

## $\gamma$ -氨基丁酸 A 型受体调节哮喘动物模型气道重构的实验研究

朱涛<sup>1</sup>,任旭斌<sup>1</sup>,朱静<sup>1</sup>,薄红<sup>2</sup>,刘春涛<sup>1</sup>(四川大学华西医院<sup>1</sup>呼吸内科,<sup>2</sup>肾内科,四川 成都 610041)

**摘要:**目的 探讨  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体 (GABAAR) 拮抗剂荷包牡丹碱对于小鼠哮喘气道重构模型的干预作用。方法 BALB/C 小鼠被随机分为 4 组:空白对照组、哮喘模型组、激素治疗组和荷包牡丹碱干预组。除空白对照组外其他各组小鼠在第 1、7、14 天通过腹腔注射 10  $\mu$ g 卵清蛋白(OVA)和 100  $\mu$ g Al(OH)<sub>3</sub> 的 PBS 液致敏,从实验的第 15~81 天小鼠每天雾化吸入 5% OVA 溶液 1 h。从第 15 天开始,激素治疗组每天雾化吸入 0.02%布地奈德溶液 0.5 h,荷包牡丹碱组每天鼻腔滴入 20%荷包牡丹碱悬浊液 50  $\mu$ l。于最后一次激发后 24 h 放血处死小鼠,检测 BALF 中细胞总数、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞,肺组织标本切片 PAS 染色检测粘蛋白糖原,Masson 染色检测上皮胶原沉积面积,免疫组织化学方法检测 GABAAR $\beta_2$  和血管内皮生长因子(VEGF)的表达水平。结果 (1)荷包牡丹碱干预组 BALF 中细胞总数、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞数分别为  $(20.50\pm 2.40)\times 10^4$ 、 $(8.30\pm 0.23)\times 10^4$  和  $(4.20\pm 0.05)\times 10^4$ ,与对照组  $[(2.43\pm 2.10)\times 10^4$ 、 $(0.00\pm 0.00)\times 10^4$  和  $(0.90\pm 0.05)\times 10^4]$  和激素干预组  $[(5.50\pm 1.90)\times 10^4$ 、 $(3.60\pm 0.25)\times 10^4$  和  $(1.90\pm 0.03)\times 10^4]$  比较差异有统计学意义(均为  $P<0.01$ ),与哮喘模型组  $[(20.40\pm 1.80)\times 10^4$ 、 $(8.80\pm 0.14)\times 10^4$  和  $(4.20\pm 0.10)\times 10^4]$  比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。(2)荷包牡丹碱干预组气道基底膜胶原沉积面积为  $(0.34\pm 0.17) \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ ,与对照组  $[(0.27\pm 0.02) \mu\text{m}^2/\mu\text{m}]$  和激素干预组  $[(0.30\pm 0.06) \mu\text{m}^2/\mu\text{m}]$  比较差异无统计学意义(均为  $P>0.05$ ),与哮喘模型组  $[(0.72\pm 0.08) \mu\text{m}^2/\mu\text{m}]$  比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。(3)荷包牡丹碱干预组 PAS 阳性细胞百分数为  $(19.00\pm 2.08)\%$ ,与对照组  $[(0.00\pm 0.0)\%]$ 、激素干预组  $[(30.00\pm 1.66)\%]$  和哮喘模型组  $[(58.00\pm 1.57)\%]$  比较差异有统计学意义(均为  $P<0.05$ )。(4)荷包牡丹碱干预组 GABAAR 受体  $\beta_2$ -亚基表达阳性率为  $(11.30\pm 2.7)\%$ ,与对照组  $[(2.00\pm 0.7)\%]$  和激素干预组  $[(7.3\pm 1.58)\%]$  比较差异有统计学意义( $P<0.01$  和  $P<0.05$ ),与哮喘模型组  $[(12.50\pm 0.31)\%]$  比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。(5)荷包牡丹碱干预组肺血管周围细胞 VEGF 表达阳性率为  $(10.60\pm 1.20)\%$ ,与对照组  $[(1.70\pm 0.34)\%]$  和激素干预组  $[(8.30\pm 0.78)\%]$  比较差异有统计学意义( $P<0.01$  和  $P<0.05$ ),与哮喘模型组  $[(18.30\pm 0.80)\%]$  比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 气道上皮细胞和气道平滑肌细胞广泛表达 GABAAR $\beta_2$ ,荷包牡丹碱吸入可以有效抑制粘液分泌和上皮胶原沉积,其抑制粘液分泌的作用强于吸入激素,但不能减轻气道炎症水平,也不能抑制 GABAAR $\beta_2$  和 VEGF 的表达。

**关键词:**哮喘;气道重构; $\gamma$ -氨基丁酸 A 型受体;荷包牡丹碱;支气管肺泡灌洗液;气道基底膜胶原沉积;血管内皮生长因子;激素

中图分类号:R562.2+5 文献标识码:A 文章编号:1673-4254(2010)04-0842-05

## Bicuculline inhibits airway remodeling in a murine model of chronic asthma

ZHU Tao<sup>1</sup>, REN Xu-bing<sup>1</sup>, ZHU Jing<sup>1</sup>, BO Hong<sup>2</sup>, LIU Chun-tao<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Respiratory Medicine, <sup>2</sup>Department of Nephrology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of bicuculline, a selective GABAAR antagonist, on airway remodeling in the murine model of chronic allergen-induced asthma. **Methods** Forty BALB/C mice were randomized into 4 groups, namely the control group, asthmatic model (induced by ovalbumin sensitization and challenge) group, budesonide inhalation group and bicuculline inhalation group. The mice were sacrificed 24 h after the last ovalbumin inhalation, and the lungs were lavaged with PBS and the total cells, eosinophils and lymphocytes counts were examined. Periodic acid-Schiff (PAS) staining was used for counting mucin-positive goblet cells in the lung tissue, and Masson Trichrome staining was used to evaluate collagen deposition. GABAAR $\beta_2$  and VEGF were quantified by immunohistochemistry. **Results** The numbers of the total cells, eosinophils and lymphocytes counts in BALF were significantly greater in the bicuculline group than in the control and budesonide groups ( $P<0.01$ ), but comparable to those in the asthmatic model group ( $P>0.05$ ). The airway collagen deposition in the bicuculline group was comparable to that in the control and budesonide group ( $P>0.05$ ), but was significantly less than that in the asthmatic model group ( $P<0.05$ ). Significant differences were found in the airway histological mucus index between the bicuculline group and the other 3 groups ( $P<0.05$ ). The airway GABAAR $\beta_2$ -positive cell percentage in the bicuculline group was significantly greater than those in the control and budesonide ( $P<0.01$  and  $0.05$ ), but similar with that in the asthmatic model group ( $P>0.05$ ). The percentage of pulmonary perivascular VEGF-positive cells in the bicuculline group was significantly greater in the control and budesonide groups ( $P<0.01$  and  $P<0.05$ ), but comparable to that in the asthmatic model group ( $P>0.05$ ). **Conclusion** GABAAR $\beta_2$  is expressed in both the airway epithelium and smooth muscles. Bicuculline inhalation can effectively suppress collagen deposition with a stronger inhibitory effect on mucus hypersecretion than budesonide.

**Key words:** asthma; airway remodeling; subtype A GABA receptor; bicuculline; airway collagen deposition; vascular endothelial growth factors; budesonide

收稿日期:2009-10-17

作者简介:朱涛(1981-),男,硕士研究生

通讯作者:刘春涛,E-mail: taosen666@tom.com

气道重构是支气管哮喘重要的病理学特征,是引起气道不可逆性气流阻塞和导致严重哮喘和致死性哮喘的主要因素<sup>[1-2]</sup>。气道重构主要是指慢性哮喘导致的上皮下游原沉积、基底膜增厚、杯状细胞化生、粘液高分泌和气道平滑肌细胞的肥大、增生<sup>[3-4]</sup>。近来有研究发现  $\gamma$ -氨基丁酸 A 型受体(GABAAR)可能参与哮喘的发病过程特别是气道重构的过程<sup>[1-2]</sup>。GABA 是一种抑制性神经递质,其广泛合成于神经细胞。GABA 由 L-谷氨酸在谷氨酸脱羧酶(GAD)催化下脱羧形成。GAD 有 GAD65 和 GAD67 两种同工酶,它们是合成 GABA 的标志酶。GABA 合成后储存在突触囊泡内,且胞质内 GABA 的浓度也很高。囊泡内 GABA 的释放主要依赖  $\text{Ca}^{++}$  的内流。当 GABA 释放后大部分是通过重摄取的方式失活。GABA 可以和 3 种受体结合:GABAAR、GABABR 和 GABACR。其中 GABAAR 和 GABACR 为化学门控离子通道型受体,GABABR 为代谢型受体。GABAAR 为一种 5 亚基的聚合受体,可构成 GABAAR 的亚基共有 7 种,表达在气道的受体主要为  $2\alpha 2\beta\gamma$ 。其中  $\beta 2$  和  $\beta 3$  是配体结合部位也是受体最重要的标志。有研究发现 GABAAR 作为一种离子通道在被激活后引起  $\text{Cl}^-$  的内流,从而导致神经细胞发生超极化现象<sup>[5-6]</sup>。而 Xiang 等却发现当 GABAAR 激活后气道上皮细胞出现  $\text{Cl}^-$  外流,与神经元的  $\text{Cl}^-$  内流相反,使纤毛柱状上皮出现除极化,研究发现在哮喘时由于 GABA 的高表达和高分泌使得纤毛柱状上皮的除极化状态持续发生,并诱发纤毛柱状上皮的杯状上皮细胞化生,从而引起气道的重构<sup>[1-2]</sup>。但迄今国内外还没有关于阻断 GABAAR 干预慢性哮喘气道重构的研究报道。本实验通过建立小鼠慢性哮喘模型,观察 GABAAR 拮抗剂荷包牡丹碱和糖皮质激素布地奈德对气道炎症、粘蛋白糖原表达、气道上皮基底膜胶原沉积、GABAAR $\beta_2$  和肺血管周围细胞 VEGF 表达水平的影响,并对两种方法进行比较。

## 1 对象和方法

### 1.1 材料

SPF 级健康雄性 BALB/C 小鼠 40 只,6~8 周龄,体质量 18~22 g (四川大学药学院实验动物中心提供)。分为 4 组,即空白对照组、哮喘模型组、激素治疗组和荷包牡丹碱干预组,每组 10 只,分笼饲养。卵清蛋白(ovalbumin,OVA)购于美国 Sigma 公司。兔抗 GABAAR $\beta_2$  抗体及兔抗 VEGF 抗体购于美国 Santa Cruz 公司。荷包牡丹碱购于百灵威科技有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物模型的建立

腹腔注射 10  $\mu\text{g}$  OVA 和 100  $\mu\text{g}$   $\text{Al}(\text{OH})_3$  配制成的溶液致敏。从第 15~81 天将小鼠置于特制塑料容器内,用超声雾化器吸入 5% OVA 生理盐水 10 ml 激发 1 h。OVA 激发后小鼠出现烦躁、呛咳、呼吸加快及轻度紫绀等哮喘发作症状<sup>[7]</sup>。

1.2.2 动物分组 实验小鼠分为 4 组:(1)空白对照组:注射等量 0.9%生理盐水代替 OVA,并吸入 0.9%生理盐水 10 ml,余同哮喘组。(2)哮喘模型组:按上述方法制备哮喘模型。(3)激素治疗组:每次激发前 30 min 超声雾化吸入 0.02%布地奈德 0.5 h,余同哮喘模型组。(4)荷包牡丹碱干预组:每次激发前 30 min 鼻腔滴入 20%荷包牡丹碱悬浊液 50  $\mu\text{l}$ <sup>[1]</sup>,余同哮喘模型组。在实验的第 81 天腹腔注射戊巴比妥(50 mg/kg)麻醉小鼠,下腔静脉放血处死,并将生理盐水注入右心室冲洗两次以洗净肺内残留血液。

1.2.3 支气管肺泡灌洗液(BALF)细胞计数 末次雾化吸入 24 h 后,以 1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉后,以静脉留置导管作气管插管。以 1、0.8 ml 磷酸盐缓冲液(PBS)分 2 次作支气管肺泡灌洗,并收集 BALF 1 ml。BALF 在 4  $^{\circ}\text{C}$  下以 400 r/min 离心 5 min,沉渣以 100  $\mu\text{l}$  PBS 液重悬。使用 Wright-Giemsa 染色后,在血细胞计数器下至少计数 200 个细胞做细胞分类计数<sup>[8,9]</sup>。下腔静脉放血处死小鼠,打开胸腔,结扎右总支气管,于远端切下,放于 10%中性甲醛中保存。

1.2.4 Masson 染色检测肺组织胶原沉积面积 石蜡切片 3~4  $\mu\text{m}$  常规脱蜡至水后,Masson 三原染色法染胶原纤维,其主要步骤为:(1)Masson 复合染色液染 5 min;(2)0.2%醋酸水溶液稍洗;(3)5%磷钨酸溶液 5~10 min;(4)0.2%醋酸水溶液浸洗 2 次;(5)亮绿染色液 5 min;(6)0.2%醋酸水溶液浸洗 2 次;(7)脱水,透明,封固。结果为胶原纤维呈蓝色,肌纤维胞质呈红色,细胞核呈蓝褐色。肺组织 Masson 染色后,对每只小鼠随机取至少 10 个直径在 100~200  $\mu\text{m}$  支气管进行气道基底膜下胶原面积测量,并以气道基底膜下胶原沉积面积与视野下气道基底膜周长比值( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ )来表示<sup>[10-11]</sup>。切片采用 Image-ProPlus (Media Cybernetics, Silver Spring, Md)图像分析系统进行分析。

1.2.5 PAS 染色法检测肺组织粘蛋白糖原表达情况 粘蛋白糖原呈 PAS 阳性染色,气道 PAS 阳性细胞主要为杯状细胞和粘液腺细胞,其定量分析可代表气道粘液表达水平。肺组织 PAS 染色后,对每只小鼠随机取至少 10 个直径在 100~200  $\mu\text{m}$  支气管进行 PAS 阳性细胞和 PAS 阴性细胞计数,并使用 PAS 阳性细胞/支气管总细胞的百分比来表示<sup>[12]</sup>。切片采用

Image-ProPlus(Md)图像分析系统进行分析。

1.2.6 免疫组织化学染色检测气道 GABAAR $\beta_2$  表达情况 肺组织以 10%中性甲醛固定后,常规脱水包埋切片,厚度 6  $\mu\text{m}$ 。参照说明书用 SABC 法进行免疫组织化学染色。以 PBS 代替一抗作为空白对照,兔抗鼠抗体工作浓度为 1:100。DAB 显色阳性结果显棕黄色,观察 GABAAR $\beta_2$  的表达位置和定量分析。在显色后,对每只小鼠随机取至少 10 个直径在 100~200  $\mu\text{m}$  支气管进行 GABAAR $\beta_2$  阳性细胞和 GABAAR $\beta_2$  阴性细胞计数,并使用 GABAAR $\beta_2$  阳性细胞 / 支气管总细胞的百分比来表示<sup>[1, 13]</sup>。切片采用 Image-ProPlus(Md)图像分析系统进行分析。

1.2.7 免疫组织化学染色检测肺血管周围细胞 VEGF 的表达情况 染色方法和表达分析方法同 GABAAR $\beta_2$ 。在对肺血管周围细胞 VEGF 表达定量分析时选用 100~200  $\mu\text{m}$  直径血管进行计数<sup>[13]</sup>。

### 1.3 统计学处理

计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示。采用 SPSS11.0 进行单因素方差分析,两样本均数多重比较采用 LSD 法进行两两比较,并进行直线相关分析。 $P<0.05$  为差

异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BALF 细胞计数

荷包牡丹碱干预组 BALF 中的细胞总数、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞数均较对照组和激素干预组增多,与哮喘模型组相同,见表 1。

表 1 小鼠支气管肺泡灌洗液细胞计数( $n=10, \bar{x}\pm s$ )

| 组别       | 细胞总数( $\times 10^4$ )         | 嗜酸性粒细胞( $\times 10^4$ )      | 淋巴细胞( $\times 10^4$ )        |
|----------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 正常对照组    | 2.43 $\pm$ 2.10               | 0.00 $\pm$ 0.00              | 0.90 $\pm$ 0.05              |
| 哮喘模型组    | 20.40 $\pm$ 1.80 <sup>a</sup> | 8.80 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup> | 4.20 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup> |
| 激素干预组    | 5.50 $\pm$ 1.90 <sup>c</sup>  | 3.60 $\pm$ 0.25 <sup>c</sup> | 1.90 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup> |
| 荷包牡丹碱干预组 | 20.50 $\pm$ 2.40 <sup>c</sup> | 8.30 $\pm$ 0.23 <sup>c</sup> | 4.20 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup> |

与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与哮喘模型组比较,<sup>c</sup> $P<0.01$ ;与激素干预组比较,<sup>c</sup> $P<0.01$

### 2.2 胶原沉积情况

荷包牡丹碱干预组和激素干预组的气道基底膜胶原沉积水平相同,哮喘模型组气道基底膜胶原沉积明显增加,对照组几乎未见胶原沉积,见图 1、表 2。

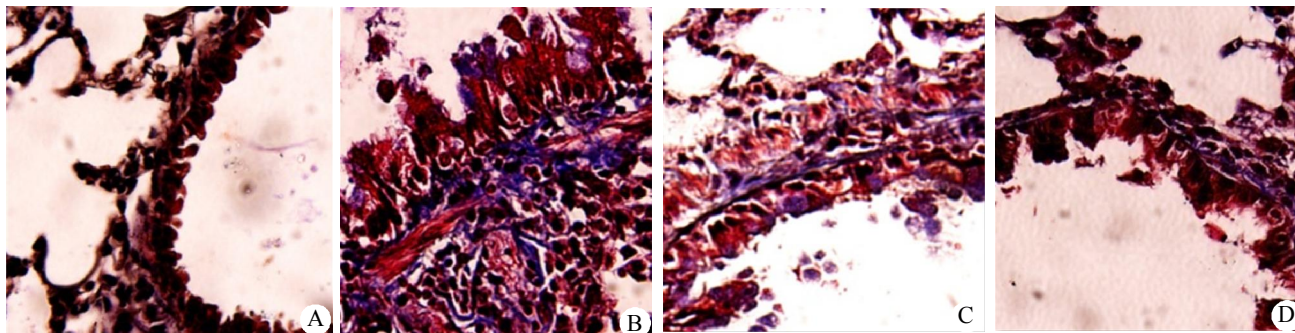


图 1 各组气道基底膜胶原沉积情况(Masson,  $\times 400$ )

A: 对照组; B: 哮喘模型组; C: 激素干预组; D: 荷包牡丹碱干预组

表 2 小鼠气道基底膜胶原沉积情况( $n=10, \bar{x}\pm s, \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ )

| 组别       | 面积比值                         |
|----------|------------------------------|
| 正常对照组    | 0.27 $\pm$ 0.02              |
| 哮喘模型组    | 0.72 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup> |
| 激素干预组    | 0.30 $\pm$ 0.06 <sup>d</sup> |
| 荷包牡丹碱干预组 | 0.34 $\pm$ 0.17 <sup>d</sup> |

与正常对照组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与哮喘模型组比较,<sup>d</sup> $P<0.05$

### 2.3 粘蛋白糖原表达情况

哮喘模型组表达水平最高,激素干预组其次,荷包牡丹碱干预组表达最少,而对照组几乎未见粘蛋白糖原表达,见图 2、表 3。

### 2.4 各组小鼠肺部 GABAA 受体 $\beta_2$ - 亚基表达情况

荷包牡丹碱干预组 GABAA 受体  $\beta_2$ - 亚基表达阳性率较对照组和激素干预组增高,与哮喘模型组相

同,见图 3、表 4。

### 2.5 肺血管周围细胞 VEGF 表达情况比较

荷包牡丹碱干预组肺血管周围细胞 VEGF 表达阳性率较对照组和激素干预组增高,与哮喘模型组相同,见图 4、表 5。

## 3 讨论

$\gamma$ -氨基丁酸(GABA)是存在于哺乳动物中枢神经系统内的一种重要的抑制性神经递质。GABA 的 A 型受体(GABAAR)是一种离子通道性受体,在神经系统广泛表达。最近发现 GABAAR 还广泛表达于包括支气管上皮在内的多种外周组织<sup>[1, 3]</sup>。近期有研究证实,阻断 GABAAR 后能够抑制哮喘急性发作期的粘液分泌和杯状细胞增生<sup>[1]</sup>,提示 GABAAR 参与哮

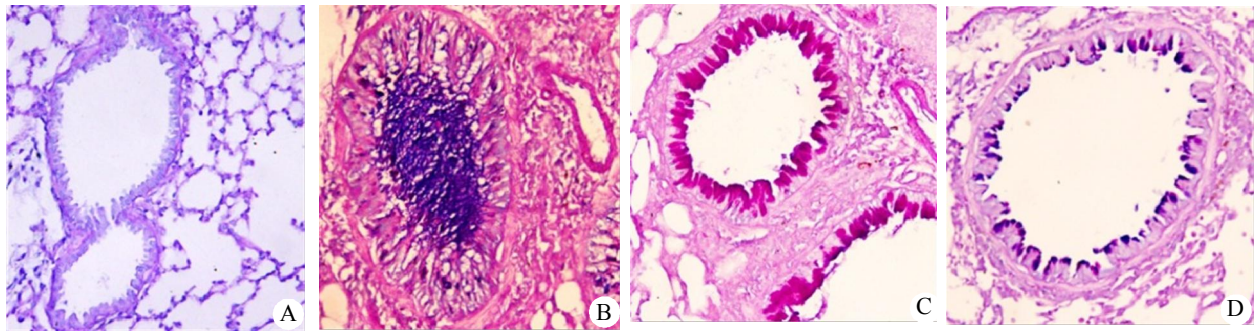
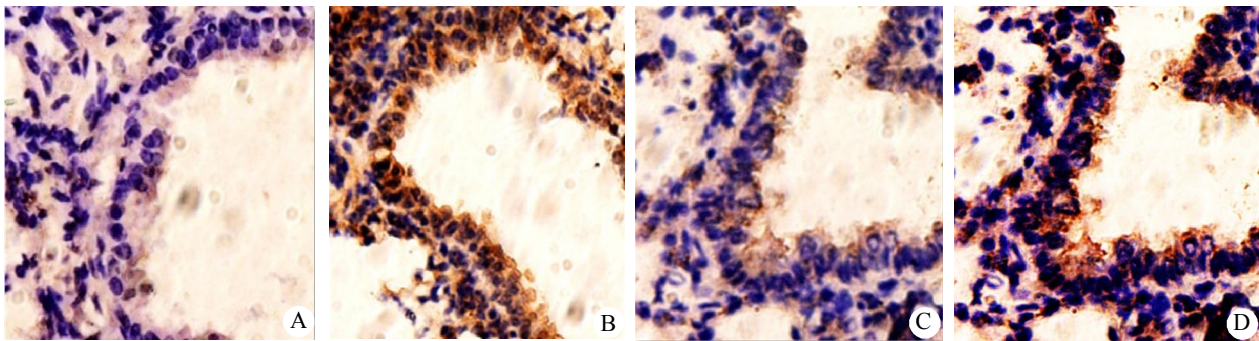


图 2 各组粘蛋白糖原表达情况(PAS,×400)

A:对照组;B:哮喘模型组;C:激素干预组;D:荷包牡丹碱干预组

图 3 各组小鼠肺部 GABA<sub>A</sub> 受体  $\beta_2$ - 亚基表达情况(DAB,×400)

A:对照组;B:哮喘模型组;C:激素干预组;D:荷包牡丹碱干预组

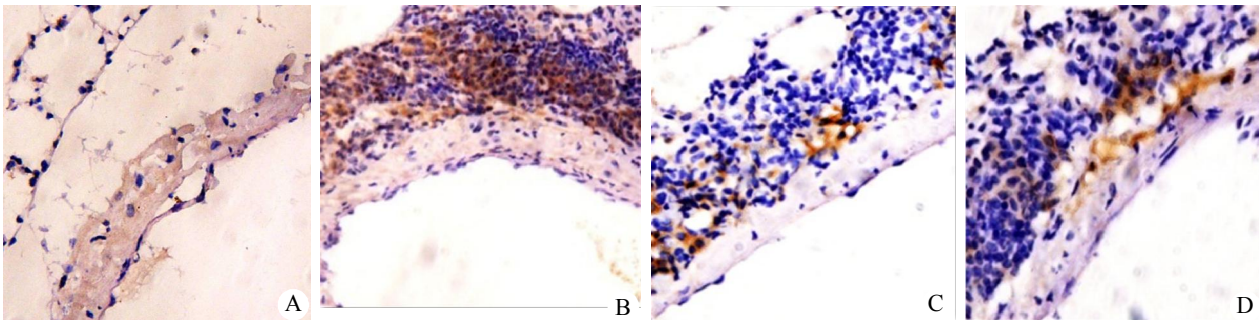


图 4 各组肺血管周围细胞 VEGF 表达情况比较(DAB,×400)

A:对照组;B:哮喘模型组;C:激素干预组;D:荷包牡丹碱干预组

表 3 各组小鼠气道糖原表达 PAS 染色对比( $n=10$ ,  $\bar{x}\pm s$ , %)

| 组别       | PAS染色百分数                  |
|----------|---------------------------|
| 正常对照组    | 0.00±0.00                 |
| 哮喘模型组    | 58.00±1.57 <sup>a</sup>   |
| 激素干预组    | 30.00±1.66 <sup>ad</sup>  |
| 荷包牡丹碱干预组 | 19.00±2.08 <sup>adf</sup> |

与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与哮喘模型组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与激素干预组比较,<sup>f</sup> $P<0.05$ 表 4 小鼠肺部 GABA<sub>A</sub> 受体  $\beta_2$ - 亚基表达情况( $n=10$ ,  $\bar{x}\pm s$ , %)

| 组别       | 小鼠肺部 GABA <sub>A</sub> 受体 $\beta_2$ - 亚基表达阳性率 |
|----------|-----------------------------------------------|
| 正常对照组    | 2.00±0.70                                     |
| 哮喘模型组    | 12.50±0.31 <sup>a</sup>                       |
| 激素干预组    | 7.30±1.58 <sup>bd</sup>                       |
| 荷包牡丹碱干预组 | 11.30±2.70 <sup>af</sup>                      |

与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与哮喘模型组比较,<sup>d</sup> $P<0.05$ ;与激素干预组比较,<sup>f</sup> $P<0.05$ 表 5 小鼠肺血管周围细胞 VEGF 表达情况( $n=10$ ,  $\bar{x}\pm s$ , %)

| 组别       | 小鼠肺血管周围细胞 VEGF 表达阳性率     |
|----------|--------------------------|
| 正常对照组    | 1.70±0.34                |
| 哮喘模型组    | 18.30±0.80 <sup>a</sup>  |
| 激素干预组    | 8.30±0.78 <sup>bd</sup>  |
| 荷包牡丹碱干预组 | 10.60±1.20 <sup>af</sup> |

与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与哮喘模型组比较,<sup>d</sup> $P<0.05$ ;与激素干预组比较,<sup>f</sup> $P<0.05$ 

喘病理生理过程的调节,但相关研究并不深入,有诸多环节尚未阐明,如气道平滑肌是否表达 GABAAR; GABAAR 诱导粘液分泌增加和杯状上皮化生的具体机制是什么;GABAAR 与肌成纤维细胞的关系又是如何等<sup>[3]</sup>。本研究在 OVA 雾化吸入建立动物慢性哮喘模型的基础上观察 GABAAR 拮抗剂荷包牡丹碱对于哮喘气道炎症和重构的影响,结果发现在气道反

复雾化吸入 OVA 81 d 后小鼠气道和肺组织内存在明显的炎症反应和结构改变,如 BALF 中细胞总数、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞分类计数增高,粘液分泌增加以及上皮下胶原沉积增多等,提示动物模型发生了哮喘特异性的气道炎症反应和气道重构。本研究发现,哮喘动物模型气道上皮细胞和 ASM 均可广泛表达 GABAAR $\beta_2$ ,吸入激素可以有效抑制 GABAAR $\beta_2$ 和肺血管周围细胞 VEGF 的表达。应用 GABAAR 拮抗剂荷包牡丹碱干预可以明显抑制气道重构特别是粘液分泌现象,其作用较激素更明显,但并不能减轻气道炎症,亦不能降低肺血管周围细胞 VEGF 的表达水平。

有研究表明在气道上皮 GABAAR 兴奋引起 Cl<sup>-</sup>外流,与神经元的 Cl<sup>-</sup>内流相反,其结果是纤毛柱状上皮除极化<sup>[1-2]</sup>。有实验表明在哮喘时由于 GABA 的高表达和高分泌使得纤毛柱状上皮的除极化状态持续发生,并最终诱导纤毛柱状上皮的杯状上皮细胞化生,而这正是气道重构的重要特征之一<sup>[1-2]</sup>。Cl<sup>-</sup>外流细胞除极化后发生的具体分子生物学机制还不清楚,但是可以明确的是 GABAAR 与气道上皮重构粘液高分泌间有着重要的联系。Xiang 等<sup>[1]</sup>发现在小鼠哮喘模型和哮喘病人的气道上皮 GABAAR 表达明显增加,而且对小鼠哮喘模型使用印防己毒素(GABAAR 的通道阻断剂)或荷包牡丹碱后可以减轻杯状上皮化生和粘液高分泌。我们发现荷包牡丹碱干预后的小鼠气道粘液分泌明显低于哮喘组和激素干预组,与 Xiang 等<sup>[1]</sup>的研究结果相似。此前多个研究提示 GABAAR 主要受到 Th2 细胞因子,特别是 IL-13 的调节<sup>[1,3,14-15]</sup>。我们发现激素干预组的炎症水平和 GABAAR $\beta_2$ 水平明显低于哮喘组和荷包牡丹碱干预组,提示炎症水平可能上调 GABAAR 的表达,而吸入激素可能通过抑制 IL-13 在内的多种炎症因子的释放,从而降低 GABAAR $\beta_2$ 的表达。我们还发现,GABAAR $\beta_2$ 表达水平除与气道粘液分泌有关外,与上皮下胶原沉积也有关系,由于在相关研究中发现 IL-13 单抗可以有效抑制上皮胶原沉积,故推测 IL-13 可能是通过上调肌成纤维细胞 GABAAR 表达来促进上皮胶原沉积的<sup>[14-15]</sup>,但是 GABAAR 与肌成纤维细胞的胶原分泌的具体关系还不清楚,需要进一步探讨。

本研究初步探讨了 GABAAR 在哮喘气道炎症和气道重构中的作用,发现 GABAAR $\beta_2$ 广泛表达于 ASM 和气道上皮,阻断 GABAAR 可以抑制气道粘液分泌和上皮下胶原沉积,但对于气道炎症和肺血管周围细胞 VEGF 的过度表达并无明显的抑制作用。关于 GABAAR 与气道炎症和重构的关系,以下问题

值得进一步研究:气道上皮广泛表达 GABAAR,而为什么仅有部分纤毛柱状上皮发生了杯状上皮化生?是否存在与 GABAAR 通路相拮抗的机制抑制杯状上皮化生的发生和胶原的沉积?神经内分泌系统是否参与了哮喘的发生?对 GABAAR 参与哮喘发病机制的进一步研究有可能开发一个新的治疗靶点。

## 参考文献:

- [1] Xiang YY, Wang SH, Liu MY, et al. A GABAergic system in airway epithelium is essential for mucus overproduction in asthma [J]. *Nat Med*, 2007, 13(7): 862-7.
- [2] Corry DB, Kheradmand F. A new link to airway obstruction in asthma [J]. *Nat Med*, 2007, 13(7): 777-8.
- [3] Elias JA, Zhu Z, Chupp G, et al. Airway remodeling in asthma [J]. *J Clin Invest*, 1999, 104: 1001-6.
- [4] Jain VV, Kitagaki K, Businga T, et al. CpG-oligodeoxynucleotides inhibit airway remodeling in a murine model of chronic asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, 110: 867-72.
- [5] Yasuaki Y, Masahito W, Yumi N, et al. Expression of GABAergic system in pulmonary neuroendocrine cells and airway epithelial cells in GAD67-GFP knock-in mice [J]. *Med Mol Morphol*, 2008, 41: 20-7.
- [6] Mizuta K, Xu D, Pan Y, et al. GABAA receptors are expressed and facilitate relaxation in airway smooth muscle [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 294: L1206-16.
- [7] Kearley J, Robinson DS, Lloyd CM. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 122: 617-24.
- [8] Kim DY, Park JW, Jeoung D, et al. Celastrol suppresses allergen-induced airway inflammation in a mouse allergic asthma model [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 612: 98-105.
- [9] Kim DY, Ryu SY, Lim JE, et al. Anti-inflammatory mechanism of simvastatin in mouse allergic asthma model [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 557: 76-86.
- [10] Cho JY, Miller M, Baek KJ, et al. Immunostimulatory DNA inhibits TGF- $\beta$  expression and airway remodeling [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 30: 651-61.
- [11] Cho JY, Miller M, Baek KJ, et al. Immunostimulatory DNA reverses established allergen-induced airway remodeling [J]. *J Immunol*, 2004, 173: 7556-764.
- [12] Cho JY, Miller M, McElwain K, et al. Combination of corticosteroid therapy and allergen avoidance reverses allergen-induced airway remodeling in mice [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116: 1116-22.
- [13] Huerta-Yepez S, Baay-Guzman GJ, Garcia-Zepeda R, et al. 2-Methoxyestradiol (2-ME) reduces the airway inflammation and remodeling in an experimental mouse model [J]. *Clin Immunol*, 2008, 129: 313-24.
- [14] Yang G, Volk A, Petley T, et al. Anti-IL-13 monoclonal antibody inhibits airway hyperresponsiveness, inflammation and airway remodeling [J]. *Cytokine*, 2004, 28: 224-32.
- [15] Kenyon NJ, Ward RW, Last JA. Airway fibrosis in a mouse model of airway inflammation [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003, 186: 90-100.