

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.32.003
文章编号: 1005-8982 (2018) 32-0012-05

烟雾对支气管哮喘大鼠肺组织激活素 A 表达的影响

李晶晶, 朱述阳

(徐州医科大学, 江苏 徐州 221004)

摘要: 目的 观察烟雾暴露对卵白蛋白 (OVA) 致敏的急性支气管哮喘 (以下简称哮喘) 大鼠模型肺组织中激活素 A (ActA) 表达的变化, 探讨烟雾对哮喘的影响。**方法** 雄性 SD 大鼠 32 只, 随机分为 4 组: 正常对照组、烟雾对照组、哮喘模型组及烟雾哮喘组, 分别复制哮喘和烟雾暴露模型。采用苏木精-伊红染色观察肺组织病理学改变, 实时荧光定量聚合酶链反应和 Western blot 检测各组大鼠肺组织中 ActA mRNA 和蛋白表达的变化。**结果** ①哮喘模型组和烟雾对照组 ActA mRNA 表达水平高于正常对照组 ($P < 0.05$), 烟雾哮喘组 ActA mRNA 表达水平高于哮喘模型组和烟雾对照组 ($P < 0.05$); ②哮喘模型组和烟雾对照组 ActA 蛋白表达水平高于正常对照组 ($P < 0.05$), 烟雾哮喘组 ActA 蛋白表达水平高于哮喘模型组和烟雾对照组 ($P < 0.05$)。**结论** 烟雾暴露可以提高 OVA 致敏的急性哮喘大鼠模型肺组织中 ActA mRNA 表达水平, 促进 ActA 蛋白的表达, 从而加重气道炎症。

关键词: 支气管哮喘; 烟雾暴露; 激活素 A

中图分类号: R562.25

文献标识码: A

Impact of cigarette smoke exposure on expression of activin A in lung tissue of OVA-sensitized asthmatic rats

Jing-jing Li, Shu-yang Zhu

(Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221004, China)

Abstract: Objective To observe the change of activin A (ActA) expression in the lung tissue of ovalbumin (OVA)-sensitized asthmatic rats after exposure to smoke, and explore the impact of smoke on asthma. **Methods** Thirty-two male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups with 8 rats in each group, namely a normal control group, an asthmatic model group, a cigarette smoke control group, a cigarette smoke exposure and asthmatic group. The rats in the exposed groups were exposed to either aerosolized OVA, tobacco smoke, or both tobacco smoke and OVA, respectively. The pathological changes of the lung tissue were observed after HE staining. The expressions of ActA mRNA and protein in the lung tissue were detected by qRT-PCR and Western blot (WB). **Results** The levels of ActA mRNA in the asthmatic model group and the smoke control group were significantly higher than that in the normal control group ($P < 0.05$), and the level of ActA mRNA in the smoke exposure and asthmatic group was significantly higher than those in the asthmatic model group and the smoke control group ($P < 0.05$). The levels of ActA protein in the asthmatic model group and the smoke control group were significantly higher than that in the normal control group ($P < 0.05$), and the level of ActA mRNA in the smoke exposure and asthmatic group was significantly higher than those in the asthmatic model group and the smoke control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Cigarette smoke can increase the mRNA and protein expression levels of ActA in the lung tissue of OVA-sensitized asthmatic rats, and exacerbate the asthmatic airway inflammation.

Keywords: bronchial asthma; cigarette smoke exposure; activin

收稿日期: 2018-05-20

[通信作者] 朱述阳, E-mail: jacinthe1026@126.com; Tel: 15189201147

支气管哮喘(以下简称哮喘)是一种以慢性气道炎症为特征的异质性疾病,涉及多种细胞及其组分。香烟烟雾是哮喘的促发因素之一,可以改变哮喘患者气道炎症特点,加重气道重塑,降低激素治疗的反应性。激活素 A(activin A, ActA)是一种多效性细胞因子,属于转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 家族中一员。ActA 可以刺激多种炎症介质,如 IL-1 β 、IL-6、IL-13、TNF、一氧化氮 NO 等的产生,促进气道平滑肌细胞和成纤维细胞增殖,增强气道炎症和重塑^[1],在哮喘的发生、发展中起重要作用。本研究通过复制烟雾暴露的急性哮喘大鼠模型,观察烟雾刺激对致敏大鼠肺组织 ActA mRNA 和蛋白表达的影响,探讨烟雾暴露哮喘大鼠的气道炎症特点,为吸烟哮喘患者寻找新的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠 32 只,6 ~ 8 周龄,体重 (180 ± 20) g,由徐州医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要仪器和试剂

卵白蛋白 (ovalbumin, OVA) (美国 Sigma 公司),庐山牌香烟 (烟碱 0.8 mg, 焦油量 11 mg), 小鼠抗大鼠 ActA 抗体 (美国 Abcam 公司), RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), Trizol 总 RNA 提取试剂盒、SYBRGreen 购自北京天根生物技术有限公司,便携式雾化器 (江苏鱼跃医疗设备有限公司),光学显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.3 模型复制及实验分组

32 只雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、烟雾对照组、哮喘模型组及烟雾哮喘组,每组 8 只。参照文献 [2] 复制哮喘大鼠模型:分别于第 1 和 8 天给予大鼠腹腔注射 10% OVA 和 Al(OH)₃ 混合液 1 ml [含 OVA 1 g, Al(OH)₃ 100 mg] 致敏;第 15 天开始雾化吸入 2% OVA 溶液,60 ml/次,1 次/d,中等雾量,40 min/次,共 4 周。正常对照组:腹腔注射生理盐水 1 ml 代替 OVA,第 15 天开始雾化吸入生理盐水,60 ml/次,1 次/d,共 4 周。烟雾对照组:前期复制同正常对照组,从第 15 天起,生理盐水雾化 30 min 后,参照文献 [3] 自制半封闭烟熏箱,每次点燃 2 支香烟燃烧 8 min,休息 5 min 后再点燃 2 支,共 10 支,1 次/d,

共 4 周。烟雾哮喘组:前期复制同哮喘模型组,每日雾化 OVA 30 min 后,继续按烟雾对照组处理方法复制烟雾模型,共 4 周。

1.4 标本制备

末次雾化诱发哮喘 24 h 后,以 1% 水合氯醛 (400 mg/kg) 腹腔注射麻醉,腹主动脉放血处死大鼠,完全游离心、肺组织,取左肺上叶组织,于 4% 多聚甲醛溶液中浸润固定 24 h,常规石蜡包埋、切片,用于苏木精-伊红染色。取右肺上叶组织放入 DEPC 处理过的冻存管中,放于 -80℃ 冰箱冻存用于实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR),其余肺组织迅速放入生理盐水中,洗去血渍,保存于 -80℃ 冰箱中用于 Western blot 检测。

1.5 qRT-PCR

按照 Trizol 总 RNA 提取试剂盒说明书进行操作,提取肺组织中总 RNA,检测 RNA 浓度和鉴定 RNA 质量。取 1 μ g 总 RNA,根据逆转录试剂盒说明书合成互补脱氧核糖核酸 (cDNA),反应体系为 1 μ l cDNA, 1 μ l ActA 引物 (见表 1), 10 μ l 2 \times SYBR PCR, 8 μ l ddH₂O。反应条件:95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 20 s, 共 40 个循环,采集荧光信号。并自 60 ~ 99℃ 缓慢升温进行熔解曲线绘制。结果以 PCR 反应指数增长初期荧光信号跨越阈值时的反应循环数 (Ct 值) 表示, Δ Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因}, $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct_{实验组} - Δ Ct_{正常对照组}, 最后根据公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算实验组目的基因 ActA 的相对表达量。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列	长度 / bp
Act-A	正向: 5' -TGCTTTGGCTGAGAGGATTT-3'	210
	反向: 5' -CGGGTCTCTTCTTCAAGTGC-3'	
GAPDH	正向: 5' -TCTCTGCTCCTCCCTGTTC-3'	87
	反向: 5' -ACACCGACCTTCACCATCT-3'	

1.6 Western blot 检测

收集不同处理组的肺组织,研磨后加入 RIPA 蛋白裂解液,冰上缓慢裂解 20 min, 4℃、12 000 r/min 离心 15 min,取上清,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒对提取的总蛋白进行蛋白定量。取 80 μ g 总蛋白上样,

电泳结束后电转至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 一抗 (小鼠抗大鼠 ActA, 1 : 1 000 稀释) 4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 二抗 (HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG, 1 : 5 000 稀释) 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次后 ECL 显影。采用 Image J 扫描蛋白灰度值, 以 ActA 蛋白与 GAPDH 蛋白的灰度值比值作为目的蛋白的表达水平, 以正常对照组目的蛋白灰度值与不同处理组目的蛋白灰度值的比值为统计指标, 做柱状图。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 16.0 统计软件和 GraphPad Prism 软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组比较用单因素方差分析, 组间两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

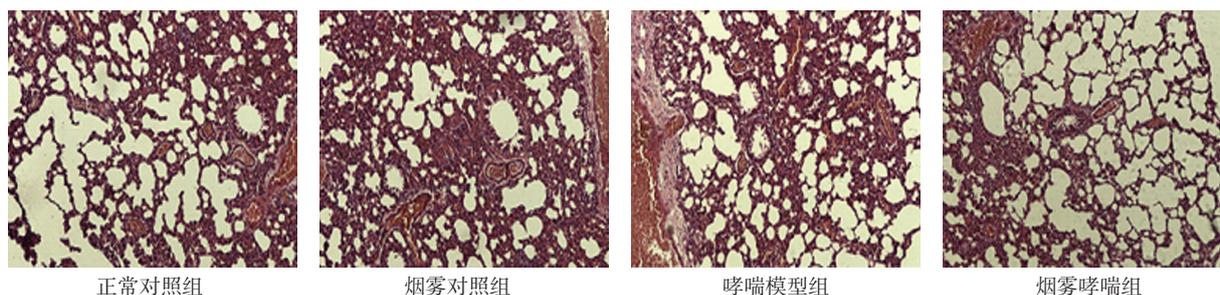
2.1 各组大鼠行为改变

正常对照组大鼠毛发白亮细密, 精神状态良好,

未见哮喘样发作。烟雾对照组大鼠活动减少, 毛发黄涩无光泽, 未见哮喘发生。哮喘模型组毛发白暗稀疏, 于雾化激发后, 表现出烦躁不安、呼吸频率加快、站立不稳等行为。烟雾哮喘组除上述表现外, 精神萎靡, 毛发黄涩稀疏, 喘息症状更为严重, 呼吸明显加重, 频率加快。

2.2 各组大鼠肺组织病理学改变

正常对照组大鼠支气管管腔规则, 纤毛排列整齐, 肺泡及细支气管形态、结构正常, 血管腔、肺泡腔、肺间质未见炎症细胞浸润。烟雾对照组支气管纤毛柱状上皮细胞脱落或变性, 气道壁增厚, 以中性粒细胞和淋巴细胞浸润为主。哮喘模型组肺组织以淋巴细胞浸润为主, 可见大量嗜酸性粒细胞, 部分气道壁增厚, 管腔狭窄。烟雾哮喘组大鼠肺泡腔不规则扩大, 肺泡间隔变薄或断裂, 气道壁增厚明显, 可见淋巴细胞、嗜酸粒细胞及中性粒细胞浸润。见图 1。



正常对照组

烟雾对照组

哮喘模型组

烟雾哮喘组

图 1 各组大鼠肺组织病理学改变 (HE \times 100)

2.3 各组大鼠肺组织 ActA mRNA 表达水平

各组大鼠肺组织 ActA mRNA 表达水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, 与烟雾对照组相比, 烟雾哮喘组 ActA mRNA 表达升高 ($P < 0.05$); 与哮喘模型组相比, 烟雾哮喘组中 ActA mRNA 表达升高 ($P < 0.05$); 哮喘模型组与烟雾对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2 和图 2。

2.4 各组大鼠肺组织 ActA 蛋白表达水平

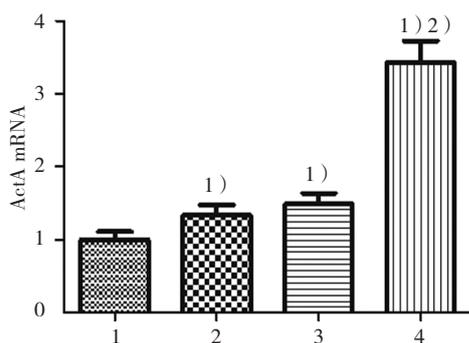
4 组 ActA 蛋白表达水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, 烟雾对照组与哮喘模型组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与烟雾对照组相比, 烟雾哮喘组 ActA 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与哮喘模型组相比, 烟雾哮喘组 ActA 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。结果提

示烟雾暴露可以提高大鼠肺组织中 ActA 的表达。见表 2 和图 3。

表 2 各组大鼠肺组织 ActA mRNA 和蛋白表达水平比较 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	ActA mRNA	ActA 蛋白
正常对照组	0.996 \pm 0.039	1.067 \pm 0.446
烟雾对照组	1.336 \pm 0.049 ¹⁾	1.412 \pm 0.037 ¹⁾
哮喘模型组	1.487 \pm 0.052 ¹⁾	1.591 \pm 0.046 ¹⁾
烟雾哮喘组	3.426 \pm 0.105 ¹⁾²⁾	2.072 \pm 0.073 ¹⁾²⁾
F 值	272.311	64.147
P 值	0.000	0.000

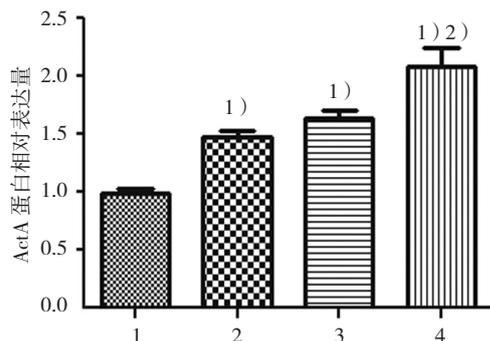
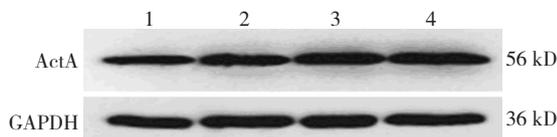
注: 1) 与正常对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与烟雾对照组、哮喘模型组比较, $P < 0.05$



1: 正常对照组; 2: 烟雾对照组; 3: 哮喘模型组; 4: 烟雾哮喘组。1) 与正常对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与烟雾对照组、哮喘模型组比较, $P < 0.05$

图 2 各组大鼠肺组织 ActA mRNA 表达水平比较

($n=8, \bar{x} \pm s$)



1: 正常对照组; 2: 烟雾对照组; 3: 哮喘模型组; 4: 烟雾哮喘组。1) 与正常对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与烟雾对照组、哮喘模型组比较, $P < 0.05$

图 3 各组大鼠肺组织 ActA 蛋白表达水平比较

($n=8, \bar{x} \pm s$)

3 讨论

吸烟是哮喘发病的危险因素之一。哮喘患者的吸烟率约为 20%, 与普通人群的吸烟率非常接近^[4], 但哮喘患者吸烟频率可能更高^[5]。烟雾暴露可以通过活化中性粒细胞和巨噬细胞, 改变哮喘气道炎症特点, 导致哮喘表型变化^[6]。本实验中, 大鼠肺组织 HE 染色显示烟雾暴露后哮喘大鼠气道壁较哮喘模型组增厚, 气道周围炎症细胞浸润更明显, 证实烟雾暴露可以加重和改变哮喘气道原有的炎症反应^[7]。

本实验分别复制哮喘和烟雾模型, 模拟烟雾诱发、加重哮喘的过程, 进一步探讨烟雾对哮喘的影响。

目前认为, 理想的哮喘动物模型通常以出现典型哮喘样发作、病理组织出现多种炎症细胞浸润(包括嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞)为特征。笔者在研究过程中观察到, 哮喘模型组、烟雾哮喘组大鼠于 OVA 雾化激发后出现不同程度烦躁不安、呼吸频率加快、站立不稳等哮喘发作症状, 肺组织病理学也符合哮喘的主要特征, 表明本实验哮喘模型复制成功。本研究结果显示, 烟雾对照组和烟雾哮喘组大鼠毛色不同程度黄涩, 精神萎靡; 肺组织病理学结果显示气道周围以中性粒细胞浸润为主, 提示烟雾模型复制成功。

ActA 是最早在性腺中发现的由 2 个 β 亚基 ($\beta A \beta A$) 构成的同型二聚体糖蛋白, 调节多种生物学过程, 包括免疫调节、组织修复、炎症反应等。SAMITAS 等^[8]对 57 例无吸烟史成年人调查(包括 16 例健康人、19 例持续轻中度哮喘患者和 22 例持续重症哮喘患者)显示, 哮喘患者血清和肺泡灌洗液中 ActA 水平较正常对照组明显升高, 但是 ActA 受体蛋白 (ALK-4 和 Act-RIIA) 表达减少, 特别是在重症哮喘患者中。由此推断, 在哮喘气道炎症、肺组织及气道上皮中, ActA 表达水平的变化起非常重要的作用。本研究发现, 烟雾对照组和哮喘模型组大鼠肺组织 ActA mRNA 和蛋白表达水平较正常对照组升高, 且烟雾哮喘组 ActA mRNA 和蛋白表达水平比烟雾对照组和哮喘模型组升高, 气道周围炎症细胞增多, 气道壁增厚, 表明 ActA 参与哮喘气道炎症的病理过程, 与上述研究结果一致。

香烟烟雾可以诱导气道上皮表达 ActA, 促进 Act-smad 信号传递, 向细胞内传递目的基因, 如 TGF- β_1 、ActA 等, 而 TGF- β_1 又加强 ActA 的表达, 形成一个正反馈环。烟雾暴露可以刺激上皮细胞产生 ActA, 加重气道炎症反应, 提示烟雾暴露参与 ActA 代谢过程^[9]。但烟雾暴露对哮喘肺组织中 ActA 表达的影响有多大, 目前尚不明确。本研究通过复制大鼠哮喘模型和烟雾模型, 观察烟雾暴露对 OVA 致敏的急性哮喘模型大鼠肺组织 ActA mRNA 和蛋白表达的影响, 结果显示, 烟雾哮喘组 ActA mRNA 和蛋白表达水平高于哮喘模型组, 提示香烟烟雾可以上调哮喘大鼠肺组织 ActA mRNA 和蛋白表达水平, 加重气道炎症反应。结合既往研究, 笔者推断, 香烟烟雾可以通过与气道上皮细胞相互作用, 产生大量 ActA, 进而释放出多种炎症介质和细胞因子, 促进哮喘气道炎症的发

生^[10]。本实验中, 烟雾对照组 ActA 蛋白表达水平与哮喘模型组无差异, 烟雾哮喘组 ActA 蛋白表达水平与哮喘模型组有差异, 证实香烟烟雾可以促进、加重哮喘的气道炎症反应。

通过基因敲除或使用 ActA 拮抗剂阻断 ActA 信号传递通路可以进一步明确香烟烟雾、ActA 与哮喘的关系, 受工作量较大、费用较高等因素限制, 只能在后续实验中进一步完善。

综上所述, 吸烟可以促进致敏大鼠气道 ActA mRNA 和蛋白的表达, 产生、释放多种炎症介质, 加重哮喘气道炎症, 但确切的作用机制仍需进一步研究。阻断 ActA 信号传递很有可能是治疗哮喘的一种有效方法, 为哮喘的防治开辟了新的途径。

参 考 文 献:

- [1] HARDY C L, NGUYEN H A, MOHAMUD R, et al. The activin A antagonist follistatin inhibits asthmatic airway remodelling[J]. *Thorax*, 2013, 68(1): 9-18.
- [2] 沈华浩, 王莘莉. 支气管哮喘小鼠模型应用评价 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2005, 28: 284-286.
- [3] 许三林, 吴人亮, 陈春莲, 等. 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: 417-419.
- [4] JIMÉNEZ-RUIZ C A, ANDREAS S, LEWIS K E, et al. Statement on smoking cessation in COPD and other pulmonary diseases and in smokers with comorbidities who find it difficult to quit[J]. *European Respiratory Journal*, 2015, 46(1): 61-79.
- [5] CERVERI I, CAZZOLETTI L, CORSICO A G, et al. The impact of cigarette smoking on asthma: a population-based international cohort study[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2012, 158(2): 175-183.
- [6] KRISIUKENIENE A, BABUSYTE A, STRAVINSKAITE K, et al. Smoking affects eotaxin levels in asthma patients[J]. *Journal of Asthma*, 2009, 46(5): 470-476.
- [7] BAKAKOS P, KOSTIKAS K, LOUKIDES S. Smoking asthma phenotype: diagnostic and management challenges[J]. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 2016, 22(1): 53-58.
- [8] SAMITAS K, POULOS N, SEMITEKOLOU M, et al. Activin-A is overexpressed in severe asthma and is implicated in angiogenic processes[J]. *European Respiratory Journal*, 2016, 47(3): 769-782.
- [9] LOOMANS H A, ANDL C D. Intertwining of activin a and TGF β signaling: dual roles in cancer progression and cancer cell invasion[J]. *Cancers*, 2014, 7(1): 70-91.
- [10] VERHAMME F M, BRACKE K R, AMATNGALIM G D, et al. Role of activin-A in cigarette smoke-induced inflammation and COPD[J]. *European Respiratory Journal*, 2014, 43(4): 1028-1041.

(童颖丹 编辑)