

- 9 Varol E, Ozturk O, Gonca T, *et al.* Mean platelet volume is increased in patients with severe obstructive sleep apnea[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2010, 70(7):497-502
- 10 Rahangdale S, Yeh SY, Novack V, *et al.* The influence of intermittent hypoxemia on platelet activation in obese patients with obstructive sleep apnea[J]. J Clin Sleep Med, 2011, 7(2):172-178
- 11 De Groot PG, Urbanus RT, Roest M. Platelet interaction with the vessel wall[J]. Handb Exp Pharmacol, 2012, 210:87-110
- 12 张木勋, 谢君辉, 刘辉国, 等. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征与肥胖的相关分析[J]. 中国实用内科杂志, 2004, 24(1):44-45
- 13 Coban E, Yilmaz A, Sari R. The effect of weight loss on the mean platelet volume in obese patients[J]. Platelets, 2007, 18(3):212-216
- 14 Gasparyan AY, Ayvazyan L, Mikhailidis DP, *et al.* Mean platelet volume: a link between thrombosis and inflammation? [J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(1):47-58
- (收稿日期:2013-06-28)
- (修回日期:2013-07-24)

哮喘大鼠气道平滑肌细胞 caveolae 的变化及罗红霉素的调控作用

陈慧君 戴元荣 曾潍贤 涂军伟 田江华

摘要 目的 观察支气管哮喘(简称哮喘)大鼠气道平滑肌细胞微囊(caveolae)及微囊蛋白-1(caveolin-1)的表达变化,并探讨罗红霉素对其表达的影响。**方法** SPF级雄性SD大鼠24只,采用数学表法随机分为对照组(C组)、哮喘组(A组)、罗红霉素组(R组),每组8只。以卵白蛋白致敏和激发的方法复制大鼠哮喘气道重塑模型,图像分析软件测定气道壁厚度(Wat/Pbm)及气道平滑肌层厚度(Wam/Pbm);透射电镜观察caveolae超微结构;Western blot法测定caveolin-1的表达变化。**结果** (1)A组大鼠Wat/Pbm、Wam/Pbm大于C组($P < 0.01$);R组大鼠Wat/Pbm、Wam/Pbm小于A组($P < 0.01$),大于C组($P < 0.01$);(2)透射电镜显示C组ASMC胞膜及胞质caveolae含量丰富、形态多样,A组caveolae含量少、结构单一,R组caveolae含量明显减少,但较A组多;(3)Western blot法显示C组caveolin-1高表达,A组表达明显低于C组($P < 0.01$);R组caveolin-1表达显著高于A组($P < 0.01$),但较C组表达减少;(4)caveolin-1表达与Wam/Pbm呈负相关($r = -0.928, P < 0.01$)。**结论** 哮喘大鼠气道平滑肌细胞caveolae结构明显减少,caveolin-1表达减少,提示caveolae缺乏与哮喘气道重塑有密切关系,罗红霉素可能通过caveolae的影响而抑制哮喘气道重塑。

关键词 微囊 微囊蛋白-1 哮喘 气道重塑 罗红霉素

Effect of Roxithromycin on the Caveolae of Airway Smooth Muscle Cells in Asthmatic Rats. Chen Huijun, Dai Yuanrong, Zeng Weixian, Tu Junwei, Tian Jianghua. Department of Respiratory Medicine, Jinhua Municipal Central Hospital, Zhejiang 321000, China

Abstract Objective To observe the change of caveolae in the airway smooth muscle cells of asthmatic rats and to study the effect of Roxithromycin. **Methods** Twenty-four healthy, male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups on average, including control group (group C), asthmatic group (group A), and Roxithromycin group (group R). A rat asthma model was exploited, in which rats were sensitized and provoked with ovalbumin. The total bronchial wall thickness (Wat/Pbm) and the bronchial smooth muscle thickness (Wam/Pbm) were measured with image-pro plus 6.0. The ultrastructure changes of caveolae were observed by transmission electron microscope. The content of caveolin-1 detected by Western blot. **Results** Wat/Pbm, Wam/Pbm of group A were significantly higher than those of group C ($P < 0.01$), those of group R decreased than group A ($P < 0.01$), nevertheless, higher than those of group C ($P < 0.01$). In group C, TEM showed there was abundant caveolae in cell membrane and inside cell membrane with multiple shapes. Group A showed that there was fewer caveolae with structure destroyed. The pathological alterations of group R appeared between group C and group A. Western blot showed that the expression of caveolin-1 in group A significantly decreased compared with group C ($P < 0.01$), that of group R was significantly elevated than that of group A ($P < 0.01$), but decreased compared with group C ($P < 0.01$). There was significantly negative correlation between Wam/Pbm and the expression of caveolin-1 detected by Western Blot ($r = -0.928$,

基金项目:浙江省卫生厅基金资助项目(2009A144)

作者单位:321000 浙江省金华市中心医院(陈慧君、涂军伟、田江华);温州医科大学附属第二医院呼吸内科(戴元荣),急诊科(曾潍贤)

通讯作者:戴元荣,电子邮箱:daiyr@126.com

$P < 0.01$). **Conclusion** The amount of caveolae in airway smooth muscle of asthma rats was obviously decreased, so as the expression of caveolin-1, which demonstrated that there was close relationship between the deficiency of caveolae and airway remodeling of asthma. Roxithromycin maybe inhibit airway remodeling through caveolae.

Key words Caveolae; Caveolin-1; Asthma; Airway remodeling; Roxithromycin

气道重塑是哮喘发病的重要环节,其中气道平滑肌细胞的增生和肥大在气道重塑中发挥了重要作用,已成为哮喘治疗的新靶点^[1]。细胞质膜 caveolae 参与了细胞的胞吞、胞饮和胆固醇的转运和信号转导,是细胞信号的处理中心,其主要结构蛋白 caveolin-1 可以与多种信号分子结合,并广泛抑制细胞的信号转导^[2]。罗红霉素是新一代大环内酯类抗生素,初步研究表明,罗红霉素可影响哮喘的气道重塑,但具体机制尚不明确。本研究通过复制大鼠哮喘气道重塑模型,透射电镜观察哮喘大鼠气道平滑肌细胞 caveolae 的结构变化,以 Western blot 法检测 caveolin-1 的表达,并给予罗红霉素干预,以探讨 caveolae 在哮喘气道重塑中的作用,以及罗红霉素对哮喘气道重塑的影响机制。

材料与方法

1. 实验动物的分组及哮喘模型的建立:清洁级 (SPF) 雄性 SD 级大鼠 24 只,由温州医学院实验动物中心提供;OVA (V 级),4~6 周龄,体重 100~120g,按随机数字表法分为对照组 (C 组)、哮喘组 (A 组)、罗红霉素组 (R 组)。参照吴立琴等^[3]的方法制备大鼠哮喘模型。C 组则代以生理盐水致敏和激发大鼠;R 组致敏阶段同 C 组,激发阶段在每次激发前 0.5h 以罗红霉素 (30mg/kg) 灌胃。末次激发后 24h 内取得肺组织标本,并剥取支气管平滑肌层标本备用。

2. 肺组织显微结构观察及支气管壁厚度和支气管平滑肌厚度测定:HE 染色法制作肺组织病理标本,常规 HE 染色,观察各组肺组织结构、炎性浸润、支气管壁有无增厚等情况。采用 IPP6.0 图像分析软件分别测量支气管基膜周径 (Pbm)、支气管管壁总面积 (Wat)、支气管平滑肌面积 (Wam)。并用 Pbm 将测得的 Wat、Wam 标准化,以 Wat/Pbm、Wam/Pbm 分

别代表管壁厚度和平滑肌厚度。

3. 电镜标本的制作:取左肺组织以 PBS 液快速洗净,多位点精确取约 1mm³ 大小的组织块,置于 2.5% 戊二醛前固定,1% 锇酸后固定,脱水后,Embed 812 浸透包埋,LEICA 型超薄切片机切片,H-7500 型透射电镜观察各组 caveolae 结构变化。

4. Western blot 法测定支气管平滑肌 caveolin-1 含量:提取支气管平滑肌细胞匀浆,每组随机选取 6 只大鼠进行 Western blot 检测,以 BCA 法进行蛋白定量,SDS-PAGE 电泳,分离的蛋白转膜至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶中室温摇床封闭 1h,分加 caveolin-1 兔抗大鼠多克隆抗体 (1:500)、 β -actin,4℃ 过夜,次日加 5% 脱脂牛奶稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔二抗 (1:1000),洗膜后,ECL 显影。用 Gel pro 软件分析系统分析 caveolin-1 和内参 β -actin 累积光密度值 (IOD),以目的蛋白 caveolin-1 与内参 β -actin 条带 IOD 比值代表 caveolin-1 的光密度值。

5. 统计学方法:全部数据经 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 LSD 检验,两变量的相关分析用 Pearson 直线相关法分析,取 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. HE 染色肺组织病理改变:光镜下见 C 组大鼠肺组织结构完整,支气管上皮损害不明显,支气管及血管周围未见明显炎症细胞浸润,支气管平滑肌未见明显增厚。A 组肺组织内支气管壁各层及肺泡腔内可见大量炎性细胞浸润,支气管上皮断裂、脱落,管腔内可见黏液栓形成,支气管平滑肌明显增厚等。R 组支气管少量炎性细胞浸润,支气管平滑肌轻度增厚 (图 1)。

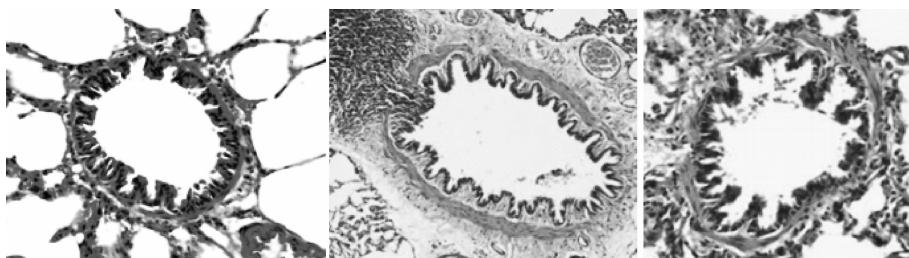


图 1 分别为 C 组、A 组、R 组大鼠肺组织病理学改变 (HE, $\times 200$)

2. 支气管壁厚度和支气管平滑肌厚度的比较:A 组大鼠 Wat/Pbm、Wam/Pbm 大于 C 组 ($P < 0.01$),R 组大鼠 Wat/Pbm、Wam/Pbm 小于 A 组 ($P < 0.01$),

大于 C 组 ($P < 0.01$)。各组大鼠支气管壁厚度及平滑肌厚度结果见表 1。

表 1 各组大鼠 Pbm、Wat/ Pbm、Wam/Pbm 比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	鼠数(<i>n</i>)	Pbm	Wat/Pbm	Wam/Pbm
		(μm)	($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)	($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)
C 组	8	2363.88 $\pm$ 128.19	34.05 $\pm$ 3.97	13.41 $\pm$ 0.82
A 组	8	2446.25 $\pm$ 115.62	94.83 $\pm$ 3.39 [▲]	30.85 $\pm$ 3.41 [▲]
R 组	8	2377.63 $\pm$ 97.35	74.30 $\pm$ 3.44 ^{▲*}	24.15 $\pm$ 1.53 ^{▲*}
<i>F</i>		1.19	585.721	127.131
<i>P</i>		>0.05	<0.01	<0.01

与 C 组比较, [▲]*P* < 0.01; 与 A 组比较, ^{*}*P* < 0.01

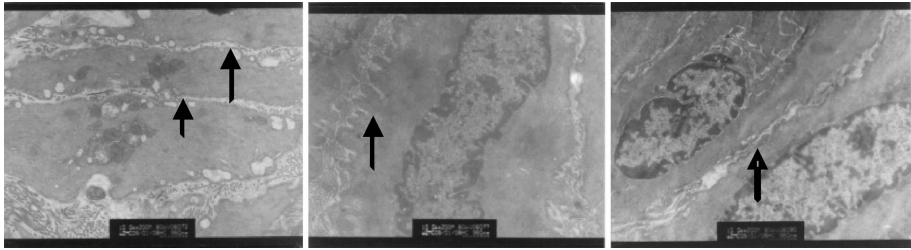


图 2 分别为 C 组、A 组、R 组大鼠气道平滑肌细胞电镜下改变 ($\times 10000$)

4. Western blot 法测定支气管平滑肌 caveolin - 1 含量: C 组 caveolin - 1 高表达, A 组表达量明显低于 C 组 (*P* < 0.01), R 组 caveolin - 1 表达显著高于 A 组 (*P* < 0.01), 但较 C 组表达减少 (表 2, 图 3)。

表 2 Western blot 法测定气道平滑肌 caveolin - 1 的表达($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	鼠数(<i>n</i>)	caveolin - 1/ β - actin
C 组	6	1.41 $\pm$ 0.25
A 组	6	0.08 $\pm$ 0.01 [▲]
R 组	6	0.37 $\pm$ 0.08 ^{▲*}
<i>F</i>		125.98
<i>P</i>		<0.01

与 C 组比较, [▲]*P* < 0.01; 与 A 组比较, ^{*}*P* < 0.01

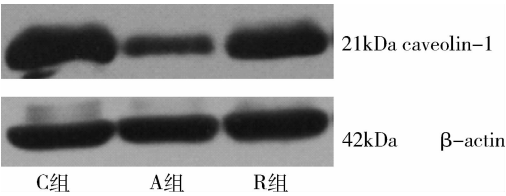


图 3 Western blot 法显示 C 组、A 组、R 组气道平滑肌匀浆 caveolin - 1 表达

5. 相关性分析: caveolin - 1 表达与 Wam/Pbm 呈显著负相关 ($r = -0.928, P < 0.01, n = 18$)。

讨 论

caveolae 是细胞质膜平均直径约 70nm 的球形或者烧瓶状内陷结构域, 为信号的传输和转换提供了场所, 被称为细胞的信号处理中心^[4]。哮喘的气道平

3. 透射电镜观察各组肺组织气道平滑肌细胞质膜 caveolae 变化 (图 2): C 组示气道平滑肌细胞上有 caveolae 结构表达丰富, 分布于细胞膜上或膜内侧附近, 呈瓶颈样或囊泡状, 排列密集, 甚至呈簇状。A 组气道平滑肌细胞质膜 caveolae 表达少, 结构单一。R 组气道平滑肌细胞质膜 caveolae 含量明显减少, 体积和直径均较小, 但较 A 组多。

滑肌细胞具有表型可塑性, 而 caveolae 是气道平滑肌细胞表型转换的决定因素, 是细胞分化状态的特征, 其形状主要由其生理状态决定^[5,6]。本研究发现 A 组电镜下 caveolae 数量减少, 形态单一, 与 C 组 caveolae 形态多样、数量丰富形成对比, 平滑肌细胞增殖是哮喘气道重塑的显著特征, A 组 Wat/Pbm 及 Wam/Pbm 均较 C 组增加 (*P* < 0.01), 可见气道重塑的平滑肌细胞的 caveolae 结构出现了客观的变化。Thyberg 等^[7]培养大鼠动脉平滑肌细胞时发现当平滑肌细胞从收缩表型转化为合成表型时 caveolae 的数量减少, caveolae 蛋白内陷并重新分布于核周的高尔基体相关囊泡, 提示 caveolae 的数量与平滑肌细胞的表型转换有关。本研究的发现提示 caveolae 与哮喘关系密切, caveolae 结构的减少和破坏可能是哮喘气道重塑发展的病理生理基础。

caveolin - 1 的功能涉及从细胞周期调控到信号转导的控制, 可引起信号分子的变构或共价修饰, 对大多数信号分子主要发挥负性调节作用。体外 PDGF 孵育气道平滑肌细胞使得溶酶体对 caveolin - 1 的降解加速, 伴随着 caveolae 的显著减少和细胞增殖^[8]。siRNA 敲除 caveolin - 1 可以激活 p42/p44MAPK 信号通路并促使细胞增殖^[9]。本研究 Western blot 法检测 caveolin - 1 的量较正常组明显减少, 提示 caveolin - 1 减少可能是导致哮喘大鼠气道重塑的因素之一。研究显示收缩型气道平滑肌细胞中 caveolin - 1 的含量是增殖型的 2 倍, siRNA 敲除 caveolin - 1 未能增加 PDGF 诱导的 p42/p44MAPK 活

化和细胞增殖,但 PDGF 的刺激积极地逆转了 caveolin - 1 的抗丝裂作用,caveolae 和 caveolin - 1 调节致使肌细胞增殖的 PDGF 受体信号,抑制 p42/p44MAPK 的活化从而维持细胞静止^[10]。本研究 caveolin - 1 的表达与 Wam/Pbm 呈显著负相关,间接支持 caveolin - 1 在维持细胞静止及抑制气道重塑的作用。

大环内酯类抗生素具有抗炎作用,长期小剂量的大环内酯类抗生素治疗已被应用于弥漫性泛细支气管炎、慢性支气管炎、支气管哮喘等慢性气道疾病。Stamatiou 等^[11]对兔气管平滑肌细胞培养时发现,阿奇霉素可诱导气道平滑肌细胞自噬,可逆性地减少平滑肌细胞的增殖,并呈剂量依赖性。可见除了抗感染及抗炎作用外,还具有抗细胞增殖作用。Stamatiou 等对人支气管平滑肌的研究也有类似的发现。罗红霉素作为新一代大环内酯类抗生素,其在哮喘中的作用已经受到关注。吴立琴等^[3]研究发现,罗红霉素干预后大鼠气道重塑有所减轻,提示其抑制气道重塑的作用。本研究罗红霉素组大鼠气道重塑指标 Wat/Pbm、Wam/Pbm 高于对照组,但低于哮喘组,电镜下 caveolae 数量较少,形态较为单一,介于对照组与哮喘组之间,caveolin - 1 的表达亦高于哮喘组,由此推测罗红霉素可能通过 caveolae 及 caveolin - 1 调节与此相关的信号转导、细胞凋亡等从而抑制气道重塑。

综上所述,本研究发现 caveolae 与哮喘气道重塑的关系密切,caveolae 及 caveolin - 1 可能是抑制气道重塑的基础,罗红霉素可能通过 caveolae 而抑制气道重塑,但其具体机制目前尚不明确,有待进一步研究。

参考文献

- 1 Janssen LJ. Airway smooth muscle as a target in asthma and the beneficial effects of bronchial thermoplasty[J]. J Allergy (Cairo),2012,59:3784
- 2 Sowa G. Caveolae, caveolins, cavins, and endothelial cell function: new insights[J]. Front Physiol,2012,2:120
- 3 吴立琴,戴元荣,夏晓东. 磷脂酰肌醇 3 - 激酶途径对支气管哮喘大鼠气道平滑肌细胞增殖的影响及罗红霉素的干预[J]. 中华结核和呼吸杂志,2009,32(4):304 - 306
- 4 张勤勤,孙润广,李连启. caveolae 及其蛋白家族的生物学结构和功能的研究现状[J]. 北京生物医学工程,2011,30(2):219 - 220
- 5 Halayko AJ, Tran T, Gosens R. Phenotype and functional plasticity of airway smooth muscle: role of caveolae and caveolins[J]. Proc Am Thorac Soc,2008,5(1):80 - 88
- 6 Thomas CM, Smart EJ. Caveolae structure and function[J]. J Cell Mol Med,2008,12(3):796 - 809
- 7 Thyberg J, Roy J, Tran PK, et al. Expression of caveolae on the surface of rat arterial smooth muscle cells is dependent on the phenotypic state of the cells[J]. Lab Invest,1997,77(1):93 - 101
- 8 Maniatis NA, Chernaya O, Shinin V, et al. Caveolins and lung function[J]. Adv Exp Med Biol,2012,729:157 - 179
- 9 Gosens R, Dueck G, Gerthoffer WT, et al. p42/p44 MAP kinase activation is localized to caveolae - free membrane domains in airway smooth muscle[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2007,292(5):L1163 - 1172
- 10 Gosens R, Stelmack GL, Dueck G, et al. Role of caveolin - 1 in p42/p44 MAP kinase activation and proliferation of human airway smooth muscle[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2006,291(3):L523 - 534
- 11 Stamatiou R, Paraskeva E, Boukas K, et al. Azithromycin has an antiproliferative and autophagic effect on airway smooth muscle cells[J]. Eur Respir J,2009,34(3):721 - 730

(收稿日期:2013 - 07 - 05)

(修回日期:2013 - 07 - 28)

64 例常规全脑全脊髓放疗患者的急性血液学毒性

杨美玲 黎 静 李志强 钟 毓 王 彦 李 重 徐艳红

摘 要 目的 了解全脑全脊髓放疗对患者血象的影响,分析其危险因素。**方法** 回顾性地分析 64 例中枢神经系统肿瘤患者在接受全脑全脊髓放疗期间血象变化,按照下降程度分为正常、轻度抑制(Ⅰ/Ⅱ)和重度抑制(Ⅲ/Ⅳ),分析性别、年龄、诱导化疗、γ 刀、脊髓剂量与血液学毒性的相关性。**结果** 白细胞下降的发生率为 85.9%(55/64),血小板为 62.5%(40/64),血红蛋白为 29.7%(19/64),其中Ⅲ~Ⅳ级白细胞、血小板、血红蛋白为 32.8%、9.4%、1.6%。68% 的患者在放疗开始 3 周内出现白

作者单位:510010 广州军区广州总医院螺旋断层放疗中心

通讯作者:黎静,电子信箱:jameslijing@163.com