

Characteristics and Differences of Calcium Channels in Smooth Muscle Cells of Hot and Cold Asthmatic Rats

Zhibin Chen^{1,2}, Lijiao Wu³, Chun'e Wang¹, Keqiang Chen¹

¹The Second I Affiliated Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou Fujian

²Fujian Academy of Traditional Chinese Medicine, Fujian Fuzhou

³Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou Fujian

Email: bin669@163.com

Received: Mar. 5th, 2020; accepted: Mar. 20th, 2020; published: Mar. 27th, 2020

Abstract

Objective: To detect the concentration of calcium ion in bronchial smooth muscle cells (ASMCs) of cold and hot asthmatic rats, to explore the differences between the two types of bronchial asthma, so as to provide a theoretical basis for the treatment of cold and hot asthma. **Methods:** Twenty-seven SD rats were randomly divided into three groups: the cold asthma group, the hot asthma group, and the normal control group, with 9 rats in each group. After establishing cold and hot asthma model, fluorescence value and fluorescence area were measured by confocal microscopy, to evaluate the changes of Calcium ion concentration in bronchial smooth muscle cells of asthmatic SD rats. **Results:** (1) Comparison of fluorescence values: there were significant differences between the three groups ($P < 0.01$). The pairwise comparison between the three groups was very significant ($P < 0.01$): The hot asthmatic rats group $>$ the cold asthmatic rats group $>$ the normal group. (2) Comparison of fluorescence area: the difference of fluorescence area between the three groups was statistically significant ($P < 0.05$): Comparison between the three groups, the hot asthmatic rats group $>$ the cold asthmatic rats group $>$ the normal group. There was statistical significance in the normal group and the hot asthmatic rats group ($P < 0.05$). There was no significant difference between the normal group and the cold asthma group, and between the hot asthma group and the cold asthma group ($p > 0.05$). **Conclusion:** The increase of calcium ion concentration in bronchial smooth muscle cells is a common feature of cold and hot asthma. The increase in the hot asthma group compared with the cold asthma group may obviously be the onset of the hot asthma group, which is mostly related to infection. It is speculated that infection is also a factor leading to increased calcium ions.

Keywords

Asthma, Bronchial Smooth Muscle Cells, Calcium Channel

冷热型哮喘大鼠平滑肌内钙通道特性与差异

陈志斌^{1,2}, 吴丽娇³, 王春娥¹, 陈可强¹

¹福建中医药大学附属第二人民医院, 福建 福州

²福建省中医药科学院, 福建 福州

³福建中医药大学, 福建 福州

Email: bin669@163.com

收稿日期: 2020年3月5日; 录用日期: 2020年3月20日; 发布日期: 2020年3月27日

摘要

目的: 检测冷热型大鼠支气管平滑肌细胞(ASMCs)内钙离子浓度, 探讨两型支气管哮喘中的差异, 为冷热型哮喘治疗提供理论依据。方法: 27只SD大鼠随机分组为寒哮组、热哮组, 正常对照组, 每组9只, 构建冷热哮喘模型后, 应用共聚焦技术测定荧光值、荧光面积, 以评估哮喘SD大鼠支气管平滑肌细胞钙离子浓度变化。结果: 1) 荧光值比较: 3组间差异, 有统计学意义($P < 0.01$)。3组间两两比较, 差异均非常显著($P < 0.01$)。热哮组 > 冷哮组 > 正常组。2) 荧光面积比较: 3组间有统计学意义($P < 0.05$)。3组间两两比较, 热哮组 > 冷哮组 > 正常组。正常组与热哮组相比, 有统计学意义($P < 0.05$), 正常组与冷哮组、热哮组与冷哮组两两比较, 差异无显著性($P > 0.05$)。结论: 支气管平滑肌钙离子浓度增加, 是冷、热哮的共同特征, 热哮组较冷哮组增加明显可能是热哮组的发病, 多与感染相关, 推测感染也是导致钙离子增高的一个因素。

关键词

支气管哮喘, 支气管平滑肌, 钙通道

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

支气管哮喘是一种异质性、慢性气道炎症为特征性疾病, 主要特征是以慢性气道炎症、气道高反应性和气道重塑。钙离子作为细胞内第二信使, 发挥着调节 ASMCs 兴奋 - 收缩耦联作用。ASMCs 是导致气道重塑的主要构成因素之一, 而 ASMCs 收缩及增殖与细胞内的钙离子浓度是密不可分, 细胞内钙离子浓度升高对增加和维持 ASMCs 收缩起主要作用[1]。本研究通过共聚焦技术, 测定 3 组间 SD 大鼠支气管平滑肌荧光值、荧光面积, 探讨钙离子浓度变化对冷热型哮喘影响及其可能的机制。

2. 实验材料和方法

2.1. 材料与方法

2.1.1. 实验动物

5~6 周健康雄性大鼠, 来源南京市江宁区青龙山动物繁殖场, 生产许可证号(SCXK(苏)2017-0001)。

2.1.2. 主要设备

雾化机(粤华, WH-2000), DMEM (Hyclone, SH30809), 冰箱(海尔, BCD-196TMPI), T-25 培养瓶(Corning, 430639), CO₂ 培养箱(Thermo fisher, 3131), 荧光倒置显微镜(Nikon, Ts2R), 拉制仪参数(RAMP-20), 微电极推制器(sutter, P-1000), 激光共聚焦显微镜(Zeiss, LSM710), Flou-3AM (Solarbio, F8840), DMEM/high (Hyclone, SH30022.01B)。

主要试剂: 卵蛋白(sigma, A5503), 戊巴比妥钠(上海隆盛化工, CAS:57-33-0), 细菌脂多糖 LPS (sigma, S0130), 氢氧化铝(上海凌峰化学, 21645-51-2), PBS (南京生兴生物, SN331), I 型胶原酶(Solarbio, C8140), 木瓜蛋白酶(sigma, P4762), 胰酶(Hyclone, SH30042.01), 牛血清白蛋白(BSA) (Hyclone, SH30070.03), PBS (Hyclone, SH30070.03)。

2.1.3. 实验分组及模型建立[2] [3] [4] [5]

本课题已通过医院伦理委员会审查。随机分组分为正常对照组、冷哮喘组、热哮喘组, 每组各 9 只, 饲养于 SPF 级动物实验室, 恒温恒湿, 模拟标准日夜系统(12 h 光照/12 h 黑夜), 予以自由饮食及饮水。热哮喘模型: 大鼠自由摄食、饮水 7 天后开始造模。大鼠分别于造模第 1、8 天腹腔注射卵蛋白和氢氧化铝混悬液 1 ml (含卵清蛋白 100 mg 和氢氧化铝干粉 100 mg)致敏, 同时 0.4% 戊巴比妥钠麻醉大鼠后, 用移液管鼻滴 40 μ L 细菌脂多糖(LPS)稀释液入大鼠双侧鼻孔(终浓度 400 μ g/mL), 从第 15 天开始以 1% 卵蛋白溶液超声雾化诱发, 每次 30 min, 每日 1 次, 连续 7 d, 以大鼠出现发热、烦躁、汗多、口渴、点头、节律性收腹样喘促等现象, 提示模型复制成功。冷哮喘模型: 第 1、8 天造模方法同热哮喘组。第 15 天开始, 将大鼠放入雾化箱内, 以 1% 卵蛋白超声雾化激发, 每次 20~30 min, 每天 1 次, 同时将大鼠放入寒冷箱内(0 $^{\circ}$ C~2 $^{\circ}$ C), 每次 20 分钟, 每天 1 次, 连续 7 天; 上述方法将大鼠激发至哮喘发作, 出现点头、身体颤抖、节律性收腹样喘促现象等, 提示模型复制成功。造模成功后, 继续雾化激发及寒冷刺激 4 周。正常对照模型: 大鼠以生理盐水 1 ml 取代卵蛋白生理盐水混悬液进行腹腔注射。第 15 天开始, 以生理盐水超声雾化激发, 每次 20~30 min, 每天 1 次。

2.1.4. 支气管平滑肌的急性分离

腹腔注射大剂量戊巴比妥钠将大鼠处死后, 将肺取出, 置于含双抗的 PBS 中漂洗, 分离大鼠两侧肺组织中 3~4 级支气管, 剪成 1 mm³ 大小的组织块。加入 2 mg/ml I 型胶原酶和 2.5 mg/ml 木瓜蛋白酶, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中消化 90 min, 常温, 1000 rpm 离心 8 min, 去除上清, 加入 0.125% 胰酶 37 $^{\circ}$ C 消化 5 min, 加入含血清的 DMEM 培养基终止消化, 1000 rpm 离心 8 min, 去除上清, 加入含血清的 DMEM 培养基重悬细胞, 用 100 目筛过滤(细胞筛), 用 DMEM 培养液反复冲洗、离心 2 次, 即可得到含支气管平滑肌细胞的细胞悬液。将细胞悬液接种至 T-25 培养瓶中, 放入培养箱中培养。3 天后, 更换培养基, 待细胞长至 80%~90% 融合度时, 使用胰酶将细胞消化下来接种至 3 个培养瓶中。培养 2~3 代的细胞用于实验。

2.1.5. 免疫组化鉴定

将分离的大鼠支气管平滑肌细胞铺板于培养皿内, 制作细胞爬片, 培养 24 h 后, 去除培养液, PBS 清洗后加入多聚甲醛固定 30 min。吸去多聚甲醛后, PBS 洗 3 次后加入 3% 过氧化氢溶液, 室温下孵育 10 min, 以阻断内源性过氧化物酶。PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 吸去 PBS 后加 5% BSA 封闭 20 min (封闭电荷)。去除 BSA 液, 每孔加入 100 μ L 1:200 稀释的一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS 洗 3 次后每孔加 100 μ L 的二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。PBS 洗 3 次后, 每张切片加 50~100 μ L 新鲜配制 DAB 溶液, 显微镜控制显色。显色完全后, 蒸馏水洗, 苏木素复染, 吸去苏木素, 水洗, 镜下拍照。

2.1.6. 钙离子浓度测定

将3种不同模型的细胞从培养箱中取出，去除培养基，加入2 ml PBS 溶液，轻轻晃两次以去除培养基，去除 PBS。向培养板中加 Fluo-3/AM，置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中避光孵育 60 min。去除含有 Fluo-3/AM 的溶液，并用 PBS 清洗两遍。37℃下孵育 10 分钟，用激光共聚焦显微镜进行拍照。激发波长 506 nm，发射波长 526 nm。拍照结束后，使用 ImageJ 软件对每组细胞中钙离子荧光强度进行检测。检测出荧光值，对各组细胞荧光值进行统计分析。

2.1.7. 统计学处理

应用 SPSS23.0 统计软件，符合正态分布，用($\bar{x} \pm s$)表示，组间比较采用 t 检验和方差分析，方差齐用 LSD，不齐用 Games-Howell；不符合正态分布采用秩和检验，以中位数和四分位数表示，P < 0.05 具有统计学意义。

3. 结果

3.1. 大鼠气道平滑肌细胞的鉴定

如图 1，镜下随机选取 3 个视野拍照，可见细胞呈长梭形，细胞质内呈棕色丝状为 α -sma 蛋白表达，由此可以证明该细胞确实为大鼠支气管平滑肌细胞。

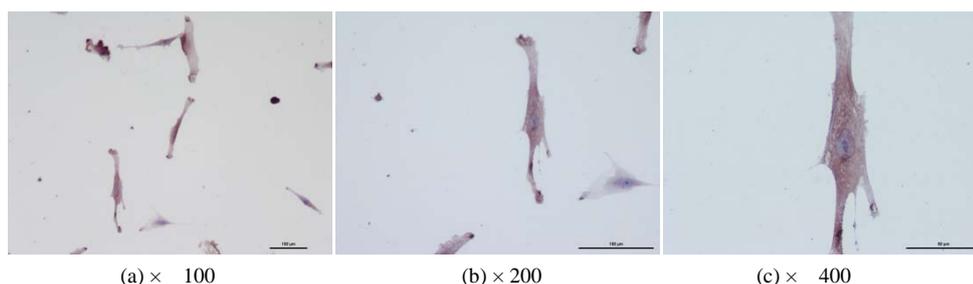


Figure 1. Bronchial smooth muscle cells in normal group at different multiples after separation.
图 1. 分离后不同倍数下正常组支气管平滑肌细胞

3.2. 钙离子浓度测定

3.2.1. 荧光值方面比较

如表 1，3 组组间荧光值比较，有非常显著性差异(P < 0.01)。荧光值热哮喘组 > 冷哮喘组 > 正常组，正常组、冷哮喘组、热哮喘组两两比较，差异均显著(P < 0.01)。

Table 1. Comparison of fluorescence values of the three groups (n, $\bar{x} \pm s$) and pairwise comparison of normal group, cold wheeze group, and hot wheeze group

表 1. 三组荧光值比较(n, $\bar{x} \pm s$)及正常组、冷哮喘组、热哮喘组两两比较

| 组别 | 例数 | 荧光值 |
|------|----|------------------------------------|
| 正常组 | 9 | 7608.038 ± 814.009 [△] |
| 冷哮喘组 | 9 | 10980.758 ± 816.689 [★] |
| 热哮喘组 | 9 | 13438.185 ± 1900.768 ^{★★} |
| F | | 46.802 |
| P | | 0.000 |

三组组间比较，P < 0.01，[△]热哮喘组与正常组比较，P < 0.01，[★]冷哮喘组与正常组比较，P < 0.01，^{★★}热哮喘组与冷哮喘组比较，P < 0.01。

3.2.2. 荧光值面积方面比较

如表 2, 三组组间荧光值面积比较, 有差异, 具有统计意义($P < 0.05$)。荧光值面积, 热哮喘组 > 冷哮喘组 > 正常组, 正常组与热哮喘组相比, 差异显著($P < 0.01$), 正常组与冷哮喘组、热哮喘组与冷哮喘组相比较, 差异无显著性($P > 0.05$)。

Table 2. Area comparison of three groups (n, $\bar{x} \pm s$) and pairwise comparison of normal group, cold wheeze group and hot wheeze group

表 2. 三组面积比较(n, $\bar{x} \pm s$)及正常组、冷哮喘组、热哮喘组两两比较

| 组别 | 例数 | 荧光面积 |
|------|----|------------------------------------|
| 正常组 | 9 | 52166.951 ± 6274.816 [△] |
| 冷哮喘组 | 9 | 56462.066 ± 6875.824 [★] |
| 热哮喘组 | 9 | 59479.835 ± 2739.161 ^{★★} |
| F | | 3.873 |
| P | | 0.035 |

三组组间比较, $P < 0.05$, [△]热哮喘组与正常组比较, $P < 0.01$, [★]冷哮喘组与正常组比较, $P > 0.05$, ^{★★}热哮喘组与冷哮喘组比较, $P > 0.05$ 。

3.2.3. 荧光值、荧光面积比较

如表 3, 正常组、哮喘组在荧光值比较, 差异显著($P < 0.01$), 具有统计意义; 在荧光面积比较, 有差异, 具有统计学意义($P < 0.05$)。

Table 3. Comparison of fluorescence value and area of normal group and asthma group (n, $\bar{x} \pm s$)/[M(P25, P75)]

表 3. 正常组、哮喘组荧光值、面积比较(n, $\bar{x} \pm s$)/[M(P25, P75)]

| 组别 | 例数 | 荧光值 | 荧光面积 |
|------------------|----|----------------------|----------------------------------|
| 正常组 | 9 | 7608.038 ± 814.009 | 52764.498 (46849.842, 55417.161) |
| 哮喘组 [◆] | 18 | 12209.471 ± 1900.688 | 58811.147 (54848.669, 61339.014) |
| t/Z | | -8.785 | 0.021 |
| P | | 0.000 | 0.020 |

[◆]哮喘组 = 冷哮喘组 + 热哮喘组; 正常组与哮喘组比较, 荧光值, $P < 0.01$, 荧光面积, $P < 0.05$ 。

4. 讨论

随着全球环境污染进一步加重, 目前我国哮喘患者约 3000 万人, 最新流行病学调查显示 14 岁以上人群患病率为 1.24%, 并呈上升趋势[6]。支气管哮喘已成为影响人们生活质量的慢性呼吸系统疾病之一。哮喘的发病机制尚不十分清楚, 其中气道慢性炎症被普遍认为是哮喘发病的本质, 这种慢性呼吸道炎症与气道高反应性(AHR)相关。近年来, 人们逐渐认识到 ASMCs 在介导哮喘的发病机制中的重要性。目前对于目前对于电压依赖性钙通道研究居多, 随着离子通道研究日渐成熟, 共聚焦技术的发展, 采用共聚焦技术检测钙离子浓度变化, 探讨 Ryanodine (RyR)受体内钙浓度变化对支气管哮喘钙通道特性影响受到重视。

细胞内钙离子来源主要经由 2 个途径, 一是由细胞内肌浆网/内质网内储存钙释放; 二是外钙内流至胞内。肌浆网上释放钙主要通过 RyR 介导。平滑肌收缩时外钙内流诱导细胞肌浆网/内质网内的储存钙释放, 是引起兴奋 - 收缩耦联的主要机制。有研究表明支气管哮喘气道高反应时 ASMCs 对多种刺激因素敏感性升高[7], 支气管收缩剂引起的 ASMCs 收缩程度升高[8]与 ASMCs 内钙离子浓度相关。为了证明

冷、热型哮喘引起钙浓度变化对 ASMCs 钙通道特性影响, 由于细胞内钙离子浓度难以测定, 我们通过共聚焦技术检测荧光值、荧光面积来反应了钙离子浓度。我们发现冷、热哮喘组的钙浓度增加, 热哮喘组较冷哮喘组增加明显, 说明冷哮喘组的细胞内钙浓度增加, 较正常情况下更容易引起支气管收缩。这可能与 ASMCs 受到外来刺激, 激活 RyR 受体, 受体兴奋使得钙通道开放而引起钙内流, 细胞内钙转移至胞浆基质, 胞浆钙浓度增高, 肥大细胞内颗粒网状化且发生形态改变, 释放介质, 引起 ASMCs 收缩有关。哮喘病人气道 ASMCs 细胞内钙离子浓度增加可使得哮喘患者气道的 ASMCs 处于无收缩的活性增加状态。此时 ASMCs 虽然没有明显收缩, 但却增加了 ASMCs 活性, 处于一触即发的高敏状态, 从而导致气道高反应性, 即使轻微的刺激即可诱发气道的痉挛[9]。王忠慧[10]等通过豚鼠研究支气管哮喘平滑肌钙通道特性, 发现 ASMCs 活性增加可能与气道高反应性相关。这也进一步证实了钙离子浓度增加, 是引起气道高反应性的主要因素。

本实验研究结果表明, 荧光值、荧光面积, 哮喘组均较正常组增高, 说明中医虽有冷哮、热哮 2 个方面的证型, 但它们都有与钙离子浓度增加相关, 这就说明了, 为什么有学者[11], 不管是冷哮, 还是热哮, 均用小青龙汤治疗均能取效的原因; 荧光值热哮钙离子浓度增加较冷哮明显。推测, 热哮患者往往是感染后发病, 感染也可能是导致钙离子浓度增加的原因, 因而, 热哮钙离子浓度增加明显。这也解释了, 临床上虽然热哮患者, 用小青龙汤能取效, 但用小青龙汤加石膏汤效果更好。热哮组较冷哮组钙离子浓度更高, 说明热哮气道高反应性, 细胞刺激阈值更低, 临证时更加注重对热哮患者的关注, 而且在中医治疗上要更加注重对哮喘患者疏风解痉治疗。荧光面积寒热两型比较, 没有显著性差异, 从数值上分析, 若加大样本量, 可能会出现与荧光值一样的差异。采取有效措施降低钙离子浓度, 减少平滑肌细胞收缩, 这可以作为支气管哮喘治疗的靶点, 也是进一步研究的方向。

基金项目

福建省自然科学基金, 编号: 2016J01566, 福建省“林求诚(陈志斌)中医肺病学术流派传承工作室项目”。

参考文献

- [1] Somlyo, A.P. and Somlyo, A.V. (1994) Signal Transduction and Regulation in Smooth Muscle. *Nature*, **372**, 231-236.
- [2] 方向明, 严郑元, 李泽庚, 刘静. 龙麻金宁方对热哮大鼠肺组织 PKBmRNA、 α -SMAmRNA 表达的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(2): 5-8.
- [3] 王智星. 平喘宁调节 ERK 信号通路对寒哮大鼠肺组织 TGF- β ₁、CyclinD1 及 EGFmRNA、PDGFmRNA 表达的研究[D]. 安徽中医药大学, 2014.
- [4] 李志勇, 孙建宁, 张硕峰. 水合氯醛和戊巴比妥钠对 SD 大鼠麻醉效果的比较[J]. 四川动物, 2008(2): 299-302.
- [5] 苗会, 薛全福, 庄逢源, 胡清华, 赵静波. 哮喘大鼠动物模型的制备[J]. 基础医学与临床, 1998(1): 73-79.
- [6] 苏楠, 林江涛, 刘国梁, 陈萍, 周新, 万欢英, 殷凯生, 马利军, 吴昌归. 我国 8 省市支气管哮喘患者控制水平的流行病学调查[J]. 中华内科杂志, 2014(8): 601-606.
- [7] Barnes, P.J. (2001) Histamine and Serotonin. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, **14**, 329-339.
- [8] Parameswaran, K., Janssen, L.J., Byrne, P.M., et al. (2002) Airway Hyperresponsiveness and Calcium Handling by Smooth Muscle. *Chest*, **121**, 621-624.
- [9] 封瑞, 李智, 滕赞, 曹禹. 哮喘豚鼠气道平滑肌细胞内钙释放通道的变化[J]. 中国药理学通报, 2007(1): 47-51.
- [10] 王忠慧, 马忠森, 周及红, 李昌辉, 张文杰, 陈冬梅, 赫国志. 哮喘豚鼠模型支气管平滑肌钙通道特性的变化[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001(9): 30-32.
- [11] 兰智慧. 小青龙汤治急性发作期支气管哮喘的疗效观察[J]. 江西中医药, 2002(1): 8-9.