

· 论 著 ·

VEGF、HIF-1 α 在大鼠慢性哮喘模型中的表达及地塞米松的干预效应刘 鑫¹, 梅全慧², 刘 希², 莫万勇³, 黄 艳^{1 Δ}

(南华大学: 1. 附属第一医院中医科; 2. 临床系, 湖南衡阳 421001;

3. 湖南省邵阳市中心医院 422000)

摘要:目的 观察缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子(VEGF)在慢性哮喘大鼠中的表达水平,探讨其在慢性哮喘气道重塑中的作用。方法 以卵清蛋白(OVA)致敏及反复激发建立大鼠慢性哮喘模型,激发前 30 min 胃内灌注地塞米松 1 mg/kg,最后一次激发 12 h 内处死大鼠,常规病理切片观察大鼠肺内炎症情况、总气管壁厚度、气管内壁厚度及气道平滑肌厚度。免疫组化检测气道壁 HIF-1 α 、VEGF 蛋白的表达,RT-PCR 观察大鼠肺部 HIF-1 α 、VEGF mRNA 的表达。结果 慢性哮喘模型组大鼠气道支气管及血管周围大量炎症细胞聚集,总气管壁、气管内壁及气道平滑肌增厚,肺组织 HIF-1 α 、VEGF mRNA 及 HIF-1 α 、VEGF 蛋白的表达增高($P < 0.01$)。哮喘大鼠致敏前使用地塞米松后气道炎症减轻,减轻总气管壁、气管内壁及气道平滑肌增厚。各组大鼠肺组织内 HIF-1 α 、VEGF 蛋白的表达与气道壁厚度呈正相关。结论 HIF-1 α 、VEGF 可能参与了慢性哮喘大鼠的气道重塑,早期使用地塞米松可以预防气道重塑。

关键词:哮喘;气道重塑;缺氧诱导因子-1 α ;血管内皮生长因子;地塞米松

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.22.006

中图分类号:R562.25;R977.11

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)22-3013-03

Expression of VEGF and HIF-1 α in asthma chronic model and dexamethasone interventionLIU Xin¹, MEI Quan-hui², LIU Xi², et al.

(1. Department of TCM, First Affiliated Hospital; 2. Department Clinical, Hengyang, Hunan 421001, China;

3. Shaoyang Central Hospital, Shaoyang, Hunan 422000, China)

Abstract: Objective To evaluate the relationship between VEGF, HIF-1 α level and asthmatic chronic rats and to investigate the effect of VEGF and HIF-1 α in airway remodeling of chronic asthmatic rats. **Methods** Twenty-four SD rats were randomly divided into three groups; the asthma chronic model group, the dexamethasone group and the control group. The asthmatic model was established by sensitization and challenge with ovalbumin, and the rats in the dexamethasone group administered dexamethasone by gastric gavage before the challenge. Immunohistochemistry and RT-PCR were used to measure the level of VEGF, HIF-1 α protein and mRNA in the rats' lung tissues. The thickness of the airway wall and its smooth muscle was estimated by a computerized digital image analyzer. **Results** (1) The thickness of the airway wall in the asthma chronic model group was higher than that in the other groups ($P < 0.01$). (2) The expression of VEGF, HIF-1 α protein and mRNA in the lung tissues of the asthma chronic model group was higher than that in the other groups ($P < 0.01$). (3) VEGF, HIF-1 α protein and mRNA expressions were positively correlated with airway wall thickness. **Conclusion** The expressions of VEGF, HIF-1 α protein and mRNA are increased in the lung tissues of asthmatic chronic rats and positively correlated with the airway thickness. VEGF and HIF-1 α may take part in the process of airway remodeling of asthma.

Key words: asthma; airway remodeling; hypoxia-inducible factor-1 α ; vascular endothelial growth factor; dexamethasone

气道重塑是指气道在各种刺激下所发生气道壁结构的变化,包括气道上皮组织化生、基底膜增厚、气道平滑肌细胞的肥大和增生、血管生成和血管重塑(vascular remodeling)等。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种多功能血管调节因子,有着促进内皮细胞增殖、增加微血管通透性、促进血管生成和成熟的功能。缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)是哺乳动物机体在缺氧条件下一个非常重要的转录调节因子。HIF-1 通过调节其目标基因等途径影响能量的代谢、血管张力的调节等生理和病理过程,VEGF 是其中的一个重要的目标基因^[1]。VEGF 和 HIF-1 与炎症性疾病有着密切的联系,它们与哮喘的关系国内外鲜有报道。本实验研究 HIF-1 α 、VEGF 在哮喘大鼠中的表达水平,探讨其在哮喘病理过程中的作用机制。

1 材料与方

1.1 材料 超声雾化器(鞍山市电子仪器厂),自制封闭雾化

吸入箱,卵清蛋白(购自美国 Sigma 公司),氢氧化铝、HIF-1 α 多克隆兔抗大鼠抗体、VEGF 多克隆兔抗大鼠抗体、免疫组化羊抗兔二抗、DAB 显色剂(购自武汉博士德生物工程有限公司),组织裂解液 TRIZOL、一步法逆转录试剂盒(购自上海生物工程技术服务有限公司),图像分析软件 Image-Pro Plus 5.1,紫外线凝胶成像分析系统 Alpha Imager 3400(美国 Alpha 公司)等。

1.2 动物分组及模型的制备 24 只健康 2 级雄性 SD 大鼠由南华大学动物部提供,体质量 100~120 g,按随机表随机分成 3 组:慢性哮喘模型组(A 组)、地塞米松治疗组(B 组)、正常对照组(C 组)。动物模型制备方法参考文献[2],第 1 天和第 8 天 A、B 两组大鼠每只腹腔内注射 OVA/AL(OH)₃ 混合液 1 mL(内含 OVA 1 mg 和 AL(OH)₃ 100 mg)致敏;C 组腹腔内注射等量生理盐水。第 15 天开始 A、B 组雾化吸入含 1% OVA 的生理盐水激发哮喘,隔天 1 次,每次 30 min,共 8 周;C

Δ 通讯作者,电话:0734-8279480。

组用生理盐水代替雾化吸入。每次激发前 30 min, B 组先给予地塞米松 1.0 mg/kg 灌胃, A 组和 C 组在同一时间段用等量生理盐水灌胃。抗原激发后, 以大鼠出现呼吸急促, 严重者呼吸减慢或节律不整、嘴唇发绀、四肢无力、行动迟缓或俯伏不动、反应迟钝、大小便失禁等为激发成功的标志。

1.3 实验标本的采集 在末次激发后 12 h 内每只腹腔内注射 10% 水合氯醛 1 mL 处死大鼠, 开胸切取左肺迅速置于液氮中保存, 用于提取 mRNA。结扎左主支气管, 于气管内灌注 4% 多聚甲醛 2 mL, 内固定后取右肺, 用于组织病理学观察及免疫组化检测。

1.4 形态学观察 取中内带肺组织常规石蜡包埋。石蜡切片厚度 4 μm , HE 染色后, 显微镜下观察。

1.5 总气管壁厚度、气管内壁厚度及气道平滑肌厚度测定 肺组织标本切片 HE 染色后光学显微镜观察, 找到完整的中小支气管横断面 [500 μm < 支气管基底膜周径 (Pbm) < 1 500 μm], 每张切片选取 3 个完整支气管, 采用图像采集系统获取图像后再以图像分析软件 Image-Pro Plus 5.1 定量分析。用光笔描绘出气道基底膜边界及平滑肌的内外边界, 测定 Pbm、总管壁面积 (Wat)、内管壁面积 (Wai)、气道平滑肌面积 (Wam), 将测得的后 3 个值除以 Pbm 标化后, 分别代表总管壁标化厚度 (Wat/Pbm)、内管壁标化厚度 (Wai/Pbm)、平滑肌标化厚度 (Wam/Pbm)。每个标本各取 3 个支气管横断面测量, 取其平均值。

1.6 免疫组化检测 HIF-1 α 、VEGF 蛋白的表达 一抗选用兔抗大鼠 HIF-1、VEGF 多克隆抗体, 稀释度为 1:100。二抗选用山羊抗兔抗体, 操作步骤按试剂盒说明书进行: 常规脱蜡至水, 抗原修复、滴加一抗过夜、滴加生物素化二抗、DAB 显色, 光镜观察, 苏木素轻度复染。采用图像采集系统获取图像后再以 Image-Pro Plus 5.1 图像分析软件测量分析, 分别测定 3 支支气管上皮积分光密度 (integral optical density, IOD), 计算其平均值代表支气管上皮 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达相对含量。

1.7 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 VEGF 及 HIF-1 α mRNA 的表达 采用 TRIZOI 试剂一步法提取总 RNA。按试剂盒说明书和引物扩增温度设置 CDNA 合成和 RT-PCR 扩增条件。反应系列放入 PCR 扩增仪 (广州市华粤行仪器有限公司 BiometraT 型) 中进行扩增。PCR 引物: VEGF 上游 5'-CAA TGA TGA AGC CCT GGA GT-3', 下游 5'-TTT CTT GCG CTT TCG TTT TT-3'。HIF-1 上游 5'-TCA AGT CAG CAA CGT GGA AG-3', 下游 5'-TAT CGA GGC TGT GTC GAC TG-3'。内参照 GAPDH 上游 5'-ACT CAG AAG ACT GTG GAT GG-3', 下游 5'-GTT GCT GTT GAA GTC CAC GG-3', 扩增产物片段分别为 210、198、323 bp。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳 22 min。每组重复实验 8 次, 通过紫外线凝胶成像分析系统对扩增产物条带进行分析, 分别测定各扩增带吸光度, 将目的基因 VEGF、HIF-1 扩增带分别与内参照 GAPDH 扩增带吸光度的比值 A 作为其 mRNA 水平的半定量指标。

1.8 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异采用 *F* 检验, 以 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。采用 Pearson 直线相关分析法进行相关性分析。

2 结 果

2.1 病理改变 A 组在致敏激发后出现明显呼吸困难, B 组有呼吸加快、气喘等表现, 但较 A 组轻。A 组病理学上可见支气管黏膜下及管壁周围大量炎症细胞浸润 (包括嗜酸粒细胞、

淋巴细胞、中性粒细胞), 黏液腺增生, 部分气道上皮脱落, 黏膜下细胞外基质沉积, 新生血管形成, 平滑肌肥大, 管壁增厚, 管腔变窄, 基底膜增厚且不规则, 管腔内黏液栓形成; C 组未见炎症细胞浸润及平滑肌肥大等改变, B 组介于两者之间, 见彩插 I 图 1~3。

2.2 图像分析 图像分析显示, Wat/Pbm、Wai/Pbm、Wam/Pbm 检测结果 A 组较 B、C 组增厚, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 各组大鼠气道壁各层标化后的数值 ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Wat/Pbm	Wai/Pbm	Wam/Pbm
A 组	8	68.66 \pm 5.22	38.21 \pm 4.08	8.04 \pm 1.48
B 组	8	42.82 \pm 3.84	21.64 \pm 3.12	3.22 \pm 1.08
C 组	8	34.80 \pm 3.48	16.51 \pm 1.24	2.96 \pm 0.78

2.3 蛋白表达半定量分析 A 组支气管上皮 VEGF、HIF-1 α 积分光密度 IOD 值较 B 组和 C 组增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 各组大鼠支气管上皮 VEGF、HIF-1 α 蛋白的积分光密度 IOD 值 (μm^2 , $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	VEGF	HIF-1 α
A 组	8	96.31 \pm 5.64	82.26 \pm 6.06
B 组	8	76.86 \pm 5.22	65.58 \pm 4.88
C 组	8	68.74 \pm 4.34	55.42 \pm 4.66

2.4 VEGF 及 HIF-1 α mRNA 的表达 A 组肺组织 VEGF mRNA、HIF-1 α mRNA 的表达比 B、C 组高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 3。

表 3 各组大鼠肺组织中 VEGF、HIF-1 α mRNA 表达半定量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	VEGF mRNA	HIF-1 α mRNA
A 组	8	0.70 \pm 0.14	0.60 \pm 0.15
B 组	8	0.51 \pm 0.12	0.39 \pm 0.10
C 组	8	0.42 \pm 0.12	0.28 \pm 0.08

2.5 相关性分析 支气管上皮细胞 VEGF 及 HIF-1 α 表达的 IOD 值与总管壁厚度呈正相关 (r 分别为 0.81 和 0.78, $P < 0.01$, $n = 24$), 与平滑肌厚度呈正相关 (r 分别 0.71 和 0.68, $P < 0.01$, $n = 24$), 与气管内壁厚度呈正相关 (r 分别 0.83 和 0.74, $P < 0.01$, $n = 24$)。

3 讨 论

VEGF 是一种在哮喘慢性炎症中起重要作用的多功能因子^[3]。肺组织中 VEGF 高表达, 可加重局部气道的炎症反应。本实验中慢性哮喘模型大鼠肺组织 VEGF 表达增高, 可能与哮喘发作时气道壁黏膜下及支气管血管周围募集大量嗜酸粒细胞、中性粒细胞等炎症细胞有关, 这些细胞可释放大量 VEGF。有报道中性粒细胞、成纤维细胞可释放 VEGF^[4]。也有报道哮喘患者气道 VEGF 高表达与嗜酸粒细胞增多呈正相关^[5], 本实验中哮喘模型气道壁厚度与 VEGF 表达呈正相关, 这与 VEGF 促血管生成和促血管渗漏作用有一定的关系。作为一种作用最强的促进血管生成的细胞因子, VEGF 通过促进气道血管的生成, 在以下几方面参与了哮喘气

道重塑:(1)血管数量、体积增加,使气道壁厚度增加;(2)血管生成是气道平滑肌细胞、成纤维细胞增生/肥大的基础;(3)新生血管表面黏附分子表达异常导致炎症细胞浸润增加。Su 等^[6]也发现哮喘气道黏膜下单位面积内微血管的数量较健康者增多,并与 VEGF 的水平呈正相关。作为一种强效促血管渗漏因子,VEGF 通过增加哮喘气道血管的渗透性,有利于各种炎症细胞、血浆成分的渗出,加重局部气道的炎症反应,引起血管外基质的结构改变和间质的水肿,促进气道重塑。

慢性哮喘模型大鼠 HIF-1 α 表达增高,可能与下列因素有关:(1)哮喘发作期,肺组织缺氧,缺氧状态能够使 HIF-1 α 转录增加,降解减少^[7],表达上调;(2)哮喘发作期,气道痉挛,支气管壁平滑肌细胞受到异常的机械张力,使气道平滑肌 HIF-1 α 蛋白分泌增加。有报道显示平滑肌 HIF-1 α 蛋白表达在机械张力增加的情况下上调^[8-9]。HIF-1 α 表达上调后能够促进包括 VEGF 和许多炎症因子在内的 50 多种基因的转录,其中 VEGF 和某些炎症因子转录后能够加重哮喘的发作,促进气道重塑。

糖皮质激素是目前已知作用最强的气道抗炎药物,是治疗哮喘的有效药物^[10],激素能延缓气道重塑,在抑制血管系统的改变方面有明显的作用。但是,目前糖皮质激素在气道重塑中的作用机制尚不明确。本实验中地塞米松治疗组 HIF-1 α 和 VEGF 的表达均较慢性哮喘模型组低,可能是糖皮质激素通过抑制 HIF-1 α 和 VEGF 的表达,抑制炎症因子释放,从而延缓了气道重塑。

本实验中哮喘模型大鼠肺组织 VEGF 和 HIF-1 α 表达上调,通过促进新生血管的生成,增加血管的渗漏,使局部的炎症反应加重,促进气道重塑。早期予以地塞米松治疗可以降低 VEGF 和 HIF-1 α 表达,延缓气道重塑的进程。但 VEGF 和 HIF-1 α 在哮喘的病变中是否起着关键作用或者仅仅是其他更重要病理进程的标志,尚须进一步研究。

参考文献:

[1] Yu P, Kodadek T. Dynamics of the hypoxia-inducible factor-1-VEGF promoter complex[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282 (Issue 48): 35035.

(上接第 3012 页)

治疗。因研究样本较小,仅是该方面研究的初步探讨,关于银杏达莫对心肌梗死后微循环影响的深入机制尚需进一步研究。

参考文献:

[1] Gao RL. Guideline for diagnosis and treatment of acute myocardial infarction[J]. *Chin J Cardiol*, 2001, 29 (12): 174.

[2] Yalonetsky S, Gruberg L, Sandach A, et al. Rescue percutaneous coronary intervention after failed thrombolysis: results from the acute Coronary Syndrome Israel Surveys (ACSIS)[J]. *Actue Cardiac Care*, 2006, 8(2): 86.

[3] 郭彩林. 银杏达莫注射液对老年冠心病血液流变学的影响[J]. *山西医科大学学报*, 2005, 6(3): 316.

[4] 叶新水, 王晓峰, 郭伟民. 银杏达莫注射液治疗急性脑梗死 45 例[J]. *中国医药导报*, 2006, 33(3): 93.

[2] 张颖, 金发光. 哮喘小鼠白细胞介素 L-5 动态分析及地塞米松的干预作用[J]. *重庆医学*, 2006, 35(18): 1685.

[3] Walters EH, Soltani A, Reid DW, et al. Vascular remodeling in asthma[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2008, 8(1): 39.

[4] Bandi N, Kompella UB. Budesonide reduces vascular endothelial growth factor secretion and expression in airway (Calu-1) and alveolar (A549) epithelial cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 425: 109.

[5] Feltis BN, Wignarajah D, Zheng L, et al. Increased vascular endothelial growth factor and receptors relationship to angiogenesis in asthma[J]. *Am Thorac Soc*, 2006, 173 (11): 1201.

[6] Su X, Taniuchi N, Jin E, et al. Spatial and phenotypic characterization of vascular remodeling in a mouse model of asthma[J]. *Pathobiology*, 2008, 75(1): 42.

[7] Hellwig-Burgel T, Stiehl DP, Wagner AE, et al. hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2005, 25: 297.

[8] Kim CH, Cho YS, Chun YS, et al. Early expression of myocardial HIF-1 α in response to mechanical stresses: regulation by stretch-activated channels and the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway[J]. *Circ Res*, 2002, 90: e25.

[9] Hasaneen NA, Zucker S, Cao J, et al. Cyclic mechanical strain-induced proliferation and migration of human airway smooth muscle cells: role of EMMPRIN and MMPs[J]. *FASEB J*, 2005, 19: 1507.

[10] Korideck H, Peterson JD. Noninvasive quantitative tomography of the therapeutic response to dexamethasone in ovalbumin-induced murine asthma J[J]. *Pharmacol Exp Ther*, 2009, 329: 882.

(收稿日期: 2009-12-10 修回日期: 2010-04-13)

[5] Cershlieck AH, Stephensuo yd A, Hughes S, et al. Rescue angioplasty after failed thrombolytic therapy for acute myocardial infarction[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(26): 2758.

[6] 孙萍, 王璐, 赵萍. 银杏叶提取物治疗急性脑梗死患者血浆内皮素血栓素、前列腺素及血液流变学的研究[J]. *贵州医药*, 2006, 30(2): 172.

[7] 马建林, 毛焕元, 周本财, 等. 银杏叶片防治冠心病患者体内红细胞脂质过氧化损伤的临床观察[J]. *同济医科大学学报*, 2000, 29(1): 71.

[8] 王际军, 草天锦, 陈秋芬, 等. 银杏达莫注射液治疗老年急性心肌梗死 136 例[J]. *心血管康复医学杂志*, 2005, 14 (2): 891.

(收稿日期: 2010-01-25 修回日期: 2010-05-10)