

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.18.003

文章编号: 1005-8982(2017)18-0015-07

siRNA 沉默 YKL-40 对支气管哮喘 小鼠气道平滑肌增殖及迁移的影响*

韩连奎, 许川, 梅宏, 孙勇攀, 刘波

(贵州省人民医院 胸外科, 贵州 贵阳 550002)

摘要:目的 探讨小干扰核糖核酸(siRNA)沉默人软骨糖蛋白 39(YKL-40)对支气管哮喘小鼠气道平滑肌增殖及迁移的影响。**方法** 20 只健康雌性 BALB/c 小鼠随机分为健康组($n=10$)和哮喘组($n=10$),采取腹腔注射抗原和雾化吸入卵蛋白的方式复制哮喘模型,健康组小鼠处理与哮喘组相同,只是将致敏物换成生理盐水,留取气管和支气管进行细胞培养,两组小鼠气道壁平滑肌细胞根据转染物不同分为 siRNA-YKL-40 组、阴性对照组和空白对照组,MTT 法检测不同转染组小鼠气道壁平滑肌细胞增殖情况,Transwell 法检测不同转染组小鼠气道壁平滑肌细胞迁移能力,实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测不同转染组小鼠气道壁平滑肌细胞中 YKL-40、白细胞介素 4(IL-4)和干扰素- γ (IFN- γ)基因和蛋白表达。**结果** 哮喘组中 siRNA-YKL-40 组 48~96 h 时细胞吸光度 A 值均低于阴性对照组和空白对照组,哮喘组中 siRNA-YKL-40 组、阴性对照组和空白对照组 48~96 h 时细胞吸光度 A 值均高于健康组,差异有统计学意义($P<0.05$);哮喘组中 siRNA-YKL-40 组迁移细胞数(86.38 ± 8.61)个,低于阴性对照组和空白对照组,哮喘组迁移细胞数均高于健康组,差异有统计学意义($P<0.05$);哮喘组和健康组中 siRNA-YKL-40 组 YKL-40 基因和蛋白相对表达量均低于阴性对照组和空白对照组($P<0.05$),哮喘组中 siRNA-YKL-40 组 IL-4 基因和蛋白相对表达量均低于阴性对照组和空白对照组,而 IFN- γ 基因和蛋白相对表达量与 IFN- γ /IL-4 均高于阴性对照组和空白对照组($P<0.05$),与健康组比较,哮喘组中 siRNA-YKL-40 组、阴性对照组和空白对照组 IL-4 基因和蛋白相对表达量均升高,而 IFN- γ 基因和蛋白相对表达量和 IFN- γ /IL-4 均降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 靶向 YKL-40 基因沉默能抑制气道壁平滑肌细胞增殖及迁移,可能与调节 IL-4/IFN- γ 失衡状态而减少气道炎症反应有关。

关键词: 支气管哮喘;人软骨糖蛋白 39;沉默核糖核酸;细胞增殖;细胞迁移

中图分类号: R562.25

文献标识码: A

Effect of silencing YKL-40 by siRNA on proliferation and migration of airway smooth muscle cells in asthmatic mice*

Lian-kui Han, Chuan Xu, Hong Mei, Yong-pan Sun, Bo Liu
(Department of Thoracic Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital,
Guiyang, Guizhou 550002, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of silencing human cartilage glycoprotein-39 (YKL-40) by small interfering ribonucleic acid (siRNA) on the proliferation and migration of airway smooth muscle cells in asthmatic mice. **Methods** Twenty healthy female BALB/c mice were randomly divided into healthy group ($n=10$) and asthma group ($n=10$). Asthma models were established by intraperitoneal injection of antigens and inhalation of ovum (OVA). The mice in the healthy group were treated the same as the asthma group, except that the sensitizers were replaced by saline. Tracheal and bronchial tubes were used for cell culture.

收稿日期:2017-01-11

*基金项目:贵州省科技计划(黔科合 SY 字, No:20123101)

[通信作者] 许川, E-mail: 3219475665@qq.com; Tel: 15985156446

According to the different transfectants, the airway smooth muscle cells of the two groups were divided into siRNA-YKL-40 group, negative control group and blank control group. The proliferation of airway smooth muscle cells of mice in different transfected groups were detected by MTT assay. The migration abilities of airway smooth muscle cells of mice in different transfected groups were detected by Transwell assay. The expressions of *YKL-40*, interleukin 4 (*IL-4*) and interferon- γ (*IFN-\gamma*) genes and proteins in airway smooth muscle cells in different transfected groups were detected by qRT-PCR and Western blot, respectively. **Results** In the asthma group, the absorbance A values at 48, 72 and 96 h of the siRNA-YKL-40 group were significantly lower than the negative control group and blank control group and the absorbance A values at 48, 72 and 96 h of the siRNA-YKL-40 group, negative control group and blank control group in the asthma group were significantly higher than the healthy group, ($P < 0.05$). In the asthma group, the number of migrated cells of the siRNA-YKL-40 group was (86.38 ± 8.61) , which was significantly lower than the negative control group and blank control group and the number of migrating cells of the asthma group was significantly higher than the healthy group ($P < 0.05$). In the asthma group and the healthy group, the relative expression levels of *YKL-40* gene and protein in the siRNA-YKL-40 group were lower than the negative control group and blank control group ($P < 0.05$), in the asthma group, the relative expression levels of *IL-4* gene and protein in the siRNA-YKL-40 group were lower than the negative control group and blank control group, while the relative expression levels of *IFN-\gamma* gene and protein and the value of $IFN-\gamma/IL-4$ were significantly higher than the negative control group and blank control group ($P < 0.05$). Compared with the healthy group, the relative expression levels of *IL-4* gene and protein in the siRNA-YKL-40 group, negative control group and blank control group in the asthmatic group were significantly increased, while the relative expression levels of *IFN-\gamma* gene and protein and the value of $IFN-\gamma/IL-4$ were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** Gene silencing targeting YKL-40 inhibits airway smooth muscle cell proliferation and migration. It might be related to the regulation of the imbalance of $IL-4/IFN-\gamma$ to reduce airway inflammation.

Keywords: bronchial asthma; human cartilage glycoprotein-39; RNA silencing; cell proliferation; cell migration

支气管哮喘作为气道慢性炎症性疾病,近年来,随着生活环境不断恶化,其发病率呈逐渐升高趋势^[1],发病急,且多在夜间或凌晨发病,出现气促、咳嗽、喘息及胸闷等症状,严重时危及患者生命^[2]。研究表明^[3],慢性炎症所致气道重塑是支气管哮喘的重要病理特征之一。而气道平滑肌细胞增殖及肥大在气道重塑中处于中心地位,因而,气道平滑肌逐渐成为哮喘治疗的靶位^[4]。YKL-40 又称人软骨糖蛋白 39 (human cartilage glycoprotein-39, HCgp39), 是存在于人体内的甲壳酶样蛋白,参与调控炎症反应、组织重构、纤维化及肿瘤发生^[5]。研究表明^[6],哮喘急性发作期气道和血清中 YKL-40 水平升高。但具体作用机制尚不明确。本研究拟采用小干扰核糖核酸 (small interfering ribonucleic acid, siRNA) 靶向沉默 YKL-40, 观察其对气道平滑肌增殖及迁移的影响, 以期对支气管哮喘机制研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和设备

胎牛血清(购自美国 Hyclone 公司), DMEM 高糖

培养基、胰蛋白酶、四甲基偶氮唑蓝(tetramethylazo blue, MTT) 及二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(购自美国 Gibco 公司), DMEM 培养基及 Trizol 总核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)提取试剂盒(购自美国 Invitrogen 公司), 逆转录和聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)试剂盒(均购自辽宁省大连宝生物有限公司), YKL-40 及内参引物、干扰序列和阴性序列均由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成, METAFFECTENE PRO 转染试剂(购自德国 Biontex 公司), 免疫组织化学染色试剂盒(购自北京中杉金桥生物公司), MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(购自北京碧云天生物公司), 兔抗人 YKL-40 多克隆抗体(购自美国 Quidel 公司), 白细胞介素 4(interleukin 4, IL-4)抗体(购自上海博升生物公司), 干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ) 抗体(购自上海瑞齐生物有限公司), Transwell 小室(购自美国 Corning Costar 公司), 酶标分析仪(购自美国 Bio-RAD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 复制小鼠哮喘模型 20 只健康雌性 BALB/c

小鼠购自河南省实验动物中心,4~6 周龄,饲养于标准环境下,自由饮水、进食,利用随机数字表将小鼠随机分为健康组和哮喘组,哮喘组参考文献[7]中的方法复制小鼠哮喘模型:第 1 天将 0.2 ml 抗原溶液(10%卵蛋 +10%氢氧化铝)腹腔注射致敏,14 d 后,采取超声雾化的方式吸入 2.5%的卵蛋约 40 min 以诱发哮喘,复制成功标志是小鼠出现呛咳、烦躁、轻度发绀和呼吸加快等哮喘发作表现,间隔 1 d,再次诱发,连续进行 6 周。健康组小鼠处理与哮喘组相同,只是将致敏物换成生理盐水。两组小鼠均于最后 1 次雾化吸入后 24 h 时,采取脱颈处死,留取气管和支气管进行细胞培养,取左肺中叶进行苏木精-伊红(hematoxylin-euphorbia, HE)染色观察,其余肺组织利用组织铁块法分别对两组小鼠气道壁平滑肌细胞进行培养,连续培养 5 代。

1.2.2 小鼠气道壁平滑肌细胞分组和转染 两组小鼠气道壁平滑肌细胞根据转染物不同进行分组:siRNA-YKL-40 组[转染 siRNA-YKL-40 序列,正向引物:5'-CAAUGUAAGACUCGGGAUUUU-3';反向引物:5'-(P)AAUCCCGAGUCUACAUGUU-3'];阴性对照组(转染 siRNA-NC:5'-UGGUUUACAUGUCGACUAA-3')和空白对照组(只加入磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS)。将小鼠气道壁平滑肌细胞接种于 6 孔板中,调整细胞密度为 1×10^5 / 孔,于 37℃ 恒温培养箱中培养。待细胞融合度达 70%~80%时,弃去培养液,换成不含血清 DMEM 溶液,过夜培养,按照转染试剂盒说明进行转染,转染后置于 37℃ 恒温培养箱中培养 48 h 完成后续实验。

1.2.3 MTT 法检测不同转染组小鼠气道壁平滑肌细胞增殖情况 取转染后各组处于对数生长期的气道壁平滑肌细胞,接种于 96 孔板中,调整细胞密度为 5×10^3 个 / 孔,分别于培养 48、72 和 96 h 时,加入 MTT 液,继续培养 4 h,弃去培养液,加入 DMSO,室温下振荡 15 min 混匀。用酶标分析仪取 570 nm 波长处检测各孔吸光度 A 值。

1.2.4 Transwell 法检测不同转染组小鼠气道壁平滑肌细胞迁移能力 取转染后各组培养 48 h 的气道壁平滑肌细胞,接种于 24 孔板,调整细胞密度为 5×10^4 个 / 孔,Transwell 小室下室中加入含 10%胎牛血清的 DMEM 液,于 37℃ 培养箱中培养 12 h,取出小室,轻轻去除小室上室培养基,甲醛固定 6 min,结晶紫染色 8 min,利用倒置显微镜进行观察,随机选取 5 个视野进行拍照,计数穿膜细胞数。

1.2.5 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测不同转染组小鼠气道壁平滑肌细胞中 YKL-40、IL-4 和 IFN- γ 基因表达 取转染后培养 48 h 小鼠气道壁平滑肌细胞,细胞裂解液裂解后,用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒对总 RNA 进行提取,用紫外分光光度计对总 RNA 纯度进行检测,取 A280/A260 ≥ 1.80 作为合格样品。用逆转录试剂盒逆转录为模板单链互补脱氧核糖核酸(complementary DNA, cDNA),以 cDNA 为模板进行 PCR。基因序列。YKL-40 正向引物:5'-CCTGCTCAGCGCAGCACTGT-3',反向引物:5'-GCTTTTGACGCTTTCCTGGTC-3';IL-4 正向引物:5'-AGCAGTTCCACAGGCACAAG-3',反向引物:5'-CTGGGTGGCTTCCTTCACAG-3';IFN- γ 正向引物:5'-AGAGGATGGTTTGCATCTGGGTCA-3';反向引物:5'-AACGCTATGCAGCTTGTTCGTG-3'。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH),正向引物:5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',反向引物:5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-3'。反应条件:94℃ 预变性 1 min,92℃ 变性 45 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,连续进行 40 次循环,每个样品均设置 3 个平行反应复孔。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法获得不同转染组小鼠气道壁平滑肌细胞中 YKL-40、IL-4 和 IFN- γ 相对表达量。

1.2.6 蛋白质印迹法检测不同转染组小鼠气道壁平滑肌细胞中 YKL-40、IL-4 和 IFN- γ 蛋白表达 取转染后培养 48 h 小鼠气道壁平滑肌细胞,细胞裂解液裂解后,利用总蛋白提取试剂盒对总蛋白进行提取,利用总蛋白检测试剂盒检测纯度,加热变性。取 30 μ g 蛋白,用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行电泳,电转移到聚偏氟乙烯膜,用 5%脱脂奶粉进行封闭 2 h,缓冲盐溶液冲洗,分别加入一抗 YKL-40 多克隆抗体、IL-4 抗体和 IFN- γ 抗体(稀释比分别为 1:200、1:500 和 1:800),4℃ 过夜孵育,加入二抗,室温下孵育 45 min, TBST 冲洗 5 次,用电化学发光试剂盒进行发光显影,拍照并用 Quantity One 软件进行分析,对细胞中 YKL-40、IL-4 和 IFN- γ 蛋白表达量进行分析。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠哮喘模型鉴定

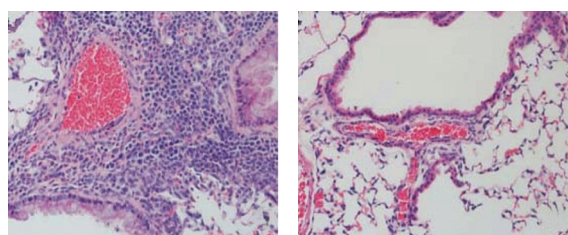
哮喘组小鼠在复制过程中均出现烦躁、呼吸急促、呛咳、四肢震颤、活动减少及抓挠等表现,随着致敏时间推移,严重的小鼠出现轻度口鼻发绀、点头呼吸及反应迟钝表现;健康组小鼠则在整个复制过程中未出现异常表现,呼吸、进食及行为正常。对两组小鼠肺组织进行免疫组织化学染色观察,哮喘组小鼠气道上皮造破坏,支气管周围出现大量炎症细胞浸润,平滑肌细胞层出现增厚;健康组小鼠气道上皮完整,支气管周围未见炎症细胞,平滑肌正常。见图 1。

2.2 不同转染组小鼠气道壁平滑肌细胞增殖情况比较

哮喘组中 siRNA-YKL-40 组 48~96 h 时细胞吸光度 A 值均低于阴性对照组和空白对照组,差异有统计学意义($F=32.944, 5.182$ 和 $11.839, P=0.000, 0.012$ 和 0.000);哮喘组中 siRNA-YKL-40 组、阴性对照组和空白对照组 48~96 h 时细胞吸光度 A 值均高于健康组,差异有统计学意义($t=5.362, 12.918, 10.148, 7.056, 7.901, 7.906, 3.389, 6.327$ 和 $7.828, P=0.000$)。见表 1。

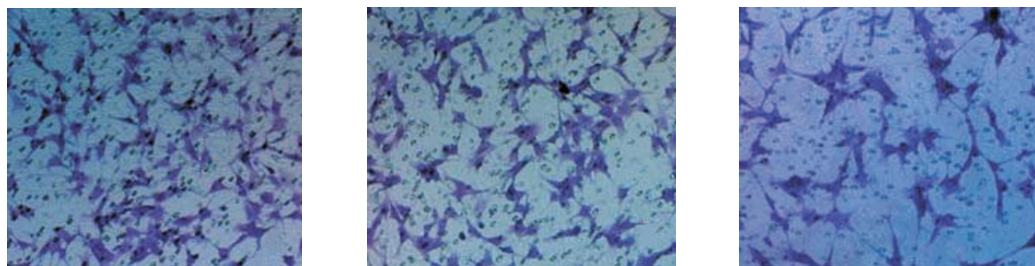
2.3 不同转染组小鼠气道壁平滑肌细胞迁移能力比较

哮喘组中 siRNA-YKL-40 组迁移细胞数 (86.38 ± 8.61) 个,低于阴性对照组和空白对照组,分



哮喘组

健康组

图 1 小鼠肺组织病理学改变 (免疫组织化学 $\times 100$)

阴性对照组

空白对照组

siRNA-YKL-40 组

图 2 哮喘组中不同转染组小鼠气道壁平滑肌细胞迁移细胞比较

别为 (179.64 ± 11.32) 和 (176.51 ± 9.26) 个,差异有统计学意义 ($F=288.926, P<0.05$);健康组中 siRNA-YKL-40 组、阴性对照组和空白对照组迁移细胞数分别为 (61.35 ± 4.98)、(65.68 ± 6.42) 和 (63.42 ± 5.71) 个,差异无统计学意义 ($F=3.180, P=0.53$);哮喘组迁移细胞数均高于健康组,差异有统计学意义 ($t=8.827, 29.676, 45.165, P=0.000$)。见图 2、3。

2.4 不同转染组小鼠气道壁平滑肌细胞中 YKL-40、IL-4 和 IFN- γ 基因表达

哮喘组和健康组中 siRNA-YKL-40 组 YKL-40 信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 相对表达量均低于阴性对照组和空白对照组,差异有统计学意义 ($F=21.019$ 和 $798.315, P=0.000$);哮喘组中 siRNA-YKL-40 组 IL-4 mRNA 相对表达量均低于阴性对照组和空白对照组,而 IFN- γ mRNA 相对表达量和 IFN- γ /IL-4 均高于阴性对照组和空白对照组,差异有统计学意义 ($F=20.769, 3.456$ 及 $9.933, P=0.000, 0.046$ 及 0.001);与健康组比较,哮喘组中 siRNA-YKL-40 组、阴性对照组和空白对照组 IL-4

表 1 不同转染组小鼠气道壁平滑肌细胞增殖情况比较 (A 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	48 h	72 h	96 h
哮喘组			
siRNA-YKL-40 组	$0.31 \pm 0.06^{1)2)3)}$	$0.49 \pm 0.08^{1)2)3)}$	$0.56 \pm 0.10^{1)2)3)}$
阴性对照组	$0.49 \pm 0.07^{3)}$	$0.63 \pm 0.09^{3)}$	$0.78 \pm 0.12^{3)}$
空白对照组	$0.51 \pm 0.08^{3)}$	$0.65 \pm 0.11^{3)}$	$0.79 \pm 0.11^{3)}$
健康组			
siRNA-YKL-40 组	0.21 ± 0.04	0.31 ± 0.06	0.42 ± 0.06
阴性对照组	0.23 ± 0.05	0.33 ± 0.07	0.44 ± 0.05
空白对照组	0.24 ± 0.06	0.32 ± 0.05	0.43 ± 0.08

注:1)与同组空白对照组比较, $P<0.05$;2)与同组阴性对照组比较, $P<0.05$;3)与健康组相应亚组比较, $P<0.05$

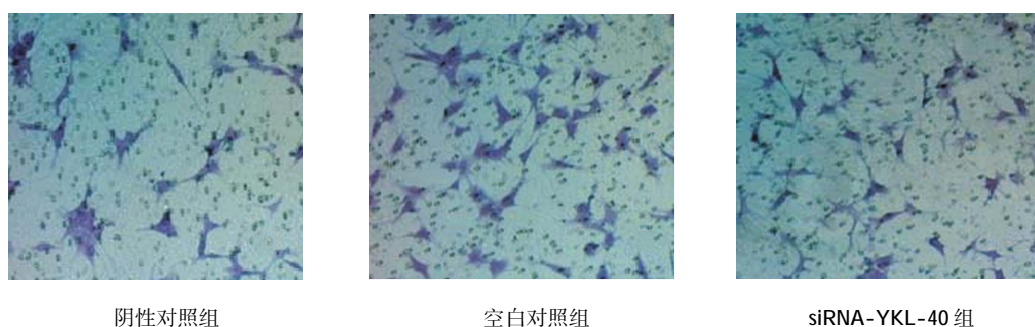


图 3 健康组中不同转染组小鼠气道壁平滑肌细胞迁移细胞比较

mRNA 相对表达量均升高,而 *IFN- γ* mRNA 相对表达量和 *IFN- γ /IL-4* 均降低,差异有统计学意义($t = 21.419, 33.695, 47.787, 23.115, 16.665, 31.470, 11.699, 24.122$ 和 66.060 , 均 $P=0.000$)。见表 2。

2.5 不同转染组小鼠气道壁平滑肌细胞中 YKL-40、IL-4 和 *IFN- γ* 蛋白表达

哮喘组和健康组中 siRNA-YKL-40 组 YKL-40 蛋白相对表达量均低于阴性对照组和空白对照组,差异均有统计学意义($F=17.386, 9.481, P<0.05$);哮喘组中 siRNA-YKL-40 组 IL-4 蛋白相对表达量均

低于阴性对照组和空白对照组,而 *IFN- γ* 蛋白相对表达量和 *IFN- γ /IL-4* 均高于阴性对照组和空白对照组,差异有统计学意义($F=7.810, 3.990$ 和 $12.283, P<0.05$);与健康组比较,哮喘组中 siRNA-YKL-40 组、阴性对照组和空白对照组 IL-4 蛋白相对表达量均升高,而 *IFN- γ* 蛋白相对表达量和 *IFN- γ /IL-4* 均降低,差异有统计学意义($t=10.115, 4.874, 19.059, 11.490, 4.890, 13.474, 11.886, 3.266$ 和 $10.634, P = 0.000, 0.000, 0.000, 0.000, 0.000, 0.000, 0.000, 0.002$ 和 0.000)。见表 3 和图 4、5。

表 2 不同转染组小鼠气道壁平滑肌细胞中 YKL-40、IL-4 及 *IFN- γ* 基因表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	YKL-40 mRNA	IL-4 mRNA	<i>IFN-γ</i> mRNA	<i>IFN-γ/IL-4</i>
哮喘组				
siRNA-YKL-40 组	$1.72 \pm 0.12^{1)2)3)}$	$1.57 \pm 0.13^{1)2)3)}$	$0.49 \pm 0.07^{1)2)3)}$	$0.31 \pm 0.09^{1)2)3)}$
阴性对照组	$2.16 \pm 0.15^3)$	$1.97 \pm 0.11^3)$	$0.39 \pm 0.09^3)$	$0.20 \pm 0.04^3)$
空白对照组	$2.19 \pm 0.17^3)$	$1.99 \pm 0.14^3)$	$0.41 \pm 0.08^3)$	$0.21 \pm 0.05^3)$
健康组				
siRNA-YKL-40 组	$0.31 \pm 0.09^{1)2)}$	$0.34 \pm 0.11^{1)2)}$	$1.58 \pm 0.08^{1)2)}$	$1.38 \pm 0.05^{1)2)}$
阴性对照组	1.02 ± 0.05	0.98 ± 0.03	0.99 ± 0.04	1.03 ± 0.05
空白对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00

注:1)与同组空白对照组比较, $P<0.05$;2)与同组阴性对照组比较, $P<0.05$;3)与健康组相应亚组比较, $P<0.05$

表 3 不同转染组小鼠气道壁平滑肌细胞中 YKL-40、IL-4 及 *IFN- γ* 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	YKL-40 蛋白	IL-4 蛋白	<i>IFN-γ</i> 蛋白	<i>IFN-γ/IL-4</i>
哮喘组				
siRNA-YKL-40 组	$0.63 \pm 0.07^{1)2)3)}$	$0.65 \pm 0.07^{1)2)3)}$	$0.24 \pm 0.05^{1)2)3)}$	$0.37 \pm 0.06^{1)2)3)}$
阴性对照组	$0.81 \pm 0.09^3)$	$0.72 \pm 0.08^3)$	$0.16 \pm 0.04^3)$	$0.22 \pm 0.07^3)$
空白对照组	$0.83 \pm 0.10^3)$	$0.71 \pm 0.06^3)$	$0.17 \pm 0.06^3)$	$0.24 \pm 0.09^3)$
健康组				
siRNA-YKL-40 组	$0.42 \pm 0.05^{1)2)}$	$0.35 \pm 0.07^{1)2)}$	$0.33 \pm 0.05^{1)2)}$	$0.87 \pm 0.07^{1)2)}$
阴性对照组	0.53 ± 0.07	0.45 ± 0.06	0.26 ± 0.04	0.58 ± 0.06
空白对照组	0.52 ± 0.06	0.44 ± 0.04	0.27 ± 0.03	0.61 ± 0.08

注:1)与同组空白对照组比较, $P<0.05$;2)与同组阴性对照组比较, $P<0.05$;3)与健康组相应亚组比较, $P<0.05$

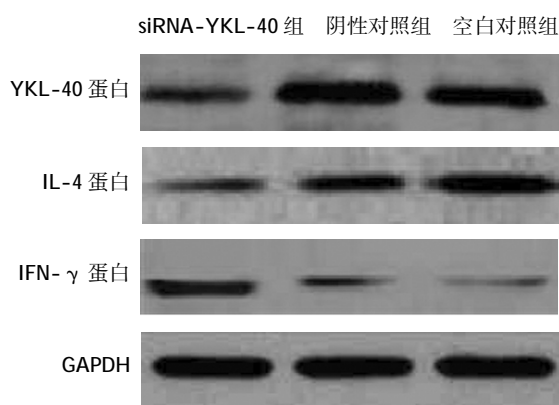


图 4 哮喘组中不同转染组细胞中 YKL-40、IL-4 和 IFN- γ 蛋白表达

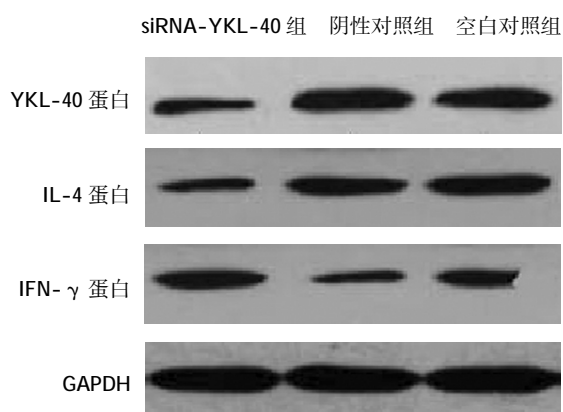


图 5 健康组中不同转染组细胞中 YKL-40、IL-4 和 IFN- γ 蛋白表达

3 讨论

哮喘作为最为常见的慢性呼吸系统疾病,近年来发病率呈上升趋势,病情迁延反复,严重影响人类健康。该病以气道慢性炎症及气道高反应性为特征,发病机制较为复杂,多种炎症因子和炎症细胞均参与哮喘发病过程,Th1/Th2 平衡失调被认为在哮喘病程中发挥重要作用^[8]。YKL-40 是一种壳质酶的衍生物,在组织纤维化、促进炎症反应、组织重塑、细胞增殖及凋亡等多种生物学过程中发挥重要作用^[9]。研究表明^[10],哮喘患者急性发作时血浆 YKL-40 水平升高,且与哮喘严重程度及气道重构等密切相关。

本研究显示,通过腹腔注射致敏及雾化吸入诱导的方式可使小鼠出现哮喘表现,免疫组织化学染色显示,哮喘组小鼠气道上皮造破坏,支气管周围出现大量炎症细胞浸润,平滑肌细胞层出现增厚,提示成功复制小鼠哮喘模型。研究表明^[11],支气管上皮细胞体量增加,异常增殖及向表皮层迁移聚集在哮喘病

程中发挥重要作用。本研究显示,哮喘组中 siRNA-YKL-40 组 48~96 h 时细胞吸光度 A 值均低于阴性对照组和空白对照组,哮喘组中 siRNA-YKL-40 组、阴性对照组和空白对照组 48~96 h 时细胞吸光度 A 值均高于健康组,说明哮喘小鼠气道平滑肌细胞出现异常增殖,而特异性抑制 YKL-40 表达,可抑制气道平滑肌细胞增殖。本研究还显示,哮喘组中 siRNA-YKL-40 组 siRNA-YKL-40 组迁移细胞数低于阴性对照组和空白对照组,哮喘组迁移细胞数均高于健康组,说明哮喘小鼠气道平滑肌细胞异常迁移在哮喘发病中发挥重要作用,而抑制 YKL-40 基因则可减少细胞迁移细胞数,进一步提示 YKL-40 参与哮喘发病过程可能通过调节气道平滑肌细胞增殖及迁移而直接参与气道重构,与肖琳等^[12]研究结论相似。

研究表明^[13],慢性炎症反应及大量释放的炎症介质与气道重塑密切相关。有研究指出^[14],YKL-40 在 Th2 诱导的炎症反应、细胞因子释放及组织重构中发挥重要作用,YKL-40 可促进 Th2 分化及增加 Th2 数量。而 Th1/Th2 平衡失调在哮喘发病中发挥重要作用^[15]。研究表明^[16],Th 细胞所处局部环境中的细胞因子在 Th1/Th2 极化中发挥关键性作用,其中,I 型细胞因子,如 IFN- γ 可促进向 Th1 分化,而 II 型细胞因子,如 IL-4,则促进向 Th2 分化。本研究显示,哮喘组中 siRNA-YKL-40 组 IL-4 基因和蛋白相对表达量均低于阴性对照组和空白对照组,而 IFN- γ 基因和蛋白相对表达量和 IFN- γ /IL-4 均高于阴性对照组和空白对照组,与健康组比较,哮喘组中 siRNA-YKL-40 组、阴性对照组和空白对照组 IL-4 基因和蛋白相对表达量均升高,而 IFN- γ 基因和蛋白相对表达量和 IFN- γ /IL-4 均降低,说明哮喘小鼠气道壁平滑肌细胞中细胞因子 IL-4 和 IFN- γ 出现表达异常,破坏 Th1/Th2 平衡,从而诱导气道慢性炎症反应及气道重构,而特异性抑制 YKL-40 表达,则可减少 IL-4 表达,促进 IFN- γ 表达,使 IFN- γ /IL-4 比值接近正常,从而纠正 Th1/Th2 平衡,提示 YKL-40 可能通过调节 IL-4/IFN- γ 失衡状态而实现对炎症反应及气道重构的影响。本研究亦显示,在抑制正常气道壁平滑肌细胞中 YKL-40 表达后,IFN- γ /IL-4 平衡未被打破,笔者推测可能正常气道壁平滑肌细胞具有一定的自我调节及修复过程,在一定范围内可维持 IFN- γ /IL-4 平衡。

综上所述,特异性抑制 YKL-40 表达可抑制气道壁平滑肌细胞增殖及迁移,可能与调节 IL-4/IFN- γ

失衡状态而减少气道炎症反应有关,但具体调控机制尚待进一步研究明确。

参 考 文 献:

- [1] 沙莉,邵明军,刘传合,等. 2010 年与 2000 年中国城市儿童支气管哮喘患病率比较[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2015, 38(9): 664-668.
- [2] IDREES M, FITZGERALD J M. Vocal cord dysfunction in bronchial asthma: a review article[J]. Journal of Asthma, 2015, 52(4): 327-335.
- [3] AMIN K. The role of the T lymphocytes and remodeling in asthma[J]. Inflammation, 2016, 39(4): 1475-1482.
- [4] SIDDIQUI S, REDHU N S, OJO O O, et al. Emerging airway smooth muscle targets to treat asthma[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2013, 26(1): 132-144.
- [5] LIBREROS S, IRAGAVARAPU-CHARYULU V. YKL-40/CHI3L1 drives inflammation on the road of tumor progression[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2015, 98(6): 931-936.
- [6] USEMANN J, FREY U, MACK I, et al. CHI3L1 polymorphisms, cord blood YKL-40 levels and later asthma development[J]. BMC Pulm Med, 2016, 16(1): 81-86.
- [7] YUAN Y, YANG B, YE Z, et al. Sceptridium ternatum extract exerts antiasthmatic effects by regulating Th1/Th2 balance and the expression levels of leukotriene receptors in a mouse asthma model[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 149(3): 701-706.
- [8] ROGALA B, BOZEK A, GLUCK J, et al. Prevalence of IgE-mediated allergy and evaluation of Th1/Th2 cytokine profiles in patients with severe bronchial asthma[J]. Postepy Dermatol Alergol, 2015, 32(4): 274-280.
- [9] MATHIASSEN A B, HENNINGSEN K M, HARUTYUNYAN M J, et al. YKL-40: a new biomarker in cardiovascular disease[J]. Biomark Med, 2010, 4(4): 591-600.
- [10] 李宗平, 屈玲玲, 崔丹萍, 等. 甲壳质酶蛋白在不同气道炎症表型哮喘患者的表达及其与哮喘的相关性[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2015, 9(4): 302-306.
- [11] KIM M J, HONG J Y, LEE K E, et al. Effect of cholesterol depletion on interleukin-8 production in human respiratory epithelial cells[J]. Allergy Asthma & Immunology Research, 2013, 5(6): 402-408.
- [12] 肖琳, 石昭泉, 李兵, 等. YKL-40 调控支气管上皮分泌 IL-8 对支气管平滑肌细胞增殖和迁移的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(12): 1591-1595.
- [13] LUCINI V, CIRACI R, DUGNANI S, et al. Antibiotics counteract the worsening of airway remodelling induced by infections in asthma[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2014, 43(5): 442-450.
- [14] LEE C G, ELIAS J A. Role of breast regression protein-39/YKL-40 in asthma and allergic responses[J]. Allergy Asthma & Immunology Research, 2010, 2(1): 20-27.
- [15] ROGALA B, BOZEK A, GLUCK J, et al. Prevalence of IgE-mediated allergy and evaluation of Th1/Th2 cytokine profiles in patients with severe bronchial asthma[J]. Postepy Dermatol Alergol, 2015, 32(4): 274-280.
- [16] DAS M, TOMAR N, SREENIVAS V, et al. Effect of vitamin D supplementation on cathelicidin, IFN- γ , IL-4 and Th1/Th2 transcription factors in young healthy females[J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2014, 68(3): 338-343.