

烟雾暴露小鼠肺部氧化应激与炎症的变化及戒烟的影响

郭 欣 胡代菊 梅晓冬

摘要 目的 观察烟草暴露小鼠肺部氧化应激状态变化与炎症因子的关系及戒烟对其的影响。方法 50 只雄性 Balb/c 小鼠按随机数字表法分为对照组、烟雾暴露组、戒烟组。戒烟组小鼠烟雾暴露 16 周后戒烟,戒烟 4、8、12 周时处死小鼠留取支气管肺泡灌洗液(BALF)及肺组织标本。采用 HE 法观察小鼠肺组织病理学形态改变,测量肺平均内衬间隔和平均肺泡数,收集 BALF 进行细胞计数,羟胺法测定肺组织匀浆中超氧化物歧化酶(SOD)活力,TBA 法测定肺匀浆中丙二醛(MDA)水平,ELISA 法测定 BALF 和肺匀浆中白细胞介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的浓度。结果 与对照组比较,烟雾暴露组小鼠出现明显的肺气肿变化,BALF 中炎症细胞显著增多($P < 0.05$),戒烟后明显减少($P < 0.05$);肺组织匀浆中 SOD 活力和 MDA 水平增高($P < 0.05$),戒烟后逐渐下降。烟雾暴露组小鼠 BALF、肺组织匀浆中 IL-8 和 TNF- α 浓度显著增高($P < 0.05$),戒烟后明显降低,并随戒烟时间延长更加明显,但未降至正常水平。SOD 活力和 MDA 水平与炎症因子之间呈显著正相关性。结论 吸烟可以导致小鼠肺部氧化应激异常和气道炎症,戒烟可减轻氧化应激和炎症,但未能恢复到完全正常,炎症持续存在。

关键词 烟草暴露;戒烟;氧化应激;炎症因子

中图分类号 R 163.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)06-0757-04

吸烟是慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)的主要发病因素,据世界卫生组织报告,目前全世界有超过 13 亿的吸烟人群, COPD 患者中 80% 有吸烟史^[1]。有研究^[2]表明 COPD 患者肺部氧化应激和炎症反应关系密切,烟雾中含有大量氧化剂和自由基,能刺激肺泡巨噬细胞产生活性氧类(reactive oxygen species, ROS),引起肺部氧化和抗氧化失衡,抗氧化剂主要包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶。急性烟雾暴露可以引起抗氧化剂活力增强,氧化应激损伤标志物丙二醛

(malondialdehyde, MDA)水平增高,但慢性烟雾暴露抗氧化剂活力变化及 MDA 水平目前仍存在疑问。研究^[3]显示戒烟是减缓 COPD 进展的有效措施,另有研究^[4-5]表明戒烟对减轻 COPD 的慢性气道炎症无效。该实验通过烟雾暴露法建立小鼠气道炎症和肺气肿模型,观察烟雾暴露和戒烟后小鼠肺部 MDA、SOD 水平的变化及其与肺部炎症介质白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的变化关系,探讨吸烟以及戒烟对肺部氧化应激、肺气肿和慢性气道炎症的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级雄性 Balb/c 小鼠 50 只, 6~8 周龄, 18~20 g, 由安徽医科大学实验动物中心提供, 研究动物饲养由安徽医科大学附属省立医院科研中心动物中心提供。本研究经安徽医科大学附属省立医院伦理委员会批准(批准号:20130042)。

1.2 主要试剂与仪器 红三环牌香烟(安徽中烟工业公司, 焦油量:11 mg, 烟气烟碱量:0.9 mg, 烟气一氧化碳量:15 mg);总超氧化物歧化酶(T-SOD)和 MDA 测试盒(南京建成生物工程研究所);IL-8 ELISA 试剂盒和 TNF- α ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型, 江苏碧云天生物技术研究所以)。

1.3 分组及处理 将 50 只小鼠按随机数字表法分为对照组($n=10$)、烟雾暴露组($n=10$)、戒烟组($n=30$)。对照组小鼠常规饲养不作任何处理, 烟雾暴露组小鼠参照文献^[6]方法香烟暴露 16 周, 戒烟组烟草暴露 16 周后戒烟 4、8、12 周时处死小鼠留取标本, 在烟雾暴露过程中烟雾暴露组、戒烟 8、12 周组各死亡一只小鼠, 原因未明。

1.4 支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)和肺组织匀浆的制备 用 10% 水合氯醛腹腔麻醉小鼠, 通过眼眶后动脉取血处死, 气管缓慢注入无菌生理盐水 1 ml 灌洗左肺, 分 3 次(4、3、3 ml)灌洗, 得到 BALF, 将 BALF 于 4℃、1 500 r/min 离心 10 min, 收集上清液, -80℃ 保存。向原管中加入 0.2 ml 的 PBS 洗涤细胞 2 次, 重悬细胞后取 10

2015-02-09 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:郭 欣, 女, 硕士研究生;

梅晓冬, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hfmxd@sina.com

μl 用于细胞计数。留取右肺上叶并称重,加入 9 倍 4℃ PBS (pH 7.3) 溶液,使用匀浆器在冰面上充分匀浆,制成 10% 匀浆液,于 4℃、3 000 r/min 离心 10 min,留取上清液,−80℃ 保存。

1.5 肺组织病理标本制备及形态定量分析 向右肺下叶注入 10% 中性甲醛 0.2 ml 内固定后,石蜡包埋切片后 HE 染色。参照文献^[7] 测量肺平均内衬间隔 (mean linear intercept, MLI) 和平均肺泡数 (mean alveolar number, MAN)。MLI:在视野正中划“十”字交叉线,计算通过交叉线的肺泡间隔数,测量十字线的总长度, $\text{MLI} = \text{十字线长度} / \text{肺泡间隔数}$,该值反映肺泡平均内径;MAN:计数每个视野中肺泡数,测量每个视野的面积, $\text{MAN} = \text{肺泡数} / \text{每个视野面积}$,该值反映肺泡密度。由病理科医师进行盲法阅片。

1.6 SOD 活力和 MDA 水平的测定 应用羟胺法测定肺组织匀浆中总 SOD 活力, TAB 法测定肺组织匀浆中 MDA 水平,使用 BCA 法对所测样本中总蛋白浓度进行定量。

1.7 IL-8 和 TNF- α 浓度的测定 应用 ELISA 法测定 BALF 和肺组织匀浆中 IL-8 及 TNF- α 的水平,同时使用 BCA 法对肺组织匀浆中总蛋白浓度进行定量以标准化。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 SNK 法,相关性检验采用 Pearson 相关性分析。

2 结果

2.1 肺组织病理学及形态定量分析 烟雾暴露后小鼠支气管上皮纤毛倒伏缺失,杯状细胞增生;支气管壁及血管壁可见明显炎症细胞浸润;肺泡间隔变薄或断裂,部分肺泡融合成肺大疱。戒烟 4 周时以上病变仍然存在,组织中炎症细胞浸润随戒烟时间延长有明显减轻,但肺泡腔扩大,肺泡间隔断裂未见明显改善。

2.2 BALF 中炎症细胞数量 烟雾暴露组和戒烟组小鼠 BALF 中细胞总数较对照组均显著增高,戒烟组小鼠 BALF 中细胞总数较烟雾暴露组减少,差异均有统计学意义 ($F = 117.95$, $P < 0.05$)。随着戒烟时间延长,有进一步下降趋势,但戒烟 12 周仍未恢复到正常。见表 1。

2.3 肺组织均浆中 SOD 活力和 MDA 水平的变化 烟雾暴露组小鼠肺组织匀浆中 SOD 活力和 MDA 水平显著高于对照组 ($P < 0.05$)。戒烟 4 周后 SOD

表 1 各组小鼠 BALF 中细胞总数和肺组织病理 MLI、MAN 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞总数	MLI	MAN
		($\times 10^4 / \text{ml}$)	($\times 10^{-6} \text{ m}$)	($\times 10^6 \text{ 个} / \text{m}^2$)
对照	10	5.71 \pm 0.28	30.03 \pm 1.95	355.32 \pm 4.40
烟雾暴露	9	19.62 \pm 0.40*	41.96 \pm 1.94*	201.50 \pm 2.77*
戒烟 4 周	10	18.83 \pm 0.12*#	41.98 \pm 1.18*	201.18 \pm 3.00*
戒烟 8 周	9	17.91 \pm 0.15*# Δ	42.11 \pm 2.26*	200.92 \pm 3.97*
戒烟 12 周	9	17.65 \pm 0.39*# Δ	42.07 \pm 2.82*	201.04 \pm 3.03*

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与烟雾暴露组比较: # $P < 0.05$; 与戒烟 4 周组比较: $\Delta P < 0.05$

活力未见明显变化,戒烟 8 周、12 周时 SOD 活力均明显减弱 ($F = 120.06$, $P < 0.05$); 戒烟 4 周、8 周、12 周 MDA 水平逐渐降低,差异均有统计学意义 ($F = 97.62$, $P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组小鼠肺组织匀浆中 SOD 活力及 MDA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOD	MDA
		(U/mg · Prot)	(nmol/mg · Prot $\times 10^{-3}$)
对照	10	43.28 \pm 1.06	7.62 \pm 0.13
烟雾暴露	9	106.64 \pm 1.91*	18.44 \pm 0.36*
戒烟 4 周	10	104.99 \pm 1.56*	15.16 \pm 0.29*#
戒烟 8 周	9	88.32 \pm 2.37*# Δ	13.65 \pm 0.25*# Δ
戒烟 12 周	9	65.16 \pm 3.32*# Δ	10.71 \pm 0.07*# Δ

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与烟雾暴露组比较: # $P < 0.05$; 与戒烟 4 周组比较: $\Delta P < 0.05$; 与戒烟 8 周组比较: $P < 0.05$

2.4 BALF 及肺组织匀浆中 IL-8 和 TNF- α 浓度的变化 烟雾暴露组 BALF 和肺组织匀浆中 IL-8 及 TNF- α 浓度显著高于对照组 ($P < 0.05$); 戒烟 4 周组 BALF 和肺组织匀浆中 IL-8 及 TNF- α 浓度较烟雾暴露组降低,IL-8 浓度降低不明显,TNF- α 浓度降低明显,差异有统计学意义 ($F = 36.2$ 、 111.87 , $P < 0.05$); 戒烟 8 周组 BALF 和肺组织匀浆中 IL-8 及 TNF- α 浓度较戒烟 4 周组降低,IL-8 浓度降低明显,差异有统计学意义 ($F = 66.54$ 、 179.83 , $P < 0.05$),TNF- α 浓度降低不明显; 戒烟 12 周组 BALF 和肺组织匀浆中 IL-8 及 TNF- α 浓度较戒烟 8 周组显著降低 ($P < 0.05$),但较对照组仍明显增高 ($P < 0.05$),见表 3。

2.5 肺组织匀浆中 SOD 活力和 MDA 水平与 TNF- α 和 IL-8 浓度之间的相关性分析 各组肺组织匀浆 SOD 活力与 TNF- α 、IL-8 浓度呈正相关性 ($r = 0.821$ 、 0.814 , $P < 0.05$),肺组织匀浆中 MDA 水平与 TNF- α 、IL-8 浓度呈正相关性 ($r = 0.813$ 、 0.745 , $P < 0.05$)。

表3 各组小鼠 BALF 和肺组织匀浆中 IL-8 及 TNF- α 浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BALF		肺组织匀浆	
		TNF- α (pg/mg)	IL-8 (pg/ μ g)	TNF- α (pg/mg)	IL-8 (pg/ μ g)
对照	10	128.76 \pm 4.82	31.71 \pm 1.37	27.67 \pm 1.24	0.38 \pm 0.02
烟雾暴露	9	222.69 \pm 6.77*	60.05 \pm 2.43*	147.73 \pm 2.09*	1.04 \pm 0.02*
戒烟4周	10	200.79 \pm 2.53*#	59.29 \pm 1.95*	112.83 \pm 2.46*#	1.02 \pm 0.04*
戒烟8周	9	197.69 \pm 2.46*#	50.21 \pm 1.37*# Δ	111.87 \pm 1.23*#	0.83 \pm 0.02*# Δ
戒烟12周	9	175.82 \pm 15.28*# Δ	45.48 \pm 0.89*# Δ	88.69 \pm 1.98*# Δ	0.57 \pm 0.47*# Δ

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与烟雾暴露组比较: # $P < 0.05$; 与戒烟4周组比较: $\Delta P < 0.05$; 与戒烟8周组比较: $P < 0.05$

3 讨论

烟雾中含有大量的 ROS、自由基团、过氧化氢等氧化剂,吸入气道中的氧化剂可刺激肺组织产生炎症反应,募集各种炎症细胞。聚集的巨噬细胞和中性粒细胞释放大量的 ROS,ROS 的产生和清除失衡时,细胞和组织发生氧化应激^[2]。ROS 引起细胞膜结构中的多不饱和脂肪酸解体,进一步通过脂质过氧化等一系列反应产生 MAD 等醛类,所以 MDA 水平变化可评估机体发生氧化应激的程度^[8]。需氧有机体在 ROS 大量产生并对细胞膜造成损害时,可产生保护性的防御机制,包括抗氧化酶类和非酶类 ROS 清除剂,其中主要抗氧化剂有 SOD、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶^[9]。有研究^[10]显示,急性吸烟后小鼠肺组织匀浆中 SOD 活力和 MDA 水平均升高,长期吸烟患者的血浆和红细胞中 SOD 活力和 MDA 水平升高,戒烟后两者均有降低^[11]。本实验结果显示,烟雾暴露后小鼠肺组织匀浆中 SOD 活力和 MDA 水平均显著升高,戒烟后 SOD 活力下降,MDA 水平持续降低。提示吸烟时小鼠体内 SOD 活力代偿性增强,但不能完全清除产生的 ROS,氧化剂和抗氧化剂处于失衡状态,机体发生氧化应激并产生较多的 MDA,戒烟后 ROS 产生减少,机体为趋向氧化剂和抗氧化剂平衡状态,抗氧化剂逐渐减少,氧化应激产生的 MDA 水平也下降。

IL-8 和 TNF- α 为慢性气道炎症中重要的炎症介质,吸入气道内的烟雾刺激气道上皮细胞和肺泡巨噬细胞可释放趋化因子 IL-8,IL-8 水平增高趋化并激活中性粒细胞,中性粒细胞释放弹性蛋白酶、IL-1 β 等刺激气道上皮细胞进一步分泌 IL-8,导致持续的气道慢性炎症和损伤^[12]。巨噬细胞、T 细胞、肥大细胞和上皮细胞分泌 TNF- α ,TNF- α 通过激活核因子- κ B (NF- κ B) 打开 IL-8 基因转录开关,增强中性粒细胞和气道上皮细胞释放 IL-8^[13]。本实验观察到烟雾暴露组小鼠 BALF 中炎症细胞明显增多,BALF 和肺组织匀浆中 IL-8、TNF- α 浓度显著增

高,与文献^[7]报道一致。戒烟后小鼠 BALF 中炎症细胞明显减少,BALF 和肺组织匀浆中 IL-8 及 TNF- α 浓度也随戒烟时间延长逐渐降低,但均未恢复至正常水平,表明戒烟能减轻烟雾暴露导致的肺部炎症,但炎症仍然持续存在,与有关研究^[14]报道相似。

本实验中,吸烟 16 周小鼠肺组织形态学指标 MLI 明显增大,MAN 明显减少,显示肺气肿形成。小鼠肺部血管和小支气管周围大量炎细胞浸润,戒烟 4 周后,炎细胞浸润有所减轻并随时间延长进一步改善,但未恢复到正常,肺气肿未见明显减轻,与研究^[15]一致。提示烟雾暴露导致炎症细胞浸润,戒烟可以减轻炎症,但延长戒烟时间对烟雾暴露已经导致的肺气肿无明显影响。

综上所述,小鼠长期烟雾暴露可导致小鼠肺内氧化应激失衡和气道慢性炎症,炎症细胞浸润和氧化应激异常有密切关系。戒烟能降低肺部 SOD 活力和 MDA 水平,减轻吸烟相关的肺部炎症,其效果随戒烟后时间延长更加明显,但未能完全恢复正常,吸烟导致的炎症持续存在。

参考文献

- [1] Hogg J C. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Lancet 2004, 364(9435): 709-21.
- [2] Rahman I, Adcock I M. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD [J]. Eur Respir J, 2006, 28(1): 219-42.
- [3] Rennard S I, Daughton D M. Smoking cessation [J]. Chest 2000, 117(5 suppl 2): 360S-4S.
- [4] Gamble E, Grootendorst D C, Hattotuwa K, et al. Airway mucosal inflammation in COPD is similar in smokers and ex-smokers: a pooled analysis [J]. Eur Respir J, 2007, 30(3): 467-71.
- [5] 段敏超, 钟小宁, 何志义, 等. CD4⁺ 白细胞介素-17⁺ 辅助性 T 细胞对香烟暴露小鼠肺部炎症及肺气肿的作用 [J]. 中华结核和呼吸杂志 2011, 34(4): 259-64.
- [6] 唐海娟, 钟小宁, 段敏超, 等. 烟草烟雾暴露对小鼠肺部 CD4⁺ 白细胞介素-17⁺ T 细胞表达的影响 [J]. 中华结核和呼吸杂志 2012, 35(5): 369-71.
- [7] 张永, 程德云, 王慧, 等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠肺内白细

- 胞介素-8 和肿瘤坏死因子- α 与气道炎症的关系研究[J]. 中国呼吸与危重监护杂志 2003 2(6): 355-9.
- [8] Michel F ,Bonfont-Rousselot D ,Mas E ,et al. Biomarkers of lipid peroxidation: analytical aspects [J]. *Ann Biol Clin* ,2008 ,66(6): 605-20.
- [9] Cantin A M. Cellular response to cigarette smoke and oxidants: adapting to survive [J]. *Proc Am Thorac Soc* ,2010 ,7(6): 368-75.
- [10] Valença S S ,Pimenta W A ,Rueff-Barroso C R ,et al. Involvement of nitric oxide in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse [J]. *Nitric Oxide* ,2009 ,20(3): 175-81.
- [11] Woźniak A ,Górecki D ,Szpinda M ,et al. Oxidant-antioxidant balance in the blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease after smoking cessation [J]. *Oxid Med Cell Longev* ,2013 2013: 897075.
- [12] Nakamura H ,Yoshimura K ,McElvaney N G ,et al. Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line [J]. *J Clin Invest* ,1992 ,89(5): 1478-84.
- [13] Higham M A ,Pride N B ,Alikhan A ,et al. Tumour necrosis factor- α gene promoter polymorphism in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Eur Respir J* ,2000 ,15(2): 281-4.
- [14] Braber S ,Henricks P A ,Nijkamp F P ,et al. Inflammatory changes in the airways of mice caused by cigarette smoke exposure are only partially reversed after smoking cessation [J]. *Respir Res* ,2010 ,11:99.
- [15] Milot J ,Meshi B ,Taher Shabani Rad M ,et al. The effect of smoking cessation and steroid treatment on emphysema in guinea pigs [J]. *Respir Med* 2007 ,101(11): 2327-35.

Oxidative stress and inflammatory changes in the lung caused by cigarette smoking exposure in mice and the effect of smoking cessation

Guo Xin ,Hu Daiju ,Mei Xiaodong

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

Abstract Objective To observe the changes of pulmonary oxidative stress after cigarette smoking exposure ,its relationship with inflammatory cytokines , and the effects of smoking cessation. **Methods** Fifty male BALB/c mice were randomly divided into the smoke exposure group , smoke cessation group , and the controls. Mice in smoke cessation group were exposed to cigarette smoking for 16 weeks. On 4 , 8 , and 12 week after smoking cessation mice were executed and the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissue were collected. The morphological alternations of lung tissue were observed. Mean length of interval and mean alveolar number were measured. Total cell numbers in BALF were counted. Superoxide dismutase (SOD) activity was measured with hydroxylamine method , malondialdehyde (MDA) level was measured with TBA method. The levels of pulmonary interleukin-8 (IL-8) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in BALF and lung tissue homogenate were measured with ELISA. **Results** Compared with the mice in the controls , emphysematous changes were remarkable in the lung of cigarette exposed mice , the total cell numbers in BALF were increased significantly ($P < 0.05$) and reduced gradually after smoking cessation ($P < 0.05$). SOD and MDA levels increased remarkably in the cigarette exposure group ($P < 0.05$) , and declined gradually after smoking cessation. The levels of IL-8 and TNF- α in BALF and lung tissue homogenate in the smoke exposure group increased significantly ($P < 0.05$) , and lowered time-dependently after smoking cessation , but not reached to normal level even 12 weeks after smoking cessation. SOD and MDA levels were positively correlated with the cytokine changes. **Conclusion** Abnormal oxidative stress in the airways caused by cigarette smoking exposure was merely partially reversed after smoking cessation. And the inflammation remains persistent concomitantly.

Key words cigarette smoking exposure ; smoking cessation ; oxidative stress ; inflammatory cytokines