

· 配伍 ·

防风-乌梅配伍含药血清对气道平滑肌细胞增殖模型表型转化调控作用

龙声志¹, 朱海燕², 吴贤波^{3*}, 陈林², 谢毅强⁴, 杨帆⁴

(1. 贵阳中医学院 研究生院, 贵阳 550002;

2. 成都医学院 第一附属医院, 成都 610050;

3. 成都市新都区中医医院, 成都 610050; 4. 海南医学院 中医学院, 海口 571101)

[摘要] 目的:观察防风-乌梅含药血清对气道平滑肌细胞(airway smooth muscle cells, ASMCs)增殖模型表型转化调控的影响,探索防风-乌梅配伍抑制气道重塑的机制,揭示中药配伍机制。方法:采用血小板衍生因子(platelet derived growth factor, PDGF)诱导的方式建立 ASMCs 增殖模型;分别给予大鼠灌胃生理盐水、防风、乌梅、防风-乌梅(生药 15.425, 15.425, 30.85 g·kg⁻¹·d⁻¹药液)制备药物血清;取4代对数生长期的人支气管平滑肌细胞(human bronchial smooth muscle cell, HBSMC),将其分为空白组、细胞模型组、正常大鼠血清组、正常大鼠血清细胞模型组、激素干预组、防风血清组、乌梅血清组、防风-乌梅血清组,对细胞给予相应处理,分别采用免疫荧光、蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测 ASMCs 收缩型标志蛋白 α -肌动蛋白(α -actin),合成型标志蛋白骨桥蛋白(osteopontin, OPN)表达,观察表型转化情况;酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测 ASMCs 分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β),白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)的含量。结果:与空白组、正常大鼠血清组比较,模型组、正常大鼠血清细胞模型组 α -actin 荧光强度与蛋白表达较弱,OPN 荧光强度与蛋白表达较强,VEGF, TGF- β , IL-6 含量明显提高($P < 0.05$);与模型组、正常大鼠血清细胞模型组比较,防风-乌梅血清组与激素干预组可显著增强 α -actin 荧光强度及蛋白表达,降低 OPN 荧光强度及蛋白表达,降低 VEGF, TGF- β , IL-6 含量($P < 0.05$)。结论:防风-乌梅配伍的抑制气道重塑作用,可能与抑制 ASMCs 由收缩型向合成型的转化,从而减少 VEGF, TGF- β , IL-6 等活性物质释放有关。

[关键词] 防风; 乌梅; 哮喘; 气道平滑肌细胞; 气道重塑; 细胞表型

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)02-0001-07

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.20190224

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181031.0852.014.html>

[网络出版时间] 2018-11-02 13:28

Effect of Saposhnikovia Radix-Mume Fructus Drug-containing Serum in Regulating Phenotypic Transformation of Airway Smooth Muscle Cell Proliferation Model

LONG Sheng-zhi¹, ZHU Hai-yan², WU Xian-bo^{3*}, CHEN Lin², XIE Yi-qiang⁴, YANG Fan⁴

(1. Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang 550002, China;

2. The First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu 610050, China;

3. Xindu District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610050, China;

4. School of Traditional Chinese Medicine, Hainan Medical University, Haikou 571101, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Saposhnikovia Radix-Mume Fructus containing-serum in regulating the phenotypic transformation of airway smooth muscle cells (ASMCs) proliferation model, in order to

[收稿日期] 20180724(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460706)

[第一作者] 龙声志,在读硕士,从事中医诊治皮肤科疾病研究, Tel:0851-85652671, E-mail:976684500@qq.com

[通信作者] *吴贤波,博士,副教授,硕士生导师,从事过过敏性疾病的中医药防治研究, Tel:028-83970120, E-mail:Cdutcmwu@163.com

explore the mechanism of combined administration of “Saposhnikovia Radix, Mume Fructus” in inhibiting airway remodeling, and reveal the compatibility mechanism of traditional Chinese medicine. **Method:** The proliferation model of ASMCs was established by platelet derived growth factor (PDGF) induction. The rats were given normal saline, Saposhnikovia Radix-Mume Fructus, Saposhnikovia Radix-Mume Fructus (15.425, 15.425, 30.85 g·kg⁻¹·d⁻¹) to prepare drug serum respectively. Four generations of logarithmic phase human bronchial smooth muscle cells (HBSMC) were collected and divided into blank control group, cell model group, normal rat serum group and normal rat serum cell model group, hormone intervention group, Saposhnikovia Radix serum group, Mume Fructus serum group, Saposhnikovia Radix-Mume Fructus serum group. The cells were given corresponding treatment. Immunofluorescence staining and Western blot were adopted to detect ASMCs deflating marks protein α -actin and osteopontin (OPN) expressions, and phenotypic transformation was observed; the levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor- β (TGF- β) and interleukin-6 (IL-6) secreted by ASMCs were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Compared with blank group and normal rat serum group, the fluorescence intensity and protein expression of α -actin in model group and normal rat serum cell model group were low, whereas the fluorescence intensity and protein expression of OPN were high, and the concentrations of VEGF, TGF- β and IL-6 increased significantly ($P < 0.05$). Compared with model group and normal rat serum cell model group, Saposhnikovia Radix-Mume Fructus serum group and hormone intervention group could significantly enhance the fluorescence intensity and protein expression of alpha-actin, decrease the fluorescence intensity, protein expression of OPN and concentrations of VEGF, TGF- β and IL-6 ($P < 0.05$). **Conclusion:** The combined administration of “Saposhnikovia Radix-Mume Fructus” has an inhibitory effect on airway remodeling, which may be related to the inhibition of the transformation of ASMCs from contractile phenotype to synthetic phenotype, so as to reduce the release of active substances, such as VEGF, TGF- β and IL-6.

[**Key words**] Saposhnikovia Radix; Mume Fructus; asthma; airway smooth muscle cells; airway remodeling; cell phenotype

气道重塑是支气管哮喘发病的一个重要特征,气道重塑会导致不可逆性的气流阻塞,增加气道阻力、加重气道高反应性,还能导致严重的肺功能低下。防风-乌梅配伍来源于祝谌予常用验方过敏煎的君-臣配伍,临床上常以药对形式用于支气管哮喘的治疗^[1]。防风辛润,善行皮毛与经脉之气,祛风之力可达十二经,善祛外来之风邪,并可解痉止痒;乌梅酸涩,一可敛肺定喘,针对肺气失于肃降,其酸涩之性可收敛肺气,助纳气定喘,二可生津润肺,以免防风辛散伤津。二药配伍,辛散祛邪而不耗气伤津,酸敛肺津而不留邪,发挥祛风解痉、敛肺生津之效。防风-乌梅配伍可调节蛋白激酶受体-2 (PAR-2) 表达影响肥大细胞脱颗粒^[2],抑制细胞外调节蛋白激酶和蛋白激酶 B 的释放,具有一定抗过敏作用^[3]。

结合前期课题组动物实验证实,防风-乌梅配伍可抑制哮喘小鼠模型气道重塑,可能与支气管平滑肌肥厚、减少相关活性物质分泌有关。本研究采用血小板衍生因子 (platelet derived growth factor,

PDGF) 来诱导人支气管平滑肌细胞 (human bronchial smooth muscle cells, HBSMC) 增殖模型^[4],从气道平滑肌细胞 (airway smooth muscle cells, ASMCs) 表型转化角度与血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF), 转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β), 白细胞介素-6 (interleukin 6, IL-6) 的表达探索防风-乌梅抑制气道平滑肌重塑机制,揭示中药配伍机制。

1 材料

1.1 动物与细胞株 SPF 级 SD 雄性大鼠 20 只, 体重 220 ~ 250 g, 购于上海富莱生物科技有限公司, 合格证号 SCXK (贵) 2015-0005。动物实验经海南医学院动物伦理委员会批准进行, 实验动物符合伦理委员会规定, 伦理委员会编号 hyyxl2017038。HBSMC 细胞株 (Sinecell 公司, 批号 b3400)。

1.2 药物与试剂 防风、乌梅药材于成都市杏林大药房购买, 由成都中医药大学中药鉴定教研室卢先明教授鉴定, 乌梅为蔷薇科植物乌梅 *Prunus mume* 的干燥成熟果实; 防风为伞形科植物防风

Saposhnikovia divaricata 的干燥根。防风、乌梅(临床成人用量均为 $15 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$),防风-乌梅(临床成人用量为 $30 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$,防风、乌梅剂量比为 1:1);吸入用布地奈德混悬液(英国 Astra Zeneca 公司,批号 320341);高糖 DMEM 培养基(上海源培生物科技股份有限公司,批号 L110);PDGF[中博瑞康(北京)生物技术有限公司,批号 10572-H07Y]; α -肌动蛋白(α -actin),骨桥蛋白(osteopontin, OPN),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗, α -actin 荧光二抗,OPN 荧光二抗,抗兔免疫球蛋白(Ig)G(美国 Proteintech 公司,批号分别为 23660-1-AP, 22952-1-AP, 10494-1-AP, SA00006-4, SA00006-2, SA00001-2);VEGF, TGF- β , IL-6 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉六合生物技术有限公司,批号分别为 LH-E10186HU, LH-E10178HU, LH-E10103HU)。

1.3 仪器 IX71 型相差显微镜(日本 Olympus 公司);3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher 公司);SW-CJ-1D 型超净台(苏州净化设备有限公司);L400 型离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);RT-6100 型酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司);ECLIPSE 80i 型荧光显微镜,DXM 1200C 型数码相机(日本 Nikon 公司);165-8000 型小型垂直电泳槽,170-3930 型小型转印槽(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 含药血清的制备 取 20 只雄性 SD 大鼠,按随机数字表法随机选取 5 只作为空白组,其余 15 只随机分为 3 组,分别为防风组、乌梅组、防风乌梅组(分别按生药 $15.425, 15.425, 30.85 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 药液灌胃),每组 5 只。给药剂量按实验动物与人体标准体重质量计算公式换算,空白组给予 0.9% 生理盐水。每日灌胃给药 3 次,每次 1 mL,连续用药 3 d 后,禁食 8 h,第 4 天末次给药 1 h 后予腹腔注射 7% 水合氯醛溶液麻醉,无菌操作下解剖大鼠行腹主动脉取血。血样常温放置 1 h 后自然凝固分层, $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,分装于离心管中, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。使用前合并各组血清, $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴灭活 30 min。

2.2 细胞模型建立和分组 参照王超智^[4]方法,采用 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PDGF 诱导的方式建立 ASMC 细胞增殖模型。取第 4 代对数生长期的 HBSMC,待胰酶消化以后以 5×10^4 个细胞密度接种于培养板, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO₂ 培养箱培养。细胞融合度 70% ~ 80%,更换 DMEM 培养基,继续培养 24 h,使细胞同步化于

G₀ 期。按照以下分组对各组细胞给予相应处理:空白组[10% 胎牛血清(FBS) + DMEM];细胞模型组($20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PDGF + 10% FBS + DMEM);正常大鼠血清组(10% 正常大鼠血清 + DMEM);正常大鼠血清细胞模型组(10% 正常大鼠血清 + $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PDGF + DMEM);激素干预组($1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 布地奈德 + $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PDGF + DMEM);防风血清组(10% 防风血清 + $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PDGF + DMEM);乌梅血清组(10% 乌梅血清 + $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PDGF + DMEM);防风-乌梅血清组(10% 防风-乌梅血清 + $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PDGF + DMEM), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO₂ 培养箱继续培养。

2.3 免疫荧光检测 HBSMC α -actin, OPN 的表达 各组药物干预 48 h 后,磷酸盐缓冲液(PBS)轻柔漂洗,4% 的多聚甲醛重悬, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 固定过夜后 PBS 轻柔漂洗 3 次, 0.1% Triton-X 100 室温处理 20 min, PBS 轻柔漂洗 3 次, 1% BSA 室温封闭 1 h, 1% BSA 稀释的一抗(1:50) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,次日用 PBS 清洗后加入稀释后的荧光二抗(1:100),室温避光孵育 1.5 h, PBS 清洗 3 次后以 DAPI(1:10)稀释,室温避光孵育 5 min, PBS 清洗 3 次后加入抗荧光淬灭剂,显微镜下观察。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 HBSMC α -actin, OPN 蛋白的表达水平 各组药物干预 48 h 后,裂解 HBSMC 提取蛋白,BCA 法检测样品蛋白浓度,取每孔按蛋白量 $100 \mu\text{g}$,进行 10% SDS-PAGE 电泳,将凝胶上的蛋白转移至 NC 膜,加入封闭液,室温摇床封闭 1 h,加入 α -actin, OPN 一抗(1:4 000, 1:1 000), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 水平摇床上孵育过夜, PBST 漂洗 3 次后加入适量二抗(1:5 000),室温孵育 1 h,继续 PBST 漂洗 3 次,将混合后的检测试剂均匀加在膜上,反应 3 ~ 5 min。将杂交膜放入保鲜膜中,赶出多余发光液,在暗房压片,显影,量化并归一化相对灰度值。

2.5 ELISA 检测细胞培养上清液中 VEGF, TGF- β , IL-6 表达 具体操作分别按照 VEGF, TGF- β , IL-6 酶联免疫试剂盒使用说明书严格操作,测出吸光度 A,描绘标准曲线,计算含量。

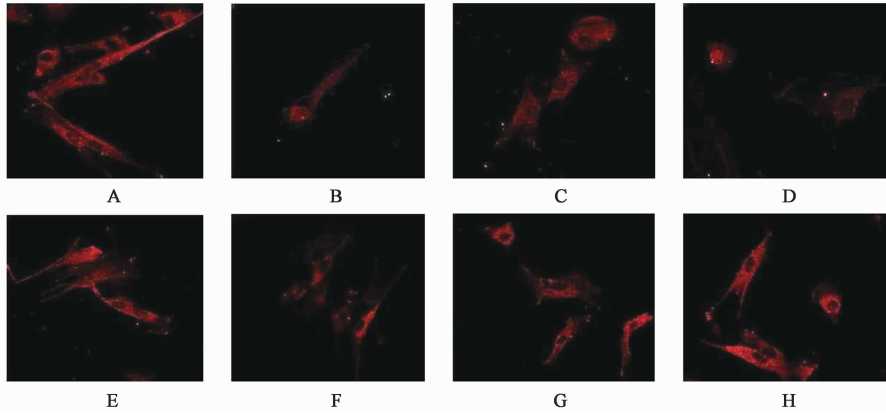
2.6 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数比较用单因素方差分析和 LSD 法进行分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 ASMCs 增殖模型 α -actin, OPN 免疫荧光表达的影响 正常大鼠血清组 α -actin 荧光强度较空白

组明显降低 ($P < 0.05$); 与空白组、正常大鼠血清组比较, 细胞模型组、正常大鼠血清细胞模型组 α -actin 荧光强度明显降低, OPN 荧光强度明显提高 ($P < 0.05$); 各给药组均能提高 α -actin 荧光强度 ($P < 0.05$), 其中防风-乌梅血清组提高 α -actin 荧光强度

的效果优于单独使用防风血清组和乌梅血清组 ($P < 0.05$); 除防风血清组外, 各给药组均能降低 OPN 荧光强度 ($P < 0.05$), 其中防风-乌梅血清组降低 OPN 荧光强度的效果优于单独使用防风血清组和乌梅血清组 ($P < 0.05$)。见图 1, 2, 表 1。



A. 空白组; B. 细胞模型组; C. 正常大鼠血清组; D. 正常大鼠血清细胞模型组; E. 激素干预组; F. 防风血清组; G. 乌梅血清组; H. 防风-乌梅血清组 (图 2~3 同)

图 1 防风-乌梅血清对 ASMCs 增殖模型 α -actin 表达的影响 (免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 1 Effect of Sapsoshnikoviae Radix-Mume Fructus serum on expression of α -actin in proliferation model of ASMCs (IF, $\times 400$)

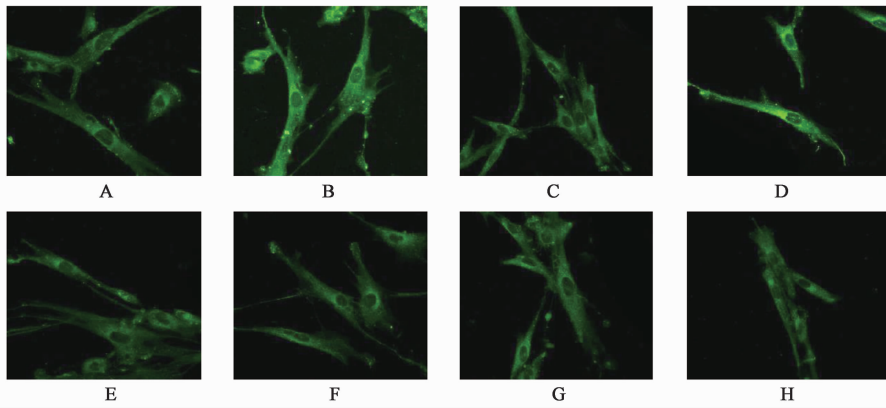


图 2 防风-乌梅血清对 ASMCs 增殖模型 OPN 表达的影响 (免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of Sapsoshnikoviae Radix-Mume Fructus serum on expression of OPN immunofluorescence in ASMCs proliferation model (IF, $\times 400$)

表 1 防风-乌梅血清对 ASMCs 增殖模型 α -actin 及 OPN 免疫荧光表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of Sapsoshnikoviae Radix-Mume Fructus serum on the expression of α -actin and OPN immunofluorescence in ASMCs ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	体积分数/%	α -actin	OPN
空白	-	636.69 \pm 10.63	34.37 \pm 7.03
细胞模型	-	284.60 \pm 12.60 ^{1,2)}	81.40 \pm 14.70 ¹⁾
正常大鼠血清	10	344.86 \pm 15.20 ¹⁾	32.48 \pm 6.90
正常大鼠血清细胞模型	10	223.67 \pm 7.22 ^{1,2,3)}	56.14 \pm 13.34 ¹⁾
布地奈德	1 \times 10 ⁻⁶ ⁷⁾	456.82 \pm 13.25 ^{3,4)}	23.85 \pm 10.44 ^{3,4)}
防风血清	10	554.86 \pm 17.54 ^{4,5,6)}	55.78 \pm 11.80 ^{5,6)}
乌梅血清	10	483.97 \pm 10.57 ^{3,4,6)}	46.65 \pm 3.12 ^{3,5,6)}
防风-乌梅血清	10	438.21 \pm 14.99 ^{3,4)}	27.21 \pm 9.10 ^{3,4)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与正常大鼠血清组比较²⁾ $P < 0.05$;与细胞模型组比较³⁾ $P < 0.05$;与正常大鼠血清细胞模型组比较⁴⁾ $P < 0.05$;与激素干预组比较⁵⁾ $P < 0.05$;与防风-乌梅血清组比较⁶⁾ $P < 0.05$; ⁷⁾ 表示单位为 mol \cdot L⁻¹。

3.2 对 ASMCs 增殖模型 α -actin, OPN 蛋白表达的影响 与空白组、正常大鼠血清组比较, 细胞模型组、正常大鼠血清细胞模型组 α -actin 蛋白表达明显降低, OPN 蛋白表达明显提高 ($P < 0.05$); 与细胞模型组、正常大鼠血清细胞模型组比较, 激素干预组、防风-乌梅血清组 α -actin 蛋白表达均明显增强 ($P < 0.05$); 激素干预组、防风血清组、乌梅血清组、防风-乌梅血清组 OPN 蛋白表达均较细胞模型组、正常大鼠血清细胞模型组明显降低 ($P < 0.05$); 其中防风-乌梅血清组与激素干预组上调 α -actin, 降低 OPN 蛋白表达的效果要优于单独使用防风血清组和乌梅血清组 ($P < 0.05$)。见图 3, 表 2。

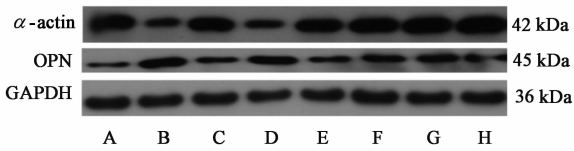


图 3 ASMCs 增殖模型 α -actin 及 OPN 蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of expression of α -actin and OPN protein in ASMCs proliferation model

3.3 对 ASMCs 增殖模型 VEGF, TGF- β , IL-6 含量的影响 与空白组、正常大鼠血清组比较, 细胞模型组、正常大鼠血清细胞模型组 VEGF, TGF- β , IL-6 含量明显提高 ($P < 0.05$); 与细胞模型组、正常大鼠血清细胞模型组比较, 激素干预组、防风血清组、乌梅

表 2 防风-乌梅血清对 ASMCs 增殖模型 α -actin 及 OPN 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of Saposhnikoviae Radix-Mume Fructus serum on relative expression of α -actin and OPN protein in ASMCs ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	体积分数/%	α -actin/GAPDH	OPN/GAPDH
空白	-	1.000	1.000
细胞模型	-	0.549 \pm 0.078 ¹⁾	1.815 \pm 0.135 ¹⁾
正常大鼠血清	10	1.065 \pm 0.092	1.157 \pm 0.031
正常大鼠血清细胞模型	10	0.528 \pm 0.088 ¹⁾	1.986 \pm 0.172 ¹⁾
布地奈德	1 \times 10 ⁻⁶ ⁴⁾	0.903 \pm 0.090 ²⁾	1.498 \pm 0.096 ²⁾
防风血清	10	0.717 \pm 0.086 ³⁾	1.679 \pm 0.011 ^{2,3)}
乌梅血清	10	0.752 \pm 0.076 ³⁾	1.642 \pm 0.061 ^{2,3)}
防风-乌梅血清	10	0.917 \pm 0.136 ²⁾	1.453 \pm 0.067 ²⁾

注: 与空白组及正常大鼠血清组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与细胞模型组及正常大鼠血清细胞模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。与防风-乌梅血清组及激素干预组比较³⁾ $P < 0.05$; ⁴⁾ 表示单位为 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 3 同)。

血清组、防风-乌梅血清组 VEGF, IL-6 表达量均明显降低, 激素干预组、乌梅血清组、防风-乌梅血清组 TGF- β 表达量均明显降低 ($P < 0.05$); 防风-乌梅血清组与激素干预组降低 VEGF 表达量的效果要优于单独使用防风血清组和乌梅血清组, 降低 TGF- β , IL-6 表达量的效果要优于单独使用防风血清组 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 防风-乌梅血清对 ASMCs 增殖模型 VEGF, TGF- β , IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of Saposhnikoviae Radix-Mume Fructus serum on concentration of VEGF, TGF- β and IL-6 in ASMCs value added model ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	体积分数/%	VEGF	TGF- β	IL-6
空白	-	161.68 \pm 12.64	75.36 \pm 8.59	227.24 \pm 2.84
细胞模型	-	1 006.22 \pm 83.24 ¹⁾	271.78 \pm 17.68 ¹⁾	416.90 \pm 37.56 ¹⁾
正常大鼠血清	10	179.72 \pm 31.19	82.93 \pm 10.60	192.96 \pm 18.37
正常大鼠血清细胞模型	10	1 016.89 \pm 93.52 ¹⁾	287.71 \pm 16.23 ¹⁾	420.06 \pm 22.65 ¹⁾
布地奈德	1 \times 10 ⁻⁶ ⁴⁾	622.11 \pm 64.38 ²⁾	154.02 \pm 16.07 ²⁾	305.26 \pm 30.66 ²⁾
防风血清	10	844.71 \pm 135.07 ^{2,3)}	263.39 \pm 18.28 ³⁾	376.39 \pm 9.36 ^{2,3)}
乌梅血清	10	803.64 \pm 70.57 ^{2,3)}	241.63 \pm 25.80 ²⁾	365.32 \pm 27.91 ²⁾
防风-乌梅血清	10	621.14 \pm 57.08 ²⁾	227.08 \pm 9.57 ²⁾	327.60 \pm 3.89 ²⁾

4 讨论

ASMCs 的改变在气道重塑过程中具有重要意义, ASMCs 表型转化异常可进一步加重气道炎症与高反应性, 影响气道重塑。ASMCs 具有收缩型与合成型两种细胞表型, 通常状态下表现为收缩型, 当 ASMCs 受到一定外刺激时便会由收缩型向合成型

转化, 合成型表型转化使 ASMCs 产生多种因子, 一方面使炎症细胞向气道聚集, 另一方面放大炎症细胞自身产生的信号转导, 促进更多的趋化因子产生, 直接和间接参与哮喘气道炎症反应的整个过程, 加重哮喘气道病理改变^[5]。因此 ASMCs 表型转化可能是哮喘症状加重的一个重要原因, 又可能是哮

喘发作的结果,能否及时纠正 ASMCs 表型对于哮喘的治疗具有重要意义。研究发现,PDGF 可促进 ASMCs 形成合成表型^[6],释放大量的炎症因子和细胞因子,导致气道高反应性和气道重塑,进而又引起炎症细胞的募集与活化,扩大炎症级联反应,再次影响 ASMCs 的增殖和表型^[7-8],因此常用其诱导建立 ASMCs 增殖模型,用于气道重塑的研究。

α -actin, OPN 是 ASMCs 主要表型标志物。OPN 在哮喘发病中参与气道炎症与重塑,在患者血清、气道分泌物、上皮细胞表达较高,诸多研究提示 OPN 表达上调与哮喘病情的严重程度极具相关性^[9-11]。本次研究通过 PDGF 刺激诱导 ASMCs 增殖模型,免疫荧光与 Western blot 结果表明,细胞模型组、正常大鼠血清细胞模型组 α -actin 荧光强度与蛋白表达水平均较空白组、正常大鼠血清组明显降低,OPN 荧光强度与蛋白表达水平均较空白组、正常大鼠血清组明显提高,提示 ASMCs 由收缩型转化为合成型。研究结果与以往研究结果一致。研究发现,各给药组均能一定程度抑制 ASMCs 由收缩型向合成型转化,其中以防风-乌梅血清组效果最佳。同时免疫荧光结果提示正常大鼠血清组 α -actin 荧光强度较空白组明显降低,但在 Western blot 表达上未见明显差异,是否大鼠血清能影响 α -actin 荧光强度的表达,还需进一步研究。

哮喘气道重塑过程中 ASMCs 由收缩型向合成型转化,一方面促进炎症介质、细胞因子释放,参与哮喘炎症发生、发展过程;另一方面炎症介质和细胞因子又可调控 ASMCs 表型,使哮喘气道重塑进一步恶化,从而形成恶性循环。早期多数研究表明,合成型 ASMCs 在活性因子的作用下可合成分泌生长因子 VEGF, TGF- β , 炎症因子 IL-6 等多种活性物质,参与气道炎症、气道重构等^[12-17]。其中,VEGF 与 ASMCs 增殖密切相关,能结合内皮细胞膜上的 VEGF 受体,诱导内皮细胞增生,促使基底膜变厚,促进气道平滑肌增殖肥大,加重气道重塑^[18],研究证实哮喘患者和哮喘模型肺组织及血清中 VEGF 表达增高^[19-20];TGF- β 是一种抗纤维化细胞因子,相关研究表明 TGF- β 的不同亚型在气道炎症及气道重塑过程具有重要作用^[21],TGF- β_1 可刺激 ASMCs 导致 VEGF 释放增强^[22],还可诱导间质细胞中细胞外基质合成,参与气道重塑^[23],TGF- β 诱导多种细胞反应,在哮喘患者气道中表达量较高^[24];IL-6 是一种淋巴因子,研究发现其在哮喘患者血清中增高明显^[25],在急性炎症反应中参与急性期反应蛋白的合

成,是气道慢性炎症反应发生的重要因子^[26],同时有研究认为,哮喘患者血清中 IL-6 升高可能是肺上皮细胞“活化”状态的结果^[27]。ELISA 结果表明,各给药组均能一定程度的抑制 VEGF, TGF- β 及 IL-6 的分泌,其中防风-乌梅血清组抑制 VEGF, TGF- β , IL-6 分泌的效果相对单独使用防风血清组和乌梅血清组较好。

综上结果提示防风-乌梅配伍的抑制气道重塑作用,可能与抑制 ASMCs 由收缩型向合成型的转化有关,从而减少 VEGF, TGF- β , IL-6 等活性物质释放有关,验证了防风-乌梅配伍具有“相须为用”的作用。本次研究从细胞表型转化及相关活性因子的角度阐释了防风-乌梅配伍抑制 ASMCs 增殖的机制,为进一步揭示防风-乌梅配伍机制奠定了基础,但未能完全阐明防风-乌梅配伍抑制细胞表型转化的具体靶点,仍需进行深一步研究。

[参考文献]

- [1] 董振华,季元,范爱平. 祝谌予经验集[M]. 北京:人民卫生出版社,1999:61.
- [2] 吴贤波,唐宋琪,王明谊,等. 药对防风-乌梅调节蛋白酶激活受体 2 表达阻断肥大细胞脱颗粒的新机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(3): 1089-1092.
- [3] 吴贤波,朱海燕,李秦峰,等. 药对防风-乌梅对肥大细胞分泌 Th2 类细胞因子的作用及机制研究[J]. 成都中医药大学学报, 2015, 38(3):20-22.
- [4] 王超智. 川芎嗪对 PDGF 诱导大鼠气道平滑肌细胞增殖的抑制作用及分子机制[D]. 广州:广州医学院,2009.
- [5] 苏美萍,邱晨. 哮喘气道平滑肌细胞表型转化调控的研究进展[J]. 广东医学,2014,35(10):1627-1629.
- [6] Wright D B, Trian T, Siddiqui S, et al. Functional phenotype of airway myocytes from asthmatic airways [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2013, 26(1):95-104.
- [7] DAI Y, CHENG R, GAO J, et al. Casticin inhibits PDGF-induced proliferation and migration of airway smooth muscle cells[J]. Eur J Pharmacol, 2018, 830: 39-46.
- [8] Gunst S J, Jr P R. Last Word on Point; alterations in airway smooth muscle phenotype do cause airway hyperresponsiveness in asthma [J]. J Appl Physiol, 2012, 113(5):847.
- [9] Delimpoura V, Bakakos P, Tseliou E, et al. Increased levels of osteopontin in sputum supernatant in severe refractory asthma[J]. Thorax, 2010, 65(9):782-786.
- [10] Samitas K, Zervas E, Vittorakis S, et al. Osteopontin

- expression and relation to disease severity in human asthma[J]. *Eur Respir J*, 2011,37(2):331-341.
- [11] Hillas G, Loukides S, Kostikas K, et al. Increased levels of osteopontin in sputum supernatant of smoking asthmatics [J]. *Cytokine*, 2013,61(1):251-255.
- [12] McKay S, Jongste J C, Saxena P R, et al. Angiotensin II induces hypertrophy of human airway smooth muscle cells: expression of transcription factors and transforming growth factor-beta1 [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998,18(6):823-833.
- [13] YING S, MENG Q, Zeibecoglou K, et al. Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics [J]. *J Immunol*, 1999, 163 (11): 6321-6329.
- [14] Pype J L, Dupont L J, Menten P, et al. Expression of monocyte chemotactic protein (MCP)-1, MCP-2, and MCP-3 by human airway smooth-muscle cells. Modulation by corticosteroids and T-helper 2 cytokines [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999, 21 (4): 528-536.
- [15] Ammit A J, Hoffman R K, Amrani Y, et al. Tumor necrosis factor- α -induced secretion of RANTES and interleukin-6 from human airway smooth-muscle cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, 23 (6): 794-802.
- [16] Gosens R, Meurs H, Bromhaar M M G, et al. Functional characterization of serum-and growth factor-induced phenotypic changes in intact bovine tracheal smooth muscle[J]. *Br J Pharmacol*, 2002, 137 (4): 459-466.
- [17] XIA Y C, Redhu N S, Moir L M, et al. Pro-inflammatory and immunomodulatory functions of airway smooth muscle: emerging concepts[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2013, 26(1):64-74.
- [18] Smith R. Is VEGF a potential therapeutic target in asthma? [J]. *Pneumologia*, 2014, 63(4):194-197.
- [19] HUANG C Q, LI W, WU B, et al. Pheretima aspergillum, decoction suppresses inflammation and relieves asthma in a mouse model of bronchial asthma by NF- κ B inhibition [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 189: 22-30.
- [20] ZHA W, MEI S, MAO H, et al. Administration of pigment epithelium-derived factor inhibits airway inflammation and remodeling in chronic OVA-induced mice via VEGF suppression [J]. *Allergy Asthma Immunol Res*,2016,8(2):161-169.
- [21] Bottoms S E, Howell J E, Reinhardt A K, et al. TGF- β isoform specific regulation of airway inflammation and remodelling in a murine model of asthma [J]. *PLoS One*, 2010,5(3):e9674.
- [22] Reddel C J, Cultrone D, Rnjakkovacina J, et al. Tropoelastin modulates TGF- β_1 -induced expression of VEGF and CTGF in airway smooth muscle cells [J]. *Matrix Biol*, 2013, 32(7/8):407-413.
- [23] 黄少君,傅汝梅.培土生金方对慢性阻塞性肺疾病稳定期患者气道重塑机制的观察[J].*中国实验方剂学杂志*,2018,24(1):174-179.
- [24] Makinde T, Murphy R F, Agrawal D K. The regulatory role of TGF- β_1 in airway remodeling in asthma [J]. *Immunol Cell Biol*, 2007, 85(5):348.
- [25] 李弯,梁敏,边俊梅,等.射干麻黄汤治疗儿童哮喘发作期临床疗效及对血清细胞因子、骨桥蛋白及 TIMP-1 水平的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*,2017,23(20):180-184.
- [26] 王东,杨欣燧,田琳娟,等.苏黄止咳汤对咳嗽变异性哮喘患者 IL-6,TNF- α 的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017,23(2):164-168.
- [27] Rincon M, Irvin C G. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases [J]. *Send Int J Biol Sci*,2012,8(9):1281-1290.

[责任编辑 周冰冰]