

布地奈德体外对鼻息肉成纤维细胞生长及凋亡的影响

Influence of budesonide on growth and apoptosis of fibroblasts in nasal polyps *in vitro*

孙臻峰^{1,2}, 陈霞芳³, 张速勤¹

(1. 第二军医大学长海医院耳鼻喉科, 上海 200433; 2. 上海市第一人民医院耳鼻喉科, 上海 200080; 3. 上海市第一人民医院中心实验室, 上海 200080)

[摘要] **目的:** 观察布地奈德对体外培养的鼻息肉成纤维细胞生长及凋亡的影响, 探讨激素局部应用治疗鼻息肉的可能机制。 **方法:** 取 9 例鼻息肉患者的鼻息肉组织进行传代培养后获得鼻息肉成纤维细胞, 观察不同浓度 (15、30、60 $\mu\text{l/ml}$) 布地奈德作用 48、72、96 和 120 h 对成纤维细胞活力的影响, 流式细胞仪和 Hoechst 染色观察 30 $\mu\text{l/ml}$ 布地奈德作用 48、72、96 和 120 h 对成纤维细胞凋亡的影响, 并与空白对照组进行对比。 **结果:** 与空白对照组相比, 当布地奈德的浓度 $>30 \mu\text{l/ml}$ 时能显著抑制成纤维细胞的生长 ($P < 0.05$), 且随着浓度的升高、时间的延长, 抑制作用明显增强; 流式细胞仪和 Hoechst 染色结果表明, 30 $\mu\text{l/ml}$ 布地奈德能导致成纤维细胞凋亡, 与空白对照组对比差异显著 ($P < 0.05$)。 **结论:** 布地奈德体外能抑制鼻息肉成纤维细胞的生长并诱导其凋亡。

[关键词] 布地奈德; 成纤维细胞; 鼻息肉; 细胞凋亡

[中图分类号] R 765.25 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2007)06-0672-03

鼻息肉是耳鼻喉科-头颈外科的常见病^[1], 其发病一般认为与过敏和炎症相关^[2-3], 但具体发病机制尚不明确。糖皮质激素(GC)能有效地减轻鼻黏膜的肿胀, 治疗和预防鼻息肉的复发, 但其作用机制仍在探讨中。以往的大量研究^[4-6]发现 GC 可减少参与过敏和炎症反应的细胞数量, 降低其活性, 甚至导致细胞凋亡, 但对鼻息肉的支架细胞成纤维细胞(NPFS)的研究较少。该细胞除了参与构成鼻息肉的支架外, 还被证实可产生包括细胞因子、多核白细胞在内的多种生物活性物质^[7]。本研究通过传代培养获得 NPFS, 观察局部应用激素布地奈德(BUD)对 NPFS 生长的影响, 从而探讨 GC 治疗鼻息肉的作用机制。

1 材料和方法

1.1 标本来源 鼻息肉标本取材于上海市第一人民医院耳鼻喉科行鼻息肉摘除术的患者, 共有 9 例标本符合要求(细胞培养后成活并含菌少)。患者年龄 18~65 岁, 中位年龄 35 岁; 男 4 例, 女 5 例; 为了使所有鼻息肉常见的鼻部伴随疾病都有所覆盖, 入选病例除鼻息肉外还分别患有其他鼻部疾病, 其中过敏性鼻炎 2 例, 慢性鼻炎 3 例, 慢性鼻窦炎 4 例。

1.2 细胞培养

1.2.1 原代培养 取鼻息肉标本置于无菌平皿中, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗净血细胞, 选择苍白色的鼻息肉组织剪成 1~2 mm³ 大小的组织块, 再用清水洗 2~3 次, 洗净血细胞静置一段时间后弃上清。用毛细滴管吸入组织块, 均匀地涂布在培养瓶中, 将培养瓶置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中静置约 2 h, 待组织块贴壁后小心加入培养液(RPMI 1640+10%新生牛血清+100 $\mu\text{l/ml}$ 青霉素+100 $\mu\text{l/ml}$ 链霉素)。3 d 后观察, 2~3 d 更换一次培养液, 4~7 代可获得成纤维细胞长成片, 然后用胰蛋白酶消化, 继续培养。

1.2.2 传代培养 细胞长成单层后, 吸弃培养液, 加入 0.25%TM-EDTA 胰蛋白酶消化, 镜下观察细胞变圆时吸弃消化液, 用培养液重新悬浮细胞。

1.2.3 接种细胞 调整细胞悬浮密度为 $3 \times 10^5/\text{ml}$ 接种于直径 35 mm 的培养皿中, 总液量为 2 ml, 除一份为原培养液继续进行细胞培养外, 余分别为含不同浓度 BUD 的培养液(产品购自 Astrazeneca 公司, 为临床常用鼻喷剂)。因是鼻喷剂, 治疗量可为 1 喷/d, 每喷约为 60 μl (1.28 mg/ μl), 为对比方便, 操作精确, 将试剂喷于烧杯中用加样器吸取, 并用培养液稀释, 调整后 BUD 浓度分别为 15、30、60 $\mu\text{l/ml}$ 。

1.3 细胞活力观察 在细胞培养的最后阶段, 弃去培养液, 用 PBS 洗两次, 细胞用胰蛋白酶消化, 并分别于培养后 48、72、96 和 120 h 采用锥虫蓝染色法进行活细胞计数, 按下式计算细胞活力: 细胞活力(%) = (总细胞数 - 着色细胞数) / 总细胞数 $\times 100\%$ 。细胞培养 96 h 选取 BUD 浓度为 30 $\mu\text{l/ml}$ 的实验组细胞和空白对照组进行瑞士染色, 在倒置显微镜下观察比较两组细胞的数量与排列有无差异。

1.4 细胞凋亡检测 (1) 采用流式细胞术观察 BUD 浓度为 30 $\mu\text{l/ml}$ 的细胞和空白对照组细胞在 48、72、96 和 120 h 细胞凋亡情况。流式细胞仪为 COULTER 公司的 XL 型流式细胞仪, 试剂为 BECKMAN COULTER 公司的 Annexin V-FITC kit。操作按说明书进行。(2) 对含 BUD 浓度为 30 $\mu\text{l/ml}$ 实验组细胞和空白对照组细胞在细胞培养的 48 h 用 Hoechst 染色, 并用荧光显微镜观察、摄影。Hoechst 染色试剂盒购自 Beyotime 公司, 操作按说明书。

1.5 统计学处理 用 SAS 6.12 统计软件分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$, 数据的方差齐性分析用 Levene 检验, 组间比较用 Cochran & Cox 近似检验。

2 结果

2.1 BUD 对 NPFS 活力的影响 NPFS(悬浮浓度为 $3 \times$

[基金项目] 上海市第一人民医院基础研究类院级课题(05B114)。Supported by a Project in Basic Research of the First Hospital of Shanghai(05B114)。 **[作者简介]** 孙臻峰, 副主任医师。E-mail: sunzhenfeng@citiz.net

10⁵)被分别置于含 BUD 15、30、60 μ l/ml 及原培养液(空白对照组)的培养皿中培养,9 个病例中比较典型的细胞活力与时间曲线见图 1。

可见 BUD 浓度为 15 μ l/ml 时对细胞影响较小,而 BUD 浓度为 30 μ l/ml 时,细胞生长受到抑制,活力下降($P<0.05$);BUD 浓度为 60 μ l/ml 时,细胞活力显著下降($P<0.05$),一般 120 h 已无活力细胞可见。

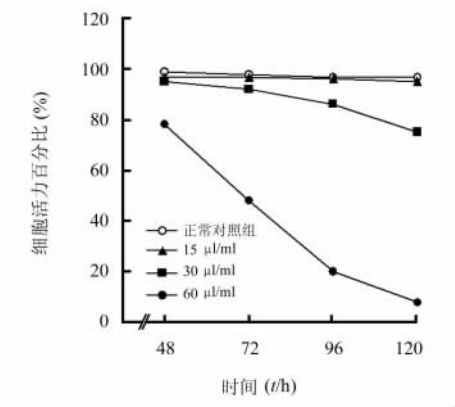


图 1 BUD 对体外培养鼻息肉成纤维细胞活力的影响

另外,空白对照组细胞与 BUD 30 μ l/ml 的实验组细胞 96 h 用瑞士染色后在倒置显微镜下观察,可见 NPFS 的数量与排列均有差异,具体见图 2。

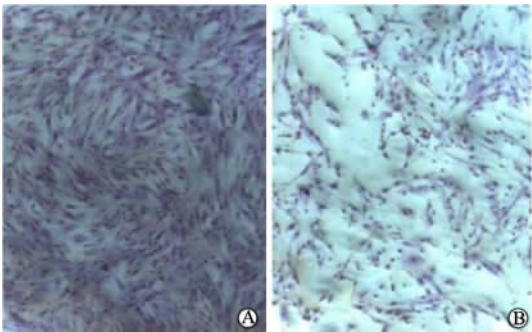


图 2 细胞培养 96 h 空白对照组(A)和实验组(B)倒置显微镜观察(×100)

2.2 BUD 对鼻息肉成纤维细胞凋亡的影响

2.2.1 流式细胞仪分析 用流式细胞仪分析 BUD 浓度为 30 μ l/ml 的细胞在 48、72、96 和 120 h 的情况时,可见随时间增长,活力细胞逐渐下降,凋亡细胞数增加,与空白对照组相比差异显著($P<0.05$,表 1)。

表 1 空白对照组和 30 μ l/ml BUD 实验组凋亡细胞比例数

($n=9, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	作用时间			
	48 h	72 h	96 h	120 h
空白对照组	0.69±0.12	1.21±0.11	1.96±0.10	2.23±0.21
实验组(30 μ l/ml BUD)	4.31±0.18*	8.57±0.20*	11.7 ±0.19*	22.5 ±0.22*

* $P<0.05$ vs 空白对照组

2.2.2 Hoechst 染色 对含 BUD 浓度为 30 μ l/ml 时的实验细胞和空白对照组细胞在 48 h 用 Hoechst 染色,用荧光显微镜观察,可见实验组凋亡细胞明显多于空白对照组,该凋亡细胞因核凋亡后致密浓染,发出蓝色荧光(图 3)。

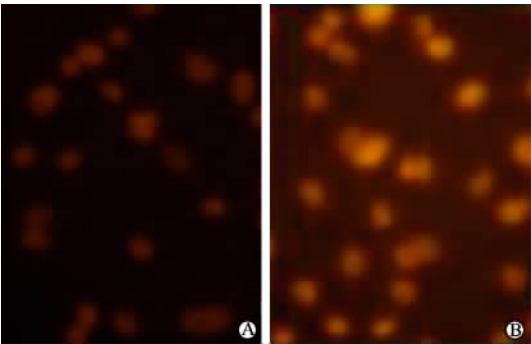


图 3 空白对照组(A)和实验组(B)Hoechst 染色结果(×400)

3 讨 论

GC 可抑制许多组织和细胞的生长,可使细胞停留在 G₁ 期,并诱导其凋亡^[8-10]。在鼻息肉的治疗中,研究发现 GC 可

使鼻息肉中的嗜酸性细胞及 IL-4、IL-5 等致炎因子数量下降,抑制其趋化和移行,甚至直接导致其凋亡^[11]。GC 还可通过抑制黏附分子的诱导剂 IL-1、IL-5、TNF- α 等从而减少黏附分子的表达^[12]。当然,这些作用都是通过激素与其受体结合而产生的。最近国内李鹏等^[13]的研究亦表明,激素受体 GR- β 在决定鼻息肉患者对激素治疗疗效上可能有一定的作用,在一定程度上可决定组织对 GC 的敏感性。而鼻息肉除了有嗜酸性细胞等炎细胞大量积聚外,还特征性地出现了结构异常,包括基底膜增厚和成纤维细胞数量增加^[14]。成纤维细胞除了支架作用外,尚可产生大量细胞因子。因而揭示 GC 能否对 NPFS 生长产生影响,甚至导致其凋亡对研究 GC 治疗鼻息肉的作用机制意义重大。本研究结果表明,BUD 可抑制 NPFS 生长,且这种抑制作用与所用激素的浓度密切相关,随着所用激素浓度上升,细胞活力明显下降,与 Hirano 等^[15]的研究结果相符。BUD 除了使 NPFS 的活力细胞数下降外,在 30 μ l/ml 浓度时,用流式细胞仪和 Hoechst 染色均可观察到凋亡细胞存在,与空白对照组相比,差异显著($P<0.05$)。这些是 BUD 直接可导致 NPFS 凋亡的强有力证据。此外,本研究所选取的病例,除鼻息肉外还包含了常见的鼻息肉的伴随疾病,而无论是鼻息肉的培养及以后的激素应用

对培养物的抑制作用,均未发现有明显差异。

综上所述,BUD 可抑制 NPFS 的生长,并诱导其凋亡,这也许是 GC 治疗鼻息肉的作用机制之一。

[参 考 文 献]

[1] Crampette L. Polypose nasosinusienne. [Nasal-paranasal sinus polyposis] [J]. Presse Med,2001, 30(39-40 Pt 2): 44-50.

[2] Lildholdt T, Runderantz H, Lindqvist N. Efficacy of topical corticosteroid powder for nasal polyps: a double-blind, placebo-controlled study of budesonide[J]. Clin Otolaryngol Allied Sci, 1995,20: 26-30.

[3] Bolard F, Gosset P, Lamblin C, et al. Cell and cytokine profiles in nasal secretions from patients with nasal polyposis: effects of topical steroids and surgical treatment[J]. Allergy,2001,56: 333-338.

[4] Meagher L C, Cousin J M, Seckl J R, et al. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes[J]. J Immunol,1996,156: 4422-4428.

[5] Distelhorst C W. Glucocorticoid-induced apoptosis[J]. Adv Pharmacol,1997,41:247-270 .

[6] Yoshimura C, Miyamasu M, Nagase H, et al. Glucocorticoids induce basophil apoptosis[J]. J Allergy Clin Immunol,2001, 108: 215-220.

[7] Kramer M F, Rasp G. Nasal polyposis: eosinophils and interleukin-5[J]. Allergy,1999,54: 669-680.

[8] Rogatsky I, Trowbridge J M, Garabedian M J. Glucocorticoid

receptor-mediated cell cycle arrest is achieved through distinct cell-specific transcriptional regulatory mechanisms[J]. Mol Cell Biol, 1997,17: 3181-393.

[9] Greenberg A K, Hu J, Basu S, et al. Glucocorticoids inhibit lung cancer cell growth through both the extracellular signal-related kinase pathway and cell cycle regulators[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002,27: 320-328.

[10] 顾之燕,顾瑞金. 变应性鼻炎的药物治疗法[J]. 中华耳鼻咽喉杂志,2000,35:73-75.

[11] Watanabe K, Shirasaki H, Kanaizumi E, et al. Effects of glucocorticoids on infiltrating cells and epithelial cells of nasal polyps[J]. Ann Otol Rhinol Laryngol,2004,113: 465-473.

[12] 袁 英,栾信庸,张立强,等. 鼻息肉患者血清中可溶性细胞间黏附分子-1 水平及临床意义[J]. 临床耳鼻喉科杂志,2005,19: 630-632.

[13] 李 鹏,李 源,刘 贤,等. 糖皮质激素受体 mRNA 在慢性鼻窦炎鼻息肉组织中的表达[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2006,41:167-170.

[14] Cauna N,Manzetti G W,Hinderer K H, et al. Fine structure of nasal polyps[J]. Ann Otol Rhinol Laryngol,1972,81:41-58.

[15] Hirano S, Asano K, Namba M, et al. Induction of apoptosis in nasal polyp fibroblasts by glucocorticoids *in vitro* [J]. Acta Otolaryngol,2003,123: 1075-1079.

[收稿日期] 2007-02-26

[修回日期] 2007-04-09

[本文编辑] 贾泽军