

苦味受体激动剂苦精对哮喘气道炎症及重塑的影响

闫 珊¹,程 丽¹,赵晓宁¹,黄轶民¹,刘 丽²,刘静静²,高福生^{2△}

(1. 潍坊医学院临床医学院 261053;2. 潍坊医学院附属医院呼吸内科 261000)

[摘要] 目的 观察苦精对哮喘小鼠 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、气道上皮下胶原纤维及气道炎症的影响。方法 45 只 BALB/c 小鼠分为 3 组,每组 15 只。A 组:正常对照;B 组:哮喘模型组;C 组:哮喘加苦精干预 1 周。采用免疫组织化学方法观察小鼠肺组织 α -SMA 的沉积,用马松(Masson)染色方法观察小鼠气道胶原纤维的沉积,苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠气道炎症程度,并对其进行计算机图像半定量分析。结果 C 组小鼠肺内细支气管壁 α -SMA、胶原纤维沉积、气道炎症程度较 B 组明显减少,图像半定量分析结果与 B 组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 苦精可以改善哮喘小鼠气道炎症及气道重塑。

[关键词] 苦味受体;苦精;哮喘;气道炎症;气道重塑

[中图分类号] R562.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)06-0752-03

Effect of denatonium benzoate on airway inflammation and remodeling in asthmatic mice

Yan Shan¹, Cheng Li¹, Zhao Xiaoning¹, Huang Yimin¹, Liu Li², Liu Jingjing², Gao Fusheng^{2△}

(1. Clinical Medicine School, Weifang Medical School, Weifang, Shandong 261053, China;

2. Department of Respiratory, Affiliated Hospital of Weifang Medical School, Weifang, Shandong 261000, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the effect of denatonium benzoate on α -smooth muscle actin (α -SMA), subepithelial collagen and airway inflammation in asthmatic mice. **Methods** Forty-five BALB/c mice were divided into 3 groups, normal control group (A group), asthma model group (B group), asthma model+denatonium benzoate group (C group); α -SMA detected by using immunohistochemistry, lung sections were stained with Masson to detect subepithelial collagen, HE stain method was used to observe the airway inflammation the images were analyzed with semi-quantitative computer. **Results** The deposition of α -SMA, subepithelial collagen and inflammation degree in C group was significantly reduced compared with B group, the difference were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Denatonium benzoate can improve airway remodeling in asthmatic mice.

[Key words] bitter taste receptor; denatonium benzoate; asthma; airway inflammation; airway remodeling

哮喘是一种以气道炎症、气道高反应性、气道重塑为特征的慢性疾病^[1],哮喘时嗜酸性粒细胞、肥大细胞、T 淋巴细胞增多,这些细胞可以分泌炎症介质,进而加重气道阻塞、黏液分泌,最终发生气道重塑^[2]。

气道重塑加重了哮喘患者的病死率,包括上皮下胶原纤维增生,黏液过度分泌,细胞外基质沉积,气道平滑肌增厚等^[3-4]。糖皮质激素是临床上治疗哮喘的一线用药,可以改善气道炎症,减缓气道重塑。但临床上一些患者对糖皮质激素不敏感^[5-7],而且糖皮质激素还可以引起高脂血症、高血糖、高血压、骨质疏松症等不良反应^[8-9],糖皮质激素类药物对于哮喘的治疗有一定局限性,因此找到一种新型、有效的治疗哮喘的药物很重要。

Deshpande 等^[10]近年发现人类肺部存在苦味受体(TAS2R),TAS2R 激活后可以引起气道高效舒张,显著降低哮喘患者的气道阻力。但关于 TAS2R 是否可以改善哮喘气道重塑的研究尚未见报道。 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)可反映气道平滑肌数量及其收缩能力的改变^[11], α -SMA 和胶原纤维的沉积被认为是气道重塑的重要指标^[12]。

本实验通过制造卵清蛋白(OVA)致敏和激发的哮喘小鼠模型,用 TAS2R 激动剂苦精干预,探究了苦精对于哮喘气道炎症及气道重塑的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 BALB/c 小鼠 45 只,购自北京华阜康生物有限公司,6~8 周龄,平均体质量 16~20 g,饲养于潍坊医学院

动物房,12 h 昼夜交替,标准饲料,自由取水。

1.2 主要试剂与仪器 雾化器(上海鱼跃公司),密闭雾化箱(自制,20 cm×15 cm×10 cm),OVA、氢氧化铝粉剂[Al(OH)₃]、苦精(美国 Sigma 公司),Solarbio、 α -ASM、Masson 染色试剂盒、HE 染色试剂盒(北京 Solarbio 公司)。

1.3 方法

1.3.1 哮喘模型的制备给药 45 只 BALB/c 小鼠分为 3 组,每组 15 只。A 组:正常对照组;B 组:哮喘模型不干预组;C 组:哮喘加苦精干预 1 周组。B 组、C 组小鼠在第 1 天、第 15 天,每只鼠腹腔注射 0.2 mL [PBS 配置,含 100 μ g OVA,1 mg Al(OH)₃]OVA 混悬液致敏,从第 21 天起,用 1% OVA 进行雾化,每周 3 次,连续 8 周。A、B 组小鼠用等量生理盐水做同样处理。C 组小鼠从第 8 周开始,每天雾化前 30 min 每只小鼠雾化吸入 800 μ g 苦精(800 μ g 苦精溶解于 5 mL PBS 里)。

1.3.2 获取肺组织 最后一次雾化后,次日麻醉小鼠,剖开胸部,心脏取血 1 mL 后注入 1 mL 生理盐水,以冲洗肺部红细胞。用眼科剪剪取肺组织,放入 4% 多聚甲醛,4 $^{\circ}$ C 储存备用。

1.3.3 免疫组织化学 储存的肺组织石蜡包埋后,5 μ m 厚切片,一抗为抗小鼠抗体 α -ASM,用 PBS 进行 1:200 稀释,二抗为兔抗小鼠抗体,进行 α -SMA 的免疫组织化学染色。用 Imagepro-plus IPP 测定各组肺组织 α -SMA 相对水平(以免疫组织化学染色静态灰度值表示)。

1.3.4 马松(Masson)染色及苏木素-伊红(HE)染色 储存的肺组织石蜡包埋后,5 μ m 厚切片,按照试剂盒操作说明进行

Masson 染色和 HE 染色,分别显示胶原纤维的增生情况及炎症情况。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用单因素方差分析(One-Way NAOVA)及 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

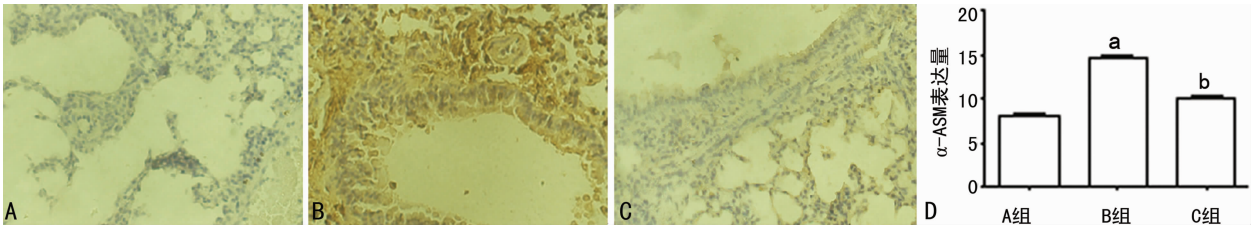
2 结 果

2.1 各组肺组织的 α -ASM 免疫组织化学 α -SMA 免疫组织化学半定量分析显示,B 组肺组织中 α -ASM 水平显著增加,免疫组织化学染成棕黄色,苦精干预一周后,C 组 α -ASM 水平较 B 组下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

2.2 各组肺组织的 Masson 染色 Masson 染色显示,B 组小

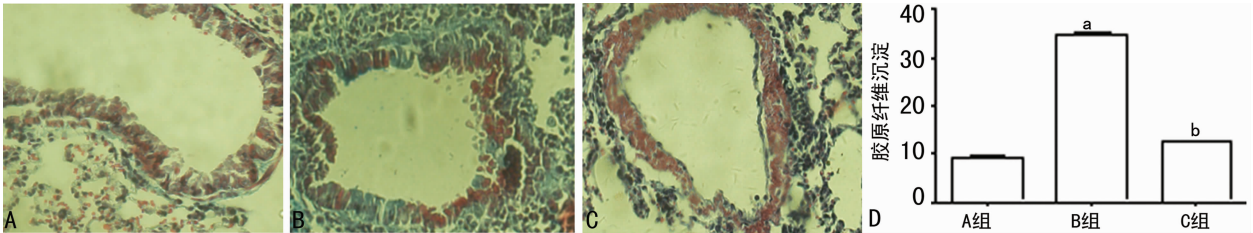
鼠气道上皮胶原纤维沉积增多,染色呈淡蓝色,苦精干预 1 周后,与 B 组比较,C 组胶原纤维减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

2.3 各组肺组织的 HE 染色 肺组织 HE 染色显示,A 组气道黏膜光滑连续、无皱褶,气管管壁无明显增厚,肺泡大小一致,壁薄均无增厚;B 组气道黏膜皱褶明显增多,气管管壁、基底膜增厚,血管及平滑肌增生,气道周围可见大量炎性细胞浸润,肺泡间隔不均匀增厚;C 组气道管壁、基底膜增厚,管腔狭窄及气道周围炎性细胞浸润,以上病理改变均较 B 组减轻。见图 3。



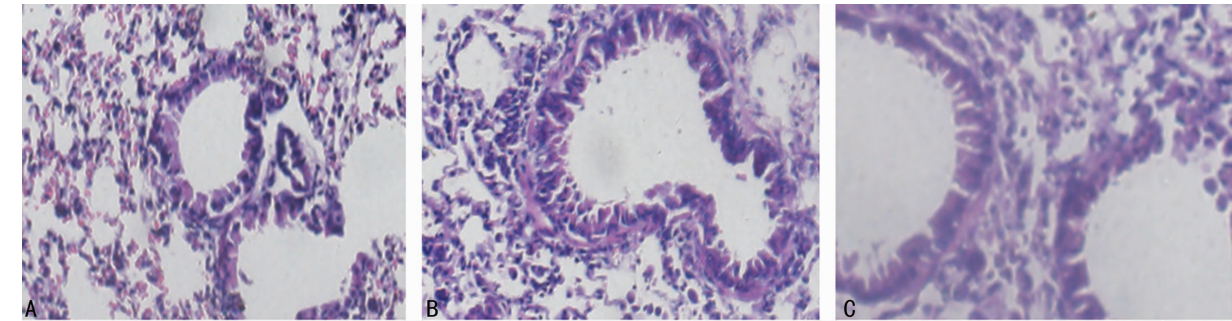
A:A 组($\times 200$);B:B 组($\times 200$);C:C 组($\times 200$);D:定量分析图;^a: $P < 0.05$,与 A 组比较;^b: $P < 0.05$,与 B 组比较。

图 1 各组肺组织的 α -ASM 表达(免疫组织化学)



A:正常组($\times 200$);B:哮喘组($\times 200$);C:苦精 1 周组($\times 200$);D:定量分析图;^a: $P < 0.05$,与正常组比较;^b: $P < 0.05$,与哮喘组比较。

图 2 各组肺组织的 Masson 染色



A:A 组 B:B 组 C:C 组。

图 3 各组肺组织的 HE 染色($\times 200$)

3 讨 论

气道重塑是哮喘的重要病理特征。气道上皮细胞脱落,杯状细胞增生,黏液腺过度分泌,上皮下胶原纤维增生,气道平滑肌细胞增生肥大,气道高反应性增加,造成哮喘患者肺功能严重降低^[13]。

在本实验中,笔者用 OVA 反复给小鼠雾化吸入,制造哮喘小鼠模型。11 周后,OVA 致敏和激发的小鼠出现躁动不安,搔抓、打喷嚏、呼吸急促等反应,HE 染色显示,B 组小鼠模型气道壁明显增厚,杯状细胞增生,Masson 染色显示 B 组小鼠气道下胶原纤维沉积,说明本实验成功制造出慢性哮喘小鼠模型。C 组用苦精连续给药 1 周后,与 B 组相比,气道上皮胶原纤维、气管周围炎性细胞、气道 α -ASM 的沉积量明显减少,

说明苦精可以改善哮喘气道的炎症及重塑。

苦精是一种苦味受体激动剂,可以作用于气道平滑肌上的 TASZR^[10],引起气道平滑肌细胞内钙离子增加,而使气道高效舒张,其舒张效果是 $\beta 2$ 受体激动剂的 3 倍^[10]。近年发现,TASZR 不仅存在于人类的味蕾中,在人体其他组织比如肾脏中,也发现了 TASZR,可以发挥调节血压的功能^[14]。抗疟药氯喹是另一种 TASZR 激动剂,研究表明,苦精、氯喹均可使哮喘患者血液中 $TNF-\alpha$ 、IL-13 减少^[15],而 $TNF-\alpha$ 、IL-13 是与哮喘炎症密切相关的炎性因子,IL-13 还可以通过 IL-4 受体上调黏蛋白的表达,促使气道上皮细胞分化为杯状细胞,增加哮喘患者气道黏液的分泌^[16]。目前国内外仍未见关于苦味受体激动剂与哮喘气道炎症及重塑关系的报道,本实验对苦精干预后

的肺组织进行 HE 染色、Masson 染色、 α -ASM 免疫组织化学,结果显示苦精干预后,气道上皮胶原纤维减少, α -ASM 水平减少,气道周围炎性细胞减少,证明苦精可以减少气道的炎症及重塑,苦味受体激动剂或许成为治疗哮喘的新型药剂,这为哮喘治疗提供了新思路。

参考文献

- [1] Chen H, Cheng S, Wang A, et al. IL-21 does not involve in OVA-induced airway remodeling and chronic airway inflammation[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(7): 10640-1065.
- [2] Abdel-Fattah MM, Salama AA, Shehata BA, et al. The potential effect of the angiotensin II receptor blocker telmisartan in regulating OVA-induced airway remodeling in experimental rats[J]. *Pharmacol Rep*, 2015, 67(5): 943-951.
- [3] McMillan SJ, Lloyd CM. Prolonged allergen challenge in mice leads to persistent airway remodelling[J]. *Clin Exp Allergy*, 2004, 34(3): 497-507.
- [4] Zhang WX, Li CC. Airway remodeling: a potential therapeutic target in asthma[J]. *World J Pediatr*, 2011, 7(2): 124-128.
- [5] Ammit AJ. Glucocorticoid insensitivity as a source of drug targets for respiratory disease[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2013, 13(3): 370-376.
- [6] Vazquez-Tello A, Halwani R, Hamid Q, et al. Glucocorticoid receptor-beta up-regulation and steroid resistance induction by IL-17 and IL-23 cytokine stimulation in peripheral mononuclear cells[J]. *J Clin Immunol*, 2013, 33(2): 466-478.
- [7] Xiong Y, Wang J, Yu H, et al. The effects of nodakenin on airway inflammation, hyper-responsiveness and remodeling in a murine model of allergic asthma[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2014, 36(5): 341-348.
- [8] Cates CJ, Jaeschke R, Schmidt S, et al. Regular treatment with salmeterol and inhaled steroids for chronic asthma; serious adverse events[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013(3): CD006922.
- [9] Cates CJ, Lasserson TJ. Regular treatment with formoterol and an inhaled corticosteroid versus regular treatment with salmeterol and an inhaled corticosteroid for chronic asthma; serious adverse events[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2010, 128(5): 310-311.
- [10] Deshpande DA, Wang WC, McIlmoyle EL, et al. Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction[J]. *Nat Med*, 2010, 16(11): 1299-1304.
- [11] 白凌军, 边逊, 徐建亚. 屏哮饮对哮喘小鼠气道重塑的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2015, 34(4): 952-954.
- [12] Davies DE, Wicks J, Powell RM, et al. Airway remodeling in asthma: new insights[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 111(2): 215-226.
- [13] Tagaya E, Tamaoki J. Mechanisms of airway remodeling in asthma[J]. *Allergol Int*, 2007, 56(4): 331-340.
- [14] Elliott RA, Kapoor S, Tincello DG. Expression and distribution of the sweet taste receptor isoforms T1R2 and T1R3 in human and rat bladders[J]. *J Urol*, 2011, 186(6): 2455-2462.
- [15] Orsmark-Pietras C, James A, Konradsen JR, et al. Transcriptome analysis reveals upregulation of bitter taste receptors in severe asthmatics[J]. *Eur Respir J*, 2013, 42(1): 65-78.
- [16] Kheradmand F, Corry DB. Discovery of novel markers in allergic lung inflammation through proteomic-based technologies[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2008, 5(1): 9-12.

(收稿日期: 2016-10-20 修回日期: 2016-11-18)

(上接第 751 页)

- of breast cancer cells to radiation[J]. *J Cell Physiol*, 2009, 220(3): 593-599.
- [12] Koga F, Yoshida S, Tatokoro M, et al. Erb B2 and NF κ B overexpression as predictors of chemoradiation resistance and putative targets to overcome resistance in muscle-invasive bladder cancer[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27616.
- [13] Chen MF, Lu MS, Chen PT, et al. Role of interleukin 1 beta in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2012, 90(1): 89-100.
- [14] Munshi A, Kurland JF, Nishikawa T, et al. Inhibition of constitutively activated nuclear factor-kappa B radiosensitizes human melanoma cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(8): 985-992.
- [15] Locke JE, Bradbury CM, Wei SJ, et al. In domethacin lowers the threshold thermal exposure for hyperthermic radiosensitization and heat-shock inhibition of ionizing radiation-induced activation of NF-kappa B[J]. *Int J Radiat Biol*, 2002, 78(6): 493-502.
- [16] Russo SM, Tepper JE, Baldwin AS Jr, et al. Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: implications for a role of NF-kappa B[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, 50(1): 183-193.
- [17] Li X, Liu D, Liu X, et al. Cp G ODN107 potentiates radiosensitivity of human glioma cells via TLR9-mediated NF- κ B activation and NO production[J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(5): 1607-1618.
- [18] Qiao Q, Jiang Y, Li G. Curcumin improves the antitumor effect of X-ray irradiation by blocking the NF- κ B pathway: an in-vitro study of lymphoma[J]. *Anticancer Drugs*, 2012, 23(6): 597-605.

(收稿日期: 2016-10-19 修回日期: 2016-11-17)