

· 实验研究 ·

阿奇霉素对香烟烟雾致肺泡Ⅱ型上皮细胞损伤的保护作用及其机制研究

张晓荣¹, 多力坤², 徐佩茹², 卢晓梅², 张亚楼², 刘辉²

(1. 暨南大学第三附属医院儿科, 广东 珠海 519000; 2. 新疆医科大学第一临床学院儿科, 新疆 乌鲁木齐 830002)

[摘要] 目的 香烟烟雾提取物(CSE)可导致肺泡Ⅱ型上皮细胞损伤、核因子- κ B(NF- κ B)活化和肿瘤坏死因子(TNF- α)分泌增加,阿奇霉素对CSE诱导肺泡Ⅱ型上皮细胞(A549)中的这些损伤是否有保护作用目前尚不清楚,该实验对此进行研究并探讨其作用机制。方法 体外培养A549,分为空白对照组、阿奇霉素阴性对照组、CSE组和CSE+阿奇霉素组,在8h后使用倒置显微镜、免疫组化染色(SP)和酶联免疫法(ELISA)观察检测上述条件下A549细胞的形态、NF- κ B活化和分泌TNF- α 水平的变化。结果 CSE可导致细胞形态和结构的改变,同时诱导产生染色呈深棕黄色颗粒的强阳性NF- κ B细胞,其TNF- α 分泌水平达 0.307 ± 0.036 pg/mL,而CSE+阿奇霉素组细胞形态和结构有所恢复,NF- κ B染色亦相对变浅,TNF- α 水平较CSE组减少,为 0.269 ± 0.009 pg/mL,空白对照组、阿奇霉素阴性对照组无上述形态学变化,NF- κ B染色为蓝紫色,TNF- α 水平分别为 0.234 ± 0.028 pg/mL和 0.259 ± 0.014 pg/mL。结论 阿奇霉素可部分抑制CSE刺激的细胞NF- κ B活化,减少TNF- α 的分泌,减轻CSE对肺泡Ⅱ型上皮细胞的毒性作用。 [中国当代儿科杂志,2007,9(1):63-66]

[关键词] 阿奇霉素;香烟烟雾提取物;核因子- κ B;肿瘤坏死因子;肺泡Ⅱ型上皮细胞

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)01-0063-04

Protection of azithromycin against pulmonary II epithelial cell injuries induced by cigarette smoke extract and relevant mechanisms

ZHANG Xiao-Rong, DUO Li-Kun, XU Pei-Ru, LU Xiao-Mei, ZHANG Ya-Lou, LIU Hui. Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital, Jinan University, Zhuhai, Guangdong 519000, China (Email: hair-cut@sohu.com)

Abstract: Objective Cigarette smoke extract (CSE) can induce injuries of pulmonary II epithelial cells, activate nuclear factor- κ B and increase tumor necrosis factor- α (TNF- α) secretion. This study aimed to investigate whether azithromycin can protect pulmonary II epithelial cells from injuries induced by CSE and relevant mechanisms. **Methods** Pulmonary II epithelial cells (A549 cells) were cultured *in vitro*. After 48 hrs of culture the cells were randomly treated with serum-free DMEM only (blank control group), azithromycin + serum-free DMEM, CSE + serum-free DMEM or CSE + azithromycin. Eight hours later the morphology of A549 cells, the activity of NF- κ B and the levels of TNF- α were measured by inverted microscope, immunohistochemistry and ELISA. **Results** The morphology and structure of A549 cells were changed, NF- κ B activity increased (dark brown staining) and TNF- α levels (0.307 ± 0.036 pg/mL vs 0.234 ± 0.028 pg/mL) increased in the CSE + serum-free DMEM group compared with the blank control group ($P < 0.01$). CSE together with azithromycin treatment recovered partly the morphological injuries of A549 cells. It also attenuated NF- κ B staining and decreased TNF- α levels from 0.307 ± 0.036 pg/mL (CSE + serum-free DMEM group) to 0.269 ± 0.009 pg/mL ($P < 0.05$). **Conclusions** Azithromycin may inhibit NF- κ B activity, decrease TNF- α secretion and thus lessen cytotoxicity of CSE to A549 cells. [Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(1):63-66]

Key words: Azithromycin; Cigarette smoke extract; Nuclear factor- κ B; Tumor necrosis factor- α ; Pulmonary II epithelial cell

香烟烟雾是与许多呼吸道疾病有关的危险因素之一,其中高水平的氧化物对下呼吸道的损伤最为明显。核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是调解炎症反应的重要转录因子,与炎症疾病密切相关,香

烟烟雾提取物(cigarette smoke extract, CSE)可诱导肺泡Ⅱ型上皮细胞NF- κ B活化和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平增高^[1]。临床应用小剂量大环内酯类抗生素在弥漫性细支气管

[收稿日期]2006-07-30;[修回日期]2006-09-11

[作者简介]张晓荣,女,硕士,主治医师。主攻方向:呼吸系统疾病。

(DPB)、支气管哮喘等慢性肺部炎性疾病中的疗效良好^[2,3]。阿奇霉素因化学性质稳定,抗菌谱广,在细胞及组织中浓度高,临床应用较广泛,但其对CSE所致的肺泡Ⅱ型上皮细胞损伤的作用及机制的研究尚未见报道,本实验以此为目的进行研究,探讨其作用机制。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 肺泡细胞株 肺泡Ⅱ型上皮细胞 A549 由中国科学院上海细胞生物研究所细胞库提供。

1.1.2 试剂与器材 核因子- κ B 的兔抗人 p65 多克隆抗体;类胎牛血清(杭州四季青生物材料研究所);DMEM 培养基(美国 GIBCO 公司);TNF- α 检测试剂盒(Biosource 公司,上海森雄科技实业有限公司分装);红河香烟(云南红河卷烟厂);注射用阿奇霉素(沈阳第一制药厂)。

1.2 方法

1.2.1 香烟烟雾提取物的制备 参照 Su 等^[4]方法,一只去过滤嘴燃烧的香烟烟雾利用如图 1 所示的装置吸入 25 mL 无血清的 DMEM 培养液中制成悬液,密封瓶,轻轻摇动使其充分溶解,调节 pH 至 7.3,过滤除菌后,于 1 h 内用于实验。

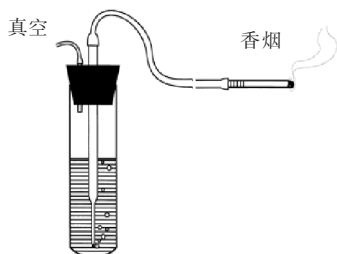


图1 CSE 制备示意图

1.2.2 细胞培养及分组 复苏冻存的 A549 细胞。细胞培养液为含有 10% 加热灭活胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μ L/mL 链霉素的 DMEM。在 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO_2 的细胞培养箱内培养,取对数生长期用于实验。调整细胞密度为 $4 \sim 5 \times 10^5$ /mL,分装在 10 cm^2 的培养瓶中。孵温箱中贴壁生长 48 h,用无血清的 DMEM 冲洗两次去除未粘附细胞。分别加入:①空白对照组:单纯无血清的 DMEM 培养液;②阿奇霉素阴性对照组:注射用阿奇霉素加入无血清 DEME,使其终浓度为 0.1 mg/mL;③CSE 组:将制备的 CSE 作为原液加入无血清的 DMEM 培养液,使其终浓度为 10% CSE;④CSE + 阿奇霉素组:

0.1 mg/mL 阿奇霉素预处理 2 h 后加入终浓度 10% CSE。于 8 h 后收集细胞做涂片,以丙酮固定。细胞上清液 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 免疫组织化学染色 采用 SP 法。抗 NF- κ B 的 p65 多克隆抗体,其稀释度为 1:80,用抗体稀释法代替一抗作为阴性对照。以联苯二胺(DAB)显色,封片。细胞染色呈棕黄色为阳性。

1.2.4 培养上清液 TNF- α 含量的测定 应用 ELISA 法按照试剂盒说明进行检测。

1.2.5 统计分析 全部数据经 SPSS10.0 软件包对检测结果进行统计分析,试验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 香烟烟雾刺激物对 A549 细胞形态的影响

倒置显微镜下观察:空白对照组及阿奇霉素阴性对照组细胞形态呈椭圆形或梭形(见图 2A,B),细胞轮廓清楚,细胞间结构紧密;CSE 组细胞边缘不规则,胞体和胞核结构不清,有伪足伸出,胞浆内有颗粒状物质,细胞间接触变松(见图 2C);CSE + 阿奇霉素组细胞轮廓较 CSE 组明显清楚(见图 2D)。

2.2 细胞 NF- κ B 免疫组化染色

免疫组织化学染色结果显示:空白对照组和阿奇霉素阴性对照组呈蓝紫色(图 3A,B);CSE 组胞浆、胞核均可见深棕黄色颗粒的 NF- κ B 强阳性细胞,以胞核中较多(图 3C);CSE + 阿奇霉素组细胞核和胞浆染色均相对较浅(图 3D)。

2.3 各组细胞培养上清液 TNF- α 含量的比较

见表 1。

表1 各组细胞培养上清液 TNF- α 含量

(pg/mL)	
组别	TNF- α
空白对照组	0.234 $\pm$ 0.028
阿奇霉素阴性对照组	0.259 $\pm$ 0.014 ^b
CSE 组	0.307 $\pm$ 0.036 ^a
CSE + 阿奇霉素组	0.269 $\pm$ 0.009 ^b
<i>F</i>	6.183
<i>P</i>	<0.05

a 与空白对照组比较, $P < 0.01$; b 与 CSE 组比较 $P < 0.05$

3 讨论

香烟烟雾与许多呼吸道疾病有关,如支气管哮喘、肺纤维化、慢性阻塞性肺气肿等。而肺泡Ⅱ型上皮细胞在体外试验中,代表着防御有毒物质的首要

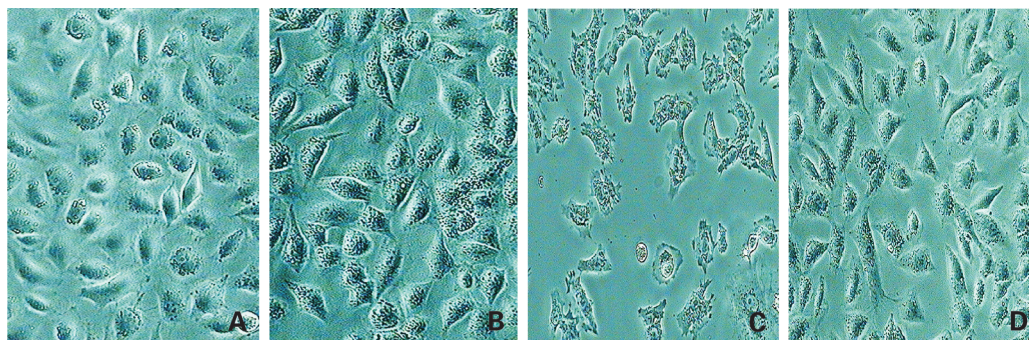


图2 香烟烟雾刺激物对 A549 细胞形态的影响 (×400) A:空白对照组,细胞形态、结构清晰,细胞间结构紧密;
B:阿奇霉素阴性对照组,细胞形态、结构清晰,细胞间结构紧密;C:CSE 组,细胞形态不规则、结构不清晰,胞浆内有颗粒状物质,
细胞间松散;D:CSE + 阿奇霉素组细胞形态较 CSE 组较规则、结构略清晰,胞浆内有一定量颗粒状物质,细胞间略松散。

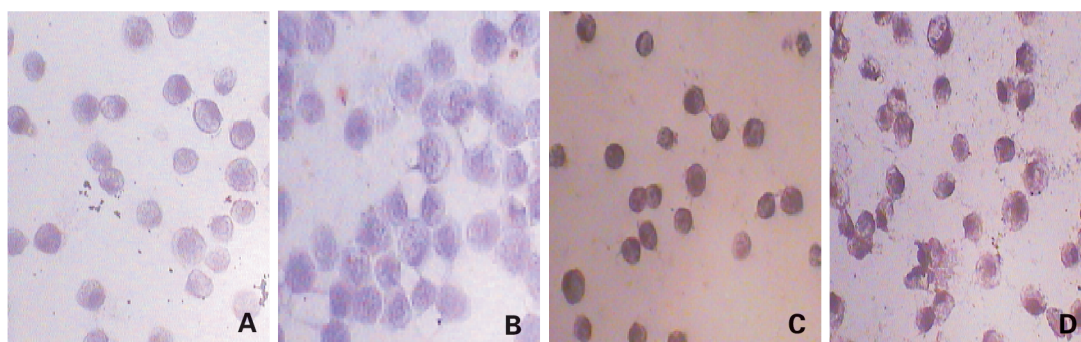


图3 细胞 NF-κB 免疫组化染色 (×400) A:空白对照组,细胞染色呈蓝紫色;B:阿奇霉素阴性对照组,细胞也呈
蓝紫色;C:CSE 组,细胞浆及胞核染色也可见到棕黄色颗粒;D:CSE + 阿奇霉素组,细胞浆及胞核内棕黄色颗粒较 CSE 组较浅。

屏障作用,其可分泌细胞因子和生长因子调节炎症和细胞生长,在控制炎症中起重要作用。本实验发现 CSE 在 8 h 即可引起 A549 细胞形态的明显变化,表现为细胞结构不清,细胞连结疏松,而阿奇霉素干预后细胞结构有所改善。进一步试验发现:CSE 组 NF-κB 免疫组化染色呈明显的深棕黄色强阳性,胞核胞浆均显著,而 CSE + 阿奇霉素处理组染色相对较浅,尤以胞浆为明显。Ichiyama 和 Desaki^[5,6] 的实验支持大环内酯类抗生素克拉霉素和乙琥红霉素对气道上皮细胞的抗炎性机制是通过 NF-κB 的活化产生的,且较小的剂量即可以显示治疗效应。

肿瘤坏死因子作为一种具有多重局部和系统生物活性的细胞因子,与呼吸系统疾病的发生、发展和病理生理改变有着密切的关系。TNF-α 表达受 NF-κB 调节,而 NF-κB 调控产生的 TNF-α,又可形成级联放大反应,进一步加重炎症反应。本试验证实香烟烟雾刺激后 A549 分泌 TNF-α 较空白对照组明显增加,与细胞 NF-κB 染色强阳性结果相一致。

近年研究发现^[3,7],大环类抗生素除抗菌作用外,还具有抗炎作用。这些效应包括减轻肺部炎性

应答、黏液调节及气道的高反应性,增加黏膜纤毛清除率和改善肺功能等。薛玉文等^[8]对 26 名发作性过敏性哮喘患者的巨噬细胞体外培养发现,红霉素可通过抑制哮喘患者巨噬细胞分泌 TNF-α、IL-8 起抗炎作用,且其抗炎作用与地塞米松的作用既交叉又互补。其他实验证实红霉素可调节中性粒细胞的趋化、淋巴细胞的增殖和单核细胞的分化,同时还能抑制人单核细胞 TNF-α 释放^[9]。

阿奇霉素是新一代的大环内酯类抗生素,其结构与红霉素相似,在内酯环的 9a 位引入 1 个甲胺基,而使其化学性质更为稳定,抗菌谱更广,组织中浓度高出血药浓度达 50 倍,半衰期可达 68 h,临床应用 3 d 结束后至第 10 天,靶组织细胞中的阿奇霉素水平仍可达治疗水平^[10]。本实验发现:CSE 刺激后 A549 分泌 TNF-α 较空白对照组明显增高,统计学差异有显著性,而阿奇霉素干预后,TNF-α 水平虽较空白对照组高,但低于 CSE 组,具有统计学意义。提示阿奇霉素可部分抑制 CSE 刺激的 NF-κB 活化,减少 TNF-α 的分泌,从而阻断 TNF-α 对 NF-κB 的进一步激活。

综上所述,香烟烟雾可导致肺泡Ⅱ型上皮细胞的形态结构变化,促使NF- κ B的活化和TNF- α 分泌增多,而阿奇霉素可减轻上述反应。本研究认为阿奇霉素减轻肺部炎症的可能机制是抑制NF- κ B活性,从而阻断NF- κ B与TNF- α 形成的恶性循环,使肺组织炎症程度进一步减轻。从抑制炎症介质失控性释放的角度出发,推断阿奇霉素可以成为治疗慢性支气管炎、哮喘等肺部疾病的一种手段。

[参 考 文 献]

- [1] 徐佩茹,张晓荣,多力坤,张亚楼,卢晓梅,刘辉. 香烟烟雾提取物对肺泡Ⅱ型上皮细胞核因子- κ B及肿瘤坏死因子的影响[J]. 临床儿科杂志,2005,23(11):810-812.
- [2] Rubin BK, Henke MO. Immunomodulatory activity and effectiveness of macrolides in chronic airway disease[J]. Chest, 2004, 125(2 Suppl): 70s-78s.
- [3] Gotfried MH. Macrolides for the treatment of chronic sinusitis, asthma, and COPD[J]. Chest, 2004, 125(2 Suppl): 52s-60s.
- [4] Su Y, Han W, Giraldo C, De Li Y, Block ER. Effect of cigarette

smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998, 19(5): 819-825.

- [5] Ichiyama T, Nishikawa M, Yoshitomi T, Hasegawa S, Matsubara T, Hayashi T, et al. Clarithromycin inhibits NF-kappa B activation in human peripheral blood mononuclear cells and pulmonary epithelial cells[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(1): 44-47.
- [6] Desaki M, Okazaki H, Sunazuka T, Omura S, Yamamoto K, Takizawa H. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of erythromycin in human bronchial epithelial cells: possible role in the signaling pathway that regulates nuclear factor-kappaB activation[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(5): 1581-1585.
- [7] Hatipoglu U, Rubinstein I. Low-dose, long-term macrolide therapy in asthma: An overview[J]. Clin Mol Allergy, 2004, 2(1): 4.
- [8] 薛玉文,王玲,李玉. 红霉素对哮喘患者肺泡巨噬细胞介质释放功能的影响[J]. 天津医药, 1999, 27(2): 70-71.
- [9] Zalewska-Kazubska J, Gorska D. Anti-inflammatory capabilities of macrolides[J]. Pharmacol Res, 2001, 44(6): 451-454.
- [10] 周基华,彭霄霞. 大环内酯类抗生素的研究进展及应用[J]. 儿科学杂志, 2004, 10(1): 8-11.

(本文编辑:吉耕中)

· 消息 ·

欢迎订阅《中国当代儿科杂志》

《中国当代儿科杂志》是由中华人民共和国教育部主管,中南大学主办的国家级儿科专业学术期刊。本刊为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)和国际权威检索机构美国MEDLINE、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、美国《化学文摘》(CA)和荷兰《医学文摘》(EM)收录期刊,是《中国医学文摘·儿科学》引用的核心期刊,同时被中国学术期刊(光盘版)、中国科学院文献情报中心、中国社会科学院文献信息中心评定为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊,并被《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》和《万方数据——数字化网络期刊》全文收录。已被复旦大学、浙江大学、中南大学和中国医科大学等国内著名大学认定为儿科核心期刊。

本刊内容以儿科临床与基础研究并重,反映我国当代儿科领域的最新进展与最新动态。辟有英文论著、中文论著(临床研究、实验研究、儿童保健、疑难病研究)、临床经验、病例讨论、病例报告、社区医师园地、专家讲座、综述等栏目。读者对象主要为从事儿科及相关学科的临床、教学和科研工作者。

本刊为双月刊,大16开本,80页,亚光铜版纸印刷,逢双月15日出版,向国内外公开发行人。中国标准刊号:ISSN 1008-8830, CN 43-1301/R。欢迎全国各高等医学院校,各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位,各级图书馆(室)、科技情报研究所及广大医务人员和医学科技人员订阅。每期定价12元,全年72元。邮发代号:42-188。可通过全国各地邮局订阅或直接来函与本刊编辑部联系订阅。本刊从2006年10月1日起,开启了网上稿件远程处理系统,作者请在线投稿,请登录本刊网站了解详情。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路87号《中国当代儿科杂志》编辑部 邮编:410008

电话:0731-4327402 传真:0731-4327922 Email: ddek@vip.163.com 网址: <http://www.cjcp.org>