



扫码阅读电子版

莫西沙星增加哮喘大鼠气道平滑肌细胞 Caveolin-1 的表达

李慧婷 赵杰 李海泉 施萍 张衍民 杜永亮

徐州医科大学第二附属医院呼吸内科, 徐州 221006

通信作者: 赵杰, Email: liht0419@163.com

【摘要】 目的 观察在莫西沙星作用下, 支气管哮喘(哮喘)大鼠气道平滑肌细胞(ASMC)小凹蛋白-1(Cav-1)蛋白及 mRNA 表达的变化, 探讨莫西沙星对 ASMC 发挥抗炎调节的可能机制。**方法** 用随机数字表法将 40 只 SD 大鼠随机分为正常组(10 只)及哮喘组(30 只)。复制哮喘大鼠模型, 体外传代培养正常及哮喘组大鼠 ASMC, 正常组作为空白对照组(A 组)、哮喘组分为哮喘对照组(B 组)、莫西沙星干预组(C 组, 莫西沙星 5 mg/L 干预哮喘模型细胞)、地塞米松干预组(D 组, 地塞米松 10^{-6} mol/L 干预哮喘模型细胞), 均孵育 48 h 后, 分别应用 Western blot 和 qRT-PCR 检测 Cav-1 蛋白水平及 mRNA 表达。**结果** Western blot 检测显示, B 组 Cav-1 蛋白表达量 (1.16 ± 0.05) 较 A、C、D 组 [Cav-1 蛋白表达量 (3.56 ± 0.05 , 2.86 ± 0.11 , 3.01 ± 0.17)] 降低, 差异有统计学意义 (P 值均 < 0.05)。C 组与 D 组之间 Cav-1 蛋白表达量差异无统计学意义 ($P = 0.172$)。qRT-PCR 结果显示 B 组 Cav-1 mRNA 表达量 (1.00 ± 0.11) 较 A、C、D 组 [mRNA 表达量分别为 (3.26 ± 0.22 , 2.68 ± 0.11 , 2.93 ± 0.05)] 降低, 差异有统计学意义 (P 值均 < 0.05), C 组与 D 组之间 Cav-1 mRNA 表达量差异无统计学意义 ($P = 0.052$)。**结论** 莫西沙星可增加哮喘大鼠 ASMC Cav-1 蛋白及 mRNA 表达, 这可能与莫西沙星对 ASMC 发挥抗炎作用相关。

【关键词】 肌细胞, 平滑肌; 莫西沙星; 小凹蛋白-1

基金项目: 徐州市科技局课题 (KC16SL102)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2019.11.004

Moxifloxacin could increase the expression of caveolin-1 of airway smooth muscle cell of asthmatic rat

Li Huiting, Zhao Jie, Li Haiquan, Shi Ping, Zhang Yanmin, Du Yongliang

Department of Respiratory Medicine, the Second Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221006, China

Corresponding author: Zhao Jie, Email: liht0419@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of moxifloxacin on the expression of the protein and mRNA of caveolin-1 (Cav-1) in asthmatic rat, and to explore the possible mechanisms of anti-inflammatory effects of moxifloxacin on airway smooth muscle cell (ASMC). **Methods** Totally 40 male SD rats were randomly and equally divided into normal group (10) and asthmatic group (30). Asthma model were established. ASMC were derived from normal and asthmatic rats and cultured in vitro. The normal group was regarded as normal control group (A), the asthmatic group was divided into 3 groups, including asthmatic control group (B), asthmatic group (C) to which moxifloxacin was added at the concentration of 5 mg/L and asthmatic group (D) to which Dexamethasone was added at the concentration of 10^{-6} mol/L. Then the cells of different groups were incubated for 48 h. Finally the protein of Cav-1 was detected by Western blot and the mRNA of Cav-1 was measured by qRT-PCR respectively. **Results** The results of Western blot indicated that the expression of Cav-1 protein of group B (1.16 ± 0.05) decreased compared with groups A, C, D (the expression of Cav-1 protein of these groups was 3.56 ± 0.05 , 2.86 ± 0.11 , 3.01 ± 0.17 respectively) ($P < 0.05$). But there were no significantly difference between groups C and D ($P =$

0.172)。The results of qRT-PCR showed that the expression of mRNA of group B (1.00 ± 0.11) decreased compared with groups A, C, D (the expression of mRNA of these groups were 3.26 ± 0.22 , 2.68 ± 0.11 , 2.93 ± 0.05 respectively) ($P < 0.05$)。But there were no significantly difference between groups C and D ($P = 0.052$)。Conclusions Moxifloxacin can increase the protein and mRNA of Cav-1 in asthmatic rat ASMC, which may be the possible mechanism concerning the anti-inflammatory effects of moxifloxacin。

【Key words】 Myocytes, smooth muscle; Moxifloxacin; Caveolin-1

Fund program: Science and Technology Bureau Project of Xuzhou (KC16SL102)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2019.11.004

支气管哮喘(哮喘)患者气道平滑肌细胞(airway smooth muscle cell, ASMC)呈现病理状态,表现为高增殖性、高收缩性及高分泌性^[1],是参与哮喘发病的重要细胞。其高分泌性表现为在炎症因子作用下分泌大量炎症因子[如IL-6、IL-8、IL-13及嗜酸粒细胞趋化因子(Eotaxin)]及细胞外基质蛋白等^[2],这些炎症介质可导致气道炎症持续及级联放大,反过来作用于ASMC,致其增殖增加及收缩增强,参与哮喘发病。我们前期研究发现莫西沙星可抑制大鼠ASMC炎症因子IL-8及Eotaxin的分泌^[3],但具体机制尚不清楚。小凹蛋白-1(caveolin-1, Cav-1)在气道炎症中担当着重要角色^[4],且哮喘患者Cav-1水平明显下调^[5],提示Cav-1对气道炎症具有保护作用。本研究旨在探讨莫西沙星对ASMC的Cav-1蛋白及mRNA表达的影响,探索莫西沙星对ASMC抗炎作用发挥的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料 莫西沙星(德国拜耳医药保健股份公司),Cav-1人抗山羊单克隆抗体(16447-1-AP,美国proteintech公司),二抗山羊抗兔IgG H&L(HRP)(ab6721,英国abcam公司),胎牛血清(中国上海徠创生物科技有限公司),大鼠[中国,徐州医科大学动物房,动物许可证号:SYXK(苏)2016-0028],荧光定量检测试剂盒(RR420A,中国上海驰勇生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物饲养及分组 用随机数字表法将40只SD雄性大鼠随机分为正常组(10只),哮喘组(30只),适应性饲养一周。

1.2.2 哮喘大鼠模型制备 将30只哮喘组大鼠应用鸡卵蛋白腹腔注射(1 mg)及间断雾化吸入3次(30 min)的方式复制哮喘大鼠模型,正常组大鼠应用同等量生理盐水干预,方法同前^[6]。

1.2.3 ASMC的培养及传代 无菌摘取正常组及哮喘组大鼠气管,贴壁法进行细胞原代培养,以胰

酶消化法进行ASMC传代并自然纯化细胞,实验取5~6代细胞,方法同前^[7]。

1.2.4 Western blot检测Cav-1蛋白表达 将培养细胞分为正常组作为空白对照组(A组),哮喘组分为哮喘对照组(B组)、莫西沙星干预哮喘组(C组)、地塞米松干预哮喘组(D组)。A组用正常血清培养细胞,B、C、D组用致敏血清培养,方法同前^[3]。A、B组用生理盐水处理细胞,C组应用莫西沙星(5 mg/L)处理细胞,D组应用地塞米松处理细胞,培养ASMC 48 h,提取细胞总蛋白,经电泳、转膜后杂交,一抗为Cav-1人抗山羊单克隆抗体,二抗为山羊抗兔IgG,以NBT/BCIP显色。条带灰度用Image J软件分析。实验重复操作3次。

1.2.5 qRT-PCR定量检测Cav-1 mRNA表达

1.2.5.1 细胞RNA提取 前期处理细胞方法同上(1.2.3),干预ASMC 48 h后,在细胞液中加入TRIzol试剂,提取细胞RNA。检测RNA纯度,结果显示OD_{260/280}比值在1.8~2.0之间,表明无RNA降解,无蛋白污染。

1.2.5.2 cDNA的合成 取总RNA提取物加入随机引物、缓冲液、逆转录酶等,混匀后在42℃温浴2 h,94℃,5~10 min,待逆转录反应完成之后,将cDNA保持在-20℃冰箱备用。

1.2.5.3 qRT-PCR反应 目的基因及内参基因的引物设计,先从中查找相应基因的序列,在引物设计软件中设计相应引物,引物序列如下:Caveolin-1,上游5'-GCGACCTAAACACCTCAAC-3',下游5'-ATGCCGTCAAACACTGTGTGTC-3'; β -actin,上游5'-TTGTTACAGGAAGTCCCTTGCC-3',下游5'-ATGCTATCACCTCCCCTGTGTG-3';Cav-1扩增片段为138 bp, β -actin扩增101 bp。将PCR反应体系置于离心机以4℃、5 500 r/min,离心半径6 cm,离心5 min,上机,循环程序:95℃,2min;95℃,15 s;60℃,50 s;40个循环。

1.2.5.4 数据的分析 首先将实验所有的基因 Ct 值整理好,之后每一组样本自身的目的基因 Ct 值减去自身内参基因 Ct 值,得到的数就是 ΔCt 。换成公式就是: $\Delta Ct = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{内参基因})$ 。用本次实验研究样本的 ΔCt 减去对照组样本的 ΔCt 并同时同时对结果取相反数,结果就是 $-\Delta\Delta Ct$ 。最后,对 $-\Delta\Delta Ct$ 进行2的幂运算,即 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 就得出实验组和对照组靶基因的转录倍数。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件包统计分析数据。所有实验数据使用 $\bar{x} \pm s$ 。2组数据之间的比较使用 Student-*t* 检验,多组间采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 ASMC 形态鉴定 倒置显微镜下,培养的 ASMC 呈梭形,平行生长,束状排列,密集与稀疏处相互交错呈“峰谷状”(图 1)。

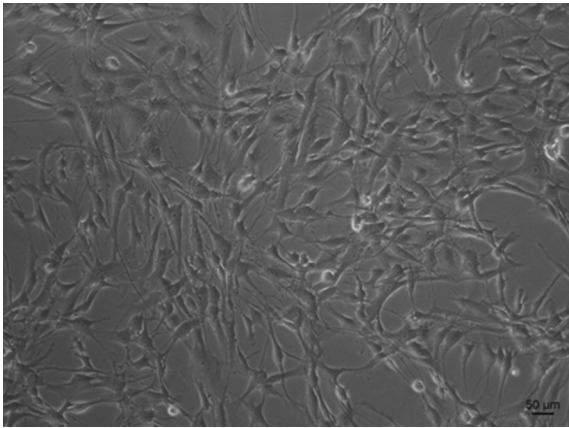
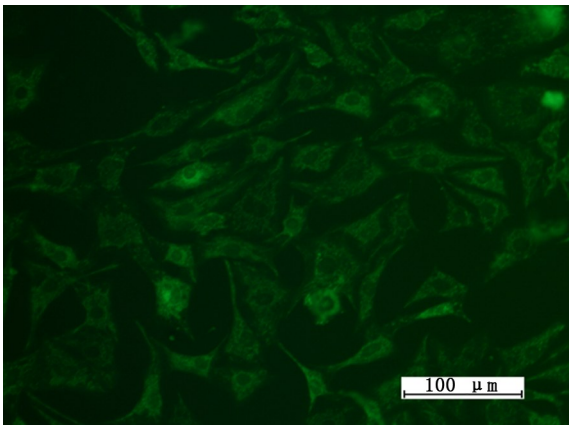


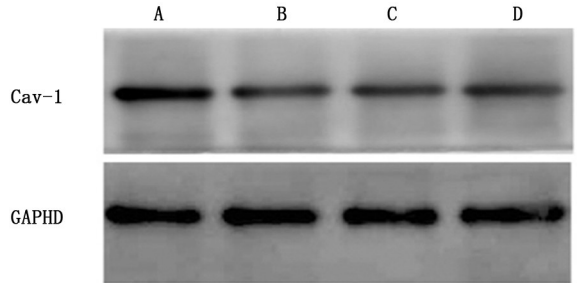
图 1 倒置显微镜下的细胞形态学鉴定图 ×400

2.2 ASMC 免疫组织化学法鉴定 免疫细胞化学检测法表明,抗平滑肌-actin 抗体呈阳性染色即胞浆内可见大量绿色荧光,证实所培养细胞是 ASMC (图 2)。



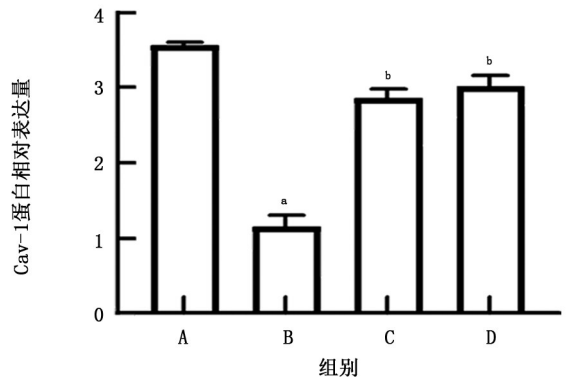
注: ASMC 为气道平滑肌细胞
图 2 免疫荧光显微镜法示 ASMC 细胞发绿色荧光 ×400

2.3 莫西沙星对 ASMC Cav-1 蛋白表达的影响 B 组 [(1.16 ± 0.05)] Cav-1 蛋白表达量均较 A、C、D 组 [Cav-1 蛋白表达量分别为 (3.56 ± 0.05) 、 (2.86 ± 0.11) 、 (3.01 ± 0.17)] 降低,差异有统计学意义 (P 值均 <0.05)。C 组与 D 组之间 Cav-1 蛋白表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3、4。



注: ASMC 为气道平滑肌细胞; Cav-1 为小凹蛋白-1; A 为空白对照组; B 为哮喘对照组; C 为莫西沙星干预哮喘组; D 为地塞米松干预哮喘组

图 3 Western blot 检测 ASMC Cav-1 蛋白电泳图



注: ASMC 为气道平滑肌细胞; Cav-1 为小凹蛋白-1; A 为空白对照组; B 为哮喘对照组; C 为莫西沙星干预哮喘组; D 为地塞米松干预哮喘组; 与 A 组比较,^a $P < 0.05$; 与 B 组比较,^b $P < 0.05$

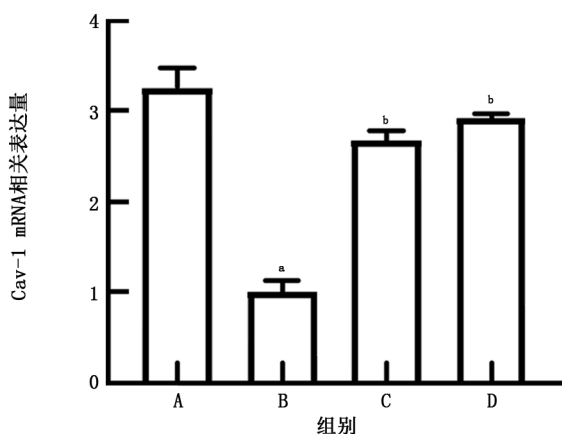
图 4 莫西沙星对 ASMC Cav-1 蛋白表达的影响

2.4 莫西沙星对 ASMC Cav-1 mRNA 表达的影响 qRT-PCR 结果显示 B 组 [(1.00 ± 0.11)] Cav-1 mRNA 表达量均较 A、C、D 组 [mRNA 表达量分别为 (3.26 ± 0.22) 、 (2.68 ± 0.11) 、 (2.93 ± 0.05)] 降低,差异有统计学意义 (P 值均 <0.05)。C 组与 D 组之间 Cav-1 蛋白表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 5。

3 讨论

哮喘患者 ASMC 呈现病理状态^[1],在哮喘发病中充当着促炎细胞及主要的炎症效应细胞双重角色^[8],其量的增加是哮喘患者大气道进行性狭窄的主要原因^[9],与重症及难治性哮喘发病密切相

关^[10]。因此，寻找针对 ASMC 发挥抗炎免疫调节作用的药物及作用机制可能将为重症及难治性哮喘的控制及治疗提供新的思路。



注：ASMC 为气道平滑肌细胞；Cav-1 为小凹蛋白-1；A 为空白对照组；B 为哮喘对照组；C 为莫西沙星干预哮喘组；D 为地塞米松干预哮喘组；与 A 组比较，^a $P < 0.05$ ；与 B 组比较，^b $P < 0.05$

图 5 莫西沙星对 ASMC Cav-1 mRNA 表达的影响

我们已证实莫西沙星可以直接作用于大鼠 ASMC，干扰 ASMC 增殖^[11]、诱导凋亡^[7]及抑制炎症因子分泌^[3]，本实验中莫西沙星可以直接干预大鼠 ASMC 并影响 ASMC 形态及数量，这与我们既往结论一致。

莫西沙星可对多种细胞发挥抗炎调节作用^[3,12]，但其具体作用机制尚不清楚。Cav-1 作为支架蛋白构成细胞表面穴样内陷 (Caveolae) 介导胞吞，其可通过抑制一氧化氮生成^[13]及影响 ASMC 内钙离子浓度在气道炎症中发挥重要作用^[14]，但莫西沙星对哮喘气道炎症的保护作用是否与 Cav-1 相关少有研究。

本实验研究发现大鼠 ASMC 中存在 Cav-1 蛋白及 mRNA 表达。哮喘组 ASMC Cav-1 蛋白及 mRNA 表达量均较正常组明显降低，提示 Cav-1 可能在哮喘性气道炎症中担当保护作用，与既往结论一致^[14]。应用莫西沙星或地塞米松干预哮喘组 ASMC 后，结果显示 2 组 ASMC Cav-1 蛋白及 mRNA 表达量均较哮喘对照组明显增加，且 2 组之间差异无统计学意义，提示莫西沙星可增加哮喘大鼠 ASMC Cav-1 蛋白及 mRNA 表达量，但其是否为莫西沙星抑制哮喘性大鼠 ASMC 炎症因子 IL-8 及 Eotaxin 分泌的上游机制，尚需进一步研究。另外，关于莫西沙星增加哮喘大鼠 ASMC Cav-1 蛋白及 mRNA 表达量的具体机制仍未可知。

莫西沙星组织渗透性较强，肺组织细胞内浓度

较血清中高达数倍甚至数十倍，与静脉给药相比，雾化吸入后气道上皮细胞内浓度并未明显升高^[15]，主要因为细胞存在药物外排机制。P 糖蛋白是介导药物主动外排的主要转运蛋白，对脂质药物最为敏感^[16]，莫西沙星脂溶性较强，当胞内浓度较高时，可上调 P 糖蛋白，启动外排机制，防止胞内药物浓度过高^[15]。P 糖蛋白转运功能的发挥需要借助细胞表面 Cav-1 支架蛋白的作用^[17]。另外，近年来研究发现有表达 Cav-1 可明显提高食管鳞状细胞癌 P 糖蛋白 mRNA 及蛋白水平，敲减 Cav-1 将致 P 糖蛋白表达明显下降，提示 Cav-1 对 P 糖蛋白表达具有调控作用^[18]。我们推测当莫西沙星以高浓度扩散进入 ASMC 胞内时，P 糖蛋白首先感知刺激信号，然后引起 Cav-1 表达水平上调，Cav-1 表达上调后反过来刺激 P 糖蛋白表达增加，最后 P 糖蛋白将胞内浓度过高的莫西沙星转运出细胞，但具体机制尚需更多的研究。

本研究结果揭示莫西沙星可增加哮喘大鼠 ASMC Cav-1 的表达，其可能与莫西沙星抑制哮喘大鼠气道炎症机制相关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Zuyderduyn S, Sukkar MB, Fust A, et al. Treating asthma means treating airway smooth muscle cells[J]. Eur Respir J, 2008, 32(2): 265-274. DOI:10.1183/09031936.00051407.
- [2] Black JL, Roth M. Intrinsic asthma: is it intrinsic to the smooth muscle? [J]. Clin Exp Allergy, 2009, 39(7): 962-965. DOI:10.1111/j.1365-2222.2009.03270.x.
- [3] Li H, Zhu S, He S, et al. Anti-inflammatory effects of moxifloxacin on rat airway smooth muscle cells exposed to allergen: Inhibition of extracellular-signal-regulated kinase and nuclear factor- κ B activation and of interleukin-8 and eotaxin synthesis [J]. Respirology, 2012, 17(6): 997-1005. DOI:10.1111/j.1440-1843.2012.02205.x.
- [4] Royce SG, Le Saux CJ. Role of Cav-1 in asthma and chronic inflammatory respiratory diseases [J]. Expert Rev Respir Med, 2014, 8(3): 339-347. DOI: 10.1586/17476348.2014.905915.
- [5] Bains SN, Tourkina E, Atkinson C, et al. Loss of Cav-1 from bronchial epithelial cells and monocytes in human subjects with asthma [J]. Allergy, 2012, 67(12): 1601-1604. DOI: 10.1111/all.12021.
- [6] Palmans E, Pauwels RA, Kips JC. Repeated allergen exposure changes collagen composition in airways of sensitised Brown Norway rats [J]. Eur Respir J, 2002, 20(2): 280-285. DOI:10.1183/09031936.02.00255402.
- [7] 李慧婷, 朱述阳, 裴厚霜. 莫西沙星对大鼠气道平滑肌细胞线粒体膜电位及凋亡的影响 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2011, 34

- (9):684-687. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-0939.
- [8] Ameredes BT. Beta-2-receptor regulation of immunomodulatory proteins in airway smooth muscle [J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2011, 3:643-654.
- [9] Pascoe CD, Seow CY, Hackett TL, et al. Heterogeneity of airway wall dimensions in humans: a critical determinant of lung function in asthmatics and nonasthmatics [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017, 312 (3): L425-L431. DOI:10.1152/ajplung.00421.2016.
- [10] Zietkowski Z, Tomasiak-Lozowska MM, Skiepkowski R, et al. Eotaxin-1 in exhaled breath condensate of stable and unstable asthma patients [J]. *Respir Res*, 2010, 11:110. DOI:10.1186/1465-9921-11-110.
- [11] 李慧婷, 朱述阳, 赵杰, 等. 莫西沙星浓度、时间依赖性抑制大鼠 ASMC 增殖及干扰 $\Delta \Psi_m$ [J]. *中国现代医学杂志*, 2014, 24(22): 17-20. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2014.22.005.
- [12] Beisswenger C, Honecker A, Kamyschnikow A, et al. Moxifloxacin modulates inflammation during murine pneumonia [J]. *Respir Res*, 2014, 15:82. DOI:10.1186/1465-9921-15-82.
- [13] Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, et al. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation [J]. *Nat Med*, 2000, 6 (12): 1362-1367. DOI:10.1038/82176.
- [14] Sathish V, Abcejo AJ, VanOosten SK, et al. Caveolin-1 in cytokine-induced enhancement of intracellular Ca^{2+} in human airway smooth muscle [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, 301 (4): L607-L614. DOI: 10.1152/ajplung.00019.2011.
- [15] Gontijo AV, Brillault J, Grégoire N, et al. Biopharmaceutical characterization of nebulized antimicrobial agents in rats: 1. Ciprofloxacin, moxifloxacin, and grepafloxacin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58 (7): 3942-3949. DOI: 10.1128/AAC.02818-14.
- [16] Krech T, Scheuerer E, Geffers R, et al. ABCB1/MDR1 contributes to the anticancer drug-resistant phenotype of IPH-926 human lobular breast cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2012, 315(2): 153-160. DOI:10.1016/j.canlet.2011.09.038.
- [17] Zhang Y, Qu X, Teng Y, et al. Cbl-b inhibits P-gp transporter function by preventing its translocation into caveolae in multiple drug-resistant gastric and breast cancers [J]. *Oncotarget*, 2015, 6 (9): 6737-6748. DOI: 10.18632/oncotarget.3253.
- [18] Zhang S, Cao W, Yue M, et al. Caveolin-1 affects tumor drug resistance in esophageal squamous cell carcinoma by regulating expressions of P-gp and MRP1 [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(7): 9189-9196. DOI:10.1007/s13277-015-4778-z.

(收稿日期: 2018-11-09)

· 简讯 ·

《急诊气道管理》已出版

人民军医出版社最近出版《急诊气道管理》, George Kovacs 和 J. Adam Law 主编, 刘双、朱光发主译, 全书共 20 章, 涵盖了紧急情况下气道管理的所有问题。本书翻译的目的就是希望让麻醉医师意外的临床医师(包括急诊医师、呼吸科医师、监护仪式、内科医师、外科医师、儿科医师、护士以及基层医务工作者)了解紧急情况下处理气道的相关知识, 掌握气道解剖、生理以及各种气管插管的设备和操作方法。该书是美国临床医师继续教育的一本使用的权威教科书。

各地新华社及医学专业书店有售, 定价每本 42 元。