor WIN62577 treatment, the changes in the migration of ASMC were measured by transwell chambers. **Results** NK-1R in ASMC was expressed mainly in the cytoplasm and cell membrane in the airway remodeling group, and the mRNA expression of NK-1R was higher than the normal control group ($P<0.01$). The number of the migrated ASMC in the airway remodeling group was significantly higher than that in the normal control group ($P<0.01$). Various concentrations (10^{-11} mol/L, 10^{-10} mol/L, 10^{-9} mol/L and 10^{-8} mol/L) of WIN62577 treatment decreased the number of the migrated ASMC ($P<0.05$). **Conclusions** NK-1R may affect airway remodeling possibly through promoting the migration ability of ASMC in rats with asthma. [Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(11): 1248-1252]

Key words: Asthma; Airway remodeling; Cell migration; NK-1R inhibitor; Rats

气道重塑是诱发气道高反应性和哮喘慢性化的主要原因, 传统观点认为, 气道平滑肌细胞 (airway smooth muscle cell, ASMC) 是一种被动的细胞, 在炎症介质的刺激下发挥调控气道舒缩的

功能。新近研究证据表明, ASMC 还能发生表型转化, 具有增殖、迁移、合成和分泌活性介质的能力, 参与哮喘气道炎症发生、发展的全过程, 可加重气道重塑进程^[1-3]。

[收稿日期] 2015-02-03; [接受日期] 2015-03-30

[基金项目] 辽宁省博士启动基金 (20121115)。

[作者简介] 魏兵, 女, 博士, 副主任医师。

感觉神经肽P物质(substance P, SP)是非肾上腺素能非胆碱能(NANC)神经系统重要的神经递质,通过相应的神经激肽-1受体(neurokinin 1 receptor, NK-1R)发挥作用^[4]。本课题组前期研究结果表明,SP可促进哮喘大鼠ASMC的迁移,另外哮喘气道重塑时气道NK-1R的mRNA、蛋白也表达增加,因此推测哮喘气道重塑时感觉神经肽SP的作用可能是通过与受体NK-1R结合影响平滑肌迁移实现的^[5-6],但NK-1R在体外ASMC的表达及对ASMC迁移的作用尚未见报道。

本研究拟通过原代培养Sprague-Dawley(SD)大鼠ASMC,并给予NK-1R拮抗剂WIN62577干预,探讨NK-1R在哮喘气道重塑大鼠ASMC迁移中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

羧基葡糖胺碱水解法试剂盒购自南京建成生物工程研究所第一分所;DMEM/FBS培养基购自美国Hyclone公司;胎牛血清购自美国Hyclone公司;IV型胶原酶、4,6-乙酰基-2-苯基吡啶(DAPI)、WIN62577购自美国Sigma公司;兔抗大鼠 α -SMA抗体、NK-1R抗体购自Santa Cruz公司;PCR引物由Invitrogen英骏生物技术有限公司合成,TRIzol总RNA提取液购自上海生工生物工程有限公司,Real time quantitative PCR(SYBRPremix Ex Taq™)试剂盒购自TaKaRa大连宝生物工程有限公司。transwell小室购自美国Corning公司。

1.2 哮喘气道重塑大鼠模型制作

SPF级雌性SD大鼠,体重60~80g,购于中国医科大学实验动物中心。随机分为:哮喘气道重塑组和正常对照组,每组8只大鼠。参考文献^[7-10]分别于第1天、第8天腹腔注射抗原致敏液1mL(含卵蛋白100mg、氢氧化铝100mg、灭活的百日咳杆菌 5×10^9 个)。对照组注射等体积生理盐水。从第15天开始,将大鼠置于一自制密闭容器(20cm \times 20cm \times 20cm)中,以1%卵蛋白超声雾化吸入,每次30min,每周3次,激发8周后处死。正常对照组用生理盐水代替卵蛋白。

1.3 大鼠支气管的病理图像分析

采用图像采集系统(MetaMorph/BX41,日本)

采集图像,测定支气管基底膜周径(Pbm)、总管壁面积(Wat)及平滑肌面积(Wam),分别以Wat/Pbm及Wam/Pbm代表相应管壁层的厚度。

1.4 大鼠支气管羧基葡糖胺测定

应用碱水解法按试剂盒说明书(购自南京建成生物工程研究所第一分所)测定羧基葡糖胺含量。

1.5 大鼠ASMC原代培养及纯化

常规消毒麻醉后,左心室取血处死大鼠。无菌分离大鼠气管,剥离外膜,去除内膜。将气管平滑肌剪下,将组织剪碎,加0.1%胰酶于37℃水浴振荡10min,1000rpm/min离心5min,去上清。再加0.1%IV型胶原酶,37℃水浴振荡30min,1000rpm/min离心5min,去上清。加入10%胎牛血清(FBS)的DMEM终止反应,轻轻吹打,100目细胞筛过滤,接种至50mL培养瓶,37℃孵箱培养,利用成纤维细胞贴壁较快的特点纯化ASMC。待细胞铺满瓶底后按1:2传代,收集第3代细胞用于实验。

1.6 免疫荧光染色检测ASMC中NK-1R的表达

取对数生长期的细胞,消化制备单细胞悬液,适当调整密度后接种于六孔板中的盖玻片上。37℃CO₂孵箱内培养过夜,待细胞贴壁伸展后,取出用4%多聚甲醛固定。3MH₂O₂室温下处理10min,3g/LTriton100在37℃作用10min,用3%羊血清室温下封闭15min。加兔抗大鼠NK-1R抗体(1:100),置湿盒内4℃过夜。加入FITC标记的山羊抗兔IgG于37℃作用30min。加DAPI5 μ g/mL,室温5min。50%甘油封片。每步之间用PBS洗片。实验中以PBS代替一抗设立阴性对照。

1.7 实时定量PCR检测ASMC中NK-1R的mRNA表达

用SYBR Green I荧光染料嵌合法,分别制作目的基因(NK-1R)和管家基因(GAPDH)的标准曲线。利用标准曲线对样品中的目的基因和管家基因分别进行定量。待测基因mRNA的相对表达量=待测基因基因拷贝数/GAPDH基因拷贝数。NK-1R引物序列:上游5'-ACCAACACCTCTGAGTCTAA-3';下游5'-TGGTCACTGTCCTCATTCT-3'。GAPDH引物序列:上游5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3';下游5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3'。引物由Invitrogen英骏生物技术有限公司合成。

1.8 Transwell 小室检测 ASMC 迁移

分别取哮喘气道重塑组及正常对照组第 3~5 代 ASMC 生长至 80% 融合时, 0.25% 的胰酶消化细胞, 计数, 用 10% FBS 的 DMEM 调整细胞密度至 $1 \times 10^5/\text{mL}$, transwell 上室加入各组细胞悬液 100 μL , 下室加入 10% FBS 的 DMEM 600 μL 。其中哮喘气道重塑组按随机化分配原则分别分为下列 5 个亚组: (1) 空白组: 不加任何干预剂; (2) WIN62577 10^{-11} mol/L 组; (3) WIN62577 10^{-10} mol/L 组; (4) WIN62577 10^{-9} mol/L 组; (5) WIN62577 10^{-8} mol/L 组。每小组 5 个复孔。进行迁移实验前, 上室细胞预先用不同浓度的 WIN62577 预处理细胞 30 min。将各组小室置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱, 24 h 后取出小室, 小心取出滤膜, 棉签轻轻擦去微孔膜朝上一面未穿膜的细胞。膜下面的 ASMC 4% 多聚甲醛固定 20 min, 苏木素染色 10 min, 二甲苯透明 1 min, 中性树胶封片, 倒置显微镜 ($\times 400$) 下随机计数 5 个视野的细胞数, 取均值。重复 3 次。

1.9 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行统计学分析, 正态分布计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠气管的病理图像分析及羟脯氨酸测定结果

支气管的病理图像分析及羟脯氨酸测定结果显示, 哮喘气道重塑组 Wat/Pbm、Wam/Pbm、羟脯氨酸含量均较对照组增加 ($P < 0.01$), 表明哮喘气道重塑模型制作成功。见表 1。

表 1 各组大鼠气道壁厚度、平滑肌厚度和羟脯氨酸含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Wat/Pbm (μm)	Wam/Pbm (μm)	羟脯氨酸含量 ($\mu\text{g/g}$ 肺组织湿重)
对照组	8	52 \pm 5	10.0 \pm 1.5	787 \pm 79
哮喘气道重塑组	8	73 \pm 6	24.6 \pm 2.5	1225 \pm 100
t 值		3.22	3.06	3.13
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

注: Wat: 总管壁面积; Wam: 平滑肌面积; Pbm: 基底膜周径。

2.2 ASMC 形态学观察

倒置相差显微镜下观察细胞形态, 未贴壁前细胞呈圆形或椭圆形, 胞质密度高, 不透明, 培养 1 d 后, 大部分细胞已贴壁, 开始伸展, 培养 3 d, 贴壁细胞完全伸展, 呈梭形或多边形, 内有 1~2 个细胞核, 细胞核位于细胞中央, 有一至数个足突, 部分区域细胞束状排列, 呈“峰谷”状态学特征。培养 7~9 d, 细胞铺满瓶底。培养细胞达铺满状态所需时间与细胞活力和细胞接种密度有关, 细胞活力愈大, 接种密度愈大, 达到铺满状态所需时间愈短。见图 1。

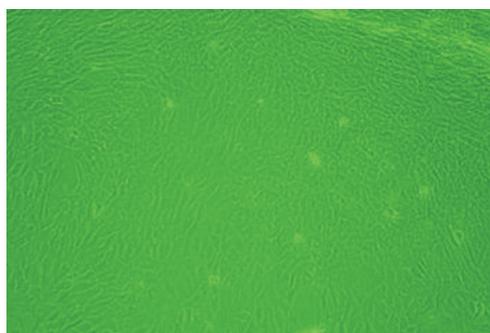


图 1 ASMC 形态观察 ($\times 100$) 培养 3 d, 倒置相差显微镜下观察细胞形态, 贴壁细胞完全伸展, 呈梭形或多边形, 内有 1~2 个细胞核, 细胞核位于细胞中央, 有一至数个足突, 部分区域细胞束状排列, 呈“峰谷”状态学特征。

2.3 α -SMA 免疫荧光染色细胞鉴定 ASMC

对平滑肌细胞特异的 α -SMA 进行免疫荧光染色, 在荧光显微镜下观察并成相, 在 488 nm 波长激光下, 标记 α -SMA 的 FITC 发绿光, 主要均匀分布在胞质。DAPI 标记胞核, 其在 356 nm 波长激光下发出蓝色荧光。见图 2。

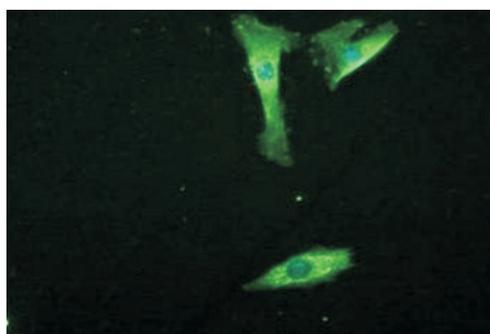


图 2 α -SMA 免疫荧光染色细胞鉴定 ASMC ($\times 400$) 标记 α -SMA 的 FITC 发绿光, 主要均匀分布在细胞质; DAPI 标记的是细胞核, 发蓝色光。

2.4 ASMC 中 NK-1R 及其 mRNA 的表达

荧光显微镜下观察 NK-1R 主要分布在细胞质和细胞膜。哮喘气道重塑组灰度值明显高于对照组 ($P < 0.01$)。哮喘气道重塑组 ASMC 中 NK-1R 的 mRNA 相对表达量较正常对照组明显增高 ($P < 0.01$)。见表 2, 图 3。

2.5 各组 ASMC 迁移结果

对照组 ASMC 迁移数量较少, 与对照组相比, 哮喘气道重塑组细胞迁移数量明显增多 ($P < 0.01$)。各浓度 NK-1R 拮抗剂组细胞迁移数目较对照组增多, 但较哮喘气道重塑组明显减少, 而且随着 WIN62577 浓度增高, ASMC 迁移数量逐渐减少 ($P < 0.05$)。见表 3, 图 4。

表 2 两组大鼠 ASMC 中 NK-1R 灰度值及 mRNA 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NK-1R 灰度值	NK-1R mRNA
对照组	8	90 ± 8	0.0104 ± 0.0002
哮喘气道重塑组	8	130 ± 13	0.0171 ± 0.0003
<i>t</i> 值		3.85	3.97
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01

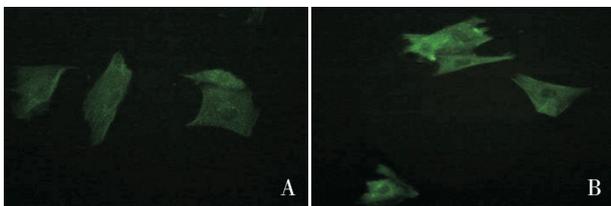


图 3 ASMC 中 NK-1R 的免疫荧光染色 ($\times 400$)
NK-1R 主要分布在细胞质和细胞膜, 发绿色荧光; A: 对照组, NK-1R 光灰度值较低; B: 哮喘气道重塑组, NK-1R 光灰度值较高。

表 3 各组大鼠 ASMC 迁移数量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ASMC 迁移数量
正常对照组	8	12.2 ± 1.9
哮喘气道重塑组	8	32.1 ± 3.7 ^a
WIN62577 10 ⁻¹¹ mol/L 组	8	28.5 ± 2.3 ^{a,b}
WIN62577 10 ⁻¹⁰ mol/L 组	8	22.7 ± 3.0 ^{a,b,c}
WIN62577 10 ⁻⁹ mol/L 组	8	17.7 ± 1.6 ^{a,b,c,d}
WIN62577 10 ⁻⁸ mol/L 组	8	14.1 ± 1.4 ^{a,b,c,d,e}
<i>F</i> 值		35.26
<i>P</i> 值		<0.05

注: a 示与正常对照组比较, $P < 0.01$; b 示与哮喘气道重塑组比较, $P < 0.05$; c 示与 WIN62577 10⁻¹¹ mol/L 组比较, $P < 0.05$; d 示与 WIN62577 10⁻¹⁰ mol/L 组比较, $P < 0.05$; e 示与 WIN62577 10⁻⁹ mol/L 组比较, $P < 0.05$ 。

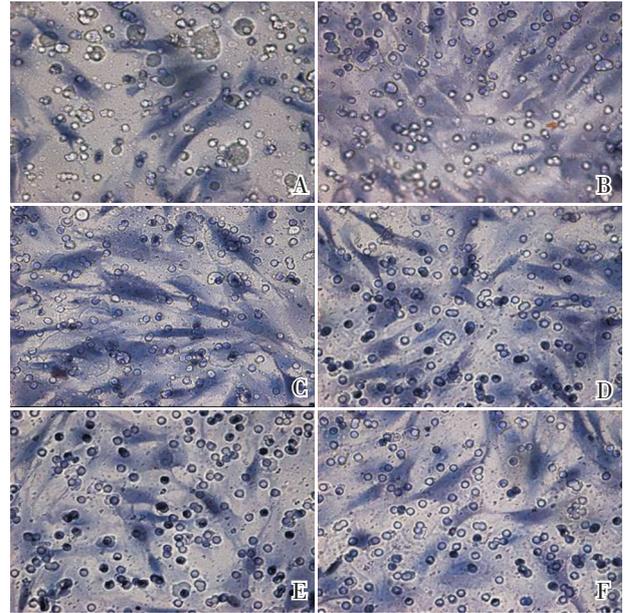


图 4 Transwell 小室检测大鼠 ASMC 的迁移 (苏木素染色, $\times 100$) A: 正常对照组, ASMC 的迁移数量最少; B: 哮喘气道重塑组, ASMC 的迁移数量最多; C: WIN62577 10⁻¹¹ mol/L 组, ASMC 的迁移数量较哮喘气道重塑组少; D: WIN62577 10⁻¹⁰ mol/L 组, ASMC 的迁移数量较 WIN62577 10⁻¹¹ mol/L 组少; E: WIN62577 10⁻⁹ mol/L 组, ASMC 的迁移数量较 WIN62577 10⁻¹⁰ mol/L 组少; F: WIN62577 10⁻⁸ mol/L 组, ASMC 的迁移数量较 WIN62577 10⁻⁹ mol/L 组少。

3 讨论

在持续哮喘的病例中, ASMC 会出现向气道内膜定向移动并出现分泌功能, 这一现象称为气道平滑肌的迁移性生长^[9]。Gizycki 等^[10]发现在哮喘急性发作后 24 h, 气道网状部内的肌成纤维细胞数量显著增加, 同时肌成纤维细胞呈现出规则的细胞轮廓, 细胞内有大量的高浓度肌丝样结构, 并且有些细胞紧贴平滑肌细胞层, 提示这种肌成纤维细胞很有可能是来源于平滑肌细胞, 这一迁移过程可能和哮喘气道病理变化有着密切的联系, 因为有证据显示, 肌成纤维细胞能够分泌大量的胶原物质, 使网状部增厚, 并且参与调控内皮细胞与间叶细胞的相互作用、影响内皮细胞的凋亡、诱导平滑肌细胞增生及气道壁的重塑^[11]。

本研究结果显示, 哮喘气道重塑组 ASMC 迁移数量明显增多, 也提示 ASMC 迁移可能是哮喘气道重构的重要促成因素。感觉神经肽 SP 广泛分布于中枢和周围神经系统, 在受到伤害性刺激时, SP 可逆向释放入损伤局部组织中, 参与对修

复细胞增殖、迁移、分化的调控^[12-14]。以往未见有关NK-1R在ASMC中的表达的报道,本研究发
现,NK-1R在大鼠ASMC的细胞膜及细胞质中均
有表达,并且哮喘气道重塑大鼠ASMC中NK-1R
的mRNA和蛋白的表达均较对照组明显增多,这
是SP作用于ASMC的基础和前提。

研究发现,运用NK-1R激动剂可以显著刺
激T淋巴细胞、单核细胞的化学趋向性,当用
NK-1R的选择性的拮抗剂LY303870时,两种细
胞的化学趋向作用被显著抑制^[15-16]。国内研究发
现,WIN62577可通过降低细胞内钙离子浓度改善
哮喘气道高反应性^[17],但是NK-1R对气道重塑的
影响未见报道。本研究显示,给予WIN62577阻断
NK-1R后可以抑制ASMC的迁移,表明NK-1R在
ASMC迁移中起着重要作用,推断感觉神经肽SP
通过与其受体(NK-1R)结合,加速ASMC的迁移,
从而促进气道重塑的发生、发展,从新的角度探
讨了气道重塑的发生机制,应用NK-1R拮抗剂从
而抑制ASMC的迁移可能是防治哮喘气道重塑的
新途径,值得进一步深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] Wu Y, Fu H, Yang H, et al. Smooth muscle progenitor cells involved in the development of airway remodeling in a murine model of asthma[J]. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2014, 32(3): 203-210.
- [2] Wright DB, Triantafyllidis T, Siddiqui S, et al. Phenotype modulation of airway smooth muscle in asthma[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2013, 26(1): 42-49.
- [3] Gerthoffer WT, Schaafsma D, Sharma P, et al. Motility, survival, and proliferation[J]. *Compr Physiol*, 2012, 2(1): 255-281.
- [4] Joos GF. The role of neuroeffector mechanisms in the pathogenesis of asthma[J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2001, 1(2): 134-143.
- [5] Li M, Shang YX, Wei B, et al. The effect of substance P on asthmatic rat airway smooth muscle cell proliferation, migration, and cytoplasmic calcium concentration in vitro[J]. *J Inflamm (Lond)*, 2011, 8(1): 18-27.
- [6] 魏兵, 尚云晓, 李森, 等. 孟鲁司特对幼年哮喘气道重塑大鼠感觉神经肽受体NK1R表达的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2013, 15(4): 298-301.
- [7] 梁亚峰, 张维溪, 李昌崇, 等. 哮喘大鼠气道重塑中尾加压素2 II的表达变化[J]. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12(4): 287-289.
- [8] 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.
- [9] Parameswaran K, Redford K, Zuo J, et al. Extracellular matrix regulates human airway smooth muscle cell migration[J]. *Eur Respir J*, 2004, 24(4): 545-551.
- [10] Gizycki MJ, Adelroth E, Rogers AV, et al. Myofibroblast involvement in the allergen-induced late response in mild atopic asthma[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997, 6(6): 664-673.
- [11] Hastie, Kraft WK, Nyce KB, et al. Asthmatic epithelial cell proliferation and stimulation of collagen production[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 165(2): 266-272.
- [12] Muñoz M, Coveñas R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in human pathology[J]. *Amino Acids*, 2014, 46(7): 1727-1750.
- [13] Amadesi S, Reni C, Katare R, et al. Role for substance p-based nociceptive signaling in progenitor cell activation and angiogenesis during ischemia in mice and in human subjects[J]. *Circulation*, 2012, 125(14): 1774-1786.
- [14] Evans AR, Junger H, Southall MD, et al. Isoprostanes, novel eicosanoids that produce nociception and sensitize rat sensory neurons[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 293(3): 912-920.
- [15] Hood VC, Cruwys SC, Urban L, et al. Differential role of neurokinin receptors in human lymphocyte and monocyte chemotaxis[J]. *Regul Pept*, 2000, 96(1-2): 17-21.
- [16] Amoruso A, Bardelli C, Gunella G, et al. A novel activity for substance P: stimulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma protein expression in human monocytes and macrophages[J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 154(1): 144-152.
- [17] 李森, 尚云晓. 神经肽-1受体拮抗剂对哮喘大鼠气道平滑肌细胞内钙离子浓度的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(7): 783-785.

(本文编辑: 王庆红)