实验研究
Experiment

烟草烟雾暴露对哮喘小鼠气道炎症的影响

王洪武[1]，邓超[1]，蔡兴俊[2]

1. 中南大学湘雅医学院附属海口医院重症医学科，海南 海口 570208
2. 海南省人民医院呼吸与危重症医学科，海南 海口 570311

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.19113

基金项目
海南省重点研发计划项目（ZDYF2018150）；海南省卫计委科研课题（18A200136）

作者简介
王洪武（1973—），男，本科，副主任医师；E-mail：wanghongwu2535@163.com

通信作者
蔡兴俊，E-mail：hkcxj1974@163.com

伦理审批 已获取
利益冲突 无申报
收稿日期 2019-03-04
录用日期 2019-05-14

文章编号 2095-9982(2019)08-0773-04
中图分类号 R
文献标志码 A

▸引用
王洪武，邓超，蔡兴俊. 烟草烟雾暴露对哮喘小鼠气道炎症的影响 [J]. 环境与职业医学，2019，36（8）：773-776.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19113

Funding
This study was funded.

Correspondence to
CAI Xing-jun, E-mail: hkcxj1974@163.com

Ethics approval Obtained
Competing interests None declared
Received 2019-03-04
Accepted 2019-05-14

▸To cite
WANG Hong-wu, DENG Chao, CAI Xing-jun. Effects of tobacco smoke exposure on airway inflammation in asthmatic mice[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(8): 773-776.

▸Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19113

摘要：

[背景] 吸烟或曾经吸烟患者哮喘发病及严重程度与未吸烟哮喘患者明显不同，表现为激素依赖或激素抵抗，烟草烟雾暴露是导致难治性哮喘的重要原因。

[目的] 探讨烟草烟雾暴露后支气管哮喘模型小鼠气道炎性细胞及相关细胞因子的变化。

[方法] 将40只小鼠随机分为4组，包括正常对照组、哮喘组、烟草烟雾暴露组、烟草烟雾暴露+哮喘组，每组各10只。哮喘组小鼠第0、14天腹腔注射0.2 mL致敏液（含OVA 100 μg、氢氧化铝凝胶400 μg），第24天用1%OVA溶液10 mL雾化激发，每天30 min，连续28 d。正常对照组及烟草烟雾暴露组小鼠以等量生理盐水替代致敏液及雾化液，烟草烟雾暴露组小鼠在每次雾化吸入后30 min被动烟草烟雾静式吸入暴露1次，每次10支，持续1 h。烟草烟雾暴露+哮喘组小鼠按哮喘组方法致敏和雾化激发，并按烟草烟雾暴露组处理方法吸入烟草烟雾。28 d后采集支气管肺泡灌洗液（BALF），用ELISA方法检测白介素（IL）-1、IL-6、IL-8、IL-17A、IL-17F浓度；测定BALF中白细胞（WBC）、嗜酸性粒细胞（EOS）及中性粒细胞（NEU）计数。

[结果] 哮喘组、烟草烟雾暴露+哮喘组BALF中WBC、EOS、NEU均高于正常对照组、烟草烟雾暴露组，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。烟草烟雾暴露+哮喘组BALF中WBC、NEU计数［分别为（20.65±1.90）×10^4/L、（16.33±1.54）×10^4/L］高于哮喘组［（16.12±1.53）×10^4/L、（3.57±0.75）×10^4/L］，EOS计数［（4.68±0.88）×10^4/L］低于哮喘组［（12.54±1.12）×10^4/L］，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。烟草烟雾暴露+哮喘组BALF中IL-1、IL-6、IL-8、IL-17A和IL-17F水平［分别为（28.93±5.91）、（70.46±7.18）、（188.64±10.43）、（146.77±9.07）、（90.87±7.52）ng/L］均高于哮喘组［（22.69±3.35）、（53.57±6.42）、（126.17±8.95）、（104.35±6.92）、（73.71±4.66）ng/L］及烟草烟雾暴露组［（11.37±2.32）、（23.38±4.75）、（88.13±7.12）、（76.12±6.88）、（43.90±4.18）ng/L］，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。

[结论] 烟草烟雾暴露加重哮喘气道炎症，炎性细胞以中性粒细胞浸润为主，气道炎症相关细胞因子释放增加。

关键词：支气管哮喘；烟草烟雾；炎性细胞；细胞因子

Effects of tobacco smoke exposure on airway inflammation in asthmatic mice

WANG Hong-wu[1], DENG Chao[1], CAI Xing-jun[2] (1.*Department of Critical Care Medicine, Haikou Hospital, Xiangya Medical College, Central South University, Haikou, Hainan* 570208, *China;* 2.*Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Hainan General Hospital, Haikou, Hainan* 570311, *China*)

Abstract:

[Background] The incidence and severity of asthma in smokers or former smokers are significantly different from those in non-smokers, usually hormonal dependence or hormonal resistance. Tobacco smoke exposure is an important cause of refractory asthma.

[Objective] This experiment is designed to investigate the changes of airway inflammatory cells and related cytokines in mice with bronchial asthma after exposure to tobacco smoke.

[Methods] Forty mice were randomly divided into normal control group, asthma group, tobacco smoke exposure group, and tobacco smoke exposure+asthma group, with 10 mice in each group. The mice in the asthma group were intraperitoneally injected with 0.2 mL sensitizing solution (including OVA 100 μg and aluminum hydroxide gel 400 μg) on day 0 and day 14, and atomized with 10 mL 1% OVA solution on day 24, 30 min per day for consecutive 28 days. The mice in the normal control group and the tobacco smoke exposure group were given the same amount of normal saline instead of sensitizing fluid and atomizing fluid. The mice in the tobacco smoke

exposure group were exposed to passive tobacco smoke by static inhalation 30 min after each atomized inhalation, each time with 10 commercial cigarettes for 1 h. The mice in the tobacco smoke exposure+asthma group were sensitized and atomized as the asthma group, and inhaled tobacco smoke as the tobacco smoke exposure group. After 28 days , bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected to detect the concentrations of interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-17A, and IL-17F by ELISA and count white blood cells (WBC), eosinophils (EOS), and neutrophils (NEU).

[Results] The WBC, EOS and NEU counts in BALF of the asthma group and the tobacco smoke exposure + asthma group were higher than those of the control group and the tobacco smoke exposure group, respectively ($P<0.05$). The WBC and NEU counts in BALF of the tobacco smoke exposure+asthma group [(20.65±1.90)×10^4/L, (16.33±1.54)×10^4/L] were higher than those of the asthma group [(16.12±1.53)×10^4/L, (3.57±0.75)×10^4/L], and the EOS count [(4.68±0.88)×10^4/L] was lower than that of the asthma group [(12.54±1.12)×10^4/L], respectively ($P<0.05$). The levels of IL-1, IL-6, IL-8, IL-17A, and IL-17F in BALF of the tobacco smoke exposure+asthma group [(28.93±5.91), (70.46±7.18), (188.64±10.43), (146.77±9.07), and (90.87±7.52) ng/L] were higher than those in the asthma group [(22.69±3.35), (53.57±6.42), (126.17±8.95), (104.35±6.92), and (73.71±4.66) ng/L] and the tobacco smoke exposure group [(11.37±2.32), (23.38±4.75), (88.13±7.12), (76.12±6.88), and (43.90±4.18) ng/L], respectively ($P<0.05$).

[Conclusion] The airway inflammation in asthma is aggravated by tobacco smoke exposure, the inflammatory cells are mainly infiltrated by neutrophils, and the release of related cytokines is increased.

Keywords: bronchial asthma; tobacco smoke; inflammatory cell; cytokine

支气管哮喘作为慢性气道炎症性疾病，其病因复杂，有内源性和外源性因素[1]。目前的研究提示，哮喘的发生存在多种机制，不同的通路均可引起哮喘的发病及进展，流行病学研究结果显示环境污染是引起哮喘发病的重要因素之一[2-5]。其中烟草烟雾暴露是导致难治性哮喘的重要原因。国外流行病学调查表明，欧美国家17%~35%的哮喘患者主动吸烟[6]，这些患者的住院治疗次数也明显增多，被动烟草烟雾暴露同样影响病情控制[7]。吸烟或曾经吸烟患者哮喘发病及严重程度与未吸烟哮喘患者明显不同，表现为激素依赖或激素抵抗。吸烟的哮喘患者在戒烟后其哮喘急性发作频率降低、肺功能下降的趋势可逆转，从而提高生活质量[8]。研究吸烟哮喘的气道炎症特点及相关发病机制对于降低此类哮喘的发病率及死亡率具有重大意义。本研究拟通过构建卵蛋白（ovalbumin，OVA）致敏哮喘小鼠模型，研究烟草烟雾暴露对气道炎性细胞浸润及相关细胞因子产生的影响，了解吸烟哮喘患者气道炎症的特点。

1 材料与方法

1.1 材料

选择雌性SPF级BALB/c纯系小白鼠40只，鼠龄8周左右，体重16~20 g，实验动物饲养及干预研究均在海南省实验动物中心进行。饲养温度适宜，环境清洁。实验试剂：OVA（Ⅴ级，纯度>98%，Sigma，美国），氢氧化铝凝胶（广州化学试剂厂，中国），ELISA试剂盒（上海川翔生物科技公司，中国），超声雾化器（Pari，德国），台式高速离心机（Eppendorf，德国）。实验时雾化吸入及烟草烟雾静式吸入暴露装置为自制封闭雾化吸入箱（30 cm×30 cm×30 cm）。实验用卷烟为湖南中烟工业公司生产的芙蓉牌过滤嘴卷烟（烟气烟碱量：1.2 mg，焦油量：11 mg）。动物实验遵循本单位和国家有关实验动物管理和使用的规定。

1.2 实验动物分组及干预

实验小鼠随机分4组，每组10只，分别为正常对照组、哮喘组、烟草烟雾暴露组、烟草烟雾暴露+哮喘组。正常对照组处理：第0、14天腹腔注射0.2 mL生理盐水，第24天雾化吸入生理盐水10 mL，每天30 min，连续28 d。哮喘组处理：第0、14天腹腔注射0.2 mL致敏液（含OVA 100 μg、氢氧化铝凝胶400 μg），第24天用1%OVA溶液10 mL雾化激发，每天30 min，连续28 d。烟草烟雾暴露组处理：第0、14天腹腔注射0.2 mL生理盐水，第24天雾化吸入生理盐水10 mL，每天30 min，同时在每次雾化吸入后30 min被动烟草烟雾静式吸入暴露1次，每次10支，持续1 h，连续28 d。烟草烟雾暴露+哮喘组处理：按上面哮喘组方法用OVA进行致敏和激发小鼠，同时在每次雾化激发后按烟草烟雾暴露组处理方法被动吸入暴露，共烟雾暴露28 d。

1.3 支气管肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid，BALF）留取及检测

在末次激发结束后所有小鼠断颈处死，立即切开颈部皮肤暴露气管，用剪刀在环状软骨下3~4个气管环处横切气管，用套管针行气管插管并丝线结扎固定，开胸，结扎右肺，经气管套管向左肺缓慢注入生理盐水0.5 mL，边按摩胸部边回收液体，反复抽吸3次，回收率80%以上。将抽取的肺泡灌洗液放入离

心管中，10 000 r/min（离心半径 13.5 cm），室温离心 10 min，离心后留取上清液分装于 Eppendoff 管，采用 ELISA 方法检测白介素（interleukin，IL）-1、IL-6、IL-8、IL-17A、IL-17F 水平。离心后所得的细胞沉淀固定于玻片上进行瑞氏染色，光学显微镜下计数白细胞（white blood cell，WBC）、嗜酸性粒细胞（eosinophile，EOS）、中性粒细胞（neutrophile，NEU）。

1.4 统计学分析

各组检测数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析，各组数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间样本均数比较采用单因素方差分析，方差分析先行方差齐性检验；用 LSD-*t* 法进行两两比较，方差不齐时，则采用 Dunnett-*T3* 法进行两两比较。检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 支气管肺泡灌洗液 WBC、EOS、NEU 计数

BALF 中哮喘组、烟草烟雾暴露组、烟草烟雾暴露＋哮喘组 WBC 总数、EOS 计数、NEU 计数均高于对照组，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；烟草烟雾暴露＋哮喘组 WBC 总数高于哮喘组、烟草烟雾暴露组（$P<0.05$）；烟草烟雾暴露＋哮喘组 EOS 计数低于哮喘组（$P<0.05$）；烟草烟雾暴露＋哮喘组 NEU 计数高于哮喘组、烟草烟雾暴露组（$P<0.05$）。见表 1。

表 1 各组小鼠支气管肺泡灌洗液炎性细胞计数（$\bar{x}\pm s$，n=10）

组别	WBC 总数（$\times10^4$/L）	EOS 计数（$\times10^4$/L）	NEU 计数（$\times10^4$/L）
正常对照组	1.47±0.28	0.31±0.07	0.41±0.07
哮喘组	16.12±1.53[a]	12.54±1.12[a]	3.57±0.75[a]
烟草烟雾暴露组	4.69±0.81[a]	0.53±0.05[a]	1.98±0.21[a]
烟草烟雾暴露＋哮喘组	20.65±1.90[abc]	4.68±0.88[ab]	16.33±1.54[abc]
F	146.58	63.72	102.17
P	0.00	0.00	0.00

[注] a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与哮喘组相比，$P<0.05$；c：与烟草烟雾暴露组相比，$P<0.05$。

2.2 支气管肺泡灌洗液细胞因子水平

除了烟草烟雾暴露组与正常对照组相比，BALF 中 IL-17F 水平差异无统计学意义外，哮喘组、烟草烟雾暴露组、烟草烟雾暴露＋哮喘组 IL-1、IL-6、IL-8、IL-17A 和 IL-17F 水平均较对照组有不同程度升高（$P<0.05$），烟草烟雾暴露＋哮喘组上述细胞因子水平均高于哮喘组及烟草烟雾暴露组（$P<0.05$）。见表 2。

表 2 各组小鼠支气管肺泡灌洗液中细胞因子水平（ng/L，$\bar{x}\pm s$，n=10）

组别	IL-1	IL-6	IL-8	IL-17A	IL-17F
正常对照组	5.62±2.17	13.66±3.12	73.89±5.68	60.55±6.18	41.89±3.76
哮喘组	22.69±3.35[a]	53.57±6.42[a]	126.17±8.95[a]	104.35±6.92[a]	73.71±4.66[a]
烟草烟雾暴露组	11.37±2.32[a]	23.38±4.75[a]	88.13±7.12[a]	76.12±6.88[a]	43.90±4.18
烟草烟雾暴露＋哮喘组	28.93±5.91[abc]	70.46±7.18[abc]	188.64±10.43[abc]	146.77±9.07[abc]	90.87±7.52[abc]
F	94.74	89.75	111.86	73.88	85.01
P	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

[注] a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与哮喘组相比，$P<0.05$；c：与烟草烟雾暴露组相比，$P<0.05$。

3 讨论

烟草烟雾暴露作为难治性哮喘的主要原因之一，与哮喘的控制率和严重程度有密切相关，部分患者长期被动烟草烟雾暴露，也是哮喘控制不良的重要因素[9]。了解烟草烟雾暴露哮喘患者气道炎性变化特点及相关机制，可对此类患者进行靶点调控，从而更好地控制病情。

本研究通过建立 OVA 致敏哮喘小鼠模型，探讨烟草烟雾暴露对哮喘气道炎症反应特点。研究结果发现，BALF 中 WBC、EOS、NEU 数量在哮喘组、烟草烟雾暴露组及烟草烟雾暴露＋哮喘组均有不同程度的升高。其中烟草烟雾暴露＋哮喘组 WBC 和 NEU 计数均高于其他 3 组，提示烟草烟雾暴露可使哮喘小鼠气道 WBC 和 NEU 增加，其作为危险因素与哮喘本身可能具有协同作用，共同加重气道炎症。与 WBC 不一样，烟草烟雾暴露＋哮喘组 EOS 计数高于对照组与单纯烟草烟雾暴露，而低于哮喘组。结合 4 组的 WBC 总数，提示烟草烟雾暴露会影响哮喘小鼠气道炎症细胞组成比例，使该组小鼠的 EOS 数量降低，也可能因为炎症细胞的其他组分改变，导致 EOS 数量相应下降。其次，对各组进行横向观察，可以发现哮喘组中，以 EOS 浸润为主，提示 EOS 是哮喘过敏级联反应中的重要炎性细胞。而烟草烟雾暴露组中，炎性细胞是以 NEU 为主，烟草烟雾暴露＋哮喘组中炎性细胞同样以 NEU 浸润为主，表现为中性粒细胞型哮喘。

烟草烟雾中主要的危害物质包括烟焦油、多环芳

烃苯并芘、二甲基亚硝胺。这些物质可破坏支气管表面起保护作用的气道黏膜，使其屏障作用减弱，此外还可使巨噬细胞的吞噬功能降低，从而可诱发肺部组织的炎性反应。NEU 作为非特异性免疫的一道重要防线，具有很强的吞噬活性，在肺部组织感染或者炎症状态下集聚，发挥重要的防御作用。故烟草烟雾暴露可增加 NEU 的数量，且在哮喘状态更加明显。现有研究普遍认为吸烟或烟草烟雾长期暴露与中性粒细胞型哮喘的发生发展密切相关，且烟草烟雾暴露会增强中性粒细胞比例并加重病情[10-11]，这与本研究结果相一致。

在细胞因子水平检测中发现，哮喘组、烟草烟雾暴露组及烟草烟雾暴露＋哮喘组小鼠的 BALF 中 IL-1、IL-6、IL-8、IL-17A 和 IL-17F 水平与对照组相比均有不同程度的升高，其中烟草烟雾暴露＋哮喘组上述细胞因子水平均高于哮喘组及烟草烟雾暴露组。从数据结果来看，哮喘合并烟草烟雾暴露比单纯哮喘或单纯烟草烟雾暴露小鼠气道炎症中细胞因子释放增加明显。而且不难发现烟草烟雾暴露＋哮喘组细胞因子中以 IL-8 水平最高，以中性粒细胞型哮喘为主。有文献报道[12]，中性粒细胞型哮喘的主要特点为气道内中性粒细胞广泛浸润，并以趋化因子 IL-8 水平增多为主，这与本研究结果相一致。中性粒细胞在气道中浸润，并通过诱导释放 IL-1、IL-6、IL-8 等细胞因子以及白三烯、弹性蛋白酶（elastase，ELA2），引起黏液腺增生，分泌大量黏液，进而平滑肌细胞增生和支气管平滑肌收缩，气道重塑和慢性气道炎症，从而导致哮喘病情的控制不良[13-14]。

综上所述，根据烟草烟雾暴露哮喘气道炎症变化特点，在治疗策略中应重视规避烟草烟雾暴露的危险因素，同时重点考虑以抑制气道中性粒细胞募集，调控细胞因子 IL-8 的水平及活性为主的治疗靶点，可能有助于更好控制病情，使该类患者更大程度获益。后续研究也将进一步探讨中性粒细胞型哮喘的调控机制，尤其是上游 T 淋巴细胞的分化对于炎性细胞浸润和相关细胞因子分泌的影响。

参考文献

[1] 郑鑫，张志红. 空气污染物对哮喘相关基因 DNA 甲基化影响的研究进展 [J]. 环境与职业医学，2016，33（8）：795-800.

[2] ZEDAN M M，LAIMON W N，OSMAN A M，et al. Clinical asthma phenotyping：a trial for bridging gaps in asthma management [J]. World J Clin Pediatr，2015，4（2）：13-18.

[3] BELL M C，BUSSE W W. Severe asthma：an expanding and mounting clinical challenge [J]. J Allergy Clin Immunol Pract，2013，1（2）：110-121.

[4] 马晓燕，张志红. $PM_{2.5}$ 与哮喘关系的研究进展 [J]. 环境与职业医学，2015，32（3）：279-283.

[5] 段丽菊，徐顺清. 臭氧诱发哮喘机制及其敏感期的研究进展 [J]. 环境与职业医学，2016，33（12）：1194-1197.

[6] BAKAKOS P，KOSTIKAS K，LOUKIDES S. Smoking asthma phenotype：diagnostic and management challenges [J]. Curr Opin Pulm Med，2016，22（1）：53-58.

[7] BITTNER J C，HASEGAWA K，PROBST B D，et al. Smoking status and smoking cessation intervention among U.S. adults hospitalized for asthma exacerbation [J]. Allergy Asthma Proc，2016，37（4）：318-323.

[8] 李洪涛，张天托，邹小玲，等. 戒烟对烟草依赖支气管哮喘患者肺功能和生活质量的影响及伐尼克兰的辅助戒烟作用 [J]. 中国全科医学，2017，20（33）：4115-4120.

[9] 周王锋，葛翔挺，戴元荣. 烟草烟雾影响支气管哮喘：机制与对策 [J]. 中国实用内科杂志，2016，36（8）：635-639.

[10] SIMPSON J L，GUEST M，BOGGESS M M，et al. Occupational exposures，smoking and airway inflammation in refractory asthma [J]. BMC Pulm Med，2014，14：207.

[11] 韩慧，宋卫东. 糖皮质激素治疗吸烟与非吸烟哮喘患者疗效的对比研究 [J]. 医学综述，2014，20（6）：1102-1103.

[12] CIEPIELA O，OSTAFIN M，DEMKOW U. Neutrophils in asthma—a review [J]. Respir Physiol Neurobiol，2015，209：13-16.

[13] 敖小冬. 白介素 17 及细胞因子信号转导抑制蛋白 3 在中性粒细胞性哮喘小鼠发病机制中的作用研究 [D]. 南宁：广西医科大学，2012.

[14] GUO Q，LI H，LIU J，et al. Tunicamycin aggravates endoplasmic reticulum stress and airway inflammation via PERK-ATF4-CHOP signaling in a murine model of neutrophilic asthma [J]. J Asthma，2017，54（2）：125-133.

（英文编辑：汪源；编辑：童玲，丁瑾瑜；校对：宋琪）