

# 支气管哮喘大鼠气道平滑肌细胞表型转变及止喘胶囊的干预作用

刘芳<sup>1</sup> 方泓<sup>2</sup> 唐斌擎<sup>2</sup> 王丽新<sup>2</sup> 张英兰<sup>2</sup> 吴银根<sup>2</sup>

**摘要** **目的** 观察支气管哮喘气道平滑肌细胞表型转变及止喘胶囊的干预作用。**方法** 雄性 SD 大鼠 60 只随机分为正常对照组、模型组、止喘胶囊组(中药组)、地塞米松组(西药组)、中西医结合组(结合组), 每组 12 只, 制备支气管哮喘大鼠模型。于激发第 4 周用电子显微镜观察气道平滑肌细胞组织形态学改变; 分别于激发第 2 周、第 4 周检测中小气道  $\text{sm}\alpha\text{-actin}$  和  $\text{sm-MHC}$  蛋白表达。**结果** 电镜下可见模型组气道平滑肌细胞内肌丝稍减少, 合成细胞器增多; 与正常对照组比较, 激发第 4 周时模型组骨架蛋白  $\text{sm-MHC}$  和  $\text{sm}\alpha\text{-actin}$  表达减少 ( $P < 0.05$ )。西药组平滑肌细胞内肌丝正常, 但可见线粒体嵴断裂, 基质丢失等缺氧改变; 中药组平滑肌细胞内肌丝变化不大, 胞内粗面内质网、核糖体未见增多, 其高尔基体不发达, 而结合组平滑肌细胞同正常对照组; 与模型组比较, 激发第 4 周各治疗组  $\text{sm}\alpha\text{-actin}$  和  $\text{sm-MHC}$  表达增强, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** 哮喘大鼠气道平滑肌细胞由收缩表型转变为合成表型, 止喘胶囊具有抑制表型转变的作用。

**关键词** 支气管哮喘; 气道平滑肌; 表型可塑性; 止喘胶囊

**Phenotype Change of Airway Smooth Muscle Cell in Bronchial Asthma Rats and the Intervention of Zhichuan Capsule on It** LIU Fang, FANG Hong, TANG Bin-qing, et al *Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (201203)*

**ABSTRACT** **Objective** To investigate the phenotype change of airway smooth muscle cell (SMC) in bronchial asthma and the effect of Zhichuan Capsule (ZCC) on it. **Methods** Sixty male SD rats were randomized into 5 groups equally, the normal control group, the model group, and three treated groups treated with ZCC, Western medicine (WM) and ZCC + WM respectively. Excepting rats in the control group, they were all made into bronchial asthma model rats and received respective treatment. Histomorphology of the airway SMC was observed by electron microscope at the 4th week, and the expressions of  $\text{sm}\alpha\text{-actin}$  and  $\text{sm-MHC}$  were examined at the 2nd and the 4th week after provocation. **Results** As compared with the control group, myofilaments in SMC were lesser, secretive organelles were more and levels of  $\text{sm}\alpha\text{-actin}$  and  $\text{sm-MHC}$  expressions at the 4th week were lower in the model group ( $P < 0.05$ ). While histomorphology of SMC in the WM group was as normal, but some hypoxia changes were seen, such as the fracture of mitochondria cristae and depletion of matrix; histomorphology of SMC in the ZCC treated group and the ZCC + WM treated group were similar to that in the normal control group, and their expressions of  $\text{sm}\alpha\text{-actin}$  and  $\text{sm-MHC}$  were enhanced as compared to those in the model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Airway SMC changes from contractile phenotype to synthetic phenotype in asthma rats, but the progress of change may be inhibited by ZCC.

**KEYWORDS** bronchial asthma; airway smooth muscle; plasticity of phenotype; Zhichuan Capsule

支气管哮喘为多种细胞参与的慢性气道炎症疾患。在慢性炎症改变中, 气道多种构成成分发生改

变, 如胞外基质沉积、平滑肌增生等, 导致气道重建。气道重建是小气道阻塞的主要原因之一, 也是哮喘发病及影响预后的重要环节。<sup>[1]</sup> 有研究表明, 气道平滑肌除增生外, 可能由收缩表型转变为合成表型, 从而参与气道炎症反应; 但也有相反证据表明, 来自哮喘气道的平滑肌细胞较非哮喘气道平滑肌细胞表现出更强的收缩力<sup>[2]</sup>。

基金项目: 国家中医药管理局基金资助项目 (No. 972100)

作者单位: 1. 上海中医药大学 (上海 201203); 2. 上海中医药大学附属龙华医院

通讯作者: 吴银根, Tel: 021-64385700, E-mail: wyg777@hotmail.com

目前关于药物干预平滑肌表型 (phenotype plasticity

of airway smooth muscle cell)可塑性的研究较少。止喘胶囊处方来源于吴银根教授治疗哮喘稳定期的经验方。前期研究表明,该方可有效抑制气道胶原沉积<sup>[3,4]</sup>。本实验拟通过对气道平滑肌细胞结构及骨架蛋白组分的检测来观察支气管哮喘大鼠气道平滑肌细胞表型,并探索止喘胶囊对平滑肌表型表达的调控作用。

## 材料与方 法

1 动物 健康雄性 SD 大鼠 60 只,由上海中医药大学动物实验中心提供,随机分为 5 组,即正常对照组(对照组)、哮喘模型组(模型组)、止喘胶囊组(中药组)、地塞米松组(西药组)、中西医结合组(结合组),每组 12 只。

2 药物 止喘胶囊浸膏:由仙灵脾、巴戟天、蛇床子以 1:1:1 比例组成。仙灵脾、巴戟天加水煎煮 2 次,每次 1 h,合并药液,滤过,减压浓缩至浸膏状;蛇床子粉碎,以 80%乙醇热回流 2 次,每次 3 h,醇液合并,滤过,回收乙醇至无味,得浸膏。由上海市秀龙中药厂监制,每克浸膏含 8.5 g 生药。地塞米松片,0.75 mg/片,由上海信谊药业有限公司生产,批号:020501。

3 试剂与仪器 卵蛋白(albumin chicken-egg)美国 Sigma 公司产品;平滑肌  $\alpha$ -肌动蛋白(sm  $\alpha$ -actin)兔抗鼠多克隆抗体,丹麦 Dako 公司产品;平滑肌肌球蛋白重链(sm-MHC)单克隆抗体,Neomarker 公司产品。勃林格殷格翰喷射式雾化吸入器(Boehringer Ingelheim, West sussex Po229SL, UK),雾化微粒大小为 2~3 mm;IMS 彩色图像分析系统,上海申腾信息技术有限公司产品;JEM-1200EX 透射电子显微镜,日本电子公司产品。

## 4 方 法

4.1 模型制备 采用文献[4]的方法加以改进:腹腔注射卵蛋白致敏 1 周,雾化吸入卵蛋白激发 4 周,共 5 周。具体如下:除对照组外,各组大鼠分别于第 1 天、第 2 天及第 3 天各腹腔注射新鲜配制的卵蛋白氢氧化铝溶液 1 mL(内含卵蛋白 10 mg 及氢氧化铝 100 mg)1 次致敏。自第 6 天起哮喘模型组开始雾化吸入卵蛋白生理盐水溶液以激发哮喘,隔 2 日 1 次,每 3 次激发浓度递增 0.5%,分别为:第 1 至 3 次 1%,第 4 至 6 次 1.5%,第 7 至 9 次 2%;第 10、11 次 2.5%,每次激发时间为 20 min。

对照组:用生理盐水代替卵蛋白进行腹腔注射和雾化吸入。

4.2 给药方法 各组均从造模第 8 天起给药(每天 1 次)直至处死。根据人临床用药剂量估算实验动

物用量<sup>[5]</sup>。对照组、模型组均以生理盐水 10 mL/(kg·d)灌胃;中药组:止喘胶囊 16 g/(kg·d)灌胃;西药组:地塞米松 0.5 mg/(kg·d)灌胃;结合组:止喘胶囊 4 g/(kg·d)、地塞米松 0.5 mg/(kg·d)灌胃。

4.3 观察指标及方法 于哮喘激发 2、4 周后,取材并检测。

4.3.1 大鼠肺组织切片制备 各组大鼠在最后一次激发 24 h 以内麻醉大鼠,取左上肺 II 级支气管以下外周肺组织,垂直于气道取材,甲醛固定后脱水,石蜡包埋,切片厚度 5 mm,常规 HE 染色后观察肺组织形态学变化。

4.3.2 大鼠气道骨架蛋白的表达 sm  $\alpha$ -actin 和 sm-MHC 的检测采用免疫组化方法。阳性产物为棕黄色或呈棕褐色,背景为紫蓝色。每一标本连续切片,每张切片选取 3 个中或小气道视野,通过显微镜放大 200 倍摄取图像,输入图像分析系统内,对图像进行灰度变换,使染色阳性区域与背景明显分开,选择并自动计算气道中阳性区域光密度,并取其均值作为 sm  $\alpha$ -actin 的该切片的阳性表达值。

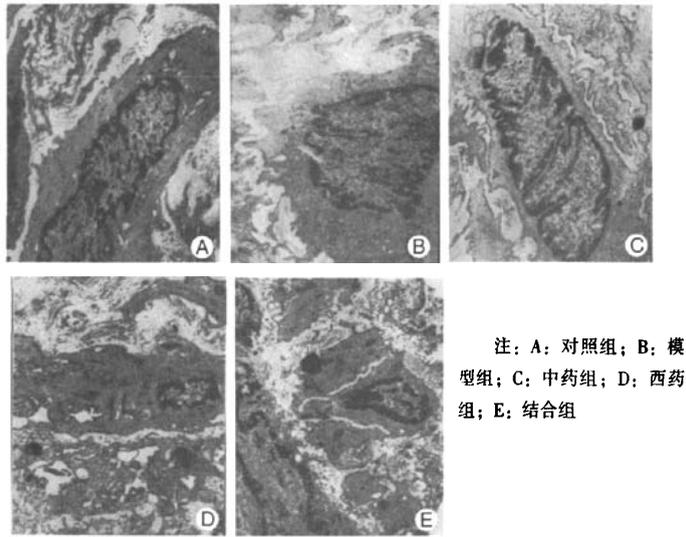
4.3.4 透射电镜观测 于激发第 4 周取肺组织块  $\leq 1 \text{ mm}^3$ ,固定、脱水、包埋、固化后切片,3%醋酸铀-枸橼酸铅双染色,采用日本电子 LEM-1200EX 透射电镜观察,并拍片。

5 统计学方法 应用 SPSS 11.5 统计软件作统计分析,实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析、*t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1 各组平滑肌细胞电镜结果比较(图 1) 电镜下观察激发第 4 周气道平滑肌细胞,发现对照组平滑肌细胞肌丝及各细胞器均正常;模型组平滑肌细胞内肌丝稍减少,胞内粗面内质网、核糖体增多,高尔基体发达;西药组平滑肌细胞内肌丝正常,但可见线粒体嵴断裂,基质丢失等缺氧改变;中药组平滑肌细胞内肌丝变化不大,胞内粗面内质网、核糖体未见增多,其高尔基体不发达;结合组平滑肌细胞同对照组。

2 各组大鼠气道壁 sm  $\alpha$ -actin、sm-MHC 表达比较(表 1) 第 2 周模型组 sm  $\alpha$ -actin 表达强度高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。各组各时间点组内比较,唯有模型组 sm  $\alpha$ -actin 第 4 周表达低于第 2 周,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。各治疗组 2 周 sm  $\alpha$ -actin 均低于模型组,4 周 sm  $\alpha$ -actin、2 周、4 周 sm-MHC 均高于模型组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。



注：A：对照组；B：模型组；C：中药组；D：西药组；E：结合组

图 1 各组大鼠气道平滑肌细胞形态学观察 (电镜, ×5000)

表 1 各组大鼠气道壁 sm α-actin、sm-MHC 表达比较 (x̄ ± s)

组别	n	时间 (w)	sm α-actin	sm-MHC
对照	6	2	0.375 ± 0.058	0.220 ± 0.109
		4	0.363 ± 0.079	0.214 ± 0.021
模型	6	2	0.465 ± 0.083 <sup>△</sup>	0.054 ± 0.021 <sup>△</sup>
		4	0.190 ± 0.046 <sup>*△</sup>	0.076 ± 0.011 <sup>△</sup>
西药	6	2	0.392 ± 0.063 <sup>▲</sup>	0.259 ± 0.047 <sup>▲</sup>
		4	0.350 ± 0.159 <sup>▲</sup>	0.170 ± 0.077 <sup>▲</sup>
中药	6	2	0.360 ± 0.054 <sup>▲</sup>	0.363 ± 0.065 <sup>△▲</sup>
		4	0.318 ± 0.076 <sup>▲</sup>	0.172 ± 0.081 <sup>▲</sup>
结合	6	2	0.331 ± 0.079 <sup>▲</sup>	0.368 ± 0.072 <sup>△▲</sup>
		4	0.323 ± 0.128 <sup>▲</sup>	0.210 ± 0.076 <sup>▲</sup>

注：与本组第 2 周比较，\*P < 0.05；与对照组比较，<sup>△</sup>P < 0.05；与模型组比较，<sup>▲</sup>P < 0.05

### 讨 论

正常成熟的气道平滑肌细胞呈梭形，细胞胞浆内富含肌丝，而高尔基复合体、线粒体和粗面内质网等细胞器很少。此型细胞能对化学物质和机械刺激产生收缩反应，几乎无蛋白合成功能，为收缩表型细胞。气道或血管平滑肌细胞受到损伤及其他刺激时，可从收缩表型转变为合成表型，表现为增生加速、收缩表型标志蛋白 sm α-actin、sm-MHC 表达减少；其超微结构改变，包括平滑肌细胞微丝的减少、合成相关细胞器的增多；合成型平滑肌细胞获得增殖、迁移和合成、分泌大量细胞外基质的能力，可分泌多种细胞因子、趋化因子、生长因子如 IL-1β、Eotaxin、IGF-2 等促进细胞增殖，加重气道炎症<sup>[6-8]</sup>。由此可见，气道平滑肌细胞既是哮喘气道炎症的效应细胞，又参与气道炎

症，其表型转变加速了气道重建的进程。

在本研究中，电镜下观察激发第 4 周气道平滑肌细胞，发现模型组平滑肌细胞内肌丝稍减少，胞内粗面内质网、核糖体增多，高尔基体发达；在激发第 2 周及第 4 周时 sm-MHC 表达均较对照组减少 (P < 0.05)，第 4 周时 sm α-actin 表达减少 (P < 0.05)。提示在激发后第 4 周时哮喘大鼠气道平滑肌细胞由收缩表型转变为合成表型。

止喘胶囊由仙灵脾、巴戟天、蛇床子 3 味中药组成，为吴银根教授治疗哮喘间歇期或轻度持续期的常用药物。方中仙灵脾补肾虚、助阳，为君药；巴戟天补肾纳气、化痰止咳，为臣药；蛇床子温肾祛寒，健脾化痰，为使药。三者配伍，共奏温肾健脾，化痰平喘之功。哮喘以肾虚内寒为病机基础，故以止喘胶囊为治，切中病机。

电镜观测结果表明，西药组细胞内肌丝虽正常，但可见线粒体嵴断裂、基质丢失等缺氧改变。提示西药组平滑肌细胞虽未出现表型转换，但却有缺氧改变，说明地塞米松能阻止表型改变的发生，但同时细胞有毒性作用；而中药组与结合组细胞维持正常形态，且未发生表型转变，说明止喘胶囊具有预防和阻止平滑肌细胞表型改变的作用，同时能保护细胞，对地塞米松造成的损伤有良好的修复功能。本研究亦发现，各治疗组在激发第 4 周时 sm-MHC、sm α-actin 表达均高于模型组 (P < 0.05)，与对照组比较差异无统计学意义 (P > 0.05)。提示止喘胶囊与地塞米松均有良好抑制平滑肌细胞表型转换的作用。

在研究中还发现,第 2 周时哮喘大鼠气道 sm  $\alpha$ -actin 表达高于对照组,这一变化与其第 4 周降低相反,亦与 sm-MHC 表达不一致。与国内文献报道亦不一致<sup>[9]</sup>。究其原因,或许是第 2 周时 sm  $\alpha$ -actin 在多种收缩蛋白减少的情况下,代偿性升高,以维持平滑肌的收缩功能。

对支气管哮喘大鼠气道平滑肌表型转变及止喘胶囊干预作用的探索,发现哮喘大鼠气道肌细胞转变为合成表型,止喘胶囊具有同激素相似的抑制表型转变作用,与地塞米松联合应用还可防止后者的毒副作用。提示止喘胶囊用于哮喘的长期预防和治疗中,有可能逐渐减少激素用量、撤消激素甚至替代激素,其临床作用及具体作用途径值得进一步深入研究。

### 参 考 文 献

[1] 吴银根,王丽新. 实验性哮喘大鼠气道重塑的形态学变化[J]. 中西医结合学报, 2003, 1(1):62-65.  
Wu YG, Wang LX. Morphological changes following airway remodeling in asthmatic rats[J]. J Chin Integr Med, 2003, 1(1):62-65.

[2] Ma X, Cheng Z, Kong H, et al. Changes in biophysical and biochemical properties of single bronchial smooth muscle cells from asthmatic subjects[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 283(6):L1181-1189.

[3] 林琳, 要全保, 于素霞. 止喘胶囊对实验性哮喘动物模型气道重建的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(8):599-601.  
Lin L, Yao QB, Yu SX, et al. Study on effect of Zhichuan Capsule on airway remodeling in experimental animal model of asthma[J]. Chin J Integrit Tradit West Med, 2001, 21(8):599-601.

[4] 吴银根, 王丽新. 基质金属蛋白酶及其抑制剂在哮喘气

道重塑中的作用及止喘胶囊的干预[J]. 中西医结合学报, 2004, 2(6):435-439.

Wu YG, Wang LX. Function of MMP/TIMP on airway remodeling of bronchial asthma and treating effects of Zhichuan Capsule[J]. J Chin Integr Med, 2004, 2(6):435-439.

[5] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1994:33-34.  
Chen Q, editor. Study methodology of herbal pharmacology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994: 33-34.

[6] 章晓红. 合成型气道平滑肌细胞与支气管哮喘[J]. 国外医学:呼吸分册, 2002, 22(4):187-189.  
Zhang XH. Secretory phenotype of airway smooth muscle and bronchial asthma[J]. Foreign Med Sci (Respir Dis), 2002, 22(4):187-189.

[7] Lavigne MC, Ramwell PW, Clarke R. Growth and phenotypic characterization of porcine coronary artery smooth muscle cells[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1999, 35(3):136-143.

[8] Regan CP, Adam PJ, Madsen CS, et al. Molecular mechanisms of decreased smooth muscle differentiation marker expression after vascular injury[J]. J Clin Invest, 2000, 106(9):1139-1147.

[9] 吴昭萍, 罗凤鸣, 王曾礼, 等. 哮喘大鼠模型肺组织平滑肌肌动蛋白哮喘大鼠模型肺组织平滑肌肌动蛋白- $\alpha$ mRNA 的表达[J]. 四川大学学报(医学版), 2003, 34(2):330-332.  
Wu ZP, Luo FM, Wang ZL, et al. Expression of  $\alpha$ -SMA mRNA in the lung tissue of rat with asthma[J]. J Sichuan Univ (Med Sci), 2003, 34(2):330-332.

(收稿:2009-11-18 修回:2010-06-01)

## 世界针灸学会联合会 2010 美国国际针灸学术研讨会会议通知

由世界针灸学会联合会与中国中医科学院共同主办,美国中医针灸学会承办,美国马里兰医学院、美国针灸研究协会、中国针灸学会等机构协办的“世界针灸学会联合会 2010 美国国际学术研讨会”将于 2010 年 11 月 6—7 日在美国旧金山举行。届时,数百名来自世界各地的中医院校代表,及中医药界、医疗机构的精英代表,将齐聚旧金山,共赴盛会。

世界针灸学会联合会是与世界卫生组织有合作关系的中医针灸学术团体,这届大会将以针灸研究、教育及临床试验为主题,遵照世界卫生组织执行委员会第 124 次会议上形成,并提交第六十二届世界卫生组织通过的有关“传统医学”的决议精神,就针灸立法、针灸标准制定、针灸科研等方面进行深入的学术交流。世界针联由 50 余个国家和地区的 126 个团体会员组成。

有愿望参会者,请尽早联系报名参加。本次大会参会者将获得参会证书和继续再教育学分证书,提供论文者将获论文发表证书,论文报告者将获论文演讲证书,经学术委员会评定后将向优秀论文作者颁发优秀论文获奖证书。相关详情,请浏览大会网页:www.wfas2010usa.com。美国办事处电话:408-648-6986,中国办事处电话:+86-1381185967。