

- 7 樊平,田景中,李光云.直肠癌神经浸润预后研究[J].中国实用外科杂志,2009,(9):739-742
- 8 Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, *et al.* Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas[J]. Clin Cancer Res,2000 Jan;6(1):127-134
- 9 Tianhang L, Guoen F, Jianwei B, *et al.* The effect of perineural invasion on overall survival in patients with gastric carcinoma[J]. J Gastrointest Surg,2008,12(7):1263-1267
- 10 张敏,HE 染色在临床病理诊断中的应用[J].齐齐哈尔医学院报,2011,(4):552-553
- 11 Liu H, Ma Q, Xu Q,*et al.* Therapeutic potential of perineural invasion, hypoxia and desmoplasia in pancreatic cancer [J]. Curr Pharm Des, 2012, 18(17):2395-2403
- 12 Johnston M, Yu E, Kim J. Perineural invasion and spread in head and neck cancer[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2012, 12(3):359-371
- 13 Zhu Z, Friess H, diMola FF, *et al.* Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer[J]. J Clin Oncol, 1999, 17(8):2419-2428
- 14 Kenmotsu M, Gochi A, Ishii H, *et al.* Relationship between perineural invasion and local recurrence of rectal carcinoma: a preliminary study with immunohistochemical staining with anti-NCAM: preliminary report [J]. Nihon Geka Gakkai Zasshi, 1990, 91(11):1759
- 15 Seki H, Tanaka J, Sato Y, *et al.* Neural cell adhesion molecule (NCAM) and perineural invasion in bile duct cancer[J]. J Surg Oncol, 1993, 53(2):78-83
- 16 Ketterer K, Rao S, Friess H, *et al.* Reverse transcription-PCR analysis of laser-captured cells points to potential paracrine and autocrine actions of neurotrophins in pancreatic cancer[J]. Clin Cancer Res, 2003, 1,9(14):5127-5136

(收稿日期:2013-12-08)

(修回日期:2013-12-27)

地塞米松对呼吸道合胞病毒感染小鼠肺内蛋白激酶 C α 表达的抑制作用

赵中秀 洪 璨 武 怡

摘 要 **目的** 探讨地塞米松对呼吸道合胞病毒感染小鼠肺内蛋白激酶 C α (PKC α) 表达的抑制作用。**方法** 健康雌性 Balb/c 小鼠 30 只,随机分为 3 组,分别为磷酸盐缓冲液(PBS)对照组、呼吸道合胞病毒(RSV)组、地塞米松组。应用 HE 染色观察病理变化,并计数支气管黏膜和黏膜下的细胞数、嗜酸性粒细胞数,应用 RT-PCR 方法检测肺组织 RSV 病毒表达,免疫组化方法检测肺内 PKC α 的表达。**结果** 正常组未检测到 RSV mRNA 表达,RSV 组、地塞米松组中 RSV mRNA 可见表达。RSV 组肺内 PKC α 平均光密度值明显高于对照组($P < 0.01$),而地塞米松组则明显低于 RSV 组($P < 0.01$)。**结论** PKC α 可能参与 RSV 的发病过程,地塞米松抑制 PKC α 的表达可能是治疗 RSV 感染性疾病的作用机制之一。

关键词 支气管哮喘 呼吸道合胞病毒 蛋白激酶 C α 地塞米松

[中图分类号] R725.6 [文献标识码] A

Inhibitory Effect of Dexamethasone on the Expression of PKC- α in Mice Lung after Infected by Respiratory Syncytial Virus. Zhao Zhongxiu, Hong Can, Wu Yi. Xuzhou Medical College, Jiangsu 221000, China

Abstract **Objective** To explore the inhibitory effect of dexamethasone on the expression of PKC α in mice lung after infected by respiratory syncytial virus. **Methods** Forty healthy female Balb/c mice were randomly divided into three groups: the control group, respiratory syncytial virus group, dexamethasone group, with 10 mice in each group. The lung histopathological changes were evaluated by hematoxylin eosin staining (HE) and counted cells and eosinophils in the tracheal mucosa and submucosal. The mRNA of Respiratory syncytial virus expressions were detected by RT-PCR and the alterations of PKC α immunoreactivity were investigated by Immunohistochemistry. **Results** The expression of RSV mRNA was not detected in normal and groups, but expressed clearly in the RSV group and the dexamethasone group. The average optic density of PKC α of the respiratory syncytial virus group was much higher than that of the control group ($P < 0.01$) and the average optic density of PKC α of the dexamethasone group was much lower than that of the respiratory syncytial virus

作者单位:221000 徐州医学院

通讯作者:武怡,主任医师,教授,硕士生导师,电子信箱:wuyi0885@sina.com

group ($P < 0.01$). **Conclusion** The present results indicate that the over expression of PKC α might be involved in the pathogenesis of respiratory syncytial virus infectious disease, and inhibition of the expression of the PKC α by dexamethasone may be one of the mechanisms in the treatment of Respiratory syncytial virus infectious disease.

Key words Respiratory syncytial virus; Protein kinase Calpha; dexamethasone

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)感染是引起儿童毛细支气管炎最常见病原体,亦是婴幼儿住院的首要原因。目前RSV感染后无特殊治疗,临床工作中旨在对症处理。蛋白激酶C α (protein kinase C alpha, PKC α)是蛋白激酶C经典亚型之一,PKC α 分布极其广泛,几乎所有组织中都有表达。研究表明PKC α 信号转导途径在气道炎症及气道平滑肌增殖方面起重要作用,PKC α -NF- κ B信号转导途径参与哮喘患者气管平滑肌细胞的增殖^[1]。哮喘患者诱导痰液炎症细胞中PKC α 表达量显著增加,提示PKC α 信号转导途径是气道炎症发生的重要机制之一^[2]。但有关PKC α 在呼吸道合胞病毒感染后是否发挥作用尚未报道。临床工作中地塞米松已被应用于RSV感染后的毛细支气管炎,但具体作用机制尚不明确,本研究通过观察RSV感染后肺组织的病理变化、检测PKC α 肺组织中的表达及地塞米松对PKC α 的抑制作用,目的在于探讨PKC α 在RSV感染发病机制中的作用及地塞米松的抑制作用,为RSV感染后的治疗提供新的思路。

材料与方法

1. 试剂与器材:RSV毒株(济南病毒研究所赠予);SPF级雌性BALB/c小鼠30只。6~8周龄,体质量为 20 ± 2 g,购于徐州医学院实验动物中心。PKC α 兔抗小鼠单克隆抗体购买自徐州康美生物科技有限公司,DAB试剂盒购买于北京中杉金桥生物技术有限公司。

2. 实验分组: BALB/c小鼠随机分成3组,每组10只。①磷酸盐缓冲液(PBS)对照组:以致敏、激发;②RSV组:在PBS致敏、激发的基础上气道内滴入RSV;③地塞米松组:在RSV组的基础上腹部注射地塞米松。

3. 动物模型制备:根据文献[3]模型制作方法略予调整RSV组于第1、14天小鼠腹腔注射0.2ml PBS,第19~21天用RSV 10^6 PFU/ml 100 μ l鼻腔滴入,第21~25天将小鼠置于透明密闭容器中以PBS溶液20ml雾化吸入,每次30min,PBS对照组小鼠于上述时点用PBS代替RSV鼻腔内分别滴入100 μ l。地塞米松组小鼠在RSV组的基础上于21~25天腹部注射地塞米松0.2mg/kg。

4. RSV制备:病毒悬液制备方法见参考文献[4],悬液制备后-80℃冷冻保存,用于SPF级雌性BALB/c小鼠鼻内接种。

5. RT-PCR方法检测肺组织中RSV的mRNA水平:采用Trizol试剂一步法提取总RNA。取各组RNA 2 μ l,通过反转录反应合成cDNA,然后以反转录的cDNA为模板进行PCR扩增反应。PCR引物: Sense: 5'-TCATAGCCTCGGCAAACCAC-3', Antisense: 5'-GGATTCTGGGTGAGGTATGTT-3',扩增产物片段104bp,退火温度:56℃。电泳,用Marker作为分子质量参照, β -actin为内参照,应用图像分析软件对各条带平均灰度值分析。

6. 肺病理学观察:将小鼠在末次致敏后24~36h内处死,取出右肺,甲醛固定,后脱水、包埋、切片用于苏木素-伊红(HE)染色;400倍光镜下观察支气管黏膜炎性细胞浸润等病理改变,并测定随机选取的10个高倍视野下支气管黏膜和黏膜下细胞数及嗜酸性粒细胞数(EOS)。

7. 免疫组化染色:采用3步法,一抗工作浓度均为1:150。常规石蜡切片处理后,应用0.3%过氧化氢阻断内源性过氧化氢酶、正常山羊血清封闭后,滴加一抗(PKC α 抗体),4℃孵育过夜,阴性对照用PBS代替一抗,生物素化羊抗IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司)孵育15min,辣根酶标记链霉卵白素孵育15min,DAB显色,苏木精复染,常规脱水、透明、中性树胶封固、光镜观察及采图。用Image-Pro Plus 6.0图像分析系统对实验结果进行图像分析,计算出平均光密度值。

8. 统计学方法:所采用SPSS 13.0软件进行统计分析,资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组样本均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),方差齐者组间比较采用LSD检验,方差不齐者用Dunnett T3检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 肺组织形态学光镜下观察及细胞计数:正常组支气管、肺泡结构完整正常。RSV组管壁增厚,管腔狭窄,管壁周围嗜酸性粒细胞等炎性细胞浸润。地塞米松组炎症变化较以上两组明显减轻,管腔狭窄不明显,管壁周围有少量嗜酸性粒细胞等炎症细胞浸润(图1)。各组支气管黏膜和黏膜下细胞总数(个/视野)分别为:正常组 18.7 ± 2.83 ,RSV组 37.3 ± 2.36 ,地塞米松组 27.2 ± 2.25 ;嗜酸性粒细胞数(个/视野)分别为:正常组 1.1 ± 0.99 ,RSV组 11.7 ± 2.21 ,地塞米松组 8.2 ± 1.81 ;地塞米松组与哮喘组、RSV组两两比较差异均有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

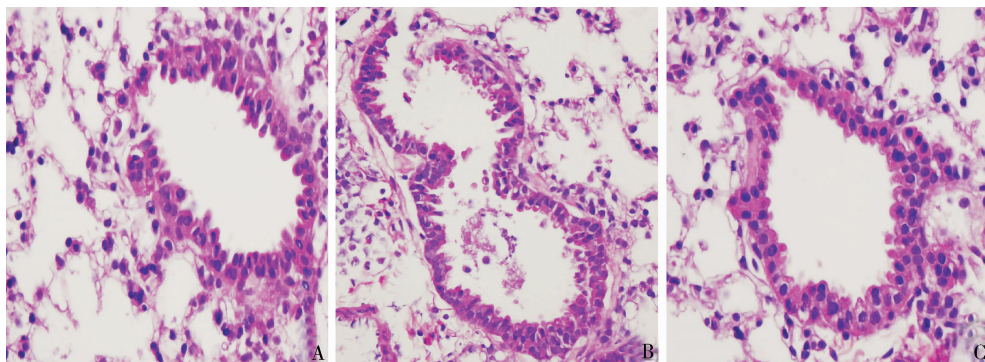


图 1 各组小鼠肺组织病理变化 (HE, ×400)

A. 正常对照组; B. RSV 组; C. 地塞米松组

2. 小鼠肺组织中 RSV 检测结果: 正常对照组未检测 RSV, 而 RSV 组、地塞米松组可见 RSV 表达明显 (图 2)。

3. 免疫组化染色: 正常对照组和地塞米松肺内 PKC α 的表达均较少, 但两者比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。RSV 组气道上皮细胞及嗜酸性细胞等炎性细胞 PKC α 均有表达, 阳性颗粒分布较多, 染色较强 (图 3B), 其表达量明显高于对照组、地塞米松组 ($P < 0.01$, 图 3)。

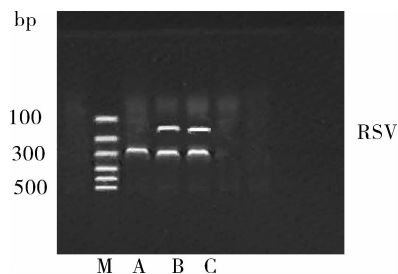


图 2 各组小鼠肺组织中 RSV 检测结果

M. Marker; A. 正常对照组; B. RSV 组; C. 地塞米松组

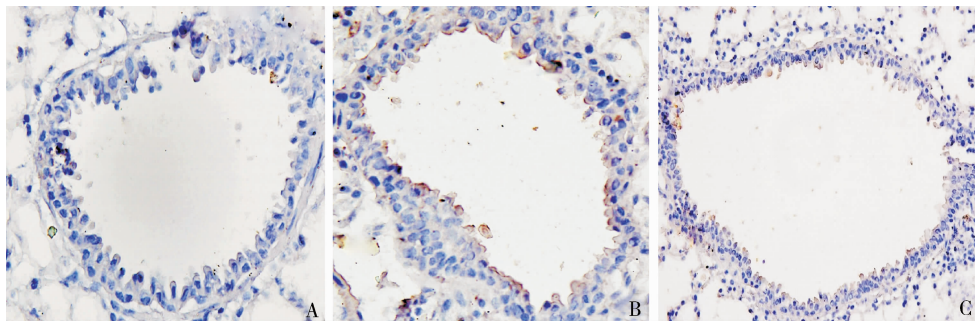


图 3 各组小鼠肺组织变化 (SP, ×400)

A. 正常对照组; B. RSV 组; C. 地塞米松组

讨 论

RSV 感染是婴幼儿下呼吸道感染中的常见原因, RSV 感染患儿常出现的临床症状是喘息发作, 婴幼儿急性 RSV 下呼吸道感染后常发生反应性气道疾病, 在急性期过后的相当一段时间内可出现反复喘息症状, 部分患儿可迁延发展为持续性哮喘。因此推测, 在儿童早期 RSV 感染后诱发急性喘息的同时有可能启动气道重塑过程, 为哮喘的发生提供病理生理学基础。RSV 感染相关喘息的临床表现与支气管哮喘相似, 目前临床工作中针对治疗 RSV 感染后相关喘息的治疗以对症治疗为主, 主要药物有糖皮质激素、支气管扩张剂等。

地塞米松作为一种长效糖皮质激素, 其作用广泛, 具有抗炎、抗过敏、免疫抑制作用, 临床上应用此类药物治疗哮喘及 RSV 感染后引起的喘息症状。

本实验病理学观察显示哮喘小鼠及 RSV 感染小鼠肺组织中嗜酸性粒细胞、淋巴细胞等炎症细胞增多, 气管壁增厚, 管腔狭窄, 而应用地塞米松后的小鼠病理变化明显改善, 免疫组化结果可见 PKC α 在 RSV 感染小鼠肺组织中有较多表达, 但地塞米松组表达量较少。PKC α 参与信号转导途径、细胞增殖、分化和凋亡等多种重要的生理及病理过程^[5]。有研究表

明,活化后的 PKC 可以引起多种炎症细胞及组织细胞如中性粒细胞、肥大细胞、T 淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、嗜碱性粒细胞等释放大炎症介质(组织胺、白三烯和白介素)^[6]。PKC α 能够刺激气道平滑肌增殖,导致气道重塑^[7-9]。由此推测,RSV 感染后应用地塞米松治疗喘息症状,其作用机制可能是地塞米松通过抑制肺组织中 PKC α 的表达,达到平喘消炎效果。

本实验结果表明,RSV 感染后 PKC α 表达量增加,应用地塞米松可抑制 PKC α 表达,提示 PKC α 可能参与 RSV 的发病过程,地塞米松抑制 PKC α 的表达可能是治疗 RSV 感染性疾病的作用机制之一。糖皮质激素是目前最有效的抗气道炎症药物,但目前有对照研究对其疗效提出质疑,而此研究结果在一定程度上揭示了 RSV 发病过程的分子生物学机制,为其进一步预防和治疗提供了新的思路和启示^[10]。

参考文献

- 1 杜春玲,徐永健,刘先胜,等. NF- κ B 参与哮喘血清被动致敏的人气道平滑肌细胞中 PKC α 诱导的 Cyclin D1 上调及细胞增殖[J]. 华中科技大学学报:医学版,2008,37(6):703-707
- 2 谢敏,徐永健,熊盛道. 蛋白激酶 C α 在哮喘患者诱导痰炎性细胞中表达的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志,2001,24(9):557-558
- 3 王莹,米贤军,沈铿,等. Thinprep 液基细胞学在中山市大规模宫颈癌筛查中的应用[J]. 中国妇幼保健,2012,27(33):5256-5259
- 4 徐基成,余绍兰,李晓琼,等. 液基细胞学检测筛查宫颈癌的应用评价[J]. 中国计划生育和妇产科,2011,3(6):21-25
- 5 Andersson S, Sowjanya P, Wangsa D, *et al.* Detection of genomic amplification of the human telomerase gene TERC, a potential marker for triage of women with HPV-positive, abnormal Pap smears[J]. Am J Pathol, 2009, 175(5):1831-1847
- 6 Chen S, Yang Z, Zhang Y, *et al.* Genomic amplification patterns of human telomerase RNA gene and C-MYC in liquid-based cytological specimens used for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia[J]. Diagn Pathol, 2012, 7: 40-52
- 7 Ramsaroop R, Oei P, Ng D, *et al.* Cervical intraepithelial neoplasia and aneusomy of TERC: assessment of liquid-based cytological preparations[J]. Diagn Cytopathol, 2009, 37:411-415
- 8 刘爽,李亚里,姜淑芳,等. FISH 技术检测宫颈组织 TERC 基因扩

- 3 唐晓媛,于化鹏,邓火金,等. 不同剂量致敏原对小鼠哮喘模型气道反应性的影响[J]. 现代医学,2011,39(2):121-125
- 4 廉国利,俞海国,赵晓东,等. 小鼠呼吸道合胞病毒感染模型的建立[J]. 西安交通大学学报:医学版,2003,24(4):329-332
- 5 Field AP, Regala RP, Protein kinase C ionta: human oncogene, prognostic marker and therapeutic target[J]. Pharmacological Research, 2007,55(6):487-497
- 6 del Rio R, Rincon M, Layscca - Espinosa E, *et al.* PKC theta is required for the activation of human T lymphocytes induced by CD43 engagement[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004,325(1):133-143
- 7 杜春玲,徐永健,刘先胜,等. 蛋白激酶 C α —胞外调节蛋白激酶 1/2 与人气道平滑肌细胞中周期蛋白 D1 及 P21 dpl 表达的关系[J]. 中华结核和呼吸杂志,2008,31(12):915-920
- 8 许淑云,徐永健,张珍祥,等. 核因子 κ B 在蛋白激酶 C 诱导哮喘模型大鼠气道平滑肌细胞增殖中的作用[J]. 中国病理生理杂志,2007,23(11):2217-2221
- 9 许淑云,徐永健,张珍祥,等. 蛋白激酶 C 在支气管哮喘模型大鼠气道平滑肌细胞增殖中的信号转导机制研究[J]. 中华结核和呼吸杂志,2003,26(12):756-761
- 10 Patel H, Platt R, Lozano JM, *et al.* Glucocorticoids for acute viral bronchiolitis in infants and young children[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2004,3:CD004878

(收稿日期:2014-02-20)

(修回日期:2014-04-02)

(上接第 92 页)

- 2 王莹,米贤军,沈铿,等. Thinprep 液基细胞学在中山市大规模宫颈癌筛查中的应用[J]. 中国妇幼保健,2012,27(33):5256-5259
- 3 徐基成,余绍兰,李晓琼,等. 液基细胞学检测筛查宫颈癌的应用评价[J]. 中国计划生育和妇产科,2011,3(6):21-25
- 4 Andersson S, Sowjanya P, Wangsa D, *et al.* Detection of genomic amplification of the human telomerase gene TERC, a potential marker for triage of women with HPV-positive, abnormal Pap smears[J]. Am J Pathol, 2009, 175(5):1831-1847
- 5 Chen S, Yang Z, Zhang Y, *et al.* Genomic amplification patterns of human telomerase RNA gene and C-MYC in liquid-based cytological specimens used for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia[J]. Diagn Pathol, 2012, 7: 40-52
- 6 Ramsaroop R, Oei P, Ng D, *et al.* Cervical intraepithelial neoplasia and aneusomy of TERC: assessment of liquid-based cytological preparations[J]. Diagn Cytopathol, 2009, 37:411-415
- 7 刘爽,李亚里,姜淑芳,等. FISH 技术检测宫颈组织 TERC 基因扩

增[J]. 中国妇产科临床杂志,2012,13(5):335-337

- 8 欧亚梦兰,李力,高琨. TERC 基因对宫颈高级别病变($\geq$ CIN II)诊断价值的 Meta 分析[J]. 中国循证医学杂志,2013,13(3):325-331
- 9 李瑞珍,吴瑞芳,乌兰娜,等. 高危型人乳头瘤状病毒检测与液基细胞学观察及其联合分析对宫颈癌筛查的意义[J]. 中国癌症杂志,2008,18(3):190-194
- 10 Jiang J, Wei LH, Li YL, *et al.* Detection of TERC amplification in cervical epithelial cells for the diagnosis of high-grade cervical lesions and invasive cancer - a multicenter study in China[J]. Journal of Molecular Diagnostics, 2010, 12(6):808-817
- 11 Katki HA, Kinney WK, Fetterman B, *et al.* Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology: a population-based study in routine clinical practice[J]. Lancet Oncol, 2011, 12(7):663-672

(收稿日期:2014-03-05)

(修回日期:2014-04-09)