

b-FGF 和 NF-κB 在哮喘大鼠肺内的表达及布地奈德干预的作用

仓春霞, 栾斌

(郑州大学第三附属医院儿内科, 河南 郑州 450052)

[摘要] **目的** 探讨哮喘大鼠发病过程中碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)和核因子-κB(NF-κB)在气道内表达的变化,及布地奈德的干预对其表达的影响。**方法** 清洁级 Sprague-Dawley 雄性大鼠 45 只,随机分为对照组、哮喘组、干预组。观察卵蛋白激发及用布地奈德干预后哮喘大鼠气道的病理变化;免疫组织化学染色观察 b-FGF 和 NF-κB 蛋白表达的变化。**结果** 布地奈德干预减轻了哮喘大鼠气道损伤。b-FGF 和 NF-κB 在对照组中呈弱阳性表达,在哮喘组中表达明显增加,使用布地奈德进行干预后 b-FGF 和 NF-κB 的表达明显降低(111.61 ± 5.52 vs 126.21 ± 6.46 ; 110.65 ± 8.71 vs 134.15 ± 9.42 ; $P < 0.05$),且二者呈正相关性。**结论** b-FGF 和 NF-κB 可能与哮喘大鼠气道重塑相关,布地奈德改善哮喘大鼠的气道重塑可能与降低 b-FGF 和 NF-κB 的表达有关。

[中国当代儿科杂志,2009,11(5):393-396]

[关键词] 哮喘;碱性成纤维细胞生长因子;核因子-κB;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(2009)05-0393-04

Expression of basic fibroblast growth factor and nuclear factor-κB and the effect of budesonide on their expression in rats with asthma

CANG Chun-Xia, LUAN Bin. Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Luan B, Email: luan20082008@yahoo.cn)

Abstract: Objective To study the expression of basic fibroblast growth factor (b-FGF) and nuclear factor-κB (NF-κB) in the airway and the effect of budesonide on their expression in rats with asthma. **Methods** Forty-five Sprague-Dawley male rats were randomly divided into three group: placebo control, untreated asthma, and budesonide-treated asthma. Asthma was induced by intraperitoneal injection of 10% ovalbumin (OVA) on days 1 and 8 and then challenged by inhalation of 1% OVA aerosol. The budesonide-treated asthma group received an inhalation of budesonide (1 mg) 30 minutes after OVA challenge. The pathological changes of the airway were assessed, and the expression of b-FGF and NF-κB in the airway was assayed by hematoxylin and eosin staining and immunohistochemistry. **Results** Budesonide treatment alleviated airway injuries. Compared with the control group, b-FGF and NF-κB expression in the airway in the untreated asthma group increased significantly ($P < 0.05$). The budesonide-treated asthma group demonstrated significantly decreased b-FGF (111.61 ± 5.52 vs 126.21 ± 6.46 ; $P < 0.05$) and NF-κB expression (110.65 ± 8.71 vs 134.15 ± 9.42 ; $P < 0.05$) in the airway as compared with the untreated asthma group. b-FGF expression was positively correlated to NF-κB expression in the budesonide-treated group. **Conclusions** b-FGF and NF-κB may be associated with airway remodeling in rats with asthma. Budesonide can improve airway remodeling, possibly by decreasing the expression of b-FGF and NF-κB. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (5):393-396]

Key words: Asthma; Basic fibroblast growth factor; Nuclear factor-κB; Airway remodeling; Rats

支气管哮喘是以气道慢性炎症、气道高反应性和气道重塑为基本病理特征的慢性疾病。哮喘气道重塑的发生机制比较复杂,目前尚未完全清楚。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, b-FGF)具有促进细胞的增殖、分化和黏附作用等多种细胞生物活性,国内外在心脏、肝脏等疾病方

面的研究较多,而在哮喘气道重塑中的研究较少。核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)作为多种细胞的核转录因子,参与多种蛋白的基因转录,研究表明其在哮喘气道重塑中发挥重要作用。有研究发现, b-FGF 是较强的 NF-κB 激活剂^[1]。而 b-FGF 和 NF-κB 在哮喘气道重塑中有无相关作用尚未见报道。

[收稿日期]2008-07-30;[修回日期]2008-09-24
[作者简介]仓春霞,女,硕士研究生。主攻方向:小儿呼吸专业。
[通讯作者]栾斌,男,主任医师,教授,郑州大学第三附属医院儿内科,邮编:450052。

为此,本实验建立大鼠哮喘模型,观察气道重塑的病理变化和 b-FGF 及 NF-κB 在气道内的表达情况,以及布地奈德的干预对其表达的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

卵蛋白(OVA)为美国 Sigma 公司产品;兔抗大鼠 b-FGF 多克隆抗体、鼠抗大鼠 NF-κB 单克隆抗体、DAB 显色剂、SP 免疫组化试剂盒均购于北京中杉金桥生物技术有限公司;布地奈德混悬液由阿斯利康制药公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组和模型制作方法 清洁级雄性 Sprague-Dawley 大鼠 45 只,由郑州大学动物实验中心提供,体重为 200 ± 10 g,按照随机化原则分为对照组、哮喘组、干预组,每组各 15 只。

模型制作参考文献^[2,3]并加以改进。哮喘组大鼠于第 1 天和第 8 天腹腔注射 10% OVA/Al(OH)₃ 混合液 1 mL 致敏,从第 15 天开始用 1% OVA 生理盐水雾化吸入激发,隔天一次,20 min/次,共激发 21 次;干预组以相同方法致敏和激发,但是每次 OVA 雾化激发 30 min 后用 1 mg 布地奈德混悬液雾化治疗;对照组使用生理盐水致敏和激发,方法同哮喘组;在末次雾化结束后 24 h 内处死 3 组大鼠。

1.2.2 肺组织标本制作 各组大鼠腹腔注射 100 mg 苯巴比妥处死,取右肺中叶,分别垂直、平行气道取材,用 4% 多聚甲醛固定 24 h,酒精梯度脱水,石蜡包埋,做厚度 5 μm 切片,分别做苏木精-伊红染色和免疫组织化学染色。

1.2.3 形态学观察 应用计算机病理图像分析系统进行分析处理。每张切片随机选两个同级的支气管,在高倍镜(10 × 40)下分别测定支气管上皮层厚度,平滑肌厚度,最后取其平均值,单位 μm。

1.2.4 免疫组织化学染色结果观察 应用计算机病理图像分析系统在高倍镜(10 × 40)视野下进行观察及分析处理。每张切片随机选 5 个支气管腔,高倍镜下测量阳性部位的灰度值,取其平均值为该大鼠的代表值。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 10.0 进行数据分析。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,两变量的相关程度用 pearson 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 一般情况

哮喘组大鼠经过 OVA 激发后,均出现不同程度的烦躁不安、张口喘息、腹部扇动、饮水量增加等现象,这些表现作为模型成功的标志。对照组无以上异常改变。

2.2 病理学改变

在 10 × 40 倍镜下观察,哮喘组大鼠气道内可见不同程度的嗜酸性粒细胞、单核细胞等炎症细胞浸润,气道腔内上皮不完整,黏液分泌增多,黏膜水肿,黏膜皱褶增多,杯状细胞明显增生,胶原明显沉积,气道外成纤维组织明显增多;使用布地奈德干预后,可见嗜酸性粒细胞明显减少,胶原沉积减轻,气道上皮完整性增加,杯状细胞增生不如哮喘组明显;而生理盐水对照组无明显改变。

2.3 气道壁形态学指标测定结果

哮喘组气道上皮厚度和平滑肌厚度均高于正常对照组和干预组($P < 0.05$),布地奈德干预组气道上皮厚度和平滑肌层厚度与哮喘组相比差异有显著性($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠气道上皮厚度和平滑肌层厚度 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)			
组别	鼠数	上皮厚度	平滑肌层厚度
对照组	15	52.21 ± 7.75	36.77 ± 8.87
哮喘组	15	101.72 ± 12.56 ^a	71.76 ± 6.60 ^a
干预组	15	70.12 ± 10.98 ^{a,b}	52.80 ± 8.46 ^{a,b}
F 值		83.56	71.20
P 值		< 0.05	< 0.05

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

2.4 免疫组化结果

b-FGF 及 NF-κB 在对照组大鼠气道中表达呈弱阳性,在哮喘组大鼠气道中表达明显增加,使用布地奈德干预后表达明显降低,但与对照组比较仍有差异($P < 0.05$,表 2)。b-FGF 及 NF-κB 在气道上皮细胞内表达,见图 1,2。

表 2 各组大鼠肺组织 b-FGF 和 NF-κB 的表达 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	鼠数	b-FGF	NF-κB
对照组	15	106.05 ± 7.67	102.51 ± 6.77
哮喘组	15	126.21 ± 6.46 ^a	134.15 ± 9.42 ^a
干预组	15	111.61 ± 5.52 ^{a,b}	110.65 ± 8.71 ^{a,b}
F 值		11.90	57.72
P 值		< 0.05	< 0.05

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

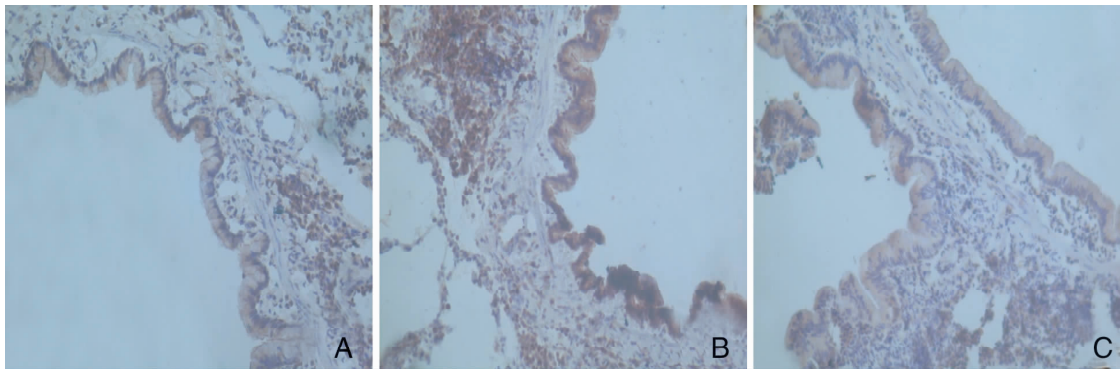


图1 各组哮喘大鼠气道上皮 b-FGF 表达(免疫组化, ×400) A: 对照组, 呈弱阳性表达, 可见气道上皮呈棕黄色; B: 哮喘组, 气道上皮结构紊乱, 肌层增厚, 呈强阳性表达; C: 干预组, 布地奈德干预后表达明显减弱。

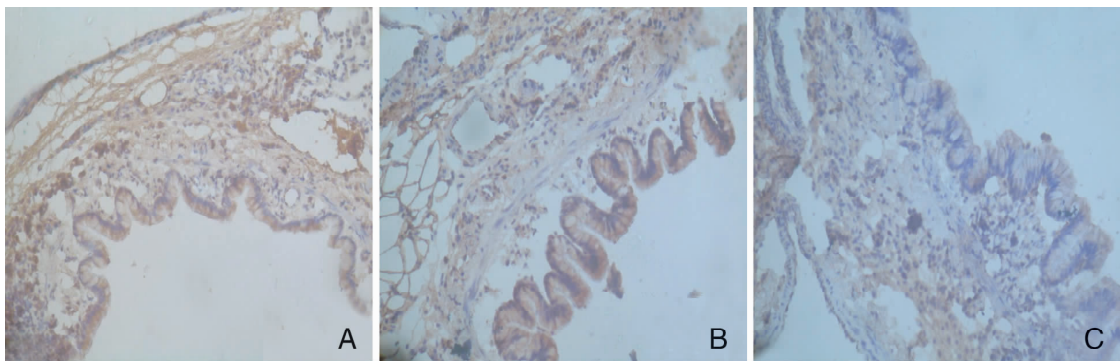


图2 各组哮喘大鼠气道上皮 NF-κB 表达(免疫组化, ×400) A: 对照组, 气道上皮细胞呈棕黄色, 呈弱阳性表达; B: 哮喘组, 气道上皮结构紊乱, 杯状细胞增多, 呈深棕黄色强阳性表达; C: 干预组, 布地奈德干预后表达明显减弱, 结构较整齐。

2.5 相关性分析结果

b-FGF 和 NF-κB 表达的相关系数 $r = 0.531$, $P < 0.01$, 说明二者之间呈正相关。b-FGF 及 NF-κB 表达与气管上皮的厚度呈正相关 ($r = 0.601$, $P < 0.01$; $r = 0.730$, $P < 0.01$), 与平滑肌厚度呈正相关 ($r = 0.574$, $P < 0.01$; $r = 0.711$, $P < 0.01$)。

3 讨论

b-FGF 是一种多效能的细胞生长因子, 具有促进细胞分裂增殖和促血管生成及参与细胞外基质形成等作用^[4]。有研究认为哮喘模型在变应原的刺激后 b-FGF 表达持续升高, 与转化生长因子-1 (TGF-1) 协同促进气管平滑肌的增生肥大^[5]。这与本实验中哮喘组病理形态方面表现为气道炎症细胞浸润、气道上皮增厚并完整性破坏、平滑肌细胞肥大增生相一致, 且 b-FGF 的表达与平滑肌厚度呈正相关。Holgate 等^[6]认为, 支气管上皮细胞是启动哮喘气道慢性炎症和气道重塑过程的关键因素。本实验用免疫组化法检测到哮喘大鼠气道上皮细胞内

b-FGF 的表达明显增加, 表明气道上皮受到刺激活化后可释放多种炎症细胞因子引起气道炎症、气道上皮损伤而释放大量的 b-FGF, 以促进气道的结构细胞分裂增殖, 参与气道的损伤修复。

NF-κB 是细胞内信号转导途径中的一种重要转录因子, 可被一些细胞因子、蛋白激酶、氧化剂等刺激激活。在本实验中 NF-κB 在哮喘大鼠气道内的表达明显高于对照组, 且与气道平滑肌厚度及气道上皮厚度呈正相关, 说明 NF-κB 与气道重塑相关, 在气道重塑过程中发挥作用。研究发现 NF-κB 参与哮喘气道重塑过程, 并且在哮喘气道慢性炎症的维持中发挥重要作用。研究认为 NF-κB 对多种生长因子、细胞因子、炎症介质、嗜酸性粒细胞趋化因子等都有调节作用^[7,8]。而气道重塑是多种细胞因子、炎症介质、黏附因子等共同作用的结果, 说明 NF-κB 在气道重塑的过程中具有重要作用。

目前尚未提出关于 b-FGF 完整的信号传导机制, 研究推测可能是通过一系列细胞内蛋白质级联反应传递给细胞核。吕威力等^[9]研究表明, b-FGF 促进内皮细胞增生的机制可能是通过激活 NF-κB,

使细胞由静止期进入增殖期,促进 DNA 合成和细胞分裂增生。有研究用 b-FGF 处理人主动脉血管平滑肌 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 60 min, ELISA 检测细胞核内未结合的总 NF- κ B p65 蛋白增加 8 倍,而细胞中增加 4 倍^[10]。以上研究都表明 b-FGF 诱导细胞增殖受 NF- κ B 调控。在本研究的哮喘模型中 b-FGF 和 NF- κ B 的表达均增加,而在布地奈德干预组中二者的表达均降低,相关分析示二者的表达与气道上皮及平滑肌的厚度均呈正相关,提示 b-FGF 的变化趋势和 NF- κ B 的变化趋势一致,说明 b-FGF 及 NF- κ B 可能与哮喘大鼠气道重塑相关,并且 b-FGF 和 NF- κ B 之间存在相关作用。

临床上已经广泛使用糖皮质激素来改善和减轻哮喘发作的症状。布地奈德的气雾剂是一种非卤代化的糖皮质激素,具有局部抗炎作用强、作用时间长等特点。在动物与患者的诱发实验中显示,布地奈德具有抗过敏抗炎作用,能缓解对即刻及迟发过敏反应所引起的支气管阻塞。在高反应性病人,布地奈德具有降低气道对组胺和乙酰甲胆碱的反应,还可以有效地预防运动性哮喘的发作。研究发现早期应用布地奈德可以抑制气道炎症反应而改善气道重塑^[11,12],但是晚期应用布地奈德只能部分逆转气道重塑^[13]。本实验应用吸入布地奈德治疗哮喘大鼠,干预组 b-FGF 和 NF- κ B 的表达与哮喘组比较明显下降,气道重塑也得到改善,表明布地奈德改善哮喘大鼠的气道重塑可能与降低 b-FGF 和 NF- κ B 的表达有关,具体机制有待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] Obata H, Biro S, Arima N. NF-kappa B is induced in the nuclear

of cultured rat aortic smooth muscle cells by stimulation of various growth factors[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 224 (1): 27-32.

[2] 贾天明,乔俊英,栾斌,邹丽萍,冯剑飞. 大鼠哮喘模型气道重塑中细胞增殖和凋亡的变化[J]. 郑州大学学报(医学版), 2004,39(3):449-451.

[3] 吕国平,崔德健,郭英江,谭剑. 介绍一种建立大鼠哮喘模型的实验方法[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1995, 18(6):372-378.

[4] Nugent MA, Iozzo RV. Fibroblast growth factor-2[J]. Int J Biochem Cell Bio, 2000, 32(2):115-120.

[5] Bosse Y, Thompson C, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. Fibroblast growth factor 2 and transforming growth factor beta1 synergism in human bronchial smooth muscle cell proliferation[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006, 34(6):746-753.

[6] Holgate ST, Lackie P, Wilson S, Roche W, Davies D. Bronchial epithelium as a key regulator of airway allergen sensitization and remodeling in asthma [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 162 (3):S113-117.

[7] 吴斌,戴元荣. 核因子- κ B 与哮喘气道重塑的研究进展[J]. 医学综述, 2007, 13(12):885-887.

[8] Doherty T, Broide D. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma[J]. Curr Opin Immunol, 2007, 19(6):676-680.

[9] 吕威力,邢雪松. TP-470 和碱性成纤维细胞生长因子在血管内皮细胞增生的相互作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11 (19):3708-3711.

[10] Zimmerman MA, Selzman CH, Reznikov LL. Interleukin-11 attenuates human vascular smooth muscle cell proliferation[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 283(1):H175-180.

[11] 张健民,吴谨淮,杨运刚. 氟替卡松与布地奈德气雾剂治疗儿童哮喘前后峰流速值的比较[J]. 中国当代儿科杂志,2003,5 (3):261-262.

[12] 蒋玉红,王亚秋,孙宽周. 支气管哮喘患者 TH 细胞的极化状态及临床意义[J]. 中国当代儿科杂志,2006,8(5):379-381.

[13] 沈华浩,王绍斌. 布地奈德干预对卵蛋白致敏小鼠抗原激发后气道炎症及气道重塑的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(3):154-159.

(本文编辑:吉耕中)