

• 基础医学 •

文章编号: 1002 - 0217(2018) 01 - 0011 - 04

辛伐他汀对哮喘气道重构小鼠肺组织 TGF- β 1 表达的影响

汪向海, 尹成胜, 金艺凤

(皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 呼吸内科, 安徽 芜湖 241001)

【摘要】目的: 探讨辛伐他汀对哮喘气道重构小鼠肺组织转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 表达的影响。**方法:** 采用随机分组的方法, 将 60 只雌性 SPF 级 BALB/C 小鼠分为哮喘组、辛伐他汀组、对照组, 每组 20 只。观察和比较各组小鼠肺组织和气管的病理改变, 同时采用图像分析软件测量各组小鼠肺组织中支气管壁面积 (W_{Ai})、平滑肌层面积 (W_{Am}) 和支气管基底膜周长 (P_{bm}); 使用 Real time PCR 和 Western blot 方法分别检测小鼠肺组织 TGF- β 1 mRNA 和 TGF- β 1 蛋白表达。**结果:** 哮喘组小鼠肺组织病理改变程度最严重, 辛伐他汀组病理改变程度虽高于对照组, 但较哮喘组减轻; 哮喘组小鼠支气管壁厚度及平滑肌层厚度高于辛伐他汀组和对照组; 哮喘组小鼠肺组织 TGF- β 1 mRNA 水平高于辛伐他汀组和对照组, 哮喘组小鼠肺组织 TGF- β 1 蛋白水平高于辛伐他汀组和对照组, 差异均有统计学意义。**结论:** 辛伐他汀可能通过减少肺组织 TGF- β 1 表达而抑制哮喘气道重构。

【关键词】 辛伐他汀; 气道重构; 哮喘; 转化生长因子- β 1

【中图分类号】 R 562. 25 **【文献标志码】** A

【DOI】 10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2018. 01. 004

Effects of simvastatin on TGF- β 1 expression in the lung tissue of asthmatic mice with airway remodeling

WANG Xianghai, YIN Chengsheng, JIN Yifeng

Department of Respiratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

【Abstract】Objective: To observe the effects of simvastatin on transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) expression in the lung tissue of asthmatic mice with airway remodeling. **Methods:** A total of 60 SPF grade female BALB/C mice were randomized into groups of asthma, simvastatin administration, and control ($n = 20$ for each group). Pathological changes of the lung tissues and airways were observed and compared among groups of mice. Image analysis software was used to measure the internal wall area (W_{Ai}), smooth muscle area (W_{Am}) and the perimeter of basement membrane (P_{bm}) in bronchial lung tissues, and real time PCR and Western blot were used to determine the expression levels of TGF- β 1 mRNA and protein in the lung tissues. **Results:** Pathological change was the severest in mice in asthma group. Although mice in the simvastatin administration group had severer pathological change than the controls, yet the change was minor compared to mice in the asthma group. Mice in the asthma group had thicker bronchial wall and smooth muscle layer as well as higher TGF- β 1 mRNA expression and protein level in the lung tissues than those in control group. The difference was statistically significant. **Conclusion:** Simvastatin may inhibit airway remodeling through reducing TGF- β 1 expression in the lung tissues.

【Key words】 simvastatin; airway remodeling; asthma; TGF- β 1

支气管哮喘是常见的慢性呼吸道疾病, 发病机制目前仍未完全清楚。目前研究认为气道重构是哮喘的重要病理基础, 而且气道重构严重的哮喘患者发病率和病死率明显增加。因此控制哮喘患者的气道重构对哮喘的防治具有重要意义。转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 是一种双链蛋白多肽, 其对细胞的生长、分化和免疫功能

都有重要的调节作用, 目前研究认为 TGF- β 1 是哮喘气道重构的重要因子^[1], 可以促进气道内黏液腺体的增生、基底膜的增厚及气道平滑肌的肥大增生^[2-4]。国内外研究发现他汀类药物除具有调脂作用外, 还具有抗炎、抑制血管和气道平滑肌增生等作用, Huang 等^[5] 研究发现他汀类药物可以有效减少哮喘急性发作。我们应用卵白蛋白 (ovalbumin,

基金项目: 皖南医学院中青年科研基金项目 (WK2015F15)

收稿日期: 2017-05-12

作者简介: 汪向海 (1982-), 男, 主治医师, (电话) 13965154483, (电子信箱) wxhwxpcy@163. com。

OVA) 致敏构建哮喘小鼠气道重构模型, 并使用辛伐他汀干预, 观察其对哮喘气道重构的作用, 探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂、实验动物分组及主要仪器 SPF 级 BALB/C 雌性小鼠共 60 只, 鼠龄为 6~8 周, 体质量 18~22 g, 购于扬州大学比较医学中心 [动物许可证号: SCXK(苏) 2012-0004], 饲养于弋矶山医院中心实验室, 将小鼠随机分为 3 组: 哮喘模型组、辛伐他汀组、对照组, 每组 20 只。小鼠饲养 1 周后进行实验。卵蛋白(上海旌雨生科有限公司), 氢氧化铝粉末(上海旌雨生科有限公司), 辛伐他汀(默沙东制药有限公司), RIPA 裂解液(碧云天生科有限公司)、PVDF 膜(美国 sigma 公司), ECL 发光液(美国 Thermo Scientific 公司), Trizol 总 RNA 提取试剂盒(碧云天生科有限公司), PCR 试剂盒(上海旌雨生科有限公司), TGF- β 1 兔多克隆抗体(上海旌雨生科有限公司), BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生科有限公司), 超声雾化器(鱼跃医疗设备有限公司), 病理图像处理分析软件(Tissue Studio), 实时定量 PCR 仪(Applied Biosystems 7500), 凝胶成像分析系统(Gel-Image-System 软件)。

1.2 构建哮喘动物模型 哮喘模型组(以下简称哮喘组): 小鼠分别于第 1、14 天腹腔注射 1 mL 致敏液(OVA 10 μ g + 氢氧化铝凝胶 100 μ g); 从第 21 天开始为激发阶段, 将小鼠置于雾化吸入箱中, 雾化吸入 50 g/L 的 OVA 溶液, 每次 30 min, 每周 3 次, 连续 8 周; 小鼠出现点头运动、搔鼻、烦躁不安、呼吸急促、两便失禁为哮喘发作标志。辛伐他汀组: 除正常致敏激发外, 每次于激发前 30 min 给予辛伐他汀 40 mg/kg 混悬液腹腔注射。对照组: 用生理盐水代替 OVA 致敏和激发, 余操作同哮喘组。

1.3 标本采集 各组小鼠在最后一次激发 24 h 后断颈处死小鼠, 先取右侧肺组织放入冻存管中置于液氮中冻存, 用于 Real time-PCR 及 Western blot 检测。取小鼠左侧肺组织置 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 用于 HE 染色后病理检查。

1.4 小鼠肺组织病理及图像分析鉴定气道重构 多聚甲醛中固定后的肺组织标本经 PBS 冲洗、酒精脱水, 浸蜡包埋后切片, 行 HE 染色后镜下观察各组小鼠肺组织病理形态, Tissue Studio 病理图像处理分析软件测量气道基底膜周径(perimeter of basement membrane, Pbm)、内壁面积(internal wall area, WAI)、平滑肌面积(smooth muscle area, WAm)、支气

管壁厚度及平滑肌层厚度分别以 WAI/Pbm($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) 和 WAm/Pbm($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) 来计算。

1.5 Real time PCR 方法检测小鼠肺组织中 TGF- β 1 mRNA 表达 由上海生工有限公司设计和合成 TGF- β 1 及内参 GAPDH 引物, 序列如表 1。

表 1 引物名称和基因序列

引物名称	基因序列
TGF- β 1-F	5'-TGGCGTTACCTTGTAACC-3'
TGF- β 1-R	5'-GGTGTGAGCCCTTCCAG-3'
GAPDH-F	5'-TGGCCTCCAAGGAGTAAGAAAC-3'
GAPDH-R	5'-GGCCTCTCTCTGCTCTCAGTATC-3'

取冻存的肺组织 80 mg, 总 RNA 提取(步骤按照 Trizol 试剂盒说明书), 逆转录反应合成 cDNA(步骤按照 TaKaRa 逆转录试剂盒说明书)。以合成的 2 μ L cDNA 为模板, 加入上下游引物各 1 μ L, 10 μ L SYBR Green 荧光染料, 6 μ L H₂O, 进行荧光 PCR 扩增, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法来计算目的基因的相对表达量, 目的基因的相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.6 Western blot 方法检测肺组织 TGF- β 1 蛋白表达 将 RIPA 蛋白裂解液加入肺组织中, 置于碎冰上, 将标本放入匀浆机中捣碎, 将制成的组织匀浆放置冰上 30 min, 离心后取上清液, -80 $^{\circ}$ C 保存。用 BCA 法测定蛋白浓度, 按照 4: 1 的比例加入蛋白上样缓冲液, 沸水煮沸使蛋白变性。电泳上样量为 40 μ g, 5% 浓缩胶 80 V, 30 min, 15% 分离胶 120 V, 1 h, 分离后转移至 PVDF 膜上, 转膜完成后, 将 PVDF 膜取出并冲洗, 用 5% 脱牛血清白蛋白室温封闭, 室温摇床上缓慢摇动 2 h; 加入兔抗鼠 TGF- β 1 抗体(1: 200), 4 $^{\circ}$ C 摇床上缓慢摇动过夜; 弃去带有兔抗鼠 TGF- β 1 抗体的分泌液, 将 PVDF 膜置于摇床上用 TBST 洗膜 3 次, 加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1: 2000), 室温摇床上缓慢摇动 2 h, TBST 洗膜 10 min, ECL 显影。以 GAPDH 作为内参, 用 Gel-Image-System 凝胶成像分析系统分析条带的灰度值。

1.7 统计学分析 实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 18.0 统计软件分析, 组间差异性检验采用 F 检验, 组间两两比较采用 LSD 法; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肺组织病理改变(HE 染色) 对照组小鼠的肺泡壁结构完整, 气道上皮无增厚, 无支气管痉挛, 无支气管狭窄, 无炎症细胞浸润(图 1)。哮

喘组小鼠的气道壁明显增厚,可见大量的炎症细胞和黏液分泌,胶原沉积,气道壁增厚,可见支气管狭窄(图2)。与哮喘组相比,辛伐他汀组气道上皮结构较完整,管腔规则,有轻度破坏,炎症细胞明显减少,与对照组相比,支气管周围仍有轻度破坏,少量炎症细胞浸润(图3),可见辛伐他汀组病理改变程度较对照组严重,但较哮喘组减轻。病理图像处理分析软件 Tissue Studio 测量各组小鼠支气管壁厚度及平滑肌层厚度,哮喘组支气管壁厚度及平滑肌层厚度最高,辛伐他汀组较对照组高,但较哮喘组降低,差异均有统计学意义(哮喘组 vs. 对照组 $P = 0.000$,辛伐他汀组 vs. 对照组 $P = 0.000$,哮喘组 vs. 辛伐他汀组 $P = 0.000$),见表2。

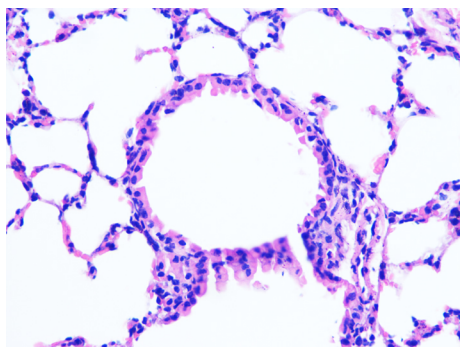


图1 对照组肺组织病理(HE 染色 ×200)

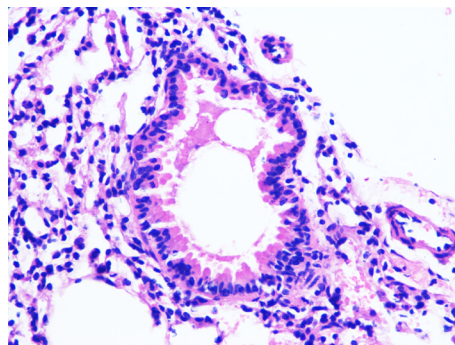


图2 哮喘组肺组织病理(HE 染色 ×200)

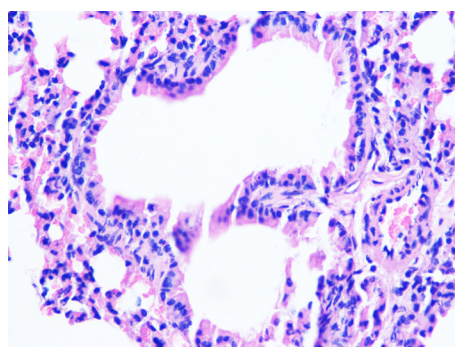


图3 辛伐他汀组肺组织病理(HE 染色 ×200)

表2 各组小鼠气道支气管壁、平滑肌层厚度及肺组织 TGF-β1 mRNA 和蛋白表达($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	WAI/Pbm /($\mu\text{m}^2 / \mu\text{m}$)	WAm/Pbm /($\mu\text{m}^2 / \mu\text{m}$)	TGF-β1 mRNA	TGF-β1 蛋白
对照组	20	25.08 ± 1.41	15.07 ± 1.19	0.94 ± 0.25	0.52 ± 0.07
哮喘组	20	89.25 ± 4.49	43.49 ± 3.55	3.40 ± 0.67	0.89 ± 0.16
辛伐他汀组	20	58.63 ± 2.17	23.95 ± 2.64	1.85 ± 0.38	0.68 ± 0.03
<i>F</i>		2301.43	604.32	141.54	65.80
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000	0.000

2.2 各组小鼠肺组织 TGF-β1 mRNA 表达 哮喘组小鼠肺组织 TGF-β1 mRNA 水平最高,对照组最低,辛伐他汀组高于对照组,但较哮喘组降低,差异均有统计学意义(哮喘组 vs. 对照组 $P = 0.003$,辛伐他汀组 vs. 对照组 $P = 0.023$,哮喘组 vs. 辛伐他汀组 $P = 0.010$)。见表2。

2.3 各组小鼠肺组织 TGF-β1 蛋白表达 哮喘组小鼠肺组织 TGF-β1 蛋白表达水平最高,对照组最低,辛伐他汀组高于对照组,但较哮喘组降低,差异均有统计学意义(哮喘组 vs. 对照组 $P = 0.013$,辛伐他汀组 vs. 对照组 $P = 0.042$,哮喘组 vs. 辛伐他汀组 $P = 0.030$)。见表2、图4。

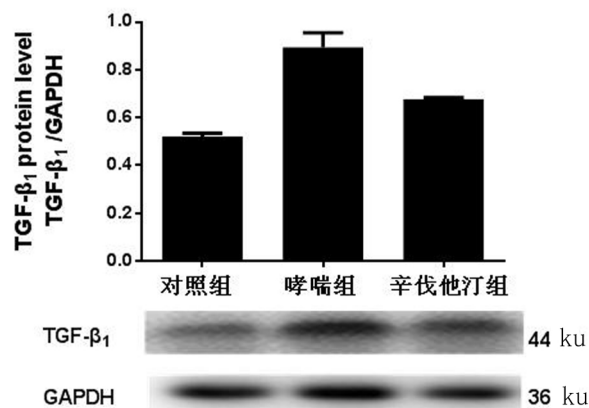


图4 各组小鼠肺组织中 TGF-β1 蛋白表达

3 讨论

气道重构是继呼吸道慢性炎症后研究者们最为关注的支气管哮喘的发病机制^[6],气道重构的主要改变体现在气道壁的增厚、气道壁结构发生改变、气道动力出现滞缓或僵硬^[7-8]。目前研究发现 TGF- β 1 与哮喘疾病的发生、发展密切相关。一方面, TGF- β 1 与炎症应答密切相关,同时具有抗炎作用与促炎症作用^[9-10]。另一方面, TGF- β 1 是体内重要的促纤维化细胞因子,参与纤维化,对细胞的增殖和分化过程起着重要作用,其过度表达与哮喘的气道重构密切相关^[11]。辛伐他汀是他汀类降血脂药物,临床上一直用于控制血液中胆固醇的含量。国外研究证实辛伐他汀可以抑制胶原纤维增生,从转录水平抑制 TGF- β 1,通过降低血液中 TGF- β 1 水平,可用于治疗骨关节炎和糖尿病肾病,但对哮喘气道重塑的影响研究较少。实验证实辛伐他汀还具有减少气道内黏液腺体的分泌,阻止气道上皮杯状细胞增生和肥大,抑制血管和气道平滑肌增生的作用^[12]。

目前有研究显示辛伐他汀可以降低哮喘急性发作患者血清 TGF- β 1 水平,从而发挥抑制气道重塑的作用,但对肺组织中 TGF- β 1 的转录和表达研究较少。本研究中,应用 OVA 致敏小鼠构建小鼠哮喘模型,肺组织病理示气道黏膜破坏,杯状细胞表达增加,可见基底膜增厚,平滑肌细胞增殖,气道壁及平滑肌明显增厚,同时可见明显的炎性细胞浸润;结合图像分析证实哮喘组支气管壁厚度及平滑肌层厚度最高,辛伐他汀组较对照组高,但较哮喘组降低,可见辛伐他汀组病理改变程度较对照组严重,但较哮喘组减轻。本实验还检测各组小鼠肺组织 TGF- β 1 mRNA 及蛋白表达,得出哮喘组 TGF- β 1 mRNA 及蛋白表达最高,对照组 TGF- β 1 mRNA 及蛋白表达最低,辛伐他汀组表达水平高于对照组,但较哮喘组降低,结果证明辛伐他汀通过降低肺组织 TGF- β 1 mRNA 及蛋白表达实现抑制哮喘气道重构作用,其机制有可能是辛伐他汀抑制了 Ras 蛋白活化,从而阻断 Ras-MAPK 信号通路级联激活^[13],最终抑制 TGF- β 1 的转录和表达,下一步我们将进行体外细胞培养,进一步通过抑制实验探究 Ras-MAPK 信号通路与 TGF- β 1 介导的气道重塑的关系。Mckay 等^[14]研究发现腹腔注射和口服不同剂量的辛伐他汀均可降低血清中 TGF- β 1 水平,但腹腔注射效果较口服给药好,且具有剂量依赖性。目前辛伐他汀对肺组织中 TGF- β 1 水平的影响是否有剂量-效应关系,且

是否与给药方式、给药时间有关,仍需进一步研究。

【参考文献】

- [1] TIAN X, ZHANG J, TAN TK, *et al.* Association of β -catenin with PSmad3 but not LEF-1 dissociates in vitro profibro-tic from anti-inflammatory effects of TGF- β 1 [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126: 67 - 76.
- [2] YADAV UC, NAURA AS, AGUILERA-AGUIRRE L, *et al.* Aldose reductase inhibition prevents allergic airway remodeling through PI3K/AKT/GSK3 β pathway in mice [J]. *PLOS One*, 2013, 8(2) : e57442.
- [3] SCHULIGA M, JAVEED A, HARRIS T, *et al.* Transforming growth factor- β -induced differentiation of airway smooth muscle cells is inhibited by fibroblast growth factor-2 [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 48(3) : 346 - 353.
- [4] XIONG YY, WANG JS, WU FH, *et al.* The effects of (\pm) - Praxmaproline on airway inflammation, remodeling and transforming growth factor- β /Smad signaling pathway in a murine model of allergic asthma [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(4) : 392 - 400.
- [5] HUANG CC, CHAN WL, CHEN YC, *et al.* Statin use in patients with asthma: a nationwide population-based study [J]. *Eur J Clin Invest*, 2011, 41: 507 - 512.
- [6] ZHANG WX, LI CC. Airway remodeling: a potential therapeutic target in asthma [J]. *World J Pediatr*, 2011, 7: 124 - 128.
- [7] WARNER SM, KNIGHT DA. Airway modeling and remodeling in the pathogenesis of asthma [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2008, 8(4) : 44 - 48.
- [8] BERGERON C, BOULET LP. Structural changes in airway diseases: characteristics, mechanisms, consequences, and pharmacologic modulation [J]. *Chest*, 2006, 129(4) : 1068 - 1087.
- [9] PRAKASH YS. Airway smooth muscle in airway reactivity and remodeling: what have we learned [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 305(12) : L912 - L933.
- [10] BROWN SD, BAXTER KM, STEPHENSON ST, *et al.* Airway TGF- β 1 and oxidant stress in children with severe asthma: association with airflow limitation [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 129(2) : 388 - 396.
- [11] HALWANI R, AL-MUHSEN S, AL-JAHDALI H, *et al.* Role of transforming growth factor- β in airway remodeling in asthma [J]. *Ame J Respir Cell Molecu Biology*, 2011, 44(2) : 127 - 133.
- [12] TAKEDA N, KONDO M, ITO S, *et al.* Role of RhoA inactivation in reduced cell proliferation of human airway smooth muscle by simvastatin [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 35(6) : 722 - 729.
- [13] SHIBATA Y, KAMATA T, KIMURA M, *et al.* Ras Activation in T cells Determines the Development of Antigen-Induced Airway Hyperresponsiveness and Eosinophilic Inflammation [J]. *The Journal of immunology*, 2002, 169: 2134 - 2140.
- [14] MCKAY, LEUNG BP, MCLNNE IB, *et al.* A Novel Anti-Inflammatory Role of simvastatin in a Murine Model of Allergic Asthma [J]. *J Immunol*, 2004, 172: 2903 - 2908.