

细胞外基质对哮喘模型大鼠气道平滑肌 细胞免疫调节作用

陈忠仁 梁梅兰

摘要 目的 研究在哮喘状态下,细胞外基质(extracellular matrix,ECM)对气道平滑肌细胞(airway smooth muscle cells,ASMCs)的免疫调节作用。方法 健康雄性 Wistar 大鼠随机分为哮喘组(8 只)及正常对照组(8 只)。大鼠哮喘模型使用卵清蛋白(OVA)致敏及激发的方法建立。分离培养得到的大鼠 ASMCs 分别置于包被有 LA 及 COL-1 的细胞瓶中进行培养。结果 Western blot 法检测结果显示,eotaxin、TGF- β 1 的表达,哮喘空白组高于正常对照空白组($P < 0.05$),哮喘组内 ECM 的干预促进表达的增加($P < 0.05$),正常对照组表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 ECM 影响哮喘 ASMCs 的免疫功能。

关键词 哮喘 细胞外基质 气道平滑肌细胞 免疫调节

中图分类号 R3 文献标识码 A DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.01.033

Regulation of Extracellular Matrix in the Immunity of Airway Smooth Muscle Cell in Asthmatic Rat. Chen Zhongren, Liang Meilan. Department of Respiratory Medicine, Haikou People's Hospital, Hainan 570208, China

Abstract Objective To study extracellular matrix (ECM) in airway smooth muscle cells (ASMCs) immunomodulatory effects in asthma status. **Methods** Healthy male Wistar rats were randomly divided into asthmatic and control groups with eight in each group. Asthmatic rat model was established in using ovalbumin (OVA) sensitization and stimulation methods. ASMCs were isolated and cultured in the flasks, which coated with LA and COL-1. Expression of eotaxin and TGF- β 1 protein in ASMCs was detected by Western blot. **Results** Western blot showed that the expression level of eotaxin, TGF- β 1 among the different groups was higher in Asthma group than in the normal control group ($P < 0.05$). Interventions ECM increased expression within asthma group ($P < 0.05$). No difference was found in expression in control group ($P > 0.05$). **Conclusion** ECM can affect the immune function in asthmatic ASMCs.

Key words Asthma; Extracellular matrix; Airway smooth muscle cell; Immunity

支气管哮喘是一种气道慢性炎症疾病,由多种细胞和细胞组分参与。作为维持气道结构和功能重要成分的气道平滑肌细胞(airway smooth muscle cell, ASMCs)和细胞外基质(extracellular matrix, ECM),在哮喘的疾病发生、发展中起了重要的作用^[1,2]。ASMCs 在炎性反应中作用比较活跃,能够分泌多种炎性介质,产生一系列细胞因子,表达免疫细胞的黏附分子以及包括 Fas 在内的一些细胞表面分子标志物,ASMCs 所分泌的这些因子能够促进 ASMCs 自身的增殖^[3-5]。ASMCs 还能够产生细胞外基质、基质金属蛋白酶和相关的抑制剂,促进有丝分裂的发生,是引起支气管哮喘气道狭窄的重要病理因素,如 I 型胶原(type I collagen, COL-1)、层黏蛋白(laminin, LA)等有显著增加,两者可相互影响。为了探讨这一问题,本实验将大鼠 ASMCs 种植于用涂覆有 ECM 的

培养瓶中,采用 Western blot 法检测哮喘 ASMCs eotaxin、TGF- β 1 蛋白的表达,探讨 ECM 对哮喘大鼠 ASMCs 免疫功能的调节作用。

材料与方法

1. 材料:健康 Wistar 雄性大鼠。卵清蛋白(ovalbumin, OVA)、COL-1、LA、胎牛血清(fetus bovine serum, FBS)、木瓜蛋白酶、I 型胶原酶、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购于美国 Sigma 公司。小鼠抗肌动蛋白(α -actin)和 Trizol 溶液购自美国 GIBCO 公司。单去污剂裂解液、0.01mol/L PBS (pH7.3)、10%分离胶、4%浓缩胶、0.15mol/L NaCl 溶液、2×(5×)SDS 上样缓冲液、电泳缓冲液、转移缓冲液、10×丽春红染液、封闭液、TBST、TBS、洗脱抗体缓冲液、抗体、化学发光试剂。

2. 大鼠哮喘模型的建立及分组:(1)哮喘模型的建立:参照文献[7]中的方法,在大鼠后腿内侧皮下注射 1ml 体积的 0.9%生理盐水混合液(含有 10mg 的 OVA 以及 200mg 的氢氧化铝);注射后第 8 天重复上述步骤;注射第 15 天玻璃容器中进行含有 2% OVA 生理盐水的喷雾试验,对大鼠进行喷雾处理,每次喷雾量控制在 50ml,每周喷雾 3 次,每次 30min,共进

行 15 天。当大鼠出现躁狂、呛咳、呼吸急促症状时,即哮喘模型制备成功。(2)大鼠分组:16 只大鼠随机分为两组,每组 8 只。哮喘组,利用 OVA 制备模型;对照组,生理盐水替代 OVA。

3. 大鼠气道平滑肌细胞 (ASMCs) 的培养、鉴定和分组:
(1)大鼠 ASMCs 的培养:根据文献[8]报道的方法分离大鼠肺叶支气管的 ASMCs。在 OVA 或生理盐水激发 2 周后,在第 24h 进行麻醉取材。取肺后移入超净台,置于冰盒上。倒入已加双抗的 D-HANKS 液,清洗肺部。清洗后的肺组织切成 1~2mm 的组织块,将其置于消化液(含 1mg/ml I 型胶原酶、1mg/ml 木瓜蛋白酶、10mg/mlBSA 的 D-HANKS 液)中,37℃ 消化 15min。消化完毕后,加入无血清的 DMEM 培养基,980r/min,离心 10min。弃上清,加入约 1ml 含 20% FBS 的 DMEM。移入细胞瓶中,37℃、5% CO₂ 孵箱培养,每隔 3 天换液 1 次,大约 1 周时间,当细胞长满单层后,胰酶消化传代培养。实验所用的细胞培养至第 2~5 代。ASMCs 的鉴定主要在显微镜观察细胞形态,并通过 α -actin 进行细胞免疫荧光染色。

4. 培养瓶的处理:根据参考文献[9]报道的方法,取无菌细胞培养瓶(50ml),将同一浓度的 COL-1 以及 LA (10 μ g/ml)加入细胞瓶中,加入的体积覆盖瓶底即可,摇匀后放于 37℃ 孵箱过夜培养。取出后无菌条件下加入 0.1% 的 BSA 封闭,室温作用 30min,弃掉液体,无血清 DMEM 培养液清洗瓶底,吸干液体,再自然风干,可直接使用,或封好瓶口待用。

5. ASMCs 分组:分离培养得到两组大鼠的 ASMCs,随机分为 3 组。①空白组:细胞正常培养;②COL-1 组:将 ASMCs 传代接种在包被有 COL-1 (10 μ g/ml)的细胞瓶中;③LA 组:将 ASMCs 传代接种在包被有 LA (10 μ g/ml)的细胞瓶中。每组各 3 瓶。

6. Western blot 法检测 ASMCs 中 eotaxin、TGF- β 1 蛋白的表达:参照 Santa Cruz 公司提供的蛋白提取方法,应用蛋白裂解缓冲液分别裂解细胞得到总蛋白。以牛血清蛋白作为标准品,绘制标准曲线,计算提取液的蛋白浓度。取总蛋白 50 μ g,10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行蛋白分离,转膜、封闭,一抗的工作浓度 1:500, β -actin 作为内参照,封闭孵育二抗,工作浓度 1:1000。用 ECL 化学发光试剂盒检测杂交信号。

7. 统计学方法:采用 SPSS 10.0 统计软件,实验数据均用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,进行方差分析和 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 大鼠 ASMCs 鉴定:如图 1 所示,通过细胞形态及免疫荧光染色显示,分离得到的细胞形态长梭型,与平滑肌细胞形态形似,并且 α -actin 的表达为阳性,可以判定培养的细胞为大鼠平滑肌细胞。

2. Western blot 法检测 eotaxin、TGF- β 1 蛋白的表达:如图 2、图 3 所示,通过分析每组条带的灰度值,对蛋白含量进行计算比较。从表 1、图 2、图 3 中

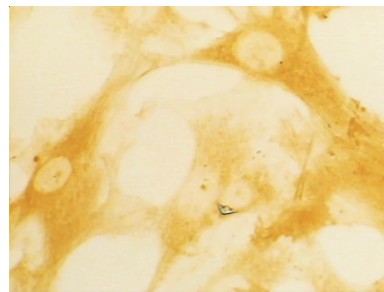


图 1 气道平滑肌细胞 α -actin DAB 染色阳性 (SP, $\times 400$)

可看出,eotaxin、TGF- β 1 蛋白在各组皆有表达,并且表达量各有不同:在哮喘模型组当中,哮喘干预组显著高于空白组,空白组含量显著高于正常对照组 ($P < 0.05$);在正常对照组中,表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 大鼠气道平滑肌细胞 eotaxin、TGF- β 1 的表达含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	eotaxin	TGF- β 1
哮喘 LA	39182 $\pm$ 62 [#]	37165 $\pm$ 53 [#]
哮喘 COL-1	42663 $\pm$ 41 [#]	32465 $\pm$ 37 [#]
哮喘空白	38633 $\pm$ 56 [*]	31888 $\pm$ 82 [*]
正常 LA	16656 $\pm$ 61	16583 $\pm$ 47
正常 COL-1	16575 $\pm$ 47	16578 $\pm$ 52
正常对照	16525 $\pm$ 58	16590 $\pm$ 49

与哮喘空白组相比,[#] $P < 0.05$;与正常对照组相比,^{*} $P < 0.05$

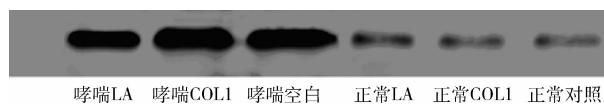


图 2 eotaxin 蛋白电泳图

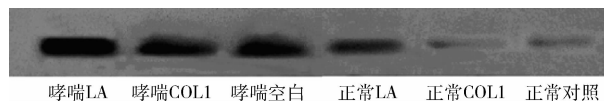


图 3 TGF- β 1 蛋白电泳图

讨 论

支气管哮喘是一种气道慢性非特异性炎症疾病,但随着疾病的进展,可出现气道重塑,这与 ASMCs 的功能状况密切相关。ASMCs 是炎性因子的作用靶点,同时也可分泌多种细胞因子和免疫活性蛋白^[10]。气道平滑肌细胞有两种表型:①以收缩功能为主的收缩型;②能合成、分泌及表达多种活性物质的合成型^[11]。合成型气道平滑肌细胞可以旁分泌、自分泌等方式分泌多种活性物质参与支气管哮喘的病理、生

理过程,启动和维持哮喘气道高反应,引起慢性炎症和气道重塑。以往观点认为,ASMCs 在哮喘发病过程中,在神经源性信号和炎性介质调控下,参与气管收缩和舒张的过程。随着不断地深入研究发现,ASMCs 不仅可以调节支气管的收缩和舒张,而且可分泌及表达多种免疫调节介质,参与气道慢性炎症和重塑的发生和发展。近年来发现 ASMCs 有新的生物学功能,如向黏膜层迁移使平滑肌层增厚、合成及炎症网络调节功能及动力学异常等。ASMCs 与 ECM 由于其组织结构特点,在哮喘的发生、发展过程中存在着紧密联系,它们相互作用,发挥其功能特点,以减少对支气管的不利影响。ASMCs 可分泌多种基质蛋白,减缓 ECM 的降解,加速气道重建。受影响的 ECM 又可调控 ASMCs 的生存、增殖和迁移等生物学行为。研究表明,哮喘 ASMCs 可分泌蛋白多糖、Ⅲ型胶原、硫酸软骨素,使 ECM 含量增加,这种作用不能被激素所抑制,并可分泌 TIMP-1 和 TIMP-2,抑制 ECM 降解^[12-14,15]。不同种类和数量的 ECM 可影响 ASMCs 的迁移速度、增殖效率、生存时间和上调平滑肌细胞的分泌功能,如 FN 呈剂量依赖性促进 ASMCs 的增殖,种植于 COL-1 和 LA 的 ASMCs 凋亡率下降^[16]。目前还没有研究发现 ECM 在 ASMCs 免疫反应方面是否具有调节作用,以及怎样参与信号通路的转导。

在笔者的实验研究中,将 eotaxin 及 TGF- β 1 作为探讨 ASMCs 免疫功能的重要因素。嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin)最早是在嗜酸性粒细胞浸润的支气管肺泡灌洗液中发现的,在人的多种组织中都能够检测到 eotaxin mRNA 的表达,可由不同来源的细胞产生^[17]。支气管哮喘的典型病理特征即嗜酸性粒细胞广泛浸润,而 eotaxin 对嗜酸性粒细胞具有趋化作用,使其靶向迁移至炎性反应部位,加剧哮喘的炎性反应。同时,研究表明,eotaxin 也会影响 ASMCs 在炎性反应时的迁移方向^[18]。TGF- β 生物学主要功能与炎性反应相关,是一些炎性细胞的趋化剂,可由肺部多种免疫相关的细胞分泌;同时可以促进 ECM 的表达并抑制其分解,对平滑肌细胞的增殖具有显著作用,并通过多种通路调控哮喘的疾病过程,气道平滑肌细胞可以分泌 TGF- β ^[19,20]。基于这两种蛋白在免疫调节方面的功能,笔者将其作为研究 ASMCs 的重要指标。

总之,本实验结果显示,ECM 对 ASMCs 中 eotaxin, TGF- β 1 的表达有正调控作用,对哮喘气道平滑

肌细胞的作用更为显著,这为今后防治哮喘提供了一个新的思路和方法。但 ECM 通过何种途径调节哮喘 ASMCs 的免疫功能还不是很清楚,这需要进行进一步研究。

参考文献

- Bhattacharya R, Gonzalez AM, Debiase PJ, *et al.* Recruitment of vimentin to the cell surface by beta 3 integrin and plectin mediates adhesion strength[J]. *Cell Sci*, 2009, 122(9): 1390-1400
- Yamauchi K, Noue H. 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
- Hmami Q, Tulic MK. New insights into the pathophysiology of the small airways in asthma[J]. *Ann Thorac Med*, 2007, 2(1): 28-33
- Chan V, Burgess JK, Ratoff JC, *et al.* Extracellular matrix regulates enhanced eotaxin expression in asthmatic airway smooth muscle cells[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 174(4): 379-385
- Woodruff PG. Gene expression in asthmatic airway smooth muscle[J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2008, 5(1): 113-118
- Halwani R, Al-Muhwen S, Hamid Q. Airway remodeling in asthma[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2010, 10(3): 236-245
- Laura P, Chiara T, James GM, *et al.* Airway remodeling in allergen-challenged Brown Norway rats; distribution of proteoglycans[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 290(1): 1052-1058
- Hirst SJ. Airway smooth muscle cell culture: application to studies of airway wall remodeling and phenotype plasticity in asthma[J]. *Eur Respir J*, 1996, 9(4): 808-820
- Vivien C, Janette KB, Jonathan CR, *et al.* Extracellular matrix regulates enhanced eotaxin expression in asthmatic airway smooth muscle cells[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 174(4): 379-385
- Ito I, Fixman ED, Asai K, *et al.* Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta modulate the expression of matrix metalloproteinases and migratory function of human airway smooth muscle cells[J]. *Clinical and Experimental Allergy*, 2009, 39(9): 1370-1380
- Tliba O, Panettieri RA Jr. Noncontractile functions of airway smooth muscle cells in asthma[J]. *Annu Rev Physiol*, 2009, 71(10): 509-535
- Halayko AJ, Tran T, Gosens R. Phenotype and functional plasticity of airway smooth muscle: role of caveolae and caveolins[J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2008, 5(1): 80-88
- Damers G, Tliba O, Panettieri RA Jr. Airway smooth muscle as an immunomodulatory cell[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2009, 22(5): 353-359
- Damera G, Panettieri RA Jr. Does airway smooth muscle express an inflammatory phenotype in asthma[J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 163(1): 68-80
- Burgess JK, Ceresa C, Johnson SR, *et al.* Tissue and matrix influences on airway smooth muscle function[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2009, 22(5): 379-387
- Araujo BB, Dolnikoff M, Silva LF, *et al.* Extracellular matrix compo-

- nents and regulators in the airway smooth muscle in asthma[J]. *Eur Respir J*, 2008, 32(1): 61-69
- 17 朱建波, 许成芳, 王文霞. 福莫特罗对过敏性哮喘大鼠气道中嗜酸性粒细胞浸润的抑制作用[J]. *实用医学杂志*, 2010, 26(13): 2304
- 18 Judith LB, Reynold AP Jr, Audreesh B, *et al.* Airway smooth muscle in asthma: just a target for bronchodilation? [J]. *Clin Chest Med*, 2012, 33(3): 543-558
- 19 Yang YC, Zhang N, Van Crombruggen K, *et al.* Transforming growth factor- β 1 in inflammatory airway disease: a key for understanding inflammation and remodeling[J]. *Allergy*, 2012, 67(10): 1193-1202
- 20 李娟, 沈奕, 钱艳, 等. 转化生长因子 β_1 I 型受体拮抗剂对支气管哮喘小鼠气道炎症及气道重塑的影响[J]. *中华哮喘杂志: 电子版*, 2013, 7(3): 25-31
- (收稿日期: 2014-06-20)
(修回日期: 2014-07-07)

婴儿动脉导管未闭合并肺部感染和心力衰竭时急诊介入封堵术

孟祥春 谭卫群 刘 麟 李博宁 徐明国 刘 琮

摘 要 **目的** 研究婴儿动脉导管未闭(PDA)合并肺部感染和心力衰竭时急诊介入治疗的可行性和安全性。**方法** 总结笔者医院近5年收治PDA患儿162例,其中15例婴儿合并反复的肺部感染和心力衰竭(纽约心功能分为IV级),2例合并右上肺不张,2例需呼吸机持续辅助,所有患者均经内科保守治疗后肺部感染迁延不愈,心力衰竭的症状持续存在,3例在病程中心力衰竭突然加重,其中1例术前因心力衰竭而死亡,14例患者得到了及时的干预。14例患者中男性7例,女性7例,患者年龄3~12个月,平均年龄6.7个月,体重3.5~8.0kg,平均体重5.6kg,3例合并小型室间隔膜部缺损(VSD)(2.5~4.0mm)。术前内科治疗包括持续面罩或头罩吸氧、控制心力衰竭、抗生素应用、雾化吸痰、营养支持、呼吸机辅助等。2例采用经典的PDA介入法进行封堵治疗;12例采用简化的PDA介入法治疗。应用简化的PDA介入法患者术中均需经胸超声的实时监测。术后1、3、6个月、1年回院复查心电图和超声心动图。**结果** 4例PDA形态为管型,9例为漏斗型,直径3~12mm,平均直径为5.4mm;均合并肺动脉高压(肺动脉压力55~110mmHg,平均压力74.5mmHg)。12例获得封堵成功;1例因输送长鞘难于从髂总静脉处送入下腔静脉,遂放弃封堵,转入外科手术结扎;1例因动脉导管粗大,呈管型,直径达12mm,选择22-24型号的封堵器,在释放后出现了封堵器移位,立即行外科取出封堵器并行PDA结扎术。术后滞留ICU时间6~12h,继续住院时间3~7天。随访中仅1例患者降主动脉血流速度增快,最高达2.15m/s,该例患者目前仍在随访中。所有患者未见血管破裂、血栓形成、动静脉瘘等血管并发症。合并小型室间隔膜部缺损3例患者,1例室缺接近闭合,左向右分流较术前明显减少;另2例室缺直径无明显变化。**结论** 婴儿PDA合并肺部感染和心力衰竭行急诊介入治疗安全,可行,并发症少,缩短住院时间,值得推广应用。但对于粗大管型PDA或合并有其他心内畸形时应慎重选择。

关键词 动脉导管未闭 急诊介入封堵 肺炎 心力衰竭

中图分类号 R654 **文献标识码** A **DOI** 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.01.034

Emergency Intervention Occlusion in Infants with Patent Ductus Arteriosus Plus Pneumonia and Heart Failure. Meng Xiangchun, Tan Weiqun, Liu Lin, *et al.* Shenzhen Children Hospital, Guangdong 518038, China

Abstract Objective To study the safety and efficacy of emergency intervention occlusion in infants with patent ductus arteriosus (PDA) associated with pneumonia and heart failure. **Methods** Fifteen infants with PDA plus pneumonia and heart failure were studied. There were 7 male and 7 female patients, aged 3 months to 12 months old, body weight 3.5-8.0kg. Three cases also had small ventricular septal defect (VSD). Pneumonia and heart failure (HF) were diagnosed simultaneously in all the patients when intervention occlusion was implemented. Medications including inhaled oxygen, digitalis, diuretic, antibiotics, aerosolizing and airway suctioning had no effects on pneumonia and HF. Two of them had right pulmonary atelectasis. Another two cases were ventilator dependent. HF deteriorated in three cases, death occurring in one of them. Fourteen cases received percutaneous intervention occlusion. **Results** The PDA assumed a conical shape in 9 cases, a tubular shape in 4 cases. The median value of the narrowest PDA diameter was 5.3mm (ranging from 3 to 12mm). The mean systolic pulmonary artery were 74.5mmHg (55-110mmHg). Immediate successful occlusion of PDA was obtained in 12 cases.