

Smads 蛋白家族在慢性支气管哮喘大鼠肺组织中的定位及基因表达

孙祝美, 李福凤*, 钱鹏, 赵洁, 温旭杰
(上海中医药大学基础医学院, 上海 201203)

[摘要] **目的:**探讨 Smads 蛋白家族在慢性哮喘大鼠肺组织中的定位表达及其 mRNA 变化情况,以反映其在哮喘大鼠气道重建过程的作用。**方法:**24 只 SD 大鼠分为正常组和模型组各 12 只。模型组以 10% 卵蛋白 + 10% 氢氧化铝生理盐水 ip 致敏,2 周后用 2% 卵蛋白雾化吸入 1 min,隔天 1 次,引喘,共 2 周后处死。取肺组织切片(HE 染色)作形态学观察;荧光免疫组化测定 Smads 蛋白家族在肺组织中的定位;RT-PCR 测定 Smads 蛋白家族 mRNA 的变化情况。**结果:**HE 染色显示模型组有较明显出血,肺泡均有一定程度扩张,有慢性炎细胞浸润;荧光免疫组化法显示 Smads 蛋白家族均在在支气管壁和肺泡壁上表达;RT-PCR 测定显示模型组 Smad2 mRNA 较正常组高表达($P < 0.05$);模型组 Smad7 mRNA 较正常组显著低表达($P < 0.05$);两组 Smad4 mRNA 之间无差异。**结论:**Smads 蛋白家族与慢性哮喘关系密切,在正常与哮喘模型中都可见 Smads 蛋白家族的表达,在哮喘发生过程中,受体型 Smad2 mRNA 表达增加,抑制型 Smad7 mRNA 表达下降,说明 TGF- β /Smad 信号途径可能被活化。

[关键词] 慢性哮喘;Smad2、4、7;免疫荧光染色;逆转录聚合酶链反应

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0207-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110823.1117.008 **[网络出版时间]** 2011-08-23 11:17

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110823.1117.008.html>

Smad Proteins Localization in Chronic Bronchial Asthma Rats Lung Tissue by Immunofluorescence and Gene Expression

SUN Zhu-mei, LI Fu-feng*, QIAN Peng, ZHAO Jie, WEN Xu-jie
(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the Smads proteins localization in lung tissue of chronic bronchial asthma rats lung tissue and its mRNA expression, and to explore the TGF- β /Smad signaling pathway, thus in the chronic bronchial asthma. **Method:** Twenty-four Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups: normal control group was treated by 0.9% saline; model group treated by the mixture (10% ovalbumin + 10% aluminum hydroxide). HE staining was used to observe the pathomorphological changes; Smad proteins localization in lung tissue was determined by immunofluorescence; Smads mRNA expression was determined by RT-PCR. **Result:** HE staining showed the model group was obviously bleeding, expanding of lung alveolar and inflammatory cell. The results showed Smads proteins were located in the bronchial wall or alveolar wall by immunofluorescence assay; RT-PCR showed that the Smad2 mRNA expression were higher significantly in model group than that in normal group ($P < 0.05$); Smad7 mRNA expression were significantly lower in model group than that in normal expression ($P <$

[收稿日期] 2011-05-04

[基金项目] 上海市教委科研资助项目(06cz2020);上海市教育委员会重点学科建设项目(J50301);“杏林学者”计划项目(R09205)

[第一作者] 孙祝美,博士,从事中药药物作用机制研究, Tel:021-51322585, E-mail:sunzhumei2000@yahoo.com.cn

[通讯作者] *李福凤,博士,副教授,从事中医诊法规范化及生物学基础研究, Tel:021-51322353, E-mail:fufeng_lee@houtmail.com

0.05); Smad4 mRNA expression was no difference between the two groups. **Conclusion:** Smads proteins had closely related to chronic asthma, Smad proteins were located in lung tissue of both normal rats and chronic bronchial asthma rats. In the course of asthma, receptor type Smad2 mRNA was increased in expression, inhibitory type Smad7 mRNA was decreased in expression, and thus TGF- β /Smad signaling pathways that might be activated.

[**Key words**] chronic asthma; Smad2, 4, 7; immunofluorescence staining; RT-PCR

支气管哮喘是临床常见慢性呼吸系统疾病, 目前发现, 转移生长因子 TGF- β_1 /Smads 信号通路是哮喘气道重建过程中的一条重要信号通路。有研究显示^[1]TGF- β_1 在哮喘患者气道上皮及黏膜下明显增多, 且 TGF- β_1 表达与气道基膜上皮、成纤维细胞数目和哮喘发作的严重程度呈正相关。Smads 是新近发现参与 TGF- β_1 在细胞内信号传导的一族蛋白质, 在丝-苏激酶胞内信号传导中起重要的作用。但目前前在哮喘气道重建的发展过程中, TGF- β_1 介导的不同 Smads 蛋白表达的作用等方面的机制阐述还不够清楚。本课题拟从 Smads 家族在慢性哮喘大鼠肺组织的定位和肺组织 mRNA 变化情况, 阐释 Smads 家族在哮喘大鼠气道重建过程中的作用。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 大鼠 24 只, 雄性, 180 ~ 200 g, 由中国科学院上海动物中心提供, 合格证号医动字第 02-22-2 号。

1.2 试剂 Smad2 (L16D3), 批号 3103 (CAT 公司); Smad4 (D-6), 批号 sc-7966 (Santa Cruz 公司); Smad7 (R&D 公司); RNasin (Invitrogen 公司); Taq polymerase (博彩生物技术公司)。

1.3 仪器 JB 50-D 高速分散器 (金达生化仪器厂), FR-2000 生物电泳图像分析 (上海复旦科技有限公司), 荧光显微镜 (Olympus), 5417R 型高速离心机 (Eppendorf 公司), DY-1 型电泳仪, 上海医用分析仪器厂, GBOX 凝胶成像分析系统 (Syntesm 公司)。

2 方法

2.1 造模 大鼠随机分为正常组 (12 只) 和模型组 (12 只)。模型组的造模方法参考文献 [2]。ip 混合液 1 mL/只 (卵蛋白 100 mg、氢氧化铝 100 mg 加生理盐水 1 mL) 致敏大鼠, 2 周后用 2% 卵蛋白雾化吸入 1 min, 诱发哮喘发作, 隔天 1 次, 引喘 2 周后处死。正常组: 大鼠 ip 0.9% 生理盐水 1 mL/只。

2.2 肺组织病理切片 两组大鼠常规肺组织取材, 置 10% 甲醛溶液固定, 包埋, 超薄切片 (5 μ m), 常规 HE 染色, 光镜下观察肺组织的病理学变化。

2.3 荧光免疫组化法检测肺组织 Smads 蛋白家族的表达 处死大鼠, 快速取肺组织, 投入 4% 中性多聚甲醛固定, 连续切片, 片厚 25 μ m, Smad7: 一抗 1: 1 000 (抗人/小鼠/大鼠的多克隆抗体), 37 $^{\circ}$ C, 孵育 1 h; 二抗: 1: 200 荧光标记的山羊抗小鼠抗体, 37 $^{\circ}$ C, 孵育 1 h; Smad2 一抗: 1: 1 000 (兔抗大鼠抗体), 37 $^{\circ}$ C, 孵育 2 h, 二抗: 1: 200 荧光标记的抗兔的抗体, 37 $^{\circ}$ C, 孵育 1 h; Smad4 一抗 1: 1 000 (抗大鼠的单克隆抗体), 37 $^{\circ}$ C, 孵育 2 h; 二抗: 1: 200 荧光标记的山羊抗大鼠抗体, 37 $^{\circ}$ C, 孵育 1 h。贴片封片, 荧光显微镜观察。

2.4 RT-PCR 法测定肺组织中 Smads 蛋白家庭 mRNA 的表达 按试剂盒说明书方法提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计法确定 RNA 的量和纯度。以总 RNA 为模板, 进行 RT-PCR。根据 Smad2, 4, 7 cDNA 序列 (Genbank GI: 3025889, 5706363, 5231223) 合成引物。

表 1 引物序列及产物长度

基因	引物序列	产物长度 /bp
Smad2	上游: 5'-ATACCCACTCCATTCCAG-3'	474
	下游: 5'-CACTATCACTTAGGCACTGG-3'	
Smad4	上游: 5'-AGGTGGCTGGTCGGAAAG-3'	312
	下游: 5'-TTGGTGGATGTTGGATGGTT-3'	
Smad7	上游: 5'-GGCATACTGGGAGGAGAAGA-3'	483
	下游: 5'-CTGTTGAAGATGACCTCTCCAGC-3'	
Actin	上游: 5'-CCGTAAAGACCTCTATGCCAACA-3'	230
	下游: 5'-GGACTCATCGTACTCTGCT-3'	

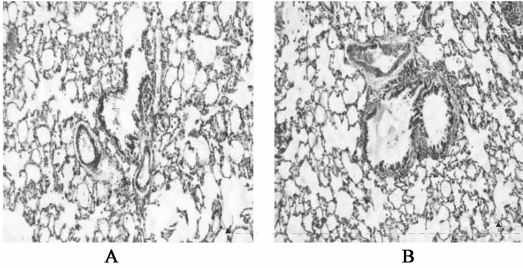
扩增产物上样于 1.6% 的琼脂糖凝胶, 图像采用 FR-2000 图像分析系统进行扫描。每个样本的 mRNA 相对含量 = 样本扩增产物吸光度 A/ β -actin 扩增产物吸光度 A。

2.5 统计方法 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 10.0 软件统计, 采用方差分析和 Q 检验。P < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 肺组织病理切片光镜观察 由图 1 可见, 正常组中小支气管黏膜完整, 周围未见明显炎细胞浸润,

肺泡未见扩张,肺泡大小均一;模型组肺组织有较明显出血,肺泡腔内有大单核细胞出现,肺泡壁有不同程度扩张,均有中小支气管黏膜上皮部分脱落,支气管腔内含有渗出物,支气管及肺泡壁周围有较多慢性炎细胞浸润,提示模型成功。

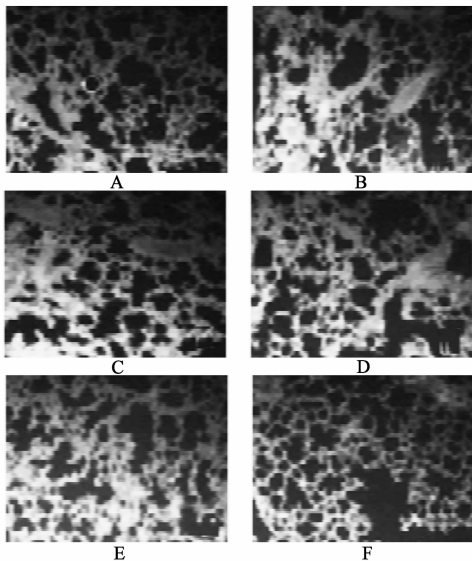


A 正常组; B 模型组

图1 肺组织的病理切片(HE × 200)

3.2 肺组织 Smads 蛋白家族表达信号定位分析

Smad2, Smad4, Smad7 均在支气管壁、肺泡壁上表达,各组的荧光强度不相同。见图 2。



A. 正常组 Smad2; B. 模型组 Smad2; C. 正常组 Smad4
D. 模型组 Smad4; E. 正常组 Smad7; F. 模型组 Smad7

图2 Smads 蛋白家族在肺组织中的定位表达

3.3 支气管肺组织 Smad2, 4, 7 的 mRNA 表达水平

与正常组相比,模型组的 Smad2 mRNA 水平明显升高;两组的 Smad4 mRNA 水平无显著性差异;与正常组相比,模型组的 Smad7 mRNA 水平明显降低。见表 2。

4 讨论

Smad 蛋白家族是在脊柱动物、昆虫和线虫内发现的转录因子家族,是迄今为止惟一已被证实的 TGF-β 受体作用的底物^[3]。Smad 的功能是能够接

表 2 两组大鼠支气管肺组织 Smad2, 4, 7 的基因表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	Smad2/β-actin	Smad4/β-actin	Smad7/β-actin
正常	0.74 ± 0.22	0.81 ± 0.22	1.05 ± 0.09
模型	1.30 ± 0.13 ¹⁾	0.77 ± 0.20	0.55 ± 0.23 ¹⁾

注:与正常组比较¹⁾ P < 0.05。

受来自 TGF-β₁ 信号受体的磷酸化信号,从而引起自身的磷酸化而被激活(R-Smad),再通过激活 co-Smad 信号蛋白并结合辅助因子形成复合物进入细胞核,调节靶基因的表达^[4]。Smads 蛋白结构和功能特点决定了该家族信号转导的多样性^[4],根据其结构和功能的不同分为三类:第一类为受体调节型 Smads 蛋白,包括 Smad1, Smad 2, Smad3, Smad5 和 Smad8;第二类为通用调节型 Smads 蛋白即 Smad4;第三类是抑制型 Smads 蛋白,包括 Smad6 和 Smad7。本研究在 3 种类型各选取一种 Smad 作为代表蛋白,根据 3 种不同类型的 Smad 蛋白的变化,反映 Smad 信号传递过程中的改变。

本研究中,我们重点考察了 3 种不同类型的 Smads 蛋白在肺组织中的定位情况以及在慢性哮喘中的 Smads 的 mRNA 变化情况。从荧光免疫组化可见,Smads 蛋白主要定位于肺组织的支气管壁和肺泡壁,不同 Smads 蛋白的荧光强度略有不同。与正常组相比:哮喘组的 Smad2 mRNA 水平明显升高,Smad7 mRNA 水平明显降低;两组的 Smad4 mRNA 水平无显著性差异。可见 Smads 蛋白家族与慢性哮喘关系密切。受体调节型的 Smad2 mRNA 水平明显升高,说明在慢性哮喘发生过程中,Smad2 激活,可能是由于卵蛋白和氢氧化铝诱发的哮喘过程,激活了 TGF-β/smad 信号途径,使受体型的 Smad2 mRNA 水平增加,从而启动下游的一系列变化,最后促进肺组织的扩张;而抑制型的 Smad7 mRNA 水平明显降低,说明 Smad7 对 TGF-β/smad 信号途径的抑制作用减弱,更加促进该途径的活化,最终导致肺扩张加剧;通用型的 Smad4 mRNA 水平无显著性差异,说明 Smad4 的表达具有稳定性,与哮喘的发生关系不大。Smads 蛋白家族的其他成员与慢性哮喘的关系需要进一步研究。

[参考文献]

[1] Chu H W, Halliday T L, Martin, et al. Collagen deposition in large airways may not differentiate severe asthma from milder forms of the disease [J]. Am J Respir Crit Care

消栓通脉颗粒对深静脉血栓形成大鼠静脉壁 NF- κ B, I κ B 表达的影响

刘政*, 张玥, 郝清智, 侯玉芬

(山东中医药大学附属医院周围血管病科, 济南 250011)

[摘要] 目的:探讨中药消栓通脉颗粒治疗深静脉血栓形成的机制。方法:72 只 Wistar 大鼠随机分为 4 组:假手术组、血栓模型组、复方丹参片组(0.23 g·kg⁻¹, ig)、消栓通脉颗粒组(32 g·kg⁻¹, ig)。连续给药 5 d 后采用下腔静脉结扎法制备血栓模型,造模后 4 h 连续给药,动态监测各组大鼠术后不同时间点静脉壁核因子 κ B mRNA (NF- κ B p50 mRNA, NF- κ B p65 mRNA), 抑制因子 κ B mRNA (I κ B α mRNA) 表达水平。结果:同一时间点,中药治疗组静脉壁 NF- κ B p50 mRNA, NF- κ B p65 mRNA 表达水平显著低于模型组($P < 0.01$),而 I κ B α mRNA 明显增高($P < 0.01$);各组静脉壁 NF- κ B p50 mRNA, NF- κ B p65 mRNA 表达随手术天数的延长呈现先增强后减弱的趋势,术后 3 d 达到高峰,而 I κ B α mRNA 的表达呈先下降后升高的规律,术后 3 d 降到低谷;与复方丹参片组比较,在同一时间点,消栓通脉颗粒剂组 NF- κ B p50 mRNA, NF- κ B p65 mRNA 表达明显降低($P < 0.01$),而 I κ B α mRNA 表达显著增高($P < 0.01$)。结论:消栓通脉颗粒剂可能通过调控 NF- κ B / I κ B 信号传导通路,减轻其介导的静脉壁炎症反应,保护血管内皮细胞功能,发挥抗血栓作用。

[关键词] 深静脉血栓;核因子 κ B;抑制因子 κ B;炎症反应;消栓通脉颗粒

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0210-04

Effect of Xiaoshuan Tongmai Granules on Level of NF- κ B and I κ B in Vein Wall in Rats with in Deep Venous Thrombosis

LIU Zheng*, ZHANG Yue, HAO Qing-zhi, HOU Yu-feng

(Department of Vascular Surgery, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the interventional mechanism of Chinese herbs Xiaoshuan Tongmai Granules(XSTM) on deep venous thrombosis (DVT) in rats. **Method:** Seventy two Wistar rats were randomly divided into 4 groups: sham group, DVT model group, XSTM group, Fufang Danshen tablets(DS) group. Venous thrombosis was induced by inferior vena caval occlusion by ligature just below the level of the renal veins. The levels of NF- κ B p50 mRNA, NF- κ B p65 mRNA and I κ B α mRNA in vein wall of all rats were dynamic detected at 1, 3,

[收稿日期] 2011-07-07

[基金项目] 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(2008BS03056)

[通讯作者] *刘政,副主任医师,博士,从事中西医结合周围血管疾病研究, Tel:15553111587, E-mail:lz2000jn@163.com

- Med, 1998, 158(6):1936.
- [2] 贾天明, 乔俊英, 栾斌, 等. 大鼠哮喘模型气道重塑中细胞增殖和凋亡的变化[J]. 郑州大学学报, 2004, 39(3):449.
- [3] 张维溪, 戴欢, 贺孝良, 等. 糖皮质激素调控哮喘大鼠气道重塑中 TGF-13/Smad 信号通路的研究[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(9):1142.
- [4] 姜云志, 沈以红, 代方银. Smad 介导 TGF-13 信号转导[J]. 蚕学通讯, 2008, 28(3):20.
- [5] Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-13/Smad signaling system [J]. EMBO, 2000, 19(8):1745.

[责任编辑 何伟]