

# 组蛋白去乙酰化酶 2 在结核性气道狭窄组织中的表达

肖阳宝<sup>1</sup>, 柳广南<sup>2</sup>, 周磊<sup>2</sup>, 罗莉<sup>1</sup>, 罗林紫<sup>1</sup>, 卢志斌<sup>1</sup>, 黄国军<sup>1</sup>, 陈安基<sup>1</sup>, 冯丹<sup>1</sup>

1. 湖南省胸科医院, 湖南 长沙 410013; 2. 广西医科大学第二附属医院, 广西 南宁 530007

**摘要:** **目的** 检测结核性气道狭窄组织中组蛋白去乙酰化酶 2(histone deacetylase 2, HDAC2) 的表达情况。 **方法** 收集经湖南省胸科医院诊断的气管支气管结核患者的气道肉芽组织标本、气管支气管结核患者瘢痕支气管手术组织标本、因肺部病变手术后的正常支气管组织标本 40 例, 用免疫组化方法检测转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ 1)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、核因子- $\kappa$ B(nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)、HDAC2 的表达情况, 比较各组的差异, 分析 TGF- $\beta$ 1、VEGF、NF- $\kappa$ B 与 HDAC2 表达的关系。用 Western blot 方法检测 HDAC2 的表达情况, 比较各组的差异。 **结果** ①免疫组化结果显示结核性增生性气道狭窄组增生肉芽组织中 TGF- $\beta$ 1、VEGF、NF- $\kappa$ B 阳性表达率高于结核性瘢痕性气道狭窄组及正常对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 结核性增生性气道狭窄组和结核性瘢痕性气道狭窄组支气管组织中 HDAC2 阳性表达率低于正常对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Spearman 相关分析结果显示 TGF- $\beta$ 1、VEGF 和 NF- $\kappa$ B 的阳性表达与 HDAC2 的阳性表达呈负相关, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。②Western blot 结果显示结核性增生性气道狭窄组和结核性瘢痕性气道狭窄组支气管组织中 HDAC2 蛋白表达量低于正常对照组, 差异有统计学意义( $F = 178.192, P < 0.05$ )。 **结论** 局部增强的炎症反应参与了结核性气道狭窄的发生, 且与 HDAC2 的低表达相关, 提示 HDAC2 可作为治疗结核性气道狭窄的潜在靶点。

**关键词:** 气道狭窄; 支气管结核; 组蛋白去乙酰化酶 2; 转化生长因子  $\beta$ 1; 血管内皮生长因子; 核因子  $\kappa$ B

**中图分类号:** R521 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2020)02-0240-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2020.02.033

结核性气道狭窄是目前我国最常见的良性气道狭窄, 引起患者通气功能障碍和分泌物引流障碍, 呼吸困难和阻塞性肺炎, 严重者可出现呼吸衰竭, 甚至窒息死亡, 但是发病机制尚不清楚。气道炎症在气道狭窄中起重要作用, 研究表明气管插管或气管切开后气道狭窄的发病与损伤后局部炎症及全身的炎症反应相关, 使成纤维细胞在受损的气管上激活, 产生持续或过度的成纤维细胞增殖, 导致气道狭窄。通过抑制炎症反应, 下调炎症因子表达, 抑制肉芽组织的过度增生和纤维化, 可以有效减轻支气管损伤后的气道狭窄<sup>[1-2]</sup>。组蛋白去乙酰化酶 2(histone deacetylase 2, HDAC2) 是炎症反应调节的重要因素, 研究证实红霉素等抗炎药物可以上调巨噬细胞、A549 细胞的 HDAC2 的表达, 减少炎症因子的释放<sup>[3-4]</sup>。本研究评估结核性气道狭窄支气管组织中炎症反应表达水平和 HDAC2 在结核性气道狭窄支气管组织中的表达情况, 同时分析结核性气道狭窄支气管组织炎症反应表达水平与 HDAC2 表达的关系, 为临床防治结核性气道狭窄提供理论依据和新思路。

**基金项目:** 湖南省自然科学基金项目(2017JJ2167); 湖南省自然科学基金省市联合基金项目(2018JJ4013)

**作者简介:** 肖阳宝(1980-), 男, 博士研究生, 副主任医师, 主要从事气管支气管结核的介入诊疗工作。

## 1 材料与方法

**1.1 标本收集** 收集 40 例湖南省胸科医院住院患者的组织标本, 其中结核性增生性气道狭窄组(增生组)20 例, 标本为气道增生肉芽组织, 结核性瘢痕性气道狭窄组(瘢痕组)10 例, 标本为瘢痕性支气管组织, 正常对照组(正常组)10 例, 标本为正常支气管组织。采集标本前所有患者均签署了知情同意书, 并经该院伦理委员会批准。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 病理学观察** 气道组织标本于多聚甲醛中固定, 脱水后石蜡包埋, 切片, 常规 HE 染色, 光学显微镜下观察。

**1.2.2 免疫组化分析** 对石蜡包埋的气道组织后行免疫组化检测, 分析观察各组组织中 TGF- $\beta$ 1、VEGF、NF- $\kappa$ B、HDAC2 的表达, 高倍镜(X400)下每张切片随机取 5 个视野拍摄, 综合染色细胞及染色程度的百分率进行分析评分, 两项评分相加, 得 0 分者判断为阴性(-), 得 1~2 分者为弱阳性(+), 得 3~4 分者为阳性(++), 得 5~6 分者为强阳性(+++)。全部切片均仔细阅片两次, 保证实验结果的可重复性。

**1.2.3 Western blot 分析** 检测各组组织 HDAC2 蛋白的表达, 胶片于凝胶成像仪下拍照, 用 Quantity One 软件分析图像。

**1.3 统计学方法** 应用 SPSS 17.0 软件对实验数据

进行统计学分析;各组数据均先行正态性检验及方差齐性检验,计量资料符合正态分布的以( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组均数间的比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。等级资料采用秩和检验。相关系数的评估采用 Spearman 相关分析方法。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组支气管组织 HE 染色结果** 增生组肉芽组织可见大量浸润的炎症细胞,成纤维细胞增生,小血管增生(图 1);瘢痕性支气管组织可见粘膜下层腺体减少,纤维结缔组织结构紊乱增厚(图 2);正常支气管组织黏膜、黏膜下层结构清晰可见,黏膜下层纤维结缔组织疏松,见少量淋巴细胞(图 3)。

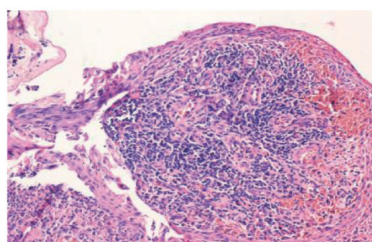


图 1 增生肉芽组织( $\times 200$  倍)

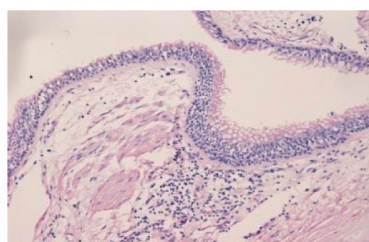


图 2 瘢痕性支气管组织( $\times 200$  倍)

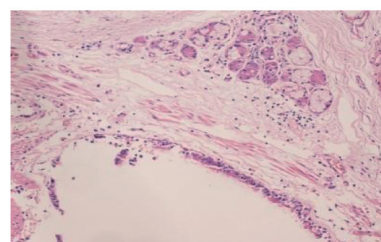


图 3 正常支气管组织( $\times 200$  倍)

**2.2 各组支气管组织 TGF- $\beta 1$ 、VEGF、NF- $\kappa B$ 、HDAC2 的表达(免疫组织化学)** TGF- $\beta 1$ 、VEGF 主要定位于细胞浆,NF- $\kappa B$ 、HDAC2 主要定位于细胞核,阳性被染成棕黄色或棕色(图 4~图 15)。经秩和检验,增生组 TGF- $\beta 1$ 、VEGF、NF- $\kappa B$  阳性表达率高于瘢痕组和正常组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),瘢痕组与正常组比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),增生

组和瘢痕组 HDAC2 阳性表达率低于正常组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),增生组与瘢痕组比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )(表 1)。Spearman 相关分析结果显示 TGF- $\beta 1$ 、VEGF 和 NF- $\kappa B$  的阳性表达率与 HDAC2 的阳性表达率呈负相关,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )(表 2),TGF- $\beta 1$ 、VEGF 和 NF- $\kappa B$  的表达随 HDAC2 的表达增加而下降。

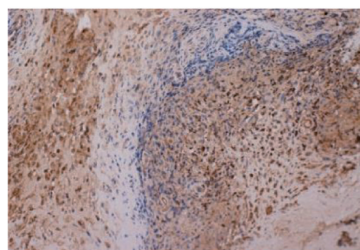


图 4 TGF- $\beta 1$ (增生组)( $\times 200$  倍)

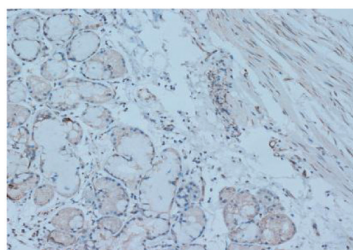


图 5 TGF- $\beta 1$ (瘢痕组)( $\times 200$  倍)

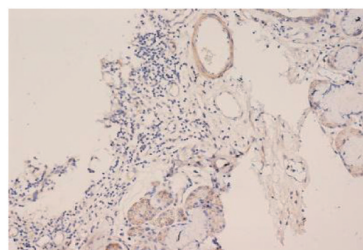


图 6 TGF- $\beta 1$ (正常组)( $\times 200$  倍)

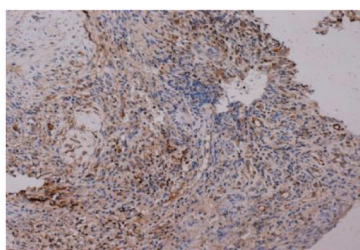


图 7 VEGF(增生组)( $\times 200$  倍)

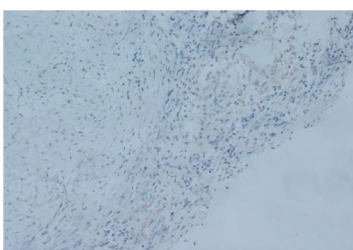


图 8 VEGF(瘢痕组)( $\times 200$  倍)

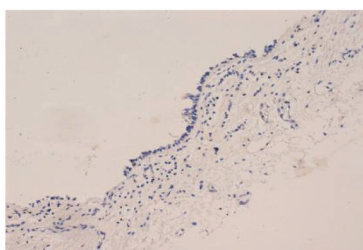


图 9 VEGF(正常组)( $\times 200$  倍)

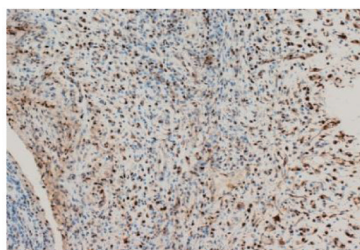


图 10 NF- $\kappa B$ (增生组)( $\times 200$  倍)

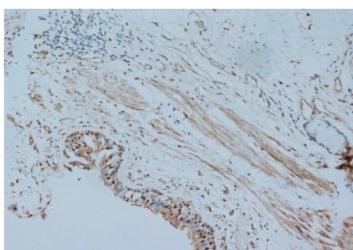


图 11 NF- $\kappa B$ (瘢痕组)( $\times 200$  倍)

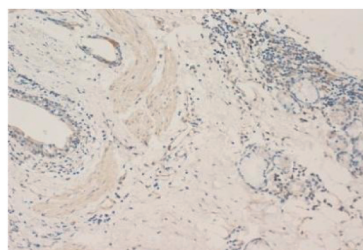


图 12 NF- $\kappa B$ (正常组)( $\times 200$  倍)



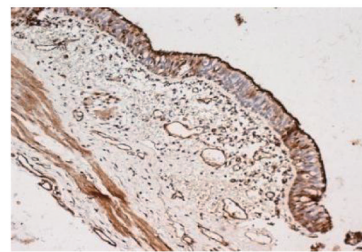
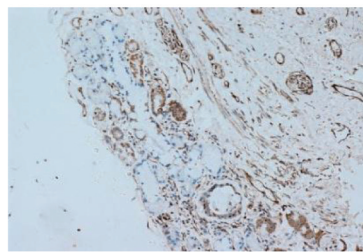
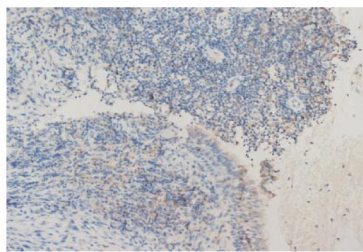


图 13 HDAC2(增生组)( $\times 200$  倍) 图 14 HDAC2(瘢痕组)( $\times 200$  倍) 图 15 HDAC2(正常组) $\times 200$  倍)

表 1 各组支气管中 TGF- $\beta$ 1、VEGF、NF- $\kappa$ B、HDAC2 表达情况( $n, \%$ )

指标	组别	例数	阴性	弱阳性	阳性	强阳性
TGF- $\beta$ 1	增生组	20	0(0)	1(5)	7(35)	12(60)
	瘢痕组 <sup>a</sup>	10	3(30)	6(60)	1(10)	0(0)
	正常组 <sup>ac</sup>	10	5(50)	5(50)	0(0)	0(0)
VEGF	增生组	20	0(0)	3(15)	5(25)	12(60)
	瘢痕组 <sup>a</sup>	10	6(60)	4(40)	0(0)	0(0)
	正常组 <sup>ac</sup>	10	7(70)	3(30)	0(0)	0(0)
NF- $\kappa$ B	增生组	20	0(0)	0(0)	4(20)	16(80)
	瘢痕组 <sup>a</sup>	10	5(50)	5(50)	0(0)	0(0)
	正常组 <sup>ac</sup>	10	6(60)	4(40)	0(0)	0(0)
HDAC2	增生组	20	0(0)	18(90)	2(10)	0(0)
	瘢痕组 <sup>b</sup>	10	0(0)	7(70)	3(30)	0(0)
	正常组 <sup>ad</sup>	10	0(0)	1(10)	4(40)	5(50)

注:a:与增生组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); b:与增生组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); c:与瘢痕组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); d:与瘢痕组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 2 TGF- $\beta$ 1、VEGF、NF- $\kappa$ B 表达与 HDAC2 表达的关系

指标	HDAC2	
	$r$	$P$
TGF- $\beta$ 1	-0.551	0.000
VEGF	-0.613	0.000
NF- $\kappa$ B	-0.600	0.000

2.3 Western blot 检测各组支气管组织 HDAC2 蛋白的表达结果 增生组和瘢痕组支气管组织中 HDAC2 蛋白表达量低于正常对照组,  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义;增生组与瘢痕组比较差异无统计学意义,见表 3、图 16。

表 3 各组支气管组织中 HDAC2 蛋白的表达量( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	HDAC2 蛋白
增生组	20	180.52 $\pm$ 17.59 <sup>ab</sup>
瘢痕组	10	227.89 $\pm$ 23.86 <sup>a</sup>
正常组	10	316.26 $\pm$ 13.96
$F$ 值		178.192
$P$ 值		0.000

注:a:与正常组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); b:与瘢痕组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

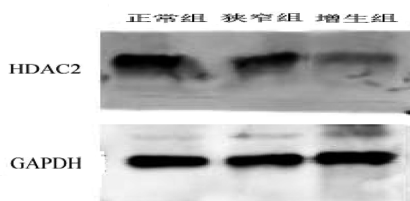


图 16 各组支气管组织中 HDAC2 蛋白的表达量

### 3 讨论

结核性气道狭窄是目前我国最常见的良性气道狭窄,包括增生性狭窄和瘢痕性狭窄,发病机理尚不明确。目前的研究认为气道粘膜损伤后修复启动引起的异常纤维增生修复,气道内瘢痕组织形成最终导致气道狭窄<sup>[5-6]</sup>。良性气道狭窄的基本组织病理改变包括局部炎症细胞浸润、小血管增生、成纤维细胞增殖及主要为 I 型胶原蛋白(collagen type I, Col-I)、III 型胶原蛋白(collagen type III, Col-III)的细胞外基质堆积<sup>[6-9]</sup>。

包括 TGF- $\beta$ 1、VEGF、HIF-1 $\alpha$ 、IL-8、IL-6、IL-1、TNF 等多种炎症因子及细胞因子参与了上述病理改变<sup>[10-12]</sup>。其中 TGF- $\beta$ 1 是成人组织损伤后修复的关键细胞因子之一,主要作用是促进成纤维细胞增殖并分泌胶原,最终形成瘢痕组织<sup>[13-14]</sup>。在伤口愈合的各个阶段中,TGF- $\beta$ 1 均有参与,其中包括炎症反应、血管生成、上皮再生、细胞外基质沉积和伤口重建等。炎症期,TGF- $\beta$ 1 刺激成纤维细胞的增殖、迁移和细胞外基质合成;增殖期,TGF- $\beta$ 1 促进血小板源生长因子(PDGF)等细胞因子的分泌;瘢痕成熟期,TGF- $\beta$ 1 刺激 Col-I、Col-III、Col-IV 胶原、纤连蛋白、蛋白聚糖和其他细胞外基质成分的合成。Lee 等<sup>[7]</sup>经支气管镜取得病因包括气管插管、气管切开及异物刺激导致的 12 例气道狭窄患者的气道肉芽组织,采用免疫组织化学方法检测肉芽组织中 TGF- $\beta$ 1 的表达情况,结果显示肉芽组织中 TGF- $\beta$ 1 高表达,认为 TGF- $\beta$ 1 在良性气管狭窄的形成密切相关。气管支气管结核(TB)患者支气管肺泡灌洗液中 TGF- $\beta$ 1 水平升高,提示 TGF- $\beta$ 1 与 TB 所致狭窄的发病机制有关<sup>[15]</sup>。

VEGF 广泛表达于人体组织,是最重要的诱导新生血管形成的细胞因子,在肉芽组织的增生、创伤组织的愈合中发挥重要作用。VEGF 受包括 TGF- $\beta$ 、IL-1、TNF- $\alpha$ 、PDGF、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、前列腺素 E(prostaglandin E, PGE)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)等多种因子调控<sup>[16]</sup>。VEGF 在良性气道狭窄肉芽组织中表达增高,

而且与 TGF- $\beta$ 1 关系密切, VEGF 及其受体受 TGF- $\beta$ 1 诱导后表达上调, 新生血管形成增加, 组织的修复和重建作用得到加强<sup>[11,15]</sup>。

核因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B) 是一种人体广泛存在的转录因子, 激活的 NF- $\kappa$ B 调节多种前炎症因子的表达合成, 在炎症过程中发挥重要的关系。研究表明红霉素可以降低肺纤维化大鼠肺泡巨噬细胞中的 NF- $\kappa$ B 活性, 肺组织 IL-1 $\beta$  及 TGF- $\beta$ m RNA 表达降低<sup>[15]</sup>。

通过炎症基因的转录与调控来实现炎症细胞及炎症介质的活化与释放, 而调节炎症基因转录的“开关”为组蛋白乙酰化和去乙酰化: 乙酰化促使炎症基因转录表达, 而 HDAC2 则可以抑制组蛋白的乙酰化, 抑制炎症基因转录表达<sup>[18-19]</sup>。

HDAC2 是炎症反应调节的重要因素, 当 HDAC2 活性减弱时, NF- $\kappa$ B 转录增加, 前炎症因子 IL-8 及 TNF- $\alpha$  的活性明显增强<sup>[19-20]</sup>, 同时研究证实通过增加氧化应激下单核细胞 HDAC (其中以 HDAC2 明显) 的活性, 可以减少 NF- $\kappa$ B 转录活性及 IL-8 合成<sup>[21]</sup>。红霉素等抗炎药物可以上调巨噬细胞、A549 细胞的 HDAC2 的表达, 减少炎症因子的释放<sup>[3-4]</sup>。

在本部分实验中, 通过免疫组化的研究方法发现结核性增生性气道狭窄组增生肉芽组织中 TGF- $\beta$ 1、VEGF、NF- $\kappa$ B 阳性表达率高于结核性瘢痕性气道狭窄组及正常对照组, 证实在增生修复期局部炎症反应增强, 随着病情进展, 由增生修复期向瘢痕成熟期转变, 细胞外基质局部沉积, 瘢痕形成, 炎症反应逐步减弱; 结核性增生性气道狭窄组和结核性瘢痕性气道狭窄组支气管组织中 HDAC2 阳性表达率低于正常对照组, 同时通过 Western blot 的研究方法也发现结核性增生性气道狭窄组和结核性瘢痕性气道狭窄组支气管组织中 HDAC2 蛋白表达量低于正常对照组, 与免疫组化结果相符, 证实了 HDAC2 在结核性气道狭窄组织中的表达量是下降的。进一步用 Spearman 相关分析方法分析 TGF- $\beta$ 1、VEGF、NF- $\kappa$ B 阳性表达率与 HDAC2 阳性表达率的关系, 结果显示 TGF- $\beta$ 1、VEGF、NF- $\kappa$ B 的表达均与 HDAC2 的表达呈负相关, 提示 HDAC2 的下调与局部组织中炎症反应的增强密切相关。

综上所述, 结核性狭窄气道组织中 TGF- $\beta$ 1、VEGF、NF- $\kappa$ B 表达增加, 且与调节炎症反应的 HDAC2 表达下降密切相关, 提示局部增强的炎症反应参与了结核性气道狭窄的发生, 与 HDAC2 的低表达相关。HDAC2 可作为治疗结核性气道狭窄的潜在靶点。

## 参考文献

- [1] 徐明鹏, 李莉华, 甘罗曼, 等. 红霉素预防免气管损伤后气管狭窄研究[J]. 国际呼吸杂志, 2017, 37(11): 835-841.
- [2] 李莉华, 徐明鹏, 甘罗曼, 等. 小剂量红霉素对气管损伤后肉芽组织增生的影响[J]. 中华医学杂志, 2017, 97(10): 777-781.
- [3] Li M, Zhong X, He Z, et al. Effect of erythromycin on cigarette-induced histone deacetylase protein expression and nuclear factor- $\kappa$ B activity in human macrophages *in vitro* [J]. Int Immunopharmacol 2012, 12(4): 643-650.
- [4] 傅钰雁, 柳广南, 黄斯明, 等. 红霉素对氧化应激下 A549 细胞的影响[J]. 广东医学, 2014(3): 340-344.
- [5] Dohar JE, Klein EC, Betsch JL, et al. Acquired subglottic stenosis—depth and not extent of the insult is key[J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 1998, 46(3): 159-170.
- [6] Correa Reis JG, Takiya CM, Lima Carvalho A, et al. Myofibroblast persistence and collagen type I accumulation in the human stenotic trachea [J]. Head Neck, 2012, 34(9): 1283-1293.
- [7] Liu H, Chen JC, Holinger LD, et al. Histopathologic fundamentals of acquired laryngeal stenosis[J]. Pediatr Pathol Lab Med, 1995, 15(5): 655-677.
- [8] Pokharel RP, Maeda K, Yamamoto T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in exuberant tracheal granulation tissue in children [J]. J Pathol, 1999, 188(1): 82-86.
- [9] Ma G, Samad I, Motz K, et al. Metabolic variations in normal and fibrotic human laryngotracheal-derived fibroblasts: a Warburg-like effect [J]. Laryngoscope, 2017, 127(3): E107-E113.
- [10] Puyo CA, Dahms TE. Innate immunity mediating inflammation secondary to endotracheal intubation [J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2012, 138(9): 854-858.
- [11] Lee YC, Hung MH, Liu LY, et al. The roles of transforming growth factor- $\beta$ 1 and vascular endothelial growth factor in the tracheal-granulation formation [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2011, 24(1): 23-31.
- [12] Cai Z, Li H, Zhang H, et al. Novel insights into the role of hypoxia-inducible factor-1 in the pathogenesis of human post-intubation tracheal stenosis [J]. Mol Med Rep, 2013, 8(3): 903-908.
- [13] Bullard KM, Cass DL, Banda MJ, et al. Transforming growth factor  $\beta$ 1 decreases interstitial collagenase in healing human fetal skin [J]. J Pediatr Surg, 1997, 32(7): 1023-1027.
- [14] Gill IS, Novick AC, Soble JJ, et al. Laparoscopic renal cryoablation: initial clinical series [J]. Urology, 1998, 52(4): 543-551.
- [15] Zhang J, Li Q, Bai C, et al. Inhalation of TGF- $\beta$ 1 antibody: a new method to inhibit the airway stenosis induced by the endobronchial tuberculosis [J]. Med Hypotheses, 2009, 73(6): 1065-1066.
- [16] Affleck DG, Bull DA, Bailey SH, et al. PDGF (BB) increases myocardial production of VEGF: shift in VEGF mRNA splice variants after direct injection of bFGF, PDGF (BB), and PDGF (AB) [J]. J Surg Res, 2002, 107(2): 203-209.
- [17] 李永春, 何冰, 王海斌. 红霉素对肺纤维化大鼠核因子  $\kappa$ B 活性及细胞因子 mRNA 表达的影响 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 1999, 22(12): 725-727.
- [18] Yao H, Rahman I. Current concepts on oxidative/carbonyl stress, inflammation and epigenetics in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2011, 254(2): 72-85.
- [19] Adenuga D, Yao H, March TH, et al. Histone deacetylase 2 is phosphorylated, ubiquitinated, and degraded by cigarette smoke [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009, 40(4): 464-473.
- [20] Barnes PJ. Role of HDAC2 in the pathophysiology of COPD [J]. Annu Rev Physiol, 2009, 71: 451-464.
- [21] 姚伦凯, 柳广南, 黄斯明, 等. 烟草烟雾暴露对肺腺癌患者外周血 HDAC2、IL-8 和 TNF- $\alpha$  表达的影响 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2016, 15(4): 361-364.

收稿日期: 2019-04-18