

〔文章编号〕 1007-0893(2022)20-0020-04

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2022.20.006

瘦素通过上调 HIF-1 α /NF- κ B 的表达促进低氧状态下大鼠气道平滑肌细胞增殖的研究

石瑞瑞¹ 朱杰晨²

(1. 濮阳市人民医院, 河南 濮阳 457000; 2. 徐州医科大学附属医院, 江苏 徐州 221000)

〔摘要〕 **目的:** 研究瘦素对低氧状态下大鼠气道平滑肌细胞 (ASMCs) 缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) / 核因子- κ B (NF- κ B) 的表达及对细胞增殖的影响。 **方法:** 体外培养大鼠 ASMCs, 按随机数字表法将细胞分为低氧组, 瘦素+低氧组 (L200 组), 瘦素+低氧+ HIF-1 α 抑制剂组 (2ME2 组), 瘦素+低氧+ NF- κ B 抑制剂组 (PDTC 组), 瘦素+低氧+ HIF-1 α 抑制剂+ NF- κ B 抑制剂组 (2ME2 + PDTC 组)。各组均孵育 24 h 后用 CCK-8 法检测细胞增殖率, 用 Western blot 法及荧光实时定量聚合酶链式反应 (PCR) 法测定 HIF-1 α 、NF- κ B 的蛋白及信使核糖核酸 (mRNA) 的表达情况。 **结果:** L200 组与低氧组相比, HIF-1 α 、NF- κ B 的蛋白及 mRNA 表达增加; 2ME2、PDTC、2ME2 + PDTC 组与 L200 相比, HIF-1 α 、NF- κ B 的蛋白及 mRNA 表达降低, 2ME2 + PDTC 组降低均最为显著, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。L200 组与低氧组相比细胞增殖显著升高; 2ME2、PDTC、2ME2 + PDTC 组与 L200 相比细胞增殖降低, 2ME2 + PDTC 组降低更为显著; 2ME2 + PDTC 组与低氧组相比细胞增殖降低, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。 **结论:** 瘦素通过部分活化 HIF-1 α /NF- κ B 的表达而促进气道平滑肌细胞增殖, 从而对气道重塑的形成起到一定的促进作用。

〔关键词〕 瘦素; 气道平滑肌细胞; 缺氧诱导因子-1 α ; 核因子- κ B; 大鼠

〔中图分类号〕 R 392.3; R 562.2⁺5 〔文献标识码〕 A

Study of Leptin Promoted on the Proliferation of Rat Airway Smooth Muscle Cells under Hypoxia by Upregulating the expression of HIF-1 α / NF- κ B

SHI Rui-rui¹, ZHU Jie-chen²

(1. Puyang People's Hospital, Henan Puyang 457000; 2. The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Jiangsu Xuzhou 221000)

〔Abstract〕 **Objective** To investigate the expression of leptin on hypoxia-inducing factor-1 α (HIF-1 α)/nuclear factor-kappa B (NF- κ B) in rat airway smooth muscle cells (ASMCs) under hypoxia condition and its effect on cell proliferation. **Methods** Rat ASMLs were cultured in vitro, the cells were divided into hypoxia group, leptin + hypoxia group (L200 group), leptin + hypoxia + HIF-1 α inhibitor group (2ME2 group), leptin + hypoxia + NF- κ B inhibitor group (PDTC group) Leptin + hypoxia + HIF-1 α inhibitor + NF- κ B inhibitor group (2ME2 + PDTC group) according to random number table method. After incubation for 24 h, the cell proliferation rate was detected by CCK-8 method, and the expressions of HIF-1 α and NF- κ B protein and mRNA were detected by Western blot and real-time polymerase chain reaction (PCR). **Results** The protein and mRNA expressions of HIF-1 α and NF- κ B in L200 group were increased compared with that in hypoxia group. Compared with L200, the protein and mRNA expressions of HIF-1 α and NF- κ B in 2ME2, PDTC and 2ME2 + PDTC groups were decreased, and the decreases were most significant in 2ME2 + PDTC group, the differences were statistically significant ($P < 0.01$). Cell proliferation in L200 group was significantly higher than that in hypoxia group. Compared with L200, cell proliferation in 2ME2, PDTC and 2ME2 + PDTC groups was decreased, and the decrease was more significant in 2ME2 + PDTC group. The cell proliferation of 2ME2 + PDTC group was decreased compared with hypoxia group, and the differences were statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** Leptin can promote the proliferation of airway smooth muscle cells by partially activating the expression of HIF-1 α /NF- κ B, thus playing a certain role in the formation of airway remodeling.

〔Keywords〕 Leptin; Airway smooth muscle cell; Hypoxia-inducible factor-1 α ; Nuclear factor-kappa B; Rat

〔收稿日期〕 2022 - 08 - 08

〔作者简介〕 石瑞瑞, 女, 主治医师, 主要研究方向是支气管哮喘气道重塑的相关机制。

支气管哮喘（简称哮喘）最重要的病理生理改变是慢性炎症以及由其引起的慢性缺氧，不能及时诊治，可产生气道不可逆的狭窄及气道重塑，进展为重症哮喘和难治性哮喘^[1-2]。目前认为，气道重塑是引起重症哮喘和难治性哮喘的病理基础和重要原因之一，其中气道平滑肌细胞（airway smooth muscle cells, ASMCs）过度增殖是气道重塑的重要环节^[3]。难治性哮喘患者多伴有肥胖及高水平的瘦素，瘦素（leptin）是由脂肪组织分泌的蛋白质，在哮喘发病过程中具有重要作用^[4-6]。本研究前期试验表明，瘦素能够促进体外培养的大鼠 ASMCs 细胞的增殖，提示瘦素参与了哮喘的气道重塑进程^[7]。已经有研究证实低氧状态下缺氧诱导因子-1（hypoxia-inducible factor-1, HIF-1）起着主导调节作用，而核因子-κB（nuclear factor-κB, NF-κB）参与炎症的启动，二者在哮喘的炎症级联反应和气道重塑中扮演着重要的角色^[8-10]。但目前关于瘦素、缺氧二者联合在哮喘气道重塑中的作用研究甚少，本实验通过研究瘦素对低氧状态下大鼠气道平滑肌细胞 HIF-1α、NF-κB 表达的影响，进一步探讨瘦素、缺氧参与哮喘气道重塑的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

清洁级 6~7 周龄雄性 SD 大鼠，体质量 150~200 g（徐州医科大学实验动物中心提供）；瘦素、NF-κB 抑制剂吡咯烷二硫代甲酸铵（pyrrolidinedithiocarbamate, PDTC）、HIF-1α 抑制剂 2-甲氧基雌二醇（2-methoxyestradiol, 2ME2）（Sigma 公司）；β-actin 抗体（北京中杉公司）；兔抗大鼠 HIF-1α 抗体（Epitomics 公司）；兔抗大鼠 NF-κB p65 抗体（北京博奥森公司）；瘦素受体抗体（ABCAM 公司）；CCK-8 法检测试剂盒（Promega 公司）；Trizol 总 RNA 提取试剂盒、TIAN-Script cDNA 第一链合成试剂盒（北京天根公司）。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 ASMCs 的培养及鉴定 无菌摘取大鼠气道平滑肌组织，贴壁法原代培养。胰酶消化法进行 ASMCs 传代并自然纯化，实验用第 5~6 代细胞。培养的 ASMCs 经形态学观察和免疫组化法检测 α-actin 的表达进行鉴定。将第 5 代 ASMCs 按 1×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板上，待细胞贴壁后，换无血清培养液培养 24 h 后换含 1% 胎牛血清的培养液，将细胞置于低氧（1% O₂、5% CO₂、94% N₂，37℃）状态下培养，随机将细胞分为低氧组、瘦素+低氧组（L200 组）、瘦素+低氧+HIF-1α 抑制剂组（2ME2 组）、瘦素+低氧+NF-κB 抑制剂组（PDTC 组）、瘦素+低氧+HIF-1α 抑制剂+NF-κB 抑制剂组（2ME2+PDTC 组）。其中各瘦素组加入 $200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的瘦素进行干预，在瘦素干预前 30 min

各抑制剂组加入相应的抑制剂进行干预。

1.2.2 HIF-1α、NF-κB 的蛋白表达 采用 Western blot 法测定，各组均孵育 24 h 后提取细胞蛋白。依次经配胶、加样、电泳、电转及封闭后，分别加入兔抗大鼠 HIF-1α、NF-κB p65 抗体过夜，洗膜后，加入二抗（小鼠抗兔免疫球蛋白 G）孵育 2 h，以 NBT/BCIP 显色后用 Image J 软件分析条带的灰度。

1.2.3 HIF-1α、NF-κB 的信使核糖核酸表达 采用荧光实时定量聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）法测定，上述各组干预 24 h 后收集 ASMCs，Trizol 法提取总核糖核酸（ribonucleic acid, RNA），紫外分光光度法测 RNA 浓度。扩增 HIF-1α 基因引物序列：上游 5'-AGCGATGACACGGAACTG-3'，下游 5'-TCAGAGGCAGGTAATGGAGAC-3'，扩增产物长度 125 bp；扩增 NF-κB p65 基因引物序列：上游 5'-GCGTTTCCGTTACAAGTGC-3'，下游 5'-GTGAGGTGGGTCTTTGGTGA-3'，扩增产物长度 154 bp；扩增内参照 β-actin 基因引物序列：上游 5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3'，下游 5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3'，扩增产物长度 285 bp。PCR 扩增条件为：94℃ 2 min，94℃ 45 s，72℃ 90 s，共进行 40 个循环。选取 β-actin 为内参照基因，采用相对定量方式（ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ）表示各组 HIF-1α、NF-κB p65 信使核糖核酸（messenger ribonucleic acid, mRNA）的表达。

1.2.4 CCK-8 法测定细胞增值率 取 ASMCs 悬液以 1×10^5 个/孔的密度接种于 96 孔板中，分组处理细胞，每组均设 6 个平行孔，置于低氧条件下培养 24 h 后加入 CCK-8 试剂，重新放回培养箱培养 2 h 后，用酶标仪于 450 nm 检测每孔光密度（optical density, OD）值，试验重复 3 次。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 *t* 检验，计数资料用百分比表示，采用 χ^2 检验，多组间采用单因素方差分析，*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

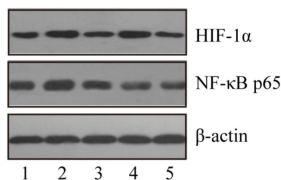
2.1 ASMCs 的鉴定

在倒置显微镜下，培养的 ASMCs 呈梭形，平行生长，束状排列，密集及稀疏处相互交替呈“峰谷”状。免疫荧光染色法表明，抗平滑肌 α-actin 抗体呈阳性染色，即胞质内可见大量的绿色荧光，证实所培养细胞为 ASMCs，见插页 2 图 1。

2.2 瘦素与各抑制剂对 ASMCs 的 HIF-1α、NF-κB 蛋白表达的影响

L200 组与低氧组相比，HIF-1α、NF-κB 的蛋白表达

增加；2ME2、PDTC、2ME2 + PDTC 组与 L200 相比，HIF-1 α 、NF- κ B 的蛋白表达降低，2ME2 + PDTC 组降低最为显著，差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)，见图 2、表 1。



注：1—低氧组；2—L200 组；3—2ME2 组；4—PDTC 组；5—2ME2 + PDTC 组；HIF-1 α —缺氧诱导因子-1 α ；NF- κ B—核因子- κ B。

图 2 Western blot 检测 HIF-1 α 、NF- κ B p65 蛋白表达电泳图

表 1 各组 ASMCs 的 HIF-1 α 、NF- κ B 蛋白表达量比较 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组 别	HIF-1 α	NF- κ B p65
低氧组	0.306 \pm 0.010	0.316 \pm 0.014
L200 组	0.532 \pm 0.015 ^a	0.523 \pm 0.011 ^a
2ME2 组	0.318 \pm 0.012 ^b	0.400 \pm 0.020 ^{ab}
PDTC 组	0.455 \pm 0.014 ^{ab}	0.310 \pm 0.022 ^b
2ME2 + PDTC 组	0.267 \pm 0.015 ^{ab}	0.251 \pm 0.013 ^{ab}

注：ASMCs—气道平滑肌细胞；HIF-1 α —缺氧诱导因子-1 α ；NF- κ B—核因子- κ B。
与低氧组比较，^a $P < 0.01$ ；与 L200 组比较，^b $P < 0.01$ 。

2.3 瘦素与各抑制剂对 ASMCs 的 HIF-1 α 、NF- κ B mRNA 表达的影响

L200 组与低氧组相比，HIF-1 α 、NF- κ B 的 mRNA 表达增加；2ME2、PDTC、2ME2 + PDTC 组与 L200 相比，HIF-1 α 、NF- κ B 的 mRNA 表达降低，2ME2 + PDTC 组降低最为显著，差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)；在 HIF-1 α 的 mRNA 表达中，2ME2 组与 PDTC 组，2ME2 + PDTC 组与低氧组相比，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，见表 2。

表 2 各组 ASMCs 的 HIF-1 α 、NF- κ B mRNA 表达量比较 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组 别	HIF-1 α	NF- κ B p65
低氧组	15.01 \pm 0.02	9.94 \pm 0.02
L200 组	22.31 \pm 0.03 ^c	15.67 \pm 0.06 ^c
2ME2 组	20.23 \pm 0.08 ^{cd}	12.59 \pm 0.02 ^{cd}
PDTC 组	20.14 \pm 0.05 ^{cd}	9.89 \pm 0.03 ^d
2ME2 + PDTC 组	14.95 \pm 0.05 ^d	6.57 \pm 0.04 ^{cd}

注：ASMCs—气道平滑肌细胞；HIF-1 α —缺氧诱导因子-1 α ；NF- κ B—核因子- κ B；mRNA—信使核糖核酸。
与低氧组比较，^c $P < 0.01$ ；与 L200 组比较，^d $P < 0.01$ 。

2.4 瘦素与各抑制剂对低氧状态下 ASMCs 增殖的影响

L200 组与低氧组相比细胞增殖显著升高；2ME2、

PDTC、2ME2 + PDTC 组与 L200 相比细胞增殖降低，2ME2 + PDTC 组降低更为显著；2ME2 + PDTC 组与低氧组相比细胞增殖降低，差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)；而 2ME2 组、PDTC 组与低氧组相比，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，见表 3。

表 3 各组 ASMCs 的增殖率比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组 别	OD 值
低氧组	0.779 \pm 0.055
L200 组	1.043 \pm 0.059 ^e
2ME2 组	0.774 \pm 0.034 ^f
PDTC 组	0.771 \pm 0.060 ^f
2ME2 + PDTC 组	0.704 \pm 0.042 ^{ef}

注：ASMCs—气道平滑肌细胞；OD—光密度。
与低氧组比较，^e $P < 0.01$ ；与 L200 组比较，^f $P < 0.01$ 。

3 讨 论

本实验结果表明：在低氧组、HIF-1 α 、NF- κ B 的蛋白及 mRNA 均有表达，提示低氧状态可增加 HIF-1 α 、NF- κ B 的转录，蛋白表达及活化；而经过瘦素处理过的 ASMCs 中 HIF-1 α 、NF- κ B 的蛋白表达和转录水平明显增加，差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)，提示瘦素对低氧处理的 ASMCs 中 HIF-1 α 、NF- κ B 的表达具有诱导作用。与 L200 组相比，单独加入 2ME2、PDTC 后部分减弱了瘦素及缺氧对 HIF-1 α 、NF- κ B 的蛋白及 mRNA 表达的诱导作用，两种抑制剂联合后其减弱作用更为显著。从实验结果可知，PDTC 可以减弱瘦素及缺氧对 HIF-1 α 的蛋白及 mRNA 表达的诱导作用，提示在瘦素及缺氧干预下 HIF-1 α 可能是通过 NF- κ B 途径来活化的。2ME2 能在转录后水平抑制 HIF-1 α 的表达，进而抑制其靶基因的表达，而实验结果却发现 2ME2 组 HIF-1 α mRNA 的表达较 L200 组有下调趋势，这可能与抑制 HIF-1 α 后，NF- κ B 的表达减少负反馈式的导致 HIF-1 α 的转录水平下调有关。

总而言之，瘦素能促进低氧状态下大鼠气道平滑肌细胞中 HIF-1 α 、NF- κ B 的表达，并且能通过调节 HIF-1 α 、NF- κ B 活性促进 ASMCs 增殖，参与气道重塑，其具体作用通路尚待进一步阐明。同时 HIF-1 α 、NF- κ B 抑制剂可部分消除瘦素对 ASMCs 增殖的促进作用，将有助于寻找新的作用靶点来减轻气道重塑，为哮喘治疗开拓新的思路和提供理论依据。

〔参考文献〕

- (1) Chen YR, Dai AG, Hu RC, et al. The expression of Hypoxia-inducible factor-1 α and its hydroxylases in pulmonary arteries of patient with chronic obstructive pulmonary disease (J). J Appl Toxicol, 2012, 28(3): 234-238.
- (2) Zhang Q, Han Z, Zhu Y, et al. Role of hypoxia inducible factor-1 in cancer stem cells(Review) (J). Mol Med Rep,

2021, 23(1): 65-67.

(3) Damera G, Tliba O, Reynoid A, et al. Airway smooth muscle as an immunomodulatory cell (J). *Pulm Pharmacol Ther*, 2009, 22(5): 353-359.

(4) Fantuzzi G, Mazzone T, Peters U, et al. Obesity and asthma (J). *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(4): 1169-1179.

(5) Imoto B, Forst T, Kern W, et al. Elevated Serum Leptin Levels in Patients With Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis (J). *Front Pharmacol*, 2021, 12(5): 36-37.

(6) Frihing BE, Boleti AP, Cardoso PH, et al. Adipose tissue, systematic inflammation, and neurodegenerative diseases (J). *Neural Regen Res*, 2022, 5(1): 38-46.

(7) 石瑞瑞, 陈显峰, 朱洁晨, 等. 瘦素促进低氧状态下大鼠气道 IF-1 α 、NF- κ B 表达 (J). *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(1): 32-35.

(8) Castillo R, Colgan SP, Taylor CT, et al. Hypoxia as a Modulator of Inflammation and Immune Response in Cancer (J). *Cancers(Basel)*, 2022, 14(9): 73-75.

(9) Li LF, Wu HP, Liu PC, et al. Reduction in Ventilation-Induced Diaphragmatic Mitochondrial Injury through Hypoxia-Inducible Factor 1alpha in a Murine Endotoxemia Model (J). *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 66-68.

(10) Ye L, Jia G, Li Y, et al. C1q/TNF-related protein 4 restores leptin sensitivity by downregulating NF-kappaB signaling and microglial activation (J). *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 159-160.

[文章编号] 1007-0893(2022)20-0023-04

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2022.20.007

莫西沙星序贯治疗老年人细菌性肺炎的临床研究

林国盛 林群英 方利军 张玫怡 吴良宁

(莆田学院附属医院, 福建 莆田 351100)

[摘要] **目的:** 探讨莫西沙星序贯治疗老年人细菌性肺炎对 2 代测序技术 (NGS) 阳性率与临床指标的影响。**方法:** 回顾性分析莆田学院附属医院 2020 年 1 月至 2022 年 1 月期间接受治疗的 98 例细菌性肺炎老年患者, 根据治疗用药方案分为 A 组与 B 组, 各 49 例。A 组患者采用头孢类药物序贯治疗, B 组患者采用莫西沙星序贯治疗。比较两组患者治疗前后 NGS 阳性率, 观察治疗前后两组患者各项临床指标的变化情况。**结果:** B 组患者咳嗽、湿啰音消失时间与白细胞、体温复常时间均短于 A 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。治疗后两组患者第 1 秒用力呼气量占用力肺活量比值 (FEV1%)、最大呼气中段流量 (MMEF)、最大通气量 (MVV) 均有不同程度提高, 且治疗后 B 组患者 FEV1%、MMEF、MVV 均高于 A 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。治疗后两组患者血清超敏 C 反应蛋白 (hs-CRP)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、降钙素原 (PCT) 水平均有不同程度下降, 且治疗后 B 组患者血清 hs-CRP、TNF- α 、PCT 水平均低于 A 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。治疗后 B 组患者 NGS 阳性率为 4.08% (2/39), 低于 A 组的 24.49% (12/39), 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:** 与头孢类药物相比采用莫西沙星治疗老年人细菌性肺炎疗效更为理想, 能够更为有效的杀灭致病菌。

[关键词] 细菌性肺炎; 莫西沙星; 序贯治疗; 老年人

[中图分类号] R 563.1 **[文献标识码]** B

Clinical Study of Moxifloxacin Sequential Therapy in Elderly Patients with Bacterial Pneumonia

LIN Guo-sheng, LIN Qun-ying, FANG Li-jun, ZHANG Mei-yi, WU Liang-ning

(Affiliated Hospital of Putian University, Fujian Putian 351100)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of moxifloxacin sequential therapy on the positive rate of next-generation sequencing (NGS) and clinical indicators in elderly patients with bacterial pneumonia. **Methods** A total of 98 elderly patients with bacterial pneumonia treated in the Affiliated Hospital of Putian University from January 2020 to January 2022 were retrospectively analyzed. According to the treatment regimen, they were divided into group A and group B, with 49 cases in each group. Patients in group A were treated with cephalosporins, and patients in group B were treated with moxifloxacin. The positive rate of NGS before

[收稿日期] 2022 - 08 - 29

[作者简介] 林国盛, 男, 副主任医师, 主要研究方向是呼吸感染与肺癌。