

维生素 D 对原代培养哮喘大鼠气道平滑肌细胞增殖的影响

曾幸坤, 郭红荣, 俞小卫*, 刘 茗

(南京医科大学附属常州二院呼吸内科, 江苏 常州 213000)

[摘要] 目的:探讨维生素 D 对哮喘大鼠气道平滑肌细胞(airway smooth muscle cells, ASMCs)的抗增殖机制,并证明细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)在其抗增殖调控中的作用。方法:原代培养正常对照组和哮喘组大鼠 ASMCs,取第 3~5 代细胞用于实验。总分为以下 5 组:正常对照 ASMCs 组、哮喘 ASMCs 组、哮喘 ASMCs + 1×10^{-8} mol/L 维生素 D 组、哮喘 ASMCs + 1×10^{-7} mol/L 维生素 D 组、哮喘 ASMCs + 1×10^{-6} mol/L 维生素 D 组。用四甲基偶氮唑盐(MTT)法、流式细胞术检测各组 ASMCs 增殖活性的变化;用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白质印迹(Western blot)检测不同组 ASMCs cyclin D1 mRNA 和蛋白的表达。结果:①哮喘 ASMCs 组 G0/G1 期细胞比例(80.01 ± 2.55)%明显少于其他各组,S 期(8.31 ± 0.42)%和 G2/M 期(11.21 ± 1.43)%比例增加,MTT 法检测其吸光度值增高(0.78 ± 0.04),提示 ASMCs 增殖明显增强。其中各值分别与正常对照 ASMCs 组[(90.15 ± 3.02)%、(5.41 ± 0.62)%、(4.38 ± 0.56)%、 0.22 ± 0.04]相比,有显著性差异($P < 0.001$);同时哮喘 ASMCs 组与哮喘 ASMCs + 1×10^{-6} mol/L 维生素 D 组各值[(89.08 ± 2.81)%、(5.58 ± 0.92)%、(4.61 ± 1.12)%、 0.38 ± 0.02]相比,其差异有统计学意义($P < 0.001$);与哮喘 ASMCs + 1×10^{-7} / 1×10^{-8} mol/L 维生素 D 组相比,差异也有统计学意义($P < 0.01$);②在 cyclin D1 mRNA 和蛋白表达水平上,哮喘 ASMCs 组与正常对照 ASMCs 组、哮喘 ASMCs + 1×10^{-6} mol/L 维生素 D 组分别相比较均偏高,差异显著($P < 0.001$);③在各不同剂量维生素 D 作用组,分别在细胞增殖活性检测、cyclin D1 mRNA 和蛋白表达水平上,大剂量维生素 D 组作用均优于最小剂量组,差异有统计学意义($P < 0.001$),显示维生素 D 的抗增殖作用有明显剂量-效应相关性。结论:哮喘组大鼠 ASMCs 增殖明显,维生素 D 可以通过调节 cyclinD1 表达发挥其对哮喘大鼠 ASMCs 的抗增殖作用。

[关键词] 哮喘;气道平滑肌细胞;维生素 D;细胞周期蛋白 D1

[中图分类号] R562.25

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)08-1070-07

doi:10.7655/NYDXBNS20130809

Effect of vitamin D on the proliferation of airway smooth muscle cells of primary culture in asthmatic rat

Zeng Xingkun, Guo Hongrong, Yu Xiaowei*, Liu Ming

(Department of Respiratory Disease, the Changzhou Second Hospital Affiliated to NJMU, Changzhou 213000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-proliferative effect of vitamin D on the proliferation of airway smooth muscle cells(ASMCs) and prove the related mechanism of cyclin D1 and vitamin D in asthmatic rat. **Methods:** The ASMCs in male Sprague Dawley(SD) rats of control group and asthma group were cultured from primary generation. Cells between passage 3 and 5 were used in the study and were divided into control group, asthma group, asthma + 1×10^{-6} mol/L vitamin D group, asthma + 1×10^{-7} mol/L vitamin D group and asthma + 1×10^{-8} mol/L vitamin D group. The proliferation of ASMCs among each group was examined by MTT colorimetric assay and cell cycle analysis. The expression of cyclin D1 was detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively. **Results:** ①The percentage of S (8.31 ± 0.42)% and G2/M (11.21 ± 1.43)% phase, the absorbance (A) (0.78 ± 0.042) value in ASMCs from asthma group were significantly increased compared with other groups; but the percentage of G0/G1 [(80.01 ± 2.55)%] phase were significantly decreased, and compared to those (G0/G1, S and G2/M phase, A value) in ASMCs from control group [(90.15 ± 3.02)% , (5.41 ± 0.62)% , (4.38 ± 0.56)% , 0.22 ± 0.04] and asthma + 1×10^{-6} mol/L vitamin D group [(89.08 ± 2.81)% , (5.58 ± 0.92)% , (4.61 ± 1.12)% and 0.38 ± 0.02 , $P < 0.001$]. The

[基金项目] 常州市应用基础研究计划项目(CJ20112011);南京医科大学科技发展基金重点项目(2011NJMU225)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yxwlyy8180102@sina.com

percentage of G0/G1,S and G2/M phas,A value in ASMCs from asthma + 1×10^{-7} mol/L vitamin D group and asthma + 1×10^{-8} mol/L vitamin D group were compared with asthma group respectively($P < 0.01$);②There were significant differences in the ratios of A value of cys D1 mRNA and expression of cyclin D1 protein in ASMCs from asthma group compared with control group and asthma + 1×10^{-6} mol/L vitamin D group respectively ($P < 0.001$) ;③And in the proliferation of ASMCs and the cyclin D1 mRNA and protein expression among different concentration of vitamin D groups,there were significant differences between the high and the low concentration ($P < 0.001$). **Conclusion:** ASMCs in asthmatic rats proliferate significantly and the expression of cyclin D1 increases obviously. Vitamin D can suppress the proliferation of ASMCs in asthmatic rats via regulating cyclin D1 expression.

[Key words] asthma;airway smooth muscle cells;vitamin D;cyclin D1

[Acta Univ Med Nanjing,2013,33(8):1070-1076]

气道重塑是哮喘发生发展的重要病理特征,并在此基础上出现不可逆性气流阻塞和持续气道高反应性。其中气道平滑肌细胞(airway smooth muscle cells, ASMCs)增殖是气道重塑的主要因素之一。维生素 D 是体内钙稳态的关键调节因子,其活化形式 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 更是一种新的神经内分泌调节激素,参与机体多种功能的分化和调节。有研究表明肺上皮细胞含有 1α -羟化酶,能将无活性 $25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 转化成活性形式 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ^[1],并且有研究证实维生素 D 缺乏可能是近年来哮喘患病率增加的原因之一^[2],人群研究还表明低水平维生素 D 与哮喘儿童吸入高剂量水平的激素存在相关性^[3]。但关于维生素 D 怎样调节哮喘的作用机制目前尚不清楚。维生素 D 可抑制细胞生长和诱导细胞分化,主要通过其核受体家族成员——维生素 D 受体(VDR)发挥生物学效应,调节某些专门靶基因的转录控制相关基因表达,并可负性调节细胞周期蛋白(cyclin),也可通过诱导细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(CKIs)从而抑制细胞生长。cyclin 对细胞的分裂增殖起关键的调控作用。有研究证实,细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)的表达增加可促使 ASMCs 的增殖^[4],从而加重气道重塑。本研究以哮喘大鼠和正常大鼠的 ASMCs 作为对照,分析证明维生素 D 在哮喘中的抗增殖作用机制,并探讨其与 cyclin D1 相互之间的影响,从而进一步探讨维生素 D 调控哮喘的相关作用机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

清洁级健康雄性 SD 大鼠(12~14 周龄、体重 200~250 g)由江苏大学动物实验中心提供;鸡卵清白蛋白(ovalbumin,OVA)、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、小鼠抗大鼠 α -肌动蛋白(α -actin)抗体(Sigma 公司,美国);氢氧化铝凝胶(Invivogen 公司,美国);兔抗 cyclin D1 多克隆抗体、兔抗 β -actin 多克隆抗体(Abcam 公司,

英国);DMEM 高糖培养基、0.25%胰蛋白酶/0.02% EDTA 溶液、特级胎牛血清、D-Hanks 液、I 型胶原酶(Gibco 公司,美国);TRIzol(Invitrogen 公司,美国);AMV Reverse Transcriptase、Taq DNA 聚合酶、Western blot 检测、ECL 检测、BCA 蛋白含量检测试剂盒(南京凯基公司)。

1.2 方 法

1.2.1 SD 大鼠分组及哮喘模型的建立

清洁级 SD 大鼠共 10 只,按照随机分配的原则,将大鼠分为正常对照组和哮喘组,每组 5 只。哮喘组按照文献方法制作哮喘模型,第 1 天每只大鼠腹腔内注射 1%OVA 生理盐水和氢氧化铝凝胶混悬液 2 ml(内含 OVA 100 μg + 氢氧化铝 200 mg)致敏,第 14 天重复致敏 1 次。第 21 天开始雾化吸入激发,将大鼠置于不完全封闭的有机玻璃箱内,用超声雾化器以 1% OVA 生理盐水 20 ml 雾化吸入,激发 20 min,每天 1 次,共 4 周。激发引喘后大鼠出现呼吸加快、口唇发绀、烦躁、活动频繁等哮喘发作症状表现。对照组大鼠以生理盐水代替 OVA 进行致敏和雾化吸入。

1.2.2 ASMCs 的培养、鉴定及分组

用胶原酶-胰酶混合法消化原代培养哮喘组和正常对照组大鼠支气管平滑肌细胞,实验用第 3~5 代细胞。细胞根据形态学观察及 α -actin 免疫细胞化学染色鉴定。分别将对照组和哮喘组大鼠 ASMCs 以 1×10^3 个/孔接种于 96 孔板或 1×10^4 个/孔接种于 24 孔板,待细胞生长汇合达 70%~80%时,用无血清的 DMEM 培养 24 h,使各组细胞同步于 G0 期,然后再按照加或不加干预剂 10%胎牛血清培养基进行培养,所有组均培养 24 h 后进行实验。按照哮喘组中加入作用不同浓度的维生素 D,共可分为以下 5 组:正常对照 ASMCs 组、哮喘 ASMCs 组、哮喘 ASMCs + 1×10^{-8} mol/L 维生素 D 组、哮喘 ASMCs + 1×10^{-7} mol/L 维生素 D 组、哮喘 ASMCs + 1×10^{-6}

mol/L 维生素D组。MTT实验各组均重复8个复孔,余实验每组均重复4个复孔,所有实验均重复3次。

1.2.3 MTT 比色法测定各组 ASMCs 增殖

各不同干预组 ASMCs 于 96 孔板培养 24 h 结束时,每孔加入 20 μ l (5 g/L) MTT 溶液,继续培养 4 h 后去培养液,再分别加入 DMSO 溶液 150 μ l,于振荡器上避光充分混匀,酶联免疫检测仪于 490 nm 处测定各组吸光度值。

1.2.4 流式细胞仪分析各组 ASMCs 细胞周期

收集第3代 ASMCs 制成细胞悬液,按照浓度为 1×10^4 个/孔接种于 24 孔板,待细胞同步化后,再加入各不同干预给药组培养液,均培养 24 h 后收集各组细胞,控制总细胞数在 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个,用 1 ml PBS 配成细胞悬液转移至流式上样管中,用预冷 75%乙醇固定,离心后加入 RNA 酶、碘化丙啶 (PI) 室温作用 30 min 后,用 FACsort 型流式细胞仪检测细胞周期,并用 Modfit 软件分析细胞周期中各期所占比例。

1.2.5 RT-PCR 检测各组 cyclinD1 mRNA 的表达

分别取各组 ASMCs 用 TRIzol 试剂提取总 RNA, -70°C 保存,并测定 RNA 质量。再逆转录为 cDNA, 以此为模板来进行 PCR 扩增。本实验 PCR 引物: ① cyclin D1 上游引物: 5'-CCTGACTGCCGA-GAAGTTGT-3', 下游引物: 5'-TCATCCGCCTCTGGCATT-3', 扩增产物片段 165 bp; ② 内参照 GAPDH 上游引物: 5'-TGTTGCCATCAACGACCCCTT-3', 下游引物: 5'-CTCCACGACATACTCAGCA-3', 扩增产物片段 202 bp。反应条件: 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 40 s, 57°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 共 32 个循环, 72°C 延伸 10 min。各组实验均重复 3 次, PCR 产物用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳。用 Quan-

tity one 4.6 软件分析实验 PCR 扩增产物条带灰度值,以 cyclin D1/ GAPDH 灰度值比作为 mRNA 水平的定量指标。

1.2.6 Western blot 检测各组 cyclin D1 蛋白的表达

消化收集并裂解各组细胞,离心提取蛋白质,将样本稀释均按每孔 20 μ l 上样,12%聚丙烯酰胺凝胶电泳后,再转印至硝酸纤维素膜。在 5%脱脂奶粉封闭 1 h (室温),弃去封闭液,不洗,再加一抗抗体 (cyclinD1 和 β -actin) (1:400) 孵育过夜 (4°C), PBST 漂洗滤膜 4 次,每次 10 min; 将膜与 HRP 结合的二抗 (1:5 000) 室温下摇荡孵育 1 h 后 ECL 试剂盒显色,扫描滤膜,并显影、洗像。每组实验均重复 3 次,用 Quantity one 4.6 软件分析各组蛋白条带灰度值,以灰度值比作为蛋白水平的定量指标。

1.3 统计学方法

实验资料采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,各计量资料指标均用均数 \pm 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,两两之间比较采用 q 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 哮喘模型及原代 ASMCs 鉴定

可见正常组和哮喘组肺组织病理改变 (图 1), 正常组无明显炎性细胞浸润,大鼠气道上皮完整,无平滑肌层增厚等改变;哮喘组黏膜下层增宽,黏膜皱褶增多,管腔狭窄,气道平滑肌明显增厚,有大量以嗜酸性粒细胞为主的炎性细胞浸润。

应用倒置相差显微镜观察细胞未汇合前多呈梭形或多边形,细胞汇合后起伏状生长,呈现典型“峰谷”生长状态; α -actin 免疫细胞化学染色细胞呈强阳性染色,胞浆呈棕黄色或者棕红色,胞核呈蓝色,鉴定原代培养的细胞为大鼠气道平滑肌细胞 (图 2)。

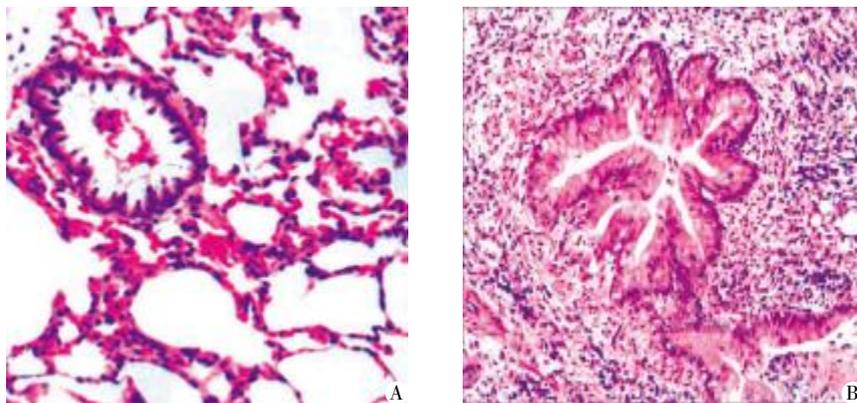


图 1 正常对照组(A)和哮喘组(B)肺组织病理切片(HE, $\times 400$)

Figure 1 The pathological changes in control group(A) and asthma group(B)(HE, $\times 400$)

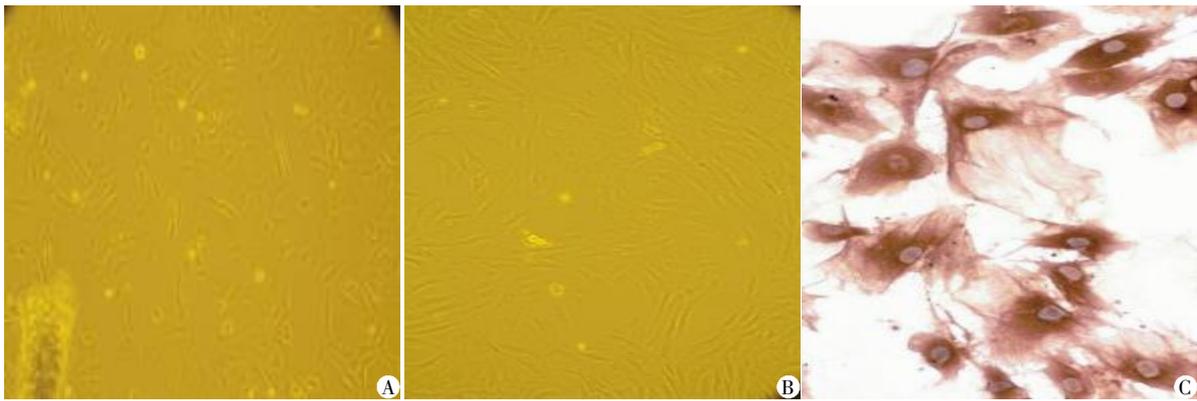


图 2 大鼠 ASMcs 未汇合前(A)和汇合后(B)典型“峰谷”生长状态以及 α -actin 免疫细胞化学鉴定(C)($\times 400$)
Figure 2 The primary ASMcs by phase contrast microscope and α -actin positive expression of ASMcs by IC($\times 400$)

2.2 各组细胞增殖活性变化

①MTT 法检测细胞增殖(表 1):哮喘 ASMcs 组吸光度值明显高于其他各组,与正常对照组比较差异有统计学意义($q = 6.63, P < 0.001$);与各不同剂量维生素 D 组比较,差异均有统计学意义,其中以哮喘 ASMcs + 1×10^{-6} mol/L 维生素 D 组吸光值最小,抑制作用最为明显($q = 8.38, P < 0.001$);其中最大剂量组与最小剂量组维生素 D 之间,吸光值比较差异有统计学意义($q = 5.56, P < 0.001$);②细胞周期分析(表 1,图 3):哮喘 ASMcs 组 G0/G1 期细胞

比例明显少于其他各组,S 期和 G2/M 期细胞比例增加,与正常对照组相比,有显著性差异(q 值分别为 7.45、4.21 和 5.89, P 均 < 0.001);同时各不同剂量维生素 D 干预组与哮喘组相比,其 G0/G1 期、S 期和 G2/M 期差异均有统计学意义(表 1),且维生素 D 大剂量组明显优于小剂量组 (q 值分别为 8.36、3.23 和 4.51, P 均 < 0.001)。

2.3 各组大鼠 ASMcs cyclinD1 mRNA 的表达

PT-PCR 检测各组 ASMcs 细胞 cyclin D1 mRNA 表达结果见图 4。哮喘 ASMcs 组的灰度值比($0.581 \pm$

表 1 各实验组 ASMcs 增殖活性的比较
Table 1 Comparison of the proliferation of ASMcs among every group (n=8)

组 别	细胞周期(%)			MTT(吸光度值)
	G0/G1	S	G2/M	
正常对照 ASMcs 组	90.15 \pm 3.02	5.41 \pm 0.62	4.38 \pm 0.56	0.22 \pm 0.04
哮喘 ASMcs 组	80.01 \pm 2.55*	8.31 \pm 0.42*	11.21 \pm 1.43*	0.78 \pm 0.04*
哮喘 ASMcs + 1×10^{-8} mol/L 维生素 D 组	85.41 \pm 2.62 ∇ #	7.35 \pm 0.87 ∇ #	7.17 \pm 0.72 ∇ #	0.51 \pm 0.02 ∇ #
哮喘 ASMcs + 1×10^{-7} mol/L 维生素 D 组	86.41 \pm 2.72 ∇	7.01 \pm 0.50 ∇	6.73 \pm 1.26 ∇	0.50 \pm 0.01 ∇
哮喘 ASMcs + 1×10^{-6} mol/L 维生素 D 组	89.08 \pm 2.81 ∇ ∇	5.58 \pm 0.92 ∇ ∇	4.61 \pm 1.12 ∇ ∇	0.38 \pm 0.02 ∇ ∇
F 值	13.04	64.62	47.35	56.31
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

与对照组相比, * $P < 0.001$; 与哮喘组相比, $\nabla P < 0.01$, $\nabla\nabla P < 0.001$; 不同剂量维生素 D 组之间, 最小剂量与最大剂量有显著性差异, $\#P < 0.001$ 。

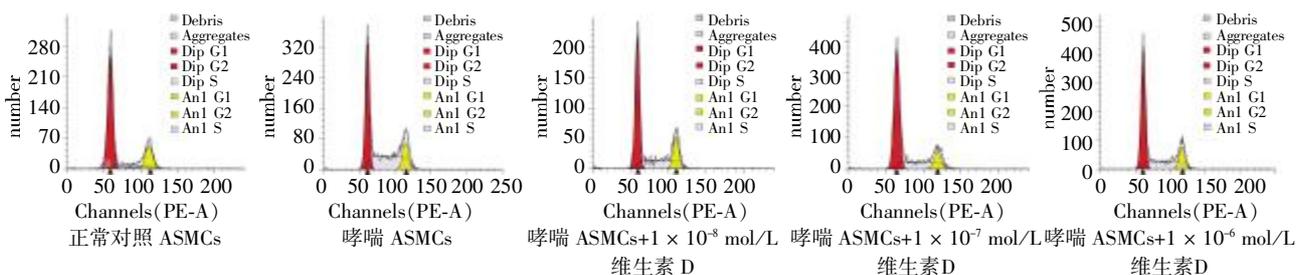
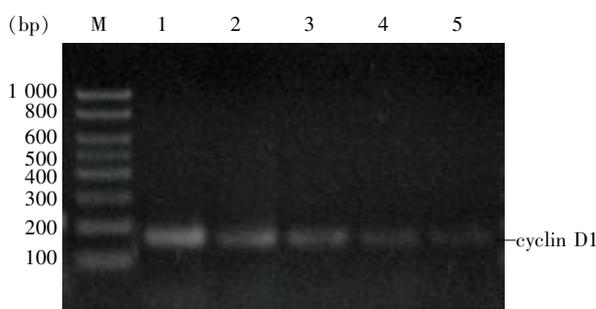


图 3 各组流式细胞检测图

Figure 3 Picture of flow cytometry of each group

0.024)明显高于正常对照组(0.165 ± 0.030),其差异有统计学意义($q = 8.92, P < 0.001$);哮喘 ASMCs + $1 \times 10^{-6}/1 \times 10^{-7}/1 \times 10^{-8}$ mol/L 维生素 D 组灰度值比($0.192 \pm 0.031, 0.398 \pm 0.016, 0.441 \pm 0.025$)均低于哮喘 ASMCs 组,其中哮喘 ASMCs + 1×10^{-6} mol/L 维生素 D 组灰度比降低最为明显,有显著性差异($q = 10.52, P < 0.001$);哮喘 ASMCs + $1 \times 10^{-7}/10^{-8}$ mol/L 维生素 D 组也均有统计学意义(q 值分别为 8.53 和 5.67, $P < 0.01$);并且最大剂量与最小剂量维生素 D 组相比较,差异有统计学意义($q = 9.68, P < 0.001$)。

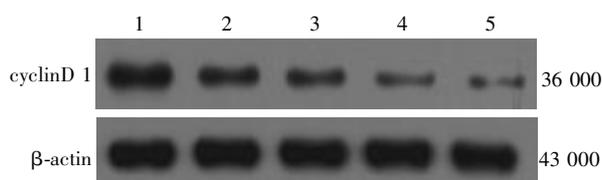
2.4 各组大鼠 ASMCs cyclinD1 蛋白的表达



1:哮喘 ASMCs 组;2:哮喘 ASMCs + 1×10^{-8} mol/L 维生素 D 组;3:哮喘 ASMCs + 1×10^{-7} mol/L 维生素 D 组;4:哮喘 ASMCs + 1×10^{-6} mol/L 维生素 D 组;5:正常对照 ASMCs 组。

图4 各实验组 ASMCs cyclin D1 mRNA 表达的比较

Figure 4 Comparison of cyclin D1 mRNA expression of ASMCs among each group



1:哮喘 ASMCs 组;2:哮喘 ASMCs + 1×10^{-8} mol/L 维生素 D 组;3:哮喘 ASMCs + 1×10^{-7} mol/L 维生素 D 组;4:哮喘 ASMCs + 1×10^{-6} mol/L 维生素 D 组;5:正常对照 ASMCs 组。

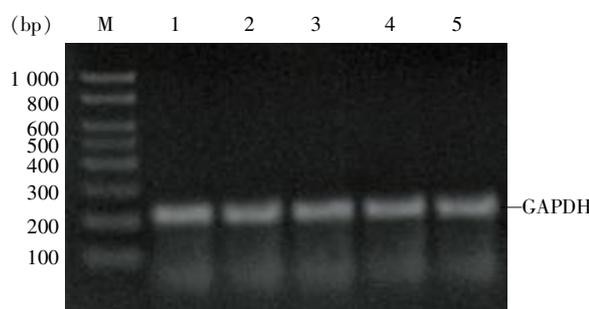
图5 各实验组 ASMCs 细胞周期蛋白 D1 蛋白表达的比较

Figure 5 Comparison of cyclin D1 protein expression of ASMCs among each group

3 讨论

气道重塑是哮喘的重要病理生理基础,主要表现为平滑肌细胞、成纤维细胞的增殖和大量细胞外基质的沉积。Homer 等^[5]研究发现在致死性和非致死性哮喘患者中,其支气管气道平滑肌面积分别增加 50%~230%和 25%~150%。本研究发现哮喘组大鼠 ASMCs 较正常对照组相比,MTT 测其吸光度值增高,ASMCs 的 G0/G1 期细胞比例减少,S 期和

Western blot 检测各组 ASMCs 细胞 cyclin D1 蛋白表达结果见图 5。哮喘 ASMCs 组的灰度值比(0.497 ± 0.004)明显高于正常对照组(0.122 ± 0.003),其差异有统计学意义($q = 12.30, P < 0.001$);哮喘 ASMCs + $1 \times 10^{-6}/1 \times 10^{-7}$ mol/L 维生素 D 组灰度值比($0.129 \pm 0.002, 0.154 \pm 0.006$)与哮喘组比较,有显著性差异(q 值分别为 9.59 和 7.63, P 均 < 0.001);哮喘 ASMCs + 1×10^{-8} mol/L 维生素 D 组灰度值比(0.223 ± 0.002)低于哮喘 ASMCs 组,差异有统计学意义($q = 6.23, P < 0.01$);其中最大剂量与最小剂量维生素 D 组相比较,差异有统计学意义($q = 8.69, P < 0.001$)。



G2/M 期细胞比例增加,提示 ASMCs 增殖明显增强。同时在哮喘 ASMCs + 各剂量维生素 D 组,其气道平滑肌细胞增殖均受到不同程度的抑制效应。流行病学研究证明维生素 D 有其明显的抗细胞增殖效应^[6],这可通过作用于细胞周期进程中的 G1/S 和 G2/M 限制点^[7],从而造成细胞周期停滞。也有研究表明,维生素 D 可通过对表皮生长因子受体(EGFR)的调节,从而激活外部信号调控酶,并最终减少细胞周期调节物,包括 cyclin D1、cyclin E、Skp2 和 P27 等,从而发挥维生素 D 作用于 G1/S 检验点诱导的细胞周期停滞^[8]。本研究表明在各维生素 D 剂量干预组,大剂量组 ASMCs 增殖明显受抑,cyclin D1 在转录和翻译水平上均明显下降,而且维生素 D 和 cyclin D1 之间呈现明显剂量-表达负相关性。这表明维生素 D 可通过作用于细胞周期,调节 cyclin D1 的表达使 ASMCs 增殖受到抑制。这与先前有关在对肝星状细胞(HSCs)的研究表明有着相似性,cyclin D1 是其活化型 HSCs 细胞周期进程中的关键调控因子^[9-10]。

细胞周期就是从 G1→S→G2→M 的演化过程,其本身的调控复杂多变,处于促进和抑制 2 种相反调控间的动态平衡,包括 CYC 的合成与降解、CDK 的激活与灭活、以及 CK1 的合成与降解等,周期蛋白在该演化过程中起着不可低估的作用。cyclin D1 只是其中一种调控蛋白,但在参与哮喘 ASMCs 的增殖调控的信号转导过程中,其可能起主要调控作用。G1/S 期、G2/M 期限限制点是细胞周期有两个关键性限制点^[11]。cyclin D1 是调控 G1/S 期限限制点的蛋白家族,可能通过 ERK、MAPK 信号通路和 PI3K 信号通路等细胞内信号转导途径,使细胞周期进程越限制点(R 点),促使 G0/G1 期进入 S 期,从而使 G0/G1 期细胞比例减少,S 期比例增加,促使 ASMCs 增殖明显。同时近年来对于 CKIs(CDK 抑制剂)的研究,特别是在用于对抗恶性肿瘤细胞增殖效应中,明确证明 1,25(OH)₂D₃ 可用于对恶性肿瘤的抗增殖作用,并证明其可能通过阻滞细胞周期 G1/S 期转化,而调节 G1/S 期和细胞周期蛋白水平。并且早有研究表明,在骨髓细胞分化过程中 1,25-(OH)₂D₃ 可上调 CDK 抑制剂 P21、P27 和 P18,从而导致细胞周期停滞,这更加证明其和细胞增殖密切相关。在对 U937 细胞的研究中发现,P21 是 VDR 作用的一个直接靶标基因^[12],同时 1,25(OH)₂D₃ 还能诱导 P27kip1 的表达,这更加表明 1,25(OH)₂D₃ 可能通过增加 CKIs 的表达造成细胞周期停滞,从而抑制细胞增殖。无直接基因作用的 1,25(OH)₂D₃ 可通过靶向转录因子调节细胞内信号转导途径来间接影响基因转录水平^[13]。同时 VDR 的抗增殖和抗分化作用,在一些肺纤维化、哮喘、COPD 及癌性疾病也明确体现^[14-16]。例如在前列腺癌中,维生素 D 可以通过影响 G1 和 G2 期而导致细胞凋亡的发生。从而抑制细胞增殖。然而也有很多遗传学家发现 VDR 可通过转录调节表达来发挥抗增殖效应,An 等^[17]最近证明 VDR 配体复合物可调节翻译后修饰以及转录因子相关蛋白的功能。更有最新 I 期临床试验证明需达到维生素 D 最大静脉给药剂量(74 μg/周),同时其药时曲线下面积为 (35.65 ± 8.01)ng/(ml·h),才能发挥其在血液中的抗增殖效应^[18]。

总之,本实验结果显示维生素 D 可以通过 cyclin D1 影响 ASMCs 的增殖,cyclin D1 作为细胞周期进程的正性调控蛋白,能够促进 ASMCs 的分裂增殖,与哮喘的发生发展密切相关。维生素 D 在作用于哮喘组大鼠 ASMCs 抗增殖的过程中,表现出对 cyclin D1 明显剂量-抑制效应相关性。这些都为

维生素 D 真正用于临床治疗哮喘提供了进一步的作用依据。

[参考文献]

- [1] Hansdottir S, Monick MM, Hinde SL, et al. Respiratory epithelial cells convert inactive vitamin D to its active form: potential effects on host defense [J]. *J Immunol*, 2008, 181(10): 7090-7099
- [2] Litonjua AA, Weiss ST. Is vitamin D deficiency to blame for the asthma epidemic? [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 120(5): 1031-1035
- [3] Brehm JM, Celedon JC, Soto-Quiros ME, et al. Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 179(9): 765-771
- [4] Lee JH, Johnson PR, Roth M, et al. ERK activation and mitogenesis in human airway smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 280(5): L1019-1029
- [5] Homer RJ, Elias JA. Airway remodeling in asthma: therapeutic implications of mechanisms [J]. *Physiology (Bethesda)*, 2005, 20(2): 28-35
- [6] Shannan B, Seifert M, Boothman DA, et al. Clusterin overexpression modulates proapoptotic and antiproliferative effects of 1,25 (OH)₂D₃ in prostate cancer cells in vitro [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007, 103 (3-5): 721-725
- [7] Zhang X, Nicosia SV, Bai W. Vitamin D receptor is a novel drug target for ovarian cancer treatment [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2006, 6(3): 229-244
- [8] Shen Z, Zhang XH, Tang J, et al. The coupling of epidermal growth factor receptor down regulation by 1α,25-dihydroxyvitamin D₃ to the hormone induced cell cycle arrest at the G1-S checkpoint in ovarian cancer cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 338(1-2): 58-67
- [9] Bouillon R, Bischoff-Ferrari H, Willett W. Vitamin D and health: perspectives from mice and man [J]. *J Bone Miner Res*, 2008, 23(7): 974-979
- [10] Samuel S, Sitrin MD. Vitamin D's role in cell proliferation and differentiation [J]. *Nutr Rev*, 2008, 66(10): S116-124
- [11] Blagosklonny MV, Pardee AB. The restriction point of the cell cycle [J]. *Cell Cycle*, 2002, 1(2): 103-110
- [12] Rots NY, Liu M, Anderson EC, et al. A differential screen for ligand-regulated genes: Identification of HoxA10 as a target of vitamin D₃ induction in myeloid leukemic cells [J]. *Mol Cell Biol*, 18(4): 1911-1998
- [13] Losel R, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(1): 46-56
- [14] Ramirez AM, Wongtrakool C, Welch T, et al. Vitamin D

inhibition of pro-fibrotic effects of transforming growth factor beta1 in lung fibroblasts and epithelial cells[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010, 118(3):142-150

[15] Litonjua AA, Weiss ST. Is vitamin D deficiency to blame for the asthma epidemic? [J]. J Allergy Clin Immunol, 2007, 120(5):1031-1035

[16] Janssens W, Lehouck A, Carremans C, et al. Vitamin D beyond bones in chronic obstructive pulmonary disease: time to act [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179(8):630-636

[17] An BS, Tavera-Mendoza LE, Dimitrov V, et al. Stimulation of Sirt1-regulated FoxO protein function by the ligand-bound vitamin D receptor[J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(20):4890-900

[18] Fakih MG, Trump DL, Muindi JR, et al. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of intravenous calcitriol in combination with oral gefitinib in patients with advanced solid tumors[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(4):1216-1223

[收稿日期] 2013-02-17

参考文献的著录格式

1. 期刊

[顺序号] 作者. 题名[J]. 刊名, 年份, 卷号(期号): 起止页码

示例:

[1] 徐春阳, 杨 荣, 张 浩, 等. NOMO1 基因在大鼠胚胎心脏发育过程中的表达[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2013, 32(6): 728-731

[2] Li JZ, Bunney BG, Meng F, et al. Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(24): 9950-9955

2. 专著

[顺序号] 作者. 书名[M]. 版本. 出版地: 出版者, 年份: 起止页码

示例:

[3] 何 维. 医学免疫学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 136

3. 析出文献

[顺序号] 析出文献责任者. 析出文献题名[M]//. 析出文献其他责任者或专著主要责任者. 专著题名: 其他题名信息. 出版地: 出版者, 年份: 析出文献起止页码

示例:

[4] 林穗芳. 美国出版业概况[M]//陆本瑞. 世界出版概况. 北京: 中国书籍出版社, 1991: 1-23

[5] 钟文发. 非线性规划在可燃毒物配置中的应用 [C]//赵 玮. 运筹学的理论与应用: 中国运筹学会第五届大会论文集. 西安: 西安电子科技大学出版社, 1996: 468-471

(本刊编辑: 接雅俐)