

早期戒烟大鼠肺病理及炎性介质变化

姜洪芳¹, 蔡存伟², 赵立³

(1. 中国医科大学附属盛京医院老年病科, 沈阳 110004;

2. 辽宁省肿瘤医院病理科, 沈阳 110042; 3. 中国医科大学附属盛京医院呼吸内科, 沈阳 110004)

【摘要】 目的 观察早期戒烟后大鼠肺组织病理及炎性介质表达变化规律。方法 选用 Wistar 雄性大鼠 80 只, 随机分为对照组及早期戒烟后 0 天、1 周、2 周、4 周、6 周、8 周、12 周组。采用酶联免疫吸附方法测定各组大鼠血清中 IL-8 的蛋白质含量, S-P 免疫组化方法检测肺组织 NF- κ B p65 的表达, 并光镜下观察 HE 染色切片、对大鼠气道炎症进行病理学评分。结果 早期戒烟组大鼠可见气道上皮细胞纤毛发生粘连、倒伏, 上皮细胞空泡变形、坏死、增生, 炎症细胞浸润; 其血清 IL-8 浓度、肺组织 NF- κ B 的表达及气道炎症病理评分在戒烟后各时相点较未吸烟对照组明显升高, 有统计学意义 ($P < 0.05$)。早期戒烟组大鼠血清 IL-8 的浓度、肺组织 NF- κ B 的表达及肺组织病理炎症评分在戒烟后略有上升, 且在戒烟后 8 周达到高峰, 但随后在戒烟 12 周时可见 IL-8 的浓度有下降趋势, 肺组织病理炎症反应有所减轻。结论 早期戒烟大鼠在戒烟早期虽可见炎症反应略有加重, 但随戒烟时间延长, 仍可见炎症反应有所减轻。因此, 提倡及早且坚持戒烟。

【关键词】 早期戒烟; 肺组织病理; 炎性介质

【中图分类号】 R563.3; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)01-0051-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.001.002

Changes in Lung Pathology and Expression of Inflammatory Mediators after Smoking Cessation Early in Rats

JIANG Hong-fang¹, CAI Cun-wei², ZHAO Li³

(1. Department of Geriatrics, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China

2. Department of Pathology, Cancer Hospital of Liaoning Province, Shenyang 110042, China;

3. Department of Respiratory Diseases, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China)

【Abstract】 Objective To investigate changes in lung pathology and expression of inflammatory mediators in early quitting smoke rats. **Methods** A total of 80 Wistar male rats were randomly divided into control group and early quitting smoke groups on the smoking cessation stage 0 day, 1 week, 2 weeks, 4 weeks, 6 weeks, 8 weeks, 12 weeks. Levels of IL-8 protein in serum of different group rats were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), expressions of NF- κ B p65 in lung tissue were detected by S-P immunohistochemistry, and pathology score of inflammation on airway were carried out by observing HE stained lung tissue sections under light microscope. **Results** Early quitting smoke group could be seen Cilia sticking together, lodging, epithelial cell vacuoles deformation, necrosis, hyperplasia, inflammatory cell infiltration. The levels of IL-8 protein in serum, expression of NF- κ B and pathological score in lung tissue of smoking cessation groups on any smoking cessation stage was significantly higher than non-smoking control group, statistically significant ($P < 0.05$). In early quitting smoke groups, the serum level of IL-8, expression of NF- κ B and airway inflammation pathological score of groups was the

[基金项目] 辽宁省自然科学基金资助项目(20092103)。

[作者简介] 姜洪芳(1979-), 女, 讲师, 硕士。研究方向: 老年肺部疾病。

[通讯作者] 赵立(1963-), 女, 教授, 博士。研究方向: 肺部疾病。

highest after 8 weeks of smoking cessation, and then the serum level of IL-8 tended to decrease and the lung inflammation alleviated on the smoking cessation stage 12 weeks. **Conclusion** Although on the early stage of smoking cessation, inflammatory response can be seen a slight increase, but with the cessation prolonged inflammatory response can still be seen some relief. Therefore, it is necessary to persist on quitting smoking as soon as possible.

【Key words】 Early smoking cessation; Lung pathology; Inflammatory mediators

吸烟可诱发肺部炎症反应,是慢性支气管炎、肺气病等疾病的重要致病因素^[1]。但目前有报道称,戒烟并不能缓解气道炎症,尤其是在肺气肿病情形成以后^[2-3]。这将引发人们思索,是否某些“健康”吸烟者在戒烟后,其病情转归并不如我们所预期的乐观。鉴于此,我们的研究以早期戒烟大鼠为研究对象,观察其戒烟后肺组织病理及炎症介质变化,以期对戒烟人群做出正确指导。

1 材料和方法

1.1 实验动物

1.1.1 实验动物及分组:实验动物选用 Wistar 雄性大鼠 80 只,体重 150 ~ 230 g,由中国医科大学动物中心提供(SCXK[军]2007-004)随机分为对照组及早期戒烟 0 天、1 周、2 周、4 周、6 周、8 周、12 周组,每组均 10 只。各组饲料、饮水相同,均予自由饮水和摄食。

1.1.2 早期戒烟组模型制备:将吸烟组大鼠以 120 只/m³密度放入 100 cm × 50 cm × 50 cm 的有机玻璃制成的染毒箱内。每天被动吸烟 2 次,每次 10 支,每次间隔 4 h,每次 30 min,连续吸烟 30 d 后戒烟。香烟为沈阳卷烟厂生产的蓝翎牌香烟,焦油量:14 mg、烟气烟碱量:12 mg、烤烟型 84 mm。

1.2 实验方法:

1.2.1 血清 IL-8 浓度的测定:各组大鼠分别于实验结束次日,以 2% 戊巴比妥钠(50 mg/吨)腹腔注射麻醉后,腹主动脉放血致死。血样以 3500 r/min 离心,取血清, -80℃ 冻存。采用酶联免疫吸附方法

测定血清中 IL-8 的蛋白质含量。试剂盒购于美国 BioSource Europe S-A 公司。

1.2.2 NF-κBp65 的表达:取相同部位肺组织,4% 多聚甲醛常规灌注固定、蜡块制作,切片,贴片。采用 S-P 免疫组化方法,试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。每张切片于光镜下随机选取 10 个视野,利用美国 Universal Imaging Porporation 图像分析系统,应用 Meta Morph 软件,测定平均光密度值以表示阳性产物的强度。

1.2.3 病理学观察:各组大鼠均取左侧支气管旁肺组织,光镜观察 HE 染色切片,按文献^[4]所述方法对各组大鼠气道炎症进行病理学评分。

1.3 统计学处理:

应用 SPSS13.0 统计软件,数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用方差分析法检验,各组间两两比较用 q 检验完成,单因素相关分析采用 Spearson 相关分析法。 $P < 0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 早期戒烟组大鼠肺组织标本 HE 染色切片

光镜下观察,多数大鼠可见气道上皮细胞纤毛发生粘连、倒伏,上皮细胞空泡变形、坏死、增生,炎症细胞浸润。

2.2 对照组及早期戒烟组血清 IL-8 浓度、肺组织 NF-κB 的表达、肺组织病理评分变化及比较结果

见表 1 及彩插 1 图 1(肺组织 HE 染色)、彩插 1 图 2(肺组织 NF-κB 的表达)。

表 1 对照组及早期戒烟组血清 IL-8 浓度、肺组织 NF-κB 的表达、病理评分变化及比较

Tab. 1 Changes and comparison among control group and early quitting smoke groups in serum level of IL-8, lung tissue expression of NF-κB and pathological score

	对照组 Control group	戒烟 0 天组 Smoking cessation stage 0 day	戒烟 1 周组 Smoking cessation stage 1 week	戒烟 2 周组 Smoking cessation stage 2 weeks	戒烟 4 周组 Smoking cessation stage 4 weeks	戒烟 6 周组 Smoking cessation stage 6 weeks	戒烟 8 周组 Smoking cessation stage 8 weeks	戒烟 12 周组 Smoking cessation stage 12 weeks
IL-8 浓度 Level of IL-8(pg/mL)	26.16 ± 3.00	29.76 ± 5.07	32.24 ± 3.09 ¹⁾	33.91 ± 4.07 ¹⁾	53.96 ± 9.28 ¹⁾²⁾	68.24 ± 6.21 ¹⁾²⁾	80.89 ± 6.17 ¹⁾²⁾	52.20 ± 5.57 ¹⁾²⁾
NF-κB 表达 Expression of NF-κB	0.0363	0.0178 ¹⁾	0.0131 ¹⁾	0.0154 ¹⁾	0.0137 ¹⁾	0.0132 ¹⁾	0.0150 ¹⁾²⁾	0.0081 ¹⁾
病理评分 Pathological score	10.50 ± 1.78	28.40 ± 3.17 ¹⁾	30.50 ± 2.32 ¹⁾	32.70 ± 6.15 ¹⁾	35.70 ± 5.06 ¹⁾	36.70 ± 3.77 ¹⁾	37.50 ± 3.98 ¹⁾	36.80 ± 4.00 ¹⁾

注: 1) 与对照组比较; $P < 0.05$; 2) 与前一时向点比较; $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs control group; 2) $P < 0.05$ vs the previous time point group

早期戒烟组大鼠血清 IL-8 浓度、肺组织 NF- κ B 的表达及气道炎症病理评分在戒烟后各时相点较未吸烟对照组明显升高,有统计学意义($P < 0.05$)。早期戒烟组大鼠血清 IL-8 的浓度、肺组织 NF- κ B 的表达及肺组织病理炎症评分在戒烟后略有上升、且在戒烟后 8 周达到高峰,但随后在戒烟 12 周时可见 IL-8 的浓度有下降趋势,肺组织病理炎症反应有所减轻。

3 讨论

吸烟诱发的肺部炎症反应机制复杂。在吸烟者可发展为有明显症状的 COPD 患者占 15% ~ 20%,有慢性呼吸道症状而无气流受限者占 50%,约 30% 的吸烟者无慢性呼吸道症状及气流受限,即所谓的“正常吸烟者”^[5]。既往的研究多是以前两者为研究对象,其研究结果已告诉我们,通过单纯戒烟,并不能逆转 COPD 病情。因此,本研究通过观察及检测早期戒烟大鼠戒烟后不同时相肺组织病理及炎性介质的表达,探讨“正常吸烟者”在戒烟后病情能否继续发展,与吸烟合并 COPD 者间戒烟后肺组织病理和炎症反应变化是否一致,关于此类研究在国内外尚鲜有报道。

香烟烟雾中的氧化剂可增加肺泡上皮细胞粘液的产生,损伤支气管纤毛功能,增加内皮细胞通透性,从而有利于炎症细胞向病变部位渗出^[6]。肺泡巨噬细胞、上皮细胞在吸烟、细菌、病毒感染等刺激下释放 IL-8 增加,IL-8 可以趋化中性粒细胞、淋巴细胞等导致炎症反应的放大。Sarah 等^[7]发现吸烟伴肺气肿的患者肺泡灌洗液中巨噬细胞释放 IL-8 水平较正常人群升高 5 倍以上,应用香烟溶液刺激肺气肿患者肺泡灌洗液中的巨噬细胞,其释放 IL-8 的增加量也明显高于健康吸烟组增加量。Nogueraa 等^[8]研究表明吸烟伴肺气肿患者支气管上皮细胞及痰液细胞培养上清液中 IL-8 水平明显高于非吸烟健康对照及吸烟无肺气肿组,证明了 IL-8 是肺气肿患者气道内的主要炎性介质。

近来的研究提示 NF- κ B 在炎症刺激后上调一系列特定的细胞因子及粘附分子基因的转录中起重要作用^[9]。NF- κ B 是一具有基因转录调控作用的 DNA 结合蛋白,对未受刺激的细胞,NF- κ B 与其抑制剂 I κ B 相结合存在于胞浆中,覆盖了 NF- κ B 的核定位信号区,阻滞了 NF- κ B 活化进入胞核发挥作用,所以 I κ B 与 NF- κ B 的解离是 NF- κ B 活化的首要

条件。而烟雾刺激作为 NF- κ B 激活的诱导剂,常与 I κ B 的去磷酸化相关。动物实验曾证实急性暴露香烟后可使肺泡巨噬细胞中 NF- κ B 活性持续增强,导致 IL-8 等炎症介质基因及粘附分子基因的过度表达,诱导中性粒细胞进入气道,而引起炎症反应的持续^[10],这一机制可能与肺气肿气道炎症作用机制相关。

由于 IL-8、NF- κ B 等细胞因子是构成肺气肿气道炎症的复杂的炎症细胞、细胞因子网络的重要组成部分,能相互促进,加速局部炎症的发生发展,在肺气肿发病中起着十分重要的作用。因此,本实验在观察戒烟大鼠肺组织病理变化的同时,检测血清 IL-8 浓度及肺组织 NF- κ B 因子表达。研究结果表明,与吸烟合并 COPD 者不同,早期戒烟大鼠在戒烟早期虽可见炎症反应略有加重,但随戒烟时间延长,仍可见炎症反应有所减轻。

吸烟所致肺部疾病病变过程十分复杂,戒烟后肺组织的炎症介质和炎症细胞发挥作用的路径和机制还需要深入研究。目前已有报导提出,COPD 患者戒烟后持续存在的炎症反应可能是一个综合性部分修复过程,炎症介质及炎症细胞的增多可能起到运输和消除炎症反应的作用^[11]。因此,建议以后的研究应该注重于观察戒烟者更长时间炎症介质及肺组织病理变化,进一步将炎症介质及炎症细胞分类,探讨其发挥作用的机制。

参考文献:

- [1] Asia Pacific COPD Roundtable Group. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: an Asia-Pacific perspective[J]. *Respirology*, 2005, 10(1): 9-17.
- [2] Gamble E, Grootendorst DC, 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): 467-471.
- [3] Willemse BW, ten Hacken NH, Rutgers B, et al. Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers [J]. *Eur Respir J*, 2005, 26(5): 835-845.
- [4] Vernooy JH, Dentener MA, van Suylen RJ, et al. Long-term intratracheal lipopolysaccharide exposure in mice results in chronic lung inflammation and persistent pathology [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 26(1): 152-159.

(下转第 61 页)

值。本研究的熔解曲线图中没有出现杂峰,也未出现主峰的异常增宽,表明实验中未出现污染、引物二聚体和非特异性扩增,B7-1 和 MIP-1 α 基因重组慢病毒载体的滴度均达 $2.00E+8$ TU/mL。

B7-1 和 MIP-1 α 基因重组慢病毒载体的成功构建,为后续淋巴瘤基因治疗奠定了基础。

参考文献:

- [1] Sica GL, Choi IH, Zhu G, et al. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity [J]. *Immunity*, 2003, 18: 849 - 861.
- [2] Strieter RM, Belperio JA, Phillips RJ, et al. CXC chemokines in angiogenesis of cancer [J]. *Semin Cancer Biol* 2004, 14: 195 - 200.
- [3] Ben-Baruch A. The multifaceted roles of chemokines in malignancy [J]. *Cancer Metastasis Rev* 2006, 25: 357 - 371.
- [4] Tiscornia G, Singer O, Verma IM. Production and purification of lentiviral vectors [J]. *Nat Protoc* 2006, 1: 241 - 245.
- [5] Sena-Esteves M, Tebbets JC, Steffens S, et al. Optimized large-scale production of high titer lentivirus vector pseudotypes [J]. *J Virol Methods* 2004, 122: 131 - 139.
- [6] Reiser J. Production and concentration of pseudotyped HIV-1-based gene transfer vectors [J]. *Gene Ther* 2000, 7: 910 - 913.
- [7] Poeschla E, Corbeau P, Wongst F. Development of HIV vectors for Anti-HIV gene therapy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996,

93: 11395 - 11399.

- [8] Naldini L, Blomer U, Gage F H, et al. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 92: 11382 - 11388.
- [9] Yamada K, Olsen JC, Patel M, et al. Functional correction of fanconi anemia group haematopoietic cells by the use of novel lentiviral vector [J]. *Mol Ther* 2001, 3: 485 - 490.
- [10] 李国平,潘润阳,张志波,等. 人 caveolin21 基因慢病毒过表达载体构建及其对 SMMC7721 细胞凋亡的影响[J]. *福建医科大学学报* 2009, 43: 297 - 300.
- [11] 于莉娜,张庆玲,丁彦青,等. Tiam1 基因慢病毒表达载体构建及其 HT29 细胞中的表达[J]. *实用医学杂志*, 2010, 26: 2895 - 2898.
- [12] Davatelis G, Tekamp-Olson P, Wolpe SD, et al. Cloning and characterization of a cDNA for murine macrophage inflammatory protein (MIP), a novel monokine with inflammatory and chemokinetic properties [J]. *J Exp Med*, 1988, 167: 1939 - 1944.
- [13] Butler SL, Hansen MS, Buslunan FD. A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo [J]. *Nat Med* 2001, 7: 631 - 634.
- [14] Charrier S, Stockholm D, Seye K, et al. A lentiviral vector encoding the human Wiskott-Aldrich syndrome Protein corrects immune and cytoskeletal defects in WASP knock-out mice [J]. *Gene Ther* 2005, 12: 597 - 606.

(修回日期)2011-09-10

(上接第 53 页)

- [5] Rutgers SR, Poster DS, Hachen NH, et al. Ongoing airway inflammation in patients with COPD who do not currently smoke [J]. *Thorax*, 2000, 55 (1): 12 - 18.
- [6] Yao H, Edirisinghe I, Rajendrasozhan S, et al. Cigarette smoke-mediated inflammatory and oxidative responses are strain-dependent in mice [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 294(6): L1174 - 1186.
- [7] Culpitt SV, Rogers DF, Shah P, et al. Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(1): 24 - 31.
- [8] Noguera A, Batle S, Miralles C, et al. Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Thorax*,

2001, 56(6): 432 - 437.

- [9] Amrani Y, Lazaar AL, Panettieri RA Jr. Up-regulation of ICAM-1 by cytokines in human tracheal smooth muscle cells involves an NF- κ B-dependent signaling pathway that is only partially sensitive to dexamethasone [J]. *J Immunol*, 1999, 163 (4): 2128 - 2134.
- [10] Nishikawa M. Cigarette smoke-induced acute airway impairment [J]. *Nihon Koryu Gakkai Zasshi*, 2000, 38(5): 347 - 353.
- [11] Erjefält JS, Uller L, Malm-Erjefält M, et al. Rapid and efficient clearance of airway tissue granulocytes through transepithelial migration [J]. *Thorax*, 2004; 59(2): 136 - 143.

(修回日期)2011-10-27

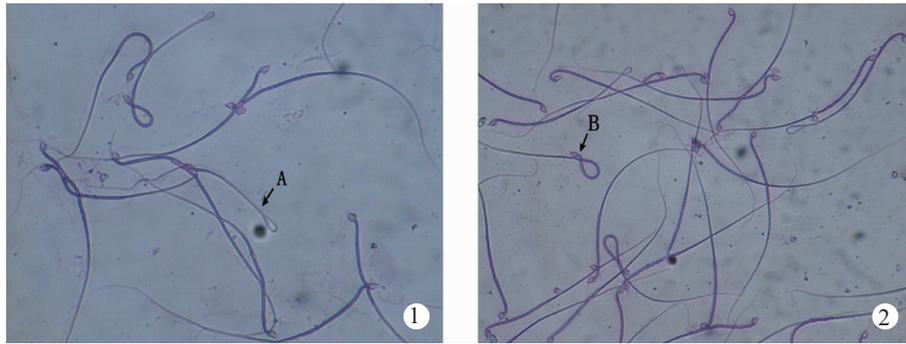


图 1 正常对照组小鼠精子涂片在普通显微镜下观察 图 2 低剂量组小鼠精子涂片在普通显微镜下观察

Fig.1 Normal control group: the sperms under the normal microscope Fig. 2 Low-dose group: sperms under normal microscope
注:A 示尾折叠类型的畸形精子;B 示钩变短类型的畸形精子 Note: Picture A shows tail folding; Picture B shows hook shortened

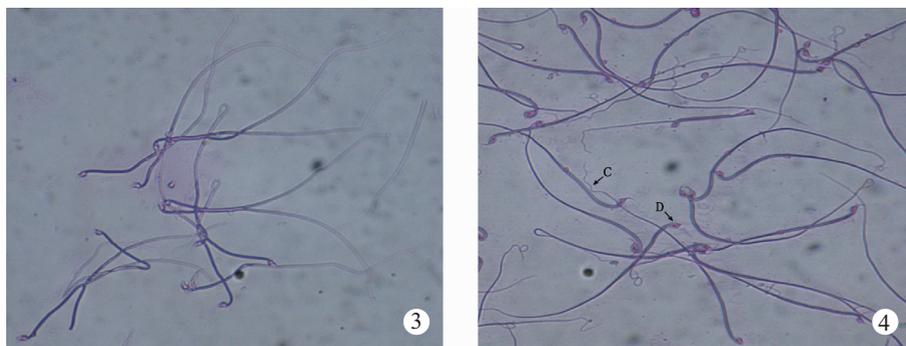


图 3 中剂量组小鼠精子涂片在普通显微镜下观察 图 4 高剂量组小鼠精子涂片在普通显微镜下观察

Fig. 3 Medium-dose group: sperms under normal microscope Fig. 4 High-dose group: sperms under normal microscope
注:C 示尾扭曲类型的畸形精子; D 示无钩类型的畸形精子 Note: Picture C shows distortion; Picture D shows no hook.

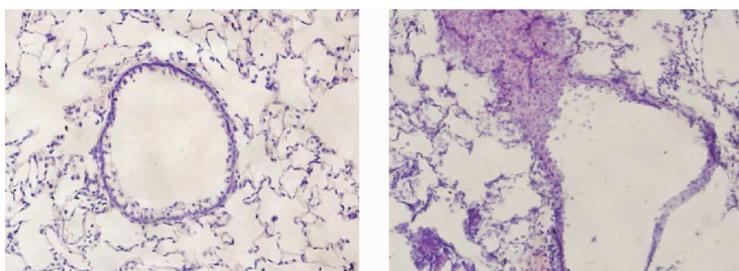


图 1 肺组织病理 HE(×200)

①正常对照组 ②早期戒烟组

Fig. 1 Lung pathology HE(×200)

①Control group ②Early quitting smoke groups

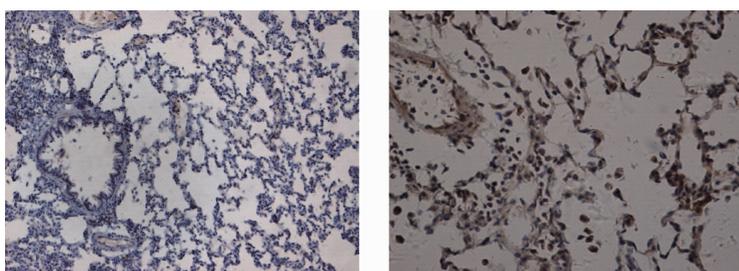


图 2 肺组织 NF-κB 表达 免疫组化(×200)

①正常对照组 ②早期戒烟组

Fig. 2 Expression of NF-κB in lung tissue(×200)

①Control group ②Early quitting smoke groups