

TGF- β 1 在 COPD 气道重塑中的作用及抗胆碱能药物干预效应实验研究

虞文嫣 卫 越 虞喜豪 崔永耀

摘 要 **目的** 通过分析 TGF- β 1 在 COPD 小鼠气道重塑中的作用及抗胆碱能药物对其的干预作用,进一步探讨 COPD 形成及治疗机制。**方法** 采用脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)滴入小鼠气管内制作 COPD 模型。30 只小鼠采用数字表法随机均分为 4 组:对照组(生理盐水气道滴入)、COPD 模型组及噻托溴铵(雾化吸入)、山莨菪碱(雾化吸入)两组干预组。经过 6 周的造模+干预治疗之后,处死小鼠,右下肺用以病理切片,左肺下叶与右肺中叶制作成肺匀浆液。ELISA 法检测肺组织匀浆 TGF- β 1 的含量;Western blot 法检测肺组织中 Smad-2、pSmad-2 及 α -SMA 的表达;肺组织切片观察:Masson 染色观察肺组织胶原沉积及平滑肌层增厚情况;HE 染色观察气道炎症情况。**结果** COPD 模型组出现 TGF- β 1、pSmad-2/Smad-2、 α -SMA 显著增高现象。此外,还出现气道管壁胶原沉积、平滑肌层增厚、气道炎症反应等改变。干预组较模型组,TGF- β 、pSmad-2/Smad-2、 α -SMA 无明显增高且炎症反应轻微、气道管壁胶原沉积、平滑肌增生情况不明显。**结论** TGF- β 1 在气道重塑上有着重要作用,抗胆碱能药物可干预上述现象。提示抗胆碱能药物除了传统观念的支气管扩张作用,在一定程度上还起到抗炎及抑制气道重塑的作用。

关键词 TGF- β 1 气道炎症 气道重塑 COPD 抗胆碱药物

[中图分类号] R363.2;R562.2

[文献标识码] A

Roles of Transforming Growth Factor- β in the Airway Remodeling in COPD and the Protective Effect of Anticholinergic Drugs. Yu Wen-yan, Wei Yue, Yu Xihao, et al. Clinical Medicine School of Ruijin, Medical School of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China

Abstract **Objective** To investigate roles of transforming growth factor- β in the airway remodeling in COPD and the protective effect of anticholinergic drugs. **Methods** LPS mouse tracheal instillation was used to produced COPD model. 30 mice were randomly divided into four groups: control group (saline airway instillation), COPD model group and two intervention groups: tiotropium (inhalation), anisodamine (inhalation). After a nine-week modeling and treatment, the mice were killed. TGF- β 1 in Lung homogenates was test with ELISA. Lung tissue in Smad-2, pSmad-2 and α -SMA expression was detected with Western blot. Masson staining was used to observed collagen deposition in lung tissue and smooth muscle layer thickening situation. HE staining was used to observed airway inflammation. **Results** TGF- β 1, pSmad-2/Smad-2, α -SMA of animals in COPD model group were significantly increased. In addition, there appeared significantly airway wall collagen deposition, smooth muscle layer thickening, airway inflammation, etc. In the intervention group, the phenomenon was attenuated. **Conclusion** TGF- β 1 plays an important role in airway remodeling. Anticholinergic drugs, to some extent, not only have anti-inflammatory effect but also have anti-remodeling effect.

Key words TGF- β 1; COPD; Airway inflammation; Airway remodeling; Anticholinergic drugs

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种以气流受限和外周气道炎症为特征的常见呼吸系统疾病。由于其发生率及病死率较高、危害性大,已成为医药学界关注热点之一。近年来有研究表明,脂多糖(LPS 革兰阴性菌细胞壁成分)可直接引起呼吸道上皮的损

伤及炎症反应,持续的炎症导致气道壁重构,黏液增生,胶原含量增加,最后引起气流受限,促进 COPD 的发生和发展。转化生长因子- β 1(TGF- β 1)能够诱导包括分化、炎症、增生以及凋亡等多种细胞反应,在 COPD、哮喘、肿瘤等多种病理过程中均发挥重要作用^[1,2]。因此,TGF- β 在气道重塑中的作用值得关注。由于 COPD 的病理生理过程至今尚未完全阐明,临床上缺乏可以有效对抗其肺部炎症的药物。乙酰胆碱作为胆碱能神经分泌的神经递质,在气道平滑肌收缩和腺体分泌等方面起着重要作用。近年来,发现

作者单位:200025 上海交通大学医学院瑞金临床学院(虞文嫣、卫越);上海解放军八五医院肿瘤内科(虞喜豪);上海交通大学医学院药理学教研室(崔永耀)

通讯作者:虞喜豪,主任医师,电子信箱:yuxih@tom.com

抗胆碱药物具有潜在的抗炎抗重塑作用而备受重视^[3-5]。本研究旨在以 LPS 刺激小鼠气道造成 COPD 模型基础上,从细胞学角度、病理学角度观察 TGF- β 1 在 COPD 小鼠气道重塑中的作用及抗胆碱能药物对其的干预效应,进一步探讨 COPD 形成及治疗机制作用。

材料与方法

1. 实验对象及实验过程:KM 小鼠 30 只,雄性健壮,体重 25 ± 5 g(上海市交通大学实验动物中心),实验小鼠按数字表法随机分 4 组:对照组(7 只):气道内滴注 50 μ l 生理盐水,2 次/周,共 6 周;COPD 模型组(8 只)(参考 Juanita H. J. Ver-nooy 法):气道内滴注 5 μ g/50 μ l LPS(Sigma 公司),2 次/周,共 6 周;噻托溴铵组(7 只):气道内滴注 5 μ g/50 μ l LPS,2 次/周,3 周后,在气道内滴注 LPS 前 30min 用雾化仪在一密闭容器内雾化吸入 50 μ g 噻托溴铵(Boehringer Ingelheim 公司)20min,共 6 周;山莨菪碱组(8 只):气道内滴注 5 μ g/50 μ l LPS,2 次/周,3 周后,在气道内滴注 LPS 前 30min 用雾化仪在密闭容器内雾化吸入 28 μ g 山莨菪碱(上海第一生化药业有限公司)20min,共 6 周。另正常饲养 5 只 KM 小鼠作为空白组。

2. 标本处理:实验小鼠于最后一次给药后 1 周处死,分别编号后取出双肺,取右下肺以 10% 甲醛固定后外送切片,取左肺下叶与右肺中叶分别称重,按 0.0166ml/mg 肺组织重量加入 PBS。用匀浆机以 8000r/min 的转速转 1min。取出 1.3ml 至 EP 管中。用离心机在 4℃、10000r/min 的转速下离心 15min。取上清加入 500 μ l 细胞裂解液,8000r/min 的转速转 15s 后取上清备用。左肺下叶匀浆液用于 ELISA,右肺中叶匀浆液用于 Western blot 法检测。

3. 测定肺组织中 α -SMA 含量:采用 Western blot 法测定肺组织中 α -SMA 含量,取各组肺匀浆上清液 20 μ l,加入细胞裂解液 20 μ l 以及上样缓冲液 10 μ l,混合后 100℃ 水浴 5min,10000r/min 离心 5min 后制成样品;后采用 SDS-Page 分离各样品中蛋白。在 4℃ 环境中,200mA 恒流模式下将 SDS-Page 分离的蛋白转至 NC 膜。转膜后用 TBST 洗膜 5min,5% milk-TBST 封闭 1h。以 1% milk-TBST 洗膜 5min 后,加入 α -SMA 抗体(Abcam)封闭慢摇 12h。以 TBST 洗膜 5min,2 次,1% milk-TBS-T 洗膜 5min,3 次后加入山羊抗鼠抗体(北京中杉公司)慢摇 1h,1% milk-TBS-T 洗膜 5min,2 次,TBS-T 洗膜 5min,3 次后,至曝光室曝光。曝光结果采用软件 ImageJ 分析。

4. 测定肺组织中转化生长因子 TGF- β 1:采用 ELISA 方法测定肺匀浆液中 TGF- β 1 含量。取小鼠 TGF- β 1 试剂盒(麦约尔生物),按试剂盒说明书配制各浓度标准液并取各组小鼠肺匀浆液 50 μ l,加入样本稀释液 410 μ l、20 μ l 1mmol/L HCl、20 μ l 1mmol/L NaOH 进行 TGF- β 1 激发实验。向 96 孔酶标板内加入各浓度标准液以及各组样本 100 μ l,贴膜后恒温 37℃ 温育 120min。洗板 6 次。向每孔加入一抗工作液 100 μ l,贴膜后恒温 37℃ 温育 60min。洗板 6 次。向每孔加入酶标抗体工作液 100 μ l,贴膜后恒温 37℃ 温育 30min。洗板 6 次。向

每孔加入底物工作液 100 μ l,避光置 37℃ 环境约 15min 后,加入反应终止液 100 μ l 终止反应。将 96 孔酶标板置酶标仪测定 A₄₅₀值,通过标准曲线计算各样品中细胞因子的含量。

5. 测定肺组织中 TGF- β 1 细胞内信号通路 Smad-2 与 pSmad-2 含量:采用 Western blot 法测定肺匀浆上清液中 Smad-2 与 pSmad-2 含量:取各组肺匀浆上清液 20 μ l,加入细胞裂解液 20 μ l 以及上样缓冲液 10 μ l,混合后 100℃ 水浴 5min,10000r/min 离心 5min 后制成样品;后采用 SDS-Page 分离各样品中蛋白。在 4℃ 环境中,200mA 恒流模式下将 SDS-Page 分离的蛋白转至 NC 膜。转膜后用 TBST 洗膜 5min,加入 Smad-2 抗体与 pSmad-2 抗体(Cell Signaling Technology)封闭慢摇 12h。以 TBST 洗膜 5min,2 次,1% milk-TBS-T 洗膜 5min,3 次后加入山羊抗鼠抗体慢摇 1h,1% milk-TBS-T 洗膜 5min,2 次,TBS-T 洗膜 5min,3 次后,至曝光室曝光。曝光结果采用软件 Image J 分析。

6. 病理切片:病理切片行常规 Masson 染色及 HE 染色。

7. 统计学方法:应用 GraphPad Prism 5.0 进行描述性分析,组间差异比较使用单因素方差分析 Dunnett 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 肺组织中转化生长因子 TGF- β 1 表达情况:ELISA 检测结果显示 COPD 模型组中 TGF- β 1 明显高于对照组,而抗胆碱能药物(山莨菪碱、噻托溴铵)干预组中 TGF- β 1 较 COPD 组有明显的降低,详见图 1。

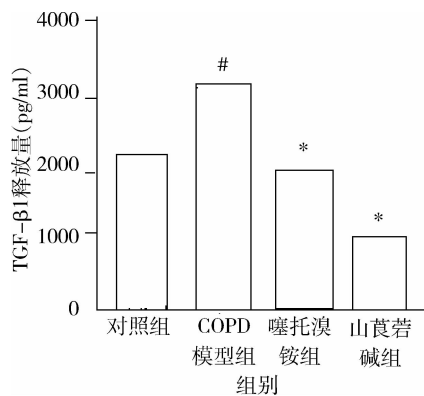


图 1 ELISA 检测肺组织匀浆中 TGF- β 1 表达情况

与对照组相比,[#] $P < 0.01$;与 COPD 模型组相比,^{*} $P < 0.001$

2. 肺组织中 TGF- β 1 细胞内信号通路 Smad-2 与 pSmad-2 含量:Western blot 法检测 Smad-2 与 pSmad-2 含量,为排除不同组别肺组织匀浆中初始 Smad-2 的差异性,将 Western blot 法检测所得 Smad-2 与 pSmad-2 做比值处理,更直观体现 Smad-2 活化程度。实验结果显示 COPD 模型组中 pSmad-2/Smad-2 明显高于对照组。抗胆碱能药物(山莨菪

碱、噻托溴铵)干预组中 pSmad - 2/Smad - 2 较于 COPD 组有明显的降低,详见图 2、图 3。

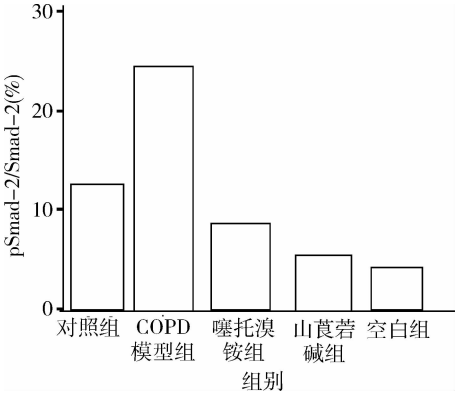


图 2 Western blot 法检测 pSmad - 2/Smad - 2



图 3 Western blot 法 pSmad - 2 与 Smad - 2 曝光结果
1. 对照组;2. COPD 模型组;3. 山莨菪碱组;4. 噻托溴铵组;5. 空白组

3. 肺组织中 α - SMA (α - 肌动蛋白) 含量: Western blot 法检测结果显示 COPD 模型组中 α - SMA 显著高于对照组;抗胆碱能药物(山莨菪碱、噻托溴铵)

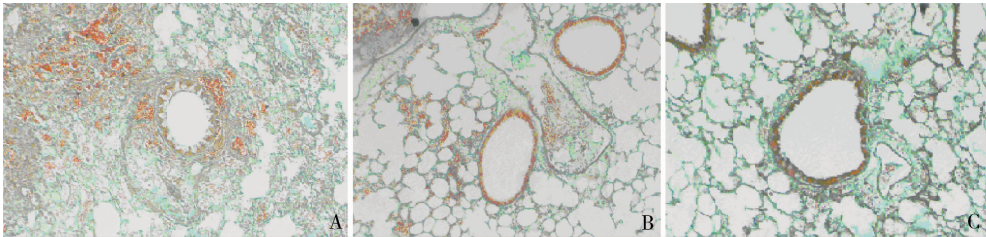


图 6 Masson 染色结果 ($\times 100$)
A. 对照组;B. COPD 模型组;C. 山莨菪碱组

5. 病理切片 HE 染色结果:染色结果显示,COPD 模型组相比于对照组出现明显的炎症反应(图 7A、B),山莨菪碱组相较于 COPD 模型组炎症反应减轻,气道周围及肺组织间隙红细胞渗出明显减少,肺泡内水肿明显减轻,炎症细胞浸润情况得到了明显改善,气管黏膜上皮完整(图 7B、C)。

讨 论

本实验通过 ELISA 方法检测出在 COPD 模型组

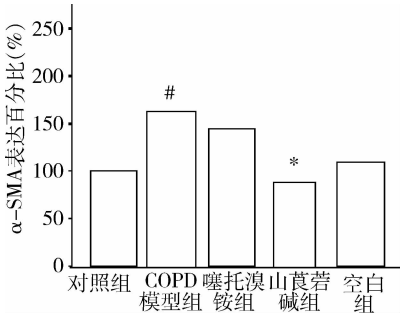


图 4 Western blot 法检测肺组织中 α - SMA 表达
与对照组相比,[#] $P < 0.05$;与 COPD 模型组相比,^{*} $P < 0.005$

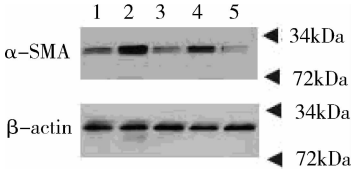


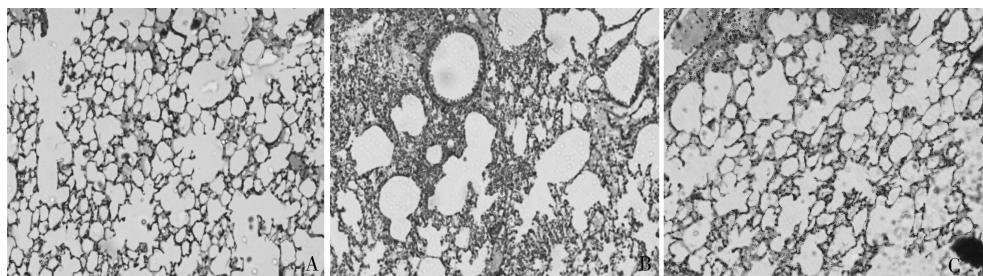
图 5 Western blot 法 α - SMA 曝光结果

1. 对照组;2. COPD 模型组;3. 山莨菪碱组;4. 噻托溴铵组;5. 空白组

组中 α - SMA 相较于 COPD 模型组出现显著下降,详见图 4、图 5。

4. 病理切片 Masson 染色结果:染色结果显示 COPD 模型组相比于对照组出现明显的肺组织胶原的沉积及平滑肌组织增生情况(图 6A、B)。山莨菪碱组相较于 COPD 模型组,肺组织胶原沉积明显减少,平滑肌组织增生情况也得到了改善(图 6B、C)。

中 TGF - β 1 明显增高,通过 Western blot 法检测出 pSmad - 2/Smad - 2 明显高于对照组。TGF - β 1 在体内来源广泛,在细胞分化的所有阶段很多细胞及组织都会产生 TGF - β 1。但在 COPD 的发病过程之中,它主要来源于肺局部浸润的中性粒细胞、单核 - 吞噬细胞、淋巴细胞和气道壁的成纤维细胞。TGF - β 1 是一种多功能细胞调节因子,以自分泌、旁分泌和内分泌的方式通过细胞表面的受体信号转导途径调控

图7 HE染色结果($\times 40$)

A. 对照组; B. COPD 模型组; C. 山莨菪碱组

细胞的增殖、分泌和凋亡^[6]。介导 TGF- β 1 信号转导的是活化因子 Smad 家族。Smad 蛋白是 TGF- β 1 家族的特异性细胞内信号转导分子,可分为 3 个亚家族 R-Smad、co-Smad 和 I-Smad。受体激活型(R-Smad)主要通过膜结合蛋白的相互作用以及 SARA (Smad 受体激活锚定蛋白)锚定细胞膜,主要有 Smad-2、Smad3。共同通路型(co-Smad)是所有 TGF- β 家族信号转位入细胞核所必须,主要是 Smad4。TGF- β 1 作为配体形成受体复合物,激活 Smad 家族,使 R-Smad 磷酸化。本实验通过检测 pSmad-2/Smad-2 排除了不同组别肺组织中初始 Smad-2 的差异性,直接反应 Smad-2 被活化的程度。本实验结果说明了 TGF- β 1 参与了 COPD 病情的进展,并通过 TGF- β 1/Smad 信号转导通路调控细胞增殖、分泌及凋亡,发挥 TGF- β 1 的生物学效应。

气道重塑是指气道在慢性炎症刺激下,所发生的气道壁的结构改变,涉及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积、气道平滑肌(airway smooth muscle, ASM)增厚、上皮下纤维化、肌成纤维细胞增生的改变。本实验通过 Western blot 法检测出在 COPD 模型组中 α -SMA 显著高于对照组,病理学检测:通过 Masson 染色可以明显看出 COPD 模型组相比于对照组出现明显的肺组织胶原的沉积及平滑肌组织增生情况。有研究结果显示, TGF- β 1 可诱导间质细胞中 ECM 的表达,并刺激蛋白酶抑制剂的产生。从中可反映出 TGF- β 1 不但可促进各种细胞外基质成分如纤黏蛋白、胶原和蛋白多糖的合成,对新合成细胞基质的降解亦有明显的抑制作用,从而引起 ECM 分解减少和沉积增加^[7,8]。细胞外基质的合成是保护组织损伤的一个重要机制,但是过度的细胞外基质合成则对气道气体交换有着严重的影响,进而对气道结构产生直接影响,进一步加重气道的纤维化。故本实验中 COPD 病理切片染色出现明显细胞外基质沉积

证实了这点。

TGF- β 1 是成纤维细胞的强效趋化因子,近年研究显示, TGF- β 1、TGF- β 2 通过刺激成纤维细胞到肌成纤维细胞(MF)的表型改变。大多数情况下 MF 以表达 α -SMA 为主, MF 在气道黏膜下增殖和积聚使气道壁增厚。MF 具有收缩性,使管腔更加狭窄,并且 MF 产生的胶原纤维、弹性纤维和网状纤维等沉积于基膜,限制管腔扩张。因此,推测 MF 在气道重塑中可能起重要作用。本实验检测 COPD 组 α -SMA 高度表达从某种程度上也体现了 TGF- β 促进成纤维细胞的增殖并向 MF 转变的事实。另有研究表明, TGF- β 1 可能诱导平滑肌细胞增殖。气道平滑肌细胞在 TGF- β 1 的刺激下细胞表型可由收缩型向合成型转化,从而使平滑肌细胞不仅具有收缩功能使管腔变窄,同时由于细胞外基质及纤维产生增加而限制了管腔的扩张,共同参与了气道重塑。本实验在 COPD 模型组中 Masson 染色平滑肌增殖结果及 α -SMA 高度表达直接体现了平滑肌细胞的高度增殖,同时由于染色显示胶原沉积从某种程度上也反映了合成型平滑肌细胞的合成功能。

本实验中,通过 ELISA 及 Western blot 法可检测出干预组抗胆碱能药物治疗后, TGF- β 1、pSmad-2/Smad-2 相较于 COPD 模型组出现了显著的下降;病理切片 HE 染色结果可以看出,干预组病变均较 COPD 模型组减轻,气道周围及肺组织间隙红细胞渗出明显减少,肺泡内水肿明显减轻,炎症细胞浸润情况得到了明显改善,气管黏膜上皮完整。由此结果,笔者认为抗胆碱能药物除具有传统意义上的支气管扩张的作用,还存在抗炎的生物学效应。有研究表明,神经源性和非神经源性的乙酰胆碱均可能在肺泡和支气管腔内发挥其促炎性作用。其通过作用于受体,释放炎症因子趋化炎症细胞,导致大量炎症细胞的浸润与活化,再通过活化的炎症细胞所释放的炎症

介质引发瀑布式炎症反应,从而促进 COPD 中的气道炎症发生发展^[9]。抗胆碱能药物正是通过阻断乙酰胆碱的作用来发挥抗炎作用,随着炎症得到改善,可以看到炎症细胞浸润减轻,炎症因子 TGF- β 1 下降及由 TGF- β 1 所激活的 pSmad-2/Smad-2 值的下降。另外本研究中通过 Western blot 法检测出干预组抗胆碱能药物治疗后, α -SMA 出现显著下降;病理切片 Masson 染色可以观察到相较于 COPD 模型组,肺组织胶原沉积明显减少,平滑肌组织增生情况也得到了改善,由此可推测抗胆碱能药物对气道重塑有一定的干预作用。综合实验结果分析,笔者认为其干预气道重塑的可能机制如下:①通过降低具有促气道重塑的炎症因子如 TGF- β 1 的产生来实现的;②通过直接阻断成纤维细胞及肌成纤维细胞上的胆碱能受体,从而拮抗乙酰胆碱的细胞增殖效应,抑制肌成纤维细胞的增殖,进一步抑制气道重塑的进展。本实验中干预组 α -SMA(肌成纤维细胞的表型)的显著降低从某种程度上也证实了这点。

综上所述,TGF- β 1 等参与了 COPD 病情的进展,并可能其通过 TGF- β 1/Smad 信号转导通路调控细胞增殖、分泌及凋亡,导致细胞外基质沉积增加、成纤维细胞增殖并发展为肌成纤维细胞、平滑肌细胞增殖并向合成型转变,从而在气道重塑中发挥重要作用。抗胆碱能药物通过阻断胆碱能受体,发挥抗炎效应^[5]。同时其又可通过阻断位于成纤维细胞、肌成纤维细胞表面的 M 受体拮抗 Ach 细胞增殖效应,或者通过抑制具有促重塑的炎症因子释放从而直接或

间接地干预气道重塑的进展^[10,11]。此为今后 COPD 临床治疗药物选择及开发新的靶点药物提供实验依据。有关各类炎症因子及相关受体相互作用关系、临床实际检测等仍待进一步研究。

参考文献

- 1 Brusasco V. Reducing cholinergic constriction: The major reversible mechanism in COPD[J]. Eur Respir Rev, 2006, 15: 32-36
- 2 Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. [J]. Nature, 2000, 405: 458-462
- 3 Barnes PJ. The role of anticholinergics in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Med, 2004, 117(Suppl 12A), 24S-32S
- 4 姚婉贞, 王国扬. 慢性阻塞性肺疾病的气道毒蕈碱 M 受体变化与抗胆碱治疗的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(7): 484-485
- 5 Profita M, Giorgi RD, Sala A, et al. Muscarinic receptors, leukotriene B4 production and neutrophilic inflammation in COPD patients [J]. Allergy, 2005, 60: 1361-1369
- 6 宋一平, 崔德健, 茅培英, 等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型气道重塑及生长因子的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(5): 5-9
- 7 Sandford AJ. Chronic obstructive pulmonary disease. 1: Susceptibility factors for COPD the genotype-environment interaction [J]. Thorax, 2002, 57(8): 736-741
- 8 Yamauchi K. 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
- 9 Nicola AH, Amir S. Update on the pharmacologic therapy for chronic obstructive pulmonary disease[J]. Clin Chest Med, 2007, 28: 589-607

(收稿日期: 2014-03-01)

(修回日期: 2014-03-26)

壳聚糖季铵盐对戊型肝炎病毒多肽疫苗免疫效果的研究

郑海群 陶 薇 何卓晶 傅 婷 陈 勇 洪 艳

摘 要 目的 研究壳聚糖季铵盐(3-氯-2-羟丙基三甲基壳聚糖, HTCC)作为免疫佐剂, 对戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)多肽疫苗接种小鼠的免疫增强效果。**方法** IPTG 诱导重组质粒 pET28a-ORF23 在大肠杆菌 BL21 中表达 HEV 重组蛋白作为多肽疫苗, 以 3-氯-2-羟丙基三甲基氯化铵(CTA)作为化学改性剂对壳聚糖进行接枝改性合成水溶性 HTCC 作为多肽疫苗佐剂。50 只雌性 BALB/c 小鼠随机分为 5 个免疫组, 小鼠后腿肌内注射, 共免疫 2 次, 间隔 3 周。ELISA 检测 3 个免疫阶段鼠血清抗 HEV-IgG 抗体水平; 末次免疫 5 周后, 四色流式细胞术检测免疫小鼠全血中 CD4⁺、CD8⁺、IFN- γ ⁺ 和 IL-4⁺ 细

基金项目: 浙江省公益技术研究社会发展项目(2011C23002); 浙江省创新团队建设与人才培养项目(2011F20015)

作者单位: 325035 温州医科大学检验医学院、生命科学院(郑海群、陈勇); 310013 杭州, 浙江省医学科学院生物工程研究所(陶薇、何卓晶、傅婷、洪艳); 310053 杭州, 浙江省医学高等专科学校(陈勇)

通讯作者: 陈勇, 电子信箱: cyong93@163.com; 洪艳, 电子信箱: hongy1008@163.com