

· 临床研究 ·

二十二碳六烯酸抑制慢性阻塞性肺疾病患者中性粒细胞核因子- κ B p65 的表达

陈弘群¹, 杨海华², 何悦¹, 曲毅^{1*}

(上海市徐汇区中心医院: ¹老年病科, ²呼吸科, 上海 200031)

【摘要】目的 探讨二十二碳六烯酸(DHA)在慢性阻塞性肺疾病(COPD)中的抗炎机制。**方法** 选取2011年12月至2012年12月在上海市徐汇区中心医院门诊就诊的患者40例, 其中COPD稳定期患者20例为A组, COPD发作期患者20例为B组, 分离外周静脉血中性粒细胞体外培养, 用不同浓度的DHA(10, 50和100 μ mol/L)处理0~72h(0, 24, 48和72h), 收取培养液上清测定炎症因子白细胞介素(IL)-6, IL-8和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平, 收取细胞蛋白做Western印迹法检测核因子 κ B(NF- κ B)p65的表达。**结果** DHA作用前B组炎症因子水平显著高于A组。DHA作用后, 两组炎症因子水平都下降, 并呈现浓度和时间依赖效应, B组下降趋势大于A组, 高浓度DHA作用72h后, A组和B组炎症因子水平趋于一致。NF- κ B p65的表达水平随DHA浓度和时间变化呈现下降趋势($P < 0.05$)。**结论** DHA可能通过抑制中性粒细胞的NF- κ B p65蛋白的表达, 显著性地降低了中性粒细胞分泌炎症因子IL-6、IL-8、TNF- α 的水平, 为DHA用于临床治疗COPD提供了理论依据。

【关键词】 二十二碳六烯酸; 肺疾病, 慢性阻塞性; 转录因子-RelA

【中图分类号】 R563.9

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2014.00013

DHA suppresses NF- κ B p65 expression in neutrophils in patients with chronic obstructive pulmonary disease

CHEN Hong-Qun¹, YANG Hai-Hua², HE Yue¹, QU Yi^{1*}

(¹Department of Geriatrics, ²Department of Respiratory Diseases, Xuhui District Central Hospital, Shanghai 200031, China)

【Abstract】Objective To investigate the anti-inflammatory effect and mechanism of docosahexaenoic acid (DHA) in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** A total of 40 COPD outpatients in our department from December 2011 to December 2012 were recruited in this study. Twenty cases of them in stable period were assigned as group A, and the left 20 cases in exacerbation period were assigned into group B. Their peripheral blood neutrophils were isolated and cultivated. Then the cells were treated with DHA at different concentrations (10, 50 and 100 μ mol/L) for 0, 24, 48 and 72h, respectively. The levels of the inflammatory cytokines IL-6, IL-8, and TNF- α in culture supernatants were measured. The expression level of NF- κ B p65 protein was detected with Western blotting. **Results** Before DHA treatment, the levels of inflammatory factors were significantly higher in group B than in group A. After DHA treatment, the levels dropped directly in a concentration- and time-dependent manner in both groups, but the downtrend was stronger in group B than in group A. After treated with high dosed DHA for 72h, the inflammatory cytokines levels in group A were not significantly different with those in group B. NF- κ B p65 protein expression was decreased in a dose- and time-dependent manner ($P < 0.05$). **Conclusions** DHA significantly reduces the levels of inflammatory cytokines IL-6, IL-8, and TNF- α through inhibiting NF- κ B p65 protein expression in neutrophils, providing the theoretical basis for DHA in clinical treatment of COPD.

【Key words】 docosahexaenoic acid; pulmonary disease, chronic obstructive; transcription factor RelA

Corresponding author: QU Yi, E-mail: QRQUYI@163.com

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是临床常见的慢性呼吸系统疾病,其病变特征是持续性的气流受限,并呈进行性发展^[1],病发后不仅肺部有炎症,有些患者还伴

随全身性炎症反应,因此抗炎治疗是目前治疗COPD的主要措施^[2]。中性粒细胞是COPD患者的主要炎症细胞,气道中性粒细胞趋化、黏附、激活是形成COPD气道炎症的关键。中性粒细胞分泌的白细胞介素

(interleukin, IL)-6、IL-8、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)等在COPD患者全身性炎症反应中起重要作用^[3]。二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 是一种对人体非常重要的多不饱和脂肪酸,属于 ω -3不饱和脂肪酸家族中的重要成员。DHA是神经系统细胞生长及维持的一种主要元素,是人体特定的免疫营养素,具有抑制炎症反应的效应。本文主要研究DHA对COPD患者中性粒细胞炎症因子释放的影响,并初步探讨其发生机制。

1 对象与方法

1.1 研究对象

入选病例为2011年12月至2012年12月间在上海市徐汇区中心医院老年病科门诊就诊的患者40例,所有患者均符合2007年中华医学会呼吸学会制定的《慢性阻塞性肺疾病诊治指南》诊断标准,且为肺功能II~III级,除外COPD的其他呼吸道疾病,稳定期要求患者病情稳定 ≥ 6 周。COPD稳定期组(A组)20例,男15例,女5例,年龄(78.7 ± 8.1)岁,病程(13 ± 10)年;COPD发作期组(B组)20例,男16例,女4例,年龄(79.2 ± 4.3)岁,病程(12 ± 9)年,两组一般资料差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 样本

抽取患者空腹外周静脉血(肘静脉)标本静脉血20ml,并予肝素抗凝处理。

1.3 材料

DHA (Cayman公司),核因子(nuclear factor, NF- κ B) p65抗体(Sigma公司),IL-6、IL-8和TNF- α ELISA试剂盒(RandD公司)。

1.4 细胞的分离

用免疫磁珠法分离出外周静脉血中性粒细胞。

1.5 细胞的培养

用含10%胎牛血清培养液,培养基在37℃、100%饱和湿度条件下培养,调整细胞浓度 2×10^9 个/L,加于24孔板中。

1.6 实验指标

各组先后加入浓度分别为10, 50和100 μ mol/L的DHA,并分别用Western印迹法检测0, 24, 48和72h后的NF- κ B p65蛋白表达:收集各组 2×10^6 细胞,放入1.5ml EP管,加入0.5ml细胞裂解液,10000 $\times g$ 离心10min,提取上清。用BCA法计算样品的蛋白浓度,加入等量的2 $\times$ SDS上样缓冲液,5000 $\times g$ 离心10min,提取上清,在4%梯度预制胶上加样,电压

调到120V转膜40min。用封闭液稀释一抗(1:500),4℃反应抗体结合过夜。用PBS稀释二抗(1:1000),室温反应30min。NC膜加ECL,反应1min放入成像系统扫描,用IPP5.6计算条带灰度值。同时收集各组细胞上清液,用ELISA检测IL-6, IL-8和TNF- α 。

1.7 统计学处理

应用统计学软件SPSS12.0进行数据处理,结果以均数 $\pm$ 标准差表示,计量资料组间比较采用 t 检验,计数资料组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 中性粒细胞的分离培养

分离患者外周静脉血中的中性粒细胞(图1)。

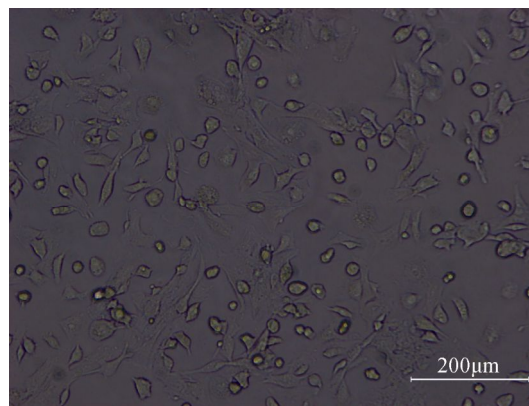


图1 中性粒细胞的分离培养
Figure 1 Isolation and culture of neutrophils from peripheral venous blood (Scale bar = 200 μ m)

2.2 不同浓度DHA对A组和B组中性粒细胞分泌炎症因子的影响

分别用DHA 10, 50, 100 μ mol/L三个不同浓度作用于A组和B组的中性粒细胞,并收集不同时间点0, 24, 48, 72h的细胞培养液,检测炎症因子IL-6, IL-8和TNF- α 的含量。由表1~表3可见,在加DHA 0h, B组细胞分泌的炎症因子IL-6、IL-8、TNF- α 量显著高于A组($P < 0.05$),当加入DHA后A组和B组的炎症因子水平都有所下降,A组为COPD稳定期患者,因此炎症因子IL-6, IL-8和TNF- α 变化不明显,无显著性差异($P > 0.05$),而B组各指标下降较为明显,且差异有统计学意义($P < 0.05$),并且呈现出DHA剂量依赖效应和时间依赖效应,和A组比较,差异仍有统计学意义($P < 0.05$)。在100 μ mol/L DHA作用72h时, A组和B组炎症因子水平已经趋于一致,且差异无统计学意义($P > 0.05$),表明DHA在100 μ mol/L作用72h时,有显著性地抑制中性粒细

胞释放炎症因子IL-6, IL-8和TNF- α 的作用, 并且对于发作期的患者, 抗炎效果尤其明显。

2.3 不同浓度DHA对B组中性粒细胞NF- κ B p65蛋白表达的影响

NF- κ B是核转录因子, 它在炎症的启动、放大及持续存在中起中枢调控作用, p65是NF- κ B的一个亚基, 当外界因子作用时, 引起NF- κ B亚基分离, 游离出有转录活性的亚基p65, 结合于DNA上发挥转录调控作用, 启动下游基因IL-6, IL-8和TNF- α 等炎症基因的表达上调。

由图2可知, DHA对中性粒细胞的NF- κ B p65亚

基的表达有抑制作用, 并且这种抑制作用随着DHA浓度加大, 作用时间加长呈现增大的趋势, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。表明DHA可能通过抑制中性粒细胞中NF- κ B的表达, 减少它的活性形式p65的水平, 从而抑制炎症因子IL-6, IL-8和TNF- α 的转录活化, 达到抗炎的作用。

3 讨论

COPD是临床常见的呼吸系统疾病, 其发病机制尚不完全明确, 它的基本病理是气道的慢性炎症, 但实际上不仅是肺部炎症, 而且是伴随全身性炎症反

表1 细胞培养液中IL-8的含量
Table 1 Concentration of IL-8 in cell supernatant ($n = 20$, ng/L, $\bar{x} \pm s$)

Concentration of DHA (μ mol/L)	Group	Time point			
		0h	24h	48h	72h
10	A	61.63 $\pm$ 7.61	51.91 $\pm$ 6.39	44.81 $\pm$ 3.90	41.12 $\pm$ 3.52
	B	718.18 $\pm$ 138.74*	310.64 $\pm$ 32.98*	243.93 $\pm$ 24.38*	162.86 $\pm$ 8.15*
50	A	61.71 $\pm$ 8.30	35.09 $\pm$ 3.38	22.32 $\pm$ 5.51	12.72 $\pm$ 3.31
	B	721.37 $\pm$ 138.75*	99.95 $\pm$ 15.23*	67.74 $\pm$ 16.8*	33.79 $\pm$ 3.6*
100	A	62.05 $\pm$ 8.63	16.01 $\pm$ 3.28	7.63 $\pm$ 1.31	4.98 $\pm$ 1.47
	B	719.79 $\pm$ 135.71*	52.36 $\pm$ 26.54*	13.42 $\pm$ 4.22*	6.02 $\pm$ 0.79

Group A: COPD patients in stable period; Group B: COPD patients in exacerbation period; IL-8: interleukin-8; DHA: docosahexaenoic acid. After DHA treatment, the levels of IL-8 dropped directly in a concentration- and time-dependent manner in both groups, but the downtrend was stronger in group B than in group A. After treated with high dosed DHA for 72h, the IL-8 levels in group A were not significantly different with those in group B. Compared with group A, * $P < 0.05$

表2 细胞培养液中IL-6的含量
Table 2 Concentration of IL-6 in cell culture medium supernatant ($n = 20$, ng/L, $\bar{x} \pm s$)

Concentration of DHA(μ mol/L)	Group	Time point			
		0h	24h	48h	72h
10	A	20.15 $\pm$ 2.58	18.36 $\pm$ 2.72	15.99 $\pm$ 3.60	14.16 $\pm$ 3.08
	B	76.60 $\pm$ 9.43*	61.44 $\pm$ 7.58*	51.82 $\pm$ 8.06*	44.83 $\pm$ 5.95*
50	A	20.11 $\pm$ 2.51	15.00 $\pm$ 4.28	11.72 $\pm$ 3.58	6.54 $\pm$ 0.79
	B	76.76 $\pm$ 9.32*	41.44 $\pm$ 5.43*	30.82 $\pm$ 9.32*	15.57 $\pm$ 8.02*
100	A	20.06 $\pm$ 2.62	8.08 $\pm$ 3.13	4.94 $\pm$ 0.58	3.28 $\pm$ 0.23
	B	76.93 $\pm$ 9.16*	28.03 $\pm$ 3.69*	10.45 $\pm$ 1.76*	4.47 $\pm$ 1.20

Group A: COPD patients in stable period; Group B: COPD patients in exacerbation period; IL-6: interleukin-6; DHA: docosahexaenoic acid. After DHA treatment, the levels of IL-6 dropped directly in a concentration- and time-dependent manner in both groups, but the downtrend was stronger in group B than in group A. After treated with high dosed DHA for 72h, the IL-6 levels in group A were not significantly different with those in group B. Compared with group A, * $P < 0.05$

表3 细胞培养液中TNF- α 的含量
Table 3 Concentration of TNF- α in cell supernatant ($n = 20$, ng/L, $\bar{x} \pm s$)

Concentration of DHA(μ mol/L)	Group	Time point			
		0h	24h	48h	72h
10	A	179.19 $\pm$ 41.82	154.8 $\pm$ 33.89	132.64 $\pm$ 36.32	107.49 $\pm$ 31.28
	B	1443.84 $\pm$ 164.48*	1018.35 $\pm$ 124.01*	803.39 $\pm$ 66.2*	719.4 $\pm$ 114.61*
50	A	180.03 $\pm$ 38.50	136.81 $\pm$ 34.75	86.51 $\pm$ 19.50	59.67 $\pm$ 12.45
	B	1447.69 $\pm$ 166.85*	613.76 $\pm$ 39.30*	376.42 $\pm$ 44.06*	216.57 $\pm$ 11.85*
100	A	182.05 $\pm$ 39.76	74.32 $\pm$ 14.37	47.34 $\pm$ 5.63	35.73 $\pm$ 5.02
	B	1447.51 $\pm$ 162.49*	353.6 $\pm$ 30.04*	96.94 $\pm$ 10.25*	44.04 $\pm$ 3.52

Group A: COPD patients in stable period; Group B: COPD patients in exacerbation period; TNF- α : tumor necrosis factor α ; DHA: docosahexaenoic acid. After DHA treatment, the levels of TNF- α dropped directly in a concentration- and time-dependent manner in both groups, but the downtrend was stronger in group B than in group A. After treated with high dosed DHA for 72h, the TNF- α levels in group A were not significantly different with those in group B. Compared with group A, * $P < 0.05$

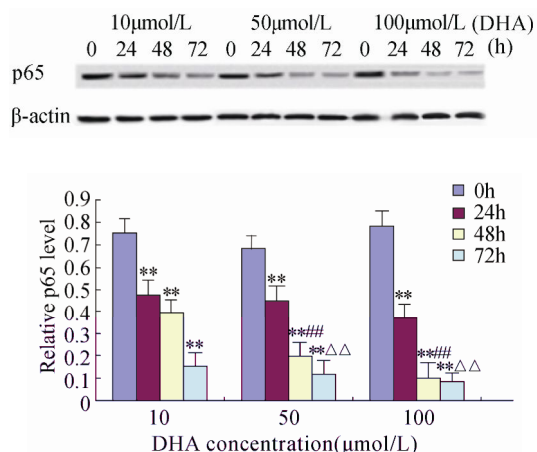


图2 不同浓度DHA对中性粒细胞p65表达的影响

Figure 2 Effect of different concentrations of DHA on expression of p65 in neutrophils

Compared with 0h at different concentrations of DHA, ** $P < 0.01$; Compared with 48h at 10μmol/L DHA, ### $P < 0.01$; Compared with 72h at 10μmol/L DHA, **** $P < 0.01$

应。各种炎症细胞分泌的炎症因子,是导致气道产生炎症,并由稳定期演变为急性发作期的重要因素^[2]。这些炎症细胞包括中性粒细胞、巨噬细胞、T淋巴细胞等,其中中性粒细胞主要分泌的IL-6, IL-8和TNF- α 对炎症的发生和加重都起着决定性作用,因此,抗炎治疗在COPD发作期的治疗过程中占有重要地位。

本研究显示,与COPD稳定期比较,发作期的中性粒细胞分泌IL-6, IL-8和TNF- α 炎症因子显著性地高于稳定期。在中性粒细胞中加入DHA后, B组的IL-6, IL-8和TNF- α 的分泌量下降较为明显,呈现出DHA剂量依赖效应和时间依赖效应,在72h, 100μmol/L DHA浓度的情况下, A组和B组差异没有统计学意义。NF- κ B p65的Western印迹分析结果说明DHA对中性粒细胞的NF- κ B p65表达有抑制作用,并随着DHA浓度增加,作用时间延长, NF- κ B p65表达显著下调。说明DHA可能通过抑制中性粒细胞中NF- κ B的表达,减少它的活性形式p65的水平,从而抑制炎症因子IL-6, IL-8和TNF- α 的转录活化,从而达到抑制炎症的作用。

NF- κ B是炎症反应过程中重要的转录因子,当受到外界细胞因子、炎症因子的影响时, NF- κ B与它的抑制亚基 I κ B分离,游离出活性亚基p65, p65进入细胞核后结合于DNA的转录因子结合域,启动下游基因的表达^[3]。NF- κ B作为细胞中一个重要的转录因子,几乎存在于所有细胞中,在免疫反应、应激反应及细胞凋亡的调节中起主导作用。NF- κ B的活化后可引起IL-6、IL-8、TNF- α 、黏附分子、集落刺激因子(粒细胞集落刺激因子)等炎症基因的转录,引起正常组织器官的炎症反应^[4]。

Moon等^[5]报道证明DHA具有抗炎作用。Weldon等^[6]发现, DHA能显著减少巨噬细胞在脂多糖诱导下的TNF- α , IL-1 β 和IL-6的生成及这些炎症递质mRNA的表达,降低p65与DNA的结合率。近期研究^[7-13]发现,二十碳五烯酸和DHA的代谢产物可以通过减少白细胞的游走及渗出,并能减少炎症递质的生成,而参与了炎症的消退过程,影响细胞膜的完整性和稳定性,减少细胞因子的产生与释放,使局部损伤组织完全修复,并降低C反应蛋白及IL-1 β 水平。

综上所述, DHA能有效减少COPD发作期患者中性粒细胞释放炎症因子IL-6, IL-8和TNF- α ,降低过度炎症反应,为今后临床上治疗COPD的炎症反应可提供新的思路。

【参考文献】

- [1] Chinese Society of Respiratory Diseases COPD Study Group. Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Diseases[J]. Chin J Tuberc Respir Dis, 2007, 30(1), 8-17. [中华医学会呼吸病学学会慢性阻塞性肺病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2007年修订版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30(1): 8-17.]
- [2] Produit-Zenjaffinen N, Potmlmas CJ, Schorderet DF. Retinal ischemia-induced apoptosis is associated with alteration in Bax and Bel-X(L) expression rather than modifications in Bal and Bcl-2[J]. Mol Vis, 2009, 15: 2101-2110.
- [3] Heller AR, Rossler S, Litz RJ, et al. Omega-3 fatty acids improve the diagnosis-related clinical outcome[J]. Crit Care Med, 2006, 34(4): 972-979.
- [4] Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases[J]. J Am Coll Nutr, 2002, 21(6): 495-505.
- [5] Moon DO, Kim KC, Jin CY, et al. Inhibitory effects of eicosapentaenoic acid on lipopolysaccharide-induced activation in BV2 microglia[J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7(2): 222-229.
- [6] Weldon SM, Mullen AC, Locher CE, et al. Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid[J]. J Nutr Biochem, 2007, 18(4): 250-258.
- [7] Hao Hasturk H, Kantarci A, Goguet-Surmenian E, et al. Resolvin E1 regulates inflammation at the cellular and tissue level and restores tissue homeostasis in vivo[J]. J Immunol, 2007, 179(10): 7021-7029.
- [8] Hu XL, Zhang X, Li Q, et al. Effects of trichostatin A on the expressions of inflammatory cytokines and Toll-like receptor 4 and the acetylation of nuclear factor- κ B

- induced by lipopolysaccharide in macrophage[J]. Acta Physiol Sin, 2012, 64(6): 651–656. [胡晓兰, 张 晓, 李倩, 等. 曲古抑菌素A对脂多糖诱导的巨噬细胞炎症细胞因子、Toll样受体4表达及核因子- κ B乙酰化的影响[J]. 生理学报, 2012 64(6): 651–656.]
- [9] EI Kebir D, Gjorstrup P, Filep JG. Resolvin E1 promotes phagocytosis-induced neutrophil apoptosis and accelerates resolution of pulmonary inflammation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(37): 14983–14988.
- [10] Wagenaar GT, Laghmani el H, de Visser YP, *et al.* Ambrisentan reduces pulmonary arterial hypertension but does not stimulate alveolar and vascular development in neonatal rats with hyperoxic lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013, 304(4): L264–L275.
- [11] Farley K, Stolley JM, Zhao P, *et al.* A serpinB1 regulatory mechanism is essential for restricting neutrophil extracellular trap generation[J]. J Immunol, 2012, 189(9): 4574–4581.
- [12] Hoenderdos K, Condliffe A. The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 48(5): 531–539.
- [13] Reddy AT, Lakshmi SP, Kleinhenz JM, *et al.* Endothelial cell peroxisome proliferator-activated receptor γ reduces endotoxemic pulmonary inflammation and injury[J]. J Immunol, 2012, 189(11): 5411–5420.
- (编辑: 周宇红)

· 消 息 ·

《中华老年多器官疾病杂志》诚征广告

《中华老年多器官疾病杂志》是由中国人民解放军总医院主管、中国人民解放军总医院老年心血管病研究所主办、国内外公开发行的医学学术期刊, 主要交流老年心血管疾病, 尤其是老年心血管疾病合并其他疾病、老年两个以上器官疾病以及其他老年多发病的诊治经验与教训。刊登内容包括心血管系统、呼吸系统、神经系统、内分泌系统、肾脏系统、消化系统、骨骼系统等各个方面疾病, 涉及临床和基础研究等诸多领域, 为从事老年医学及其相关疾病专业的医疗、科研及教学人员必读的刊物。

过去的几年, 本刊以严谨的态度、诚实的信誉赢得了厂商和读者的信赖, 与许多公司建立了良好的长期合作关系。

《中华老年多器官疾病杂志》真诚欢迎国内外厂商来此发布药物、产品、技术和服务信息。我刊除彩色四封外, 还有精美彩色、黑白插页供选择。

需要刊登广告的客户, 可电话告知您的传真, 我们会立即将报价单传真给您, 洽商确定版位后, 将与您签订正式的刊登合同。

地址: 100853 北京市复兴路28号, 《中华老年多器官疾病杂志》编辑部

电话: 010-66936756

网址: <http://www.mode301.cn>

E-mail: zhln dqg@mode301.cn