

N-乙酰半胱氨酸对香烟暴露小鼠肺组织中 IL-17A 及 IL-22 的影响

冯迪 郭欣 梅晓冬

摘要 目的 探讨香烟暴露诱导的肺气肿小鼠肺组织中白介素-17A(IL-17A)以及白介素-22(IL-22)的变化以及戒烟、N-乙酰半胱氨酸(NAC)对IL-17A和IL-22的影响。方法 采用香烟暴露法建立小鼠肺气肿模型,给予戒烟及NAC灌胃干预。采用ELISA法检测肺匀浆及肺泡灌洗液(BALF)中IL-17A和IL-22浓度。HE染色观察肺组织病理学变化。结果 香烟暴露可使小鼠肺组织发生肺气肿样变化。与正常对照组相比,肺匀浆及BALF中,香烟暴露后IL-17A及IL-22水平升高($P < 0.05$)。与香烟暴露组比较,戒烟及NAC灌胃后IL-17A及IL-22水平下降($P < 0.05$)。肺匀浆及BALF中IL-22与IL-17A的比值逐渐降低。结论 IL-17A及IL-22与香烟暴露导致的小鼠肺组织中慢性炎症的发生有关。戒烟及NAC处理对吸烟导致的IL-17A及IL-22变化有一定干预作用。

关键词 香烟暴露; N-乙酰半胱氨酸; 白介素-17A; 白介素-22

中图分类号 R 563.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)11-1579-05

慢性阻塞性肺疾病(慢阻肺)是一组以不完全可逆气流受限为特征的疾病,主要病理变化包括慢性气道炎症和肺气肿。影响慢阻肺发生发展的因素十分复杂,与颗粒物吸入、遗传基因、性别、社会经济状况等因素均有关。吸烟是已知的慢阻肺发病的主要病因之一。近年来研究^[1-4]表明白介素-17(interleukin-17,IL-17)和白介素-22(interleukin-22,IL-22)在慢阻肺的发病中起重要作用,是慢阻肺病理变化发生的重要细胞因子。N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine,NAC)是一种硫醇类抗氧化剂,具有抗炎、抗氧化应激等多种药理效应,其在治疗慢阻肺中的作用机制目前尚未完全阐明,在慢阻肺炎症免疫机制中发挥的调节作用也不清楚。临床研究^[5]显示NAC对慢阻肺有一定治疗效果。该研究通过吸烟制作小鼠肺气肿模型,予以戒烟和使用NAC治疗,观察小鼠肺匀浆及支气管肺泡灌洗液(bron-

choalveolar lavage fluid,BALF)中IL-17A及IL-22的变化,探讨NAC对小鼠肺中IL-17A及IL-22相关机制的干预影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性BABL/c小鼠,清洁级,10周龄,20~27g,由安徽医科大学实验动物中心提供。在恒温(25℃),光照:黑暗周期12h:12h环境中饲养适应1周后实验。本研究经安徽医科大学附属省立医院伦理委员会批准。

1.1.2 药品与试剂 红三环牌香烟(安徽红三环工业公司,焦油量为11mg/支,烟碱量为0.8mg/支,一氧化碳量为15mg/支);NAC(A7250,美国Sigma公司);IL-17A、IL-22 ELISA试剂盒(产品批号:23017968、23023883,上海裕平公司)。

1.1.3 仪器与设备 自制香烟暴露带孔玻璃仓;JT12001电子天平(上海精天电子仪器厂);KDC-2046低速冷冻离心机(中科中佳科学仪器有限公司);高速匀浆器(合肥艾本森科学仪器有限公司);恒温仪(上海卓一电子有限公司);酶标仪(上海赛默飞世尔仪器有限公司);BI2000生物医学图像分析系统(成都泰盟科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 将BABL/c小鼠按随机数字表法分为正常对照组、香烟暴露组、戒烟4周组、戒烟8周组、戒烟12周组、NAC灌胃4周组、NAC灌胃8周组、NAC灌胃12周组,每组5只。正常对照组不给予任何干预措施,自由摄食饮水。香烟暴露组、戒烟组及NAC灌胃组置香烟暴露玻璃仓内给予香烟烟雾暴露,同时点燃4支香烟,放入仓内自然燃烧,待燃烧完毕烟雾基本消失(约20min)后,打开仓盖,休息30min后重复上述操作3次。每周5d,持续24周,肺气肿模型造模结束。将正常对照组及香烟暴露组小鼠处死采样。戒烟4周组停止香烟暴露,继续饲养4周后处死采样。戒烟8周组继续饲养8周处死采样,戒烟12周组继续饲养12周处死采样,饲养方法同正常对照组。NAC灌胃4周组停止香烟暴露,并给予NAC 100mg/kg灌胃,

2015-08-10 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1308085MH115)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院呼吸内科,合肥 230001

作者简介:冯迪,女,硕士研究生;

梅晓冬,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:

hfmxd@sina.com

每天1次,每周5 d,4周后处死采样。NAC灌胃8周组8周后处死采样,NAC灌胃12周组12周后处死采样。

1.2.2 标本采集 小鼠最后一次香烟暴露或者给药24 h后,给予硫喷妥钠腹腔注射麻醉,立即解剖暴露气管,取出右肺,置入10%甲醛内固定,留作病理观察。左肺行气管插管后予以冷0.9%盐水以0.4、0.3、0.3 ml分3次气管内灌入,每次反复抽吸3次后回收,回收率60%~70%。回收后的BALF在4℃条件下3 000 r/min离心10 min,取上清液分装后置-80℃冰箱保存备用。离断灌洗后的左肺称取重量,按1:5的量,加冷生理盐水,冰上充分研磨,成浆后4℃、3 000 r/min离心10 min,取上清液分装置-80℃保存备用。

1.2.3 病理切片制作 将固定好的肺组织石蜡包埋切片,行HE染色,每只小鼠制作3张切片,每个切片任取5个视野,光学显微镜下(10×10)观察肺组织结构的形态学变化,参照文献^[6-7]测量平均肺泡壁内衬间隔(linear intercept, Lm)及损伤指数(destructive index, DI)并进行统计学分析。

1.2.4 ELISA法检测IL-17A、IL-22浓度 按照ELISA试剂盒提供的使用说明书检测BALF及肺匀浆中IL-17A、IL-22的浓度。

1.3 统计学处理 采用SPSS 16.0统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间两两比较采用单因素方差分析及两两比较的SNK法。采用Graphpad Prism 5软件作图。

2 结果

2.1 形态学变化 光镜下,正常对照组小鼠肺泡壁完整、连续、肺泡大小较均一。各实验组(香烟暴露组、戒烟组及NAC灌胃组)小鼠肺泡壁显著变薄、断裂,肺泡腔扩大、大小不一,肺泡Lm、DI明显高于正常对照组,差异有统计学意义($F = 2.94、3.60, P < 0.05$),各实验组之间差异无统计学意义,见表1。

2.2 肺匀浆及BALF中IL-17A的变化 与正常对照组比较,香烟暴露后小鼠肺匀浆中IL-17A水平显著升高;戒烟4周后IL-17A水平虽有下降趋势,但差异无统计学意义。戒烟8周、12周、NAC灌胃各组IL-17A水平与香烟暴露组相比,均明显下降($P < 0.05$),与正常对照组比较差异无统计学意义。与戒烟4周相比,NAC灌胃4周组IL-17A水平明显下降,见图1A。与正常对照组比较,香烟暴露后,小鼠BALF中IL-17A水平明显升高。同样,戒烟4周

表1 各组小鼠平均肺泡Lm及DI比较($\bar{x} \pm s$)

组别	Lm(μm)	DI
正常对照	30.25 ± 4.11	29.25 ± 5.50
香烟暴露	48.60 ± 7.60*	47.80 ± 8.14*
戒烟4周	45.25 ± 5.80*	52.50 ± 9.33*
戒烟8周	45.25 ± 9.67*	52.00 ± 6.58*
戒烟12周	41.40 ± 5.86*	46.60 ± 6.19*
NAC 4周	45.40 ± 5.86*	49.40 ± 8.71*
NAC 8周	43.60 ± 8.02*	46.40 ± 9.29*
NAC12周	46.40 ± 5.64*	46.00 ± 6.86*

与正常对照组比较: * $P < 0.05$

对升高的IL-17A无显著影响。戒烟8周及NAC灌胃4、8周组IL-17A水平仍高于正常对照组。戒烟12周及NAC灌胃12周后IL-17A浓度降至正常对照组水平。与戒烟4周相比,NAC灌胃4周组IL-17A水平明显下降,见图1B。

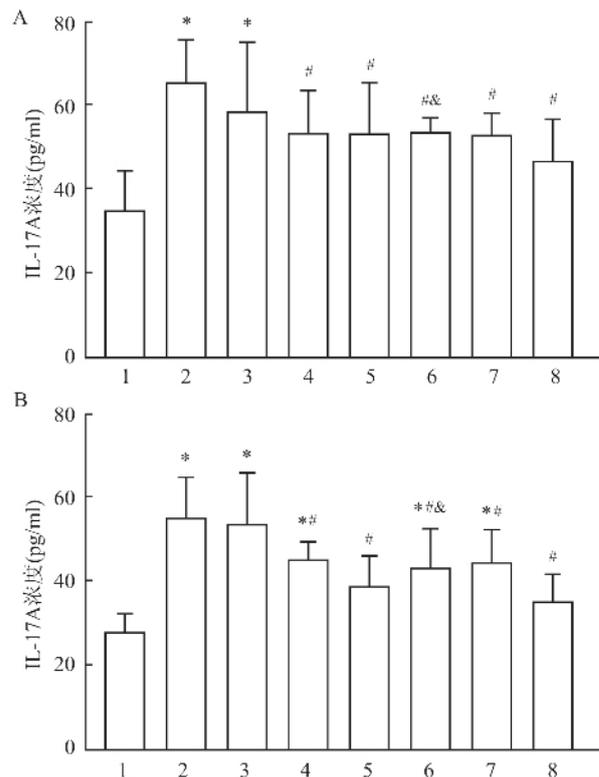


图1 各组小鼠肺匀浆、BALF中IL-17A浓度变化

A: 肺匀浆; B: BALF; 1: 正常对照组; 2: 香烟暴露组; 3: 戒烟4周组; 4: 戒烟8周组; 5: 戒烟12周组; 6: NAC 4周组; 7: NAC 8周组; 8: NAC 12周组; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与香烟暴露组比较: # $P < 0.05$; 与戒烟4周组比较: & $P < 0.05$

2.3 肺匀浆及BALF中IL-22的变化 香烟暴露后小鼠肺匀浆中IL-22水平明显升高。戒烟4、8周后,IL-22水平有所下降,但差异无统计学意义。与香烟暴露组比较,戒烟12周及NAC灌胃各组IL-22

值均显著降低;此4组与正常对照组比较差异均无统计学意义。与戒烟4周相比,NAC灌胃4周组IL-22水平明显下降,见图2A。BALF中,香烟暴露组、戒烟各组及NAC灌胃4、8周组IL-22水平较正常对照组均升高,仅NAC灌胃12周组IL-22水平下降至正常对照组水平。除戒烟4周组外,其余各处理组IL-22水平均较香烟暴露组降低。与戒烟4周相比,NAC灌胃4周组IL-22水平明显下降,见图2B。

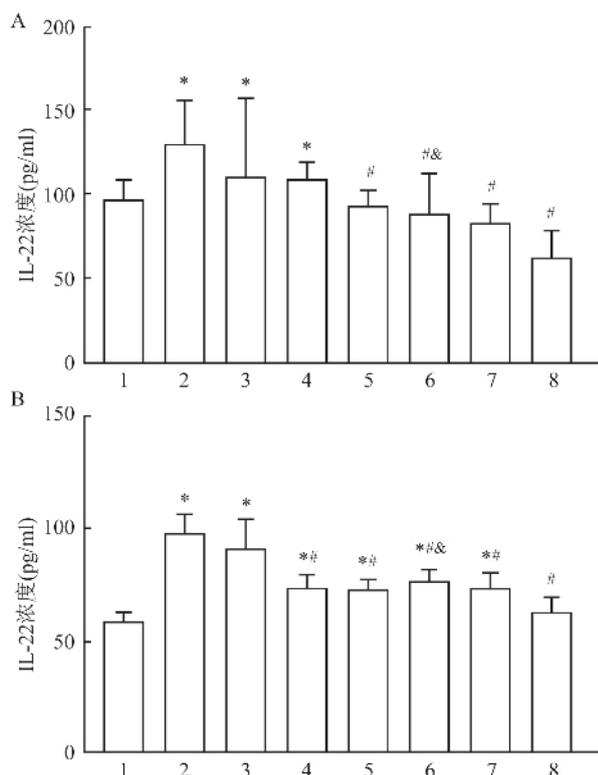


图2 各组小鼠肺匀浆、BALF中IL-22浓度变化

A: 肺匀浆; B: BALF; 1: 正常对照组; 2: 香烟暴露组; 3: 戒烟4周组; 4: 戒烟8周组; 5: 戒烟12周组; 6: NAC 4周组; 7: NAC 8周组; 8: NAC 12周组; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与香烟暴露组比较: # $P < 0.05$; 与戒烟4周组比较: & $P < 0.05$

2.4 肺匀浆及BALF中IL-22与IL-17A比值的变化 肺匀浆及BALF中,随着戒烟及NAC灌胃干预时间的延长,IL-22与IL-17A的比值不断下降,见图3。

3 讨论

IL-17家族包括IL-17A~F、IL-21、IL-22,目前研究最多的主要为IL-17A和IL-22。多种免疫细胞可分泌IL-17和IL-22,其中Th17是IL-17及IL-22的主要来源细胞^[8-9]。此外,Th22亦可分泌大量IL-22^[10]。近年研究^[11-12]表明IL-17和IL-22增高与多

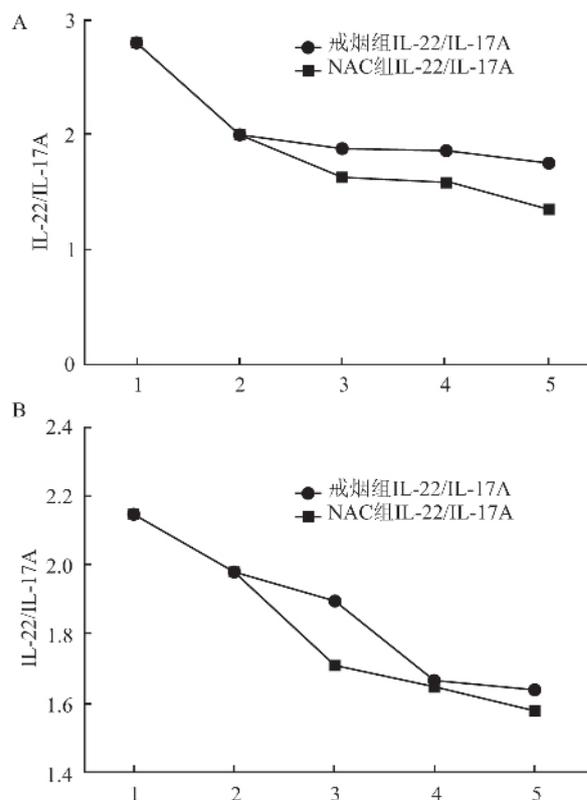


图3 各组小鼠肺匀浆、BALF中IL-22/IL-17A变化

A: 肺匀浆; B: BALF; 1: 香烟暴露0周; 2: 香烟暴露24周; 3: 干预4周; 4: 干预8周; 5: 干预12周

种慢性炎症疾病如类风湿、系统性红斑狼疮、银屑病发病有关。抗IL-17和抗IL-22抗体治疗能够在一定程度上改善病情,提示IL-17、IL-22可促进这些自身免疫性疾病的发生。

IL-17及IL-22是慢阻肺发生发展的关键细胞因子。本研究显示香烟暴露后,小鼠肺匀浆及BALF中IL-17A浓度升高,与蒙菁菁^[3]的报道一致。小鼠受到香烟烟雾刺激后,Th17等多种炎症细胞募集于气道,产生各种细胞因子,这可能是IL-17A增加的直接原因。随着戒烟时间的延长,气道受到的烟雾刺激逐渐减少,募集的炎症细胞亦逐渐减少,因而IL-17A等细胞因子的分泌逐渐减少。与Li et al^[4]的研究结果类似,本实验香烟暴露后,小鼠BALF中IL-22升高。同样,这与Th17、Th22细胞浸润气道,导致IL-22分泌增多有着密切关系。戒烟4周、8周、12周后,炎症细胞浸润渐减少,继之产生的IL-22亦逐渐减少。

NAC是一种含有巯基(-SH)的还原性物质,为还原性谷胱甘肽的前体。除抗氧化作用外,NAC还有一定的抗炎作用。临床研究^[13]显示口服NAC能够显著提高慢阻肺患者的用力呼吸流速,减少慢

阻肺急性加重及患者住院的次数。本实验中,NAC灌胃后小鼠肺组织中升高的 IL-17A、IL-22 水平明显降低,可能与 NAC 抑制氧化应激反应、气道炎症得以控制有关。值得注意的是 随着给药时间延长,IL-17A、IL-22 水平有逐渐下降的趋势;与同期戒烟组比较,NAC 灌胃各组 IL-17A、IL-22 水平均低于戒烟组,即戒烟同时予以 NAC 治疗,就减少炎症因子而言,其疗效优于单纯戒烟。

IL-17 和 IL-22 不仅来源细胞相似,而且两者在多数免疫炎症反应中呈现同增同减的趋势^[14]。本实验显示,香烟暴露后小鼠肺组织中 IL-17A 和 IL-22 表达均明显增加,戒烟及 NAC 灌胃后二者均又明显减少。随着香烟暴露、戒烟和 NAC 干预时间的增加,肺匀浆和 BALF 中,IL-22 及 IL-17A 浓度变化程度不同,两者比例逐渐减小。提示 IL-17A 与 IL-22 这两种细胞因子在吸烟导致慢性肺部炎症的发病机制中,不同阶段作用可能有所不同。据此推测这与 IL-17A 抑制 Th17 细胞产生 IL-22,从而使两者比值减少有关^[15]。此现象的意义及两者之间相互影响的确切机制尚需进一步研究。

综上所述,本研究显示 IL-17A 和 IL-22 参与吸烟导致的肺部炎症的发生。戒烟能够使烟熏小鼠的慢性气道炎症明显减轻,增高的 IL-17A 和 IL-22 显著降低,但不能完全恢复至正常水平。NAC 能够明显减轻吸烟导致的气道炎症,进一步改善戒烟后小鼠肺部的炎症变化。IL-17A 和 IL-22 相关的免疫在慢阻肺的发病机制中的作用值得深入研究。

参考文献

- [1] Di Stefano A, Caramori G, Gnemmi I, et al. T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients [J]. *Clin Exp Immunol*, 2009, 157(2): 316–24.
- [2] Shen N, Wang J, Zhao M, et al. Anti-interleukin-17 antibodies attenuate airway inflammation in tobacco-smoke-exposed mice [J]. *Inhal Toxicol*, 2011, 23(4): 212–8.
- [3] 蒙菁菁, 钟小宁, 黄秋娣. 烟草烟雾暴露大鼠中 CD4⁺ 白介素-17 + T 细胞 CD4⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞的变化及意义 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2012, 35(1): 55–60.
- [4] Li J R, Zhou W X, Huang K W, et al. Interleukin-22 exacerbates airway inflammation induced by short-term exposure to cigarette smoke in mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2014, 35(11): 1393–401.
- [5] Zheng J P, Wen F Q, Bai C X, et al. Twice daily N-acetylcysteine 600 mg for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (PANTHEON): a randomised, double-blind placebo-controlled trial [J]. *Lancet Respir Med*, 2014, 2(3): 187–94.
- [6] Saetta M, Shiner R J, Angus G E, et al. Destructive index: a measurement of lung parenchymal destruction in smokers [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1985, 131(5): 764–9.
- [7] Thurlbeck W M. Measurement of pulmonary emphysema [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1967, 95(5): 752–64.
- [8] Liang S C, Tan X Y, Luxenberg D P, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(10): 2271–9.
- [9] Liang S C, Long A J, Bennett F, et al. An IL-17F/A Heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment [J]. *J Immunol*, 2007, 179(11): 7791–9.
- [10] Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(12): 3573–85.
- [11] Zhu S, Qian Y. IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2012, 122(11): 487–511.
- [12] Yang X, Zheng S G. Interleukin-22: a likely target for treatment of autoimmune diseases [J]. *Autoimmun Rev*, 2014, 13(6): 615–20.
- [13] Tse H N, Raiteri L, Wong K Y, et al. High-dose N-acetylcysteine in stable COPD: the 1-year, double-blind, randomized, placebo-controlled HIACE study [J]. *Chest*, 2013, 144(1): 106–18.
- [14] Eyerich S, Eyerich K, Cavani A, et al. IL-17 and IL-22: siblings, not twins [J]. *Trends Immunol*, 2010, 31(9): 354–61.
- [15] Sonnenberg G F, Nair M G, Kim T J, et al. Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A [J]. *J Exp Med* 2010, 207(6): 1293–305.

Changes of interleukin-17A and interleukin-22 in the lung of cigarette smoke exposed mice and the effect of N-acetylcysteine

Feng Di, Guo Xin, Mei Xiaodong

(Dept of Respiratory Medicine, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the changes of interleukin-17A (IL-17A) and interleukin-22 (IL-22) in the lung of cigarette smoke exposed mice and the effect of smoking cessation and N-acetylcysteine (NAC) treatment.

糖尿病大鼠角膜上皮损伤修复过程中 occludin 的重塑特点

黄晨晨¹, 廖荣丰¹, 汪枫¹, 唐松涛²

摘要 目的 探讨糖尿病(DM)大鼠和正常大鼠角膜上皮修复过程中紧密连接蛋白 occludin 重塑的特点。方法 90只SD大鼠随机分为DM组和正常对照组(NC)各45只(DM组均高脂喂养)通过腹腔注射链脲佐菌素(STZ)诱导形成II型DM大鼠模型,于损伤后0h(未损伤),16、48、72、120h(每组5只)处死大鼠取角膜。间接免疫荧光染色和Western blot法观察 occludin 蛋白在损伤修复过程中的变化。结果 DM大鼠角膜上皮损伤愈合率较NC组大鼠明显延迟,DM组和NC组大鼠角膜上皮 occludin 蛋白在损伤后16、48h表达差异有统计学意义($P < 0.05$),在损伤后0、72、120h表达差异无统计学意义。结论 糖尿病可影响大鼠角膜上皮创伤修复过程中紧密连接蛋白 occludin 蛋白的表达。

关键词 糖尿病;紧密连接蛋白;角膜上皮;免疫荧光染色;Western blot

中图分类号 R 772.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)11-1583-05

随着社会的进步和发展,糖尿病(diabetes mellitus, DM)的发病率也在快速的增加,糖尿病眼病也成为了致盲的主要原因^[1]。研究^[2]报道了糖尿病眼病的并发症,除了糖尿病视网膜病变,多种类型的角膜上皮紊乱在糖尿病患者中也十分常见,包括角

膜上皮损伤愈合的延迟,上皮屏障功能、基础泪液分泌量和角膜敏感度的下降。其中,角膜上皮损伤修复延迟会导致糖尿病患者眼内手术后的一系列临床问题,尤其是玻璃体切除术后。虽然损伤修复延迟的机制尚未了解,但可能与紧密连接蛋白表达的变化有关。该实验通过检测去上皮后不同时间 occludin 蛋白的表达,探讨DM大鼠和NC大鼠在角膜上皮修复过程中紧密连接蛋白 occludin 重塑特点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级健康成年雄性SD大鼠90只,购于安徽医科大学实验动物中心,体重200g左右,发育正常,角膜透明,术前裂隙灯显微镜下眼部检查均无异常。

1.1.2 主要试剂 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)购自美国Sigma公司;0.5%丙美卡因滴眼液购自美国爱尔康公司;兔抗 occludin 多克隆抗体购自美国Abcam公司;FITC标记的羊抗兔IgG抗体、新生胎牛血清、抗荧光淬灭剂、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗、BCA蛋白浓度测定试剂盒、RIPA裂解液、蛋白Marker购自上海碧云天公司。

1.1.3 主要仪器 裂隙灯、手术显微镜(德国Carl Zeiss公司);眼前节照相机(日本佳能公司);血糖分析仪(美国强生公司);冰冻切片机(德国Leica公司);-80℃低温冰箱(美国Thermo Forma公司);电泳仪(北京六一仪器厂);凝胶电泳成像系统(美

2015-06-03 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1408085MH191)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院¹眼科、²内分泌科,合肥230032

作者简介:黄晨晨,女,硕士研究生;

廖荣丰,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: liaorfyf@126.com

Methods BALB/c mice in experimental groups were exposed to cigarette smoke. Then the smoke-exposure was stopped and mice were treated with NAC gavage. The mice were executed 1, 2, and 3 months after smoking cessation. Lung tissue sample and bronchoalveolar lavage fluid(BALF) were collected. HE staining was used to observe the pathologic changes of the lung and ELISA was used to measure the level of IL-17A and IL-22. **Results** Considerable emphysematous changes was found in the lung of mice exposed to cigarette smoke. Compared with the controls, the level of IL-17A and IL-22 elevated remarkably in pulmonary tissue and BALF after smoking exposure and declined gradually after smoking cessation. Additional NAC gavage treatment enhanced the decline tendency. **Conclusion** IL-17A and IL-22 might play a complex role in the chronic inflammatory changes of lung in mice exposed to cigarette smoke.

Key words cigarette smoking; N-acetylcysteine; interleukin-17A; interleukin-22