

N-乙酰半胱氨酸对吸烟导致小鼠肺气肿及 IL-12 水平的影响

胡代菊 郭欣 梅晓冬

摘要 目的 观察 N-乙酰半胱氨酸(NAC)对烟草烟雾暴露导致的小鼠肺气肿及白介素-12(IL-12)水平的影响。方法 健康雄性 C57BL/6 小鼠 24 只,按随机数字表法分为正常对照组、烟雾暴露组和 NAC 组。烟雾暴露组和 NAC 组小鼠给予香烟烟雾吸入共 20 周。NAC 组小鼠在烟雾暴露 16 周时,予以加用 NAC 腹腔内注射给药 4 周后处死小鼠,留取肺组织、血液和肺泡灌洗液(BALF)。使用 HE 染色法观察小鼠肺组织病理形态改变,计算单位面积内的平均肺泡内衬间隔以及肺泡数;使用酶联免疫吸附法(ELISA)检测小鼠 BALF 和血清中 IL-12 的浓度水平。结果 与正常对照组相比,烟雾暴露组小鼠肺组织内炎症细胞浸润及肺气肿样变化明显,肺泡内衬间隔增加,肺泡数减少。同时,血清及 BALF 内 IL-12 水平较正常对照组明显增高,差异有统计学意义($P < 0.05$);NAC 组小鼠肺组织病理变化与烟雾暴露组相比明显减轻,差异有统计学意义($P < 0.05$);血清和 BALF 内 IL-12

水平较烟雾暴露组显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 NAC 能明显抑制烟雾暴露导致的肺气肿,降低炎症因子 IL-12 水平,提示 NAC 对烟雾暴露导致的小鼠肺部炎症反应及肺气肿可能有减轻作用。

关键词 烟雾;肺气肿;慢性阻塞性肺病;白介素-12;N-乙酰半胱氨酸

中图分类号 R 563.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)11-1578-04

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种以不完全可逆气流受限为主要特征的慢性气道炎症性疾病。其主要病理变化为气道慢性炎症反应和肺气肿,其发生与肺组织对有害颗粒或气体的炎症反应有关^[1]。各种原因导致的肺部损伤最终均与氧化应激、气道炎症反应和肺泡细胞凋亡以及免疫调节之间的相互作用密切相关^[2]。吸烟是导致 COPD 发生和发展的主要因素,占 COPD 病例发病原因的 80% 左右,吸烟除导致气道慢性炎症外,其导致的氧化应激异常也是吸烟导致 COPD 的又一重要机制。该研究通过烟熏法建立肺气肿模型,模拟 COPD 慢性炎症反应及肺气肿病

2014-07-14 接收

基金项目:安徽省科技厅计划项目(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:胡代菊,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

the microRNA-339 lentiviral expression vector (has-miR-339) was constructed. **Methods** MiR-339 precursor sequence (pre-miR-339) and flanking sequence were obtained by the miRBase database. The DNA encoding pre-miR-339 was digested with double connective enzyme and ligated to pLVTHM. The constructs were confirmed by direct DNA sequencing. Lentivirus was generated by co transfection with the above construct with packaging plasmids psPAX2 and pMD2. G into HEK293FT. A stable SW620 subline overexpressing with pre-miR-339 was selected by flow cytometry. Confirmation of stable transfection of the plasmids was obtained using the Real-time RT-PCR assay. The migration of SW620 cells was measured with scratch assay. **Results** Through double enzyme digestion and DNA sequencing, the lentiviral expression vector containing pre-miR-339 was successfully constructed. And fluorescence microscope observation showed that the 293FT packaging cells and SW620 cells expressed green fluorescence. The migration results showed that compared with the control group (SW620/PLVTHM-NC), experimental group (SW620/PLVTHM-pre-miR-339) cell migrated more slowly, scratch distance was wider. **Conclusion** The lentiviral vector containing pre-miR-339 and a stable SW620 subline with miR-339-5p and miR-339-3p overexpression are successfully constructed. And the results confirm that miR-339-5p/3p can inhibit the migration of SW620 colon cancer cells.

Key words miR-339; colorectal cancer; lentiviral expression vector; migration

理改变,观察 N 乙酰半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)对吸烟导致的小鼠肺气肿及肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)和血清中白介素-12(interleukin-12, IL-12)水平变化的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料 香烟为安徽红三环卷烟厂生产的红三环牌过滤嘴香烟,每支含尼古丁 1.0 mg,焦油 13 mg, IL-12 酶联免疫吸附法(ELISA 法)检测试剂盒由南京福麦斯生物制剂公司提供。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型建立 健康 6~8 周龄 C57BL/6 雄性小鼠 24 只,20~25 g,普通级由安徽医科大学实验动物中心提供。按随机数字表法分为正常对照组、烟雾暴露组和 NAC 组,每组 8 只。C57BL/6 小鼠置于适宜小鼠生存条件的动物房内,并予以维持 12 h 昼夜循环,给予充足的食物和水。适应 1 周后,开始烟雾暴露。正常对照组暴露于空气 20 周;烟雾暴露组及 NAC 组小鼠分别置于烟熏装置箱内(40 cm × 50 cm × 45 cm 有机玻璃舱),小鼠置于箱内完全暴露于烟雾中,4 支香烟放入舱内自然燃烧,大约 15 min,打开玻璃舱休息间隔 30 min,每天重复 3 次,每周进行 5 天,共 16 周。在本实验预实验中,HE 染色光镜下发现第 16 周时烟雾暴露可以明显导致肺气肿和肺部炎症形成。肺气肿造模成功后,烟雾暴露组继续上述方法烟熏暴露 4 周;NAC 组同样方法烟雾暴露 16 周后,继续烟雾暴露同时予以 NAC 100 mg/kg 腹腔内注射,每天 1 次,每周进行 5 天,共 4 周^[3]。

1.2.2 标本留取 小鼠最后一次烟雾暴露和给药 24 h 后,按照 40 mg/kg 硫苯妥钠给予腹腔注射麻醉,内眦动脉采血,每只留取全血 500 μl,3 000 r/min 离心 15 min,留取血清分装后置于 -80 ℃ 冰箱内待用。小鼠采血后立即予以解剖充分暴露气管,结扎右肺门,取出右肺,置入 10% 甲醛内固定,留作病理检测。气管插管后予以提前加热至 37 ℃ 的 0.9% 生理盐水 1 ml 分 3 次气管内灌入,每次反复抽吸 3 次后回收,回收率为 80%~90%。予以 4 ℃ 条件下,1 000 r/min 离心 10 min,留取上清液分装后置于 -80 ℃ 冰箱内待用。

1.2.3 肺泡形态观察及肺气肿测定 右肺以 10% 甲醛固定 48 h,取下叶距肺门 3 mm 处连续切片(厚

度为 5 μm),行 HE 染色,计算平均内衬间隔和平均肺泡数。每只小鼠取 3 个 HE 染色切片,使显微镜处于同一放大倍数(×200),每片随机取 3 个视野(避开大血管和支气管),在每个视野正中心划十字交叉线,计算与交叉线相交的肺泡隔数和每个视野内肺泡数,同时测出十字线总长和每个视野面积,平均内衬间隔 = 十字线总长/肺泡数,表示肺泡平均内径;平均肺泡数 = 肺泡数/每个视野面积,反映肺泡密度。

1.2.4 IL-12 含量的检测 步骤严格按照 ELISA 试剂盒说明书要求操作,分别测定 BALF 和血清内 IL-12 含量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 肺组织形态学评价

2.1.1 HE 染色 正常对照组小鼠气管内表面纤毛整齐,未见腺体增生及炎性细胞浸润,肺泡间隔完整;烟雾暴露组,小鼠支气管内纤毛部分脱落,炎性细胞浸润明显,普遍存在肺泡腔不规则扩大,肺泡间隔变薄或断裂,部分肺泡相互融合形成肺大疱;NAC 组炎性细胞浸润明显减轻,纤毛破损脱落情况不明显,肺泡间隔断裂不明显,肺部病变明显改善。见图 1。

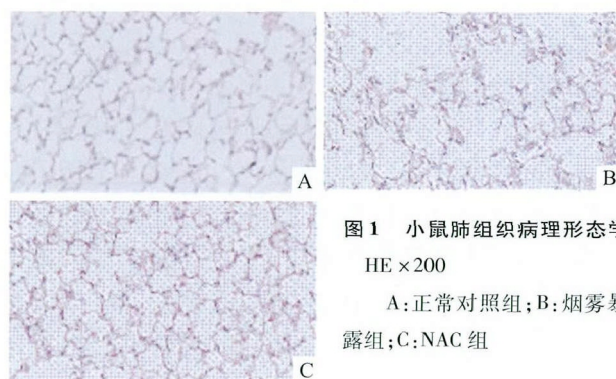


图1 小鼠肺组织病理形态学
HE × 200
A:正常对照组;B:烟雾暴露组;C:NAC 组

2.1.2 定量分析 与正常对照组比较,烟雾暴露组小鼠肺平均内衬间隔显著增加,平均肺泡数显著减少,呈现明显的肺气肿样改变,差异有统计学意义($P < 0.05$);与烟雾暴露组比较,NAC 组肺部病理有明显改善,差异有统计学意义($P < 0.05$),与正常对

照组比较, NAC 组虽然平均内衬间隔有所减少, 平均肺泡数有所增加, 肺气肿样改变有所改善, 两组之间差异有统计学意义 ($F = 26.109, 199.998, P < 0.05$), 见表 1。

2.2 血清和 BALF 中的 IL-12 变化 与正常对照组比较, 烟雾暴露组小鼠血清和 BALF 中 IL-12 水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); NAC 组血清和 BALF 中 IL-12 水平较烟雾暴露组显著下降, 差异有统计学意义 ($F = 20.980, 9.769, P < 0.05$), 见表 1。

表 1 各组小鼠肺平均内衬间隔、平均肺泡数、血清和 BALF 内 IL-12 水平的比较 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	平均内衬间隔 ($10^{-6}\text{m}/\text{个}$)	平均肺泡数 ($10^6/\text{m}^2$)	血清中 IL-12 (pg/L)	BALF 中 IL-12 (pg/L)
正常对照	38.7 ± 8.6	497.6 ± 116.5	228.76 ± 17.08	86.74 ± 10.41
烟雾暴露	62.7 ± 9.9*	287.4 ± 70.9*	387.07 ± 46.11*	131.25 ± 22.57*
NAC	48.6 ± 9.1*	410.5 ± 84.6*	238.40 ± 45.69*	89.79 ± 10.20*

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与烟雾暴露组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

COPD 是机体因长期吸入各种有害气体或离子所引起的与慢性炎症反应有关的一种疾病, 其主要病理改变为气道慢性炎症及肺气肿形成。吸烟是 COPD 的主要发病和发展因素, 研究^[4]显示吸烟的 COPD 患者肺内中性粒细胞、巨噬细胞明显增多, 并与疾病严重程度相关, 这些吞噬细胞分泌中性粒细胞弹性蛋白酶、基质金属蛋白酶 (MMPs) 并产生大量氧化产物, 气道上皮可见大量树突状细胞聚集, 可能与炎症反应及肺气肿形成有关。肺组织内炎症细胞的迁移和激活同时又受到所释放的不同调节因子所调控, 包括由炎症细胞和肺内固有细胞所释放的蛋白酶、细胞因子、趋化因子等。这些调节因子在慢性炎症反应中发挥作用, 并在肺气肿组织的破坏和修复过程中可见明显异常^[5]。已有研究^[6-7]表明多种炎症因子与 COPD 患者气道慢性炎症反应有关, 如 IL-12、IL-8、肿瘤坏死因子- α 、单核细胞趋化蛋白-1 α 等多种炎症因子, COPD 患者肺内均有不同程度增高。

有关氧化应激在烟雾导致 COPD 发病机制中的作用, 以及是否可以通过该途径达到干预 COPD 的病理变化进程尚无研究结论。抗氧化物能否用于治疗吸烟所相关的氧化应激损伤性疾病如 COPD 值得探索研究。NAC 是一种具有抗氧化作用的分子, 文

献^[8]报道动物实验证明 NAC 能够抑制气道内的蛋白氧化反应和有效减轻环境浓缩有害颗粒物导致的炎症反应。体内外实验^[9]均表明 NAC 通过提高细胞内 GSH 水平和减弱 NF- κ B 的激活来阻止上皮细胞和巨噬细胞释放炎症调节物质, 促进 B 细胞活化, 提示 NAC 在抗氧化和免疫反应中的调节作用。有研究^[10]表明 NAC 能够在信号转录及蛋白质水平抑制小鼠巨噬细胞产生 IL-12, 从而促进 Th17 反应抑制 Th1 反应。

本研究显示, 肺部组织学病理检查显示肺组织内炎症细胞浸润及肺气肿形成, 与 COPD 的肺组织病理变化相似, 证明烟雾暴露能够导致小鼠肺组织内产生炎症反应和肺气肿形成, 与文献^[11]报道相符。IL-12 作为 COPD 发病中的主要炎症因子, 在烟熏小鼠血清和 BALF 的含量明显增高, 与对照组小鼠相比有显著性差异, 提示烟雾暴露能够导致小鼠肺内产生炎症反应。有关烟雾暴露小鼠肺部 IL-12 的变化研究结果并不一致, 有研究^[12-14]显示 IL-12 在小鼠吸烟前后 BALF 和血清中无明显变化甚至降低。本研究结果显示烟熏导致小鼠血清和 BALF 中 IL-12 水平均明显增高, 推测可能与炎症反应发生的不同阶段细胞因子产生有不同相关, 此外与使用的香烟以及动物等因素也可能有关。

本研究观察了 NAC 对烟熏导致小鼠肺气肿及血清和 BALF 内 IL-12 水平的变化。烟熏同时使用 NAC 干预 4 周后结果显示, 与继续烟雾暴露组小鼠相比, NAC 能明显降低烟熏导致的小鼠血清和 BALF 内增高的 IL-12 水平, 增高的 IL-12 降低到与正常对照组相似的水平, 提示 NAC 可能对烟雾暴露导致的气道炎症有抑制作用。肺部病理组织学观察显示, NAC 组小鼠肺气肿较继续烟熏组明显减轻, 提示 NAC 可能对烟雾暴露导致的肺气肿有抑制作用。但是本研究小鼠样本量不够大以及研究时间较短, 有必要增大样本量以及延长研究时间, 以使得结论更加明确及有说服力。本研究提示 NAC 对烟雾暴露导致的肺部炎症和肺气肿可能有干预作用, 提示 NAC 可能对于 COPD 患者肺气肿及气道炎症反应有治疗价值, 具体作用机制有待于分子或基因水平进一步研究。

参考文献

- [1] MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease

- [J]. *Proc Am Thorac Soc* 2005 2(8): 258–66.
- [2] Kirkham P, Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy [J]. *Pharmacol Ther* 2006, 111(10): 476–94.
- [3] Palmer V L, Kassmeier M D, Willcockson J, et al. N-acetylcysteine increases the frequency of bone marrow Pro-B/Pre-B cells, but does not reverse cigarette smoking-induced loss of this subset [J]. *PLoS ONE* 2011, 6(9): e24804.
- [4] Demedts I K, Bracke K R, Van Pottelberge G, et al. Accumulation of dendritic cells and increased CCL20 levels in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 175(11): 998–1005.
- [5] Tudor R M, McGrath S, Neptune E, et al. The pathobiological mechanisms of emphysema models: what do they have in common? [J]. *Pulm Pharmacol Ther* 2003, 16(2): 67–78.
- [6] Keatings V M, Collins P D, Scott D M, et al. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma [J]. *Am J Respir Crit Care Med* 1996, 153(2): 530–4.
- [7] Churg A, Dai J, Tai H, et al. Tumor necrosis factor- α is central to acute cigarette smoke-induced inflammation and connective tissue breakdown [J]. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 166(6): 849–54.
- [8] Rhoden C R, Lawrence J, Godleski J J, et al. N-Acetylcysteine prevents lung inflammation after short-term inhalation exposure to concentrated ambient particles [J]. *Toxicol Sci* 2004, 79(2): 296–303.
- [9] Mulier B. Hydrogen peroxide-induced epithelial injury: the protective role of intracellular nonprotein thiols (NPSH) [J]. *Eur Respir J* 1998, 11(5): 384–91.
- [10] 张明华, 刘冀琴, 赵娟. 抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸对巨噬细胞产生 IL-12 及 IL-23 的不同作用 [J]. *免疫学杂志* 2010, 26(9): 776–80.
- [11] 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.
- [12] D'hulst A I, Maes T, Bracke K R, et al. Cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in acid-mice. Is the acquired immune system required? [J]. *Respir Res* 2005, 6: 147.
- [13] Mortaz E, Lazar Z, Koenderman L, et al. Cigarette smoke attenuates the production of cytokines by human plasmacytoid dendritic cells and enhances the release of IL-8 in response to TLR-9 stimulation [J]. *Respir Res* 2009, 10: 47.
- [14] Kroening P R, Barnes T W, Pease L, et al. Cigarette smoke-induced oxidative stress suppresses generation of dendritic cell IL-12 and IL-23 through ERK-dependent pathways [J]. *J Immunol* 2008, 181(2): 1536–47.

Influence of N-acetylcysteine on emphysema and IL-12 induced by cigarette smoking in mice

Hu Daiju, Guo Xin, Mei Xiaodong

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

Abstract Objective To investigate the effect of N-acetylcysteine (NAC) on the level of IL-12 and emphysematous damage induced by cigarette smoking in mice in order to find new therapeutic method for chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** Twenty-four male C57BL/6 mice were randomly divided into three groups: control group, cigarette exposure group and NAC treating group. Mice in cigarette smoking group was treated with cigarette smoking for 20 weeks, and NAC group was given NAC between week 16 and 20. All mice were executed at the end of week 20 and lung tissue, blood and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were collected. Pathological changes of lung tissue were observed on HE stained slides. The number of alveolar airspace was calculated. IL-12 levels in BALF and serum were detected by ELISA. **Results** Emphysematous changes and inflammatory cell infiltration were found in the lung of cigarette smoking mice. Levels of IL-12 in BALF and serum increased remarkably compared with that of control group. The histopathological changes in NAC treated group were also remarkably improved compared with the smoking group. Meanwhile IL-12 level tremendously lowered in NAC treated group. There was no significant difference between the levels of IL-12 in the controls and NAC treated group. **Conclusion** NAC can suppress the inflammation and ameliorate emphysematous damage induced by cigarette smoking.

Key words cigarette smoking; emphysema; chronic obstructive pulmonary disease; IL-12; N-acetylcysteine