文章编号:1000-5404(2008)03-0213-03

论著

辛伐他汀对大鼠气道黏液高分泌的影响和机制研究

王海霞,孙 贝,李继琼,王 洵,陈 磊,汪 涛,徐 丹,文富强 (四川大学华西医院呼吸内科,成都 610041)

摘 要:目的 了解辛伐他汀对丙烯醛引起的气道黏液高分泌的作用及其可能的机制。方法 大鼠雾化吸入丙烯醛,建立气道黏液高分泌模型。将42只雄性SD大鼠按随机数字表法分为7组:对照组(A组)、辛伐他汀自身对照组(B组)、模型组(C组)、低剂量辛伐他汀组(D组)、中剂量辛伐他汀组(E组)、高剂量辛伐他汀组(F组)和甲羟戊酸组(G组),每组6只。分别用阿辛蓝-过碘酸雪夫(AB-PAS)和免疫组化染色检测气道黏蛋白和黏蛋白5ac(mucin5ac,MUC5ac)的表达。RT-PCR检测MUC5ac mRNA的表达。结果 丙烯醛刺激可以使大鼠气道黏蛋白、MUC5ac蛋白和mRNA表达增高,使支气管肺泡灌洗液中巨噬细胞数增多。结论 辛伐他汀可以抑制丙烯醛所致的气道黏液高分泌,甲羟戊酸可以部分逆转辛伐他汀的作用,其机制可能是通过甲羟戊酸途径减少巨噬细胞在肺中的浸润。

关键词:气道黏液高分泌;辛伐他汀;丙烯醛;甲羟戊酸
中图法分类号:R322.3;R329.25;R974 文献标识码:A

Effect of simvastatin on airway mucus hypersecretion in rats and its molecular mechanism

WANG Hai-xia, SUN Bei, LI Ji-qiong, WANG Xun, CHEN Lei, WANG Tao, XU Dan, WEN Fu-qiang (Department of Respiratory Diseases, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To explore the effect of simvastatin on airway mucus hypersecretion in rats. Methods Rat airway mucus hypersecretion was induced by acrolein. Forty-two male SD rats were randomly divided into 7 groups, with 6 rats in each group. The rats in groups D, E, F were intragastrically administered simvastatin (5, 10, 20 mg/kg respectively) 1 d before spray atomization of acrolein once a day for 12 d and those in group G were simultaneously given 20 mg/kg simvastatin and 20 mg/kg mevalonate intraperitoneally. The rats in groups A and B received no spray atomization of acrolein, and those in group B were given 20 mg/kg simvastatin intragastically once a day, which both served as control. Mucin and mucin5ac were detected with Alcian blue-periodic acid sthiff and immunohistochemistry, and mucin5ac mRNA by RT-PCR. Results Acrolein significantly induced the expression of mucin5ac mRNA and protein in bronchial epithelium, and increased the concentration of mucin and macrophage number in BALF. Simvastatin significantly suppressed bronchial mucin5ac expression and reduced the number of macrophages and the concentration of mucin. The effect of simvastatin can be partly reversed by mevalonate. Conclusion Simvastatin inhibits airway mucus hypersecretion induced by acrolein, which might be related to the reduction of macrophage infiltration through mevalonic acid pathway.

Key words: airway mucus hypersecretion; simvastatin; acrolein; mevalonate

气道黏液高分泌是气道慢性炎症性疾病(如慢性阻塞性肺疾病、支气管哮喘等)的重要特征[1]。黏蛋白分泌异常,会导致气道阻塞、细菌定植,使疾病加重。他汀类药物是一类有效减低总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇的调脂药物,在临床广泛应用于血脂紊乱的治疗,其作用机制是通过抑制3-羟基-3-甲基-甲戊二酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶,影响甲羟戊酸的合成。而甲羟戊酸作为底物可进一步合成胆固醇和类异戊二烯终产物。有研究表明,类异戊二烯化合物参与一些蛋白的翻译后修饰,从而影响细胞内信号转导,发挥除调脂以外的其他重要作用(如抗炎等)[2]。本研究通过建立大鼠气道黏液高分泌模型,旨在探索他汀类药物对黏液高分泌的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF级雄性SD大鼠42只,8~10周龄,体质量250~

基金项目:国家杰出青年基金(30425007);国家自然科学基金(30370627)
Supported by the National Science Fund for Young Distinguished Scholars (30425007) and the National Natural Science Foundation of China (30370627)
作者简介:王海霞,女,山东省青岛市人,硕士研究生,主要从事慢性阻塞性肺疾病方面的研究。电话:(028)85440934,E-mail:whxtiti@126.com
通信作者:文富强,电话:(028)85164087,E-mail:wenfuqiang@126.com
收稿日期:2007-06-06;修回日期:2007-09-05

280 g，购于四川大学实验动物中心。主要试剂：丙烯醛由江苏昆山市化学试剂厂生产；辛伐他汀（商品名舒降之）购自杭州默沙东公司；甲羟戊酸购自美国 Sigma 公司；小鼠抗大鼠 MUC5ac 单克隆抗体购自美国 Neomarkers 公司；免疫组化染色 S-P 试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立和分组 将动物按随机数字表法分为 7 组，分别为对照组（A 组）、辛伐他汀自身对照组（B 组）、模型组（C 组）、低剂量辛伐他汀（D 组）、中剂量辛伐他汀组（E 组）、高剂量辛伐他汀组（F 组）和甲羟戊酸组（G 组），每组 6 只。C、D、E、F、G 组按 Borchers 等[3]的方法制作大鼠气道黏液高分泌模型，即用 3.0 ml/m^3 丙烯醛液雾化，6 h/d，每周 5 d，第 12 天时结束。D、E、F 组丙烯醛液雾化前 1 d 开始分别以辛伐他汀 5、10、20 mg/kg 和 20 mg/kg 灌胃，持续 12 d。G 组在给予辛伐他汀（20 mg/kg）的同时给予甲羟戊酸 20 mg/kg 腹腔注射，1 次/d。A 组和 B 组不用丙烯醛液雾化吸入。B 组仅给予辛伐他汀 20 mg/kg 灌胃，1 次/d。

1.2.2 标本收集及处理 丙烯醛液雾化 12 d 后，以 10% 水合氯醛（0.3 ml/100 g）腹腔注射麻醉大鼠。取右中肺置于 4% 中性甲醛固定。左肺以 0.9% 生理盐水 3 ml 分 3 次行支气管肺泡灌洗，支气管肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid，BALF）回收率在 90% 以上。BALF 混匀后计细胞总数，离心后细胞沉渣涂片，行瑞氏染色，计数 200 个细胞，进行细胞分类计数。

1.2.3 阿辛蓝-过碘酸雪夫（AB-PAS）染色检测杯状细胞黏蛋白分泌 组织切片上选择同等大小的支气管，黏膜上皮细胞计数大于 500 个，分别计算染色阳性颗粒的杯状细胞占整个黏膜上皮细胞的百分数（即阳染率）。

$$\text{阳染率} = \frac{\text{阳染细胞数}}{500} \times 100\%$$

1.2.4 MUC5ac 免疫组化检测 常规脱蜡至水，高压修复，羊血清封闭，小鼠抗大鼠 MUC5ac 1∶100 37 ℃孵育 1 h 后，4 ℃冰箱过夜，生物素标记的二抗 37 ℃孵育 1 h，辣根酶标记链霉卵白素 37 ℃30 min，DAB 显色。Image-Pro Plus 5.0 图像分析系统进行阳染区光密度值分析。

1.2.5 MUC5ac mRNA 的 RT-PCR 检测 MUC5ac 上游：5′-GCTCATCCTAAGCGACGTCT-3′，下游：5′-GGGGGCATA-ACT-TCTCTTGG-3′，扩增片段为 500 bp。β-actin 上游：5′-CCTCAT-GAAGATCCTGACCG-3′，下游：5′-ACCGCTCATTGCCGATAGTG-3′，扩增片段为 200 bp。PCR 扩增条件为 94 ℃，预变性 2 min，进行以下循环：94 ℃30 s，58 ℃30 s，72 ℃45 s 共 40 个循环，最后 72 ℃延伸 5 min。扩增产物行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳，Bio-Rad 凝胶成像系统分析电泳结果，将目的条带与同时扩增的 β-actin 条带灰度比值进行比较。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件对 BALF 中巨噬细胞数、AB-PAS 相对着色面积、MUC5ac 积分光密度和 MUC5ac mRNA 表达行方差分析。

2 结果

2.1 BALF 中巨噬细胞计数结果

与对照组相比，丙烯醛刺激后，巨噬细胞数显著增高（$P < 0.05$），辛伐他汀不同剂量干预后，可使巨噬细胞数减少（$P < 0.05$），且不同剂量间差异有统计学意义（$P < 0.05$）。甲羟戊酸可以部分逆转辛伐他汀的作用，使巨噬细胞数增多，甲羟戊酸组与辛伐他汀高剂量组之间差异有统计学意义（$P < 0.05$），见表 1。

表 1 大鼠气道巨噬细胞数、AB-PAS 和免疫组化染色结果（$n=6$，$\bar{x} \pm s$）

组别	巨噬细胞数（$\times 10^6$/L）	AB-PAS 相对着色面积（%）	MUC5ac 积分光密度（IOD $\times 10^3$）
对照组	1.72 ± 0.39	3.83 ± 0.75	3.33 ± 0.68
辛伐他汀自身对照组	2.09 ± 0.35	4.00 ± 0.89	3.57 ± 0.51
模型组	20.90 ± 0.92^a	34.83 ± 1.17^a	27.33 ± 1.21^a
低剂量辛伐他汀组	9.75 ± 0.66^b	25.67 ± 1.21^b	14.00 ± 0.89^b
中剂量辛伐他汀组	6.24 ± 0.41^{bcd}	18.00 ± 1.41^{bcd}	9.43 ± 0.67^{bcd}
高剂量辛伐他汀组	3.96 ± 0.51^{bc}	11.17 ± 1.17^{bc}	6.32 ± 0.29^{bc}
甲羟戊酸组	15.14 ± 0.82^d	28.17 ± 1.60^d	19.00 ± 0.89^d

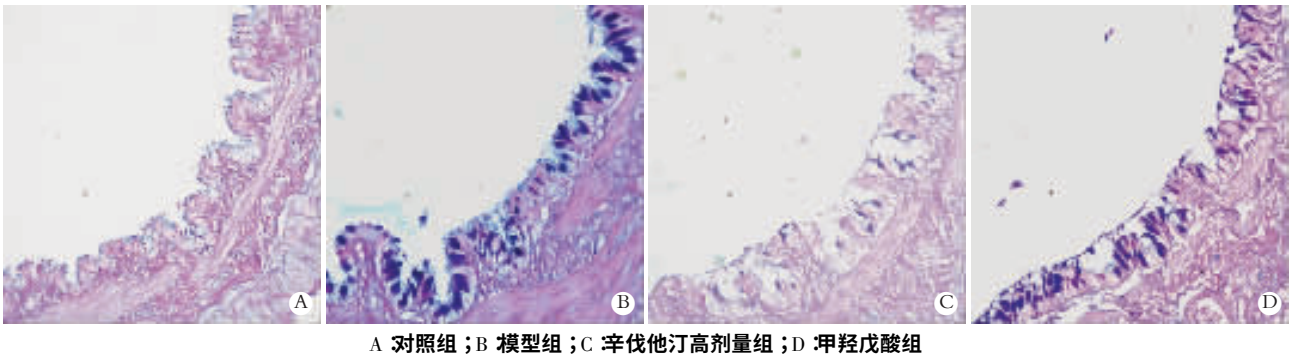
a：$P < 0.05$，与对照组比较；b：$P < 0.05$，与模型组比较；c：$P < 0.05$，与低剂量辛伐他汀干预组比较；d：$P < 0.05$，与高剂量辛伐他汀组比较

2.2 AB-PAS 染色结果

丙烯醛刺激后气道黏膜上皮杯状细胞中 AB-PAS 阳染颗粒显著增多，辛伐他汀干预后 AB-PAS 阳染颗粒显著减少，甲羟戊酸干预后较辛伐他汀组阳染颗粒增多，见图 1。AB-PAS 相对着色面积统计分析显示，丙烯醛刺激后，模型组较对照组明显增高，辛伐他汀低、中、高剂量干预后阳染面积明显减少（$P < 0.05$），见表 1。

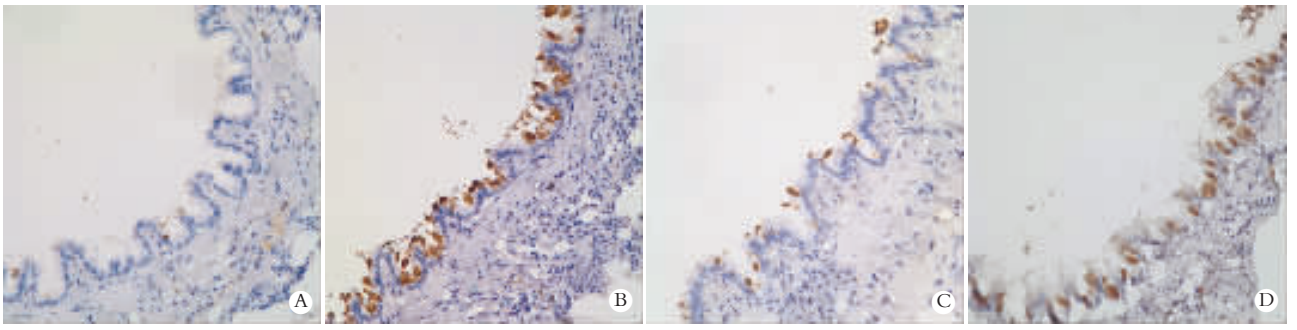
2.3 MUC5ac 免疫组织化学染色结果

正常气道上皮细胞仅有少量的棕黄色颗粒，丙烯醛刺激后气道黏膜上皮阳染颗粒的表达明显增多，辛伐他汀干预后，阳染颗粒减少，甲羟戊酸可以部分逆转辛伐他汀的作用，见图 2。统计分析结果显示，辛伐他汀呈剂量依赖抑制丙烯醛所致的 MUC5ac 的高表达（$P < 0.05$），甲羟戊酸组与辛伐他汀高剂量组比较差异有统计学意义（$P < 0.05$），见表 1。



A：对照组；B：模型组；C：辛伐他汀高剂量组；D：甲羟戊酸组

图 1 黏蛋白在大鼠气道中的表达（AB-PAS ×400）

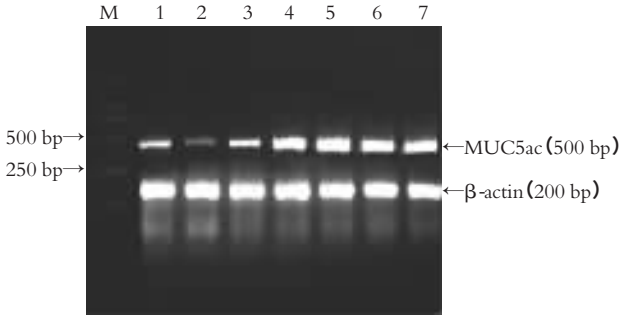


A 对照组；B 模型组；C 辛伐他汀高剂量组；D 甲羟戊酸组

图 2　MUC5ac 蛋白在大鼠气道中的表达　（S-P ×400）

2.4　MUC5ac 的 RT-PCR 检测结果

丙烯醛刺激后，模型组 MUC5ac mRNA 表达较对照组增高（$P<0.05$），辛伐他汀高、中、低剂量干预后，MUC5ac mRNA 表达较模型组降低（$P<0.05$），3 个剂量组间比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），甲羟戊酸组与辛伐他汀高剂量组比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），见图 3。



M 标准；1 对照组；2 辛伐他汀自身对照组；3 辛伐他汀高剂量组；4 辛伐他汀中剂量组；5 辛伐他汀低剂量组；6 甲羟戊酸组；7 模型组

图 3　MUC5ac mRNA 在肺组织中的表达

3　讨论

气道黏液主要由气道上皮杯状细胞和黏膜下腺体分泌，其适当的分泌可以起到保护气道的作用。而黏液在呼吸道过度分泌可引起气流阻塞和呼吸道反复感染。目前认为有毒气体和有害颗粒的吸入是慢性气道炎症疾病最主要的病因，其中吸烟是最常见的病因之一。烟草中含有的丙烯醛是一种低分子不饱和醛，是呼吸道的强烈刺激剂，我们用丙烯醛雾化吸入已经成功地复制出气道黏液高分泌模型。目前对丙烯醛引起黏液高分泌的机制还不是非常明确，但已有人用转基因小鼠证明在此过程中巨噬细胞的浸润促进了丙烯醛的黏液高分泌作用[4]。因此此过程中如果能减少巨噬细胞的浸润将起到减轻黏液分泌的作用。

他汀类药物对巨噬细胞浸润的影响已有文献报道。McKay 等[5] 研究表明辛伐他汀可以减少哮喘小鼠模型 BALF 中巨噬细胞的浸润。欧阳春等[6] 也发现氟伐他汀可以减少由单侧输尿管梗阻引起的单核巨噬细胞增多。对他汀类药物减少巨噬细胞浸润的机制目前尚不清楚，可能主要通过甲羟戊酸途径影响单核细胞趋化蛋白-1 以及一些黏附分子如 ICAM-1 和巨噬细胞刺激因子 M-CSF 的表达，从而减少巨噬细胞的浸润[7,8]。本实验结果显示，雾化吸入丙烯醛的大鼠接受辛伐他汀处理后，BALF 中巨噬细胞数减少，气道 MUC5ac 和黏蛋白表达降低，其减少和下降程度与辛伐他汀用量呈剂量依赖性关系。应用甲羟戊酸后，巨噬细胞以及气道 MUC5ac 和黏蛋白表达增高，提示辛伐他汀可能通过甲羟戊酸途径减少巨噬细胞的浸润，但其具体机制还不明确。

综上所述，辛伐他汀在丙烯醛诱导的大鼠气道黏液高分泌中，可能通过甲羟戊酸途径下调巨噬细胞在肺中的浸润，为临床慢性阻塞性肺疾病的治疗提供理论基础。

参考文献：

[1] 丁艳苓，姚婉贞. 慢性阻塞性肺疾病与哮喘气道炎症的研究[J]. 中国呼吸与危重监护杂志，2004，3(6)：410－412，415.

[2] 杨胜利，薛爱英，刘惠亮. 他汀类药物抗炎作用研究进展[J]. 心血管康复医学杂志，2006，15(4)：409－412.

[3] Borchers M T，Wert S E，Leikauf G D. Acrolein-induced MUC5ac expression in rat airways[J]. Am J Physiol，1998，274(4 Pt 1)：L573－L581.

[4] Borchers M T，Wesselkamper S，Wert S E，*et al*. Monocyte inflammation augments acrolein-induced Muc5ac expression in mouse lung[J]. Am J Physiol，1999，277(3 Pt 1)：L489－L497.

[5] McKay A，Leung B P，McInnes I B，*et al*. A novel anti-inflammatory role of simvastatin in a murine model of allergic asthma[J]. J Immunol，2004，172(5)：2903－2908.

[6] 欧阳春，宁建平，周巧玲，等. 氟伐他汀对 UUO 大鼠肾间质单核细胞趋化蛋白-1 表达及巨噬细胞浸润的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志，2005，6(7)：379－381.

[7] Martin-Ventura J L，Blanco-Colio L M，Gomez-Hernandez A，*et al*. Intensive treatment with atorvastatin reduces inflammation in mononuclear cells and human atherosclerotic lesions in one month[J]. Stroke，2005，36(8)：1796－1800.

[8] 田少江，贾汝汉，丁国华，等. 肾间质巨噬细胞积聚的调节因素及阿托伐他汀的作用[J]. 中华肾脏病杂志，2004，20(1)：63－65.

（编辑　吴培红）