

• 基础论著 •

烟雾暴露大鼠气道胰岛素样生长因子1及骨桥蛋白的表达变化

宋妤 胡晓芸 施熠炜 李爱民 马爱玲 鲁彩花

【摘要】 目的 观察烟雾暴露与戒烟大鼠气道胰岛素样生长因子1(IGF-1)与骨桥蛋白(OPN)的表达变化,探讨烟雾暴露大鼠气道损伤的机制。方法 将雄性SD大鼠40只随机分为5组:对照组(C组)、烟雾暴露1个月组(S1组)、烟雾暴露1个月及戒烟1个月组(Q1组)、烟雾暴露3个月组(S2组),烟雾暴露3个月及戒烟1个月组(Q2组),HE染色观察肺组织病理学改变;免疫组化染色检测IGF-1及OPN蛋白在气道的表达;RT-PCR检测肺组织IGF-1及OPN mRNA的表达。结果 与C组比较,S1、S2组支气管上皮细胞IGF-1、OPN蛋白及mRNA表达均增强($P<0.05$),Q1、Q2组支气管上皮细胞的IGF-1、OPN蛋白及mRNA表达低于各吸烟组($P<0.05$),支气管IGF-1蛋白与OPN蛋白呈正相关($r=0.558, P<0.05$)。结论 IGF-1、OPN参与烟雾暴露大鼠的气道重塑,早期戒烟有助于逆转气道重塑。

【关键词】 烟雾吸入损伤; 戒烟; 胰岛素样生长因子1; 骨桥蛋白; 气道重塑

Expression of insulin-like growth factor 1 and osteopontin in rats airway of smoke exposure Song Yu, Hu Xiaoyun, Shi Yiwei, Li Aimin, Ma Ailing, Lu Caihua. Department of Respiratory Medicine, the First Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China
Corresponding author: Hu Xiaoyun, Email: huxiaoyunly@sina.com

【Abstract】 Objective To observe the expression changes of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and osteopontin (OPN) in rats airway of smoke exposure and smoke cessation, explore the mechanism of smoke exposure rats with airway damage. **Methods** Forty male SD rats were randomly divided into five groups: control group(C group), smoke exposure 1 month group(S1 group), smoke exposure 1 month and smoke cessation 1 month group(Q1 group), smoke exposure 3 months group(S2 group), smoke exposure 3 months and smoke cessation 1 month group(Q2 group).The lung tissue airway remodeling were observed using HE staining. The expression of IGF-1 and OPN protein in bronchial of each group was evaluated by immunohistochemistry. The expression of IGF-1 and OPN mRNA in bronchial of each group was detected by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. **Results** S1, S2 groups of IGF-1, OPN protein and mRNA which were expressed in bronchial epithelial cells were significantly higher than C group ($P<0.05$). Q1, Q2 groups were lower than the smoke exposure($P<0.05$). In bronchial, IGF-1 protein was positively related with OPN protein($r=0.558, P<0.05$). **Conclusion** IGF-1 and OPN participate in airway remodeling with smoke exposure of rats. Early to give up smoking helps to reverse the airway remodeling.

【Key words】 Smoke inhalation injury; Smoking cessation; Insulin-like growth factor I; Osteopontin; Airway remodeling

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.12.025

基金项目: 国家“十二五”科技支撑课题《国家肺栓塞防治网络建设与临床诊治关键技术的研究》(2011BA11B17); 山西省自然科学基金(2013011055-4)

作者单位: 030001 太原, 山西医科大学第一临床医学院呼吸科

通讯作者: 胡晓芸, Email: huxiaoyunly@sina.com

慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 是气道、肺血管、肺实质乃至全身的慢性炎症, 以不完全可逆性气流受限为特征, 多与肺组织对有毒颗粒和气体的异常炎症反应有关。研究表明, 吸烟是其主要的致病因素^[1]。胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 通过促进气道上皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞增生及分化, 并增加胶原沉积和细胞外基质成分的产生而参与气道重塑^[2]。骨桥蛋白 (OPN) 是一个与炎症过程有关的潜在促炎症细胞因子^[3], 在哮喘气道重塑的发生发展中起关键作用^[4]。虽然多项研究提示 IGF-1 及 OPN 在气道损伤中发挥作用, 但在烟雾暴露与戒烟大鼠模型中 IGF-1 及 OPN 对支气管的作用研究尚少。本实验通过制备大鼠被动吸烟模型, 观察不同烟雾暴露条件大鼠气道 IGF-1 与 OPN 的表达变化, 研究烟雾暴露气道损伤的发生机制。

材料和方法

一、实验材料

猴王牌香烟, 焦油量 12 mg/支, 烟碱量 1.0 mg/支, 一氧化碳量 15 mg/支。兔抗大鼠 IGF-1、OPN 单克隆抗体、SABC 免疫组化试剂盒、DAB 显色剂均购自武汉博士德生物工程有限公司。IGF-1、OPN、 β -actin 引物由 Primer3 软件设计, 由上海生工生物科技有限公司合成; Trizol 试剂盒购自上海生工生物科技有限公司; 反转录试剂盒购自 Fermentas 公司; 荧光定量 PCR 试剂盒购自 Roche 公司。

二、实验方法

1. 动物分组和模型制备: 选体重 (200±30) g 的 8 周龄健康雄性 SD 大鼠 40 只 (山西医科大学动物实验中心提供), 按随机数字表法分为对照组 (C 组)、烟雾暴露 1 个月组 (S1 组)、烟雾暴露 1 个月戒烟 1 个月组 (Q1 组)、烟雾暴露 3 个月组 (S2 组)、烟雾暴露 3 个月戒烟 1 个月组 (Q2 组), 每组 8 只。参照许三林法^[5]自制大鼠实验性烟雾暴露装置。除

烟雾暴露干预外, 各组动物饲养条件相同, 即普通饲料喂养, 自由饮水和摄食, 室温 20~25 °C, 湿度 40%~70%, 12 h 交替采光。熏烟时舱内氧浓度保持在 21%。大鼠每周熏烟 6 d, 每天上下午各 1 次, 每次 15 支, 每支香烟点燃 15 min 后换烟。C 组大鼠不吸烟, 常氧下相同条件饲养, 戒烟后大鼠饲养条件与 C 组相同。

2. 肺组织标本制备: 各组大鼠于实验终点以 25% 的乌拉坦 (4 ml/100 g) 腹腔注射麻醉, 仰卧位固定于解剖台, 钝性分离皮下组织及肌层, 暴露胸腔, 完整取下肺组织, 右肺置于 4% 多聚甲醛固定 24 h, 常规石蜡包埋, 用于 HE 染色及免疫组化染色。左肺用生理盐水冲洗后, 放入冻存管后置于 -80 °C 冰箱保存, 用于 RT-PCR 测定。

3. 支气管 IGF-1、OPN 蛋白免疫组织化学染色: 支气管 IGF-1、OPN 蛋白检测采用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物 (SABC) 法, DAB 显色。一抗为兔抗鼠 IGF-1、OPN 多克隆抗体; 二抗为生物素化山羊抗兔 IgG 抗体。阳性结果为支气管上皮细胞胞浆出现棕黄色颗粒。采用 Aperio 数字病理切片扫描仪, 在 200 倍光镜下扫描切片, 每张切片随机选取结构完整、直径 100~200 μ m 的支气管 3 支, 检测支气管上皮细胞的平均光密度 (IOD), 取平均值代表该切片 IGF-1、OPN 蛋白表达的相对含量。

4. RT-PCR 检测肺组织 IGF-1 及 OPN mRNA 表达: 取肺组织 50 mg, 加入 1 ml Trizol, 按说明书提取总 RNA, 取 2 μ g RNA 按说明书反转录为 cDNA, 取 1 μ g 做 PCR 扩增。反应条件为: 94 °C 预变性 10 min, 活化 Tag 酶; 94 °C 15 s, 60 °C 60 s, 共反应 45 个循环。ABI Prism 7300 SDS 软件记录数据并分析, 将目的基因的 Ct 值用 β -actin 的 Ct 值进行标准化, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因表达的相对倍数变化。大鼠 IGF-1 和 OPN 基因引物序列见表 1。

表 1 大鼠 IGF-1 和 OPN 基因引物序列表

基因	基因引物序列	长度(bp)
IGF-1	上游引物 5'- CCGCTGAAGCTACAAAGTC-3'	170
	下游引物 5'- GGGAGGCTCCTCTACTATC-3'	
OPN	上游引物 5'- CATAGCCTCAGCATCCTTGG-3'	165
	下游引物 5'- TGTAATGCGCCTTCTCCTCT-3'	
β -actin	上游引物 5'- GTCAGGTCATCACTATCGGCAAT-3'	147
	下游引物 5'- AGAGGTCTTTACGGATGTCAACGT-3'	

表2 各组大鼠支气管 IGF-1 和 OPN 蛋白与 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	IGF-1		OPN	
	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA
C 组	0.012±0.005 ^{bcd}	0.452 6±0.038 8 ^{bcd}	0.018±0.002 ^{bcd}	0.619 3±0.062 8 ^{bcd}
S1 组	0.076±0.001 ^{acde}	1.037 3±0.128 6 ^{acde}	0.086±0.010 ^{acde}	3.187 5±0.116 8 ^{acde}
Q1 组	0.046±0.017 ^{abde}	0.839 6±0.473 9 ^{abde}	0.039±0.008 ^{abde}	2.762 7±0.070 3 ^{abde}
S2 组	0.200±0.013 ^{abce}	1.548 5±0.174 8 ^{abce}	0.070±0.013 ^{abce}	2.134 0±0.090 4 ^{abce}
Q2 组	0.060±0.015 ^{abcd}	1.327 5±0.085 8 ^{abcd}	0.056±0.018 ^{abcd}	1.615 5±0.067 4 ^{abcd}
F 值	386.616	52.697	41.329	472.519
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: IGF-1: 胰岛素样生长因子 1; OPN: 骨桥蛋白。C 组: 对照组, S1 组: 烟雾暴露 1 个月组, Q1 组: 烟雾暴露 1 个月戒烟 1 个月组, S2 组: 烟雾暴露 3 个月组, Q2 组: 烟雾暴露 3 个月戒烟 1 个月组。与 C 组比较, ^a $P<0.05$; 与 S1 组比较, ^b $P<0.05$; 与 Q1 组比较, ^c $P<0.05$; 与 S2 组比较, ^d $P<0.05$; 与 Q2 组比较, ^e $P<0.05$

三、统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件包进行统计学分析。所有数据均以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间差异显著性检验采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组间两两比较采用 LSD 检验, 相关分析采用 Pearson 法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、肺组织病理改变

C 组大鼠肺血管管壁光滑; 肺泡结构完整连续, 支气管黏膜完整, 周围无炎细胞浸润。S1 和 S2 组大鼠肺血管平滑肌层增厚, 管腔狭窄; 肺泡大小不等, 肺泡壁变薄, 有不同程度的断裂, 部分融合为肺大疱; 纤毛脱落、倒状, 支气管黏膜上皮脱落、坏死, 周围有大量中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞浸润, 以 S2 组为著。Q1、Q2 组大鼠肺血管平滑肌层增厚程度、肺泡结构紊乱程度、支气管黏膜上皮脱落程度、炎性细胞浸润程度均较烟雾暴露组减轻, 以 Q1 组减轻为著。各组大鼠肺组织病理改变见图 1。

二、IGF-1 及 OPN 蛋白在大鼠支气管表达

IGF-1 及 OPN 蛋白在支气管上皮细胞胞浆阳性表达为棕黄色。吸烟组呈棕黄色, 戒烟组呈浅黄色。二者在支气管的表达见图 2, 3, 表达量及比较见表 2。Q1、Q2 组支气管上皮细胞的 IGF-1、OPN 蛋白表达低于各吸烟组 ($P<0.05$)。

三、各组大鼠肺组织匀浆 IGF-1 及 OPN mRNA 表达

S1、S2 组 IGF-1、OPN mRNA 表达均高于 C 组, IGF-1 以 S2 组为著, OPN 以 S1 组为著。戒烟组 mRNA 表达较烟雾暴露组减少。各组肺组织 IGF-1 及 OPN mRNA 表达及比较见表 2。Q1、Q2

组支气管上皮细胞的 IGF-1、OPN mRNA 表达低于各吸烟组 ($P<0.05$)。各组大鼠 IGF-1、OPN 基因扩增曲线见图 4, 5。

四、相关性分析

在支气管中, IGF-1 蛋白与 mRNA 呈正相关 ($r=0.581$, $P<0.05$), OPN 蛋白与 mRNA 呈正相关 ($r=0.512$, $P<0.05$), 支气管 IGF-1 蛋白与 OPN 蛋白呈正相关 ($r=0.558$, $P<0.05$)。

讨 论

COPD 的发病机制学说有: 慢性炎症、氧化剂/抗氧化剂失衡、蛋白酶/抗蛋白酶失衡、自主神经功能紊乱等。目前吸烟是公认的导致 COPD 的主要原因。香烟烟雾中的多种化学物质激活气道和肺泡上皮细胞的氧化应激信号, 诱导转录因子上调促炎细胞因子和趋化因子, 进而激活炎细胞脱颗粒, 释放中性弹力酶和炎症因子参与气道重塑, 最后导致肺气肿、COPD 的发生^[6-7]。研究表明, 中性粒细胞的数量与气道损伤及气道受限的程度呈正相关^[8], 本研究提示, 烟雾暴露可导致大鼠肺泡结构紊乱程度、支气管上皮损伤程度、炎细胞浸润, 且以 S2 组为著, 表明烟雾暴露可引起大鼠气道重塑, 与文献报道的结果一致。此外, 本实验发现戒烟后肺组织损伤有所减轻, 但 Q1 较 Q2 组缓解明显, 其原因可能是长期烟雾暴露肺组织结构发生进行性破坏, 即使戒烟组织修复作用也非常有限, 但具体机制需进一步研究。

IGF-1 作为一种促有丝分裂原, 不仅促进细胞增殖分化, 还参与组织的发育及损伤后的修复。高晓玲等^[9]用脂多糖 (LPS) 和木瓜蛋白酶的方法制备 COPD 时发现, 实验组大鼠 IGF-1 含量明显高于对照组。本实验表明, 烟雾暴露组大鼠支气管上皮

细胞 IGF-1 蛋白及 mRNA 表达多于对照组, 并呈时间依赖性的增加, 戒烟后 IGF-1 蛋白及 mRNA 表达减少, 提示烟雾暴露通过上调支气管上皮细胞 IGF-1 蛋白的表达而参与气道重塑。其发生机制可能是烟雾暴露条件下, 支气管上皮产生的 IGF-1 可促进气道上皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞增殖迁移, 以及 IGF-1 通过依赖 Rho 激酶诱导支气管平滑肌持久性收缩^[10]。文献报道: 低氧诱导产生的

IGF-1 不仅促进细胞增殖, 又抑制其凋亡, 其可能机制是 IGF-1 与 IGF-1R 结合后激活信号转导通路, 导致转录因子 CREB 活化、抗凋亡蛋白 bcl-2 表达增加, 继而抑制凋亡^[11]。本实验 IGF-1 是否通过上调 bcl-2 而参与气道重塑还需进一步研究。

OPN 作为一种促炎症细胞因子, 通过与细胞表面的整合素或 CD44 受体相结合刺激细胞黏附、增加细胞外间质信号转导而参与多种肺部疾病的发

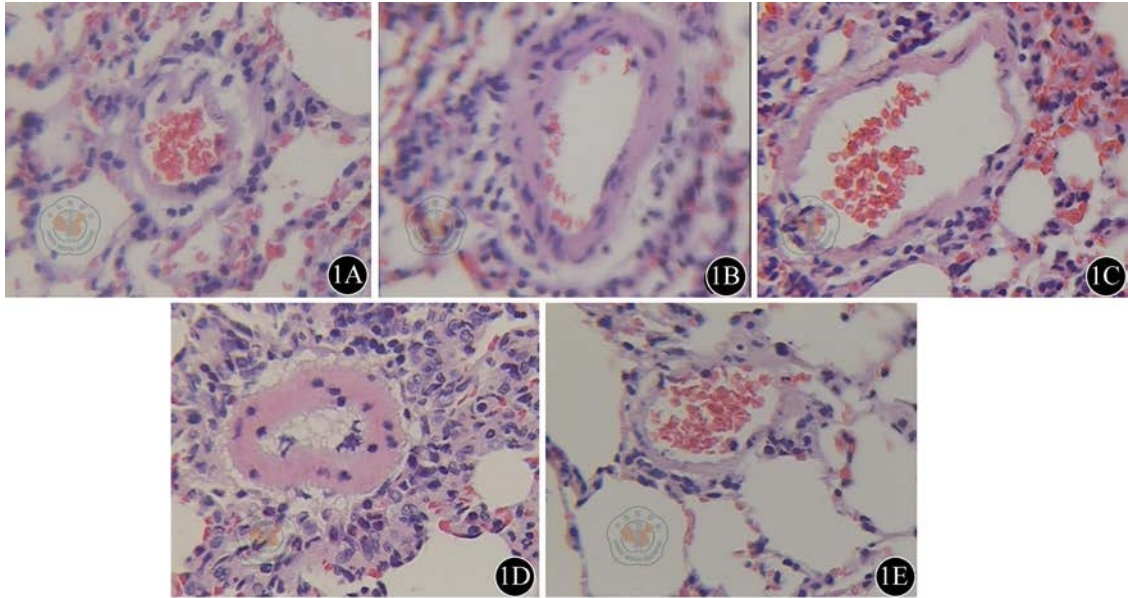


图1 各组大鼠肺组织形态学改变 (HE ×250) ; 1A: 对照组; 1B: 烟雾暴露1个月组 (S1组) ; 1C: 烟雾暴露1个月戒烟1个月组 (Q1组) ; 1D: 烟雾暴露3个月组 (S2组) ; 1E: 烟雾暴露3个月戒烟1个月组 (Q2组)

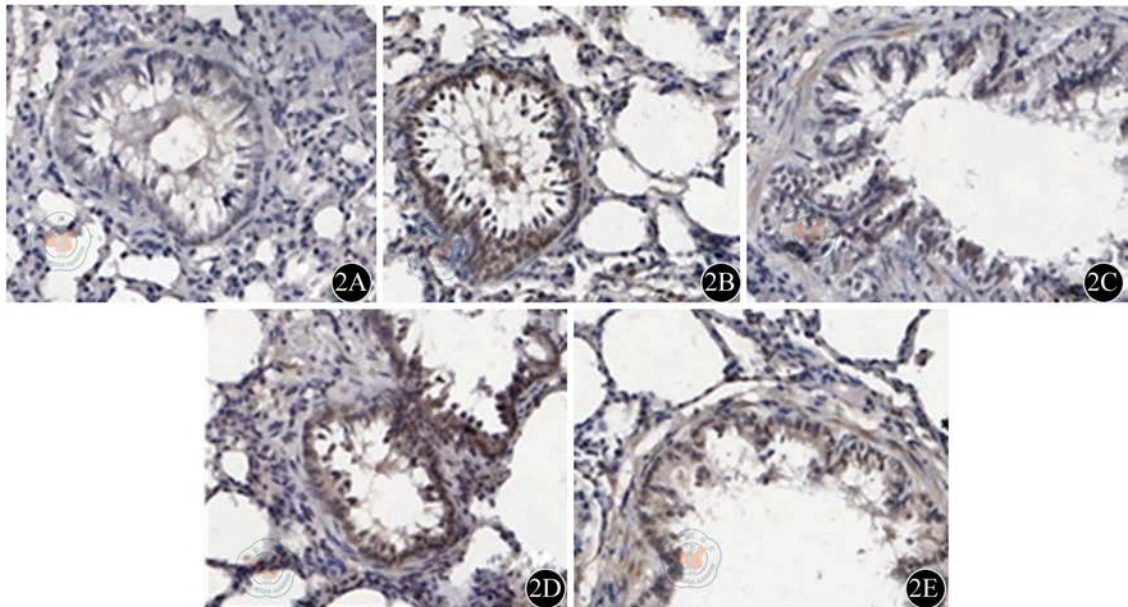


图2 各组大鼠支气管IGF-1表达 (免疫组化 ×200) ; 2A: 对照组; 2B: 烟雾暴露1个月组 (S1组) ; 2C: 烟雾暴露1个月戒烟1个月组 (Q1组) ; 2D: 烟雾暴露3个月组 (S2组) ; 2E: 烟雾暴露3个月戒烟1个月组 (Q2组)

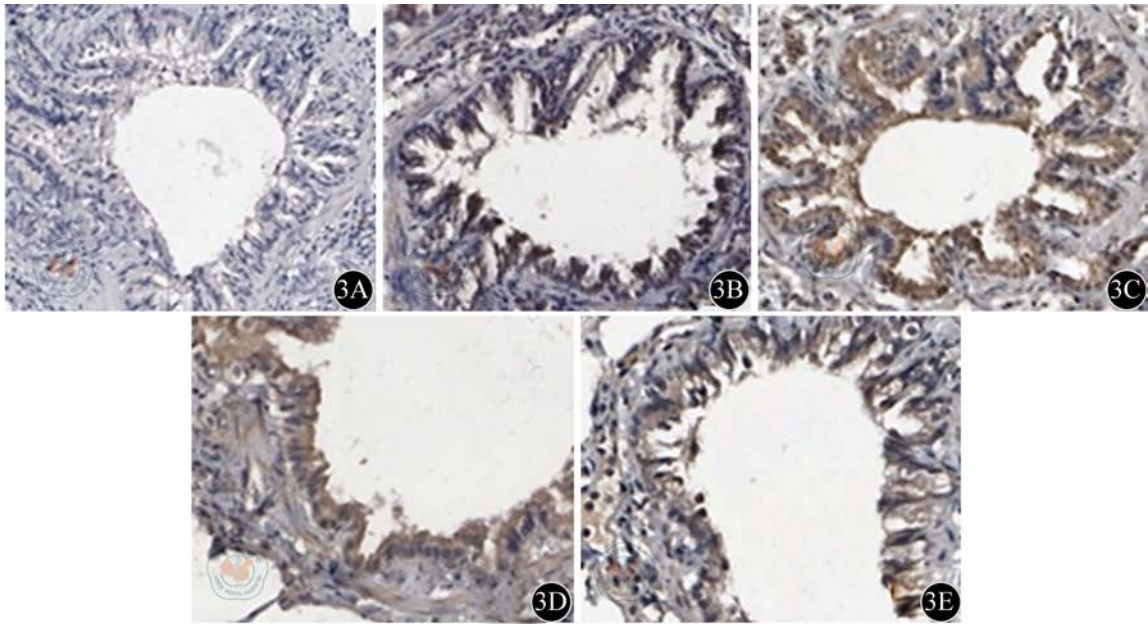


图3 各组大鼠支气管OPN表达(免疫组化×200)；3A：对照组；3B：烟雾暴露1个月组(S1组)；3C：烟雾暴露1个月戒烟1个月组(Q1组)；3D：烟雾暴露3个月组(S2组)；3E：烟雾暴露3个月戒烟1个月组(Q2组)

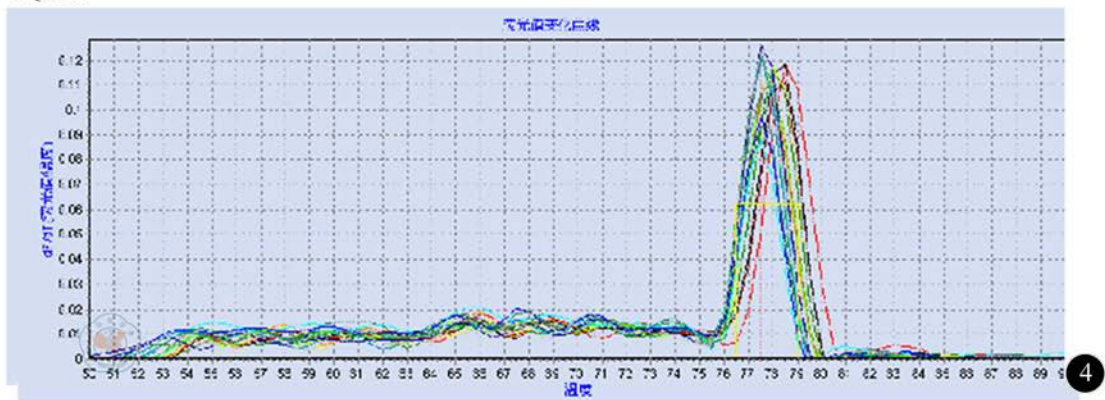


图4 IGF-1基因扩增曲线

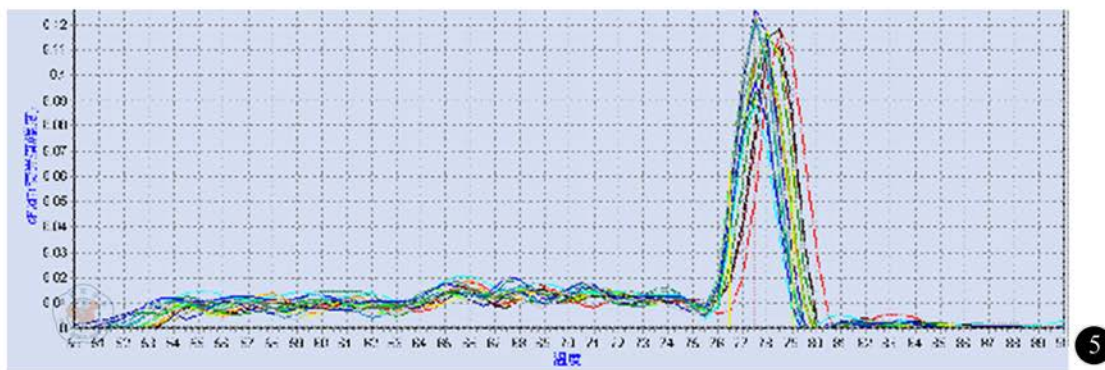


图5 OPN基因扩增曲线

生。研究表明：在低氧、炎症刺激等作用条件下，机体OPN表达增强^[12-13]，但在烟雾暴露条件下OPN表达如何及其他对气道重塑的作用报道尚少。本实验提示，烟雾暴露组大鼠气道OPN蛋白及mRNA

表达高于对照组，戒烟后OPN蛋白及mRNA有所减少，表明烟雾暴露上调支气管上皮细胞OPN的表达。气道重塑包括气道上皮细胞损伤、成纤维细胞增殖分化、细胞外基质沉积等^[14]。OPN参与烟雾

暴露大鼠气道重塑可能与 OPN 协同 TGF- β 、PDGF、ET-1 等多种因子激活成纤维细胞, 促进其增殖、迁移、黏附。此外, 还可能与 OPN 促进支气管平滑肌细胞增殖及参与细胞外基质沉积有关。OPN 在气道未呈时间依赖性的增加, 其原因可能是随着烟雾暴露时间的累积, 肺组织损伤加重, 而导致机体缺氧明显, 以及机体释放大量的氧自由基、炎症介质等, 使 OPN 蛋白在吸烟 3 个月时受基因调节水平、酶原活性及内源性 OPN 抑制物等多个方面影响而表达减少。

在肺癌组织中, IGF-1 通过与受体结合激活 PI3K/Akt 和 MAPK 途径参与细胞的增殖及凋亡^[15], OPN 也通过与整合素、CD44 结合诱导多种激酶(如: PI3、MAPK、PLC、NIK2)磷酸化和活化参与细胞的增殖, 转移及浸润。本研究显示: 支气管上皮细胞 IGF-1 与 OPN 表达呈正相关, 其原因可能是烟雾暴露条件下两者通过相同信号转导通路、相同中间酶激活剂诱导其表达增加而参与气道重塑。但具体机制还需进一步研究。

总之, 本研究发现烟雾暴露通过上调大鼠支气管上皮细胞 IGF-1 和 OPN 的表达参与气道重塑。戒烟可减轻烟雾暴露大鼠的气道重塑。

参 考 文 献

- [1] 姚婉贞. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2007 年修订版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30(1): 8-17.
- [2] 杜毓锋, 许建英, 杜永成. 白细胞介素 1β 对气道上皮细胞表达转化生长因子- β -1 和胰岛素样生长因子-1 的影响[J]. 山西医科大学学报, 2007, 38(8): 701-704.
- [3] Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, et al. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival[J]. Journal of Clinical Investigation, 2001, 107(9): 1055-1061.
- [4] Kohan M, Bader R, Puxeddu I, et al. Enhanced osteopontin

expression in a murine model of allergen-induced airway remodelling[J]. Clinical & Experimental Allergy, 2007, 37(10): 1444-1454.

- [5] 许三林, 吴人亮. 上皮钙粘附素在吸烟小鼠呼吸道上皮损伤修复中表达的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1999, 22(7): 417-419.
- [6] Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases[J]. European Journal of Pharmacology, 2006, 533(1): 222-239.
- [7] Scanlon PD, Connett JE, Waller LA, et al. Smoking cessation and lung function in mild-to-moderate chronic obstructive pulmonary disease: the Lung Health Study[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2000, 161(2): 381-390.
- [8] 乔翠霞, 李素云. 慢性阻塞性肺疾病的流行病学研究现状[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(11): 1618-1621.
- [9] 高晓玲, 郝丽婷, 李建强, 等. 胆红素对慢性阻塞性肺疾病大鼠血小板源性生长因子和胰岛素样生长因子表达的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2009, 18(2): 225-228.
- [10] Gosens R, Schaafsma D, Grootte Bromhaar MM, et al. Growth factor-induced contraction of human bronchial smooth muscle is Rho-kinase-dependent[J]. Eur Pharmacol, 2004, 494: 73-76.
- [11] Mehrhof FB, Müller FU, Bergmann MW, et al. In cardiomyocyte hypoxia, insulin-like growth factor-I-induced antiapoptotic signaling requires phosphatidylinositol-3-OH-kinase-dependent and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the transcription factor cAMP response element-binding protein[J]. Circulation, 2001, 104(17): 2088-2094.
- [12] Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin[J]. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, 2000, 11(3): 279-303.
- [13] Zohar R, Suzuki N, Suzuki K, et al. Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration[J]. Journal of Cellular Physiology, 2000, 184(1): 118-130.
- [14] 孙海会, 尚云晓. 骨桥蛋白与支气管哮喘的研究进展[J/CD]. 中华哮喘杂志: 电子版, 2013, 7(3): 206-209.
- [15] Grimberg A, Cohen P. Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis[J]. Journal of Cellular Physiology, 2000, 183(1): 1-9.

(收稿日期: 2014-05-20)

(本文编辑: 戚红丹)