

TGF- β 1、MMP-9 在哮喘大鼠气道重建模型中的表达及丹参的干预作用

陈 静 赵文娟 李玉卿 夏永辉 袁嘉丽

(云南中医学院,昆明,650500)

摘要 目的:观察 TGF- β 1、MMP-9 在哮喘大鼠气道重建模型中的动态变化,探讨丹参干预气道重建的作用机制。方法:SPF 级 SD 成年雄性大鼠 70 只随机分为正常对照组、哮喘模型组(哮喘 2 周组、哮喘 4 周组、哮喘 8 周组)、丹参干预组(丹参 2 周组、丹参 4 周组、丹参 8 周组)3 个大组,7 个小组。用卵蛋白(OVA)-氢氧化铝混悬液致敏与激发建立大鼠哮喘气道重塑模型,激发 2、4、8 周后处死。观察哮喘大鼠肺组织病理变化,采用 ELISA 法检测大鼠肺组织 TGF- β 1、MMP-9 水平。结果:哮喘大鼠气道炎性细胞浸润及支气管平滑肌增厚,随着激发时间的延长逐渐加重;同时,哮喘大鼠肺组织 TGF- β 1、MMP-9 水平逐渐升高,哮喘 4 周组、哮喘 8 周组较正常对照组显著升高($P < 0.05$ 、 $P < 0.001$);使用丹参干预后,丹参 8 周组较哮喘 8 周组显著降低($P < 0.001$)。结论:气道重建的程度随着哮喘发作及时间推移而发生动态变化;TGF- β 1、MMP-9 参与哮喘气道重建过程;活血化瘀药丹参可通过抑制 TGF- β 1、MMP-9 水平而干预阻断哮喘气道重建。

关键词 哮喘;气道重建;TGF- β 1;MMP-9;丹参

Expression of TGF- β 1、MMP-9 in airway remodeling in Asthma Rats Model and Effects of Salvia Miltiorrhiza

Chen Jing, Zhao Wenjuan, Li Yuqing, Xia Yonghui, Yuan Jiali

(Yunnan University of TCM, Kunming 650500, China)

Abstract Objective: To observe the dynamic changes of TGF- β 1 and MMP-9 in the airway remodeling of asthma rat model and explore the mechanism of salvia miltiorrhiza (Danshen) in intervening airway remodeling. **Methods:** Seventy healthy adult male rats were randomly divided into the normal control group, asthma model group (subdivided into two-week asthmatic group, four-week asthmatic group and eight-week asthmatic group) and salvia miltiorrhiza group (subdivided into two-week salvia miltiorrhiza group, four-week salvia miltiorrhiza group, and eight-week salvia miltiorrhiza group) with a total of seven groups with 10 rats in each. Asthmatic airway remodeling rats model was established with ovalbumin and Al(OH) $_3$, and rats were observed 2, 4 and 8 weeks after induced model respectively. The pathological changes of the lung tissue were observed. The level of TGF- β 1 and MMP-9 in lung tissue was detected by ELISA. **Results:** Airway inflammatory cells infiltrated in airway tissue and the thickness of bronchial smooth muscle increased. With the prolongation of the stimulating time, TGF- β 1 and MMP-9 level increased gradually in the asthma model group. Compared with the normal control group, there were significant differences ($P < 0.05$, $P < 0.001$) in the four-week asthmatic group and eight-week asthmatic group. After salvia miltiorrhiza was applied, the TGF- β 1 and MMP-9 level decreased. Compared with the eight-week asthmatic group, there were significant differences ($P < 0.001$) in the eight-week salvia miltiorrhiza group. **Conclusion:** The changes of airway remodeling in asthma are dynamic process and TGF- β 1 and MMP-9 may intervene in the changes of airway remodeling process. Salvia miltiorrhiza improve the state of airway remodeling in asthmatic rats by inhibiting the level of TGF- β 1 and MMP-9.

Key Words Asthma; Airway remodeling; TGF- β 1; MMP-9; Salvia miltiorrhiza

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.03.029

支气管哮喘(哮喘)是由多种细胞和细胞组分参与的气道慢性炎性反应性疾病^[1]。气道重建是哮喘的一大重要病理学特征,其本质就是气道纤维化和胶原沉积。气道重建可加重气道高反应性,导致

肺功能持续性与进行性损害,从而增加了临床上支气管哮喘的难治性^[2]。有效改善气道重建成为哮喘防治的新方向。TGF- β 1 是迄今已知最强的致纤维化因子之一,也是导致哮喘气道重建的主要调控因

基金项目:云南省教育厅重大专项项目(编号:ZD2013010);云南省教育厅科学研究基金项目(编号:2013Y241);云南省高校中医药调节机体微环境应用基础研究科技创新团队项目

作者简介:陈静(1978.08—),女,硕士,讲师,形态学实验室主任,研究方向:中西医结合基础免疫学,E-mail:sunnychenj@163.com

通信作者:袁嘉丽(1963.03—),女,博士,教授,研究生处处长,研究方向:中西医结合基础免疫学,E-mail:yjl6688767@sina.com

子^[3]。MMP-9 是降解细胞外基质的主要成分,在生理和病理情况下有利于组织重构^[4-5]。中医学认为气道纤维化虽有多种病机,但大多数医家都认同在不同证型的纤维化中瘀血都成为了重要病理产物。因此,活血化瘀是治疗器官纤维化的大法^[6]。本实验通过组织病理分析和 ELISA 法检测哮喘气道重建不同阶段的病理特征及在气道重建的不同阶段给予丹参干预后的大鼠气道 TGF- β 1、MMP-9 的动态变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 70 只,4~6 周龄,体重(180±20) g(购自四川省医学科学院实验动物研究所,许可证编号:SCXK(川)2013-24,合格证号 0018160)。

1.2 试剂及仪器 鸡卵清蛋白(OVA)、氢氧化铝凝胶(Sigma 公司,美国);大鼠 TGF- β 1ELISA 试剂盒;大鼠 MMP-9 ELISA 试剂盒(苏州卡尔文生物科技有限公司);酶标仪(美国分子仪器公司);压缩雾化器(Pari Turboby,德国);台式高速离心机(BECKMAN 公司,美国);自备有机玻璃雾化箱(45 cm×35 cm×20 cm)。

1.3 实验药物 丹参,购于昆明福林堂药业有限公司,以水煎法进行药液浓缩,每毫升药液含生药 1 g,根据成人(60 kg)临床一日用药量换算出大鼠(200 g)等效用量,以上剂量均根据动物体表面积等效剂量换算。

1.4 实验方法

1.4.1 模型制备及分组 SD 雄性大鼠 70 只,随机分为 7 组,每组 10 只,第 1 天和第 14 天腹腔注射 OVA-氢氧化铝混悬液 2 mL 致敏(OVA1 mg,氢氧化铝 100 mg,加生理盐水至 2 mL),于实验第 21 天起将大鼠置于密闭容器内,予 2% OVA 生理盐水雾化激发,30 min/次,隔天 1 次。正常对照组用生理盐水代替 OVA 致敏和激发^[7]。实验中观察大鼠反应,出现烦躁不安、呼吸急促深快、腹肌抽搐、烦躁呛咳及点头运动等症状表明建立哮喘模型成功^[8]。实验动物随机分成正常对照组、哮喘模型组(分为哮喘 2 周组、哮喘 4 周组、哮喘 8 周组)、丹参干预组(分为丹参 2 周组、丹参 4 周组、丹参 8 周组)共计 3 大组,7 个小组。

1.4.2 制备组织病理切片 各组大鼠末次激发后 24 h,打开胸腔取下左肺组织,中性甲醛固定,石蜡包埋后切片,HE 染色光学显微镜下观察细支气管、血管及肺泡的病理改变。

1.4.3 指标检测 采用酶联免疫吸附试验法

(ELISA)检测各组大鼠肺组织匀浆上清液 TGF- β 1、MMP-9 含量。参照试剂盒说明书进行,通过标准品吸光度(A)值绘制标准曲线,然后计算各样本的值。

1.5 数据收集和统计学处理 实验数据采用 SPSS 软件 16.0 进行统计分析处理,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组数据服从正态分布,方差齐;方差分析 $P < 0.001$,组间有差异,采用 LSD 法检验,进行多组间均数的多重比较。

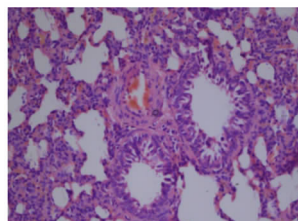


图 1 正常对照组(HE×200)

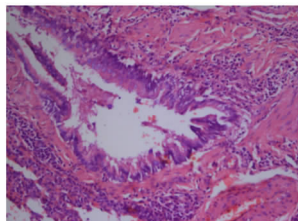


图 2 哮喘 2 周组(HE×200)

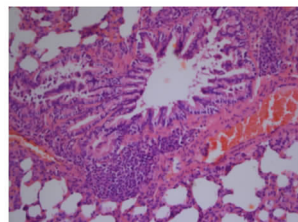


图 3 哮喘 4 周组(HE×200)

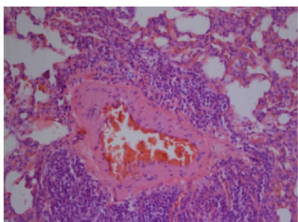


图 4 哮喘 8 周组(HE×200)

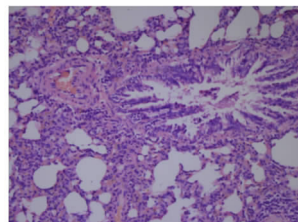


图 5 丹参 2 周组(HE×200)

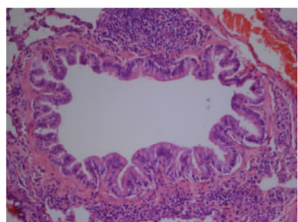


图 6 丹参 4 周组(HE×200)

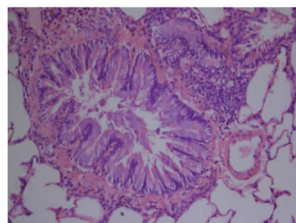


图 7 丹参 8 周组(HE×200)

2 结果

2.1 组织病理学改变 正常对照组:气道周围无炎性细胞浸润,支气管管腔规则,气道黏膜上皮及肺泡结构完整,肺泡间隔窄,气道平滑肌薄,肺泡腔透亮,无上皮脱落损伤,黏膜无水肿。(图 1)。哮喘模型组:2 周组支气管可见黏液栓,气道有损伤,肺泡间隔不同程度增宽,部分断裂,气管与血管周围有炎性细胞浸润(图 2);4 周组可见杯状细胞增生,基底膜增厚,肺泡间隔不同程度增宽,轻度充血水肿,气管周围炎性细胞浸润(图 3);8 周组大量密集炎性细胞

浸润,可见黏液栓,肺泡融合、不同程度断裂,平滑肌增生(图4)。丹参干预组:2周组大鼠支气管壁周围有少量炎性细胞浸润,气道平滑肌增厚不明显,伴黏液分泌,基底膜稍增厚(图5);4周组增生细胞减少,肺泡大小相似,充血、水肿减轻,少量炎性细胞浸润(图6);8周组支气管管壁趋于正常,上皮结构较完整,管壁未见增厚,浸润的炎性细胞减少,无明显炎性渗出(图7)。

2.2 大鼠肺组织匀浆 TGF- β 1 及 MMP-9 含量测定
检测结果显示,哮喘4周组、哮喘8周组肺组织 TGF- β 1 及 MMP-9 与正常对照组比较均有显著升高($P < 0.05$),其中哮喘8周组升高最明显($P < 0.001$);随着激发时间的延长,哮喘8周组 TGF- β 1 及 MMP-9 含量显著高于哮喘2周组、哮喘4周组($P < 0.05$);使用丹参干预后,丹参2周组、丹参4周组肺组织 TGF- β 1 及 MMP-9 含量较对应时间的哮喘组有所降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$),丹参8周组肺组织 TGF- β 1 及 MMP-9 含量与哮喘8周组比较显著降低($P < 0.001$)。

表1 各组大鼠肺组织匀浆 TGF- β 1 及 MMP-9 含量($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TGF- β 1 (ng/mL)	MMP-9 (ng/mL)
正常对照组	10	1.05 $\pm$ 0.25	1.99 $\pm$ 0.29
哮喘2周组	9	1.41 $\pm$ 0.47 [△]	2.29 $\pm$ 0.51
哮喘4周组	7	1.45.9 $\pm$ 0.32 [△]	2.43 $\pm$ 0.40 [△]
哮喘8周组	7	1.99 $\pm$ 0.18 ^{□◇☆}	3.01 $\pm$ 0.31 ^{□◇☆}
丹参2周组	8	1.31 $\pm$ 0.36 [▲]	1.93 $\pm$ 0.30 [▲]
丹参4周组	7	1.33 $\pm$ 0.19 [■]	2.06 $\pm$ 0.49 [■]
丹参8周组	7	1.37 $\pm$ 0.30 [◆]	2.10 $\pm$ 0.20 [★]
<i>F</i>		5.394	7.037
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:△与正常对照组比较, $P < 0.05$;□与正常对照组比较, $P < 0.001$;◇与哮喘2周组比较, $P < 0.05$;☆与哮喘4周组比较, $P < 0.05$;▲与哮喘2周组比较, $P > 0.05$;■与哮喘4周组比较, $P > 0.05$;◆与哮喘8周组比较, $P < 0.05$;★与哮喘8周组比较, $P < 0.001$ 。

3 讨论

气道重塑是哮喘的重要病理特征,是哮喘发展到一定阶段气道出现的不可逆改变,也是哮喘难治的重要原因。目前,哮喘治疗主要是控制症状、抗炎、免疫疗法,从改善气道重建的角度进行哮喘治疗的药物很少,作用也不理想,因此,从气道重建的调控因子入手,用药物控制细胞因子的含量从而干预气道重建,是治疗难治性哮喘的一个新思路。

TGF- β 是哮喘气道重建的主要调控因子,其中以 TGF- β 1 活性最强,作为促纤维化的关键因子,TGF- β 1 促进平滑肌细胞和杯状细胞肥大增生,增加

胶原和纤连蛋白合成并促进气道胶原沉积和基底膜增厚,促进结缔组织蛋白合成从而导致官腔狭窄和和不可逆的肺功能改变^[9-10]。MMP-9 是特异性降解 ECM 的锌依赖性蛋白酶家族,作为与哮喘气道重塑关系最为密切的基质金属蛋白酶,MMP-9 主要负责降解 ECM,哮喘状态下,MMP-9 的过度表达不仅能导致 ECM 结构重建,而且还能诱导嗜酸粒细胞迁移并影响气道平滑肌细胞增殖与迁移,进而诱发哮喘气道重建^[11-12]。因此,抑制 TGF- β 1 和 MMP-9 表达可减轻哮喘气道重建^[13-14]。

哮喘在中医属“哮病”范畴,传统上认为,宿痰伏肺是哮喘的夙根,但现代中医从痰的产生机制和临床实践分析,认为痰瘀密切相关,相互影响。各种原因导致血停成瘀,津聚为痰,产生瘀血、痰浊等病理产物,痰浊、瘀血有形之邪阻滞肺络,搜逐不易,致肺管狭窄,使无形之气不能宣降,痰瘀互结,气道狭窄,更致津血运行受碍,使病情迁延,缠绵难愈^[15-16]。曹世宏认为,肺燥阴伤和肺气虚冷是哮喘的主要病机,但两者均可导致瘀血,瘀血一旦形成又可影响气机的宣畅,阴津阳气难以布达,使肺纤维化形成加重。因此,活血化瘀是治疗器官纤维化的重要方法。

本研究在深入探讨哮喘气道重建中医因病机的基础上,利用中药多靶点、多调控途径的特点和优势,选择活血化瘀药丹参对哮喘气道重建进行干预。药理作用研究表明丹参可活血化瘀,对抗氧自由基,改善微循环^[17],有利于及时清除气道上的炎性因子及免疫复合物;同时丹参可抑制成纤维细胞增殖或诱导成纤维细胞凋亡,减少胶原合成和分泌的作用。本研究检测哮喘气道重建不同阶段的病理特征及在气道重建的不同阶段给予丹参干预后的大鼠肺组织 TGF- β 1、MMP-9 的动态变化。实验结果提示,随着激发时间延长和哮喘发作次数的增加,炎性反应反复刺激,肺组织 TGF- β 1、MMP-9 的分泌逐渐升高,大鼠肺组织病理变化趋于严重,气道重建越明显;经丹参干预后,肺组织 TGF- β 1、MMP-9 随着干预时间的延长逐渐下降;大鼠肺组织炎性细胞浸润减少,支气管管壁和平滑肌增生程度减轻,气道重建逐渐改善;这表明 TGF- β 1、MMP-9 是哮喘气道重建的重要调控因子,监测 TGF- β 1、MMP-9 的表达可帮助我们了解气道重建的发生时间及发展程度;另一方面,活血化瘀药丹参干预或阻断哮喘气道重建的机制可能是通过抑制 TGF- β 1、MMP-9 表达而实现的。

参考文献

[1] 栗丽丽,师强华,梁淑芬. 支气管哮喘发病机制的研究进展[J].

- 中医临床研究,2014,6(36):27-29.
- [2] Makinde T, Murphy RF, Agrawal DK. The regulatory role of TGF- β in airway remodeling in asthma[J]. Immunol Cell Biol, 2007, 85(5): 348-356.
- [3] Kenyon N J, Ward R W, McGrew, et al. TGF- β 1 causes airway fibrosis and increased collagen I and III mRNA in mice[J]. Thorax, 2003, 58(9): 772-777.
- [4] Watson AM, Benton AS, Rose MC, Freishtat RJ. Cigarette smoke alters tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 9 levels in the basolateral secretions of human asthmatic bronchial epithelium in vitro[J]. J Investig Med, 2010, 58(5): 725-729.
- [5] Mehra D, Sternberg DI, et al. Altered lymphocyte trafficking and diminished airway reactivity in transgenic mice expressing human MMP-9 in a mouse model of asthma[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010, 298(2): 189-196.
- [6] 牛建昭, 贾长恩. 器官纤维化基础及中医药防治[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 11.
- [7] 赵文娟, 韩妮萍. 生三七粉调节哮喘小鼠气道炎症及 Th 亚群相关细胞因子的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2014, 9(12): 1296-1299.
- [8] Eynott P R, Nath P, Leung S Y, et al. Allergen-induced inflammation and airway epithelial and smooth muscle cell proliferation: role of Jun N-terminal kinase[J]. Br J Pharmacol, 2003, 140(8): 1373-1380.
- [9] Donnell MP. Renal tubulointerstitial fibrosis new thoughts on its development and progression[J]. Postgrad Med, 2010, 122(4): 208-219.
- [10] Itoigawa Y, Harada N, Harada S, et al. TWEAK enhances TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in human bronchial epithelial cells[J]. Respir Res, 2015, 16: 48.
- [11] Piirila P, Lauhio A, Majuri MI, et al. Matrix metalloproteinases-7, -8, -9 and TIMP-1 in the follow-up of diisocyanate-induced asthma[J]. Allergy, 2010, 65: 61-68.
- [12] Ma HP, Li W, Liu XM. Matrix metalloproteinase 9 is involved in airway inflammation in cough variant asthma[J]. Exp Ther Med, 2014, 8(4): 1197-1200.
- [13] 彭光耀, 刘鑫, 黄艳, 等. TGF- β 1-Smads 通路在哮喘大鼠气道重塑模型中的动态变化[J]. 广东医学, 2010, 31(5): 557-560.
- [14] McMillan SJ, Xanthou G, Lloyd CM. Manipulation of allergen-induced airway remodeling by treatment with anti-TGF- β antibody: effect on the smad signaling pathway[J]. J Immunol, 2005, 174(9): 5774-5780.
- [15] 田金娜, 李建保. 丹龙定喘汤对哮喘小鼠气道重塑及血清 TGF- β 1 的影响研究[J]. 四川中医, 2012, 30(4): 17-19.
- [16] 陈昕芳. 活血化痰法治疗哮喘发作期研究[J]. 长春中医药大学学报, 2013, 29(2): 236-237.
- [17] 陈媛媛, 郭芳, 王文军, 等. 丹参联合川芎嗪对肺纤维化大鼠肺组织 JAK1/STAT1/ICAM-1 表达的影响[J]. 泸州医学院学报, 2012, 35(1): 6-13.

(2015-06-30 收稿 责任编辑: 王明)

(上接第 478 页)

- [2] 于敏, 张双庆, 闻隰. 细胞色素 P450 酶系体外药物代谢研究方法进展[J]. 中国药事, 2013, 27(1): 81-87.
- [3] Kamel A, Harriman S. Inhibition of cytochrome P450 enzymes and biochemical aspects of mechanism-based inactivation (MBI) [J]. Drug Discov Today Technol, 2013, 10(1): 177-189.
- [4] Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation[J]. Pharmacol Ther, 2013, 138(1): 103-141.
- [5] Faber MS, Jetter A, Fuhr U. Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: why, how, and when? [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2005, 97(3): 125-134.
- [6] Martignoni ML, Groothuis GM, Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2006, 2(6): 875-894.
- [7] 张晓璐, 乐江. 细胞色素 P450 的工具药选择及种属差异的研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(5): 697-701.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 177.
- [9] 罗文, 刘斌, 王伟, 等. 何首乌药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 北京中医药大学学报, 2008, 30(8): 557-560.
- [10] Liang ZT, Chen HB, Yu ZL, et al. Comparison of raw and processed Radix Polygoni Multiflori (Heshouwu) by high performance liquid chromatography and mass spectrometry [J]. Chin Med, 2010, 5(29): 1-9.
- [11] 杨芳. 人和鼠肝微粒体药物代谢检测平台的建立及初步应用研究[D]. 西安: 西北大学, 2008.
- [12] 张艳辉, 于超, 郭延全, 等. 高效液相色谱法测定鼠肝微粒体中 CYP1A2 酶的活性及动力学考察[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(2): 189-193.
- [13] 韦灵玉, 张玉杰, 魏宝红, 等. 黄连黄芩及配伍诱导对大鼠肝微粒体 5 种 CYP450 亚酶活性的影响[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(9): 1426-1429.
- [14] 李浩, 杨红莉, 李登科, 等. 何首乌水提物对大鼠肝脏 CYP1A2, CYP2E1 酶活性及 mRNA 表达抑制作用研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(7): 1370-1375.
- [15] Zhou SF, Wang B, Yang LP, et al. Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2[J]. Drug Metab Rev, 2010, 42(2): 268-354.
- [16] Nishimura Y, Kurata N, Sakurai E, et al. Inhibitory effect of antituberculosis drugs on human cytochrome P450-mediated activities[J]. J Pharmacol Sci, 2004, 96(3): 293-300.
- [17] 孙震晓, 张力. 何首乌及其制剂相关肝损害国内文献回顾与分析[J]. 药物不良反应杂志, 2010, 12(1): 26-30.
- [18] 张思玉, 朱晓光, 张广平, 等. 制首乌提取液毒理学研究[J]. 毒理学杂志, 2013, 27(4): 261-264.
- [19] 李晓菲, 李娜, 涂灿, 等. 基于内毒素特异质模型的生首乌与制首乌肝毒性比较研究[J]. 中草药, 2015, 46(10): 1481-1486.
- [20] Ma KF, Zhang XG, Jia HY. CYP1A2 polymorphism in Chinese patients with acute liver injury induced by *Polygonum multiflorum* [J]. Genet Mol Res, 2014, 13(3): 5637-5643.

(2015-06-19 收稿 责任编辑: 张文婷)