文章编号:1000-5404(2014)24-2459-04

论著

丝裂霉素C预防家兔喉气管狭窄的实验研究

申培力,骆文龙 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院耳鼻咽喉头颈外科)

[摘要] **目的** 探讨丝裂霉素C在治疗兔喉气管狭窄中的作用及其机制。**方法** 将30只家兔按照简单随机化分组分为对照组(A组)、模型组(B组)、0.5 mg/mL低浓度用药组(C1组)、2 mg/mL中浓度用药组(C2组)、5 mg/mL高浓度用药组(C3组)。制备喉气管狭窄模型,用药后20d比较各组喉气管狭窄度。取模型组狭窄组织做成纤维细胞培养,分别置于0、2.5、12.5、50、100、200 mg/L的丝裂霉素C中培养后用流式细胞仪检测细胞凋亡差异,Western blot、荧光定量PCR检测细胞bFGF、TGF-β1的蛋白和mRNA转录水平表达变化。**结果** B、C组相比A组均出现明显喉气管狭窄($P<0.05$),C2、C3 2组狭窄度明显低于B组($P<0.05$),C1组与B组无明显差异($P>0.05$);丝裂霉素C能诱导成纤维细胞凋亡,下调TGF-β1、bFGF的蛋白和mRNA表达量。**结论** 丝裂霉素C可明显诱导成纤维细胞凋亡,对预防和治疗瘢痕性喉气管狭窄具有重要作用。

[关键词] 喉气管狭窄;丝裂霉素C;dFGF;TGF-β1
[中图法分类号] R767.7;R969;R979.5 [文献标志码] A

Mitomycin C prevents laryngotracheal stenosis in rabbits

Shen Peili, Luo Wenlong (Department of Otorhinolaryngology and Head & Neck Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of mitomycin C on laryngotracheal stenosis in rabbits. **Methods** Rabbits were randomly divided into 5 groups, that is, a control group (group A), a model group (group B), a 0.5 mg/mL low-dose group (group C1), a 2 mg/mL middle-dose group (group C2) and a 5 mg/mL high-dose group (group C3). The model of rabbit laryngotracheal stenosis was established by scraping the laryngotracheal mucosa. All rabbits in group C1, group C2 and group C3 received topical application of mitomycin C to the wound surface of larygotracheal mucosa. The laryngotracheal stenosis degree was observed on the 20th day after operation. The fibroblasts taken from the stenosis tissue of the model group were cultured in vitro with mitomycin C at 6 different concentrations (0, 2.5, 12.5, 50, 100 mg/mL, and 200 mg/mL). Meanwhile, the fibroblast apoptosis difference was detected by flow cytometry. In addition, the mRNA and protein expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) and transforming growth factor β1 (TGF-β1) in the 6 groups was detected by FQ-PCR and Western blotting, respectively. **Results** Compared with group A, both group B and group C showed obvious laryngotracheal stenosis ($P<0.05$). The stenosis degree of group C2 and group C3 was significantly lower than that of group B ($P<0.05$), but there was no significant difference between group B and group C1 ($P>0.05$). Mitomycin C could significantly inhibit the proliferation of the fibroblasts and reduce the mRNA and protein expression of TGF-β1 and bFGF. **Conclusion** Mitomycin C can significantly induce the apoptosis of fibroblasts, and may play an important role in preventing and treating laryngotracheal stenosis.

[**Key words**] laryngotracheal stenosis; mitomycin C; basic fibroblast growth factor; transforming growth factor β1

Supported by the Key Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2012-1-041). Corresponding author: Luo Wenlong, E-mail: luowenlong163@163.com

[基金项目] 重庆市卫生局重点项目(2012-1-041)
[通信作者] 骆文龙,E-mail:luowenlong163@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141106.1616.027.html(2014-11-06)

喉气管狭窄的常见原因为喉气管外伤、高位气管切开、气管插管等造成的瘢痕过度增生、瘢痕挛缩。目前主要的治疗方法是内镜激光手术切除配合支架植入,但存在一定的复发率,治疗效果不理想。而药物治疗具有创伤小、操作简单等优点,患者更容易接受。丝裂霉素C由于价格便宜,副作用小,一直是治疗喉气管狭窄研究最多的药物。本研究通过动物实验初步尝试应用丝裂霉素C的方法,体外实验研究丝裂霉素C对兔成纤维细胞凋亡和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)、转化生长因子β1(transfor ming growth factor β,TGF-β1)表达的影响,旨在探讨丝裂霉素C预防和辅助治疗喉气管狭窄的作用及相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

家兔30只,体质量1.5~2.0 kg,雌雄不限,由重庆医科大学实验动物中心提供。丝裂霉素C(大连美仑生物),胎牛血清、DMEM-F12培养基(Gibco,美国),dFGF、TGF-β1抗体(RD,美国),羊抗兔IgG(Sigma,美国),GDS8000凝胶扫描系统(UVP,美国),图像分析系统。

1.2 实验动物分组与模型建立

将30只家兔按照简单随机化分组法分为对照组($n=6$);模型组($n=6$);低浓度用药组($n=6$);中浓度用药组($n=6$);高浓度用药组($n=6$)。3个用药组丝裂霉素C用药浓度分别为0.5、2.0、5.0 mg/mL。用药组造模前禁食6~8 h,用20%氨基甲酸乙酯按1 g/kg体质量耳缘静脉麻醉,待动物麻醉后,仰卧固定。在颈前区备皮后,做正中纵向切口剪开皮肤约5~7 cm,逐层剥离直至暴露喉和气管,距甲状软骨下缘1~2 cm切开气管前壁(切口为气管口径的一半),将试管刷由切口处向头部的方向插入气管腔内,来回刮擦10次,避免损伤软骨。3个用药组每组随机抽取3只家兔,将浸有不同浓度丝裂霉素C的棉球覆盖并固定在气管内环,保持5 min,剩余3只用药保持10 min。逐一缝合气管肌肉、皮下组织、皮肤并作消毒处理。模型组在进行气管刮擦之后即做闭合处理,不局部应用丝裂霉素C。对照组行气管切开后立即闭合,不进行黏膜刮擦和用药,其余步骤均同C组。

1.3 内窥镜观察及狭窄度测量

各组家兔均在20 d处死,于内镜下观察。取喉部横切面标本计算狭窄度,计算公式为 $S=[1-(r1+r2)/(R1+R2)]\times 100\%$,其中r1和r2为气管内通气腔的长径和短径,R1和R2为气管软骨围成的环的长径和短径[1]。

1.4 成纤维细胞培养

空气栓塞法处死模型组家兔,无菌条件下剥离剪取气管,经双抗PBS液反复冲洗后剪成2 mm×2 mm大小。贴到培养瓶中,翻转置于37 ℃ CO_2培养箱中4 h。完全贴壁后加入5 mL含双抗的10%胎牛血清DMEM培养基,3 d换液1次。待细胞长满至80%时,去除组织块,用0.25%胰蛋白酶消化10 min后传代,取第4代用于实验。

1.5 细胞药物模型构建及分组

传代培养成纤维细胞24 h后,吸取培养液和未贴壁细胞,更换含不同丝裂霉素C浓度的培养液培养。实验分组:A组:正常细胞(0 mg/mL);B组:2.5 mg/mL,C组:12.5 mg/mL;D组:50 mg/mL;E组:100 mg/mL;F组:200 mg/mL。

1.6 流式细胞仪检测成纤维细胞凋亡

A~F浓度组经细胞培养24 h后经消化离心后制成单细胞悬液,收集总量为5×10^5细胞,加入195 μL Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞,再加入5 μL Annexin V-FITC,轻轻混匀。室温20~25 ℃避光孵育10 min,1 000×g离心5 min,弃上清,加入200 μL Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞。再加入10 μL碘化丙啶染色液,轻轻混匀,4℃避光染色5~10 min,上机检测各组细胞凋亡率。

1.7 Western blot检测dFGF、TGF-β1蛋白的表达

用RIPA提取A~F浓度组细胞的蛋白,使用标准曲线测定样品浓度,Western blot上样量均为20 μg,80~120 V SDS-PAGE电泳;200 mA恒流电转膜1 h,5%脱脂牛奶封闭,一抗dFGF、TGF-β1抗体(1∶500),内参GAPDH一抗(1∶5 000),二抗(1∶3 000),常规方法显影、定影,直至显影出电泳带。用UVP凝胶图像处理系统Labworks4.6软件分析目的条带的灰度值,观察各组蛋白表达强弱。

1.8 荧光定量PCR检测

取A~F浓度组细胞,使用TRIzol法提出总RNA后将其逆转录为cDNA(3 μL/ 20 μL体系)。进行荧光定量PCR反应(2 μL/ 50 μL体系)。使用β-actin为检测目的基因表达的对照。引物序列如下:bFGF上游引物:5′-TTCTTCCTGCGTATC-CACCC-3′,下游引物:5′-CAGTCTTCCATCTTCCTTCATAGC3′,产物片段157 bp;TGF-β1上游引物:5′-CCCAAGTGATGATGAG-GTGC-3′,下游引物:5′-CCTTGCCAAAGAAGCCTGAG-3′,产物片段134 bp;内参β-actin上游引物:5′-TCACCATGGATGAT-GATATCGC-3′,下游引物:5′-CGTGCTCGATGGGGTACTTCA-3′,产物片段225 bp。反应参数为:94 ℃ 4 min;94 ℃ 20 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s循环35次,72 ℃检测信号。每个样本bFGF、TGF-β1表达量由β-actin表达量进行标准化,用比较Ct值法分析表达差异。

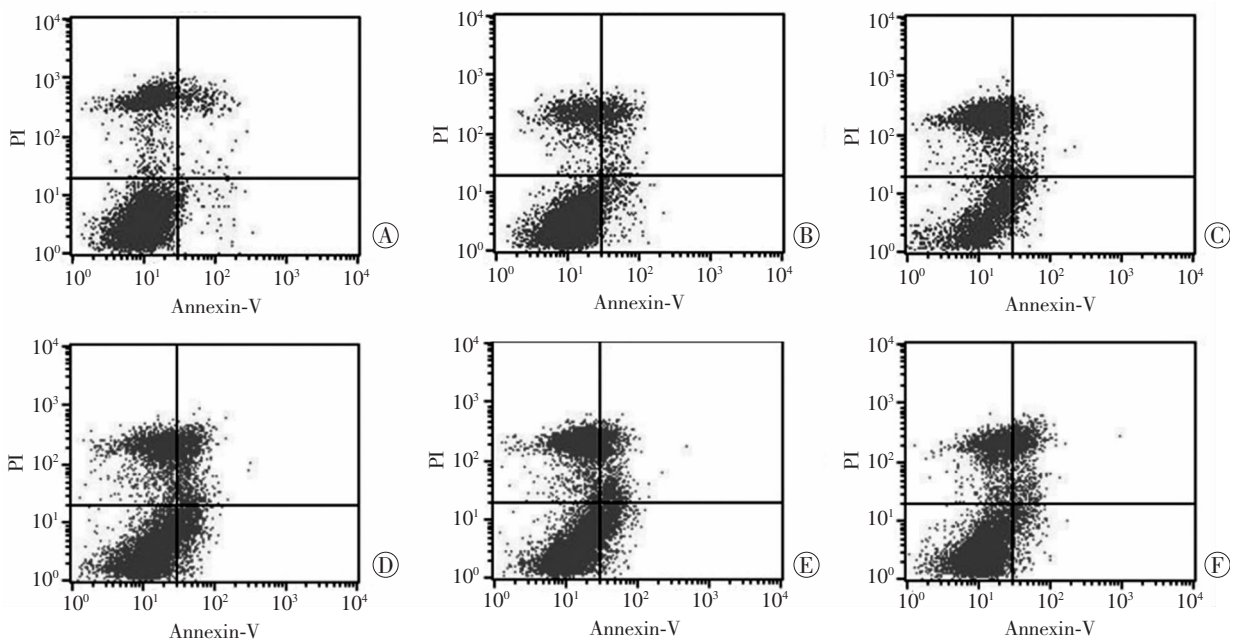
1.9 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,应用SPSS 19.0统计学软件进行t检验。

2 结果

2.1 喉气管狭窄度比较

经过喉气管狭窄度的测定,对照组狭窄度为(6.45±1.01)%,模型组狭窄度为(48.95±3.84)%,模型组和3个用药组喉气管狭窄度明显大于对照组($P<0.05$);中、高浓度用药组喉气管狭窄度明显低于模型组($P<0.05$);低浓度用药与模型组相比无统计学差异($P>0.05$);中、高浓度用药组之间相比较,差异无统计学意义($P>0.05$);3个用药组各自组内对比无统计学差异($P>0.05$)。见表1。



A:对照组;B:2.5 mg/mL 浓度组;C:12.5 mg/mL 浓度组;D:50 mg/mL 浓度组;E:100 mg/mL 浓度组;F:200 mg/mL 浓度组

图 1　流式细胞仪检测丝裂霉素 C 诱导的成纤维细胞凋亡

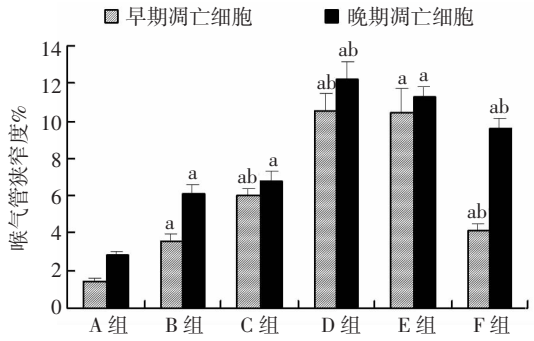
表 1　各浓度用药组用药后 20 d 时气管狭窄度比较（%，$\bar{x} \pm s$）

组别	药物作用 5 min	药物作用 10 min	P
低浓度用药组	47.29 ± 3.89[a]	46.39 ± 3.92[a]	0.792
中浓度用药组	34.12 ± 2.83[ab]	33.72 ± 3.38[ab]	0.882
高浓度用药组	34.43 ± 3.53[ab]	33.30 ± 2.90[ab]	0.691

a:$P<0.05$,与对照组[(6.45 ± 1.01)%]比较;b:$P<0.05$,与模型组[(48.95 ± 3.84)%]比较

2.2　流式细胞仪检测结果

流式细胞仪结果显示,随着丝裂霉素 C 浓度逐渐增加,成纤维细胞早期、晚期凋亡率明显上升,提示丝裂霉素 C 能诱导成纤维细胞凋亡,且具有较高的浓度依赖性($P<0.05$),在 50 ~100 mg/mL 浓度的丝裂霉素 C 中培养的成纤维细胞凋亡率最高,2 组凋亡率没有显著差异($P>0.05$)。见图 1、2。

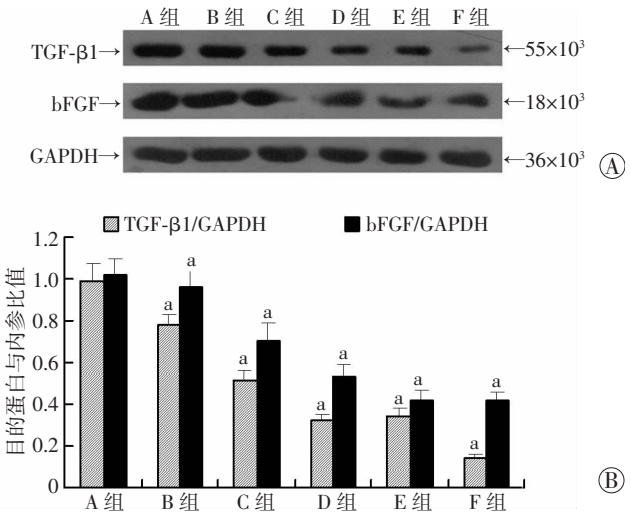


a:$P<0.05$,与 A 组比较;b:$P<0.05$,与前一浓度的对应值比较

图 2　丝裂霉素 C 诱导的成纤维细胞凋亡比例(%)

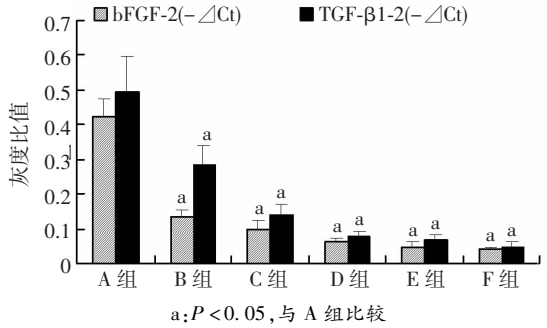
2.3　丝裂霉素 C 对成纤维细胞 TGF-β1、bFGF 蛋白和 mRNA 水平表达的影响

Western blot 及荧光定量 PCR 检测结果显示,随着丝裂霉素 C 浓度逐渐增加,TGF-β1、bFGF 在蛋白及 mRNA 水平的表达量明显降低($P<0.05$)。见图 3、4。



A:Western blot 结果;B:半定量分析结果　a:$P<0.05$,与 A 组比较

图 3　Western blot 检测成纤维细胞中 TGF-β1、bFGF 蛋白的表达



a:$P<0.05$,与 A 组比较

图 4　纤维细胞中 TGF-β1、bFGF mRNA 的表达

3 讨论

目前大多数研究者认为丝裂霉素C适用于急性组织损伤引起的狭窄,对已经形成的瘢痕,用药效果并不明显,且应用丝裂霉素C的最佳时间是喉气管黏膜受到损伤时甚至在这之前[2-3]。而后大量的喉气管狭窄的临床研究将丝裂霉素C作为辅助治疗的手段,但后续缺少针对丝裂霉素C具体疗效的研究[4-7]。

本实验参照了国内外动物喉气管狭窄的建模方法[1,8-9],并适度改良。用药组用药时间设定为进行气管刮擦术后立即使用,在丝裂霉素C作用的"窗口期"之内。造模结果显示B组(模型组)、C组(用药组)的喉气管狭窄度明显高于A组(对照组),再次说明这种造模方法稳定有效,且操作简便,适用于各种喉气管狭窄的实验研究。用药结果显示C2、C3组喉气管狭窄度明显低于B组,但C1组与B组无显著差异,说明丝裂霉素C能够有效预防和治疗早期喉气管狭窄,但需要达到一定的作用浓度,用药浓度同时也受用药方式和次数影响。C2、C3 2组相比较差别无统计学意义,说明丝裂霉素C浓度在高于2 mg/mL后,治疗效果没有明显提升,但局部使用高浓度的丝裂霉素C也没有出现任何不良反应,提示安全性较好。C组各组的组内对比无显著差异,说明药物单次作用时间超过5 min以后,疗效没有明显提高。

目前喉气管狭窄形成的主要原因是喉气管黏膜受到损伤后引起炎症反应,成纤维细胞大量生成导致瘢痕生长挛缩[10-11]。而本实验再次验证了丝裂霉素C对成纤维细胞增殖具有明显的抑制作用。为了进一步研究丝裂霉素C诱导成纤维细胞凋亡的机制,本实验对两种与成纤维细胞增生、创伤修复和瘢痕形成关系最为密切的细胞因子的表达量进行了检测。bFGF能促进成纤维细胞、上皮细胞和血管内皮细胞分裂增殖[12],促使参与创伤修复的细胞增殖,抑制损伤细胞凋亡[13]。TGF-β1是公认的成纤维细胞的强效趋化因子,能够直接诱导成纤维细胞向肌成纤维细胞转化[14],直接刺激血管形成,促进成纤维细胞增殖,抑制细胞外基质的降解,刺激细胞外基质与更多胶原合成并黏附,从而促进瘢痕形成[15]。通过Western blot和荧光定量PCR检测,证明了丝裂霉素C可下调TGF-β1、bFGF细胞因子的表达,足以影响创伤的愈合过程,对预防和治疗瘢痕性喉气管狭窄具有重要作用。

参考文献:

[1] 杨希之, 毛小慧, 敖华飞, 等. 兔瘢痕性喉气管狭窄模型的制备[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2010, 30(12): 1490-1493.

[2] Smith M E, Elstad M. Mitomycin C and the endoscopic treatment of laryngotracheal stenosis: are two applications better than one? [J]. Laryngoscope, 2009, 119(2): 272-283.

[3] Teo F, Anantham D, Feller-Kopman D, *et al*. Bronchoscopic management of sarcoidosis related bronchial stenosis with adjunctive topical mitomycin C[J]. Ann Thorac Surg, 2010, 89(6): 2005-2007.

[4] Parker N P, Bandyopadhyay D, Misono S, *et al*. Endoscopic cold incision, balloon dilation, mitomycin C application, and steroid injection for adult laryngotracheal stenosis[J]. Laryngoscope, 2013, 123(1): 220-225.

[5] Gouveris H, Karaiskaki N, Koutsimpelas D, *et al*. Treatment for adult idiopathic and Wegener-associated subglottic stenosis[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2013, 270(3): 989-993.

[6] 谢斌, 殷敏, 朱歆洁, 等. 丝裂霉素C在治疗气道瘢痕狭窄中的应用[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2013, 27(12): 654-656.

[7] 崔嘉, 张杰, 王娟, 等. 局部应用丝裂霉素C对良性瘢痕增生性气道狭窄抑制作用的初步研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2012, 35(12): 901-906.

[8] 李聪, 杨希之, 敖华飞, 等. 5-FU变形脂质体制备及局部治疗兔喉气管狭窄的研究[J]. 医学研究杂志, 2013, 42(4): 54-57.

[9] Nakagishi Y, Morimoto Y, Fujita M, *et al*. Photodynamic therapy for airway stenosis in rabbit models[J]. Chest, 2008, 133(1): 123-130.

[10] Melkane A E, Matar N E, Haddad A C, *et al*. Management of postintubation tracheal stenosis: appropriate indications make outcome differences[J]. Respiration, 2010, 79(5): 395-401.

[11] Johnston D R, Curry J M, Rubin R, *et al*. Unusual fibrosclerotic lesion of the laryngotracheal complex presenting as subglottic stenosis[J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2009, 118(1): 27-29.

[12] Nugent M A, Iozzo R V. Fibroblast growth factor-2[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2000, 32(2): 115-120.

[13] Skaletz-Rorowski A, Eschert H, Leng J, *et al*. PKC delta-induced activation of MAPK pathway is required for bFGF-stimulated proliferation of coronary smooth muscle cells[J]. Cardiovasc Res, 2005, 67(1): 142-150.

[14] Lotz M M, Rabinovitz I, Mercurio A M. Intestinal restitution: progression of actin cytoskeleton rearrangements and integrin function in a model of epithelial wound healing[J]. Am J Pathol, 2000, 156(3): 985-996.

[15] Murata H, Zhou L, Ochoa S, *et al*. TGF-beta3 stimulates and regulates collagen synthesis through TGF-beta1-dependent and independent mechanisms[J]. J Invest Dermatol, 1997, 108(3): 258-262.

(**收稿**:2014-07-09;**修回**:2014-08-06)

(编辑 张 维)