

· 论著 ·

大蒜素对气道平滑肌细胞 α -平滑肌肌动蛋白表达的抑制作用及其机制研究

魏晓阳

【摘要】目的 观察大蒜素对气道平滑肌细胞(ASMC) α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达的影响,以评价大蒜素对气道重塑的抑制作用,并探讨其相应的作用机制。**方法** 用 0、2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的大蒜素处理人 ASMC 细胞 48 h 后提取细胞总 RNA 和蛋白。荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测细胞 α -SMA mRNA 表达,蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测细胞 α -SMA 和磷酸化 Smad1(p-Smad1)的蛋白表达。**结果** 随着大蒜素处理 ASMC 细胞浓度的提高(0、2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$),细胞 α -SMA mRNA 表达呈进行性下降(分别为 0.543 ± 0.121 、 0.354 ± 0.072 、 0.223 ± 0.058 、 0.191 ± 0.034),各剂量间两两比较差异有统计学意义(均 $P < 0.05$); α -SMA 和 p-Smad1 的蛋白表达也呈进行性下降 [α -SMA 蛋白(灰度值比值)分别为 0.96 ± 0.02 、 0.72 ± 0.16 、 0.54 ± 0.11 、 0.31 ± 0.14 , p-Smad1 蛋白(灰度值比值)分别为 0.94 ± 0.03 、 0.76 ± 0.13 、 0.62 ± 0.11 、 0.43 ± 0.12],各剂量间两两比较差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** 大蒜素可以剂量依赖性地下调 ASMC 细胞 α -SMA 的 mRNA 和蛋白表达,抑制 Smad 蛋白的磷酸化,阻止转化生长因子 $-\beta$ (TGF- β)和 Rho 激酶信号通路。

【关键词】 大蒜素; 支气管哮喘; α -平滑肌肌动蛋白; Smad 蛋白

Down-regulation of expression of α -smooth muscle actin in airway smooth muscle cells by allicin and its mechanisms WEI Xiao-yang. Department of Pulmonology, the First Hospital Affiliated to General Hospital of PLA, Beijing 100048, China

Corresponding author: WEI Xiao-yang, Email: yixueqikanw@126.com

【Abstract】Objective To investigate the effect of allicin on the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) in airway smooth muscle cells (ASMC), and to evaluate the mechanism of allicin on inhibition of airway remodeling. **Methods** The human ASMCs were treated for 48 hours with 0, 2.5, 5.0, and 10.0 $\mu\text{mol/L}$ allicin, respectively, and the total RNA and protein of the cells were collected. The mRNA expression of α -SMA was determined by real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis. The protein expression of α -SMA and phosphorylation Smad1 (p-Smad1) were assessed by Western blotting analysis. **Results** After the treatment with allicin for 48 hours in a dose of 0, 2.5, 5.0, and 10.0 $\mu\text{mol/L}$ respectively, the mRNA expression of α -SMA was down-regulated (0.543 ± 0.121 , 0.354 ± 0.072 , 0.223 ± 0.058 , and 0.191 ± 0.034 , respectively), with statistically significant difference among groups (all $P < 0.05$), and the protein expression of α -SMA and p-Smad1 was also gradually down-regulated in a dose-dependent manner [α -SMA protein (grad value ratio): 0.96 ± 0.02 , 0.72 ± 0.16 , 0.54 ± 0.11 , and 0.31 ± 0.14 , respectively; p-Smad1 protein (grad value ratio): 0.94 ± 0.03 , 0.76 ± 0.13 , 0.62 ± 0.11 , and 0.43 ± 0.12 , respectively], with statistically significant difference among groups (all $P < 0.05$). **Conclusion** Allicin depresses the mRNA and protein expression of α -SMA, and inhibits p-Smad1 in a dose-dependent manner, thus interrupts the transforming growth factor- β and Rho kinase signal pathway.

【Key words】 Allicin; Asthma; α -smooth muscle actin; Smad protein

支气管哮喘(哮喘)是由多种炎性细胞参与的可逆性气道阻塞性疾病,反复发作的哮喘会导致气道出现不可逆性的狭窄,在疾病发展的后期多并发肺气肿、肺源性心脏病,严重影响了患者的生存质量和生命安全,可见控制哮喘的发作和疾病的进展是整个哮喘防治的核心^[1]。激素是目前临床上控制哮喘的首选药物,而且糖皮质激素可以通过抑制炎症反应阻止哮喘的进展,但目前哮喘发作的控制率不足

2%,导致患者的病死率高达 36.7/10 万,所以,寻找新的药物也是哮喘防治研究的一个热点^[2-3]。我国从古代开始就采用中药治疗疾病,在天然来源的化合物疾病治疗方面也有着悠久的历史,随着化学分离鉴定技术的提高,大量的活性单体成分不断被分离鉴定出来。大蒜素(allicin)是从草本植物大蒜中提取的一种活性成分,有研究显示,大蒜素具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化和消炎等多种生物学功能^[4-5]。本研究中通过观察大蒜素对气道平滑肌细胞(ASMC) α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达的影响,研究大蒜素对气道重塑的抑制作用,并探讨其相关的作用机制。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.03.011

基金项目:吴阶平医学基金会临床科研专项基金(32067501083)

作者单位:100048 北京,解放军总医院第一附属医院呼吸科

通信作者:魏晓阳,Email:yixueqikanw@126.com

1 材料与方 法

1.1 试剂:青霉素、链霉素、大蒜素购自美国 Sigma 公司,胎牛血清、DMEM 培养基为美国 Gibco 公司产品,TRIzol、核酸染料、荧光定量检测聚合酶链反应(PCR)试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, α -SMA、磷酸化 Smad1 蛋白(p-Smad1)、三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 细胞培养:人 ASMC 购自德国 Sincell 公司,在 37 °C、5%CO₂ 条件下 DMEM 培养液中培养 ASMC 细胞,培养液含有 10%胎牛血清、链霉素 100 kU/L 和青霉素 100 kU/L。

1.3 荧光定量 PCR 检测 α -SMA mRNA 表达:将处于对数生长期的 ASMC 细胞接种到 6 孔板(每孔 0.5 × 10⁶ 个),待细胞贴壁后分别加入 0、2.5、5.0、10.0 μ mol/L 大蒜素处理 48 h,去上清,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,加入 1 ml TRIzol,按照试剂盒说明书操作,提取 ASMC 细胞总 RNA,反转录出 cDNA 第一链,检测 α -SMA mRNA 表达。 α -SMA 基因:上游引物 5'-CTGGCATCGTGCTGGACTC-3',下游引物 5'-GCCCATCAGGCAACTCGTA-3',荧光定量 PCR 反应条件:94 °C 15 s,59 °C 40 s,30 个循环。 Δ Ct 值=目的基因 Ct 值-内参 GAPDH 基因 Ct 值,基因的表达量用 2^{- Δ Ct} 值表示。

1.4 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测 α -SMA 和 p-Smad1 蛋白表达:将处于对数生长期的 ASMC 细胞接种到 6 孔板(每孔 0.5 × 10⁶),细胞贴壁后分别加入 0、2.5、5.0、10.0 μ mol/L 的大蒜素处理 48 h,去上清,用 PBS 洗涤 2 次,加入 1 × 十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液裂解细胞,95 °C 10 min,12 000 × g 离心 10 min,取上清,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),8%分离胶,12%积层胶,80 V、2 h 电转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,在含 5%脱脂奶粉的洗膜液(TBST)中浸 PVDF 膜 1 h 封闭非特异性结合,加入 1:1000 稀释的特异性一抗 4 °C 过夜,加入 1:5000 稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗室温下 1 h,化学发光,X 线曝光。曝光图片灰度扫描,以目的蛋白与内参 GAPDH 的灰度值比值作为相对表达量。

1.5 统计学分析:应用 SPSS 12.0 统计软件处理数据,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验和方差分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大蒜素对 ASMC 细胞 α -SMA mRNA 表达的影响(表 1):0、2.5、5.0、10.0 μ mol/L 大蒜素处理 ASMC

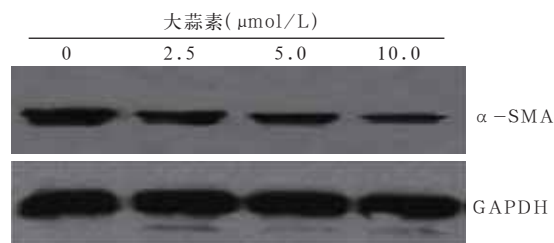
细胞后, α -SMA mRNA 表达呈剂量依赖性下调,各剂量间比较差异有统计学意义(均 *P* < 0.05)。

表 1 不同剂量大蒜素对气道平滑肌细胞 α -SMA mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

| 大蒜素浓度(μ mol/L) | 样本数 | α -SMA mRNA (2 ^{-ΔCt} 值) |
|---------------------|-----|--|
| 0 | 6 | 0.543 ± 0.121 |
| 2.5 | 6 | 0.354 ± 0.072 |
| 5.0 | 6 | 0.223 ± 0.058 |
| 10.0 | 6 | 0.191 ± 0.034 |

注: α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白;两两比较,*P* < 0.05

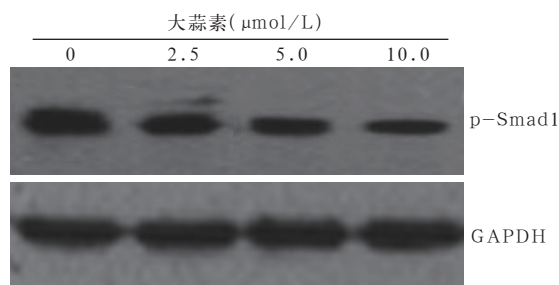
2.2 大蒜素对 ASMC 细胞 α -SMA 蛋白表达的影响(图 1):用 0、2.5、5.0、10.0 μ mol/L 的大蒜素处理 ASMC 细胞后, α -SMA 蛋白表达呈剂量依赖性下调(0.96 ± 0.02、0.72 ± 0.16、0.54 ± 0.11、0.31 ± 0.14),各剂量间比较差异有统计学意义(均 *P* < 0.05)。



α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白,GAPDH:三磷酸甘油醛脱氢酶

图 1 蛋白质免疫印迹试验检测不同剂量大蒜素对气道平滑肌细胞 α -SMA 蛋白表达的影响

2.3 大蒜素对 ASMC 细胞 p-Smad1 蛋白表达的影响(图 2):用 0、2.5、5.0、10.0 μ mol/L 的大蒜素处理 ASMC 细胞后,p-Smad1 蛋白表达呈剂量依赖性下调(0.94 ± 0.03、0.76 ± 0.13、0.62 ± 0.11、0.43 ± 0.12),各剂量间比较差异有统计学意义(均 *P* < 0.05)。



p-Smad1:磷酸化 Smad1,GAPDH:三磷酸甘油醛脱氢酶

图 2 蛋白质免疫印迹试验检测不同剂量大蒜素对气道平滑肌细胞 p-Smad1 蛋白表达的影响

3 讨 论

哮喘的本质是由嗜酸粒细胞、单核细胞等多种炎性细胞和气管上皮细胞、平滑肌细胞等多种气道固有细胞共同参与的气道慢性炎症过程,气道高反

应性是哮喘的主要临床特征^[6-8]。近期研究显示,气道固有细胞中的平滑肌细胞在哮喘的发病中起着重要作用,在炎症刺激下 ASMC 细胞可以分泌细胞外基质或者炎症因子,如白细胞介素、转化生长因子(TGF)等都参与哮喘的急性发作和病变的发展^[9-10]。 α -SMA 是平滑肌细胞的特征性蛋白,作为平滑肌细胞的主要结构蛋白,决定了 ASMC 细胞的收缩、迁移和生长等重要生命过程,其表达的升高可直接提高 ASMC 细胞的反应性,加重气道的重塑,因此,靶向 α -SMA 的治疗也是目前哮喘防治的一个新的研究方向^[11]。已有研究显示,大蒜素可以清除过氧化物,阻止氧自由基引起的气道慢性炎症^[12]。本研究表明,大蒜素可以剂量依赖性地下调 ASMC 中 α -SMA 的 mRNA 和蛋白表达,说明大蒜素具有降低气道敏感性和抑制气道重构的活性。从而证实了大蒜素可以抑制气道的慢性炎症过程。

平滑肌的增殖、收缩和迁移受到多条信号通路的调节,例如 TGF- β 和 Rho 激酶信号通路等,即使在纤维细胞向肌成纤维细胞的转变中也会受到这些信号转导通路的调控,在转化的肌成纤维细胞中, α -SMA 也是其主要的结构和收缩蛋白^[13]。复杂的网络调控使机体的生理过程处于一个平衡的状态,其中任何一个蛋白的表达失调都会导致机体疾病的发生。Smad 是 TGF- β 和 Rho 激酶信号通路的下游靶蛋白,磷酸化后的 Smad 可以入核发挥转录因子的作用,调控下游靶基因的表达,例如 α -SMA 等,所以 TGF- β 和 Rho 激酶信号通路的激活可以促进平滑肌细胞的增生和肥大等一系列生理活动^[14-15]。本研究表明,大蒜素可以剂量依赖性地下调 ASMC 细胞中 Smad1 蛋白的磷酸化水平,说明大蒜素抑制了 TGF- β 和 Rho 激酶信号通路的激活,故而其相应的靶蛋白 α -SMA 也出现了下调。

综上所述,本研究表明大蒜素可以下调 ASMC 细胞 α -SMA 的 mRNA 和蛋白表达,抑制 Smad 蛋

白的磷酸化,阻止 TGF- β 和 Rho 激酶信号通路是其作用的主要机制。

参考文献

- [1] Meng L, He X, Zhu W, et al. TLR3 and TLR7 modulate IgE production in antigen induced pulmonary inflammation via influencing IL-4 expression in immune organs. *PLoS One*, 2011, 6: e17252.
- [2] 黄擎绮. 术前应用双氯芬酸钠镇痛诱发支气管哮喘 2 例的抢救体会. *中国危重病急救医学*, 2010, 22: 431.
- [3] Bartlett NW, McLean GR, Chang YS, et al. Genetics and epidemiology: asthma and infection. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2009, 9: 395-400.
- [4] 高甜,柴惠,沃兴德. 大蒜素的药理作用及其开发应用. *医学研究杂志*, 2011, 40: 12-15.
- [5] Chang HP, Chen YH. Differential effects of organosulfur compounds from garlic oil on nitric oxide and prostaglandin E2 in stimulated macrophages. *Nutrition*, 2005, 21: 530-536.
- [6] Holgate ST. The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis. *Immunol Rev*, 2011, 242: 205-219.
- [7] 胡清华,严利华,王梦奇,等. 重症支气管哮喘合并多器官功能障碍综合征的中西医结合救治. *中国中西医结合急救杂志*, 2012, 19: 180-181.
- [8] Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J*, 2008, 31: 143-178.
- [9] Koziol-White CJ, Panettieri RA Jr. Airway smooth muscle and immunomodulation in acute exacerbations of airway disease. *Immunol Rev*, 2011, 242: 178-185.
- [10] 任克吉,张学东,孙健. 速效型肾上腺糖皮质激素在支气管哮喘中的应用. *中国危重病急救医学*, 2009, 21: 233.
- [11] Bentley JK, Hershenson MB. Airway smooth muscle growth in asthma: proliferation, hypertrophy, and migration. *Proc Am Thorac Soc*, 2008, 5: 89-96.
- [12] Chung LY. The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, alliin, and allyl disulfide. *J Med Food*, 2006, 9: 205-213.
- [13] Kuroishi S, Suda T, Fujisawa T, et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor-beta1 in mouse tracheal epithelial cells. *Respirology*, 2009, 14: 828-837.
- [14] Meyer-ter-Vehn T, Han H, Grehn F, et al. Extracellular matrix elasticity modulates TGF-beta-induced p38 activation and myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52: 9149-9155.
- [15] McMurty IF, Abe K, Ota H, et al. Rho kinase-mediated vasoconstriction in pulmonary hypertension. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 661: 299-308.

(收稿日期: 2012-07-12)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

采用富含 IgM 型免疫球蛋白治疗脓毒性休克导致的多器官功能衰竭无益

目前脓毒性休克呼吸衰竭(呼衰)的病死率仍然很高,最近一些研究表明,富含 IgM 型免疫球蛋白治疗可能对此类患者有益。为此匈牙利研究人员进行了一项临床试验,旨在观察富含 IgM 型免疫球蛋白治疗对伴有严重呼衰的早期脓毒性休克患者的疗效。33 例伴有严重呼衰的早期脓毒性休克患者被随机分为两组:富含 IgM 型免疫球蛋白治疗组(5 ml/kg, 16 例)和安慰剂组(17 例)。两组均采用 8 h 静脉滴注的方法,连续 3 d。观察指标包括:多器官功能障碍评分(MOD 评分)、血清 C-反应蛋白(CRP)和降钙素原(PCT)水平。结果发现:治疗前 8 d 患者的 MOD 评分并无明显改善;同时两组患者重症监护病房(ICU)住院时间、机械通气时间、升压药使用情况和 28 d 病死率无明显差异,两组间血清 PCT 水平也无显著差异。因此研究人员认为:富含 IgM 型免疫球蛋白制剂的使用对器官功能障碍没有任何改善作用。

林志龙,编译自《J Anesth》, 2013-01-12(电子版);胡森,审校