

IL-19对哮喘模型大鼠气道平滑肌细胞增殖的影响

李年珍¹, 张焕萍², 柴景伟¹, 张彬¹

(1. 山西医科大学, 太原 030001; 2. 山西医科大学第一临床医学院呼吸内科, 太原 030001)

【摘要】 目的 探讨 IL-19 对哮喘大鼠气道平滑肌细胞 (ASMCs) 增殖的作用。方法 通过对大鼠进行雾化卵清蛋白, 制备哮喘模型大鼠。提取哮喘大鼠 ASMCs 进行培养, 分别以 1 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ IL-19 干预 ASMCs 生长。采用流式细胞仪、MTT 法检测 ASMCs 增殖情况, 观察不同浓度 IL-19 对 ASMCs 增殖的影响。结果 与正常鼠相比, 慢性哮喘大鼠 ASMCs 增殖明显, 处于 S 期的细胞比例明显增高。经 10 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ IL-19 干预后, 慢性哮喘大鼠 ASMCs 处于 S 期的细胞比例减少, 增殖亦减弱。且两组间比较有明显差异。而经 1 $\mu\text{g/L}$ IL-19 干预后, 慢性哮喘大鼠 ASMCs 处于 S 期的细胞比例及增殖均无明显变化。结论 一定浓度的 IL-19 可能抑制慢性哮喘大鼠 ASMCs 的增殖。

【关键词】 白细胞介素-19; 气道平滑肌细胞; 增殖

【中图分类号】 R363; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)06-0043-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.06.010

Effect of IL-19 on Airway Smooth Muscle Cells Proliferation in Asthmatic Rats

LI Nian-zhen¹, ZHANG Huan-ping², CHAI Jing-wei¹, ZHANG Bin¹

(1. ShanXi medical university, TaiYuan 030001, China;

2. Department of respiration First Affiliate Hospital of ShanXi medical university, TaiYuan 030001, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of IL-19 on airway smooth muscle cells (ASMCs) proliferation in asthmatic rats. **Methods** The rat model of asthma was made through ovalbumin (OVA) sensitization and excitation. Primary cultures of ASMCs were established for experiments. ASMCs were treated with 1 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ IL-19. Adopt flow cytometry and MTT method to detect the proliferation of ASMCs, and observe the influence of different concentrations of IL-19 on the proliferation of ASMCs. **Results** Compared with normal rats, the proliferation of ASMCs in chronic asthmatic rats and the percentage of cells at S phase was obvious increased. The percentage of cells at S phase of ASMCs in chronic asthmatic rats intervened by 10 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ IL-19 was decreased and the proliferation of ASMCs was reduced compared with the asthmatic group, and there is difference between 10 $\mu\text{g/L}$ IL-19 group and 100 $\mu\text{g/L}$ IL-19 group. But these two indexes of ASMCs in chronic asthmatic rats have no obvious change after intervening by 1 $\mu\text{g/L}$ IL-19. **Conclusion** IL-19 may inhibit the proliferation of ASMCs in chronic asthmatic rats.

【Key words】 Interleukin-19; Airway smooth muscle cells (ASMCs); Proliferation

气道平滑肌细胞 (ASMCs) 在哮喘气道慢性炎症、气道高反应性及气道重塑中均具有十分重要的

作用。近年来研究表明, ASMCs 不仅具有收缩和增殖功能, 而且还有分泌功能^[1]。ASMCs 可分泌一些

[基金项目] 山西省教育厅 2005 年山西省高校科技研究开发项目 (20051001)。

[作者简介] 李年珍 (1983 -), 女, 研究方向: 支气管哮喘。E-mail: 28524627@qq.com。

[通讯作者] 张焕萍。E-mail: zhp326@163.com。

细胞因子、炎症因子和趋化因子,这些介质又可作用于 ASMCs 对细胞的增殖、凋亡进行调节。ASMCs 在哮喘的发病及进展中扮演很重要的角色。IL-10 在哮喘中的作用比较明确,IL-10 对气道炎症起抑制作用。因 IL-19 与 IL-10 具有同源性,推测 IL-19 也具有和 IL-10 相似的生物学活性^[2-4]。关于 IL-19 的生物学作用尚存在争议。IL-19 对哮喘的具体作用尚无相关报道。

本实验通过制备大鼠哮喘模型,培养大鼠叶支气管 ASMCs,用不同浓度的 IL-19 干预细胞生长,观察 ASMCs 的增殖的变化。探讨 IL-19 对体外培养的哮喘平滑肌细胞增殖中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

卵清白蛋白 (ovalbumin, OVA)、I 型胶原酶 (collagenase) 为美国 Sigma 公司产品;DMEM 培养基 (Gibco 公司);胎牛血清 (杭州四季青生物所);小鼠抗 α 平滑肌肌动蛋白 (α -actin) 单克隆抗体购自博士德公司;白细胞介素-19 (IL-19) 购自美国 Peprotech 公司。余为进口或国产试剂,分析纯。

1.2 方法

1.2.1 大鼠哮喘模型的建立 健康雄性 Wistar 大鼠,体重 200~250 g,由山西医科大学实验动物中心提供 [SCXK (普)070101]。适应性喂养 1 周后,第 1 天大鼠腹腔注射含 100 mg OVA 和 200 mg 氢氧化铝的生理盐水 1 mL,同时腹腔注射百日咳杆菌疫苗 1 mL (约 6×10^9 个菌株) 作为佐剂,第 8 天重复致敏 1 次,第 15 天开始激发,将大鼠置于特制玻璃容器内,用超声雾化器喷入 2% OVA 生理盐水 50 mL,激发 30 min,每天 1 次,激发 8 周。激发后大鼠出现烦躁、呛咳、呼吸加快及轻度紫绀等哮喘发作症状。正常大鼠以等量生理盐水代替 OVA 注射,并吸入生理盐水 50 mL 8 周。

1.2.2 ASMCs 的分离、培养及鉴定 参照 Johnson 等^[5]的培养方法,上述大鼠腹腔注射 25% 乌拉坦 (4 mL/kg) 麻醉后,开胸迅速取出肺脏置于预先冰浴的 D-hanks' 溶液,在解剖显微镜下仔细分离出叶支气管,并将支气管外膜剥离干净,刮除内皮,将获得的单层 ASM 在青霉素小瓶中剪成 1 mm \times 1 mm 的小块后,加入 1 g/L I 型胶原酶,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中消化 1 h 后加入 DMEM 液,混匀后用金属滤网过滤,滤液置离心管内 1000 r/min 离心 6 min。弃上清

后,沉淀的细胞用含 20% FBS、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL 的 DMEM 培养液重悬,接种到培养瓶内,让细胞贴壁生长。原代培养的细胞生长约 7~10 d 后融合。0.25% 胰蛋白酶消化传代,以含 10% FBS、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL 的 DMEM 培养液传代培养,每 3~4 d 换液 1 次,约 4~5 d 细胞长满后传代,3~8 代的细胞用于实验。小鼠平滑肌 α -肌动蛋白 (α -actin) 免疫细胞化学染色鉴定为 ASMCs^[6]。

1.2.3 实验分组 取第 3~8 代培养的大鼠气道平滑肌细胞,0.25% 胰蛋白酶消化,台盼蓝染色法计数,细胞存活率大于 96%。用含 10% FBS 的 DMEM 培养,待细胞 90% 融合后,换无血清 DMEM 培养 24 h,使细胞生长同步于 G₀ 期,换用含 10% FBS 的 DMEM 液,随机分为 5 组:(1) 对照组:培养的正常大鼠 ASMCs,每孔/瓶中不加任何干预;(2) 哮喘组:培养的哮喘大鼠 ASMCs,每孔/瓶中不加任何干预;(3)、(4)、(5) 组分别为不同浓度的 IL-19 干预组:培养的哮喘大鼠 ASMCs,每孔/瓶中分别加入终浓度为 1 μ g/L、10 μ g/L、100 μ g/L 的 IL-19 放入 CO₂ 培养箱中共培养 12 h,进行下述实验。每 4 个复孔/瓶为一组,实验重复 3 次。

1.2.4 细胞增殖检测

1.2.4.1 流式细胞仪分析 ASMCs 细胞周期: ASMCs 按 10^6 /mL 的密度接种于 100 cm² 的培养瓶,培养及分组如前述,收集的 ASMCs 用 PBS 液配制成浓度为 1×10^6 个/mL 的细胞悬液,用预冷的 75% 乙醇固定,加入 RNA 酶、碘化丙啶室温作用后,用 FACSsort 型流式细胞仪 (美国 BD 公司) Cellquest 软件分析细胞周期中各期所占的百分比。

1.2.4.2 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 微量比色法测定 ASMCs 增殖: 96 孔板内的 ASMCs 培养结束时,每孔加 MTT (5 g/L) 20 μ L,培养 4 h 后去培养液,加二甲亚砜 150 μ L 振荡 30 min,使结晶物充分溶解。酶联免疫检测仪于 490 nm 处测定各孔 A 值。

1.2.5 统计学方法 应用统计分析软件包 SPSS13.0 进行统计学分析。实验数据以均数 \pm 标准差表示。组间差异显著性检验采用方差分析,两两比较采用 q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞鉴定

在倒置显微镜下,经原代培养的 ASMCs 呈梭

形,有较长的突起,圆形的细胞核位于细胞中央,呈疏密相间、典型“峰和谷”生长状态(彩插 2 图 1)。α-actin 免疫细胞化学染色,免疫反应产物呈棕黄色。97% 细胞 α-actin 染色阳性,所培养的细胞为平滑肌细胞^[6](彩插 2 图 2)。

2.2 流式细胞仪分析 ASMCs 细胞周期

与对照组 ASMCs 比较,哮喘组 ASMCs 的 G₀/G₁ 期细胞所占比例明显减少 (P < 0.01), S 期细胞所占比例增高 (P < 0.01),表明处于有丝分裂期的细胞数目增多。而加入不同浓度 IL-19 共培养 12 h 后,10 μg/L、100 μg/L IL-19 干预组 S 期细胞所占比例较哮喘组都明显下降 (P < 0.01),但仍高于对

照组 (P < 0.01) (表 1 和图 3)。同时这两个浓度 IL-19 干预组 ASMCs 的 G₀/G₁ 期细胞所占比例较哮喘组明显增高 (P < 0.01),但仍低于对照组 (P < 0.01)。且上述两个指标两个浓度干预组间比较有差异 (P < 0.01)。但 1 μg/L IL-19 干预组以上指标与哮喘组并无统计学差异 (P > 0.05)。

2.3 MTT 检测 ASMCs 增殖

与对照组相比,哮喘组 ASMCsA 值显著增加 (P < 0.01),10 μg/L、100 μg/L IL-19 干预组 ASMCsA 值较哮喘组相比均显著降低 (P < 0.01),但仍高于对照组 (P < 0.01) (表 1 和图 4)。而 1 μg/L IL-19 干预组 ASMCsA 值与哮喘组并无统计学差异 (P > 0.05)。

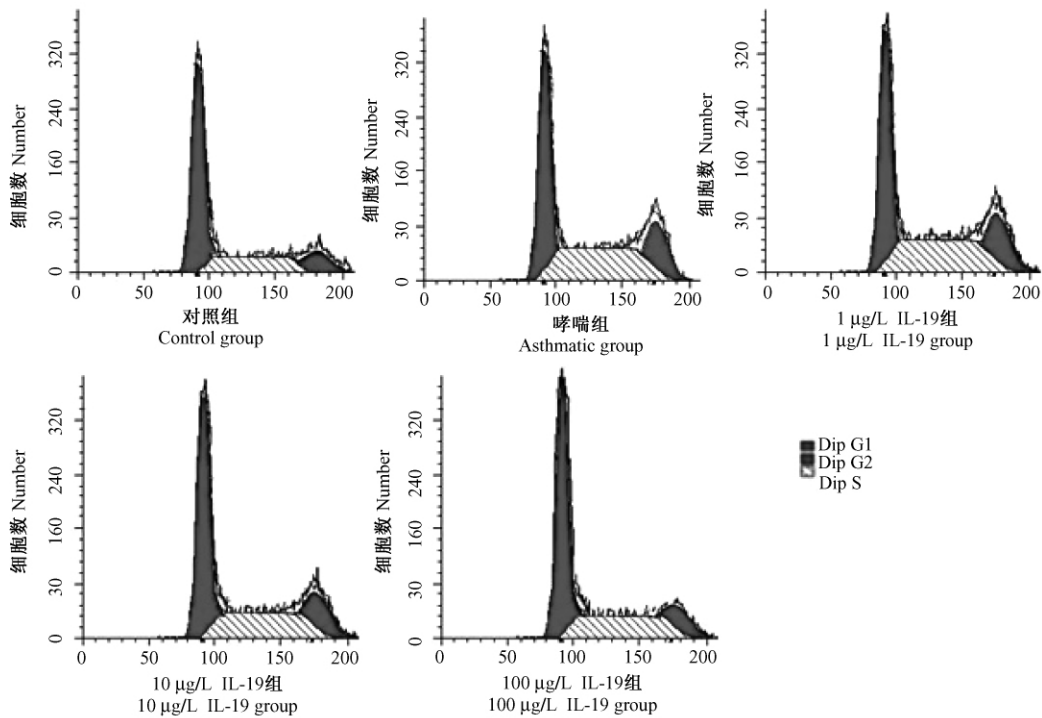


图 3 流式细胞仪分析各组大鼠气道平滑肌细胞周期

Fig. 3 Analysis of cell cycle of ASMCs by flow cytometry

表 1 IL-19 对哮喘大鼠气道平滑肌细胞增殖的影响 (n = 3)

Tab. 1 IL-19 effect on cell proliferation of ASMCs in asthmatic rats (n = 3)

| 组别 Groups | G ₀ /G ₁ 期细胞比例 (%) | S 期细胞比例 (%) | A 490 (MTT) |
|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| | Percentage of cells at G ₀ /G ₁ phase (%) | Percentage of cells at S phase (%) | |
| 对照组 Control group | 79.73 ± 3.86 [#] | 11.27 ± 0.08 [#] | 0.291 ± 0.069 [#] |
| 哮喘组 Asthmatic group | 44.62 ± 3.56 [*] | 34.71 ± 1.08 [*] | 0.540 ± 0.009 [*] |
| 1 μg/L IL-19 组 1 μg/L IL-19 group | 45.15 ± 2.22 ^{* #} | 34.73 ± 0.36 ^{* #} | 0.544 ± 0.007 ^{* #} |
| 10 μg/L IL-19 组 10 μg/L IL-19 group | 66.25 ± 2.24 ^{* #} | 26.84 ± 1.86 ^{* #} | 0.414 ± 0.013 ^{* #} |
| 100 μg/L IL-19 组 100 μg/L IL-19 group | 72.05 ± 1.93 [#] | 16.47 ± 0.48 ^{* #} | 0.322 ± 0.410 ^{* #} |
| F 值 | 108.94 | 340.2 | 368.31 |

注: * P < 0.01 与对照组比较; # P < 0.01 与哮喘组比较

Note: * P < 0.01 compared with control group; # P < 0.01 compared with asthmatic group

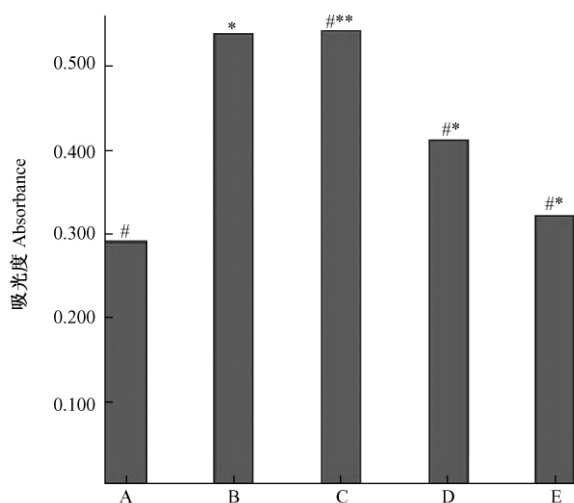


图 4 MTT 法检测各组大鼠气道平滑肌细胞的增殖

A:对照组 B:哮喘组 C:1 μg/L IL-19 组

D:10 μg/L IL-19 组 E:100 μg/L IL-19 组

注:° $P < 0.01$ 与对照组比较;*** $P > 0.05$ 与

哮喘组比较;#* $P < 0.01$ 与哮喘组比较

Fig. 4 Proliferation of ASMCs were detected by MTT

A:Control group; B:Asthmatic group; C:1 μg/L IL-19 group; D:10 μg/L IL-19 group; E:100 μg/L IL-19 group.

Note:° $P < 0.01$ compared with control group;*** $P > 0.05$

compared with asthmatic group;#* $P < 0.01$

compared with asthmatic group

3 讨论

支气管哮喘是一种由多种炎症细胞、炎症介质和细胞因子共同参与并相互作用的气道慢性炎症性疾病。在气道炎症中,气道平滑肌细胞(ASMCs)不仅有收缩功能,而且有合成分泌炎症介质的功能。ASMCs 在哮喘气道炎症、气道高反应性与气道重构中有重要作用。多种炎症介质和炎性细胞产物又可作用于 ASMCs,对 ASMCs 的增殖进行调节。增殖的 ASMCs 使气道壁增厚,导致基础气道阻力增加和不可逆性气流受限的发生。

白细胞介素-19(IL-19)是新近发现的 IL-10 超家族成员中的一员。IL-10 被广泛认为是系统性的抑制炎症反应的细胞因子^[7]。因 IL-19 与 IL-10 具有同源性^[8],推测 IL-19 也具有和 IL-10 相似的生物学活性。关于 IL-19 的生物学作用尚存在争议。在 Sommerville^[9]研究 IL-19 对受损血管平滑肌的作用过程中,发现在它可使受损血管平滑肌增殖减少。但它对哮喘大鼠气道平滑肌细胞的作用目前还尚无报道。实验结果表明:一定浓度 IL-19 可使慢性

哮喘大鼠气道平滑肌细胞增殖减弱,处于增殖期的细胞数目减少。提示 IL-19 对体外培养的哮喘气道平滑肌细胞有抑制增殖的作用。这与 IL-19 可使受损血管平滑肌增殖减少的报道一致。我们还发现随着 IL-19 干预浓度的增高,处于增殖期的细胞比例逐渐减少但仍高于正常对照组,提示可能所选择的 IL-19 干预浓度仍较低,或者 ASMCs 上还可能还存在其它类型的促进细胞增殖的信号转导通道,有待进一步研究。

以上实验结果表明,一定浓度的 IL-19 可以抑制哮喘大鼠 ASMCs 的增殖。目前对于已形成的气道重塑当前尚无特效药物,大力加强防治哮喘气道重塑药物的研究势在必行,本课题为哮喘的防治提供了新思路。关于 IL-19 抑制哮喘气道平滑肌细胞增殖的具体机制还未完全阐明,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Chung KF. Airway smooth muscle cells: contributing to and regulating airway mucosal inflammation [J]. Eur Respir J, 2000, 15(5):961-968
- [2] Dumoutier L, Leemans C, Lejeune D, et al. [J]. J Immunol, 2001, 167(7):3545-3549.
- [3] Wolk K, Kunz S, Asadullah K, et al. [J]. J Immunol, 2002, 168(11):5397-5402.
- [4] Fickenscher H, Hor S, Kupers H, et al. [J]. Trends Immunol, 2002, 23(2):89-96.
- [5] Johnson PR, Roth M, Tamm M, et al. Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 164(3):474-477.
- [6] Bai J, Liu XS, Xu YJ, et al. Extracellular signal-regulated kinase activation in airway smooth muscle proliferation in chronic asthmatic rats. Acta physiologica sinica, June 2007, 59(3):311-318
- [7] Parrish-Novak J, Xu WF, Brender Ty et al. [J]. Biological Chemistry 2002, 12(6):47517
- [8] Gallagher G, Dickensheets H, Eskdale J, et al. [J]. Genes Immun, 2000, 1(7):442-450.
- [9] Tian Y, Laura J, Sommerville et al. [J]. The American Journal of Pathology 2008, 173:901-909
- [10] Kavurma MM, Khachigian LM. ERK, JNK and p38 MAP kinases differentially regulate Proliferation and migration of phenotypically distinct smooth muscle cell subtypes [J]. J Cell Biochem 200-3, 89(2):289-300.

(修回日期)2010-12-29

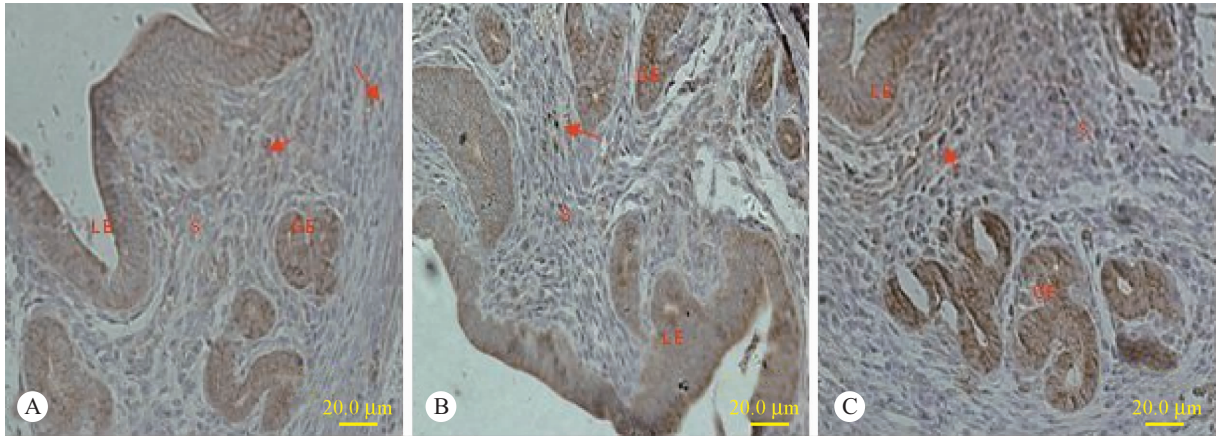


图 2 各处理组小鼠子宫内膜中 ER 免疫组织化学分析

Fig. 2 The immunohistochemistry analysis of ER in endometrium of the mouse

注:A 对照组;B 50mg/kg 组;C 400mg/kg 组。GE:腺上皮,LE:腔上皮,S:基质;箭头所指为 ER 阳性细胞,ER 在小鼠子宫内膜三种细胞类型的胞核中都有表达(SABC)

Note: A control group; B 50mg/kg group; C 400 mg/kg group. GE: glandular epithelium; LE: luminal epithelium; S: endometrial stroma. Arrow directs the positive staining nucleus of ER. The three types of cells in endometrium are positive staining (SABC)



图 1 大鼠气道平滑肌细胞生长形态

Fig. 1 Growth form of rat's ASMCS



图 2 大鼠气道平滑肌细胞 α-actin 免疫细胞化学染色

Fig. 2 immunocytochemical staining of α-actin in ASMCS