维普资讯 http://www.cqvip.com

率为 80%。药敏结果与远期化疗效果之间的关系尚在进一步研究中。

3 讨 论

临床上如何更好地选择抗癌药物和制定疗效较高的化疗方案是一个亟待解决的临床难题[1]。由于晚期头颈肿瘤无论手术和放疗采用单一或综合的治疗方法,其疗效均不佳,局部失败率可达 25%～50%,远处转移率达 10%～20%[2]。因此,积极探索在手术+放疗的基础上合理地采用化疗,尤其是寻求一种简便易行、准确可靠的实体瘤化疗药物敏感性预测方法,实行个体化治疗,对于改善头颈肿瘤晚期病人的治疗现状,提高临床疗效是十分重要的。多年来,人们不断在寻找一种简便易行、准确可靠的化疗药物敏感性预测方法,致今发展为体内和体外两大系列十多种药敏试验,并且,逐步从动物体内转向体外,从昂贵、费时转向简便、快速。核仁组成区(Nucleolar Organize Regions, NORs)是细胞核糖体基因转录合成核糖体 RNA 的场所[3],AgNOR 计数的变化可反映细胞的增殖活性[4]。很多研究观察到化疗药物治疗后,瘤细胞中 AgNOR 平均计数减少,可作为预测肿瘤化疗效果的参考指标[5]。由于 AgNOR 作为核仁组成区及其 rDNA 转录活动的标志,直接反映了细胞基因转录活性的改变,因此,可以准确、灵敏地反映抗癌药物对肿瘤作用的变化。AgNOR 技术与目前公认的 MTT 法有较好的相关性,两种方法总的符合率为 94.5%[6],但是,AgNOR 检测方法无新鲜肿瘤组织中非肿瘤细胞的干扰,是与 MTT 等方法不同的显著特点[4,5]。此外,本方法试剂价格便宜、技术操作简便、实验周期较短,因而,具有价廉、简易、省时的特点。

本研究根据喉癌和鼻咽癌的生物学及组织病理学特点,应用简便易行的单纯机械分离法分离新鲜肿瘤组织,获得了高存活率的单细胞悬液,实验的成功率高。我们观察到,喉癌和鼻咽癌的药物敏感性有较大异质性,敏感性最高的药物也存在对其不敏感的个体(15/51 例对 DDP 不敏感),敏感性最低的药物也存在对其较为敏感的个体(14/51 例对 MMC 较敏感),结果表明,不同的个体对同一种药物和不同的药物对同一个体的敏感性均不同,因此,进行肿瘤药敏检测,实行喉癌和鼻咽癌个体化治疗非常必要。治疗头颈部恶性肿瘤的药物甚多,几乎包括各种抗癌药。本实验所测得的敏感药物顺序大致与临床结果符合,其敏感性较好的药物如 DDP、VCR、5-FU、PYM 等是目前头颈肿瘤化疗中的首选药物。经 AgNOR 技术测得的喉癌和鼻咽癌的药物敏感顺序不完全一致,且鼻咽癌的敏感性显著高于喉癌($P<0.05$),这提示化疗在鼻咽癌的综合治疗中具有非常重要的作用。本组 10 例患者作了化疗,药敏结果与体内疗效的符合率达 80%,初步显示 AgNOR 技术与临床的相关性较好。由于样本数少,本研究的预测结果与临床疗效的关系有待深入研究。

参 考 文 献

[1] Xu JI, Song SI, Tang ZI. Evaluation of in vitro chemosensitivity of antitumor drugs using the MTT assay in fresh human breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 1998;49:251-259.

[2] Zidam J. Multidrug chemotherapy using bleomycin, methotrexate and cisplatin combined with radical radiotherapy [J]. Cancer, 1987;59:24-26.

[3] Piffko J, Bankfalvi A, Ofner D, et al. Standardized AgNOR analysis of the invasive tumor front in oral squamous cell carcinomas[J]. J Pathol, 1997;182:450-456.

[4] Valenca JT Jr, Escanhoel CA, Netze K, et al. AgNOR pattern and PCNA analysis in fine needle biopsies of liver cell carcinoma[J]. Neoplasma, 2001;48:370-373.

[5] Karoly S, Edib K, Andrew VS. Decrease in the AgNOR number in Dunning R3327 prostate cancers after treatment with an agonist and antagonist of luteinizing hormone-releasing hormone[J]. Am J Pathol, 1991;138:1237-1241.

[6] Yamaue H, Tanimura H, Noguchi K, et al. Chemosensitivity testing of fresh human gastric cancer with highly purified tumor cells using the MTT assay[J]. Br J Cancer, 1992;66:794-798.

[7] 张丽萍,许良中. 体外瘤株嗜银蛋白染色法与 MTT 法化疗敏感性的对比研究[J]. 实用肿瘤杂志, 1997;12:81-83.

维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2003)02 - 0175 - 04

塞来昔布抑制慢性支气管炎大鼠气道粘蛋白高分泌的实验研究

黄 勇[1], 杨肇亨[1], 周向东[2], 刘维会[1], 段绪伟[1]

(1.第三军医大学大坪医院呼吸内科,重庆 400042;2.重庆医科大学第二临床学院肺科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨塞来昔布抑制慢性支气管炎大鼠气道粘蛋白高分泌的作用。方法:Wistar 大鼠气管内注入 0.1% 脂多糖 200μl 复制模型,采用图象分析、ELISA 等方法检测病理学改变、支气管肺泡灌洗液(BALF)中粘蛋白量的变化。结果:注入脂多糖 3 周后出现慢性支气管炎的病理学表现,包括杯状细胞增生、粘膜下腺体增生肥大,分泌细胞内及 BALF 中粘蛋白量增加;塞来昔布可以显著减少每 1mm 气管上皮中杯状细胞数目、上皮及腺体细胞粘蛋白面积% 与未分泌指数、BALF 中粘蛋白含量。结论:塞来昔布通过特异性地抑制环氧化酶 2 的活性,可以减少慢性支气管炎大鼠气管上皮杯状细胞增生,也可抑制杯状细胞和粘液腺体粘蛋白的合成分泌亢进。

【关键词】塞来昔布;慢性支气管炎;粘蛋白

【中国图书分类法分类号】R562.21 【文献标识码】A 【收稿日期】2002 - 05 - 02

A study on inhibition of celecoxib on the hypersecretion of airway mucin in chronic bronchitis rats

HUANG Yong, et al

(*Department of Respiratory Diseases, Daping Hospital, The Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the inhibition of celecoxib on the hypersecretion of airway mucins in the chronic bronchitis rats. *Methods*: Rat chronic bronchitis model was established by intratracheal instillation of 0.1% lipopolysaccharide 200μl. With image analysis and ELISA, the changes of pathology and mucins in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were observed. *Results*: The rats shared many features of chronic bronchitis after instillation, including goblet cells hyperplasia, submucosal glands hyperplasia and hypertrophy, mucins overabundance of secretory cells and BALF. Celecoxib could remarkably decrease the number of goblet cells per 1mm epithelium, mucins area% and pre - secretion index of glands and epithelia, mucins in BALF. *Conclusion*: Through inhibiting specifically cyclooxygenase 2, celecoxib could decrease goblet cells hyperplasia, inhibit excessive mucin synthesis and secretion in goblet cells and mucus glands of chronic bronchitis rats.

【Key words】Celecoxib; Chronic bronchitis; Mucin

花生四烯酸在环氧化酶作用下生成的前列腺素和血栓素是慢性支气管炎病理生理过程中重要的炎症介质。目前认为环氧化酶 1 作为细胞功能的一部分,呈基础结构性表达,而环氧化酶 2 的 mRNA 和蛋白水平在炎症过程中,受细胞因子诱导而明显增加。塞来昔布是环氧化酶 2 特异性抑制剂,在维持其抗炎、解热、镇痛作用的同时,又避免了传统非甾体类消炎药的诸多副作用,具有良好的安全性和耐受性[1]。本实验利用气管内滴入脂多糖复制大鼠慢性支气管炎模型,探讨了塞来昔布抑制气道粘蛋白高分泌的作用。

作者介绍:黄 勇(1970-),男,硕士,主治医师、讲师,主要研究方向:慢性阻塞性肺疾病。

1 材料和方法

1.1 动物模型制作

体重 200~250g 健康雄性 Wistar 大鼠 28 只,随机分为:(1)正常对照组(C 组):7 只,不做任何干预;(2)慢性支气管炎组(B 组):7 只,1% 戊巴比妥钠 30mg/kg 体重腹腔注射麻醉后,用静脉留置针经声门插入气管内,注入 0.1% 脂多糖(大肠杆菌血清型 Olll:B4, Sigma 公司)200μl,饲养 3 周[2];(3)塞来昔布组(S 组):7 只,从注入脂多糖第 8 天起,每天给

维普资讯 http://www.cqvip.com

予塞来昔布(法玛西亚公司)20mg/kg 体重灌胃,连续 14 天;(4)生理盐水组(N 组),除改用生理盐水 0.4ml 灌胃外,余同塞来昔布组。

1.2 标本采集

大鼠麻醉后暴露气管,甲状软骨下插管,4℃ 无钙镁 Hank's 液 10ml 分 2 次灌洗,回收的支气管肺泡灌洗液(BALF)应大于 5ml;取 50μl 加 950μl3% 醋酸混匀,细胞计数板计数两次,取均值;其余 BALF 1000r/min,离心 10min,上清液 -70℃ 保存;少许 Hank's 液与沉淀物混匀后涂片,瑞氏染色行分类计数。开胸暴露心脏,生理盐水经左心室—主动脉弓冲洗血管床后,4% 多聚甲醛 -0.1mol/L 磷酸缓冲液血管及气管内灌注固定,30min 后取出气管支气管及肺组织,相同固定液 4℃ 继续固定 24h,常规脱水,石蜡包埋,分别行 HE 染色、阿辛蓝 - 过碘酸雪夫氏染色(AB - PAS)及抗生物素蛋白 - 生物素 - 过氧化物酶复合体法 RTEll 小鼠抗大鼠气道粘蛋白单克隆抗体(美国 SH Randell 教授惠赠)免疫组织化学染色。

1.3 图象分析

采用重庆大学 ICT 研究所 Tiger 920 细胞图象分析系统。每张 HE 染色切片随机测定 3 处腺体厚度、相应气管壁厚度,AB - PAS 染色切片测定 3mm 长气管上皮中杯状细胞数目,RTEll 免疫组化染色切片测定 3 处腺体及 5 个高倍镜视野中杯状细胞阳性染色的平均吸光度、粘蛋白面积%(阳性染色面积与腺体细胞面积或气管上皮面积之比)。

1.4 粘蛋白含量测定

BALF 室温复融,100μl/孔包被酶标板,40℃ 过夜,稀释液室温孵育 1h,100μl 1∶500 稀释的 RTEll 单抗 37℃ 孵育 1h,100μl 1∶1000 稀释的 HRP 标记羊抗小鼠 IgG 室温密封孵育 3h,100μl 底物溶液 37℃ 避光显色 15min,加入终止液 50μl 终止反应,用底物溶液校正零点,于 492nm 处测吸光度作为粘蛋白相对含量,取 2 孔相同待测品的均值。

1.5 统计方法

应用 SPSS 统计软件进行 t 检验,$P<0.05$ 为有显著性差异,$P<0.01$ 为有极显著性差异。

2 结 果

2.1 病理组织学及 BALF 细胞学改变

慢性支气管炎大鼠气管、支气管上皮脱落,纤毛缺失、倒伏,杯状细胞增生、分泌亢进;粘膜下粘液腺增生肥大,浆液腺粘液化生;气管壁增厚,粘膜层、粘膜下层、肌层见淋巴细胞、浆细胞及少量中性粒细胞浸润,支气管平滑肌增厚;肺泡扩张,肺泡壁变薄、断裂。支气管肺泡灌洗液中细胞总数、中性粒细胞%极显著地增加,肺泡巨噬细胞%极显著降低。塞来昔布灌胃 14 天后,上皮损害减轻,炎症细胞浸润减少,BALF 的中性粒细胞%显著降低;生理盐水组病理组织学特征与 BALF 细胞计数与分类均未发生明显变化(图 1~4,表 1)。

2.2 分泌细胞增生肥大水平

与对照组比较,慢性支气管炎组气管壁极显著增厚、每 1mm 上皮中杯状细胞数、腺体厚度/气管壁厚度(Reid 指数)极显著增加。塞来昔布可以抑制杯状细胞增生,但对气管壁厚度和 Reid 指数无显著的减低作用(表 2)。

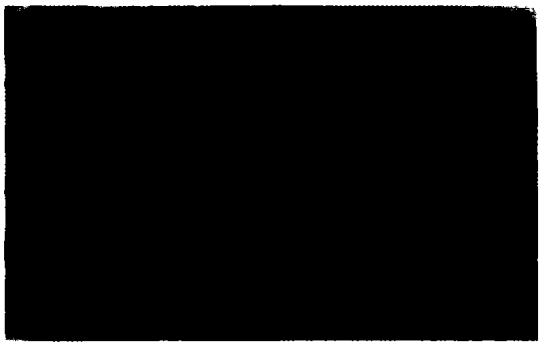


图 1 慢性支气管炎大鼠气管上皮受损、腺体增生肥大、炎症细胞浸润(×200) HE 染色



图 2 慢性支气管炎大鼠气管上皮杯状细胞增生、粘蛋白表达水平增加(×200) RTE11 染色(ABC 法)



图 3 慢性支气管炎大鼠气管粘膜下腺体粘蛋白表达水平增加(×200) RTE11 染色(ABC 法)

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 4 塞来昔布组气管上皮杯状细胞增生减弱、上皮及粘膜下腺体粘蛋白表达水平降低(×200)
RTE11 染色(ABC 法)

2.3 分泌细胞合成及分泌亢进程度

2.3.1 粘蛋白表达水平 各组分泌细胞免疫组化染色阳性处(粘蛋白)的平均吸光度没有明显改变,但慢性支气管炎组上皮和腺体细胞粘蛋白面积%均极显著增加,未分泌指数(平均吸光度与粘蛋白面积%的乘积)也极显著增加。塞来昔布组织粘蛋白面积%、未分泌指数均较慢性支气管炎组明显降低(图 2~4,表 3)。

2.3.2 支气管肺泡灌洗液中粘蛋白相对含量 与对照组(0.206 ± 0.027)比较,慢性支气管炎组 BALF 的吸光度极显著增加(0.535 ± 0.098, $P<0.01$),塞来昔布组较慢性支气管炎组极显著降低(0.414 ± 0.063, $P<0.05$),生理盐水组无明显变化(0.541 ± 0.099, $P>0.05$)。

3 讨 论

上皮杯状细胞和粘膜下腺体合成分泌的粘蛋白是决定呼吸系统粘液的粘附性、粘滞性、弹性的主要因素。慢性支气管炎发生发展过程中,分泌细胞增生、肥大,粘液及粘蛋白分泌亢进,气道内潴留的粘液损害了粘液纤毛清除功能及局部防御机制,加重了气道阻塞和细菌感染,可导致气体交换异常,使病情进一步恶化[3]。

本实验采用气道内一次性注入 0.1% 脂多糖 200μl 的方法,3 周后大鼠即表现出慢性支气管炎的病理学特征。除了杯状细胞增生,粘膜下腺体增生肥大外,慢性支气管大鼠 BALF 中粘蛋白含量也明显增加,同时分泌细胞内尚未分泌的粘蛋白仍高于正常对照组,提示合成的亢进程度大于分泌的亢进,证实了模型的高分泌特征。

表 1 BALF 细胞计数与分类($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞总数($\times 10^5$/ml)	细胞分类%		
			肺泡巨噬细胞	中性粒细胞	淋巴细胞
C 组	7	9.18 ± 0.76	86.50 ± 2.57	3.36 ± 0.99	10.14 ± 1.68
B 组	7	40.89 ± 6.92**	57.14 ± 10.38**	34.00 ± 7.26**	8.86 ± 3.54
S 组	7	32.65 ± 4.03	60.21 ± 7.31	27.79 ± 3.82△	12.00 ± 2.47
N 组	7	38.14 ± 4.75	60.07 ± 5.92	30.57 ± 4.35	9.36 ± 2.53

注:与 C 组比较:** $P<0.01$ 与 B 组比较:△ $P<0.05$

表 2 气管壁及分泌细胞增生肥大水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	气管壁厚度(μm)	Reid 指数	杯状细胞数/mm 上皮
C 组	7	353.57 ± 25.12	0.061 ± 0.015	11.05 ± 1.94
B 组	7	533.31 ± 42.29**	0.420 ± 0.040**	52.81 ± 7.72**
S 组	7	516.43 ± 35.72	0.408 ± 0.067	28.19 ± 3.06△△
N 组	7	527.16 ± 28.40	0.426 ± 0.034	51.57 ± 4.19

注:与 C 组比较:** $P<0.01$ 与 B 组比较:△△ $P<0.01$

表 3 气管上皮及腺体细胞内粘蛋白表达水平

组别	n	气管上皮		腺体细胞	
		粘蛋白面积%	未分泌指数	粘蛋白面积%	未分泌指数
C	7	0.060 ± 0.004	0.068 ± 0.005	0.120 ± 0.023	0.135 ± 0.017
B	7	0.404 ± 0.053**	0.475 ± 0.050**	0.556 ± 0.121**	0.652 ± 0.074**
S	7	0.158 ± 0.037△△	0.183 ± 0.042△△	0.462 ± 0.095△	0.509 ± 0.088△△
N	7	0.395 ± 0.046	0.461 ± 0.054	0.554 ± 0.076	0.643 ± 0.054

注:与 C 组比较:** $P<0.01$ 与 B 组比较:△ $P<0.05$;△△ $P<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com

PGE_1、PGE_2、$PGF_2\alpha$、TXA_2 均可分别通过 cAMP、cGMP、Ca^{2+}、甘油二酯等，刺激人、动物气管支气管，及培养的细胞株粘蛋白的合成分泌。环氧化酶抑制剂吲哚美辛、氟联苯丙酸等则可以抑制香烟烟雾、卵蛋白激发所导致的大鼠气道上皮杯状细胞增生，促进肺内气道上皮表型的恢复。吲哚美辛、阿司匹林、血栓素拮抗剂 PTA_2 及 SQ29548 能抑制花生四烯酸、15－羟花生四烯酸、半胱氨酸白三烯、血小板活化因子对粘蛋白分泌的刺激作用，以及 TXA_2 类似物、半胱氨酸白三烯引起的大鼠气管粘液分泌、凝胶层增厚[4]。

塞来昔布主要用于骨关节炎和类风湿性关节炎，及其他抗炎镇痛治疗，极少用于呼吸系统疾病。Dicpinigaitis 等的研究表明其对稳定期哮喘患者的肺功能、气道反应性、咳嗽反射的敏感度均没有显著的影响[5]，目前尚无气道高分泌方面的研究报道。本实验证实了塞来昔布可以明显抑制慢性支气管炎大鼠气管上皮杯状细胞增生，与烟熏等模型的结果相一致，可能是由于前列腺素的合成及其增加 cAMP 的作用被抑制所致，这也是杯状细胞增生的一个主要机制[4,6]。由于塞来昔布特异性地抑制了环氧化酶 2 的活性，前列腺素和血栓素合成减少，对粘蛋白合成分泌的刺激作用减弱，因此整个气道内粘蛋白的分泌量及气管上皮和粘膜下腺体细胞内尚未分泌粘蛋白均有明显减少。

此前曾报道慢性支气管炎、弥漫性泛细支气管炎患者应用吲哚美辛、TXA_2 合成酶抑制剂 OKY－046 后痰量减少，主要由于血管通透性降低所致，提示环氧化酶途径抑制剂减少水分分泌的作用似乎更占优势[7]。而且传统非甾体类消炎药抑制了环氧化酶途径，可导致脂氧化酶代谢增强，故药物本身也能促进高分泌，这就是阿司匹林哮喘患者粘液释放增加，吲哚美辛促进致敏豚鼠激发后粘蛋白分泌增高的主要机制。而新近研究发现阿司匹林哮喘主要是与环氧化酶 1 途径被抑制有关，环氧化酶 2 抑制剂对该类患者甚至可能是有益的[8]。本实验也未发现塞来昔布有增加粘蛋白分泌的作用。随着对环氧化酶在炎症中作用机制的深入研究，环氧化酶 2 抑制剂的应用将得到更大的拓展，具体的临床研究也会不断地深入进行。

参 考 文 献

[1] FitzGerald GA, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase－2[J]. N Engl J Med, 2001; 345(6): 433－442.

[2] 马 楠，崔德建，梁研杰，等. 气管内注入脂多糖法建立大鼠慢性支气管炎模型[J]. 中华结核和呼吸杂志，1999; 22(6): 371－372.

[3] Rogers DF. Mucus hypersecretion in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Novartis Found Symp, 2001; 234: 65－83.

[4] Borchers MT, Carty MP, Leikauf GD. Regulation of human airway mucins by acrolein and inflammatory mediators[J]. Am J Physiol, 1999; 276(4 pt 1): L549－555.

[5] Dicpinigaitis PV. Effect of the cyclooxygenase－2 inhibitor celecoxib on bronchial responsiveness and cough reflex sensitivity in asthmatics[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2001; 14(2): 93－97.

[6] Rogers DF, Jeffery PK. Inhibition of cigarette smoke－induced airway secretory cell hyperplasia by indomethacin, dexamethasone, prednisolone, or hydrocortisone in the rat[J]. Exp Lung Res, 1996; 10(3): 285－298.

[7] Kurashima K, Fujimura M, Hoyano Y, et al. Effect of thromboxane A2 synthetase inhibitor, OKY－046, on sputum in chronic bronchitis and diffuse panbronchiolitis[J]. Eur Respir J, 1995; 8(10): 1705－1711.

[8] Marks F, Harrell K, Fischer R. Successful use of cyclooxygenase－2 inhibitor in a patient with aspirin－induced asthma[J]. South Med J, 2001; 94(2): 256－257.