

布地奈德对哮喘气道重塑大鼠骨桥蛋白和 mRNA 表达的影响

王小明 梁亚峰 崇 蕾 张维溪 李昌崇

摘 要 **目的** 探讨布地奈德对气道重塑模型大鼠肺组织骨桥蛋白(OPN)表达的影响及其在哮喘气道重塑中的作用。**方法** 大鼠于第1天和第8天腹腔注射卵清蛋白(OVA)/Al(OH)₃,第15天起雾化吸入OVA激发,隔天1次,制备哮喘气道重塑幼年大鼠模型。布地奈德组在雾化吸入OVA前30 min,给予雾化布地奈德混悬液(2ml:1mg)。正常对照组以生理盐水代替OVA。运用彩色医学图像分析系统测量大鼠支气管壁总面积和平滑肌面积,计算平滑肌厚度(Wam)和支气管壁厚度(Wat),通过反转录-聚合酶链(RT-PCR)测定各组大鼠肺组织中OPN的mRNA,运用免疫组化法测定各组大鼠OPN蛋白的表达,并对Wat、Wam与OPN的蛋白和mRNA表达进行相关性分析。**结果** 哮喘组Wat及Wam显著高于对照组,布地奈德组较哮喘组显著降低(P 均 <0.01)。免疫组化检测结果提示,布地奈德组OPN蛋白的表达高于正常对照组,但显著低于哮喘组,差异具有统计学意义(P 均 <0.01)。RT-PCR检测结果显示,哮喘组OPN mRNA表达均高于正常对照组,布地奈德组较哮喘组显著减弱,差异具有统计学意义(P 均 <0.01)。肺组织中Wat、Wam与OPN的蛋白、mRNA表达均呈正相关。**结论** 布地奈德能显著抑制哮喘大鼠OPN的表达,缓解气道重塑。

关键词 大鼠 哮喘 气道重塑 骨桥蛋白 布地奈德

中图分类号 R72 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.12.008

Effect of Budesonide on the Expression of Osteopontin of Asthma Airway Remodelin Rats. Wang Xiaoming, Liang Yafeng, Chong Lei, et al. Department of Pediatric Pulmonology, The Second Affiliated Hospital & Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 320527, China

Abstract **Objective** To explore the effects of budesonide on osteopontin expression of asthma airway remodelin Rats. **Methods** SD rats were intraperitoneal injection with ovalbumin for a rat asthma airway remodeling model from day15. Budesonide group rats aerosolized budesonide 30 min before exposed to aerosolized ovalbumin. Physiological saline were instead in Normal control group with for sensitization and challenge. Brochial wall thickness(Wat) and brochial smooth muscle thickness(Wam) were measured by image analysis system. The mRNA expressions of OPN of lung homogenate were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). The protein expressions of OPN of lung homogenate were detected by immunohistochemistry(IHC). Besides, correlative analysis between Wam/Wat and the expression of OPN was studied. **Results** Wat and Wam of rats in asthma group was higher than normal control group, while those of budesonide group significant lower than asthma group($P < 0.01$, respectively). OPN expression detected by IHC was significant lower in budesonide group than asthma group, but higher than normal control group($P < 0.01$, respectively). OPN expression detected by RT-PCR in asthma group was significant higher than normal control group, while those of budesonide group were significantly lower than asthma group($P < 0.01$, respectively). There was significantly positive correlation between Wat and the protein/mRNA expression of OPN, also between Wam and the protein/mRNA expression of OPN. **Conclusion** Budesonide decreases the the expression of OPN, involves in airway remodeling in asthma.

Key words Rat; Asthma; Airway Remodelin; Osteopontin; Budesonide

支气管哮喘(简称哮喘)是一种慢性气道炎性疾病,

由多种细胞如肥大细胞、嗜酸性粒细胞、T淋巴细胞、气管平滑肌细胞和众多细胞组分共同参与,也是儿童最常见的慢性呼吸道疾病。近年来,尽管关于哮喘防治的研究不断深入,哮喘发生率仍在全球范围内呈上升趋势,成为亟待攻克的医学难题。气道重塑是哮喘的重要病理特征,是哮喘潜在的治疗靶点^[1]。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30973232,81100015);温州市科技局基金资助项目(Y20140050)

作者单位:325027 温州医科大学附属第二医院、育英儿童医院儿童呼吸科(王小明、崇蕾、张维溪、李昌崇),儿童重症监护室(梁亚峰)

通讯作者:李昌崇,电子信箱:wzlicheh@21cn.com

吸入型糖皮质激素是控制哮喘的最有效药物,布地奈德混悬液是国内最常用的临床药物。目前研究认为,吸入型糖皮质激素在气道炎症、气道重塑的防控方面均有重要作用,但是其对后者的作用机制及靶点尚未完全明确。骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种分泌型磷酸化糖蛋白,在支气管嗜酸性粒细胞、T 淋巴细胞、气道上皮细胞中均有诱导性表达,能发挥多种生物学效应作用,包括促进细胞的趋化、黏附、增殖、迁移作用以及直接或间接地活化多种细胞内信号转导途径,在气道炎症、气道重塑中均起到很重要的作用,解释了哮喘大部分的病理特征^[2~5]。本研究通过观察布地奈德对哮喘大鼠肺组织 OPN 蛋白及 mRNA 表达的影响,探讨布地奈德抑制哮喘大鼠气道重塑的作用及其机制。

材料与方法

1. 动物:大鼠来自上海斯莱克公司,选购标准:体重 100 ~ 120g、雄性、幼年(0 ~ 2 个月),饲养在温州医科大学实验动物中心,SPF 级,共 24 只。实验动物许可证号:SCXK(沪)2008 - 003。

2. 主要试剂及仪器:布地奈德雾化混悬液(美国阿斯利康公司),卵清蛋白(ovalbumin, OVA)(美国 Sigma 公司),免疫组化试剂盒(北京中杉金桥公司),小鼠抗大鼠 OPN 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),引物合成(上海生工公司),RT - PCR 试剂盒(美国 Fermentas 公司),超声雾化器(N038 型 PARI BOY,德国百瑞公司),Leica 图像采集系统及石蜡切片机(德国徕卡公司),奥林巴斯光学显微镜(日本光学公司)。

3. 主要方法:(1)构建哮喘大鼠气道重塑模型的建立及分组处理:将大鼠随机分成 3 组:正常对照组(N 组)、哮喘组(A 组)、布地奈德组(B 组),每组 8 只。参考笔者的实验方法,运用 OVA 溶液致敏及激发,构建哮喘气道重塑大鼠模型^[6,7]。在实验开始的第 1 天、第 8 天,A 组及 B 组大鼠通过腹腔注射 OVA/Al(OH)₃ 混合液[VA 1mg、Al(OH)₃100mg]1.5ml 致敏,N 组以生理盐水替代。激发阶段,A 组及 B 组大鼠从第 15 天起用超声雾化器进行 1% OVA 生理盐水溶液喷雾,隔天 1 次,雾化时大鼠被放置在密闭的透明容器内,每次 30min,激发时间为 4 周。同样,N 组以生理盐水雾化吸入替代 1% OVA 生理盐水溶液。布地奈德组在激发阶段,每次激发前 30min 给予布地奈德混悬液 2ml(布地奈德 1mg)雾化吸入。(2)动物标本的收集:各组大鼠在末次激发后 12h 内,经 10% 水合氯醛麻醉(4ml/kg)腹腔注射麻醉后,即刻打开胸腔,暴露肺组织,观察肺组织大体改变后,切取左肺近肺门中上段和中下段组织,体积约 3mm × 3mm × 3mm,浸入 4% 多聚甲醛固定,送病理科进行石蜡包埋。采用高温(180℃)灭 RNA 酶的剪刀和镊子取右肺组织及左肺剩余肺组织,用去 RNA 酶的 EP 管分装后,迅速置于液氮中保存。(3)气管管壁厚度(Wat)和平滑肌厚度(Wam)测量:每只大鼠挑选 3 ~ 5 支中小支气管,均具有完

整横断面,用彩色医学图像分析软件,200 倍光镜下,测定支气管总面积(Wat1)、管腔面积(Wat2)、支气管基膜周径(Pbm)、平滑肌外缘及内缘内气管面积(Wam1、Wam2),并用 Pbm 标准化,公式:Wat = (Wat1 - Wat2)/Pbm; Wam = (Wam1 - Wam2)/Pbm。(4)免疫组织化学法检测肺组织 OPN 蛋白的表达:检测步骤依次为:石蜡切片,烤箱脱蜡后水化,运用 3% 过氧化氢阻断 10min,高压锅煮沸抗原修复 3 ~ 5min,4℃ 一抗孵育过夜,加 1 滴生物素标记的第 2 抗体(B 液),37℃ 孵化 15min,加 1 滴链霉素抗生物素 - 过氧化物酶液,37℃ 孵化 15min,DAB 显色,显微镜下观察,出现阳性用水充分冲洗,苏木素染色 1min,充分冲洗,0.5% ~ 1.0% 盐酸乙醇分化 30s(显微镜控制,至胞核及核内染色质清晰终止),乙醇脱水,二甲苯 I、II 透明,中性树胶封片。阳性结果:细胞胞质中出现棕黄色,显微镜下观察。(5)RT - PCR 法检测肺组织 OPN mRNA 的表达:取出冻存于 - 80℃ 冰箱中的肺组织,剪取 100mg,提取总 RNA,运用 Trizol 一步法;测定 RNA 浓度,采用紫外分光光度法。运用 PCR 仪进行反转录反应,合成 cDNA,反应条件:42℃,60 min → 70℃,10min。取上游引物、下游引物各 1μl 配置 PCR 反应体系 25μl,在涡流振荡器上混匀,稍离心,按下列条件在 PCR 扩增仪上进行扩增:94℃ 5min,进入循环:94℃ 30s,相应退火温度退火 30s,72℃ 延伸 30s,30 个循环,72℃ 延伸 10min。内参 GAPDH 产物长度 288bp,上游引物:5' - TGCTGAGTACGTGGAGGTCTTCTGAGTGGCAGTGAT - 3',下游引物:5' - TGCTGAGTACGTGGAG - 3'。OPN 产物长度 145bp,上游引物:5' - CCAAGGACCAACTACAACC - 3',下游引物:5' - AGTGGCTACAGCATCTGAGTG - 3'。扩增得到相应目的产物片段,取 2μl 在 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,用 Smart View 凝胶数字成像系统扫描分析。

4. 统计学方法:运用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组样本均数比较采用单因素方差分析,均数间两两比较采用 SNK - q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 布地奈德对 Wat 和 Wam 的变化:相对正常对照组大鼠,哮喘组大鼠 Wat 和 Wam 均显著增高。布地奈德组大鼠 Wat 和 Wam 亦高于正常对照组,但较哮喘组均显著降低(P 均 < 0.01 ,表 1)。

表 1 布地奈德对大鼠肺组织 Wat 和 Wam 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Wat	Wam
正常对照组	30.0 ± 1.1	12.7 ± 0.8
哮喘组	56.7 ± 0.9**	22.3 ± 0.7**
布地奈德组	47.8 ± 1.4**	17.1 ± 1.2**

与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与哮喘组比较,** $P < 0.01$

2. 布地奈德对哮喘气道重塑大鼠 OPN 蛋白表达的影响:OPN 主要表达于支气管黏膜上皮、血管内

皮、支气管黏膜下和血管平滑肌。哮喘组大鼠肺组织 OPN 蛋白的 MOD 值显著高于正常对照组 ($P <$

0.01)。在布地奈德干预后,布地奈德组显著低于哮喘组 (P 均 <0.01 ,图 1,表 2)。

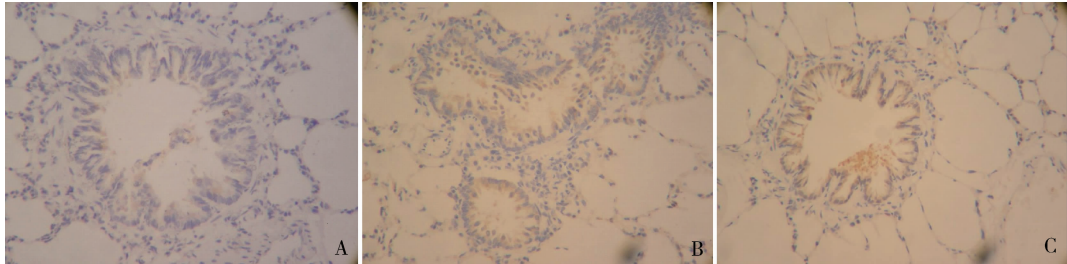


图 1 免疫组化法检测大鼠肺组织 OPN 表达 ($\times 400$)
A. 正常对照组;B. 哮喘组;C. 布地奈德组

表 2 布地奈德对大鼠肺组织中 OPN 蛋白和 OPN mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	OPN	OPN mRNA
正常对照组	0.15 ± 0.02	0.41 ± 0.06
哮喘组	$0.48 \pm 0.08^{**}$	$0.97 \pm 0.16^{**}$
布地奈德组	$0.38 \pm 0.11^{##}$	$0.71 \pm 0.07^{##}$

与正常对照组比较, $^{**} P < 0.01$; 与哮喘组比较, $^{##} P < 0.01$

3. 布地奈德对哮喘气道重塑大鼠 OPN mRNA 表达的影响:哮喘组大鼠 OPN mRNA 的表达显著高于正常对照组,运用布地奈德混悬液雾化吸入干预后,该组大鼠 OPN mRNA 表达较哮喘组显著减弱 (P 均 <0.01 ,图 2,表 2)。

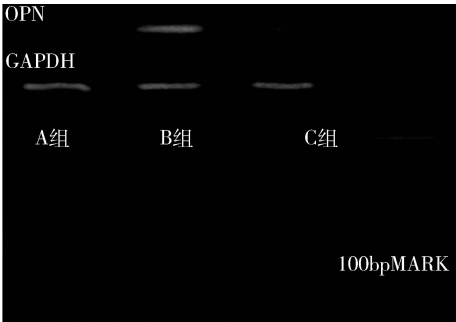


图 2 布地奈德对大鼠肺组织 OPN mRNA 表达的影响

4. Wat、Wam 与 OPN 表达的相关性分析:Wat 与大鼠肺组织 OPN mRNA 表达呈显著正相关 ($r = 0.872, P < 0.01$),与 OPN 蛋白的表达呈显著正相关 ($r = 0.951, P < 0.01$)。Wam 与大鼠肺组织 OPN mRNA 表达呈显著正相关 ($r = 0.862, P < 0.01$),Wam 与 OPN 蛋白的表达呈显著正相关 ($r = 0.944, P < 0.01$)。

讨 论

骨桥蛋白是一种多功能蛋白,经与整合素家族、

CD44 家族等不同的受体结合,发挥多种的生物学效应,在气道炎症、上皮纤维化、细胞外基质沉积、促进新血管形成等方面均有作用。Nagasaka 等^[8]通过体外培养来源于 OPN 基因缺失 (OPN -/-) 胎鼠皮肤的肥大细胞,发现运用 OPN 重组体可以增强 IgE 介导的 OPN -/- 胎鼠肥大细胞的脱颗粒、趋化作用。Simoes 等^[9]通过构建 OPN 基因敲除小鼠哮喘模型,发现 OPN 缺乏可以帮助小鼠拮抗 OVA 诱导的气道高反应,其机制与降低胶原蛋白和黏液分泌、下调 gob - 5 mRNA 表达、抑制黏膜下炎症细胞的浸润、增殖相关。Kohan 等^[10]体外培养来自 OPN -/- 和正常小鼠成纤维细胞,运用三色染色法检测胶原含量,通过成纤维细胞划痕实验,进行其迁移分析,并检测成纤维细胞的增殖情况及 IL - 4、IL - 13、TGF - $\beta 1$ 、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等促纤维因子的表达,发现 OPN -/- 小鼠成纤维细胞的胶原合成、促纤维化因子的表达减少,成纤维细胞的迁移受抑制。Anemitsu 等^[11]将 20 名哮喘患者纳入研究,并随访 20 年,发现 OPN 与其肺功能下降有关。

本实验在显微镜下对 OPN 免疫组化图片观察发现,相对于正常肺组织中的少量表达,哮喘支气管黏膜上皮、支气管黏膜下、气管平滑肌、血管内皮和平滑肌中 OPN 表达明显增多,提示哮喘气道重塑时,OPN 在肺组织的表达明显增加,分布更广。实验中哮喘气道重塑大鼠肺组织的 OPN 蛋白和 OPN mRNA 的表达显著高于正常对照组。综上所述,本试验结果表明,OPN 在哮喘气道重塑的形成中发挥作用,抑制 OPN 的产生或其生物学作用对哮喘防治具有重要意义。

糖皮质激素具有显著抗炎作用,可有效治疗哮喘

气道炎症。吸入性糖皮质激素是目前控制气道炎症的最有效药物,相较于全身激素使用(包括口服或静脉),具有局部药物浓度高、用量少、不良反应小等优点。目前对吸入性糖皮质激素控制气道炎症的作用机制研究已有极大的肯定,并且认为其具有一定防止气道重塑的作用,但其作用机制尚未明确,尤其是后者。Bos 等^[12]研究发现布地奈德可以降低气道的高反应性,防止气道平滑肌层的增厚,阻止黏液腺的肥大,下调收缩蛋白的表达,显著抑制哮喘气道重塑,而对平滑肌刺激的减少可能会使其分泌 TGF- β 1 量下降。Kumar 等^[13]研究表明,地塞米松可以通过抑制嗜酸性粒细胞在上皮内的积累,抑制慢性炎症细胞在气道固有层的积累,下调小鼠上皮 TGF- β 1 的表达,逆转皮下胶原化和上皮肥大。本实验中布地奈德干预后的大鼠肺组织的 OPN 蛋白及 OPN mRNA 的表达均哮喘组较显著降低,其 Wam、Wat 亦较哮喘组显著下降,揭示布地奈德具有拮抗气道重塑的作用,其作用可能与下调哮喘大鼠肺组织 OPN 的表达有关。当然,布地奈德对哮喘气道重塑的抑制作用及机制复杂,还有待于进一步研究。

参考文献

- Zhang WX, Li CC. Airway remodeling: a potential therapeutic target in asthma[J]. World J Pediatr, 2011, 7(2): 124-128
 - Morimoto J, Kon S, Matsui Y, et al. Osteopontin: as a target molecule for the treatment of inflammatory diseases[J]. Curr Drug Targets, 2010, 11(4): 494-505
 - Konno S, Kurokawa M, Uede T, et al. Role of osteopontin, a multifunctional protein, in allergy and asthma[J]. Clin Exp Allergy, 2011, 41(10): 1360-1366
 - Takahashi A, Kurokawa M, Konno S, et al. Osteopontin is involved in mi-
- (上接第 22 页)
- Cui X, Ji D, Fisher DA, et al. Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(1): 64-67
 - Mashimo T, Kaneko T, Sakuma T, Kobayashi J, et al. Efficient gene targeting by TAL effector nucleases conjoined with exonucleases in zygotes[J]. Sci Rep. 2013, 3:1253
 - Zhou J, Wang J, Shen B, et al. Dual sgRNAs facilitate CRISPR/Cas9 mediated mouse genome targeting[J]. FEBS J, 2014, 281(7): 1717-1725
 - Wang H, Huang ZQ, Xia L, et al. Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor[J]. Science, 2001, 293(5531): 853-857
 - Jocely C, Francois MB, Marie CB, et al. Sam68 RNA binding protein is an in vivo substrate for protein arginine N-methyltransferase 1

- gration of eosinophils in asthma[J]. Clin Exp Allergy, 2009(39): 1152-1159
 - Puxeddu I, Berkman N, Ribatti D, et al. Osteopontin is expressed and functional in human eosinophils[J]. Allergy, 2010, 65(2): 168-174
 - Guan XJ, Zhang WX, Li CC, et al. The role of external signal regulated kinase and transforming growth factor β 1 in asthma airway remodeling and regulation of glucocorticoids[J]. Med J China, 2007, 87(25): 1767-1772
 - Zhang WX, Liang YF, Wang XM, et al. Urotensin upregulates transforming growth factor- β 1 expression of asthma airway through ERK-dependent pathway[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 364(1-2): 291-298
 - Nagasaka A, Matsue H, Matsushima H, et al. Osteopontin is produced by mast cells and affects IgE-mediated degranulation and migration of mast cells[J]. Eur J Immunol, 2008, 38(2): 489-499
 - Simoes DC, Xanthou G, Petrochilou K, et al. Osteopontin deficiency protects against airway remodeling and hyperresponsiveness in chronic asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179(10): 894-902
 - Kohan M, Breuer R, Berkman N. Osteopontin induces airway remodeling and lung fibroblast activation in a murine model of asthma[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009, 41(3): 290-296
 - Anemitsu Y, Ito I, Niimi A, Izuhara K, et al. Osteopontin and periostin are associated with a 20-year decline of pulmonary function in patients with asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2014, 190(4): 472-474
 - Bos IS, Gosens R, Zuidhof AB, et al. Inhibition of allergen-induced airway remodelling by tiotropium and budesonide: a comparison[J]. Eur Respir J, 2007, 30(4): 653-661
 - Kumar RK, Herbert C, Thomas PS, et al. Inhibition of inflammation and remodeling by roflumilast and dexamethasone in murine chronic asthma[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 307(1): 349-355
- (收稿日期: 2015-05-12)
(修回日期: 2015-06-11)

- [J]. Mol Biol Cell, 2003, 14: 274-287
 - Francois MB, Ugo D, Jean YM, et al. Arginine methylation of MRE11 by PRMT1 is required for DNA damage checkpoint control[J]. Genes Dev, 2005, 19: 671-676
 - Cyril B, Fabienne G, Valerie R, et al. Interaction of PRMT1 with BIG/TOB proteins in cell signalling: molecular analysis and functional aspects[J]. Genes Cells, 2002, 7: 29-39
 - Simandi Z, Czipa E, Horvath A, et al. PRMT1 and PRMT8 regulate retinoic acid-dependent neuronal differentiation with implications to neuropathology[J]. Stem Cells, 2015, 33: 726-741
 - Balint BL, Gabor P, Nagy L. Genome-wide localization of histone 4 arginine 3 methylation in a differentiation primed myeloid leukemia cell line[J]. Immunobiology, 2005, 210(2-4): 141-52
- (收稿日期: 2015-03-26)
(修回日期: 2015-04-03)