



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2020.07.015

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2020.07.015

• 临床基础研究 •

白藜芦醇对哮喘小鼠气道炎症及肺组织高迁移率族蛋白 B1 和基质金属蛋白酶-9 表达的影响

邹进晶 查干 王有娜 索涛 吴小军

[摘要] **目的** 探讨白藜芦醇(RES)对哮喘小鼠气道炎症及肺组织高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)、基质金属蛋白酶(MMP)-9 表达的影响。**方法** 将 36 只 C57BL/6 雌性小鼠随机分为对照组、哮喘组和 RES 干预组,每组各 12 只。采用卵清蛋白混合液腹腔注射致敏并雾化吸入激发建立哮喘小鼠模型。采用苏木素-伊红染色和过碘酸-雪夫染色观察小鼠气道炎症及黏液分泌情况;酶联免疫吸附试验检测肺泡灌洗液(BALF)中 HMGB1 和 MMP-9 蛋白表达水平;分别采用免疫组化染色、逆转录-聚合酶链反应检测肺组织中 HMGB1 和 MMP-9 蛋白、mRNA 表达水平。**结果** RES 干预组小鼠肺组织炎症病理学评分和基底膜周径标准化的 PAS⁺杯状细胞面积(Apas⁺/Pbm)均明显低于哮喘组($P < 0.05$)。哮喘组小鼠 BALF 中炎症细胞总数、嗜酸性粒细胞计数、巨噬细胞计数、淋巴细胞计数、HMGB1 及 MMP-9 表达水平均高于对照组($P < 0.05$),而 RES 干预组小鼠上述指标均低于哮喘组($P < 0.05$)。对照组小鼠肺组织中 HMGB1 和 MMP-9 蛋白及 mRNA 的表达较少,而哮喘组小鼠肺组织中的表达明显增多,但 RES 干预组小鼠肺组织中 HMGB1 和 MMP-9 蛋白及 mRNA 的表达水平均明显低于哮喘组($P < 0.05$)。**结论** RES 可减轻哮喘小鼠气道炎症和气道重塑,其可能机制为通过调节肺组织 HMGB1 和 MMP-9 的表达。

[关键词] 哮喘; 白藜芦醇; 高迁移率族蛋白 B1; 基质金属蛋白酶-9

Effects of resveratrol on airway inflammation and expression of high mobility group protein B1 and matrix metalloproteinase-9 in lung tissue of asthmatic mice Zou Jinjing*, Zha Gan, Wang Youna, Suo Tao, Wu Xiaojun. * Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

[Abstract] **Objective** To explore the effects of resveratrol on airway inflammation and expression of high mobility group protein B1 (HMGB1), matrix metalloproteinase (MMP)-9 in lung tissue of asthmatic mice. **Methods** Thirty-six C57BL/6 female mice were randomly divided into control group, asthma group and RES treated group, with 12 mice in each group. Asthmatic mice model was established by intraperitoneal injection of ovalbumin mixture to cause allergies and atomization inhalation of ovalbumin mixture to excite. Airway inflammation and mucus secretion condition were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining and iodine acid-schiff (PAS) staining. Expression levels of HMGB1 and MMP-9 protein in alveolar lavage fluid (BALF) were detected by enzyme linked immunosorbent assay. Expression levels of HMGB1 and MMP-9 protein, mRNA in lung tissue were examined by immunohistochemical staining and reverse transcription polymerase chain reaction respectively. **Results** Inflammatory pathology score and the area of goblet cells standardized by perimeter of basement membrane (A_{pas}⁺/P_{bm}) in RES treated group were significantly decreased than those in asthma group ($P < 0.05$). Counts of total inflammation cells, eosinophil cells, macrophage cells, lymphocytes, expression levels of HMGB1 and MMP-9 protein in BALF of asthma group were higher than those of control group ($P < 0.05$), while above indexes in RES treated group were lower than those in asthma group ($P < 0.05$). There was a low expression of HMGB1 and MMP-9 protein, mRNA in lung tissue of control group, while expression of above indexes significantly increased, but expression levels of HMGB1 and MMP-9 protein, mRNA in lung tissue of RES treated group were significantly lower than those of asthma group ($P < 0.05$). **Conclusion** RES can alleviate airway inflammation and airway remodeling in asthmatic mice, the possible mechanism is by regulating expression of HMGB1 and MMP-9 in lung tissue.

[Key words] Resveratrol; Asthma; High mobility group protein B1; Matrix metalloproteinase-9

哮喘是多种免疫活性细胞和细胞因子参与的一种慢性非特异性气道炎症性疾病^[1-2]。既往研究结果显示,辅助性 T 细胞(Th)1/Th2 和 Th17/调节性 T 细胞(Treg)反应失衡是哮喘免疫失衡的主要机制,然而其作用通路还不足以完全解释哮喘患者症状的持续存在^[3-4]。白藜芦醇(RES)是植物在环境恶化及受到病原攻击时产生的一种植物抗毒素。既往研究表明,RES 在哮喘^[5]、慢性阻塞性肺疾病^[6]、急性肺损伤^[7]及肺间质性病变^[8]等呼吸系统疾病中发挥重要作用。高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)是一种晚期炎症因子,已有研究证实其在维持哮喘气道炎症中发挥作用^[9]。基质金属蛋白酶(MMP)-9 通过促进细胞外基质(ECM)沉积和气道平滑肌细胞增殖、迁移,参与哮喘的气道重塑过程^[10]。我们通过检测 RES 对哮喘小鼠模型气道炎症反应及肺组织 HMGB1 和 MMP-9 表达的影响,探讨其影响哮喘气道炎症的机制,为支气管哮喘患者的治疗提供新思路 and 理论基础。

材料与方法

1. 材料:6~8 周龄 SPF 级 C57BL/6 雌性小鼠 36 只,体重约 20 g,购于武汉大学动物实验中心。鸡卵清蛋白(OVA)购于 Sigma 公司;免疫组化一抗购于美国 Gene Tex 公司;二抗及显色剂购于北京博奥森生物技术有限公司。逆转录试剂盒和聚合酶链反应(PCR)试剂盒购于 Transgene 公司;Trizol 总 RNA 提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于碧云天生物有限公司;ECL 发光液购于美国 Thermo Scientific 公司。实验仪器包括超声雾化器、实时定量 PCR 仪(ABI7500 型)、光学显微镜等。

2. 方法

(1) 动物分组和哮喘小鼠模型制作:将 36 只 C57BL/6 雌性小鼠随机分为对照组、哮喘组及 RES 干预组,每组各 12 只。哮喘小鼠模型制作:①致敏:于第 1 天、第 14 天予每只小鼠分别腹腔注射致敏液 0.2 ml (1 mg/ml OVA 0.1 ml 与 10 mg/ml 佐剂液态铝 0.1 ml 混合制备);②激发:于第 21~27 天将小鼠置于密闭容器(20 cm×40 cm×50 cm)中,以 10 mg/ml 的 OVA 溶液 10 ml 雾化吸入,每天 1 次,每次 30 min;同时,RES 干预组小鼠于激发前 1 h,采用 100 mg/kg 的 RES 腹腔注射进行干预;对照组和哮喘组小鼠腹腔注射等体积的磷酸盐缓冲液(PBS)。末次激发 24 h 后处死动物,进行标本采集。

(2) 肺组织标本制备:第 28 天断椎处死各组小鼠,并立即予 PBS 进行肺泡灌洗,收集 1 ml 肺泡灌洗液于 EP 管中,迅速取新鲜右肺组织置于 1.5 ml 的 EP

管中,置于 -80 ℃ 冰箱贮存。将取出的左肺组织置于 4% 甲醛溶液中,石蜡包埋固定切片后,行苏木素-伊红(HE)染色、过碘酸-雪夫(PAS)染色及免疫组化染色。

(3) HE 染色、PAS 染色及免疫组化染色:每只小鼠分别随机选取 3 张肺组织石蜡切片行 HE 和 PAS 染色。评分方法:两位独立的观察者在 200 倍显微镜下对支气管壁炎症细胞浸润及杯状细胞的增殖情况进行半定量评分,每张切片至少观察 4 个视野,评分标准:0 分:支气管壁及血管周围无炎症细胞浸润;1 分:支气管壁及血管周围有散在炎症细胞浸润;2 分:支气管壁及血管周围有 1~5 层炎症细胞浸润;3 分:支气管壁及血管周围有 >5 层炎症细胞浸润。采用 Image Pro Plus 6.0 软件分析气道上皮杯状细胞的数量及基底膜周径标准化的 PAS⁺杯状细胞面积(Apas⁺/Pbm)。每张石蜡切片也均进行免疫组化染色,观察炎症细胞中 HMGB1 和 MMP-9 蛋白的表达,采用积分光密度(IOD)反映目标蛋白的表达水平。

(4) 肺组织 HMGB1 和 MMP-9 mRNA 的逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测:采用 Trizol 法提取右肺组织总 RNA,采用逆转录试剂盒合成单链 cDNA,并设计目的基因引物。HMGB1 序列上游引物:5'-AAA-GAAGTTCAAGGACCCC-3',下游引物:5'-GCTCTGTAG-GCAGCAATAT-3',产物长度 234 bp;MMP-9 序列上游引物:5'-GCGTGTCTGGAGATTCGACT-3',下游引物:5'-TTTGAAACTCACACGCCAG-3',产物长度 167 bp;内参 GAPDH 上游引物:5'-ATGGGTCTGAACCACGAGA-3',下游引物:5'-CAGGGATGATGTTCTGGGCA-3',产物长度 229 bp;PCR 反应体系(20 μl):模板 cDNA 4 μl,PCR 上、下游引物(100 μM)各 0.4 μl,预混缓冲液(SYBR Green/Fluorescein qPCR Master)10 μl,双蒸水(ddH₂O)5.2 μl。反应条件:50 ℃ 2 min,95 ℃ 10 min;95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,40 个循环。每个样品重复 3 次,记录每次测定的 Ct 值,以 GAPDH 为内参,得出的数据采用 2^{-ΔΔCt}进行分析。

(5) 支气管肺泡灌洗液(BALF)中 HMGB1 和 MMP-9 蛋白水平检测:将保存在 -80 ℃ 冰箱中的 BALF 取出,于冰上复融后在 4 ℃ 下以 3 000 r/min 离心 10 min,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 HMGB1 和 MMP-9 蛋白水平。

3. 统计学处理:应用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用两独立样本 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1.3 组小鼠肺组织病理形态学比较:对照组小鼠

肺组织 HE 染色下见支气管结构排列规律,未见炎症细胞浸润(图 1A);PAS 染色下见支气管上皮细胞中几乎无杯状细胞(PAS⁺细胞)和黏液分泌(图 1B)。哮喘组小鼠肺组织 HE 染色下见气道壁明显增厚,肺泡融合,支气管壁和血管周围有大量炎症细胞浸润,以嗜酸性粒细胞为主(图 1C);PAS 染色下见支气管上皮细胞中杯状细胞(PAS⁺细胞)增殖及黏液分泌明显增多(图 1D)。与哮喘组比较,RES 干预组小鼠肺组织 HE 染色下见气道壁明显变薄、肺泡融合明显减少,支气管壁和血管周围炎症细胞明显减少(图 1E);PAS 染色下见支气管上皮细胞中杯状细胞(PAS⁺细胞)数量和黏液分泌明显减少(图 1F)。对照组、哮喘组和 RES 干预组小鼠肺组织炎症病理学评分分别为 0.33 ± 0.18 、 2.68 ± 0.39 、 1.51 ± 0.54 , Apas⁺/Pbm 分别为 0.41 ± 0.44 、 6.01 ± 1.28 、 3.54 ± 1.59 。RES 干预组小鼠肺组织炎症病理学评分和 Apas⁺/Pbm 均明显低于哮喘组($P < 0.05$)。

2.3 组小鼠肺组织中 HMGB1 和 MMP-9 蛋白免疫组化及 mRNA 检测结果比较:对照组小鼠肺组织中 HMGB1 和 MMP-9 蛋白及 mRNA 的表达较少,而哮喘组小鼠肺组织中的表达明显增多,但 RES 干预组 HMGB1 和 MMP-9 蛋白及 mRNA 的表达水平均明显低于哮喘组($P < 0.05$)。见图 2 和表 1。

表 1 3 组小鼠肺组织中 HMGB1 和 MMP-9 mRNA 及蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	HMGB1 mRNA	MMP-9 mRNA	HMGB1 蛋白	HMGB1 蛋白	MMP-9 蛋白
对照组	12	0.95 ± 0.06	1.09 ± 0.18	13.73 ± 1.50	13.73 ± 1.50	15.20 ± 0.85
哮喘组	12	2.47 ± 0.21^a	1.84 ± 0.18^a	97.53 ± 9.18^a	97.53 ± 9.18^a	79.57 ± 7.76^a
RES 干预组	12	1.84 ± 0.41^b	1.47 ± 0.10^b	47.15 ± 3.09^b	47.15 ± 3.09^b	32.84 ± 4.24^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与哮喘组比较,^b $P < 0.05$

3.3 组小鼠 BALF 中炎症细胞计数、HMGB1 及 MMP-9 蛋白表达水平比较:哮喘组小鼠 BALF 中炎症细胞总数、嗜酸性粒细胞计数、巨噬细胞计数、淋巴细胞计数、

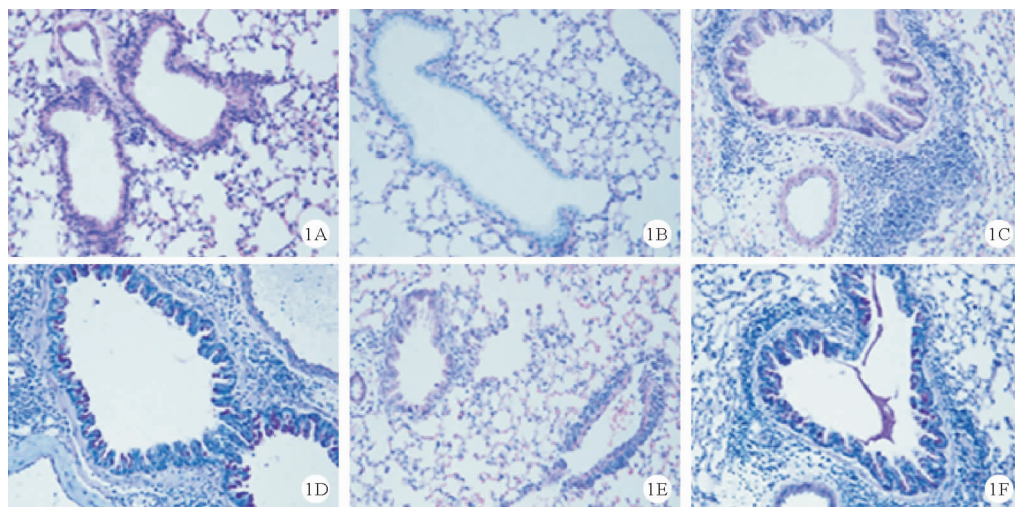


图 1 3 组小鼠肺组织病理形态学比较($\times 200$, A:对照组, HE 染色; B:对照组, PAS 染色; C:哮喘组, HE 染色; D:哮喘组, PAS 染色; E:RES 干预组, HE 染色; F:RES 干预组, PAS 染色)

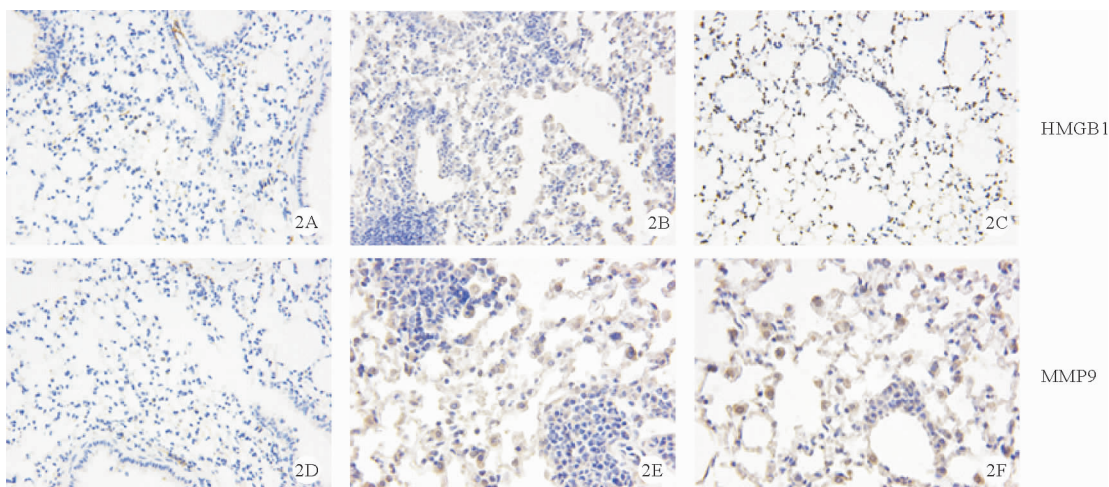


图 2 3 组小鼠肺组织中 HMGB1 和 MMP-9 蛋白免疫组化结果($\times 200$, A、D:对照组; B、E:哮喘组; C、F:RES 干预组)

表 2 3 组小鼠 BALF 中炎症细胞计数、HMGB1 及 MMP-9 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	炎症细胞总数	嗜酸性粒细胞计数	巨噬细胞计数	淋巴细胞计数	中性粒细胞计数	HMGB1 蛋白	MMP-9 蛋白
对照组	12	1.932 ± 0.271	0.300 ± 0.167	0.867 ± 0.108	0.188 ± 0.018	0.026 ± 0.008	9.856 ± 2.208	25.623 ± 6.707
哮喘组	12	5.620 ± 0.290 ^a	0.820 ± 0.051 ^a	3.900 ± 0.290 ^a	1.013 ± 0.077 ^a	0.187 ± 0.026	53.172 ± 17.221 ^a	365.142 ± 81.057 ^a
RES 干预组	12	3.150 ± 0.356 ^b	0.522 ± 0.313 ^b	2.750 ± 0.165 ^b	0.530 ± 0.054 ^b	0.078 ± 0.015	41.132 ± 10.910 ^b	221.332 ± 65.481 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与哮喘组比较,^b $P < 0.05$

HMGB1 及 MMP-9 表达水平均高于对照组($P < 0.05$); RES 干预组小鼠肺泡灌洗液中炎症细胞总数、嗜酸性粒细胞计数、巨噬细胞计数、淋巴细胞计数、HMGB1 及 MMP-9 表达水平均低于哮喘组($P < 0.05$)。见表 2。

讨 论

既往研究结果显示,RES 可减轻慢性哮喘小鼠气道炎症,并改善其气道重塑、降低气道高反应性、改善肺功能^[11]。Lee 等^[12]的研究表明,RES 干预哮喘小鼠模型组血清和 BALF 中 Th2 相关细胞因子分泌明显减少,气道炎症细胞数量及气道黏液分泌明显减少。本研究结果显示,与哮喘组比较,RES 干预组小鼠支气管壁明显变薄,支气管壁及血管周围炎症细胞也明显减少,BALF 中炎症细胞、支气管上皮杯状细胞数量及分泌的黏液也明显减少。因此,从肺组织炎症病理学评分和 Apas⁺/Pbm 角度而言,RES 明显减轻哮喘小鼠气道炎症,但其具体机制尚未明确。

HMGB1 广泛存在于哺乳动物细胞内,当机体免疫炎症反应被激活时,细胞内的 HMGB1 释放到细胞外^[13]。Ma 等^[14]的研究表明,细胞外 HMGB1 参与 Th2 为主导的免疫炎症反应,诱导哮喘小鼠模型 BALF 中炎症细胞数量明显增加,同时细胞外 HMGB1 水平与哮喘的严重程度呈正相关,且该研究还认为 HMGB1 是激素抵抗型哮喘的潜在病因之一。Hou 等^[15]的研究也表明,哮喘患者肺活检标本及诱导痰液中 HMGB1 水平明显升高,且与 BALF 中性粒细胞数量呈正相关,与肺功能呈负相关。有研究表明,给予抗 HMGB1 功能性抗体干预后哮喘小鼠模型 HMGB1 的表达明显减少,哮喘症状明显减轻^[16]。本研究结果显示,与对照组比较,哮喘组小鼠 BALF 中 HMGB1 蛋白及肺组织中 HMGB1 蛋白和 mRNA 表达水平明显升高;而 RES 干预组小鼠 BALF 中 HMGB1 蛋白及肺组织中 HMGB1 蛋白和 mRNA 表达水平明显低于哮喘组。因此,我们推测 RES 可能通过降低 HMGB1 的表达抑制哮喘气道炎症的发生。

MMP-9 是与哮喘气道重塑关系最密切的 MMPs 成员。Royce 等^[17]的研究发现,RES 可通过抑制上皮下游原沉积减轻慢性哮喘小鼠气道重塑。本研究结果显示,与哮喘组比较,RES 干预组小鼠 BALF 中 MMP-9 蛋白及肺组织中 MMP-9 蛋白和 mRNA 表达水平明显

低于哮喘组。因此,我们推测 RES 可能通过调节 MMP-9 表达抑制哮喘小鼠气道重塑。

综上所述,RES 可减轻哮喘小鼠气道炎症和重塑,其可能机制为通过调节 HMGB1 和 MMP-9 的表达。

参 考 文 献

- [1] Posada-Duque RA, Barreto GE, Cardona-Gomez GP. Protection after stroke: cellular effectors of neurovascular unit integrity [J]. Front Cell Neurosci, 2014, 8: 231-239.
- [2] 靳钰,唐昊. 急性哮喘小鼠 CD4⁺T 淋巴细胞中细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原-4 与气道重塑的相关性 [J]. 临床内科杂志, 2018, 35 (9): 622-625.
- [3] Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease [J]. Lancet, 2008, 372 (9643): 1107-1119.
- [4] 欧灵,谢增辉,方萍,等. 支气管哮喘合并佝偻病患儿血清维生素 D 水平与辅助性 T 细胞 1/辅助性 T 细胞 2 和辅助性 T 细胞 17/调节性 T 细胞平衡的关系 [J]. 中国医药, 2018, 13 (5): 751-754.
- [5] Tenero L, Piazza M, Zanon L, et al. Antioxidant supplementation and exhaled nitric oxide in children with asthma [J]. Allergy Asthma Proc, 2016, 37 (1): e8-e13.
- [6] Liu XJ, Bao HR, Zeng XL, et al. Effects of resveratrol and genistein on nuclear factor-kappaB, tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase 9 in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Mol Med Rep, 2016, 13 (5): 4266-4272.
- [7] 赵光举,李声琴,洪广亮,等. 白藜芦醇对百草枯中毒小鼠肺损伤的干预及机制 [J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28 (1): 33-37.
- [8] Fagone E, Conte E, Gili E, et al. Resveratrol inhibits transforming growth factor-beta-induced proliferation and differentiation of ex vivo human lung fibroblasts into myofibroblasts through ERK/Akt inhibition and PTEN restoration [J]. Exp Lung Res, 2011, 37 (3): 162-174.
- [9] Ma L, Zeng J, Mo B, et al. High mobility group box 1: a novel mediator of Th2-type response-induced airway inflammation of acute allergic asthma [J]. J Thorac Dis, 2015, 7 (10): 1732-1741.
- [10] Piiril P, Lauhio A, Majuri ML, et al. Matrix metalloproteinases-7, -8, -9 and TIMP-1 in the follow-up of diisocyanate-induced asthma [J]. Allergy, 2010, 65 (1): 61-68.
- [11] Aich J, Mabalirajan U, Ahmad T, et al. Resveratrol attenuates experimental allergic asthma in mice by restoring inositol polyphosphate 4 phosphatase (INPP4A) [J]. Int Immunopharmacol, 2012, 14 (4): 438-443.
- [12] Lee M, Kim S, Kwon O, et al. Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of resveratrol, a polyphenolic stilbene, in a mouse model of allergic asthma [J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9 (4): 418-424.
- [13] Lee HY, Kim IK, Yoon HK, et al. Inhibitory Effects of Resveratrol on Airway Remodeling by Transforming Growth Factor-beta/Smad Signaling Pathway in Chronic Asthma Model [J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2017, 9 (1): 25-34.
- [14] Ma L, Zeng J, Mo B, et al. High mobility group box 1: a novel mediator of Th2-type response-induced airway inflammation of acute allergic asthma [J]. J Thorac Dis, 2015, 7 (10): 1732-1741.
- [15] Hou C, Kong J, Liang Y, et al. HMGB1 contributes to allergen-induced airway remodeling in a murine model of chronic asthma by modulating airway inflammation and activating lung fibroblasts [J]. Cell Mol Immunol, 2015, 12 (4): 409-423.
- [16] Yao L, Zhao H, Tang H, et al. Chicken IgY facilitates allergic airway inflammation in a chemical-induced murine asthma model by potentiating IL-4 release [J]. Toxicol Lett, 2015, 239 (1): 22-31.
- [17] Royce SG, Dang W, Yuan G, et al. Resveratrol has protective effects against airway remodeling and airway hyperactivity in a murine model of allergic airways disease [J]. Pathobiol Aging Age Relat Dis, 2011, 1: 7134.

(收稿日期: 2019-06-10)

(本文编辑: 周三凤)