DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.10.019
第26卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 10
2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

文章编号:1000-5404(2004)10-0895-04

论著

吸烟大鼠支气管肺组织中Gq的表达及其影响

曹国强[1],钱桂生[2],崔社怀[1] (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所呼吸内科,重庆 400042;[2]新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要:目的 探讨Gq在COPD大鼠模型支气管肺组织中的表达变化及其在COPD大鼠模型气道炎症中的作用。方法 将Wistar大鼠44只随机分为4组:①非吸烟对照组;②吸烟1个月组;③吸烟2个月组;④干预(地塞米松+吸烟2个月)组。观察肺组织病理学变化和支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞记数和分类。支气管肺组织Gq表达检测采用免疫组织化学和Western blot分析。结果 吸烟大鼠的支气管粘膜和肺实质均有大量炎细胞浸润,BALF中白细胞总数和中性粒细胞数均显著高于对照组,吸烟2个月大鼠出现明显肺气肿改变。Gq在对照组大鼠支气管肺组织有弱表达,在模型组和干预组均有过度表达,Gq阳性细胞主要为气道上皮细胞、炎细胞和毛细血管内皮细胞。模型组大鼠Gq阳性细胞百分比和BALF中白细胞总数、中性粒细胞数呈显著正相关。Western blot分析显示模型组和干预组Gq表达水平显著高于对照组,而药物干预后Gq表达水平显著下降,却仍高于对照组。结论 Gq的强表达可能在吸烟大鼠的气道炎症中发挥作用,干预其过度表达可能是治疗气道炎症的有效方法,糖皮质激素有可能通过抑制Gq的过度表达而减轻气道炎症的作用。

关键词:G蛋白;慢性阻塞性肺疾病;药物干预
中图法分类号:R163; R322.35; R341 文献标识码:A

Expression of Gq in bronchopulmonary tissues in rats after inhalation of cigarette smoke

CAO Guo-qiang[1], QIAN Gui-sheng[2], CUI She-huai[1] ([1]Department of Respiratory Diseases, Daping Hospital, 400042; [2]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the expression of Gq protein in bronchopulmonary tissues of rats of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) model and the roles of inflammation in airway of COPD rats. Methods A total of 44 Wistar rats were divided randomly into 4 groups: nonsmoking control group, 1-month-smoking group, 2-month smoking group, and intervention group (dexamethasone + smoking for 2 months). The pathological changes of lung tissues and the total and differential count of white blood cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in all groups were observed. The expression of Gq in bronchopulmonary tissues was detected by immunohistochemical method and Western blot analysis. Results More significant increases in total number of leukocytes and neutrophils in BALF were found in the model group than those in the control group. Gq was mainly expressed in airway epithelial cells, inflammatory cells, and pulmonary capillary endothelia. Weak expression of Gq was found in bronchopulmonary tissues in the control group, but overexpression of Gq in the model group. The ratios of Gq positive cells in bronchopulmonary tissues were significantly correlated with the number of white blood cells and neutrophils in BALF. The levels of expression of Gq were significantly higher in the model groups and intervention group than those in the control group. More significant decrease in Gq expression was found in the intervention group as compared with that in 3-month-smoking group. Conclusion Gq may be involved in the process of airway inflammation in COPD. Inhibition of the Gq overexpression might be a new approach to the treatment of COPD. Corticosteroid might have some effects on the inhibition of the airway inflammation.

Key words: G protein; chronic obstructive pulmonary diseases; drug intervention

吸烟与人类慢性支气管炎和肺气肿的关系密切,熏香烟能在较短时间内复制出慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)模型。COPD在气道内有大量中性粒细胞、巨噬细胞及淋巴细胞等炎细胞聚集[1]。目前认为,在所有已知的各种刺激中有80%作用于受体后都通过G蛋白与其效应器发生偶联,即G蛋白的水平与活性变化对维持和控制细胞正常状态有重要作用,G蛋白的变化是否参与了吸烟诱

作者简介:曹国强(1963-),男,河北省景县人,博士研究生,副主任医师,副教授,主要从事COPD哮喘方面的研究,发表论文21篇。电话:(023)68757939

收稿日期:2004-03-03;修回日期:2004-04-29

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

导的COPD病理变化目前尚少见报道。我们采用烟熏建立COPD大鼠模型，用免疫组化和Western blot方法测定COPD大鼠肺组织Gq蛋白的表达变化，并探讨其在COPD慢性气道炎症形成中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备与分组

雄性Wistar大鼠44只(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)，体质量(200±20) g，随机分为4组：不吸烟组、吸烟1个月组、吸烟2个月和干预(吸烟2个月＋地塞米松)组，每组11只。实验用市售山城牌过滤嘴香烟(重庆卷烟厂)，参照许三林等[2]自制大鼠实验性被动吸烟装置，方法稍有改进，每日吸烟1次，每次燃烧15支卷烟，每3支燃烧10～15 min，燃烧完换烟继续，15支香烟燃烧中间停止3 min，每周吸烟6 d，连续2个月，分别于1个月、2个月吸烟完成后分批将动物处死。干预组先按模型组方法制备COPD模型，第8天起隔日下午肌肉注射地塞米松1 mg/kg。除吸烟时间外，4组大鼠在相同环境中饲养，干预组及不吸烟组大鼠于实验开始2个月后处死。

1.2 支气管肺泡盥洗液及肺组织学检查

大鼠用戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉后，气管插管，用10 ml生理盐水灌洗，操作时缓慢地经气道把液体注入肺脏，再缓慢回抽液体，如此反复推抽4次，最终的回抽量约8 ml。取0.5 ml回收液先做白细胞记数，余下的液体2 000 r/min离心10 min后，取上清保存于－70 ℃冰箱，待它用。沉淀用瑞氏-姬姆萨染色法进行白细胞分类记数。处死后的大鼠完整取下心肺，向气管内注入4%多聚甲醛直至肺膨胀，取下左、右肺叶浸泡于4%多聚甲醛液中固定12 h，规定取右中、下肺常规石蜡包埋，切片，其中2张行HE染色作常规病理学检查。

1.3 支气管肺组织Gq的免疫组织化学检测

肺组织切片厚4 μm，采用链霉菌抗生物素蛋白过氧化酶法(北京中山公司S-P即用型试剂盒，S-P9001)在石蜡切片上测Gq的免疫组化表达，操作步骤按试剂盒说明书进行。一抗为1∶200 Gq单抗(美国Santa Cruz公司)，二抗为生物素化羊抗小鼠IgG，3,3二氨基联苯胺(DAB H_2O_2)显色，苏木素复染，封片。阳性反应为胞浆内出现棕色颗粒。阴性对照以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗而其它条件均相同。每张切片随机选取结构完整的1支主支气管和4支直径＜100～200 μm的细支气管进行光镜下观测分析。

染色结果判定：Gq蛋白阳性表达主要为细胞浆。先按染色强度打分：无色(0分)，淡黄(1分)，棕黄(2分)，棕褐(3分)；再按阳性细胞所占百分比打分：阳性细胞＜5%为0分，5%～25%为1分，25%～50%为2分，50～75%为3分，75%为4分；染色强度与阳性细胞所打分的乘积0～1分为阴性(－)，2～3分为弱阳性(＋)，4～5分为阳性(＋＋)，6分为强阳性(＋＋＋)。

1.4 大鼠肺组织Western blot杂交分析

将冷冻肺组织置于4 ℃预冷的含0.4 mmol/L甲苯黄酰氟(PMSF，Sigma公司)、1 mmol/L的1，10菲咯啉(1，10 phenanthroline，Sigma公司)、1 mmol/L碘乙酰胺(瑞士Fluka公司)和1 μmol/L抑胃肽A(pepstatinA，Sigma公司)的磷酸盐缓冲液(PBS，pH 7.4)中，匀浆制备膜蛋白，置－70 ℃储存备用。电泳用11%SDS PAGE，按每一样品25～50 μg分别上5块胶，1块用于染色确定上样量的一致性，另4块分别用电转移的方式转至醋酸纤维素膜上。

将膜用5%的脱脂奶粉封闭后，与抗Gqα(1∶1 200)抗体(美国Santa Cruz公司)反应1 h，洗去抗体后将膜置于1∶8 000的辣根过氧化物酶标记的IgG(英国Amersham公司)中反应1 h，用PBS充分洗涤后，用增强型化学发光(ECL)显影药盒(英国Amersham公司)显影，X线片记录影像。

1.5 统计学方法

计数资料用χ^2检验。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件行方差分析及均数间多重比较。

2 结果

2.1 肺组织病理学变化

吸烟1个月组大鼠，气道上皮细胞纤毛脱落，细胞脱落，气道壁炎性细胞浸润明显。吸烟2个月组除上述改变外，还可见杯状细胞增生，气道平滑肌增生肥大，肺泡壁变薄、破裂，肺泡腔融合、扩大及肺大疱形成(图1)。

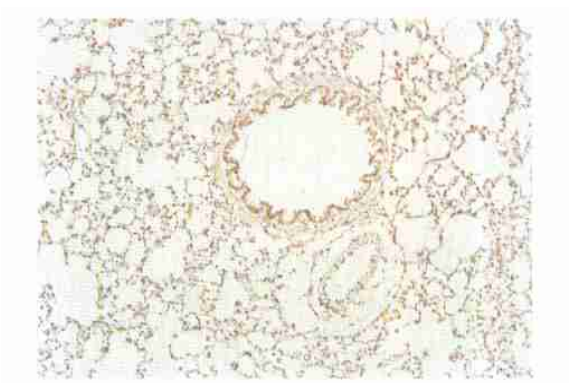


图1 免疫组化显示正常对照组大鼠支气管肺组织细胞浆Gq呈弱阳性表达 (S-P×100)

Fig 1 Positive expression of Gq in airway epithelial cells, pulmonary alveoli cells, and endothelial cells of normal rats by immunohistochemical staining (S-P×100)

2.2 各组支气管肺泡灌洗液(BALF)细胞学变化(表1)

表1 各组支气管肺泡灌洗液中白细胞记数及分类($\bar{x}\pm s$，$n=11$)

Tab 1 Count and classification of leukocytes in BALF ($\bar{x}\pm s$, $n=11$)

Group	White blood cells	Percentage of different cells (%, $\bar{x}\pm s$)		
	(10^8/L)	Macrophages	Neutrophils	Lymphocytes
Control	6.12±1.7	87.2±2.6	7.4±2.3	3.6±1.9
Smoking for 1 month	14.2±3.8**	70.17±4.4*	24.2±3.7**	4.3±1.6
Smoking for 2 months	15.3±3.5**	68.31±7.5*	27.2±5.3**	3.2±2.1
Intervention	10.1±4.2#	86.31±3.1#	6.2±5.3##	5.2±3.1

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* control；#：$P<0.05$，##：$P<0.01$，*vs* smoking for 1 and 2 months

2.3 大鼠肺组织Gq免疫组织化学检测结果

11只正常大鼠肺组织中Gq表达阴性和弱阳性8例

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(72.7%), 表达阳性 2 例(18.2%), 强阳性 1 例(9.1%); 吸烟 1 月的 11 只大鼠中 Gq 表达弱阳性 1 例(9.1%), 阳性的 7 例(63.6%), 强阳性 3 例(27.3%); 吸烟 2 月组 Gq 表达阳性的 2 例(18.2%), 强阳性 9 例(81.8%); 地塞米松治疗组 Gq 表达弱阳性 2 例(18.2%), 表达阳性 7 例(63.6%), 强阳性 2 例(18.2%)。

吸烟组大鼠与正常对照组比较 Gq 阳性、强阳性表达增加非常显著($P<0.01$); 吸烟 2 月组大鼠 Gq 表达强阳性率显著高于吸烟 1 月组大鼠($P<0.05$); 地塞米松治疗后大鼠 Gq 表达强阳性率显著下降($P<0.05$), 但阳性、强阳性率仍高于正常对照组($P<0.01$)。见表 2, 图 2、3。

表 2　各组支气管肺组织 Gq 表达检测结果

Tab 2　Immunohistochemical results of Gq expression

Group	−	+	++	+++	Total number
Control	1	7	2	1	11
Smoking for 1 month	0	1	7	3	11
Smoking for 2 months	0	0	2	9	11
Intervention	0	1	7	3	11
Total number	1	9	18	16	44

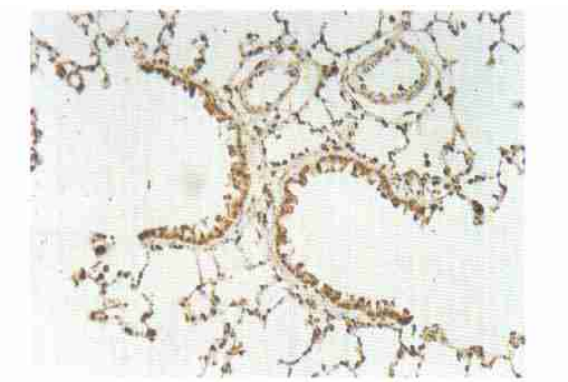
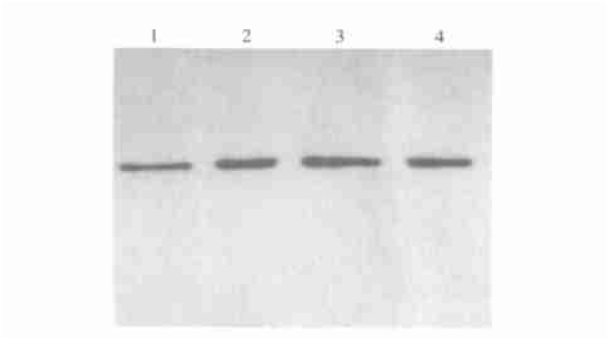


图 2　免疫组化显示 **COPD** 组大鼠支气管肺组织细胞浆 **Gq** 呈强弱阳性表达　(S-P× 200)

Fig 2　Positive expression of Gq in airway epithelial cells, pulmonary alveoli cells, and endothelial cells of COPD rats by immunohistochemical staining　(S-P× 200)



1: Normal rats; 2: Smoking for 1 month; 3: Smoking for 3 months; 4: Intervention with dexamethasone

图 3　**Gq** 蛋白在不同组大鼠支气管肺组织中的表达 (**Western blot**)

Fig 3　Gq protein level in the bronchopulmonary tissue of the rats in different groups

2.4　Gq 表达与 BALF 中性粒细胞记数的关系

吸烟组大鼠 BALF 白细胞总数、中性粒细胞数量与支气管肺组织的 Gq 阳性细胞百分数之间呈显著正相关(r 各为 0.76 及 0.85, P 分别<0.01)。

2.5　大鼠肺组织 Gq Western blot 杂交分析结果

吸烟大鼠支气管肺组织 Gq 蛋白平均积分光密度值分别为: 正常对照组 103.39±19.2; 吸组烟为 130.7±17.9; 吸烟 3 个月组为 149.9±22.7; 地塞米松治疗组为 129.2±20.4。吸烟各组(含地塞米松治疗组)Gq 蛋白表达均较正常对照组升高(P 分别<0.01); 吸烟各组间比较, 吸烟 2 个月组较吸烟 1 个月组也有增高($P<0.05$); 地塞米松治疗组较吸烟 2 个月组显著下降($P<0.05$), 但仍高于正常对照组, 与吸烟 1 个月组比较差别不显著($P>0.05$)。

3　讨论

光镜观察显示, 吸烟大鼠出现了支气管上皮纤毛变短、不规则, 杯状细胞增生, 粘液分泌增多, 气管支气管粘膜大量炎细胞浸润, 肺气肿、肺大泡等 COPD 的病理性改变。

Gq 是 G 蛋白 α 亚族的重要成员之一, 不论是在生理状态, 还是病理状态下, 它的水平和活性对维持和控制细胞正常状态均是十分重要的。涉及到 G 蛋白的研究十分广泛, 但通常多采用 Western blot 来检测组织中的 G 蛋白表达变化, 它可以提供 G 蛋白在整体组织(器官)的活性状况, 但不能提供表达 G 蛋白的细胞起源及数量, 而免疫组化能弥补其不足。本实验结果显示, COPD 大鼠的气道上皮细胞、肺毛细血管内皮细胞、炎细胞等均表现为 Gq 强表达, 提示以上细胞参与了烟雾刺激以及刺激后续反应的病理性信号转道。

最近有学者在过敏原诱导的小鼠肺嗜酸性粒细胞增多症的研究中发现, 敲除了 Gq 基因的小鼠肺组织和肺泡灌洗中嗜酸性粒细胞的数量显著下降[3], 提示 Gq 的异常表达参与了嗜酸性粒细胞增多的发生。COPD 患者气道内存在大量中性粒细胞为主的炎细胞, 在急慢性吸烟大鼠的支气管周围和肺间质均有大量炎症细胞浸润, BALF 中白细胞总数和中性粒细胞数均显著高于对照组, 烟雾刺激是通过何信号转道途径导致以上炎细胞浸润的, 是否也与 Gq 的表达异常有关, 目前尚少见报道。本实验采用免疫组化和 Western blot 相结合的办法对 Gq 在吸烟大鼠肺组织的表达变化进行研究, 结果显示吸烟大鼠的支气管上皮细胞、支气管粘膜下和肺泡腔的炎细胞、肺泡上皮细胞 Gq 的表达均有不同程度的增加, 以上改变参与了 COPD 的发病, 并与气道内炎细胞特别是中性粒细胞的浸润密切相关。

吸烟导致 Gq 表达的机制尚不清楚。Tappia 等[4]发现吸烟者较不吸烟者血液中 TNF 产物要高 38%; 实

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

验组大鼠被动吸烟后血浆 TNF 水平显著高于对照组[5]。也就是说吸烟可以促进体内单个核细胞分泌 TNF，而 TNF-α 处理后的人气道平滑肌细胞 Gq 表达增加，我们认为厌烟雾引起的 TNF 含量增加也可能是被动吸烟大鼠支气管-肺组织 Gq 表达增加的原因之一。吸烟还引起肺泡巨噬细胞、中性粒细胞大量聚集在肺内聚集、激活，释放出催化因子，如白细胞介素-8 及白三烯 B4 等细胞因子和炎性介质也可能参与了 Gq 的高表达，而上述炎性介质又可能会作用于受体后通过 G 蛋白与其效应器发生偶联而发挥效应，参与 COPD 的发病。

吸烟引起中性粒细胞在肺泡组织大量聚集的机制有很多，如吸烟通过使肺组织的多种细胞合成和释放催化因子，吸引中性粒细胞至肺泡腔；香烟内的氧化剂可降低中性粒细胞的变形性，从而促使其小血管停滞等。文献[6]报道，在炎症反应过程中的中性粒细胞凋亡延迟与 G 蛋白的表达改变有关。本研究显示 Gq 的表达变化与烟雾刺激大鼠气道内的炎细胞、中性粒细胞的数量成显著正相关，我们由此推测，烟雾刺激以及刺激后所产生的一系列反应产物，有可能会通过 G 蛋白(如 Gq)信号途径介导使中性粒细胞等炎细胞存活时间延长即凋亡异常，结果炎细胞在支气管-肺组织浸润。干预其过度表达可能是治疗气道炎症的有效方法，糖皮质激素有可能通过抑制 Gq 的过度表达而减轻气道炎症的作用。

参考文献：

[1] Saetta M, Turato G, Maestrelli P, *et al*. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(6): 1304－1309.

[2] 许三林，吴人亮，陈春莲，等. 上皮钙粘素在吸烟小鼠呼吸道上皮损伤修复中表达的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志，1999，22(7)：417－419.

[3] Borchers M T, Justice P J, Ansay T, *et al*. Gq signaling is required for allergen-induced pulmonary eosinophilia[J]. J Immunol, 2002, 168(7): 3543－3549.

[4] Tappia P S, Troughton K L, Langley-Evans S C, *et al*. Cigarette smoking influences cytokine production and anti oxidants defences[J]. Clin Sci (Lond), 1995, 88(4): 485－4899.

[5] 雷光华，周江南，李康华. 被动吸烟对大鼠腰椎骨密度和血浆 TNF 水平的影响[J]. 中国现代医学杂志，2002，12(10)：60－62.

[6] Condliffe A M, Kitchen E, Chilvers E R. Neutrophil priming: Pathophysiological consequences and underlying mechanisms[J]. Clin Sci (Lond), 1998, 94(5): 461－471.

(编辑 张 宁)

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)10-0898-01

良性子宫病变的保留子宫手术 45 例分析

Uterus-preserved surgery for benign uterine diseases: a report of 45 cases

王 琳，常 青，李玉艳，史常旭 (第三军医大学西南医院妇产科，重庆 400038)

我科于 2001 年 10 月初开展了对子宫良性病变经小切口行子宫三角形切除手术及子宫肌瘤挖除术，切口 3～4 cm，手术创伤小，术后疼痛轻，患者恢复快，现将 45 例患者的情况报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

患者年龄 28～77 岁，平均(46.2±7.4)岁。子宫肌瘤 30 例，子宫腺瘤样增生过长 7 例，功能性子宫出血 4 例，子宫腺肌症 4 例。临床诊断与病理诊断均相符。

作者简介：王 琳(1964－)，女，四川省巴中市人，博士，副主任医师，副教授，主要从事子宫内膜异位症方面的研究，发表论文 26 篇。电话：(023)68754409

收稿日期：2003-08-02；修回日期：2004-02-05

1.2 手术方法

45 例中有 38 例采用全身麻醉，7 例采用硬膜外与腰麻联合麻醉。

(1)取下腹纵切口 3～4 cm，切口大小依子宫大小而定，常规开腹。腹直肌前鞘应较皮肤切口上下各长约 1 cm，横切口则以下腹正中为中线向两侧延长，取切口 3～4 cm 在腹部横纹皱褶处进入。

(2)用两把小“S”拉钩暴露子宫一侧，操作在腹腔内进行，用血浆管扎住子宫峡部，阻断子宫血流，切开肌瘤突出部位，挖出肌瘤。若肌瘤较大，可将肌瘤纵形切开后取出。

(3)可吸收线间断缝合子宫，逐层关腹，皮肤切口用 4/0 可吸收线作连续皮内缝合。

(4)如行三角形子宫切除术，在子宫峡部扎止血带后再用电刀行三角形切除，将宫体取出后将剩余子宫肌层提出腹腔，

(下转 907 页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net