

· 短篇论著 ·

吸入布地奈德对被动吸烟大鼠肺功能及肺组织 IL-32 表达的影响

邓星奇 张志锋 刘梅 顾薇 凌美蓉 丁念昌 程德山 周健 王继芹

【摘要】 目的 观察布地奈德雾化吸入对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠肺功能及肺组织 IL-32 表达的影响。方法 将雄性 Wistar 大鼠 36 只随机分为对照组、模型组、布地奈德治疗组,每组 12 只。对照组常规饲养,不做任何处理;模型组及布地奈德治疗组烟熏 3 个月建立吸烟致大鼠 COPD 模型。布地奈德治疗组建立 COPD 模型后雾化吸入布地奈德 4 ml/只(0.5 mg/ml) 治疗 15 d,1 次/d,模型组不予治疗。采用大鼠肺功能仪对每组大鼠进行肺功能检测,采用 HE 染色,光镜下观察肺组织病理变化,采用 Western blot 检测肺组织中 IL-32 的含量。结果 模型组与正常组比较 0.3 s 用力呼出气量占用力肺活量百分比(FEV_{0.3}/FVC)、动态顺应性(C_{dyn})降低,吸气阻力(R_i)、呼气阻力(R_e)升高;布地奈德治疗组较模型组 FEV_{0.3}/FVC、C_{dyn}、R_i 和 R_e 均明显改善($P < 0.01$)。模型组 IL-32 表达水平(0.86 ± 0.13)较对照组(0.14 ± 0.02)显著增高($P < 0.01$),布地奈德治疗组 IL-32 水平(0.56 ± 0.24)较对照组显著增高($P < 0.01$),较模型组显著降低($P < 0.01$)。结论 IL-32 在 COPD 大鼠肺组织中显著升高,参与了慢性气道炎症,布地奈德吸入可使 COPD 大鼠肺组织中 IL-32 的表达减少,抑制炎症反应,改善 COPD 肺功能。

【关键词】 肺疾病,慢性阻塞性; 布地奈德; 呼吸功能试验; 白细胞介素 32

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是慢性气道炎症性疾病,多种炎性细胞及其释放的多种细胞因子参与了其炎症反应过程^[1]。IL-32 是新近发现的一种促炎性细胞因子。IL-32 广泛参与机体自身免疫反应或获得性免疫反应,有可能在 COPD 的炎症反应形成中具有重要的作用^[2,4]。本研究着重观察被动吸烟大鼠肺组织 IL-32 的表达水平及雾化吸入布地奈德对 COPD 大鼠肺功能及 IL-32 表达的影响,探讨 COPD 发生发展的炎性机制及吸入糖皮质激素在 COPD 中的治疗作用及可能机制。

一、材料与方

1. 实验动物:4 周龄雄性 Wistar 大鼠 36 只,体重 120 ~ 130 g(由上海交通大学医学部实验动物中心提供),按清洁级动物条件分笼饲养,饲喂经消毒处理的食物及饮用水,适应性饲养 1 周。随机分为正常对照组、模型组、布地奈德治疗组,每组 12 只。

2. 方法:(1)仪器及试剂:AniRes2003 动物肺功能分析系统为北京贝兰博科技有限公司产品,兔抗小鼠 IL-32 多克隆抗体购于 Novus 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(羊抗兔)购于武汉博士德生物工程有限公司。布地奈德由阿斯利康提供,多功能真彩色病理图像分析系统为 Nikonmicrophot-FXA 产品。(2)模型的制备:模型制备参照文献^[5]方法。模型组及布地奈德治疗组大鼠同时置于自制熏烟箱,每天早晚分别给予持续吸入新鲜的香烟雾 4 h,每次 15 支香烟,熏烟 3 个月后模型制备成功。模型制备后布地奈德治疗组大鼠给予雾化吸入布地奈德 4 ml/只(0.5 mg/ml),1 次/d,共 15 d;模型组不予治疗。

3. 肺功能检测:实验结束后处死大鼠前禁食水 12 h,以 10% 乌拉坦 14 ml/kg 麻醉大鼠后,气管插管,放入体描仪,采用 AniRes2003 动物肺功能分析系统测定 0.3 s 用力呼气容积占用力肺活量百分比(FEV_{0.3}/FVC%)、吸气阻力(R_i)、呼气阻力(R_e)、动态肺顺应性(C_{dyn})。

4. 标本的采集及观察:肺功能测定结束后开胸取大鼠肺膈叶,用 10% 甲醛灌注固定,常规石蜡包埋制片,HE 染色,光镜观察。应用多功能真彩色病理图像分析系统分别测量平均肺泡数(MAN)、肺平均内衬间隔(Lm)、支气管壁厚/外径。MAN:计数每个视野内的肺泡数,除此视野的面积即为 MAN,其数值反映肺泡密度,每例标本测 10 个视野,求平均值;Lm:在显示器视野中央划“十”字交叉线,计数通过该交叉线的肺泡隔数,除以十字线的总长度即为 Lm,其数值反映肺泡平均直径,每例标本测 8 个视野,求平均值;支气管壁厚/外径:测量周径 < 1000 μm 的小支气管横截面的壁厚/外径比值,每例标本测 8 个小支气管,求平均值。

5. Western blot 检测肺组织 IL-32 的表达:120 mg 组织在 1 ml RIPA 裂解液[包含 10 μl 蛋白酶抑制剂混合液,10 μl 苯甲磺酰氟(PMSF)和 10 μl 磷酸酶混合液]中研磨、裂解。14 000 r/min,离心机半径 8 cm,离心 15 min,取上清液,加入 2 倍体积的 3 × SDS 上样缓冲液,煮沸 5 min,然后于 10% 的 SDS-PAGE 中恒压 90 V 电泳 2 h,电泳完毕将蛋白转移至 PVDF 膜上,采用

5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗(1:300)孵育 2 h, HRP 标记二抗(羊抗兔, 1:10 000)孵育 1 h, TBST 清洗 3 次, 用显色剂 ECL-plus 染色 10 min, 然后在 TYPHOON 扫描仪中成像, 采用 Imagequant TL 软件分析光密度值。以 GAPDH 为内参。

6. 统计学处理: 采用 SPSS 13.0 统计软件, 数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。各组间差异比较用方差分析及 *q* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 各组大鼠肺功能的变化: 与对照组比较, 模型组 FEV0.3/FVC%、Cdyn 明显下降, Ri、Re 明显升高 (*P* < 0.01)。布地奈德治疗组 FEV0.3/FVC%、Cdyn 及 Re、Ri 明显改善, 与模型组比较有显著差异 (*P* < 0.01), 但与对照组比较 FEV0.3/FVC%、Cdyn 明显降低, Ri、Re 明显增高 (*P* < 0.01)。见表 1。

2. 各组大鼠肺组织形态学测量结果: 模型组较对照组 Lm 显著增加 (*P* < 0.05), MAN 显著降低 (*P* < 0.05), 小支气管壁厚/外径比值显著增加 (*P* < 0.05)。布地奈德组 Lm 减小, 但与对照组比较仍有显著差异 (*P* < 0.05), MAN 及小支气管壁厚/外径比与模型组比较无显著差异。见表 2。

3. 各组大鼠肺组织 IL-32 的表达水平: 模型组 IL-32 表达水平 (0.86 ± 0.13) 较对照组 (0.14 ± 0.02) 显著增高 (*P* < 0.01), 布地奈德治疗组 IL-32 水平 (0.56 ± 0.24) 较对照组 (0.14 ± 0.02) 显著增高 (*P* < 0.01), 较模型组 (0.86 ± 0.13) 显著降低 (*P* < 0.01)。见图 1。

表 1 不同实验组大鼠肺功能的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	FEV0.3/FVC%	Ri (cm H ₂ O · s ⁻¹ · ml ⁻¹)	Re (cm H ₂ O · s ⁻¹ · ml ⁻¹)	Cdyn (ml/cm H ₂ O)
对照组	12	76.25 ± 6.52	1.24 ± 0.21	1.70 ± 0.23	0.22 ± 0.10
模型组	12	56.21 ± 10.63 ^a	1.73 ± 0.75 ^a	2.78 ± 0.53 ^a	0.15 ± 0.04 ^a
布地奈德组	12	70.52 ± 6.81 ^{ab}	2.40 ± 0.43 ^{ab}	3.63 ± 0.42 ^{ab}	0.18 ± 0.06 ^{ab}

注: 与对照组比较, ^a*P* < 0.01; 与模型组比较, ^b*P* < 0.01

表 2 肺组织形态学测量结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	Lm (μm)	MAN (个/μm ²)	小支气管壁厚/外径
对照组	12	22.46 ± 4.65	20.08 ± 2.37	0.12 ± 0.06
模型组	12	40.46 ± 5.62 ^a	12.38 ± 2.82 ^a	0.18 ± 0.06 ^a
布地奈德组	12	38.79 ± 5.29 ^a	17.25 ± 2.70 ^a	0.16 ± 0.06 ^a

注: 与对照组比较, ^a*P* < 0.05

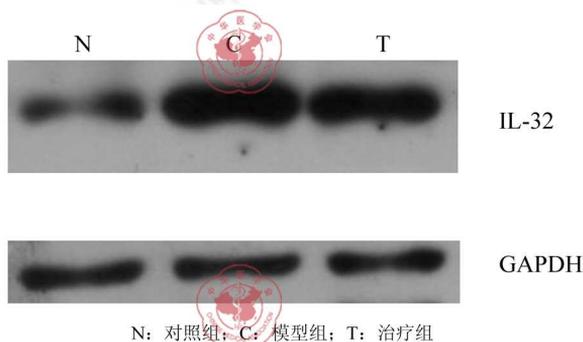


图 1 Western blot 检测各组大鼠肺组织 IL-32 的表达

三、讨论

IL-32 是 Kim 等^[2]在 2005 年新发现的一种促炎性细胞因子。在类风湿性关节炎患者的滑膜腔及克罗恩病的炎性肠壁上均检测到明显升高的 IL-32 细胞因子。目前被广泛接受的观点认为: IL-32 广泛参与机体自身免疫反应或获得性免疫反应, 在炎症反应形成中具有重要的作用^[4]。进一步的研究表明 IL-32 主要由 T 细胞、NK 细胞、上皮细胞和单核细胞产生, 通过细胞内和细胞外两条途径发挥作用。IL-32 通过激活 NF-κB 和 P38MAPK 途径产生诸如 TNF-α、IL-1β、IL-6 等细胞因子, 从而在炎症反应放大效应中起重要作用^[2]。Calabrese 等^[6]通过对罹患肺癌的 COPD 患者肺组织标本的检测发现 IL-32 表达明显高于非 COPD 患者, 考虑 IL-32 参与了 COPD 患者炎症发生机制。我们的实验在 COPD 的动物模型中进一步证实 IL-32 在 COPD 大鼠肺组织表达明显升高, 且与气流阻塞严重程度成正相关。表明 IL-32 参与了 COPD 气道炎症的过程。

COPD 是一种以气流受限为特征的疾病状态, 这种气流受限通常呈进行性发展, 不完全可逆, 多与肺部对有害颗粒物或有害气体的异常炎症反应有关。我们的实验由动物被动吸烟, 刺激肺部发生异常炎症反应, 导致气流受限, 肺泡腔增大, 符合慢

性阻塞性肺疾病特征。目前研究表明,参与 COPD 慢性气道炎症的细胞主要有肺泡巨噬细胞、T 淋巴细胞(尤其 CD8⁺T 细胞)和中性粒细胞。激活的炎症细胞释放多种介质,包括白三烯 B4 (LTB4)、TNF- α 、IL-8、IL-6 和其他介质,这些介质能够破坏肺的结构和促进中性粒细胞炎症反应。炎症促进 COPD 患者肺组织结构重塑,进而导致不完全可逆气流受限^[7-8]。IL-32 通过激活 NF- κ B 和 P38MAPK 等多种途径产生诸如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等细胞因子,与慢性气道炎症中升高的细胞因子类似,我们推测 IL-32 参与了 COPD 慢性气道炎症的发动和维持,是慢性气道炎症的前炎症因子。

目前吸入性糖皮质激素越来越多地用于治疗 COPD,其优点主要有:脂溶性高,容易穿透细胞膜,局部应用后肺组织浓度高,局部抗炎活性强,我们选择的布地奈德混悬液属于第二代肾上腺皮质激素,有较高的糖皮质激素受体结合力,适宜于雾化吸入治疗^[8-10]。我们的研究结果显示:吸入布地奈德治疗组大鼠,肺组织 IL-32 水平明显低于模型组,治疗组 FEV0.3/FVC%、Cdyn 及 Re、Ri 较模型组明显改善,提示吸入布地奈德能有效地消除气道炎症,缓解支气管痉挛,改善肺功能。我们推测吸入布地奈德可能通过抑制 IL-32 的生成,从炎症反应的上游即阻断炎症扩大效应,从而达到治疗效果。

参 考 文 献

- [1] Lopez AD, Shibuya K, Rao C. Chronic obstructive pulmonary disease; current burden and future projections. *Eur Respir J*, 2006, 27:397-412.
- [2] Kim SH, Han SY, Azam TA, et al. Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNF-alpha. *Immunity*, 2005, 22:131-142.
- [3] Joosten LA, Netea MG, Kim SH. IL-32, a proinflammatory cytokine in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103:3298-3303.
- [4] Shioya M, Nishida A, Yagi Y. Epithelial overexpression of interleukin-32 alpha in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*, 2007, 149:480-486.
- [5] Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295: L1-15.
- [6] Calabrese F, Baraldo S, Bazzan E, et al. IL-32, a novel proinflammatory cytokine in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 178:894-901.
- [7] 许梅,张湘燕,叶贤伟,等.慢性阻塞性肺病患者血清内皮素和肾上腺髓质素水平的相关研究[J/CD].中华临床医师杂志:电子版,2008,2:39-41.
- [8] 黄惠娟,钟小宁,欧莉梅,等.小剂量红霉素对稳定期慢性阻塞性肺病患者 Th1/Tc1 介导气道炎症和运动耐力的影响[J/CD].中华临床医师杂志:电子版,2010,4:1893-1900.
- [9] Nold F, Nold-Petry CA, Pott GB, et al. Endogenous IL-32 controls cytokine and HIV-1 production. *Immunol*, 2008, 181:557-565.
- [10] 陈云辉,王小平,罗巍,等.舒利迭吸入治疗慢性阻塞性肺疾病的疗效观察.中国实用医药,2007,2:12-13.

(收稿日期:2011-05-19)

(本文编辑:戚红丹)

邓星奇,张志锋,刘梅,等.吸入布地奈德对被动吸烟大鼠肺功能及肺组织 IL-32 表达的影响[J/CD].中华临床医师杂志:电子版,2011,5(17):5097-5099.