

研究论文

线粒体 ATP 敏感钾通道调控哮喘大鼠气道平滑肌细胞增殖

赵建平*, 高敏, 叶永军, 胡伟华, 周志刚, 胡红玲

华中科技大学同济医学院附属同济医院呼吸疾病研究所, 武汉 430030

摘要: 本文旨在探讨线粒体 ATP 敏感钾(mitochondrial ATP-sensitive K^+ , MitoK_{ATP})通道对哮喘大鼠气道平滑肌细胞(airway smooth muscle cells, ASMCs)增殖的影响及其调控机制。36 只 Sprague-Dawley (SD)大鼠随机分为哮喘组($n=18$) 和正常组($n=18$), 哮喘组大鼠采用卵清蛋白(ovalbumin, OVA)致敏及激发的方法制备哮喘模型, 正常组大鼠吸入等量生理盐水。取各组大鼠肺组织, 分离出 ASMCs 进行培养, 将样本分 6 组分别进行干预: (1)正常组; (2)正常 + MitoK_{ATP} 通道开放剂 diazoxide 组(diazoxide 组); (3)正常 + MitoK_{ATP} 通道阻断剂 5-HD 组(5-HD 组); (4)哮喘(asthma)组; (5) asthma + diazoxide 组; (6) asthma + 5-HD 组。利用罗丹明(Rhodamine123, R-123)荧光染色、激光共聚焦显微镜成像检测线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$), DCFH-DA 荧光染色法检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量, RT-PCR 检测核因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB) mRNA 的表达, 流式细胞仪检测细胞凋亡和 MTT 法检测细胞增殖情况。结果显示: (1) Diazoxide 组与正常组相比, R-123 荧光强度增强, $\Delta\Psi_m$ 去极化, ROS 及 NF- κB 的表达增高, 细胞增殖增多、凋亡减少($P<0.05$); 而 5-HD 组与正常组相比, 上述指标均无显著差异; (2) 与正常组相比, Asthma 组 R-123 荧光强度增强, $\Delta\Psi_m$ 去极化, ROS 及 NF- κB 的表达增高, 细胞增殖增多、凋亡减少($P<0.05$); Asthma + diazoxide 组与 Asthma 组相比, R-123 荧光强度和 $\Delta\Psi_m$ 去极化增强, ROS 及 NF- κB 表达增高, 细胞增殖增多、凋亡减少($P<0.05$); Asthma + 5-HD 组与 Asthma 组相比, R-123 荧光强度和 $\Delta\Psi_m$ 去极化减弱, ROS 及 NF- κB 表达降低, 细胞增殖减少、凋亡增多($P<0.05$); (3)各组大鼠 ASMCs 的 R-123 荧光强度, NF- κB mRNA 表达量与 ROS 含量均呈正相关; MTT 的吸光度值与 NF- κB mRNA 表达量呈正相关, 凋亡细胞百分比与 NF- κB mRNA 表达量呈负相关。以上结果提示, 哮喘可引起大鼠 ASMCs 的 MitoK_{ATP} 通道开放及 $\Delta\Psi_m$ 去极化, $\Delta\Psi_m$ 去极化促进 ROS 的表达, ROS 可能作为信号分子刺激 NF- κB 表达增加, 进而促进 ASMCs 增殖, 参与气道重构。

关键词: 哮喘; 线粒体膜电位; 线粒体 ATP 敏感钾通道; 活性氧; 核因子 κB ; 平滑肌

中图分类号: R332; R562.2*5

Regulation of rat airway smooth muscle cell proliferation by mitochondrial ATP-sensitive K^+ channel in asthmatic rats

ZHAO Jian-Ping*, GAO Min, YE Yong-Jun, HU Wei-Hua, ZHOU Zhi-Gang, HU Hong-Ling

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

Abstract: The objective of this paper was to investigate the effect and mechanism of mitochondrial ATP-sensitive K^+ (MitoK_{ATP}) channel on the proliferation of airway smooth muscle cells (ASMCs) in asthmatic rats. Thirty-six Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned into 2 groups (18 in each): (1) Asthma group: the asthmatic rat model was established by ovalbumin (OVA) sensitization and excitation; (2) Normal group: rats were subjected to inhalation of equal amount of normal saline. The rat ASMCs were isolated from fresh lung tissues and cultured respectively as follows: (1) Control group: normal ASMCs were cultured under normoxia for 24 h; (2) Diazoxide group: normal ASMCs were cultured under normoxia for 24 h with diazoxide (an opener of MitoK_{ATP} channel); (3) 5-HD group: normal ASMCs were cultured under normoxia for 24 h with 5-hydroxydecanoate (5-HD) (an antagonist of MitoK_{ATP} channel); (4) Asthma group: Asthmatic ASMCs were cultured under normoxia for 24 h; (5) Asthma + diazoxide group: Asthmatic ASMCs were cultured under normoxia with diazoxide for 24 h; (6) Asthma + 5-HD group: Asthmatic ASMCs were cultured under normoxia with 5-HD for 24 h. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was detected using Rhodamine 123 (R-123). The level of reactive oxygen

Received 2008-10-06 Accepted 2008-12-11

*Corresponding author. Tel: +86-27-83663617; Fax: +86-27-83662898; E-mail: zhaojp@tjh.tjmu.edu.cn

species (ROS) was detected by DCF fluorescence. The expression of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) mRNA was examined by RT-PCR. The proliferation and apoptosis of rat ASMCs were examined respectively by MTT colorimetric assay and cell cycle analysis. The results were as follows. (1) After exposure to diazoxide for 24 h, the R-123 fluorescence intensity, the ROS level, NF- κ B mRNA expression and the MTT absorbance value (A value) in normal ASMCs were significantly increased, and the apoptosis of rat ASMCs was significantly decreased compared to the control group ($P < 0.05$). However, there was no significant changes in those indices after the normal ASMCs had been exposed to 5-HD for 24 h. (2) In Asthma and Asthma + diazoxide groups, the R-123 fluorescence intensity, ROS level and the MTT A value were markedly increased, and the apoptosis was markedly decreased compared to control group ($P < 0.05$). These changes were more obvious in Asthma + diazoxide group than those in Asthma group ($P < 0.05$). 5-HD partly weakened the effect of asthma on the R-123 fluorescence intensity, ROS level and the MTT A value and the apoptosis of rat ASMCs ($P < 0.05$). R-123 fluorescence intensity and NF- κ B mRNA expression were positively correlated with ROS level. NF- κ B mRNA expression was positively correlated with the MTT A value and negatively correlated with the apoptosis of rat ASMCs. All the results suggest that the opening of MitoK_{ATP} channel followed by a depolarization of $\Delta\Psi$ m contributes to the increase in ROS level and NF- κ B mRNA expression in rat ASMCs and to the unbalance between cell proliferation and apoptosis of ASMCs induced by asthma. This might be a mechanism of the development of airway remodeling in asthma.

Key words: asthma; mitochondrial membrane potential; mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel; reactive oxygen species; nuclear factor- κ B; smooth muscle

慢性气道炎症、气道重构和气道高反应性是支气管哮喘的三大特征。气道平滑肌细胞(airway smooth muscle cells, ASMCs)过度增殖在哮喘的气道重构中起着重要作用,是不可逆性气流阻塞的重要病理基础^[1]。最近研究表明线粒体膜上ATP敏感钾(mitochondrial ATP-sensitive K⁺, MitoK_{ATP})通道开放可增加大鼠肺动脉平滑肌细胞的活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量,引起肺动脉平滑肌细胞的增殖增多和凋亡减少^[2]。哮喘时大鼠ASMCs上MitoK_{ATP}通道开放与否、ROS的表达情况、及其对ASMCs增殖的影响尚不清楚。

本研究以大鼠ASMCs作为研究对象,探讨哮喘大鼠ASMCs上MitoK_{ATP}通道对ROS表达及细胞增殖的影响,旨在探索支气管哮喘的发生机制,为探索新的防治方法提供实验基础。

1 材料与方 法

1.1 主要材料和仪器 二氮嗪(diazoxide)、5-羟癸酸(5-hydroxydecanoate, 5-HD)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、罗丹明123 (Rhodamine123, R-123)、二甲亚砜(DMSO)、碘化丙啶(PI)、2,7-二氢二氯荧光黄双乙酸钠(DCFH-DA)购于Sigma公司;高糖DMEM培养基、胎牛血清均购于Hyclone公司;小鼠抗肌动蛋白(α -actin)抗体购于博士德公司;SABC免疫组化试剂盒、Taq DNA聚合酶、dNTPs、逆转录酶(M-MLV)、随机引物(random primer)、琼脂糖均购于北京中杉金桥公司;PCR引物、内参照 β -

actin引物均由上海生工生物技术公司合成;其余试剂均为国产分析纯。激光共聚焦显微镜(Leica SP-1, USA)、酶联免疫检测仪、FACSsort型流式细胞仪(美国BD公司)、图像分析仪(HPIAS-1000型)、PCR仪(MJ Research Co.)、MUVB-20凝胶成像分析系统(Ultralum)、WD-9403C型紫外透射反射仪、DDY-D型电泳仪(北京六一仪器厂)由华中科技大学同济医学院提供。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组和哮喘模型 清洁级雄性Sprague-Dawley (SD)大鼠36只,体重200~250 g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,随机分为哮喘组和对照组,每组18只。哮喘组:按文献^[3]方法建立大鼠哮喘模型。第1天于大腿内侧皮下注射1%卵清蛋白(ovalbumin, OVA)抗原液1 mL(含OVA 10 mg和氢氧化铝200 mg)致敏,同时腹腔注射灭活百日咳杆菌疫苗1 mL(约 6×10^9 个菌株)作为佐剂,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402型超声雾化器喷入2% OVA生理盐水50 mL,每次30 min,每天上午1次,连续14 d,大鼠出现烦躁、呛咳、呼吸加快及轻度紫绀等哮喘发作症状为激发成功。对照组:以等量生理盐水代替OVA注射,每天吸入50 mL生理盐水2周。

1.2.2 细胞培养 将大鼠脱臼至死,取新鲜肺组织,在解剖显微镜下,分离出气管平滑肌组织,剪碎后置于含I型胶原酶(1 mg/mL)、木瓜蛋白酶

(1 mg/mL)、10 mg/mL 的牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)的 D-Hanks 液中消化, 37 °C、15 min 后用含 20% 胎牛血清的 DMEM 终止消化, 吹打、过滤后将细胞悬液接种于 25 mL 培养瓶中, 置于 37 °C、21% O₂、5% CO₂、95% 湿度的培养箱中培养 4 d 后观察, 细胞部分铺展成梭形, 5~7 d 后开始生长, 10~15 d 达到融合, 呈“峰和谷”的形态。细胞融合后用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞进行传代培养。实验采用第 3~6 代细胞, 实验时细胞均处于对数生长期。

1.2.3 细胞鉴定 相差倒置显微镜下观察细胞, 细胞铺满瓶底约 90% 后呈现“峰和谷”的形状, S-P 法作 α -actin 抗体免疫组织化学染色为阳性, 鉴定为 ASMCs^[4]。

1.2.4 细胞分组和药物干预 大鼠 ASMCs 分为 6 组: 正常组: 正常大鼠 ASMCs, 培养液中只加 DMSO, 终浓度为 0.1%; 正常 + diazoxide 组(diazoxide 组): 正常大鼠 ASMCs, 培养液中加入 diazoxide (MitoK_{ATP} 通道的选择性开放剂, 终浓度为 100 μ mol/L, 它溶于 DMSO, DMSO 在 DMEM 培养基中的终浓度为 0.1%); 正常 + 5-HD 组(5-HD 组): 正常大鼠 ASMCs, 培养液中加入 5-HD (MitoK_{ATP} 通道的选择性阻断剂, 终浓度为 500 μ mol/L, 直接溶于 DMEM 中); 哮喘组: 哮喘大鼠 ASMCs, 培养液中只加 DMSO, 终浓度为 0.1%; 哮喘 + diazoxide 组: 哮喘大鼠 ASMCs, 培养液中加入 diazoxide, 终浓度为 100 μ mol/L; 哮喘 + 5-HD 组: 哮喘大鼠 ASMCs, 培养液中加入 5-HD, 终浓度为 500 μ mol/L; 以上干预后均培养 24 h。

1.2.5 大鼠 ASMCs 线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, $\Delta\psi$ m)的检测 采用罗丹明荧光技术(Rhodamine fluorescence)^[5]。各组细胞先用 D-Hanks 液将培养液冲洗干净, 以免影响荧光亮度, 与 R-123 (终浓度 10 μ g/mL) 37 °C 避光孵育 30 min; 用 D-Hanks 液将未被细胞吸收的 R-123 冲洗干净, 在激光共聚焦显微镜下检测 R-123 荧光, 488 nm 时激发, 530 nm 时检测。R-123 荧光与 $\Delta\psi$ m 呈线性关系, 随着 $\Delta\psi$ m 去极化, R-123 荧光逐渐增强。用 D-Hanks 溶液孵育的细胞做对照, 结果用 HPIAS-1000 型图像分析仪分析。

1.2.6 DCFH-DA 荧光染色法测定 ROS 水平 细胞在六孔板中的培养分组及干预方式同前。在处理因素干预结束后, 加入终浓度为 20 μ mol/L DCFH-

DA 的 PBS 液, 37 °C 避光温育 30 min, 用荧光显微镜进行观察并照像。DCFH-DA 可进入细胞内水解、氧化, 形成高荧光的 DCF, 和细胞内 ROS 的水平成正比。因此, 可用细胞内 DCF 的平均荧光强度直接反映细胞内 ROS 水平。DCF 可发出绿色荧光, 结果用 HPIAS-1000 型图像分析仪分析。

1.2.7 RT-PCR 检测核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) mRNA 水平 收集细胞, 采用 TRIzol 一步法抽提细胞总 RNA, 取总 RNA 1 μ g, 以 Oligo(dT) 为引物, 用 M-MLV 逆转录酶于 42 °C 逆转录合成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。所用引物序列为: NF- κ B 上游 5'-TCCCCAAGCCAGCACCCCAGC-3', 下游 5'-GGCCCCCAAGTCTTCATCAGC-3', 扩增产物长 335 bp; β -actin 为内参, 上游 5'-TGCTGTCCCTGTATGCCTCT-3', 下游 5'-GGTCTTTACGGATGTCAACG-3', 扩增产物长 462 bp。NF- κ B PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 32 次, 循环结束后 72 °C 延伸 10 min。 β -actin PCR 时 53 °C 退火 30 s, 循环 30 次, 其余条件与 NF- κ B 相同。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 以 β -actin 为阳性对照, 经凝胶成像分析系统成像、条带密度扫描, 以积分光密度 IOD_{NF- κ B}/IOD _{β -actin} 比值进行半定量分析。

1.2.8 MTT 法检测细胞增殖 在 96 孔平底细胞培养板接种 ASMCs 浓度约为 1×10^8 个/L, 每孔 200 μ L, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h。生长成层后换无血清的 DMEM 培养基同步化 24 h。分组与干预方式同前。每组均 6 孔, 每孔溶液总体积均为 200 μ L, 置于培养箱中培养。干预结束后, 加入 MTT (5 mg/mL), 每孔 20 μ L。置于培养箱中 4 h 后加入 DMSO 原液 150 μ L/孔, 振荡 10 min 结晶物溶解后, 酶联免疫检测仪下选择波长 490 nm 测定各孔的吸光度值(A 值)。

1.2.9 流式细胞术检测细胞凋亡 细胞培养与分组同前。各组细胞用 0.25% 胰酶消化, 离心弃上清, PBS 洗涤 2 次, 离心 5 min。再用预冷的 70% 乙醇 2 mL 固定, 冷藏待测。上机前 PBS 洗去固定液, 用 100 μ L PBS 制成单细胞悬液后, 加入 10 g/L RNA 酶和 100 g/L PI 染料染色 30 min。取 1×10^6 个细胞在 FAC2-Sort 流式细胞仪上进行细胞凋亡分析(CellQuest 软件)。

1.3 统计学处理 所有数据均用 mean $\pm$ SD 表示,

采用 SPSS 13.0 软件处理。多组间的比较采用单因素方差分析, 组间差异比较采用 q 检验, 线性相关关系用直线相关分析, $P < 0.05$ 时认为有统计学差异。

2 结果

2.1 细胞鉴定

在倒置光学显微镜下, 大鼠 ASMCs 呈梭型, 细胞中心有卵圆形细胞核, 细胞生长呈现“峰和谷”形态。 α -actin 细胞免疫化学染色呈阳性。鉴定该细胞是平滑肌细胞(图 1)。

2.2 $\Delta\psi_m$ 的变化

与正常对照组相比, diazoxide 使 ASMCs 上 MitoK_{ATP} 通道开放, 表现为 R-123 荧光强度明显增强($P < 0.05$); 5-HD 对正常细胞组 MitoK_{ATP} 通道作用不明显, R-123 荧光强度与正常对照组无显著差异; 哮喘组和哮喘 + diazoxide 组都可引起平滑肌细胞 R-123 荧光强度增强($P < 0.05$), 且后者比前者作用更显著($P < 0.05$); 哮喘 + 5-HD 组可以引起 MitoK_{ATP} 通道关闭, 部分逆转哮喘增强平滑肌细胞 R-123 荧光的作用($P < 0.05$) (表 1、图 2)。

2.3 MitoK_{ATP} 通道对大鼠 ASMCs 中 ROS 表达的影响

与正常组比较, diazoxide 组细胞内 ROS 表达明显增强($P < 0.05$), 5-HD 组 ROS 表达没有明显变化。哮喘组与正常组相比, ROS 表达明显增强($P < 0.05$); 与哮喘组比较, 哮喘 + 5-HD 组 ROS 表达有所减弱($P < 0.05$), 哮喘 + diazoxide 组 ROS 表达明显增强($P < 0.05$) (图 3、表 1)。

2.4 MitoK_{ATP} 通道对大鼠 ASMCs 中 NF- κ B mRNA 表达的影响

与正常组比较, diazoxide 组细胞 NF- κ B mRNA 表达增强($P < 0.05$), 5-HD 组没有明显变化。哮喘组与正常组相比, NF- κ B mRNA 表达增加($P < 0.05$); 与哮喘组比较, 哮喘 + diazoxide 组则增加($P < 0.05$), 哮喘 + 5-HD 组 NF- κ B mRNA 表达量减弱($P < 0.05$) (图 4、表 2)。

2.5 MitoK_{ATP} 通道对大鼠 ASMCs 增殖及凋亡的影响

MTT 和流式细胞术检测结果显示, 与正常组比较, diazoxide 组 A 值显著升高, 凋亡细胞百分比明显减少($P < 0.05$); 5-HD 组 A 值以及凋亡细胞百分比无显著变化; 哮喘组 A 值增高, 凋亡细胞百分比减少($P < 0.05$)。哮喘 + diazoxide 组 A 值高于哮喘组, 凋亡细胞百分比少于哮喘组($P < 0.05$); 哮喘 + 5-HD 组 A 值低于哮喘组, 而凋亡细胞百分比则高于哮喘组($P < 0.05$) (表 3)。

表 1. Diazoxide、5-HD 和哮喘对大鼠 ASMCs 线粒体膜电位及细胞内活性氧含量的影响

Table 1. Effects of diazoxide, 5-HD and asthma on the mitochondrial membrane potential and ROS content in rat ASMCs

Group	R-123 fluorescence	DCF fluorescence
Control	66.30 $\pm$ 11.89	59.17 $\pm$ 10.59
5-HD	55.60 $\pm$ 18.85	53.40 $\pm$ 11.55
Diazoxide	149.70 $\pm$ 26.86*	124.67 $\pm$ 21.53*
Asthma	188.30 $\pm$ 31.80*	161.05 $\pm$ 30.04*
Asthma + 5-HD	116.50 $\pm$ 29.68*#	117.20 $\pm$ 22.91*#
Asthma + diazoxide	219.40 $\pm$ 20.22*#	230.40 $\pm$ 15.13*#

The mitochondrial membrane potential was detected using Rhodamine 123 (R-123) fluorescence. The level of reactive oxygen species (ROS) was detected by DCF fluorescence. mean $\pm$ SD, $n=6$. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs asthma group.

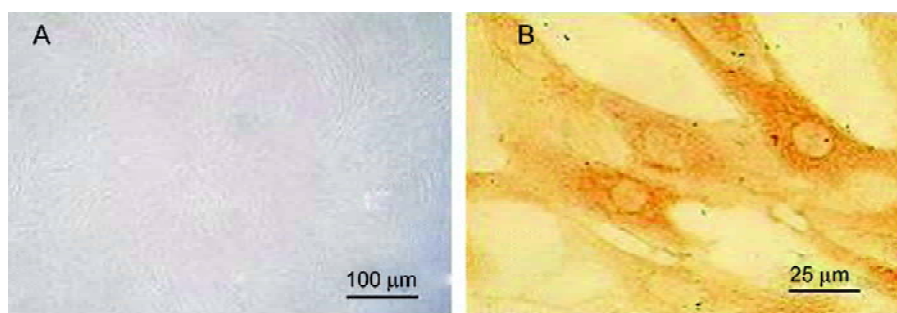


图 1. 大鼠气道平滑肌细胞形态和鉴定

Fig. 1. Appearance and identification of rat ASMCs. A: Typical 'hill and valley' appearance of ASMCs under phase contrast microscope. Scale bar, 100 μ m. B: Immunohistochemical staining of α -smooth muscle actin showed that the cultured cells were stained positively. Scale bar, 25 μ m.

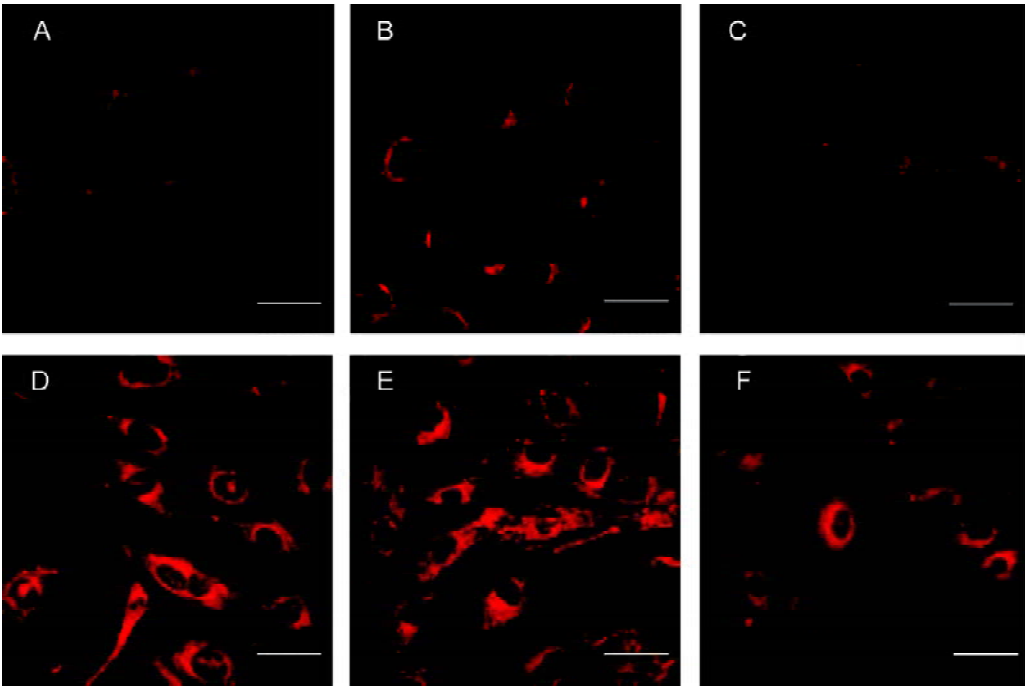


图 2. 线粒体 ATP 敏感钾通道对线粒体膜电位的影响
Fig. 2. Effect of mitochondrial ATP-sensitive K^+ channel on mitochondrial membrane potential reflected by R-123 fluorescence in rat ASM cells. A: Control group. B: Diazoxide group. C: 5-HD group. D: Asthma group. E: Asthma + diazoxide group. F: Asthma + 5-HD group. Scale bar, 50 μ m.

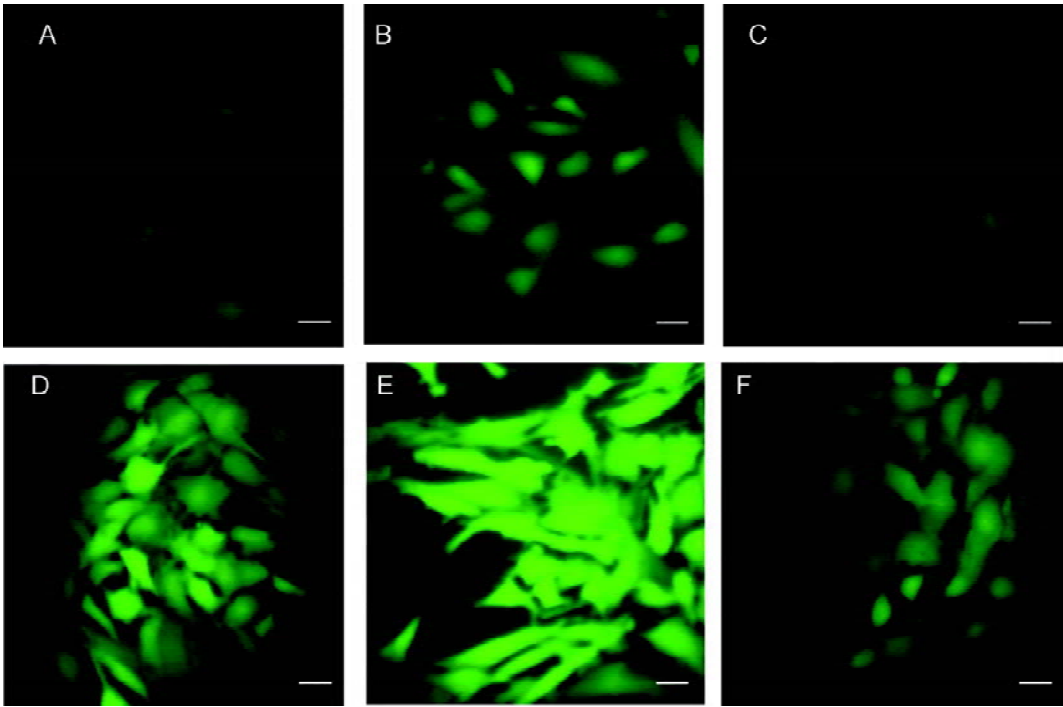


图 3. 线粒体 ATP 敏感钾通道对 ASM 细胞内 ROS 含量的影响
Fig. 3. Effects of mitochondrial ATP-sensitive K^+ channel on the level of ROS reflected by DCF fluorescence in rat ASM cells. A: Control group. B: Diazoxide group. C: 5-HD group. D: Asthma group. E: Asthma + diazoxide group. F: Asthma + 5-HD group. Scale bar, 50 μ m.



图 4. MitoK_{ATP} 通道对大鼠 ASMCs 中 NF-κB mRNA 表达的影响

Fig. 4. Effects of mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel on the expression of NF-κB mRNA. 1: Diazoxide group; 2: 5-HD group; 3: Control group; 4: Asthma + diazoxide group; 5: Asthma + 5-HD group; 6: Asthma group.

表 2. Diazoxide、5-HD 和哮喘对大鼠 ASMCs 细胞 NF-κB mRNA 表达的影响

Table 2. Effects of diazoxide, 5-HD and asthma on the expression of NF-κB mRNA in rat ASMCs

Group	NF-κB mRNA (IOD _{NF-κB} /IOD _{β-actin})
Control	0.220±0.022
5-HD	0.210±0.036
Diazoxide	0.567±0.056*
Asthma	0.952±0.080*
Asthma+5-HD	0.513±0.090*#
Asthma+diazoxide	1.279±0.042*#

mean±SD. n=6. *P<0.05 vs control group; #P<0.05 vs asthma group.

表 3. Diazoxide、5-HD 和哮喘对大鼠 ASMCs 细胞增殖和凋亡的影响

Table 3. Effects of diazoxide, 5-HD and asthma on cell proliferation and apoptosis in rat ASMCs

Group	Cell proliferation (MTT A value)	Apoptotic rate (%)
Control	0.151±0.010	16.91±1.42
5-HD	0.143±0.021	18.50±2.03
Diazoxide	0.213±0.420*	9.99±1.03*
Asthma	0.296±0.029*	7.68±0.56*
Asthma+5-HD	0.204±0.024*#	12.15±1.68*#
Asthma+Diazoxide	0.377±0.021*#	4.59±0.51*#

mean±SD. n=6. *P<0.05 vs control group; #P<0.05 vs asthma group. A value, absorbance value.

2.6 指标相关性分析

各组大鼠 ASMCs 的气道平滑肌细胞 R-123 荧光强度, NF-κB mRNA 表达量与 ROS 含量均呈正相关(分别 $r=0.725$, 0.756 , 均 $P<0.05$); 各组大鼠

气道平滑肌 MTT 的 A 值与 NF-κB mRNA 表达量呈正相关($r=0.733$, $P<0.05$), 凋亡细胞百分比与 NF-κB mRNA 表达量呈负相关($r=-0.774$, $P<0.05$)。

3 讨论

气道重构是支气管哮喘的重要病理特征, 可造成气道阻塞, 加重哮喘的发生发展。ASMCs 增殖和凋亡之间相互平衡在维持正常气道结构和功能方面起重要的作用, ASMCs 增殖水平上升和/或凋亡水平下降是导致气道重构的重要因素^[6]。最近研究表明 MitoK_{ATP} 通道开放可引起肺动脉平滑肌细胞的增殖增多和凋亡减少, 从而促进缺氧性肺动脉重塑过程^[2]。MitoK_{ATP} 通道对哮喘 ASMCs 增殖的影响尚不清楚, 本实验对此进行初步探讨。

MitoK_{ATP} 通道是影响 $\Delta\psi_m$ 的重要因素, 它对维持线粒体内钾平衡, 控制线粒体容积改变起重要作用。细胞内 ATP 和二磷酸核苷酸(NDP)含量调节 MitoK_{ATP} 通道活性, 即 ATP 增多 NDP 减少时 MitoK_{ATP} 通道活性受到抑制, 反之此通道被激活。MitoK_{ATP} 通道在常氧的情况下通常失活关闭, 而低氧时随着 ATP 减少 NDP 增多, MitoK_{ATP} 通道被激活开放, 引起 $\Delta\psi_m$ 去极化^[7]。本研究结果显示, 哮喘组和 diazoxide 组大鼠 ASMCs 上 MitoK_{ATP} 通道开放, $\Delta\psi_m$ 部分去极化, 两者共同作用(哮喘 + diazoxide 组)效果更明显, 由此可推测哮喘时大鼠气道平滑肌存在缺氧情况, 从而引起 MitoK_{ATP} 通道开放

线粒体是 ROS 的主要来源, ROS 不仅包含氧自由基, 如超氧自由基($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基($\cdot OH$), 也包括一些含氧的非自由基衍生物。研究证实, 生理条件下 ROS 诱导信号转导、导致基因转录和细胞生长^[8]。哮喘时, 气道持续暴露于外源性及内源性大量 ROS, 引起气道上皮的损伤, 诱导 ASMCs 增生, 促进哮喘的发展^[9]。

本实验进一步发现, 随着 MitoK_{ATP} 通道开放, 哮喘组和 diazoxide 组 ROS 产生增多, NF-κB 的表达增多, ASMCs 增殖增多、凋亡减少, 两者共同作用(哮喘 + diazoxide 组)效果更明显; 5-HD 作为 MitoK_{ATP} 通道关闭剂可逆转此效应; 且 R-123 荧光强度, NF-κB mRNA 表达量与 ROS 表达均呈正相关。Diazoxide 引起 ROS 产生的机制, 可能是由于 MitoK_{ATP} 通道开放使 K⁺ 内流而导致线粒体基质体积变化, 使电子传递链和氧化磷酸化出现功能性脱耦联, 生成氧化基团。后者被线粒体过氧化物歧化酶

歧化成过氧化氢后,进一步反应即生成氢氧基等物质^[10]。由本研究推测,哮喘组可能是由于ASMCs缺氧引起的MitoK_{ATP}通道开放促进了气道平滑肌ROS的表达增多。ROS促进NF- κ B的表达增多可能是其促进气道平滑肌增殖机制之一。ROS可促进I κ B α 磷酸化、泛素化并使其降解,从而激活NF- κ B的结合活性^[11]。NF- κ B是细胞内具有转录激活作用的转录因子,在非活化细胞中,NF- κ B则位于细胞质内,与其阻遏蛋白I κ B结合处于非活化状态。当细胞受到丝裂原等外来信号刺激时I κ B α 被磷酸化失活,使NF- κ B进入细胞核,并通过与NF- κ B增强子及启动子相互作用而促进基因表达^[12]。研究表明,NF- κ B参与哮喘大鼠气道重构,促进哮喘ASMCs增殖^[13],本研究也证实如此,MTT的A值与NF- κ B mRNA表达量呈正相关,凋亡细胞百分比与NF- κ B mRNA表达量呈负相关。由此可见,MitoK_{ATP}通道的开放可能参与ASMCs的增殖反应,并在ASMCs增殖过程中起到促进作用,这种作用在哮喘中表达更明显,进一步加重了气道重构。

综上所述,哮喘大鼠ASMCs上MitoK_{ATP}通道开放, $\Delta\psi_m$ 部分去极化,导致ASMCs中ROS表达增多,ROS可刺激NF- κ B的激活并使其表达增加,进而引起ASMCs的增殖增多、凋亡减少,参与气道重构。由此可见,进一步研究MitoK_{ATP}通道将为研究哮喘过程中气道重构的病理生理机制提供新的靶向。由于本实验通过建立大鼠哮喘模型研究哮喘的发病机制,且只是初步探讨MitoK_{ATP}通道与ASMCs增殖的关系,故MitoK_{ATP}通道在哮喘发生发展中的作用有待进一步深入研究。

参考文献

- Hershenson MB, Brown M, Camoretti-Mercado B, Solway J. Airway smooth muscle in asthma. *Annu Rev Pathol* 2008; 3: 523-555.
- Hu HL (胡红玲), Wang T, Zhang ZX, Zhao JP, Xu YJ. Effect of diazoxide on change of H₂O₂ in rat pulmonary artery smooth muscle cells and proliferation of hypoxic rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志) 2007; 23 (10): 2002-2020 (Chinese, English abstract).
- Salmon M, Walsh DA, Koho H, Barnes PJ, Chung KF. Repeated allergen exposure of sensitized Brown-Norway rats induces airway cell DNA synthesis and remodeling. *Eur Respir J* 1999; 14: 633-641.
- Zhao JP (赵建平), Guo Z, Zhou ZG, Chen J, Hu HL, Wang T, Zhang ZX. Effect of opening of mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels on the expression of hypoxia inducible factor-1 α and cell proliferation in pulmonary arterial smooth muscle cells of rats. *Acta Physiol Sin* (生理学报) 2007; 59(2): 157-162 (Chinese, English abstract).
- Krick S, Platoshyn O, McDaniel SS, Rubin LJ, Yuan JX. Augmented K⁺ currents and mitochondrial membrane depolarization in pulmonary artery myocyte apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281: L887-L894.
- Bai J, Liu XS, Xu YJ, Zhang ZX, Xie M, Ni W. Extracellular signal-regulated kinase activation in airway smooth muscle cell proliferation in chronic asthmatic rats. *Acta Physiol Sin* (生理学报) 2007; 59(3): 311-318.
- Das B, Sarkar C. Cardiomyocyte mitochondrial K_{ATP} channels participate in the antiarrhythmic and antiinfarct effects of K_{ATP} activators during ischemia and reperfusion in an intact anesthetized rabbit model. *Pol J Pharmacol* 2003; 55: 771-786.
- Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(9): 1387-1404.
- Pawliczak R. The role of radical oxygen species in airway inflammation. *Pol Merkuri Lekarski* 2003; 14(84): 493-496.
- Costa AD, Garlid KD. Intramitochondrial signaling: interactions among MitoK_{ATP}, PKC ϵ , ROS, and MPT. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295(2): H874-H882.
- Kim HS, Loughran PA, Rao J, Billiar TR, Zuckerbraun BS. Carbon monoxide activates NF- κ B via ROS generation and Akt pathways to protect against cell death of hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295(1): G146-G152.
- Mehrfhof FB, Schmidt-Ullrich R, Dietz R, Scheidereit C. Regulation of vascular smooth muscle cell proliferation: role of NF- κ B revisited. *Circ Res* 2005; 96(9): 958-964.
- Xu S, Xu Y, Zhang Z, Ni W, Chen S. Effect of nuclear factor- κ B on airway remodeling in asthmatic rats. *Huazhong Univ Sci Tech Med Sci* 2004; 24(1): 13-18.