

1,25 二羟维生素 D₃ 对哮喘大鼠气道重塑及纤溶酶原激活物抑制剂-1 的影响

林 志, 张焕萍

(山西医科大学第一医院呼吸科, 太原 030001)

【摘要】 目的 观察 1,25 二羟维生素 D₃ (VD) 对哮喘大鼠气道重塑及其肺组织中纤溶酶原激活物抑制剂-1 (PAI-1) 表达和血浆中 PAI-1 含量的影响。**方法** 30 只健康雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组、哮喘组、VD 干预组, 每组各 10 只。卵蛋白致敏和激发复制慢性哮喘模型。VD 干预组每次激发前给予 VD 干预。用免疫组化检测肺组织 PAI-1 的表达, 酶联免疫法测血浆中 PAI-1 含量, 采用图像分析进行图像分析。**结果** (1) 哮喘组支气管管壁厚度较对照组和 VD 干预组显著增加 ($P < 0.01$)。 (2) 哮喘组 PAI-1 在大鼠肺组织的表达程度较对照组和 VD 干预组显著增加 ($P < 0.01$)。 (3) 哮喘大鼠血浆中 PAI-1 含量较对照组和 VD 干预组明显增加 ($P < 0.01$)。 (4) 直线相关性分析显示, 哮喘组支气管管壁厚度与大鼠肺组织中 PAI-1 表达水平呈正相关 ($r = 0.822, P < 0.01$); 哮喘组支气管管壁厚度与大鼠血浆中 PAI-1 含量呈正相关 ($r = 0.942, P < 0.01$)。**结论** 1,25 二羟维生素 D₃ 干预可明显减轻慢性哮喘气道重塑的病理改变, 并可通过部分抑制 PAI-1 的表达来延缓气道重塑。

【关键词】 哮喘; 气道重塑; 纤溶酶原激活物抑制剂-1; 1,25 二羟维生素 D₃

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)03-0028-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.03.006

Effects of 1,25(OH)₂D₃ on PAI-1 in Asthma Rats of Airway Remodeling

LIN Zhi, ZHANG Huan-ping

(Department of Respiration Disease, the First Affiliate Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

【Abstract】 Objective To observe the effects of 1,25(OH)₂D₃ on the airway remodeling and the expression of PAI-1 in asthma rats. **Methods** Eighteen wistar rats were randomly divided into three group: the control group, the asthma model group, and the 1,25(OH)₂D₃ group. The asthma model was established by sensitization and challenged with ovalbumin, and the rats in the 1,25(OH)₂D₃ group injected 1,25(OH)₂D₃ before the challenge. The following parameters were measured: the protein expression of PAI-1 by immunohistochemistry and the level of PAI-1 by ELISA. the bronchial wall thickness by computer-assisted image analysis system. **Results** (1) the bronchial wall thickness in the asthma group was higher than in the other groups ($P < 0.01$). (2) The expression of PAI-1 in the asthma group higher than that in other groups ($P < 0.01$). (3) The lever of PAI-1 in plasma of asthma group was higher than that in other groups ($P < 0.01$). (4) There was a positive correlation between the activity of PAI-1 in rat lungs and the bronchial wall thickness ($r = 0.822, P < 0.01$), the same between the level of PAI-1 in plasma and the bronchial wall thickness ($r = 0.942, P < 0.01$). **Conclusion** 1,25(OH)₂D₃ could decrease the expression of PAI-1 in lung tissues of asthmatic rats and the level of PAI-1 in plasma and inhibit airway remodeling.

[基金项目] 2005 年山西高校科技研究开发项目 (20051001)。

[作者简介] 林志 (1983 -), 女, 硕士生, 研究方向: 支气管哮喘。E-mail: lz200802@163.com。

[通讯作者] 张焕萍 (1968 -), 女, 博士, 硕士生导师, 主任医师, 研究方向: 支气管哮喘。E-mail: zhp326@163.com。

【Key words】 Asthma; Airway remodeling; PAI-1; 1,25(OH)₂D₃

支气管哮喘(简称哮喘)是由多种细胞及细胞成分参与的慢性炎症疾病,传统认为它是一种气道可逆性疾病,然而许多研究表明^[1,2],哮喘患者随着疾病的进展,其功能进行性恶化,发生不可逆性气流受限时,其病理基础是气道重塑。有研究证实,纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)即主要的血浆纤溶酶原活化抑制剂,在组织重塑中发挥重要作用;维生素 D₃ 的活性代谢产物-1,25-二羟维生素 D₃(1,25(OH)₂D₃),对哮喘气道重塑有一定干预作用^[3]。但有关 1,25(OH)₂D₃ 影响 PAI-1 在哮喘气道的表达,缓解气道重塑的作用尚未阐明。本实验通过观察肺组织和血浆 PAI-1 水平及气道结构变化,探讨 PAI-1 与气道重塑关系及 1,25(OH)₂D₃ 干预作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

OVA 和 1,25(OH)₂D₃ 为美国 Sigma 公司产品,鼠抗 PAI-1(一抗)和免疫组化试剂盒购自博士德公司,PAI-1 的酶联免疫法(ELISA)测定试剂盒为上海太阳公司。

1.2 实验动物分组及处理

健康雄性 Wistar 大鼠 30 只,体重 160~200 g,由山西医科大学实验动物中心提供(SCXK(晋)(2009-0001)),随机分为 3 组(每组 10 只):即对照组、哮喘组及 VD 干预组。综合文献及本科室先前的制备方法^[4],并加以改正,第 1 天和第 8 天,哮喘组和 VD 干预组动物分别腹腔注射 10% OVA 生理盐水溶液 1 mL(内含卵蛋白 100 mg 和氢氧化铝 100 mg)致敏;对照组动物用生理盐水代替。第 15 天,将哮喘组和 VD 干预组动物置于自制的密闭有机玻璃箱(60 cm×40 cm×40 cm)中,用超声雾化器将 1% OVA 生理盐水溶液雾化吸入激发哮喘,每次 30 min,每天 1 次,共 8 周;VD 干预组动物吸入 1% OVA 生理盐水溶液 30 min 前腹腔注射 1000 ng^[5] 1,25(OH)₂D₃;对照组用生理盐水代替 OVA 进行,方法相同。末次激发后 24 h 内处理动物、取材。

1.3 肺组织形态观察及图像分析

右肺中叶常规固定,石蜡切片,HE 染色,光镜下形态学观察,每个标本选取 4 个直径在 100~200 μm 范围内的不含软骨的完整气管横断面,采用

Image-proplus6.0 图像分析软件进行测量,测定参数包括支气管壁内周长(Pi)、支气管管壁外缘所围面积(WAt₁)、支气管管壁内缘所围面积(WAt₂),分析管壁总面积(WAt)=WAt₁-WAt₂,以 WAt/Pi(μm²/μm)表示支气管管壁厚度^[6],并以此衡量气道重塑的程度。

1.4 肺组织 PAI-1 免疫组织化学染色

免疫组化方法严格按说明书染色步骤进行,抗原修复后,孵育一抗,PAI-1 兔抗鼠多克隆抗体按 1:100 稀释。用 Image-proplus6.0 图像分析软件采集图像,测量阳性区域的平均光密度,取其平均值代表 PAI-1 的相对表达,并进行图像半定量分析。设阴性对照及空白对照。

1.5 血浆中 PAI-1 水平的测定

右心采血后 30 min 内离心,上清于 -20℃ 冻存,1 个月内,按照 ELISA 试剂盒说明书测定血浆 PAI-1 的水平。用标准曲线求得 PAI-1 浓度。

1.6 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件包进行统计分析,实验资料用均数±标准差($\bar{X} \pm S$)表示,多组间比较采用单因素方差分析和 LSD 检验。并进行直线相关分析。检验水平取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组激发后哮喘发作情况

哮喘多在激发后 30 min 内发作,哮喘组小鼠出现口唇发绀、呼吸急促,烦躁不安,活动频繁等表现,而 VD 干预组发作程度有所减轻,对照组大鼠行动敏捷,未见异常。

2.2 三组大鼠肺组织病理改变

与对照组相比,哮喘组大鼠肺组织镜下可见气道上皮细胞破坏、黏膜下层和平滑肌增厚、杯状细胞增生、形成许多空泡、气道腔有脱落的细胞及黏液、气道及血管周围不同程度的炎性细胞浸润等改变。图像分析结果表明,哮喘组大鼠小气道 WAt/Pi 较对照组大鼠增加,差异有统计学意义($P < 0.01$),VD 干预组 WAt/Pi 较哮喘组轻,差异有统计学意义($P < 0.01$)。(表 1)

2.3 免疫组化测定肺组织中 PAI-1 的分布与表达

对照组可见 PAI-1 在细胞浆呈阴性或极小部分

表 1 大鼠支气管管壁厚度、肺组织 PAI-1 蛋白相对表达量及血浆中 PAI-1 水平的比较

Tab.1 The thickness of airway, the expression of PAI-1 in lung tissue and the content of PAI-1 in blood plasma in three groups

组别 Group	管壁厚度 WAt/ Pi	PAI-1 平均光密度 Average optical	PAI-1 含量 Content
对照组 Control group	15.878 ± 1.650	0.224 ± 0.014	0.432 ± 0.256
VD 干预组 VD group	36.003 ± 3.211 ^{ab}	0.270 ± 0.017 ^{ab}	3.075 ± 0.440 ^{ab}
哮喘组 Asthma group	48.621 ± 5.674 ^a	0.310 ± 0.020 ^a	6.282 ± 0.424 ^a
F 值	108.520	36.175	350.794
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

注: a 与对照组比较, $P < 0.01$; b 与哮喘组比较, $P < 0.01$

Note: a compare with control group, $P < 0.01$; b compare with asthma group, $P < 0.01$

弱阳性表达;哮喘组, PAI-1 在胞浆呈棕黄色强阳性表达, 少量胞核着色, 分布于支气管全层, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); VD 干预组为弱阳性表达, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。(表 1)。

2.4 血浆中 PAI-1 含量

哮喘组大鼠血浆中 PAI-1 的含量显著高于对照组和 VD 干预组 ($P < 0.01$)。(表 1)。

2.5 相关性分析

相关分析表明, 哮喘组支气管管壁厚度与大鼠肺组织中 PAI-1 表达水平呈正相 ($r = 0.822$ $P < 0.01$), 哮喘组支气管管壁厚度与大鼠血浆中 PAI-1 含量呈正相关 ($r = 0.942$ $P < 0.01$)。

3 讨论

气道重塑即气道壁结构的变化, 病理改变包括: 气道壁增厚、上皮细胞损伤、网状基底膜增厚 (RBM)、支气管平滑肌 (ASM) 增大和血管改变^[1]。是慢性哮喘反复发作及顽固性哮喘的重要病理基础。气道上皮细胞受损后内皮素-1 释放增多, 能够刺激气道平滑肌细胞增生肥大, 刺激成纤维细胞增生并促进其分泌纤维连接素、肌腱蛋白, 促进气道纤维化形成, 参与气道重塑。RBM 的增厚主要由于胶原 I、III、IV 增多所致, 故又称上皮下纤维化。上皮下纤维化能减少气道黏膜褶皱的数量和改变黏膜折叠的类型, 使气道黏膜在支气管平滑肌收缩时从多而细的皱折变为少而大的皱折, 增加气道阻力和加重气道狭窄, 促进气道重塑形成。ASM 细胞不但控制气道口径, 其结构改变可引起气道高反应和气道重塑; 还可参与哮喘的免疫调节, 分泌炎症介质如生长因子, 趋化因子和白介素等^[7]。

纤溶系统中的 PAI-1 在气道重塑中有一定作用。PAI-1 抑制细胞外基质蛋白溶解作用, 导致细胞外基质沉积, 产生哮喘气道重塑; 除此之外, 哮喘

的支气管平滑肌细胞在体外产生大量 PAI-1, 在平滑肌细胞局部诱导平滑肌细胞合成胶原; PAI-1 还能促进新生血管的形成, 并和肥大细胞、嗜酸性粒细胞形成复杂的调节网络参与气道重塑^[8]。有研究证实 PAI-14G 等位基因可能与气道重塑有关, 且患有哮喘和过敏性鼻炎的土耳其儿童较健康者携带 PAI-14G 等位基因的机率高^[9]。

1,25(OH)₂D₃ 是体内重要的维生素 D₃ 的活性代谢产物, 生物学效应通过基因组和非基因组两种机制介导。前者是 1,25(OH)₂D₃ 发挥大多数生物活性的作用机制, 依赖于细胞核内的 VDR。VDR 不仅存在于小肠上皮细胞、肾细胞和骨细胞等经典的靶细胞, 还存在于视网膜、垂体、肌肉、乳腺、卵巢、脾、肺等多种组织中, 说明 1,25(OH)₂D₃ 除经典经典的调节骨代谢及钙磷代谢平衡的生理功能, 还具有更为广泛的生物学调节作用^[5]。例如, 1,25(OH)₂D₃ 可改善哮喘气道重塑; 抑制体外培养的被动致敏人哮喘 ASM 细胞增殖; 下调 MMP-9 表达^[5]。维生素 D 缺乏和气道高反应性, 肺功能低下的顽固性哮喘和哮喘患者激素耐受有关^[10]。怀孕期间母体从食物中摄入适量维生素 D 可减少儿童哮喘和过敏性鼻炎的发生^[11]。

有研究报道, 1,25(OH)₂D₃ 抑制 PAI-1 在冠心病患者心脏中的表达^[12]; 但目前有关 1,25(OH)₂D₃ 影响 PAI-1 在哮喘肺组织的表达, 缓解气道重塑尚不清楚。实验结果显示: 哮喘组与对照组相比, PAI-1 水平升高 ($P < 0.01$), 支气管管壁厚度明显增高 ($P < 0.01$)。1,25(OH)₂D₃ 干预后 PAI-1 水平下降及支气管管壁厚度减低。直线相关分析显示, 哮喘组支气管管壁厚度和 PAI-1 呈正相关, 用支气管管壁厚度来衡量气道重塑程度, 提示 PAI-1 与哮喘气道重塑密切相关, 1,25(OH)₂D₃ 可能通过下调 PAI-1 水平来改善气道重塑, 但不能逆转。本实验只局限在蛋白水平, 对 PAI-1 核酸水平的研究有待于进一步探索。

参考文献:

- [1] 钟南山. 支气管哮喘基础与临床(第1版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:448-464.
- [2] 范晓艳,张焕萍. p-ERK1/2 及 ERK2mRNA 在哮喘大鼠气道中的表达变化[J]. 中国比较医学杂志,2008,18(3):14-18.
- [3] Song Y, Wu C, Qi H. Effect of $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ (a vitamin D analogue) on passively sensitized human airway smooth muscle cells[J]. *Respirology*,2007,12(4):486-494.
- [4] Matthiesen S, Bahulayan A, Holz O, et al. MAPK pathway mediates muscarinic receptor-induced human lung fibroblast proliferation[J]. *Life Sci*,2007,8(24):2259-2262.
- [5] 宋颖芳,戚好文,吴昌归. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对哮喘小鼠气道重塑及基质金属蛋白酶-9 表达的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2008,13(3):3-5.
- [6] Yamaguchi M, Niimi A, Matsumoto H, et al. Sputum levels of transforming growth factor β_1 in asthma: relation to clinical and computed tomography findings[J]. *J Investing Allergol Clin Immunol*,2008,18(3):202-206.
- [7] B. B. Araujo, M. Dolnikoff, L. F. F. Silva. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma[J]. *Eur Respir J*,2008,32(9):61-69.
- [8] I. Kucharewicz A, Mogie Inicki I, Kasacka W, et al. Plasmin System Regulation in an Ovalbumin-Induced Rat Model of Asthma[J]. *Arch Allergy Immunol*,2008,147(6):190-196.
- [9] Ozlem Yilmaz Ozbek, M. D, F. Belgin Atac, Ph. D, Ersin Ogus, Ph. D, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 gene 4G/5G polymorphism in Turkish children with asthma and allergic rhinitis[J]. *Allergy and Asthma Proceedings*, 2009, 2(1):13-19.
- [10] Sandhu MS, Casale TB. The role of vitamin D in asthma[J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2010,9(3):105-133.
- [11] Erkkola M, Kaila M, Nwaru BI, et al. Maternal vitamin D intake during pregnancy is inversely associated with asthma and allergic rhinitis in 5-year-old children[J]. *Clin Exp Allergy*, 2009,39(6):875-882.
- [12] Ruth Wu-Wong J, Nakane M, Ma J, Cook AL. Vitamin D analogs down-regulate plasminogen activator inhibitor-1 in human coronary artery smooth muscle cells[J]. *Thromb Haemost*, 2005,3(7):1545-1546.

[修回日期]2011-12-13

(上接第 27 页)

- [28] 孙军平,汪建新,郭丽娜,等. 内毒素致兔急性肺损伤及血必净保护作用[J]. 军医进修学院学报,2009,30(1):102-104.
- [29] 高红梅,常文秀,曹书华. “血必净”注射液对内毒素刺激的内皮细胞的影响[J]. 中国急救医学,2005,25(6):437-438.
- [30] 孙正达,沈建明,沈蕾. 血必净注射液改善脓毒症大鼠心脏功能的作用[J]. 复旦大学学报(医学版),2008,35(2):208-211.
- [31] 任添华,姜悦,任爱民,等. 单相速发型多脏器功能障碍综合征动物模型的研究[J]. 首都医科大学学报,2005,26(4):479-481.
- [32] 平易,刘骏峰,谢琼红,等. 内毒素介导的多脏器功能障碍综合征动物模型的研究[J]. 中国临床医学,2009,16(2):287-290.

[修回日期]2011-12-20