

D-松醇对慢性哮喘小鼠模型肺组织转化生长因子 $\beta 1$ 表达的影响

顾晓燕¹, 王毓薇¹, 蒋德升¹, 杜 强^{2*}

(¹解放军第四五四医院呼吸科, 江苏 南京 210002; ²南京医科大学第二附属医院呼吸科, 江苏 南京 210011)

[摘要] 目的: 观察 D-松醇对慢性哮喘小鼠模型转化生长因子(TGF- $\beta 1$)的影响。方法: 18 只 BALB/c 小鼠按随机原则分成正常对照组、哮喘模型组、D-松醇干预组, 每组 6 只, 末次抗原激发 24 h 后, 检测各组小鼠的肺功能, HE 染色观察气道炎症变化; Masson 三色染色观察气道纤维化的改变; real-time PCR 观察肺组织 TGF- $\beta 1$ mRNA 的表达; 采用 ELISA 观察支气管肺泡灌洗液中 TGF- $\beta 1$ 的表达。结果: 哮喘模型组小鼠气道炎症、气道高反应性和气道重塑明显加重, 而 D-松醇能显著抑制慢性哮喘模型小鼠的气道炎症和气道高反应性, 且 D-松醇干预后哮喘模型小鼠肺组织 TGF- $\beta 1$ mRNA 和肺泡灌洗液中 TGF- $\beta 1$ 表达也显著降低。结论: D-松醇能抑制慢性哮喘模型小鼠的气道重塑, 其机制可能通过抑制肺组织 TGF- $\beta 1$ 的表达而实现。

[关键词] D-松醇; 哮喘; 气道重塑; 气道高反应性; 转化生长因子- $\beta 1$

[中图分类号] R562.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)03-369-05

Effect of D-pinitol on the TGF- $\beta 1$ expression in a murine model of chronic asthma

GU Xiao-yan¹, WANG Yu-wei¹, JIANG De-sheng¹, DU Qiang^{2*}

(¹Department of Respiratory Medicine, the 454th Hospital of Chinese PLA, Nanjing 210002; ²Department of Respiratory Medicine, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of D-pinitol on the expression of transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) in a murine model of chronic asthma. **Methods:** Eighteen BALB/c mice were randomly divided into 3 groups, namely control group, OVA group and D-pinitol group. Pulmonary function was measured to evaluate the resistance of expiration 24 hours after the last OVA challenge, hematoxylin and eosin (HE) staining was used to assess the inflammatory cell infiltrates, and Masson's trichrome to determine airway fibrosis. The expression of TGF- $\beta 1$ mRNA in lung was measured by real-time PCR. The concentration of TGF- $\beta 1$ in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** All the parameters associated with airway inflammation, airway hyperresponsiveness (AHR) and remodeling were increased in the OVA group, and decreased by treatment of D-pinitol ($P < 0.05$). Treatment with D-pinitol significantly inhibited the levels of TGF- $\beta 1$ in the lung tissue and in the BALF ($P < 0.05$). **Conclusion:** These data demonstrated that D-pinitol could suppress the progression of airway remodeling in a murine model of chronic asthma. Partly, the effect might be due to inhibition of the expression of TGF- $\beta 1$.

[Key words] D-pinitol; asthma; airway remodeling; airway hyperresponsiveness; TGF- $\beta 1$

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(3): 369-373]

支气管哮喘是一种慢性气道炎性疾病, 其主要特征是不同程度的气道炎症、气道重塑和气道高反应性 (airway hyperresponsiveness, AHR)^[1]。D-松醇 (D-pinitol) 具有刺激胰岛素分泌的能力, 能降低血糖^[2], 近年来, 有研究表明其对哮喘亦具有一定的治

疗作用^[3]。本研究应用 D-松醇干预慢性哮喘小鼠模型后, 观察其对气道炎症、气道高反应性以及气道重塑的影响, 进一步探讨这种抑制效果是否与抑制转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 有关。

1 材料和方法

1.1 材料

6~8 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 18 只, 购自

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金重点资助项目 (09NMUZ23)

*通讯作者, E-mail: jingshuyue@163.com

上海斯莱克实验动物中心, 南京医科大学动物中心饲养(环境温度 25℃, 湿度 70%)。小动物肺功能分析系统 AniRes2005 分析软件(北京贝兰博科技有限公司), 鸡血清卵蛋白(OVA, V 级, 美国 Sigma 公司), 总 RNA 抽提试剂盒(美国 Invitrogen 公司), real-time PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司), 小鼠 TGF-β1 ELISA 试剂盒(美国 Sigma 公司), D-松醇(南京医科大学药理实验室惠赠)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠慢性哮喘模型的制备和分组

18 只小鼠随机分成 3 组, 正常对照组、哮喘模型组和 D-松醇干预组, 每组 6 只。哮喘模型组与 D-松醇干预组于实验开始第 1 天和第 15 天, 小鼠腹腔注射 0.2 ml 致敏液(含 OVA 100 μg, 氢氧化铝凝胶 1 mg), 第 22 天以 1% OVA 溶液雾化吸入, 每日 30 min, 每周 3 次, 连续 8 周。D-松醇干预组小鼠在每次雾化吸入前 30 min, 按 20 mg/kg^[2]D-松醇灌胃。正常对照组以生理盐水代替 OVA 处理。

1.2.2 小鼠气道反应性激发检测

末次激发小鼠 24 h 后, 用 3% 戊巴比妥钠(70 mg/kg)腹腔注射麻醉, 行气管切开、气管插管, 同时行尾静脉穿刺置管, 将小鼠放入密闭的体描箱中, 连接小型动物呼吸机行辅助通气, 动物呼吸机参数设置为: 呼吸频率 90 次/min, 吸呼比为 1.0:1.5, 潮气量为 6 ml/kg。每只小鼠分别给予浓度逐渐增加的氯化乙酰胆碱(ACh) 0、10、30、90 和 270 μg/kg, 采用 AniRes2005 动物肺功能分析系统测定气道阻力^[4-5]。

1.2.3 支气管肺泡灌洗

3 组小鼠行支气管肺泡灌洗, 分 3 次缓慢注入生理盐水, 每次注入量为 0.4 ml, 每次灌洗后计量。支气管肺泡灌洗液(BALF)离心(1 000 g, 10 min)后细胞沉淀做瑞氏染色, 上清液-70℃备用行 TGF-β1 检测。

1.2.4 小鼠肺组织病理改变

小鼠行支气管肺泡灌洗后取左上叶肺组织, 10% 中性福尔马林固定过夜, 石蜡切片后进行 HE 染色、Masson 三色染色, 显微镜下观察肺组织的炎症改变及气道壁胶原沉积情况。采用 Image-Pro Plus 图像分析软件分别测量支气管周围胶原纤维面积。所有测量值均用相应的支气管基底膜周长(bronchial basement membrane perimeter, Pbm)标准化, 并以校正后的胶原纤维面积(μm²/μm)表示胶原纤维含量。

1.2.5 肺组织 TGF-β1 表达的测定

取右肺上叶按试剂盒说明提取 RNA, 进行逆转录和定量 PCR, TGF-β1 上游引物 5'-GTGTGGAG-CAACATGTGGAAGTCTA-3', 下游引物 5'-TTG-GTTCAGCCACTGCCGTA-3'; GAPDH 上游引物 5'-CCATTTGCAGTGGCAAAG-3', 下游引物 5'-CACCC-CATTTGATGTTAGTG-3'。实验组目的基因的表达相对于对照组的变化倍数以 2^{-ΔΔCt} 表示。

1.2.6 ELISA 检测 BALF 中 TGF-β1 含量

根据试剂盒提供的方法进行反应, 终止反应后用酶联仪测 450 nm 光密度, 结果与标准曲线比较确定 TGF-β1 含量。

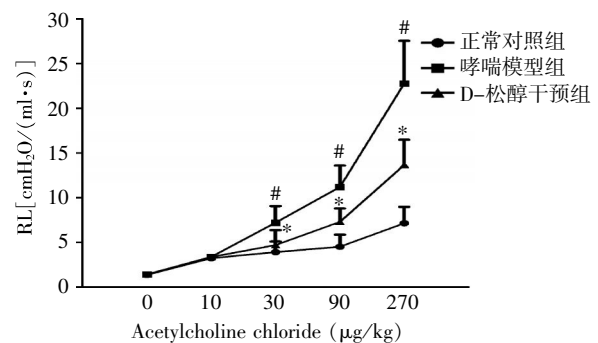
1.3 统计学方法

实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS11.5 软件进行单因素方差分析, 组间两两比较用 LSD 检验。显著性以 $P < 0.05$ 判定。

2 结果

2.1 各组小鼠气道反应性比较

各组小鼠气道阻力在 ACh 浓度为 10 μg/kg 时差异无显著性 ($P > 0.05$)。在 ACh 浓度为 30、90 和 270 μg/kg 时, 哮喘模型组与正常对照组比较, 小鼠气道阻力明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 而 D-松醇干预组与哮喘模型组比较, 气道阻力明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1)。



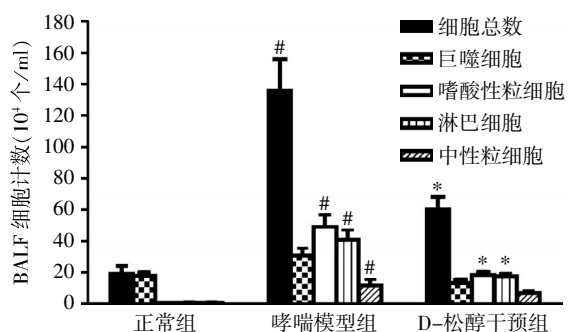
RL: 气道阻力; Acetylcholine chloride: 氯化乙酰胆碱。与正常组相比, $^{\#}P < 0.01$, 与哮喘模型组相比, $^*P < 0.05$ ($n = 6$)。

图 1 各组小鼠气道高反应性比较

Figure 1 The comparison of airway hyperresponsiveness in each group

2.2 3 组小鼠 BALF 中炎症细胞计数

与正常对照组比较, 哮喘模型组小鼠 BALF 中细胞总数、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞及中性粒细胞明显增加, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$), 而 D-松醇干预组与哮喘模型组比较, 细胞总数、嗜酸性粒细胞及淋巴细胞均显著降低(均 $P < 0.05$, 图 2)。



与正常组相比, $P < 0.01$, 与哮喘模型组相比, $*P < 0.05 (n = 6)$ 。

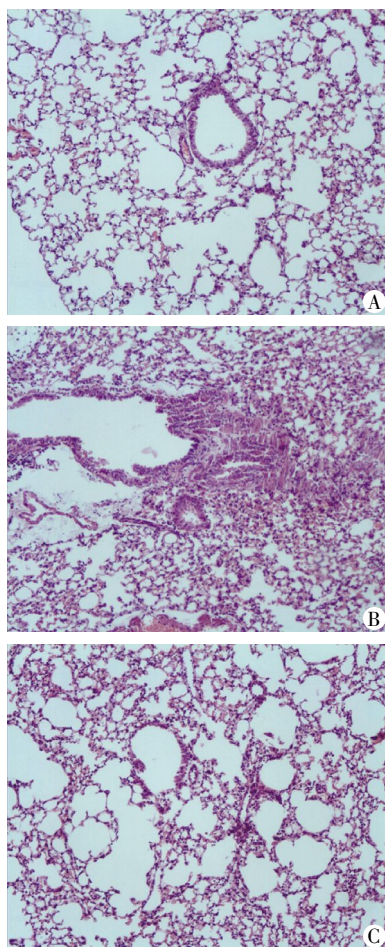
图 2 各组小鼠 BALF 中炎性细胞计数比较

Figure 2 The comparison of the inflammatory cell numbers in BALF in each group

2.3 各组小鼠肺组织病理结果比较

2.3.1 HE 染色

正常组小鼠气道上皮平整, 无纤毛脱落, 肺泡腔内和血管周围未见炎性渗出, 黏膜下未见炎细胞浸润, 气管平滑肌无增厚。哮喘模型组小鼠 HE 染色



A: 正常对照组; B: 哮喘模型组; C: D-松醇干预组。

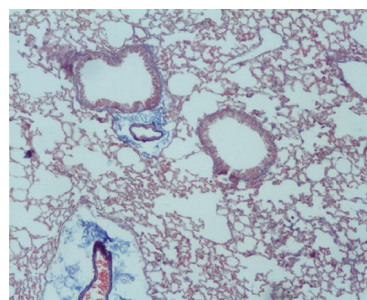
图 3 各组小鼠肺组织 HE 染色结果比较 (HE, $\times 100$)

Figure 3 The comparison of the airway inflammation in each group (HE staining, $\times 100$)

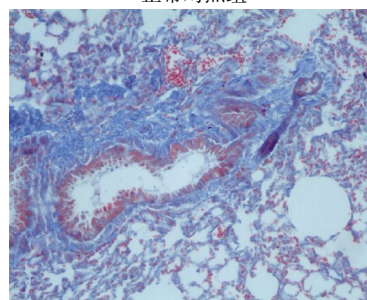
可见气道上皮细胞脱落, 气道上皮不完整, 杯状细胞增多, 黏膜、黏膜下及管周有大量的炎细胞浸润, 以淋巴细胞为主, 气道壁及气道平滑肌明显增厚, 黏膜下层增宽, 黏膜皱褶增多, 管腔狭窄, 有时可见黏液栓堵塞, 肺泡腔内炎性渗出。D-松醇干预组上述改变较哮喘模型组明显减轻 (图 3)。

2.3.2 Masson 染色

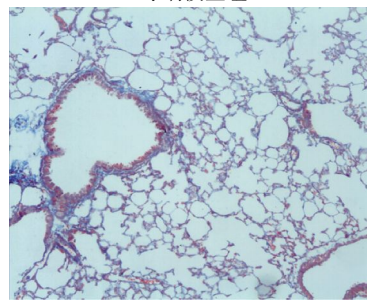
哮喘模型组小鼠气道上皮下胶原纤维较正常对照组明显增多, 而经 D-松醇干预后, 上皮胶原纤维较哮喘模型组明显减少 (图 4)。



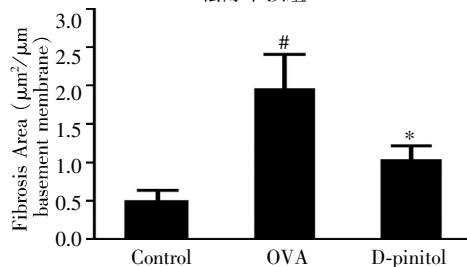
正常对照组



哮喘模型组



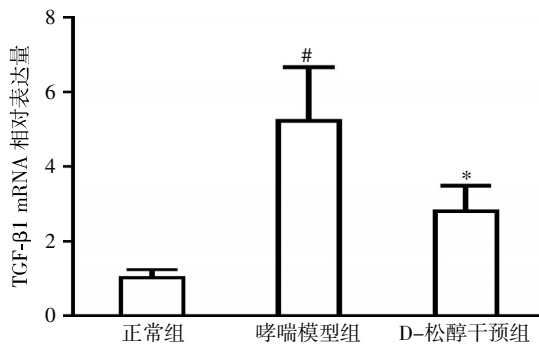
D-松醇干预组



Control: 正常组; OVA: 哮喘模型组; D-pinitol: D-松醇干预组。与正常组相比, $P < 0.01$, 与哮喘模型组相比, $*P < 0.05 (n = 6)$ 。

图 4 各组小鼠肺组织 Masson 染色结果比较 (Masson, $\times 200$)

Figure 4 The comparison of the collagen fibers under the airway in each group (Masson, $\times 200$)



与正常组相比, * $P < 0.01$; 与哮喘模型组相比, * $P < 0.05$ ($n = 6$)。

图 5 各组小鼠肺组织 TGF-β1 基因表达水平的比较

Figure 5 Expression of TGF-β1 mRNA in airway walls in each group

2.4 各组小鼠肺组织 TGF-β1 mRNA 的表达水平

哮喘模型组小鼠肺组织 TGF-β1 mRNA 表达较正常对照组明显增加 ($P < 0.01$), 而经 D-松醇干预后, 哮喘模型小鼠肺组织 TGF-β1 mRNA 表达明显减少 ($P < 0.05$, 图 5)。

2.5 各组小鼠 BALF 中 TGF-β1 蛋白表达水平

哮喘模型组小鼠 BALF 中 TGF-β1 表达量为 (114.5 ± 25.6) pg/ml, 与正常对照组 [(15.3 ± 3.5) pg/ml] 和 D-松醇干预组 [(58.5 ± 10.6) pg/ml] 比较, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

3 讨论

支气管哮喘是一种慢性炎症性疾病, 除了存在非特异性气道高反应性和气道炎症外, 亦存在气道重塑, 组织学表现为上皮细胞增生、气道基底膜增厚、杯状细胞增生肥大及上皮下血管增生、上皮下胶原沉积和纤维化等^[6]。

TGF-β1 是一种多效性细胞因子, 在哮喘发作时起着多种作用, 可拮抗淋巴细胞的反应, 是免疫应答的关闭信号; 可刺激某些类型细胞 (如成纤维细胞) 生长, 是致纤维化的重要细胞因子。与 Bartram 等^[7]的报道一致, 本实验中 TGF-β1 在正常肺组织中亦有一定表达, 提示 TGF-β1 是参与正常细胞生长调节的一个重要因子。而在致敏组小鼠肺组织和 BALF 中, TGF-β1 含量显著增高。TGF-β1 在哮喘中的作用仍不很明确, 有报道认为, 在气道炎症中, TGF-β1 可由活化的嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、肥大细胞、T 淋巴细胞等多种细胞分泌并介导这些细胞生长的抑制作用, 表现出其“负反馈”作用。近来有研究显示^[8], 与野生型小鼠哮喘模型比较, TGF-β1 部分基因敲除小鼠的抗原激发导致的嗜酸性粒细胞炎症的程度更为严重, 且 TGF-β1 表达水平的下降同 Th2

型细胞因子 IL-4、IL-5 和 IL-13 表达水平的增高呈正相关。因此, TGF-β1 在哮喘时的表达增强可能是其发挥抗炎作用的结果。而 TGF-β 在抗炎的同时, 能够作用于多种细胞, 诱导不同的信号转导通路, 参与气道炎症和气道重塑的形成^[9]。

D-松醇是一种存在于大豆的环多醇类药物, 能清热利湿、消食除积、祛痰止咳, 具有抗炎^[3,10]、抗氧化^[11]、降血脂^[12]等作用。本实验应用 D-松醇干预慢性哮喘小鼠模型发现, D-松醇能明显缓解哮喘小鼠的气道炎症、气道高反应性以及气道重塑的相关病理改变。本实验同时还观察到, 哮喘组小鼠 BALF 和肺组织中 TGF-β1 表达明显高于正常组, 而 D-松醇干预组小鼠 TGF-β1 水平显著降低, 本研究结果说明 D-松醇能显著抑制支气管哮喘模型小鼠的气道重塑, 其抑制效应可能与抑制 TGF-β1 的表达有关。然而, 本研究发现, D-松醇干预组小鼠气道炎症、气道高反应性及气道重塑虽较哮喘组明显缓解, 但仍未恢复至正常组水平, 提示可能还有其他机制参与了此病理生理过程。

以上研究揭示, D-松醇对慢性哮喘具有一定的治疗作用, 其部分机制可能通过抑制 TGF-β1 的表达实现, 而 D-松醇调节 TGF-β1 表达的具体分子机制还需要进一步研究来阐明。

[参考文献]

- [1] 中华医学会呼吸病学分会哮喘组. 支气管哮喘防治指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(3): 132-138
- [2] Bates SH, Jones RB, Bailey CJ. Insulin-like effect of pinitol[J]. Br J Pharmacol, 2000, 130(8): 1944-1948
- [3] Lee JS, Lee CM, Jeong YI, et al. D-pinitol regulates Th1/Th2 balance via suppressing Th2 immune response in ovalbumin-induced asthma[J]. FEBS Lett, 2007, 581(1): 57-64
- [4] Du Q, Zhou LF, Chen Z, et al. Imiquimod, a toll-like receptor 7 ligand, inhibits airway remodelling in a murine model of chronic asthma[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2009, 36(1): 43-48
- [5] Du Q, Chen Z, Zhou LF, et al. Inhibitory effects of astragaloside IV on ovalbumin-induced chronic experimental asthma[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2008, 86(7): 449-457
- [6] Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, et al. Asthma: from bronchoconstriction to airways inflammation and remodelling [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161(5): 1720-1745
- [7] Bartram U, Speer CP. The role of transforming growth factor-β in lung development and disease [J]. Chest, 2004,

- 125(2):754-765
- [8] Scherf W, Burdach S, Hansen G, et al. Reduced expression of transforming growth factor β exacerbates pathology in an experimental asthma model [J]. *Eur J Immunol*, 2005, 35(1):198-206
- [9] 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
- [10] Lee JS, Jung ID, Jeong YI, et al. D-pinitol inhibits Th1 polarization via the suppression of dendritic cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(6):791-804
- [11] Sivakumar S, Subramanian SP. Pancreatic tissue protective nature of D-Pinitol studied in streptozotocin-mediated oxidative stress in experimental diabetic rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 622(1-3):65-70
- [12] Geethan PK, Prince PS. Antihyperlipidemic effect of D-pinitol on streptozotocin-induced diabetic Wistar rats [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2008, 22(4):220-224
- [收稿日期] 2011-03-28

(上接第 309 页)

- [9] Lee TK, Poon RT, Yuen AP, et al. Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(18):5369-5376
- [10] Ke XS, Qu Y, Goldfinger N, et al. Epithelial to mesenchymal transition of a primary prostate cell line with switches of cell adhesion modules but without malignant transformation [J]. *PLoS One*, 2008, 3(10):3368
- [11] 安 勇, 姚 捷, 卫积书, 等. 吉西他滨耐药人胰腺癌细胞株的建立及其与肿瘤干细胞的相关性研究 [J]. *中华外科杂志*, 2010, 48(13):999-1003
- [12] Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(10):755-768
- [13] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumor stem cells and drug resistance [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(4):275-284
- [14] Guzman ML, Swiderski CF, Howard DS, et al. Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(25):16220-16225
- [15] Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(3):1030-1037
- [16] Hermann PC, Huber SL, Herder T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer [J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(3):313-323
- [收稿日期] 2011-10-17

欢迎投稿 欢迎订阅