

· 论 著 ·

地塞米松对实验性哮喘大鼠气道细胞 DNA 合成
和 气道重塑的影响

孔祥永¹， 栾 斌²， 贾天明²， 冯建飞²， 王秀芳²， 王西阁²， 邹丽萍²， 孙 莉²

(1. 第一军医大学珠江医院儿科 广东 广州 510282； 2. 郑州大学第三附属医院儿内科 河南 郑州 450052)

[摘 要] 目的 观察地塞米松对实验性哮喘大鼠气道细胞 DNA 合成和 气道重塑的干预效果。方法 应用 SD 大鼠建立哮喘动物模型,采用免疫组化技术和其它形态学研究的方法,研究雾化吸入地塞米松对气道细胞 DNA 合成和 气道重塑反应的影响。结果 ① 地塞米松治疗组气道上皮下胶原沉积以及粘液的分泌比模型组明显减少。② 模型组气道平滑肌细胞 Brdu 阳性计数(10.25±2.09)明显高于正常对照组(7.15±2.05)和地塞米松治疗组(6.85±2.20)($P<0.01$)。模型组气道上皮细胞 Brdu 阳性计数(21.83±7.01)亦明显高于正常对照组(16.22±4.36)和地塞米松治疗组(16.92±3.48)($P<0.05$)。结论 应用地塞米松干预可减轻实验性哮喘大鼠气道炎症,抑制气道细胞 DNA 合成,延缓气道重塑反应的发生。

[关 键 词] 哮喘； 气道重塑； 地塞米松； 大鼠

[中图分类号] R-332；R562.2+5 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2002)02-0109-02

Effect of Dexamethasone on the Cellular DNA Synthesis
and Remodelling of Airway in Asthmatic Rats

KONG Xiang-Yong, LUAN Bin, JIA Tian-Ming et al.

Department of Pediatrics, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 5100282, China

Abstract : Objective To study the effect of dexamethasone (DXM) on the cellular DNA synthesis and airway remodelling of airway in asthmatic rats. **Methods** Asthmatic model was established using SD rats. The changes of the airway wall were observed by collagen and mucus staining and Bromodeoxyuridine (BrdU)-positive cells were detected using immunohistochemical technique in the airway smooth muscle (ASM) and epithelium in the asthmatic model rats (model group), DXM inhalation rats (DXM group), and normal rats (control group). **Results** ① The collagen deposition in the subepithelium and mucus staining in the airway obviously decreased in the DXM group compared with the model group. ② The Brdu-positive cells of ASM in the model group (10.25±2.09) were significantly higher than those in the control group (7.15±2.05) and the DXM group (6.85±2.20) ($P<0.01$). The Brdu-positive cells of the epithelium in the model group (21.83±7.01) were also significantly higher than those in the control group (16.22±4.36) and the DXM group (16.92±3.48) ($P<0.05$). **Conclusions** Inhaling DXM may alleviate airway inflammation response, inhibit DNA synthesis of airway cells and prevent from developing airway remodelling in asthmatic rats.

Key words : Asthma ; Airway remodelling ; Dexamethasone ; Rat

气道重塑(airway remodelling)是难治性哮喘的病理基础,可导致气道不可逆阻塞和 气道高反应性,使肺功能进行性下降。其病理改变主要包括气道平滑肌层增厚和基底膜增厚及其玻璃样变。本研究利用卵蛋白重复刺激致敏的 SD 大鼠建立哮喘模型,观察地塞米松对气道细胞 DNA 合成和 气道重塑的影响,

为哮喘气道重塑的防治提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象及分组

健康雄性 SD 大鼠 36 只,体重 120~150 g 购于

[收稿日期] 2001-07-16；[修回日期] 2001-11-16
[作者简介] 孔祥永(1972-)男,博士研究生,主治医师。

河南医科大学实验动物中心),随机分为正常对照组、模型组和地塞米松(DXM)治疗组,每组 12 只。

1.2 方法

1.2.1 哮喘模型制备^[1,2] 整个模型制作完成需要 21 d。在第 1、2、3 天模型组和 DXM 组均每天腹腔注射卵蛋白溶液(Sigma 公司)1 ml(内含卵蛋白 100 mg 及氢氧化铝 100 mg)致敏,正常对照组用生理盐水代替腹腔注射,每只动物共注射 3 次。在第 6、9、12、15、18、21 天模型组和 DXM 组均每天雾化吸入 1% 的卵蛋白 20 min 激发哮喘,正常对照组用生理盐水代替,吸入时间相同。在激发前 30 min,DXM 组首先雾化吸入 0.02% 的地塞米松 10 min,正常对照组、模型组用生理盐水代替,吸入时间相同。在雾化吸入的同一天,3 组动物均每天腹腔注射 5-溴脱氧尿苷(Bromodeoxyuridine Brdu, Sigma 公司)两次,间隔 4~6 h,每次注射剂量为 50 mg/kg,每组动物共注射 12 次。

1.2.2 标本制备 在第 22 天每只动物均腹腔注射超大剂量鲁米那 100 mg 处死,取出支气管和肺组织,用 Carnoy's 液固定 24 h。选择 II 级支气管垂直气道取材,石蜡包埋切片,切片厚度 5 μm。

1.2.3 染色 ①胶原染色:采用苦味酸-酸性品红法。染色后胶原纤维呈鲜红色,肌纤维呈黄色,胞核呈蓝褐色。②粘液染色:采用高碘酸-无色品红法(PAS),染色后粘液呈亮红色。

1.2.4 气道细胞 DNA 合成检测 参照文献^[3]和双标试剂盒(北京中山生物技术有限公司)的说明,采用双标免疫组化的方法进行气道细胞 DNA 合成检测,分别应用抗 Brdu 单克隆抗体(Sigma 公司)判定气道细胞的 DNA 合成及抗 α-平滑肌肌动蛋白单克隆抗体(α-smooth muscle actin, Sigma 公司)鉴定平滑肌。染色后平滑肌细胞和上皮细胞 Brdu 阳性核呈紫褐色,平滑肌细胞浆呈橙红色,结果观察采用计算机图像分析系统(西安华海电子有限公司)进行分析处理,计算 10 个高倍视野的平滑肌细胞和上皮细胞的 Brdu 阳性核,取其平均值作为最后结果。

1.3 统计学方法

采用 SAS 8.1 统计软件进行统计分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 肺组织学观察结果

正常对照组无明显炎性细胞浸润,模型组支气

管区有明显的炎性细胞浸润,以嗜酸性粒细胞为主,而 DXM 组炎性细胞浸润明显减少。

2.2 胶原染色和粘液染色观察结果

模型组在上皮下有大量的胶原组织沉积,上皮表面粘液层明显增厚。正常对照组和 DXM 组上述改变不明显。

2.3 平滑肌细胞和上皮细胞 Brdu 阳性计数

模型组气道平滑肌细胞 Brdu 阳性计数明显高于正常对照组和 DXM 组($P < 0.01$);模型组气道上皮细胞 Brdu 阳性计数亦明显高于正常对照组和 DXM 组($P < 0.05$)。如表 1。

表 1 3 组动物气道平滑肌细胞和上皮细胞 Brdu 阳性计数
Table 1 Comparison of the numbers of Brdu-positive cells in ASM and epithelium in the three groups (n = 12, $\bar{x} \pm s$)

组别	气道平滑肌细胞	气道上皮细胞
正常对照组	7.15 ± 2.05 ^a	16.22 ± 4.36 ^b
模型组	10.25 ± 2.09	21.83 ± 7.01
地塞米松组	6.85 ± 2.20 ^a	16.92 ± 3.48 ^b

注: ^a 与模型组比较 $P < 0.01$; ^b 与模型组比较 $P < 0.05$;

3 讨论

本实验利用 Brdu 作为 DNA 的标记物研究气道细胞的 DNA 合成,获得了满意的结果。传统的检测细胞增生和 DNA 复制的方法基于氚标记的胸腺嘧啶(³H-TdR)掺入的放射自显影和闪烁计数法。前者耗时长,后者尽管快速,但其结果不能反映细胞群体中正在复制的增殖细胞的个体频率。Brdu 作为 TdR 的类似物,能在细胞周期的 S 期有效的掺入到 DNA 分子中,从而可用免疫组化技术进行检测,其结果和 TdR 标记的完全一致^[3]。但 Brdu 不需要放射性同位素,既快速简便又精确敏感,应用双标免疫组化染色能够使平滑肌 Brdu 阳性细胞计数完全限定在 α-平滑肌肌动蛋白阳性区内,从而增加了准确性。

许多研究表明,地塞米松不仅能改善哮喘症状,而且能显著地减轻气道炎症。Stewart 等^[4]研究发现地塞米松、氢化可的松、甲基强的松龙可抑制体外培养的平滑肌细胞的增殖。

本研究进一步证实,雾化吸入地塞米松可明显的抑制气道平滑肌细胞和上皮细胞的 DNA 合成,使上皮及平滑肌层周围胶原组织的沉积减少,粘液分泌减少,和国外研究报道一致。因此,地塞米松可通过抑制细胞增生的作用, (下转第 113 页)

表 3 不同胎龄、出生体重的新生儿窒息后
MODS 发生率及病死率比较

Table 3 Comparison of the incidence and mortality of MODS following asphyxia in different pregnant age and birth weight neonates				例(%)
围产因素	例数	MODS 发生率	MODS 病死率	
胎龄				
< 37 周	33	23(69.7)	7(21.2)	
≥37 周	67	33(47.8) ^a	5(7.5) ^a	
出生体重				
< 2.5 kg	37	26(70.3)	8(21.6)	
≥2.5 kg	63	29(46.0) ^b	4(6.3) ^b	

注 :^a与 < 37 周组比较 $P < 0.05$ ^b与 < 2.5 kg 组比较 $P < 0.05$

本文资料显示 胎龄 < 37 周窒息组 MODS 发生率及病死率亦高于胎龄 ≥37 周组 ,出生体重 < 2.5 kg 组 MODS 发生率及病死率亦高于体重 ≥2.5 kg 组 ,两组差异有显著性 ,提示胎龄越小、出生体重越低 ,窒息后 MODS 发生率及病死率越高。早产儿及低出生体重儿各器官功能发育不完善 ,缺氧后更易导致多器官损害 ,尤其是脑损害。故加强围产期保健 ,降低早产

及低体重儿的出生率是降低 MODS 的重要措施。
目前国内外在 MODS 治疗方面取得了一些进展 ,但 MODS 的病死率仍居高不下。产前、产时及产后采取一切措施防治缺氧缺血 ,加强围产期保健 ,防止早产 ,正确掌握复苏方法而且复苏后立即继续治疗 ,是降低新生儿窒息后 MODS 发生率及死亡率的关键。另外 ,对于新生儿窒息不能只偏重于单一器官损害而忽视其它脏器的损害 ,从而延误了 MODS 的诊断和治疗。

[参 考 文 献]

[1] 中华医学会儿科学会急诊学组 . 全国小儿急诊医学研讨会纪要 [J] . 中华儿科杂志 ,1997 ,35(2) 97 - 98 .
[2] 刘敬 ,曹海英 ,何纯义 ,等 . 新生儿窒息多脏器血流动力学研究 [J] . 中华儿科杂志 ,1998 ,36(2) 69 - 70 .
[3] Perlman JM ,Tack ED ,Martin T ,et al . Acute systemic organ injury in term infants after asphyxia [J] . Am J Dis Child ,1989 ,143(5) 617 - 620 .
(本文编辑 刘丽旭)

(上接第 110 页)

延缓气道重塑反应的发生 ,防止气道壁的增厚和上皮纤维化及其玻璃样变 ,可有效地改善肺功能和气道阻塞。另据报道 ,许多生长因子在气道重塑的发生过程中起重要作用 ,对不同的生长因子 ,地塞米松的抑制作用明显不同 ,地塞米松组对胰岛素样生长因子 Ⅰ(IGF - 1) 的促增生作用明显抑制 ,而对表皮生长因子(EGF)和胎牛血清的促增生作用无影响^[5]。因此 ,地塞米松对气道重塑的作用及其机制还有待于进一步研究。需要指出的是 ,在本实验中 ,地塞米松可以明显抑制气道重塑反应发生过程中的平滑肌细胞和上皮细胞的 DNA 合成和细胞增生 ,减少胶原沉积和粘液分泌 ,提示早期应用地塞米松 ,不仅可减轻气道炎症 ,而且可延缓气道重塑的发生。但对已形成的气道重塑 ,地塞米松是否具有逆转作用尚待更深入探讨。

[参 考 文 献]

[1] 吕国平 ,崔德建 ,郭英江 ,等 . 介绍一种建立大鼠哮喘模型的制备方法 [J] . 中华结核和呼吸杂志 ,1995 ,18(6) 377 - 378 .
[2] Salmon M ,Walsh DA ,Huang TJ ,et al . Involvement of cysteinyl leukotrienes in airway smooth muscle cell DNA synthesis after repeated allergen exposure in sensitized Brown Norway rats [J] . Br J Pharmacol ,1999 ,112(5) 1151 - 1158 .
[3] Thomson PJ ,Mcgurk M ,Potten CS ,et al . Tritiated thymidine and bromodeoxyuridine double - labelling studies on growth factors and oral epithelial proliferations in the mouse [J] . Arch Oral Biol ,1999 ,44(9) 721 - 734 .
[4] Stewart AG ,Fernades D ,Tomlinson PR . The effect of glucocorticoids on proliferation of cultured airway smooth muscle [J] . Br J Pharmacol ,1995 ,116(8) 3219 - 3226 .
[5] Dixon ER ,Weinberg JA ,Lew DB . Effect of dexamethasone on bovine airway smooth muscle cell proliferation [J] . J Asthma ,1999 ,36(6) : 519 - 525 .
(本文编辑 刘丽旭)