

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)10-1047-03

瘦素对大鼠气道平滑肌细胞 TGF- β 1 及 I 型胶原蛋白表达的影响周瑞娟¹, 陶洪臣², 李月球², 裴厚爽², 朱述阳^{1*}, 张森¹, 陈碧¹, 刘文静¹, 张毛为¹¹徐州医学院附属医院呼吸内科, 江苏 徐州 221000; ²大屯煤电(集团)有限责任公司中心医院, 江苏 徐州 221611

[摘要] 目的 观察瘦素对大鼠气道平滑肌细胞(ASMC)转化生长因子- β 1(TGF- β 1)及 I 型胶原蛋白表达的影响。方法 贴壁法体外培养大鼠 ASMC。不同浓度瘦素刺激体外培养的 ASMC, 分为空白对照组、不同浓度(50、100、200) μ g/L 干预组。各组干预 24 h 后 RT-PCR 法检测各组 TGF- β 1 及 I 型胶原蛋白 mRNA 表达。将 ASMC 按 5×10^5 接种于 6 孔板, 经上述不同浓度瘦素干预 48 h 后, 收集细胞上清液。各组干预 48 h 后采用 ELISA 测定各组上清中 TGF- β 1 及 I 型胶原蛋白水平。结果 与对照组相比, 各浓度瘦素处理的 ASMC 中 TGF- β 1 及 I 型胶原蛋白 mRNA 和蛋白的表达增加($P < 0.05$), 并与瘦素浓度呈正相关。结论 瘦素可以增加体外培养的 ASMC 中的 TGF- β 1 和 I 型胶原蛋白的表达。

[关键词] 瘦素; 气道平滑肌细胞; 哮喘; 转化生长因子- β 1; I 型胶原蛋白

[中图分类号] R392.11, R392.33, R446.61, R562.2*5 **[文献标志码]** A

目前认为, 气道重塑是引起重症哮喘和难治性哮喘的病理基础和重要原因之一^[1]。气道平滑肌细胞不仅作为靶细胞发生增生、肥大, 还能以自分泌和旁分泌的方式产生多种生长因子、趋化因子及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)蛋白, 作为效应细胞主动参与哮喘气道重建^[2]。有关瘦素参与哮喘发病的研究多集中于其促进气道高反应性及气道炎症方面。本研究采用体外培养的大鼠气道平滑肌细胞(airway smooth muscle cells, ASMC), 观察瘦素干预后 ASMC 中转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)及 I 型胶原蛋白表达的变化, 进一步探讨瘦素在哮喘气道重塑中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 SD 大鼠 3 只(SPF 级), 雄性, 体质量 150~200 g, 由徐州医学院实验动物中心提供。TGF- β 1 及 I 型胶原蛋白 ELISA 试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司, 总 RNA 提取试剂盒及 RT-PCR 一步法试剂盒购自北京天根生物工程有限公司, β -actin 内参引物序列购自上海生工生物工程有限公司。小鼠抗大鼠 α -肌动蛋白(α -actin)抗体、FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自武汉博士德生物有限公司, Triton X-100、柠檬酸钠均购自北京天根生物工程有限公司; 磷酸盐缓冲液(PBS)、DMEM-F12 细胞培养液及胰酶为 Gibco 公司产品, 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自杭州四季青生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 ASMC 的培养及鉴定 取 2 月龄 SD 大鼠, 迅速无菌分离大鼠的气道平滑肌组织, 采用组织贴块法培养原代

ASMC, 胰酶消化法传代并自然纯化, 实验用 4~6 代。(1)细胞形态学鉴定: 应用倒置相差显微镜观察, 观察细胞的大小、形态及排列方式等。(2)免疫细胞化学鉴定: 取 4~6 代 ASMC, 传代接种至预先放置于 24 孔板内的盖玻片上, 待生长至单层后, 进行 α -actin 免疫荧光细胞化学染色。简述如下: 细胞爬片经 100 mL/L 福尔马林液室温下固定 30 min, PBS 洗涤 3 次, 2 min/次; 1 g/L Triton X-100 (PBS 配制)室温下透化细胞 10 min; 用 100 mL/L 山羊血清封闭 30 min, 小鼠抗大鼠 α -actin 抗体(1:200 稀释)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; PBS 洗涤 3 次, 5 min/次; FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:200 稀释)室温孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次, 5 min/次; 荧光封片剂封片后在荧光显微镜下检测。

1.2.2 细胞干预与分组 培养 ASMC 分为 4 组: 不同浓度瘦素刺激体外培养的 ASMC, 分为空白对照组(50、100、200) μ g/L 瘦素干预组。干预 24 h 后分别提取总 RNA, 放置 -20 $^{\circ}$ C 保存; 此外将气道平滑肌细胞按 5×10^5 接种于 6 孔板(每组设 4 个复孔), 经上述不同浓度瘦素干预 48 h 后, 收集细胞上清液放置液氮罐中低温保存备用。

1.2.3 RT-PCR 法检测 TGF- β 1 及 I 型胶原蛋白 mRNA 的表达 ASMC 干预分组后收集细胞, 提取总 RNA 并合成 cDNA, PCR 扩增。TGF- β 1 引物序列上游引物 5'-GCTAATGGTGGACCGCAAC-3', 下游引物 5'-GCAGTGAGCACTGAACCGA-3', 此对引物扩增出片段大小为 340 bp, I 型胶原蛋白引物序列上游引物 5'-CCTGGAAGAGATGGTGCT-3', 下游引物 5'-CCATCTCTGCCAGCAGGAC-3', 此对引物扩增出片段大小为 122 bp; 以 β -actin 为内参照, 上游引物: 5'-GAGACCTCAACACCCCAGC-3', 下游引物: 5'-CACAGACTACTTGGCCTCAG-3', 此引物扩增出 654 bp 片段。反应条件: TGF- β 1: 50 $^{\circ}$ C 30 min, 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 30 s,

收稿日期: 2013-04-12; 接受日期: 2013-05-10

作者简介: 周瑞娟(1986-), 女, 山东沾化人, 硕士研究生

Tel: 18795421881; E-mail: zrxj1008@126.com

*Corresponding author, 朱述阳, E-mail: jiechenz356@sohu.com

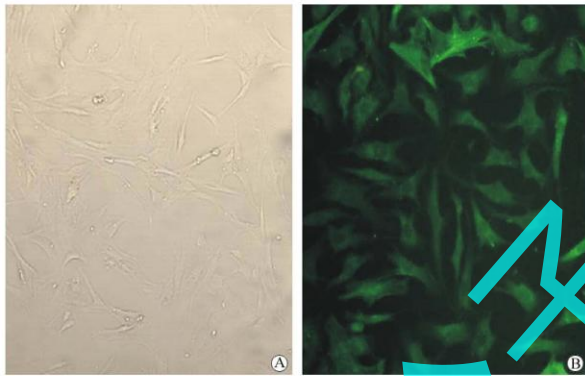
65℃延伸30 s,共35个循环,最后65℃延伸10 min。I型胶原蛋白:55℃退火30 s,其余条件同上。PCR产物用15 g/L的琼脂糖电泳,紫外灯下拍照,与 β -actin吸光度的比值进行半定量分析。

1.2.4 ELISA检测各组ASMC培养上清中TGF- β 1及I型胶原蛋白的表达 收集各组细胞上清液,按ELISA试剂盒说明书操作步骤处理。酶联免疫检测仪490 nm处测定各孔吸光度(A)值。其余条件同上。

1.2.5 统计学分析 采用SPSS13.0统计软件包。实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析检验其差异性,各两组间差异比较用 q 检验完成,相关性采用Pearson相关分析。

2 结果

2.1 ASMC的鉴定 倒置显微镜下,培养的ASMC呈梭形,平行生长,束状排列,密集与稀疏处相互交错呈“峰谷”状(图1A)。免疫荧光细胞化学染色显示,培养细胞为平滑肌 α -actin阳性,胞质内可见强绿色荧光(图1B)。



A: 相差显微镜($\times 100$); B: 荧光显微镜(免疫荧光细胞化学, $\times 400$)。

图1 ASMC的鉴定

2.2 ELISA测定各组ASMC上清液中TGF- β 1及I型胶原蛋白表达的变化 上清液中TGF- β 1及I型胶原蛋白浓度检测结果表明(表1),(50、100、200) μ g/L瘦素干预组较空白对照组明显升高,且与瘦素浓度呈正相关($r_1=0.955$, $r_2=0.916$, $P<0.05$)。

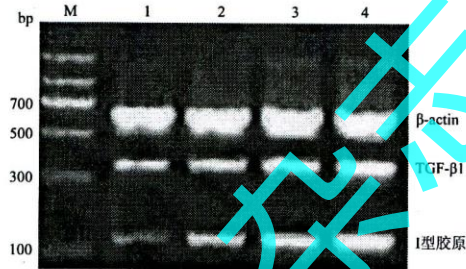
表1 各组ASMC上清液中TGF- β 1及I型胶原蛋白浓度的比较 ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

瘦素浓度(μ g/L)	TGF- β 1(pg/mL)	I型胶原蛋白(ng/mL)
0	15.999 \pm 1.347	0.524 \pm 0.149
50	22.983 \pm 1.010*	0.889 \pm 0.084*
100	28.708 \pm 3.241**	1.219 \pm 0.126**
200	43.749 \pm 2.384***	1.799 \pm 0.374***

* $P<0.05$ vs 0 μ g/L; ** $P<0.05$ vs 50 μ g/L; *** $P<0.05$ vs 100 μ g/L。

2.3 RT-PCR法检测ASMC内TGF- β 1及I型胶

原蛋白mRNA的表达 ASMC内TGF- β 1及I型胶原蛋白mRNA表达水平,在用(50、100、200) μ g/L瘦素处理的细胞比未用瘦素处理的细胞明显增加($P<0.05$);且与瘦素水平呈线性正相关关系(图2和表2, $r_1=0.974$, $r_2=0.982$, $P<0.05$)。



M: DNA marker; 1: 0 μ g/L瘦素组; 2: 50 μ g/L瘦素组; 3: 100 μ g/L瘦素组; 4: 200 μ g/L瘦素组。

图2 逆转录PCR检测各组ASMC中TGF- β 1及I型胶原蛋白mRNA表达

表2 ASMC中TGF- β 1及I型胶原蛋白mRNA相对表达量 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

瘦素浓度(μ g/L)	TGF- β 1 mRNA	I型胶原蛋白mRNA
0	0.471 \pm 0.046	0.531 \pm 0.018
50	0.736 \pm 0.070*	0.654 \pm 0.008*
100	0.944 \pm 0.006**	0.791 \pm 0.025**
200	1.217 \pm 0.018***	0.993 \pm 0.018***

* $P<0.05$ vs 0 μ g/L; ** $P<0.05$ vs 50 μ g/L; *** $P<0.05$ vs 100 μ g/L。

3 讨论

气道重塑是引起重症哮喘和难治性哮喘的病理基础和重要原因之一^[1]。气道重塑主要表现为上皮细胞黏液性化生、气道平滑肌细胞的增生和肥大、基底膜增厚及上皮下纤维化、血管形成的增加、细胞外基质的沉积等^[3]。研究表明,肥胖不仅使哮喘发病率增加,还导致哮喘的严重程度增加、治疗难度增大^[4]。肥胖相关哮喘的发病与脂肪组织释放的多种细胞因子和炎症介质密切相关^[5]。其中瘦素是脂肪组织中表达的促炎分子的中心成员,在哮喘发病中具有重要的作用。瘦素又称ob蛋白,是ob基因(位于人染色体7q32)编码的一种由167个氨基酸组成的分泌性蛋白质,具有促炎和免疫调控作用。瘦素受体在小鼠和人的气道上皮细胞及平滑肌细胞上广泛表达^[6]。瘦素受体在ASMC中表达的增加可能与肥胖哮喘发病及激素抵抗相关^[7]。

瘦素能促进大鼠气道平滑肌细胞增殖,并呈浓度依赖性和时间依赖性^[8],其促进气道平滑肌细胞增殖的作用与激活p-ERK和PI3K有关^[8]。有关瘦

素参与哮喘发病的研究多集中于其促进气道高反应及气道炎症方面。

本研究结果显示瘦素刺激体外培养气道平滑肌细胞 TGF- β 1 及 I 型胶原蛋白及 mRNA 的表达,其表达量也与瘦素浓度呈正相关。TGF- β 1 是参与哮喘气道重构的关键性细胞因子之一,研究发现 TGF β -1 mRNA 的表达水平与哮喘的严重性程度及气道阻塞程度成正相关^[9],其能直接促进成胶原蛋白的合成等^[10]。慢性房颤患者心房肌中 TGF- β 1 mRNA 和蛋白水平显著升高,在心房纤维化过程中发挥重要的作用^[11]。Rebecca L 等^[12]也发现 TGF- β 1 能够诱导体外培养膀胱平滑肌细胞表型转化从而促进可溶性胶原蛋白的形成。给予外源性瘦素可以通过与瘦素受体结合^[13]、激活 PI3K/Akt 信号转导途径抑制大鼠气道平滑肌细胞凋亡^[14]。本研究结果显示,瘦素干预后 TGF- β 1 mRNA 及其蛋白表达水平显著升高,提示能够瘦素能够通过上调 TGF- β 1 的表达促进气道重塑。

细胞外基质蛋白在气道的过度沉积是引起气道重塑的关键因素。哮喘的气道上皮下纤维化和网状基底膜增厚,是由于 I、II、III 型胶原和纤连蛋白等沉积增加所引起的,其中 I 型胶原是哮喘网状基底膜增厚的主要沉着物。Schram 等^[15]研究发现,瘦素可以通过激活 p38-MAPK 通路促进心肌细胞胶原蛋白基因转录及其蛋白合成,参与心肌细胞外基质重塑。本研究发现瘦素干预后 I 型胶原 mRNA 及其蛋白表达水平显著升高,提示瘦素促进气道平滑肌细胞合成细胞外基质蛋白,参与上皮下纤维化形成。

气道平滑肌细胞还能以自分泌和旁分泌的方式产生多种生长因子、趋化因子及细胞外基质蛋白,作为效应细胞主动参与哮喘气道重建^[2]。本实验证明瘦素可以增加体外培养的 ASMC 中的 TGF- β 1 和 I 型胶原蛋白的表达。

参考文献:

[1] James A. Remodelling of airway smooth muscle in asthma: what sort do you have[J]. Clin Exp Allergy, 2005, 35(6): 703-707.

- [2] Damera G, Tliba O, Panettieri RA Jr. Airway smooth muscle as an immunomodulatory cell[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2009, 22(5): 353-359.
- [3] Warner SM, Knight DA. Airway modeling and remodeling in the pathogenesis of asthma[J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2008, 8(1): 44-48.
- [4] Taylor B, Mannino D, Brown C, et al. Body mass index and asthma severity in the national asthma survey[J]. Thorax, 2008, 63(1): 14-20.
- [5] Malli F, Papaioannou AI, Gourgoulialis KI, et al. The role of leptin in the respiratory system: an overview[J]. Respir Res, 2010, 11: 152.
- [6] Bruno A, Pace E, Chanez P, et al. Leptin and leptin receptor expression in asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2009, 124(2): 230-237.
- [7] 王莉君,郝璐,李慧婷,等.瘦素受体、IRF-1 和糖皮质激素受体- β 在肥胖哮喘大鼠气道平滑肌细胞中的表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(10): 1037-1040.
- [8] 何淑敏,朱述阳,李慧婷,等.瘦素对大鼠气道平滑肌细胞增殖的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 27(8): 849-855.
- [9] Panek M, Pietras T, Szamraj J, et al. Identification and association of TGF β -1 expression in patients with asthma in a Polish population-Lodz metropolitan area study[J]. Int J Biochem Mol Biol, 2013, 4(1): 67-74.
- [10] Halwani R, Al-Muhsen S, Hamid Q. Airway remodeling in asthma[J]. Curr Opin Pharmacol, 2010, 10(3): 236-245.
- [11] Li Y, Jian Z, Yang ZY, et al. Increased expression of connective tissue growth factor and transforming growth factor-Beta-1 in atrial myocardium of patients with chronic atrial fibrillation[J]. Cardiology, 2013, 124(4): 233-240.
- [12] Heise RL, Parekh A, Joyce EM, et al. Strain history and TGF- β 1 induce urinary bladder wall smooth muscle remodeling and elastogenesis[J]. Biomech Model Mechanobiol, 2012, 11(1-2): 131-145.
- [13] Nair P, Radford K, Fanat A, et al. The effects of leptin on airway smooth muscle responses[J]. Am J Respir Cell Mol, 2008, 39(4): 475-481.
- [14] 刘文静,朱述阳,陈玉玲,等.瘦素通过 PI3K/Akt 通路对大鼠气道平滑肌细胞凋亡的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2012, 12(35): 915-918.
- [15] Schram K, De Girolamo S, Madani S, et al. Leptin regulates MMP-2, TIMP-1 and collagen synthesis via p38 MAPK in HL-1 murine cardiomyocytes[J]. Cell Mol Biol Lett, 2010, 15(4): 551-563.