

基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.09.005

寒燥对慢性阻塞性肺病模型层粘连蛋白及透明质酸含量的影响

高 振¹,李凤森¹,哈木拉提·吾甫尔²,荆 晶¹,徐 丹¹

(1. 新疆医科大学附属中医医院国家中医临床研究基地研究部,乌鲁木齐 830000;

2. 新疆医科大学中医学院中医系中西医结合教研室,乌鲁木齐 830054)

【摘要】目的:了解新疆干燥寒冷环境(寒燥)对慢性阻塞性肺病(Chronic obstructive pulmonary disease,COPD)支气管肺泡灌洗液(Bronchial alveolar lavage fluid,BALF)中层粘连蛋白和透明质酸含量的影响,为新疆寒燥环境下 COPD 特点的揭示提供参考。方法:利用气管滴注弹性蛋白酶结合熏烟的方法建立 COPD 模型,气管滴注弹性蛋白酶、熏烟结合寒燥环境应激的方法建立 COPD 寒燥模型,然后利用酶联免疫吸附测定(Enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)法测定各组大鼠血清中层粘连蛋白含量,BALF 中层粘连蛋白和透明质酸含量。结果:血清层粘连蛋白含量 COPD 寒燥组高于对照组($P < 0.01$),COPD 组含量有高于对照组的趋势,但差异无统计学意义;BALF 中层粘连蛋白含量 COPD 寒燥组高于对照组($P < 0.05$),COPD 组含量有高于对照组的趋势,但差异无统计学意义;BALF 中透明质酸含量 COPD 寒燥组和 COPD 组均高于对照组($P < 0.05$),但 COPD 寒燥组和 COPD 组比较差异无统计学意义。结论:经过 90 d 的建模,2 组模型肺部表现均符合 COPD 的病理特征,但其血清及 BALF 中层粘连蛋白含量则不尽相同,这可能是西北寒燥环境导致 COPD 地域化发病的可能机理之一。

【关键词】慢性阻塞性肺病;寒燥环境;层粘连蛋白;透明质酸

【中国图书分类法分类号】R 339.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-02-10

Effect of cold and dry environment on hyaluronan and laminin in the model of chronic obstructive pulmonary disease

GAO Zhen¹,LI Fengsen¹,HALMURAT·Upur²,JING Jing¹,XU Dan¹

(1. Research Department,National Clinical Research Base of Traditional Chinese Medicine,the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital,Xinjiang Medical University;2. Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Teaching and Research Section,College of Traditional Chinese Medicine,Xinjiang Medical University)

【Abstract】Objective:To reveal the effect of cold and dry environment on hyaluronan and laminin in the model of chronic obstructive pulmonary disease(COPD) so as to provide references for treating COPD with local peculiarity of Xinjiang(northwest of China). Methods:COPD model was established by dripping porcine pancreatic elastase(PEE) in the trachea combined with cigarette smoking and model of COPD cold-dryness was also set up by dripping PEE in the trachea,cigarette smoking combined with cold and dry environment. Bronchial alveolar lavage fluid(BALF) and serum were taken to detect contents of hyaluronan and laminin in rat's BALF and laminin in rat's serum of each group with enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). The data were analyzed statistically with software SPSS. Results:The results showed that laminin content in serum was significantly higher in COPD cold-dryness group than in control group($P < 0.01$),but the difference was of no statistical significance between COPD group and control group. Laminin content in BALF was significantly higher in COPD cold-dryness group than in control group($P < 0.05$),but the difference was of no statistical significance between COPD group and control group. Conclusions:The lung performances of COPD model and COPD cold-dryness model are in accordance with the physiological characteristics of COPD,but laminin contents in serum and BALF are different,which may be one of the pathogenesis of COPD under the cold and dry environment of northwest china.

【Key words】chronic obstructive pulmonary disease;cold and dry environment;laminin;hyaluronan

慢性阻塞性肺疾病(Chronic obstructive pulmonary disease,COPD)是一种具有气流受限特征的

可以预防 and 治疗的疾病,气流受限不完全可逆、呈进行性发展,是目前世界上第 4 大致死性疾病。我国在针对 7 个地区 20 245 位成年人进行调查后发现,40 岁以上人群 COPD 患病率为 8.2%^[1],其患病率之高十分惊人。其发病机制复杂,至今尚未完全明确,气道重塑是引起不可逆性气流阻塞的主要原

作者介绍:高 振(1981-),男,主治医师,在读博士,

研究方向:慢性阻塞性肺疾病中西医结合临床及基础。

通信作者:李凤森,男,教授,Email:fengsen602@163.com。

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(编号:2012211B35)。

因。透明质酸、层粘连蛋白均是纤维结缔组织的主要成分,而纤维结缔组织的异常增生是细胞外基质各成分的过度沉积及分布异常、纤维增生和降解不平衡的结果。透明质酸是细胞外机制中糖胺聚糖的主要成分。已经有研究指出层粘连蛋白与很多肺脏疾患的发生有关^[2]。前期研究发现 COPD 时层粘连蛋白水平升高,在一定程度上反映了肺组织损伤、继发肺间质纤维化的病理过程,是 COPD 继发肺间质纤维化的有价值的指标,对判断预后有一定的临床意义^[3]。新疆地处中国西北,远离海洋,沙漠广布,每年需供暖 6 个月以上,气候干燥寒冷,本研究旨在通过实验探讨寒燥环境对 COPD 发病过程中透明质酸和层粘连蛋白分泌的影响,为新疆环境下 COPD 特点的揭示提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性 Wistar 大鼠 21 只,体重(150±20) g,新疆医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(新)2003-001。

1.2 仪器与试剂

FLI-2000H 型人工气候箱(日本 EYELA 公司,NO:10908061),BS-1105 型电子天平(北京赛多科斯天平有限公司),雪莲牌香烟(新疆卷烟厂出品,焦油量 12 mg,烟气烟碱量 1.0 mg,烟气 CO 量 13 mg),大鼠层粘连蛋白 ELISA 试剂盒、大鼠透明质酸 ELISA 试剂盒(均由 Benter Medsystems 生产)。

1.3 分组与造模

21 只 Wistar 大鼠适应性喂养 2 d 后按照随机数字表法随机分为 3 组,即 COPD 寒燥组、COPD 组、对照组,每组 7 只。造模方法参照课题组前期研究方法^[4]进行。

1.4 观测指标

1.4.1 肺部病理标本制作 组织剪剪破左心房后,以静脉输液器经右心室肺动脉灌注,先用适量生理盐水灌注,将肺内血管床中的残留血液冲洗干净,再用 4%多聚甲醛灌注,灌注

速度先快后慢,每只大鼠固定 20 min 后,截断右侧肺门组织,取出右肺,在垂直于支气管的肺矢状面最大周径处取材,取厚约 5 mm 组织,剪成面积为 1.5 cm² 时的小块,浸入 4%多聚甲醛中固定待用。

1.4.2 血清及支气管肺泡灌洗液(Bronchial alveolar lavage fluid, BALF)取材 经下腔静脉抽血离心,取其上清液移入无菌瓶内。抽血处死大鼠后,将气管与双肺暴露,做气管下部横行切口,对右主支气管予以结扎,用接 12 号针头(尖端磨平)的注射器经气管切口向左肺缓慢灌注无菌生理盐水 3 ml,每次灌注后立即回收灌注液(回收率为 60%~70%),并经纱布过滤,重复 3 次。将所取得的 BALF 离心,取其上清液移入无菌瓶内,并放在-70℃的超低温冰箱中待测。检测时取血清和 BALF 采用双抗体夹间接 ELISA 法测定层粘连蛋白及透明质酸含量,严格按照试剂盒说明之步骤操作。

1.5 统计方法

实验数据采用 SPSS 11.5 统计软件分析,结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,凡符合正态分布和方差齐的数据采用单因素方差分析(ANOVA),多组间两两比较采用 LSD 检验,若方差不齐则用 Tamhane 方法进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组肺组织病理形态比较

COPD 组见大片状肺大泡,有充血现象(图 1A);COPD 寒燥组见大片肺大泡,有充血现象(图 1B);对照组小鼠肺泡大小较一致,肺泡壁厚度正常,外周未见炎性细胞浸润(图 1C)。

2.2 各组层粘连蛋白和透明质酸含量比较

在实验过程中,COPD 组和 COPD 寒燥组在第 1 次染毒后第 1 天各死亡 1 只,对照组在实验进行的第 40 天死亡 1 只。故而每组纳入检测的大鼠为 6 只。血清层粘连蛋白含量 COPD 寒燥组高于对照组($P < 0.01$),COPD 组高于对照组,但差异无统计学意义;同样 BALF 中层粘连蛋白含量 COPD 寒燥组高于对照组($P < 0.05$),COPD 组和对照组相当;BALF 中透明质酸含量 COPD 寒燥组和 COPD 组均高于对照组,但 COPD 寒燥组和 COPD 组比较差异无统计学意义,具体见表 1 和表 2。

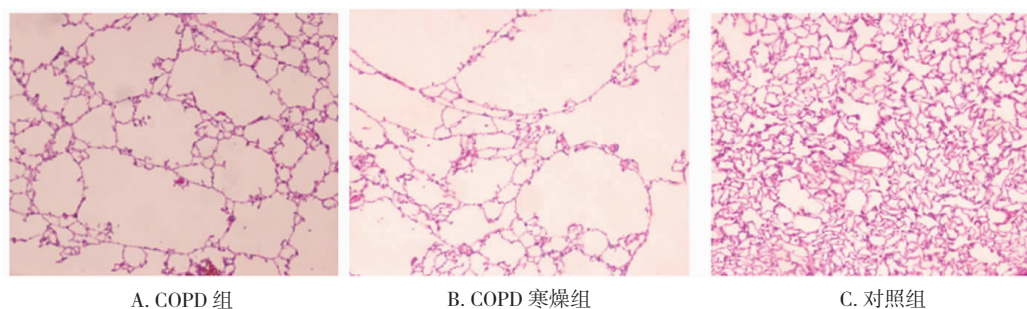


图 1 各组肺组织病理形态比较(HE 染色,100×)

Fig.1 Histopathological images of pulmonary tissues of rats among different groups (HE staining, 100×)

表 1 3 组血清中层粘连蛋白含量比较 (5 倍稀释)

Tab.1 Comparison of laminin in serum among three groups

(5 times diluted)		
组别	例数 (n)	层粘连蛋白
COPD寒燥组	6	295.98 ± 50.71*
COPD组	6	259.47 ± 57.67
对照组	6	203.51 ± 30.99

注:*, 和对照组相比, $F=5.693$, $P=0.004$

表 2 3 组 BALF 中层粘连蛋白及透明质酸含量比较

Tab.2 Comparison of laminin and hyaluronan in BALF among

three groups			
组别	例数 (n)	层粘连蛋白	透明质酸
COPD寒燥组	6	18.20 ± 1.29*	408.35 ± 81.12*
COPD组	6	17.40 ± 1.13	397.19 ± 60.20*
对照组	6	16.28 ± 0.95	320.51 ± 21.61

注:*, 和对照组相比, 层粘连蛋白 $F=4.360$, $P=0.010$; 透明质酸, $F=3.858$; COPD 寒燥组和对照组相比, $P=0.042$; COPD 组和对照组相比, $P=0.022$

3 讨 论

COPD是一种以进行性气流受限且不完全可逆为特点的慢性肺部疾病^[5],我国在对 7 个地区超过 2 万名成年人进行调查后发现,40 岁以上人群 COPD 患病率为 8.2%^[6],且呈增加趋势,预计很快将成为世界第 3 大致死原因^[7,8],给社会和家庭带来沉重负担。目前 COPD 的发病机制包括周围环境污染尤其是吸烟导致局部炎症反应,这些最终发展为气流阻塞^[9]。与常人相比,COPD 患者小气道病理表现出截然不同的结构改变(气道重塑)^[10],随着研究的深入,发现气道重塑是引起不可逆性气流阻塞的主要原因^[11,12]。病理学研究提示气道重塑主要表现为平滑肌增生肥大及以胶原为主的细胞外基质过度沉积,从而造成气道壁增厚、变形、狭窄、僵硬,导致气流受限^[13,14]。本研究模型肺部病理表现与之相符,且寒燥组在出现黏膜下以淋巴细胞增多为主炎症细胞浸润的同时有上皮细胞纤毛脱落;2 组模型肺部均符合 COPD 的病理表现,但难以从切片看出差异。

COPD 寒燥组无论 BALF 还是血清中层粘连蛋白均较正常对照组升高,COPD 组虽从值上有增高趋势,但和对照组相比差异没有统计学意义;COPD 寒燥组、COPD 组 BALF 中透明质酸含量均高于对照组,COPD 寒燥组和 COPD 组相比差异无统计学意义。但是,从本研究结果不难看出,经过 90 d 的建模,虽然 2 组肺部均出现了 COPD 的病理特征,但是

其微观机理却存在着某种程度的不同,即层粘连蛋白无论是 BALF 中还是血清中 COPD 寒燥组均明显高于对照组,COPD 组虽有升高的趋势,但差异无统计学意义。

透明质酸、层粘连蛋白均是纤维结缔组织的主要成分,而纤维结缔组织的异常增生是由于细胞外基质各成分的过度沉积及分布异常、纤维增生和降解不平衡的结果。透明质酸是组织修复所必须的结构,也是成纤维细胞发挥功能及与其他细胞信息传递的场所^[15]。COPD 发病机制中的肺气肿和气道重塑与细胞外基质的损伤和无效修复有关,透明质酸是细胞外基质的组成部分,它在 COPD 患者痰中是显著升高的^[16]。层粘连蛋白正常情况下分布于血管、胆管的基底膜中,其升高是病变累及血管和胆管基底膜的一种指标。它的增多表明上皮细胞的损伤破坏,不断有新的细胞生长修复和增生,导致上皮增厚。COPD 组血清及 BALF 中层粘连蛋白显著增高,表明有过多的层粘连蛋白生成并沉积于肺组织,同时释放入血和支气管上皮衬液,参与上皮和内皮细胞的修复和过度增生^[17]。

新疆地处中国西北,气候寒燥。寒燥作为一种应激源可以对多种疾病的发生发展产生影响,尤其是肺部疾病。前期研究显示寒燥可以影响小鼠的免疫功能^[18]和下丘脑-垂体-肾上腺轴的功能^[19],并对 COPD 模型的全身炎症因子产生影响^[4]。本研究提示 COPD 气道中存在细胞外基质成分的过度沉积或分布异常,而寒燥可以加重这种紊乱状态,增加气道重塑的可能性。同时 COPD 组血清与 BALF 中层粘连蛋白含量有着同步升高的趋势,提示肺内层粘连蛋白的变化可一定程度上在血清中反映出来。

4 结 论

经过 90 d 的建模,2 组肺部均出现了 COPD 的病理特征,但是其内在的微观机制却不尽相同,表现在血清和 BALF 中层粘连蛋白的含量有所不同,这可能是西北寒燥环境导致 COPD 方域化发病的可能机理之一。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组.慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2007 年修订版)[J].中华结核和呼吸杂志,2007,30(1):8-17.

- COPD Group of Respiratory Disease Branch in Chinese Medical Association. The guideline on diagnosis and treatment of chronic obstructive pulmonary diseases (2007 revised edition)[J].Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Disease, 2007, 30(1): 8-17.
- [2] 高 锋,孔宪涛,王笑利,等.细胞外间质成分与肝病关系的研究[J].中华内科杂志, 1994, 33(2): 109-112.
- Gao F, Kong X T, Wang X L, et al. The extracellular matrix and liver disease: a study with enzymoimmunological assay[J].Chinese Journal of Internal Medicine, 1994, 33(2): 109-112.
- [3] 陈绍平,杨德元.慢性阻塞性肺病时血清层粘连蛋白改变的临床意义[J].川北医学院学报, 1997, 12(1): 19-20.
- Chen S P, Yang D Y. Clinical significance of serum laminin in chronic obstructive pulmonary disease[J].Journal of North Sichuan Medical College, 1997, 12(1): 19-20.
- [4] 李凤森,高 振,荆 晶,等.慢性阻塞性肺疾病西北寒燥证模型全身炎症反应状态研究[J].科技导报, 2011, 29(18): 65-68.
- Li F S, Gao Z, Jing J, et al. Systemic inflammatory response in cold dry syndrome of chronic obstructive pulmonary disease model[J].Science & Technology Review, 2011, 29(18): 65-68.
- [5] Barnes P J, Shapiro S D, Pauwels R A. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms[J].Eur Respir J, 2003, 22(4): 672-688.
- [6] 钟南山.慢性阻塞性肺疾病在中国[J].中国实用内科杂志, 2011, 31(5): 321-322.
- Zhong N S. Chronic obstructive pulmonary disease in China[J].Chinese Journal of Practical Internal Medicine, 2011, 31(5): 321-322.
- [7] Pauwels R A, Buist A S, Calverley P M, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO global initiative for chronic obstructive lung disease (GOLD) workshop summary[J].Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(5): 1256-1276.
- [8] Murray C J, Lopez A D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: global burden of disease study[J].Lancet, 1997, 349(9064): 1498-1504.
- [9] MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease[J].Proc Am Thorac Soc, 2005, 2(4): 290-291.
- [10] Jeffery P K. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J].Proc Am Thorac Soc, 2004, 1(3): 176-183.
- [11] Jeffery P K. Structural and inflammatory changes in COPD: a comparison with asthma[J].Thorax, 1998, 53(2): 126-136.
- [12] Tiddens H, Silverman M, Bush A. The role of inflammation in airway disease remodeling[J].Am J Crit Care Med, 2000, 162(2 pt 2): s7-10.
- [13] Elias J A, Zhou Z, Chupp G, et al. Airway remodeling in asthma[J].J Clin Invest, 1999, 104(8): 1001-1006.
- [14] Postma D S, Kerstjens H A. Characteristics of airway hyperresponsiveness in asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J].Am J Respir Crit Care Med, 1998, 158(5 pt 3): s187-192.
- [15] 董碧蓉,周 静,王曾礼.慢性阻塞性肺疾病患者胶原成份改变的临床意义[J].中华结合和呼吸杂志, 1995, 18(5): 301.
- Dong B R, Zhou J, Wang Z L. The change of collagen contents and its clinical significance in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J].Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 1995, 18(5): 301.
- [16] Dentener M A, Vernooy J H, Hendriks S, et al. Enhanced levels of hyaluronan in lungs of patients with COPD: relationship with lung function and local inflammation[J].Thorax, 2005, 60(2): 114-119.
- [17] 宋一平,崔德健,茅培英,等.慢性阻塞性肺疾病大鼠模型气道重塑及生长因子的研究[J].中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(5): 286.
- Song Y P, Cui D J, Mao P Y, et al. Study on pathological changes and the potential role of growth factors in the airway wall remodeling of COPD rat models[J].Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2001, 24(5): 286.
- [18] 高 振,阿地力江,哈木拉提·吾甫尔.西北寒燥证证候模型免疫功能紊乱的研究[J].中华中医药杂志, 2010, 25(8): 1225-1228.
- Gao Z, Adilijiang, Halmurat·Upur. Research of immune function disorder of northwest dry and cold syndrome[J].China Journal of TCM and Pharmacy, 2010, 25(8): 1225-1228.
- [19] 高 振,胡汉华,刘莹莹,等.西北寒燥证证候模型下丘脑-垂体-肾上腺轴紊乱状态研究[J].中医杂志, 2010, 51(10): 929.
- Gao Z, Hu H H, Liu Y Y, et al. Study on Hypothalamus-pituitary-adrenal axis disordered state in the cold dry syndrome models in northwest China[J].Journal of Traditional Chinese Medicine, 2010, 51(10): 929.

(责任编辑:冉明会)

《重庆医科大学学报》

欢迎赐稿、订阅

网址:cyxb.alljournals.ac.cn

邮发代号:78-132