

研究论文

细胞外信号调节激酶 1/2 信号通路在慢性哮喘模型大鼠支气管平滑肌细胞迁移功能变化中的调控作用

谢 敏, 刘先胜*, 徐永健, 张珍祥, 白 晶, 倪 望, 陈士新

华中科技大学同济医学院附属同济医院呼吸内科, 武汉 430030

摘 要: 本研究旨在探讨细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2) 信号通路在慢性哮喘模型大鼠支气管平滑肌细胞(bronchial smooth muscle cells, BSMCs)迁移能力改变中的调控作用。应用卵清蛋白致敏和雾化方法制备大鼠慢性哮喘模型, 体外培养大鼠 BSMCs, 采用免疫荧光细胞化学、Western blot 和 RT-PCR 方法检测 ERK1/2 信号通路的表达, 分别用平面迁移实验和跨膜迁移实验来评价 BSMCs 的活动和趋向迁移能力, 并比较用和不用 ERK1/2 信号通路干预剂的差异。Western blot 结果显示慢性哮喘模型大鼠 BSMCs 中总 ERK1/2 (9.13 ± 0.87) 较对照组(4.68 ± 0.59)明显增加, 磷酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) 占总 ERK1/2 的比值(0.55 ± 0.05)较对照组(0.48 ± 0.04)显著提高 ($n=10, P<0.01$)。慢性哮喘组 ERK1 和 ERK2 mRNA 的表达(1.83 ± 0.24 和 1.07 ± 0.11)较对照组(0.58 ± 0.14 和 0.51 ± 0.12)明显增高($n=10, P<0.01$)。在平面迁移实验中, 慢性哮喘大鼠 BSMCs 的迁移最远距离是对照组的(2.9 ± 0.1)倍, 在 ERK1/2 激动剂表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)刺激下增加到(5.0 ± 0.2)倍, 而在 30 mmol/L PD98059 的作用后下降到(1.7 ± 0.2)倍。正常对照大鼠 BSMCs 平面迁移能力对 PD98059 的反应较慢性哮喘组弱, 仅在 100 mmol/L PD98059 的作用下下降到(0.8 ± 0.1)倍。跨膜迁移实验中, 慢性哮喘大鼠 BSMCs 的跨膜迁移细胞是对照组的(1.9 ± 0.1)倍, 在 EGF 刺激下增加到(3.1 ± 0.2)倍, 而在 30 mmol/L PD98059 作用后下降到(1.45 ± 0.2)倍。这些结果表明慢性哮喘模型大鼠 BSMCs 的迁移能力明显增强, ERK1/2 信号通路在该功能变化的调控中可能发挥了重要作用。

关键词: 细胞外信号调节激酶; 哮喘; 支气管平滑肌细胞; 迁移**中图分类号:** R 329

Role of extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway in migration of bronchial smooth muscle cells of chronic asthmatic rats

XIE Min, LIU Xian-Sheng*, XU Yong-Jian, ZHANG Zhen-Xiang, BAI Jing, NI Wang, CHEN Shi-Xin

Department of Respiratory Medicine, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract: This work was designed to explore the role of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling pathway in migration of bronchial smooth muscle cells (BSMCs) of chronic asthmatic rats. To make chronic asthma model, Wistar rats underwent ovalbumin (OVA) injection and eight-week inhalation. BSMCs were cultured *in vitro*. The expression of ERK1/2 in BSMCs was analyzed by immunocytochemistry, Western blot and RT-PCR. Migration of BSMCs was detected by both plate test and Boyden cell test. Results showed: (1) With Western blot technique, the ratio of p-ERK1/2 to total ERK1/2 in chronic asthmatic group was obviously higher than that in the control group (0.55 ± 0.05 vs 0.48 ± 0.04 , $n=10, P<0.01$). (2) With RT-PCR, the relative A values of ERK1 and ERK2 mRNA in airways of chronic asthmatic rats were 1.83 ± 0.24 and 1.07 ± 0.11 , respectively, which were significantly increased compared with that in the control group (0.58 ± 0.14 and 0.51 ± 0.12 , $n=10, P<0.01$). (3) In plate test, the migration of BSMCs of chronic asthmatic rats was 2.9 times of that in the control group and reached 5.0 times by epidermal growth factor (EGF) stimulation, but decreased to 1.7 times

Received 2006-10-24 Accepted 2006-11-20

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30400195) and the Dawn Program for Youth Pioneering in Technology of Wuhan Municipality (No. 20045006071-8).

*Corresponding author. Tel: +86+27-83663617; E-mail: Liuxiansheng@tjh.tjmu.edu.cn

by 30 $\mu\text{mol/L}$ PD98059. (4) In Boyden cell test, the migration of BSMCs of chronic asthmatic rats was 1.9 times of that in the control group, and reached 3.1 times by EGF stimulation, but decreased to 1.45 times by 30 $\mu\text{mol/L}$ PD98059. Our results indicate that the migration ability of BSMCs of chronic asthmatic rats increases, and ERK1/2 signaling pathway may play an important role in this process.

Key words: extracellular signal-regulated kinase; asthma; bronchial smooth muscle cell; migration

支气管平滑肌细胞(bronchial smooth muscle cells, BSMCs)是支气管哮喘疾病发生和发展进程中的重要功能细胞,它不仅具备收缩功能而参与气道收缩和高反应性,而且还可能发生增生和肥大以及分泌多种活性成分和细胞外基质而促进慢性哮喘气道重塑的发展^[1]。近年来,BSMCs的迁移功能逐渐得到国内外学者的广泛关注,它在气道重建的发生及发展中可能具有重要作用。多项研究表明,在气道重建中扮演重要角色的肌纤维母细胞很可能是由BSMCs迁移转化而来^[2],然而,介导慢性哮喘 BSMCs 迁移能力改变的细胞内信号转导通路至今尚不十分明了。细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2)信号通路是细胞内重要的信号转导通路,参与了哮喘气道慢性炎症、气道高反应性和气道平滑肌的增殖等多种病理生理过程^[3,4],但是有关ERK信号通路在慢性哮喘模型BSMCs迁移能力改变中作用的研究国内外尚少见报道。本研究旨在通过大鼠慢性哮喘模型探讨哮喘状态下BSMCs迁移能力的改变以及ERK1/2信号通路在其中发挥的作用,为进一步阐明慢性哮喘气道重塑的病理发生和发展机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 卵清蛋白(ovabumin, OVA)为美国 Sigma 公司产品,灭活百日咳菌苗为北京生物制品研究所产品。PD98059 购自美国 Biosource 公司,鼠源表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)购自美国 Accurate Chemical 公司。DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司。鼠抗总 ERK1/2 单克隆抗体和兔抗磷酸化 ERK1/2 (phosphorylated-ERK1/2, p-ERK1/2)多克隆抗体购自美国 R&D 公司,小鼠抗大鼠 α -actin 抗体和 β -actin 内参照抗体购自美国 Santa Cruz 公司,BCA 蛋白测定试剂盒购自 Pierce 公司。逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自美国 Promega 公司,PCR 引物和核酸分子质量标准购自大连 TaKaRa 生物有限公司,TRIzol 试剂盒购自 Gibco 公司。Transwell 培养板购自美国 Corning 公司。

1.2 慢性哮喘动物模型的制备 6 周龄的健康雄性 Wistar 大鼠 20 只,体重 180~200 g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,动物随机分为两组:正常对照组(10 只)和慢性哮喘组(10 只)。致敏参照文献方法^[4]进行:慢性哮喘组第 1 天每只大鼠后腿内侧皮下注射含 10 mg OVA 和 200 mg 氢氧化铝的生理盐水 1 mL,同时腹腔注射百日咳杆菌疫苗 1 mL (约 6×10^9 个菌株),第 8 天重复致敏 1 次,第 15 天开始激发,将大鼠置于特制玻璃容器内,用超声雾化器喷入含 2% OVA 的生理盐水 50 mL,激发 30 min,每周 3 次,持续八周。激发后大鼠出现烦躁、呛咳、呼吸加快及轻度紫绀等哮喘发作症状。正常对照组以生理盐水代替抗原进行。

1.3 支气管肺泡灌洗和肺组织形态学测量 末次激发 12 h 后,参照文献方法^[5],20% 乌拉坦 6 mL/kg 腹腔注射麻醉,扎闭右肺,3 mL 生理盐水进行支气管肺泡灌洗(3 次回吸),收回的灌洗液,800 r/min 离心 10 min 后,调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL,制成细胞涂片,4% 多聚甲醛固定,瑞氏染色后光学显微镜下观察 400 个细胞,进行细胞分类计数,得到嗜酸性粒细胞(eosinophil, Eos)的相对计数。取右肺中叶,4% 多聚甲醛固定,行石蜡切片,HE 染色。在显微镜下(放大 100~200 倍)找到完整肺内支气管横断面,参照文献^[6]关于气道各层的定义,采用千屏 2000 软件图像分析软件,测定支气管基底膜周径(Pbm)、总管壁面积(WAt)、平滑肌面积(WAm)和平滑肌细胞核数目,并用 Pbm 将测量值标准化,分别以 WAt/Pbm, WAm/Pbm 和平滑肌细胞核数目 /Pbm 表示气道壁相对厚度、平滑肌相对厚度和平滑肌细胞核相对数目。图像测量在两个观察者之间独立进行,每张切片测量 3 个支气管,以两位测量者的平均值作为测量值。

1.4 大鼠 BSMCs 的培养和鉴定 参考文献方法^[7]进行 BSMCs 的培养。严格无菌条件,在解剖显微镜下,分离出支气管平滑肌层,剪成 1 mm³ 大小,置于消化液(NaCl 135 mmol/L, KCl 15 mmol/L, MgCl₂ 22 mmol/L, 葡萄糖 10 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, 胶原酶 2 g/L, 木瓜蛋白酶 5 g/L, BSA

2 g/L)中, 37°C、20~30 min 后终止消化, 用含有 20% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 DMEM 培养基悬浮细胞, 按 1×10^7 个细胞/L 接种, 置于培养箱(37°C, 5% CO₂)培养。5~7 d 后细胞融合成峰-谷样生长, 经 α -actin 免疫荧光细胞化学染色鉴定为平滑肌细胞。0.25% 胰蛋白酶消化, 1:2 分装传代, 实验用第三代细胞, 实验前细胞均用无血清培养基同步 24 h。

1.5 ERK1/2 反义寡核苷酸转染 针对大鼠 ERK1/2 翻译起始部位设计 ERK1/2 的反义寡核苷酸(oligo-deoxynucleotide, ODN)序列: 5'-GCCGCCGCCGCGCCAT-3', 作为对照的正义寡核苷酸序列: 5'-ATGGCGGCGGGCGGCGGC-3', 两端硫代修饰的 ODN 由 TaKaRa 公司合成。将脂质体稀释成 2 μ g/mL, 静置 5 min 后与 1 mol/L ODN 混合, 室温下孵育 20 min, 加入细胞培养液, 6 h 后, 弃上清, 加入 0.5 mol/L ODN 培养 18 h 或 42 h。

1.6 ERK1/2 在慢性哮喘模型大鼠 BSMCs 中的表达测定

1.6.1 免疫荧光细胞化学染色 第三代细胞制成细胞爬片, 冷丙酮固定, -80°C 冻存待用。行免疫荧光细胞染色时, 取冰冻细胞片置于室温下 30 min, PBS 洗 5 min, 两次, 一抗(p-ERK 1:100 或 α -actin 1:100) 4°C 过夜, 二抗 1:100 室温 2 h, 甘油 PBS 封片。PBS 代替一抗为阴性对照。Nikon TE-2000 荧光显微镜观察并拍照。图像定量分析每张切片随机测量 5 个视野, 用千屏 HMIAS-2000 软件图像分析系统, 分别测阳性反应平均灰度, 以 5 个视野的平均值作为该切片的测量值。

1.6.2 Western blot 分析 收集细胞, 用细胞裂解液提取细胞总蛋白, BCA 试剂盒测定蛋白量后, 取 50 mg 样品加入 8% SDS 聚丙烯酰胺凝胶中电泳后, 转移至硝酸纤维素滤膜上, 在脱脂奶粉磷酸缓冲液中封闭过夜, 然后分别加入下列第一抗体: 兔抗 p-ERK1/2 多克隆抗体(1:1 000)、鼠抗总 ERK1/2 单克隆抗体(1:1 000)、 β -actin (1:400), 4°C 过夜, 二抗(1:1 000)温育 1 h, DAB 显色, 用千屏 HMIAS-2000 软件图像分析系统对图像进行测定。

1.6.3 RT-PCR 分析 采用 TRIzol 一步法提取细胞总 RNA, 取总 RNA 2 μ g, 按逆转录试剂盒使用说明操作, 逆转录成 cDNA。ERK1 引物序列为上游: 5'-GCTGAATCACATCCTGGGTAT-3'; 下游: 5'-AGATCTGTATCCTGGCTGGAA-3', 扩增片段

373 bp。ERK2 引物序列为上游: 5'-GCAGGTGTTC-GACGTGGGAAT-3'; 下游: 5'-GTGCAGAACATTAG-GTGAATA-3'; 扩增片段 394 bp。内部参照 β -actin 引物序列为: 上游: 5'-GTCACCAACTGGGACGATA-3'; 下游: 5'-AGGTCTTTACGGATGTCAACG-3'; 扩增片段 654 bp。ERK1、ERK2 PCR 反应条件为 94°C 3 min, 94°C 30 s, 58°C 1 min, 72°C 1 min, 35 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min。用琼脂糖电泳检测表达结果, 经 MUVB-20 凝胶成像分析系统(美国 UltraLum 公司)进行扫描分析, 对各组 ERK1、ERK2 的相对含量进行统计学分析。

1.7 BSMCs 迁移能力评价 实验分为 4 组, A 组为正常对照大鼠 BSMCs; B 组为慢性哮喘模型大鼠 BSMCs; C 组为慢性哮喘大鼠 BSMCs 加入终浓度 10 ng/mL EGF; D 组为慢性哮喘大鼠 BSMCs 加入 ERK1/2 反义或正义 ODN 转染处理。A、B、C 组又分为 5 个小组, 依次加入终浓度为 0、10、30、50 和 100 μ mol/L 的 PD98059, 处理方法为加入 EGF 前用不同浓度的 PD98059 孵育 30 min。

1.7.1 平面迁移实验 平面迁移实验参照 Sarkar 等^[8]的方法, 将盖玻片置于 24 孔培养板中, 接种 BSMCs。细胞近融合后以无 FBS 的 DMEM 培养 24 h, 取盖玻片在显微镜下用无菌刮刀沿直线刮除玻片另一侧 BSMCs, 洗涤后放回新培养板中。然后在不同处理方式下培养 48 h, 在倒置显微镜下用测微尺测量移行最远的 BSMC 细胞核至刮线边缘的距离, 随机测量各组 3 个盖玻片 12 个高倍视野, 取平均值。结果以各组爬行距离与正常对照未加 EGF 组爬行距离的相对倍数来表示。

1.7.2 跨膜迁移实验 跨膜迁移实验采用改良的 Boyden 小室法(Transwell, 8 μ m 膜孔径)测量细胞穿膜移行能力, 实验分组同平面迁移实验。将 5×10^4 个细胞置于内室, 培养基不含 FBS, 外室加入含不同浓度药物的 10% FBS-DMEM 培养基。于 37°C 5% CO₂ 培育 24 h, 除去滤膜, Hanks 冲洗两次, 刮去内室面细胞, 外室面瑞氏染色, 计数 3 个 200 倍高倍视野下细胞数目, 取平均值。结果以各组迁移细胞与正常对照未加 EGF 组迁移细胞的相对倍数来表示。

1.8 统计学处理 结果用 SPSS11.5 统计软件处理, 数值用 mean $\pm$ SD 表示, 两组间的比较分析用 *t* 检验, 多组间比较分析用方差分析, 多组间两两比较用 *q* 检验, *P* < 0.05 为差异有显著性, 相关分析

用 Pearson 直线相关分析。

2 结果

2.1 慢性哮喘模型气道病理改变

OVA 雾化致慢性哮喘模型的大鼠气道出现明显的病理变化, 肺实质炎性细胞浸润, 支气管内壁黏膜皱襞增多、断裂, 管腔内可见黏液栓, 黏膜下及管壁可见大量的 Eos 浸润(图 1)。慢性哮喘模型大鼠气道壁相对厚度 $[(71.42 \pm 6.77) \mu\text{m}^2/\mu\text{m}]$ 、平滑肌相

对厚度 $[(19.01 \pm 0.41) \mu\text{m}^2/\mu\text{m}]$ 、平滑肌细胞核相对数 $[(0.16 \pm 0.02) \text{个}/\mu\text{m}]$ 和肺泡灌洗液 Eos 相对计数 $[(3.82 \pm 0.29)\%]$ 均较正常对照大鼠[分别为 $(30.23 \pm 4.11) \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ 、 $(8.97 \pm 0.31) \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ 、 $(0.09 \pm 0.01) \text{个}/\mu\text{m}$ 和 $(1.11 \pm 0.17)\%$]明显增高($n=10$, t 值分别为 13.01、19.88、6.44 和 15.80, P 均 <0.01)。

2.2 培养的大鼠 BSMCs 鉴定

取第三代培养细胞制成细胞贴片, 用平滑肌 α -actin 作鉴定指标, 在荧光显微镜下, 可见细胞肌丝

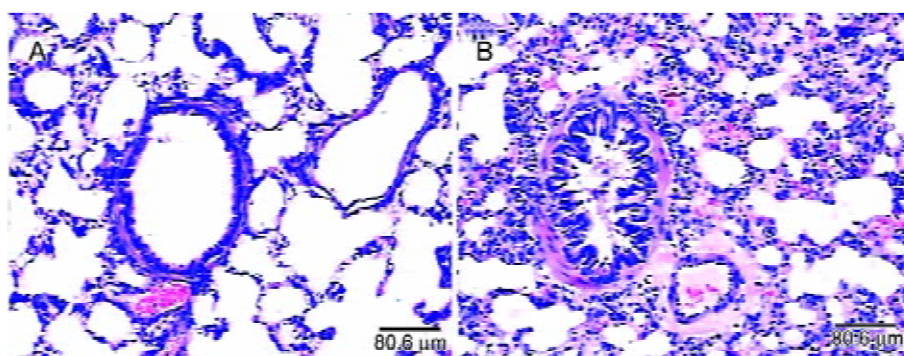


图 1. 慢性哮喘模型大鼠气道病理改变(HE 染色)

Fig. 1. Pathological change of bronchioles in lung of chronic asthmatic rats (HE staining). Compared with normal control (A), the thickness of both airway wall and smooth muscle layer increased markedly in chronic asthmatic rats (B), accompanied by infiltration of inflammation cells into airway wall and lung parenchyma. Scale bar, 80.6 μm .

清晰, 排列有序, 证实培养的细胞为 BSMCs (图 2)。

2.3 ERK1/2 在慢性哮喘模型大鼠 BSMCs 中的表达

2.3.1 免疫荧光细胞化学染色

免疫荧光细胞化学染色显示 p-ERK1/2 在正常大鼠 BSMCs 中为极弱的绿色荧光, 而在慢性哮喘模型大鼠 BSMCs 中荧光强度明显增强, 平均灰度 (80.5 ± 3.6) 较正常对照组 (30.1 ± 2.4) 明显增高($n=10$, $P<0.01$)。

直线相关分析发现慢性哮喘模型大鼠 BSMCs 中 p-ERK1/2 荧光强度灰度值与气道平滑肌的厚度成正相关($r=0.721$, $P<0.01$)。另外 p-ERK1/2 在慢性哮喘模型大鼠 BSMCs 的蛋白表达还与大鼠肺泡灌洗液 Eos 计数成正相关($r=0.652$, $P<0.01$)。

2.3.2 Western blot 分析

蛋白印迹分析的结果以内参 β -actin 校正后的 A 值比表示, 结果表明总 ERK1/2 和 p-ERK1/2 在慢性哮喘模型大鼠 BSMCs 中的蛋白表达均较正常对照组明显增强(图 3), 同时 p-ERK1/2 与总 ERK1/2 的比值 (ERK 的磷酸化活性) 在两组之间也有明显差异, 慢性哮喘组显著高于正常对照组 $(0.55 \pm 0.05 \text{ vs } 0.48 \pm$

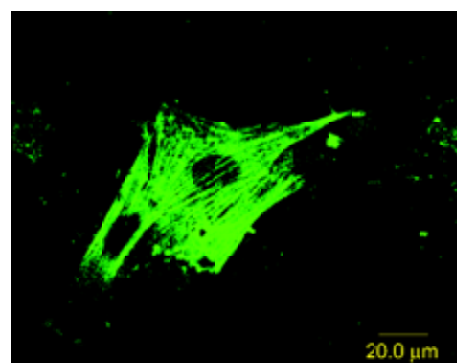


图 2. 培养的大鼠支气管平滑肌细胞 α -actin 鉴定(免疫荧光细胞化学染色)

Fig. 2. Identification of cultured bronchial smooth muscle cells by immunofluorescence cytochemical staining of anti-smooth muscle α -actin antibody. Scale bar, 20 μm .

0.04, $n=10$, $P<0.01$)。

2.3.3 RT-PCR 分析

逆转录 PCR 的结果以内参 β -actin 作基准, 校正后的 A 值比显示 ERK1 和 ERK2 的 mRNA 水平在慢性

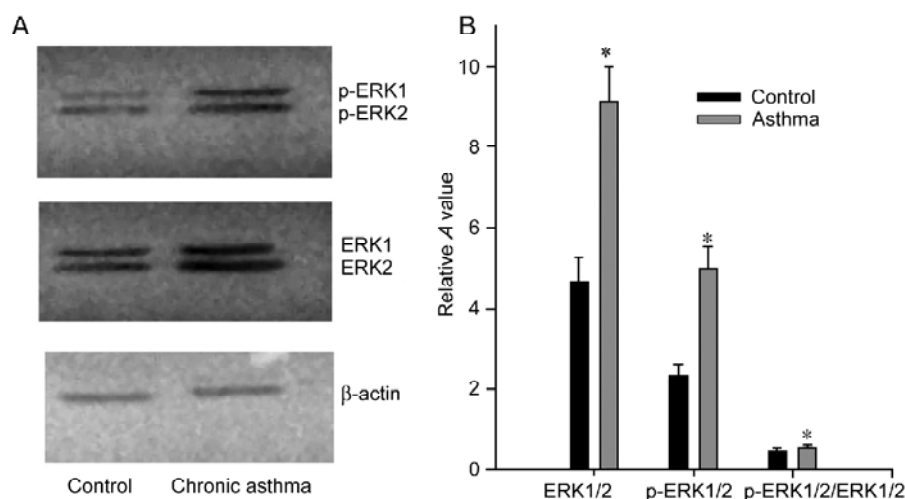


图 3. Western blot 分析 ERK1/2 在慢性哮喘大鼠支气管平滑肌细胞中的表达

Fig. 3. Western blot analysis of ERK1/2 in bronchial smooth muscle cells of chronic asthmatic rats. The blotting straps (A) and histogram of relative A value (B) show that both total ERK1/2 and p-ERK1/2 were highly expressed in BSMCs of chronic asthmatic rats after normalized by β -actin. * $P < 0.05$ compared with control.

哮喘模型组明显增高(图 4), 分别为 1.83 ± 0.24 和 1.07 ± 0.11 , 而在正常对照组, ERK1 和 ERK2 的 A 值比分别为 0.58 ± 0.14 和 0.51 ± 0.12 , 差异均有显著性(P 均 < 0.01)。

2.4 慢性哮喘模型大鼠 BSMCs 迁移功能的变化以及 ERK1/2 信号通路对其的调节

2.4.1 平面迁移实验

在第三代 BSMCs 的平面迁移实验中, 慢性哮喘模型大鼠 BSMCs 表现出活跃的迁移能力, 与正常对照组相比, 最远迁移距离明显增加, 迁移细胞数目显著增多, 两组之间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。ERK1/2 信号通路激动剂 EGF 刺激后, 慢性哮喘模型大鼠 BSMCs 的迁移能力进一步增强, 迁移距离和迁移细胞数目较未用 EGF 组有显著性差异。

ERK1/2 信号通路抑制剂 PD98059 对正常对照大鼠 BSMCs、慢性哮喘模型大鼠 BSMCs 和 EGF 刺激后的慢性哮喘模型大鼠 BSMCs 的平面迁移能力都有抑制作用, 但是最大作用浓度和作用效果表现不一(图 5)。PD98059 对正常对照大鼠 BSMCs 的起效浓度是 $50 \mu\text{mol/L}$, 在 $100 \mu\text{mol/L}$ 时抑制迁移距离约 20%。而对于慢性哮喘模型大鼠 BSMCs, $10 \mu\text{mol/L}$ 的 PD98059 即表现明显的抑制效应, 在 $30 \mu\text{mol/L}$ 时达到约 60% 抑制效果, 与正常对照组 BSMCs 有差异。在 EGF 刺激后的慢性哮喘模型 BSMCs 中, 也是 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 PD98059 即出现明显的抑制效应, 但

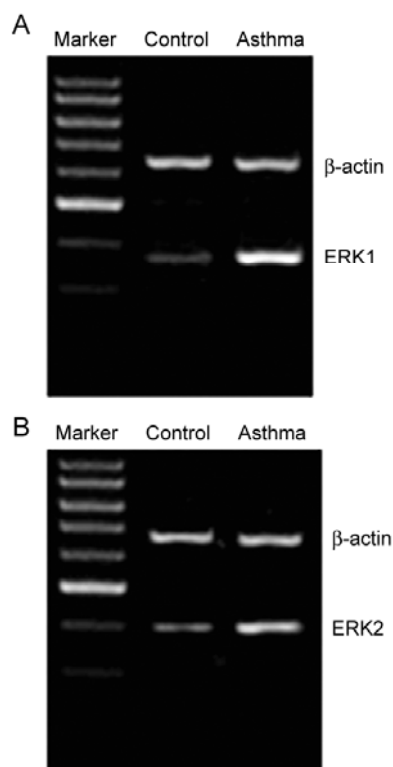


图 4. RT-PCR 分析 ERK1 和 ERK2 mRNA 在慢性哮喘大鼠支气管平滑肌细胞的表达

Fig.4. RT-PCR analysis of ERK1/2 in bronchial smooth muscle cells of chronic asthmatic rats. The photos show the mRNA expressions of ERK1 (A) and ERK2 (B) in BSMCs of chronic asthmatic rats were higher than that in the control group.

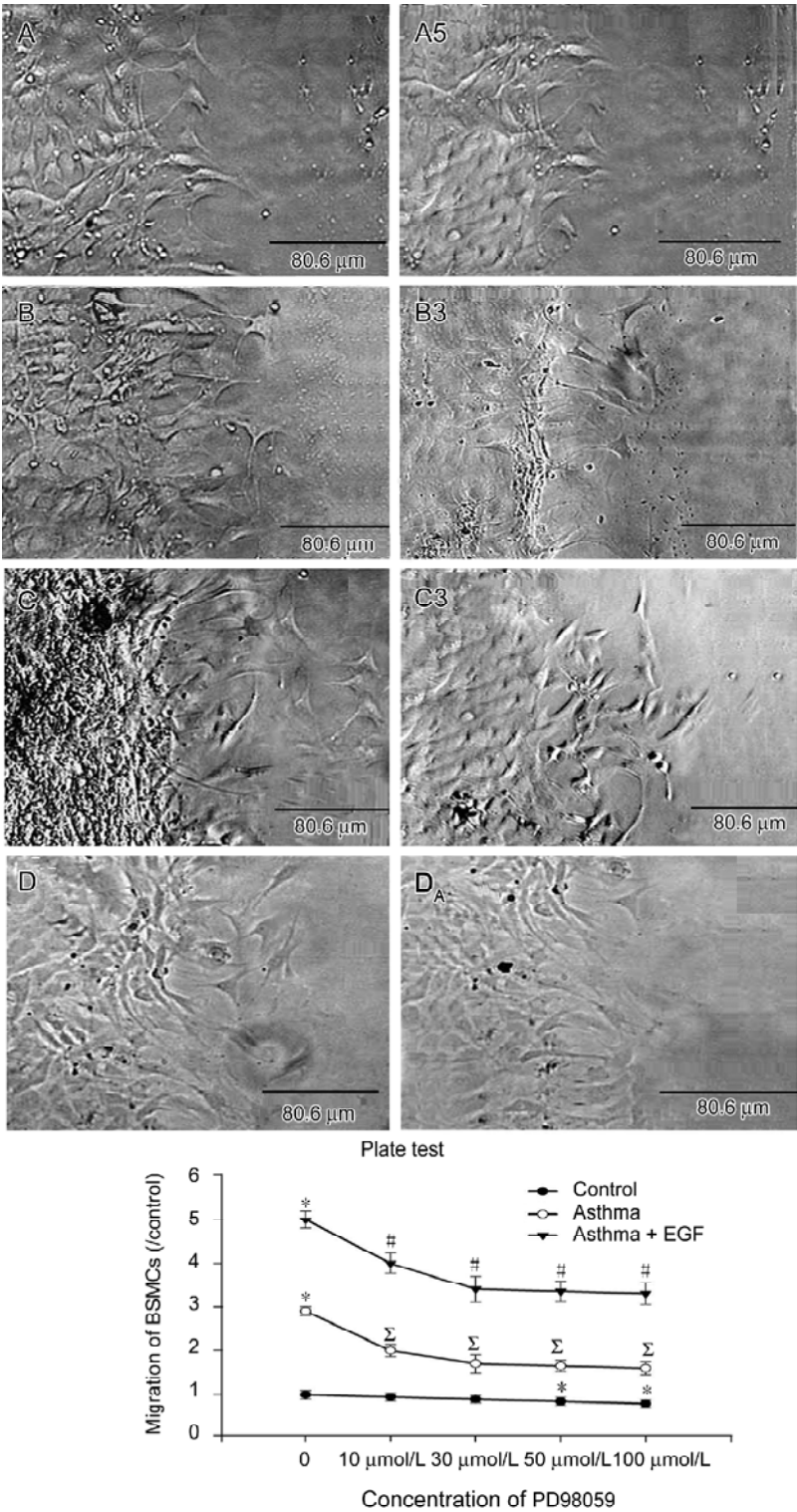


图 5. 大鼠支气管平滑肌细胞平面迁移实验

Fig.5. Plate migration test for bronchial smooth muscle cells (BSMCs) of chronic asthmatic rats. The photos show the migration of BSMCs 24 h after scratch. A: Control. A5 was treated with 100 μmol/L PD98059. B: Chronic asthma group. B3 was treated with 30 μmol/L PD98059. C: BSMCs of chronic asthmatic rats irritated by 10 ng/mL EGF. C3 was pretreated with 30 μmol/L PD98059 before EGF stimulation. D: BSMCs of chronic asthmatic rats treated with sense ODN. D_A was transfected with antisense ODN. Scale bar, 80.6 μm. E: The dot-line graph shows the concentration-dependent effect of PD98059 on BSMCs in the control, chronic asthmatic rats and EGF-irritated BSMCs of chronic asthmatic rats. **P*<0.05 compared with the control group without PD98059, Σ*P*<0.05 compared with asthma group without PD98059, #*P*<0.05 compared with asthma + EGF group without PD98059.

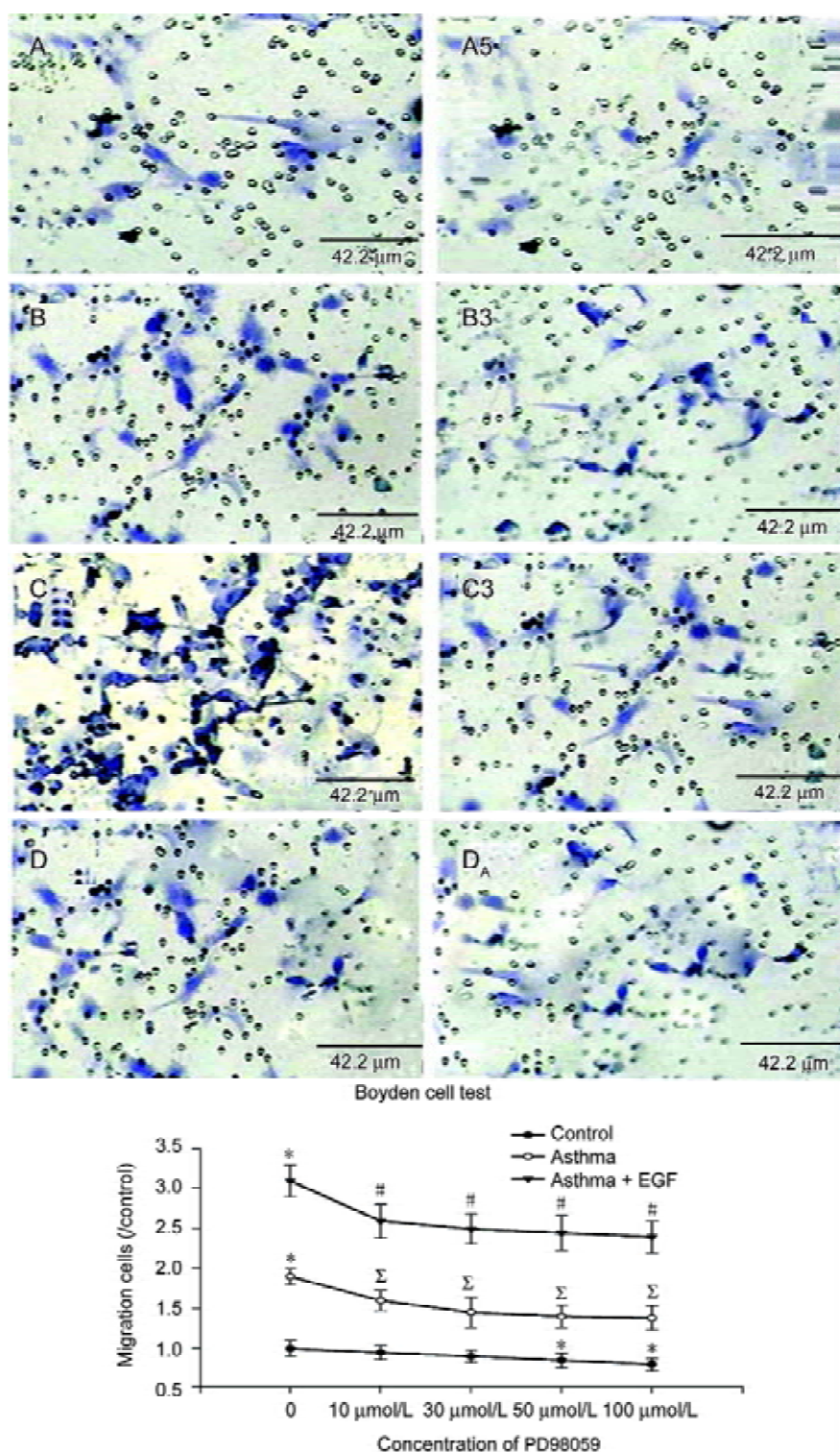


图 6. 大鼠支气管平滑肌细胞跨膜迁移实验

Fig. 6. Transmembrane migration test for bronchial smooth muscle cells (BSMCs) of chronic asthmatic rats. The photos show the migration of BSMCs 24 h after scratch. A: Control group without any medication. A5 was treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ PD98059. B: Chronic asthma group B3 was treated with 30 $\mu\text{mol/L}$ PD98059. C: BSMCs of chronic asthmatic rats irritated by 10 ng/mL EGF. C3 was pretreated with 30 $\mu\text{mol/L}$ PD98059 before EGF stimulation. D: BSMCs of chronic asthmatic rats treated with sense ODN. D_A was transfected with antisense ODN. Scale bar, 42.2 μm . E: The dot-line graph shows the concentration-dependent effect of PD98059 on BSMCs in the control, chronic asthmatic rats and EGF-irritated BSMCs of chronic asthmatic rats. * $P < 0.05$ compared with the control groups without PD98059, $\Sigma P < 0.05$ compared with asthma group without PD98059, # $P < 0.05$ compared with asthma + EGF group without PD98059.

在 30 $\mu\text{mol/L}$ 则达到约 80% 抑制效果。反义 ODN 处理后, 慢性哮喘大鼠 BSMCs 的迁移距离明显降低, 与未处理前有明显差异($P < 0.01$), 而正义 ODN 处理组则与未处理组没有明显差异。

2.4.2 跨膜迁移实验

跨膜迁移实验得到的结果与平面迁移实验类似, 慢性哮喘模型大鼠 BSMCs 比正常对照大鼠 BSMCs 的跨膜迁移能力明显增强, 跨膜细胞数量有显著性差异。EGF 刺激后, 慢性哮喘模型大鼠 BSMCs 的跨膜迁移细胞数目进一步增多, 较未用 EGF 组有显著性差异。

ERK1/2 信号通路抑制剂 PD98059 对正常对照大鼠 BSMCs、慢性哮喘模型大鼠 BSMCs 和 EGF 刺激后的慢性哮喘模型大鼠 BSMCs 的跨膜迁移能力都有抑制作用, 但是最大作用浓度和作用效果也表现不一(图 6)。PD98059 对正常对照大鼠 BSMCs 的起效浓度是 50 $\mu\text{mol/L}$, 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 时抑制迁移细胞数目约 20%。而对于慢性哮喘模型大鼠 BSMCs, 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 PD98059 即表现明显的抑制效应, 在 30 $\mu\text{mol/L}$ 时达到约 50% 抑制效果, 与正常对照组 BSMCs 有差异。在 EGF 刺激后的慢性哮喘模型 BSMCs 中, 也是 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 PD98059 即表现明显的抑制效应, 在 30 $\mu\text{mol/L}$ 时也达到约 50% 抑制效果。反义 ODN 处理后, 慢性哮喘大鼠 BSMCs 的迁移细胞数目明显降低, 与未处理前有明显差异($P < 0.01$), 而正义 ODN 处理组则与未处理组没有明显差异。

3 讨论

气道重塑是慢性哮喘重要病理特征, 也是部分哮喘患者难以获得治疗效果的重要原因之一, 其机制至今未能完全阐明。作为气道重塑的重要组成部分之一, BSMCs 的迁移能力是近年来新的研究热点之一。最初的想法是来源于在动脉粥样硬化等疾病所致的血管重建中发挥重要作用的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMCs), 在高血压、高血脂等引起血管硬化的早期即表现出增强的迁移活性, 从中膜定向迁移至内皮下并在内膜下增生, 从而参与血管重建病理机制的形成。由此推测, 慢性哮喘气道重塑中 BSMCs 是否也有类似的作用。随后的研究表明, 在哮喘患者气道固有层发现的肌纤维母细胞在显微结构、形态学和位置都与 BSMCs 极其相近, 这给早先的推论提供了有利的证据, 进一步的研究提示肌纤维母细胞极有可能是由 BSMCs 迁

移转化而来^[2,9]。然而, 对于气道平滑肌这种迁移功能改变的病理生理机制和细胞内信号转导通路一直未能得到全面阐述。

平面迁移实验和跨膜迁移实验都是检测细胞迁移能力的方法, 但是前者评价的是细胞在平面上自由活动的的能力, 而后者则可以评判细胞在物质浓度差的状态下趋向运动的能力。无论是平面迁移实验还是跨膜迁移实验, 本实验结果均表明, 哮喘状态下 BSMCs 的迁移功能显著增强, 提示 BSMCs 迁移功能的变化可能在哮喘的发病机制中发挥了作用。

ERK 是一条重要的细胞内信号转导通路, 以往研究表明它在包括 VSMCs 在内的多种细胞功能调控中有重要作用^[2,9-11]。本实验的结果显示, 在慢性哮喘模型大鼠 BSMCs 中, ERK1/2 的表达水平发生显著变化, 在蛋白质水平, 总 ERK1/2 和 p-ERK1/2 的表达量均较正常对照组明显增高, 同时 p-ERK1/2 占总 ERK1/2 的比例也显著上升, 说明 ERK1/2 的活化水平在慢性哮喘模型大鼠 BSMCs 中也明显升高; 在 mRNA 水平, ERK1 和 ERK2 的表达均比正常对照组显著增强, 提示 ERK1/2 信号通路在哮喘状态下功能显著上调。我们的结果同时也证明, 慢性哮喘大鼠 BSMCs 中 p-ERK1/2 的表达水平还与气道平滑肌的厚度和气道肺泡灌洗液 Eos 的计数成正相关, 这种密切的关系显示出 ERK1/2 信号通路在 BSMCs 参与哮喘气道重建的过程中可能发挥了重要的调控作用。

为进一步探讨 BSMCs 迁移功能的变化是否与 ERK 信号通路有关, 本实验应用 ERK1/2 通路研究的工具药 EGF 和 PD98059 以及 ERK1/2 反义 ODN 观察 ERK 对 BSMCs 迁移的影响。结果表明, ERK1/2 信号通路的激动剂 EGF 可以显著提高慢性哮喘大鼠 BSMCs 的迁移能力, 而 ERK1/2 通路的抑制剂 PD98059 能够有效抑制慢性哮喘大鼠 BSMCs 平面和跨膜迁移能力。用 ERK1/2 反义 ODN 转染细胞后, 慢性哮喘大鼠 BSMCs 的迁移能力更是显著降低, 这说明 ERK1/2 信号通路在慢性哮喘大鼠 BSMCs 的活动性和趋向性的功能调控中均发挥了重要作用。

实验中还发现, 正常对照大鼠 BSMCs、慢性哮喘大鼠 BSMCs 和 EGF 刺激后的慢性哮喘大鼠 BSMCs 对不同浓度 PD98059 的效应曲线有所不同。正常对照大鼠 BSMCs 在高浓度的 PD98059 时才出现反应, 而且最大效应仅为 20%, 远远小于慢性哮喘大鼠 BSMCs 对 PD98059 的反应。因此, ERK1/2 信

号通路可能更多地在慢性哮喘大鼠BSMCs中调控细胞的迁移能力,而在正常大鼠BSMCs中发挥的调控作用较为有限。本实验中最大浓度的PD98059未能完全抑制慢性哮喘大鼠BSMCs增强的迁移能力,表明还有其他信号通路参与调控慢性哮喘大鼠BSMCs的迁移能力,有待进一步的研究。

哮喘是一种气道的慢性炎症性疾病。在慢性哮喘状态下,很多生长因子、炎症因子和神经递质如IL-13、TNF和VEGF等均可通过相应的受体途径激活胞浆内的ERK1/2信号转导通路,ERK1/2被激活后除了保留在胞浆内激活细胞骨架成分和其它蛋白激酶,更重要的下游途径是进入细胞核内,激活转录因子,调控多种基因的表达。本项研究证实了慢性哮喘模型大鼠BSMCs中ERK1/2的激活和其对细胞迁移功能的调控,但它调控细胞迁移功能的途径是直接通过对胞浆内细胞骨架的调节还是间接通过核转位后相应基因的激活,还有待研究的进一步深入。同时,ERK1/2在慢性哮喘模型大鼠BSMCs中的激活是否也调控了其它的细胞功能,如细胞分泌和细胞收缩过程,也需要继续探讨。

总之,本实验结果显示慢性哮喘大鼠BSMCs的平面和跨膜迁移能力较正常对照大鼠明显增高,ERK1/2信号通路参与调控这个重要的病理生理过程,为进一步阐明气道重塑的病理机制和探索慢性哮喘新的治疗靶点提供重要依据。

参考文献

- 1 Johnson PR, Burgess JK. Airway smooth muscle and fibroblasts in the pathogenesis of asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2004; 4: 102-108.
- 2 Madison JM. Migration of airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29: 8-11.
- 3 Zhou L, Hershenson MB. Mitogenic signaling pathway in airway smooth muscle. *Respir Physiol Neurobiol* 2003; 137: 295-308.
- 4 Jiang Y (姜勇), Gong XW. Regulation of inflammatory responses by MAPK signal transduction pathways. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2000; 52: 267-271 (Chinese, English abstract).
- 5 Li CQ (李超乾), Xu YJ, Yang DL, Shi HZ, Liu XS, Xiong WN, Chen SX, Ni W, Zhang ZX. A study of helper T cell (Th)1/Th2 immune response pattern of gammadeltaT cells in asthma. *Chin J Intern Med (中华内科杂志)* 2004; 43(5): 342-344(Chinese, English abstract).
- 6 Bai A, Eidelman DH, Hogg JC, James AL, Lambert RK, Ludwig MS, Martin J, McDonald DM, Mitzner WA, Okazawa M. Proposed nomenclature for quantifying subdivisions of the bronchial wall. *J Appl Physiol* 1994; 77: 1011-1014.
- 7 Liu XS (刘先胜), XU YJ, Zhang ZX, Ni W, Chen SX. Effect of protein kinase C on K_v channel in rat bronchial smooth muscle. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2003; 55: 135-141 (Chinese, English abstract).
- 8 Sarkar R, Meinberg EG, Stanley JC, Gondon D, Webb RC. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1996; 78: 225-230.
- 9 Gizycki, MJ, Adelroth E, Rogers AV, O'Byrne PM, Jeffery PK. Myofibroblast involvement in the allergen-induced late response in mild atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16: 664-673.
- 10 Wang TH (王庭槐), Tan Z, Fu XD, Yang D, Hu FX, Li YY. Effect of ERK on 17 β -estradiol-induced inhibition of VSMC proliferation in rats after vascular injury. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2003; 55(4): 411-416 (Chinese, English abstract).
- 11 Zhu JH (朱建华), Liu Z, Huang ZY, Li S. Effects of angiotensin II on extracellular signal-regulated protein kinases signaling pathway in cultured vascular smooth muscle cells from Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2005; 57(5): 587-592 (Chinese, English abstract).