

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.24.018

氟西汀对慢性阻塞性肺疾病模型中炎症因子及糖皮质激素受体水平的影响

臧宇,傅恩清[△]

空军军医大学第二附属医院呼吸与危重病科,陕西西安 710038

摘要:目的 观察氟西汀治疗对小鼠慢性阻塞性肺疾病模型炎症因子及糖皮质激素受体水平的影响。方法 选择雄性 C57 小鼠为研究对象,随机分为 4 组,即空白+溶剂组、空白+氟西汀组、熏烟+溶剂组、熏烟+氟西汀组,每组 10 只。熏烟处理为小鼠连续 12 周暴露于含有 10.0 mg 焦油和 1.0 mg 尼古丁的香烟烟雾中,建立慢性阻塞性肺疾病模型。空白处理为将小鼠置于充满新鲜空气的箱子中。氟西汀组与溶剂组小鼠分别接受氟西汀和生理盐水灌服,剂量均为 5 mg/kg。12 周后取肺组织做病理切片进行观察,对肺泡灌洗液中炎症因子水平进行分析;同时,分析小鼠海马中糖皮质激素受体(GR)的表达情况。结果 小鼠熏烟前的体质量差异无统计学意义($P>0.05$);6 周后,空白+溶剂组、空白+氟西汀组小鼠体质量显著高于熏烟+溶剂组及熏烟+氟西汀组,差异有统计学意义($P<0.05$);12 周后,空白+氟西汀组的肺泡灌洗液中白细胞介素(IL)-6 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平显著高于空白+溶剂组,差异有统计学意义($P<0.05$);熏烟+氟西汀组肺泡灌洗液中 IL-6 和 TNF- α 水平明显低于熏烟+溶剂组($P<0.05$);与空白+溶剂组相比,熏烟+溶剂组小鼠 12 周后总 GR 蛋白水平显著降低($P<0.05$);建立慢性阻塞性肺疾病模型后,熏烟+氟西汀组的小鼠体内 GR 蛋白水平高于熏烟+溶剂组($P<0.05$)。结论 熏烟导致慢性阻塞性肺疾病小鼠炎症因子水平升高,大脑内的 GR 蛋白水平持续降低,表达减少。氟西汀能够降低炎症因子的水平,逆转 GR 蛋白表达的持续降低,有助于慢性阻塞性肺疾病的恢复。

关键词:慢性阻塞性肺疾病; 氟西汀; 炎症因子; 糖皮质激素受体**中图法分类号:**R563**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2019)24-3613-04

Effects of fluoxetine on levels of inflammatory cytokines and glucocorticoid receptors in chronic obstructive pulmonary disease models

ZANG Yu, FU Enqing[△]

Department of Respiratory and Critical Care, the Second Affiliated Hospital of
The Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of fluoxetine on the levels of inflammatory cytokines and glucocorticoid receptors in mice with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** A total of 40 C57 mice were randomly divided into 4 groups, including blank solvent+saline group, blank solvent+fluoxetine group, smoking+saline group and smoking+fluoxetine group. The rates of smoking group were exposed to cigarette smoke containing 10.0 mg tar and 1.0 mg nicotine for 12 weeks to establish a COPD model. The rates of blank solvent was putted in the boxes full of fresh air. The rates of fluoxetine group and saline group were taken 5 mg/kg intragastric administration of normal saline and fluoxetine. After 12 weeks, the lung tissue was taken for pathological observation, and alveolar lavage fluid was analyzed for inflammatory factors, and the brain was used to analyze the expression of glucocorticoid receptor. **Results** There was no statistically significant difference in weight of C57 mice before smoking, but after 6 weeks, the weight of blank solvent+saline group and blank solvent+fluoxetine group were significantly higher than that of smoking+saline group and smoking+fluoxetine group ($P<0.05$). After 12 weeks, interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α in alveolar lavage fluid of blank solvent+saline group, blank solvent+fluoxetine group, smoking+saline group were significantly higher than that of blank solvent+saline group and smoking+fluoxetine group ($P<0.05$). Compared with blank solvent+saline group, the level of GR protein of smoking+saline group was significantly decreased ($P<0.05$). After modeling the COPD, the level of GR protein of smoking+fluoxetine group was significantly higher than that of smoking+saline group. **Conclusion** The levels of inflammatory cytokines in COPD rats caused by smoking are increased, the levels of GR in the brain are continuously

decreased. Fluoxetine could reduce the levels of inflammatory cytokines, reverse the continuous decrease of GR expression, and contribute to the recovery of COPD.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease; fluoxetine; inflammatory cytokines; glucocorticoid receptors

慢性阻塞性肺疾病是一种以不完全可逆的气流受限为特点,伴有气促、咳嗽、喘息并反复加重的肺部疾病;不仅损伤气道、肺泡和肺血管,同时还损伤肺外组织,可并发神经系统疾病,如焦虑、抑郁和睡眠障碍等,其发病机制非常复杂^[1]。在中枢神经系统(CNS)中,神经内分泌系统通过激活激素受体发挥作用,对免疫反应产生强大的调节作用^[2]。糖皮质激素受体(GR)能够被糖皮质激素激活,在脑中的调节作用也非常复杂^[3]。长期使用氟西汀治疗,能升高 GR 蛋白水平并增加表达。本研究旨在观察氟西汀治疗对小鼠慢性阻塞性肺疾病模型炎症因子及 GR 蛋白水平的影响。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 选择 40 只雄性 C57 小鼠为研究对象。周龄 6~8 周,平均 (6.1 ± 0.5) 周;体质量 19~20 g,平均 (19.6 ± 0.3) g。均购买于陕西省实验动物中心。小鼠均饲养在 12 h 黑夜、12 h 白昼的环境中,饲养室温度为 22~24 °C,相对湿度为 50%~60%。饲养期间小鼠自由进食和饮水,并让其在实验室环境中适应 1 周。所有实验步骤严格按照中国实验动物的相关规定进行。所有动物分为 4 组,即空白+溶剂组、空白+氟西汀组、熏烟+溶剂组、熏烟+氟西汀组,每组 10 只。

1.2 方法

1.2.1 熏烟诱导建立慢性阻塞性肺疾病模型 空白+溶剂组:雄性 C57 小鼠连续 12 周暴露于室内新鲜空气中,同时,接受生理盐水(5 mg/kg)灌服,每天灌服 1 次,每天在接触新鲜空气 1 h 后灌服,最初 4 周连续灌药,第 4 周结束。空白+氟西汀组:小鼠同样暴露于室内新鲜空气中,同时,接受氟西汀(5 mg/kg)治疗,每天灌服 1 次,每天在接触新鲜空气 1 h 后灌服,最初 4 周连续灌药,第 4 周结束。熏烟+溶剂组:雄性 C57 小鼠连续 12 周暴露于熏烟的烟雾中,烟雾通过燃烧含有 10.0 mg 焦油和 1.0 mg 尼古丁的商业过滤嘴香烟产生,每次点 5 支香烟,每天熏 2 次,每次熏 30 min,同时接受生理盐水灌服,方法同上。熏烟+氟西汀组:该组小鼠接受熏烟及氟西汀灌服,方法同上。在最后一次熏烟 24 h 后,采集血液标本,并收集支气管肺泡灌洗液(BALF)和脑组织进行进一步研究。

1.2.2 体质量测量和病理检测 实验期间每周测量小鼠体质量,并进行记录。12 周后解剖,取出肺组织,放入 4%多聚甲醛固定液中固定,然后脱水并包埋在石蜡中。切为 5 μ m 的切片,脱蜡,并依次用苏木精和

伊红(HE)染色。对 HE 染色标本进行病理分析。

1.2.3 BALF 的收集和炎性细胞评估 肺组织整块取出,每次用 1 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)进行灌洗,共灌洗 3 次,收集灌洗液,然后在 4 °C 环境下,以 300 $\times$ g 离心 10 min,上清液保存于 -80 °C 进行下一步分析。为了分析炎性细胞水平,将 BALF 细胞重悬在 1 mL 的 PBS 中,然后应用 ELISA 检测白细胞介素(IL)-6 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 的水平。

1.2.4 Western blot 分析 将海马组织标本切成小块,放在低温 RIPA 缓冲液的玻璃容器中均匀化。将均匀化的溶液离心,用双肌球蛋白酸试剂盒测定上清液的蛋白水平,然后将标本通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,将分离的蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜)上。用 5%脱脂乳封膜后,与一抗 anti-GR 孵育,放在 4 °C 过夜。洗涤后,PVDF 膜加二抗在室温下孵育,然后观察条带。

1.2.5 免疫组织化学实验 通过免疫组织化学实验进一步检测 GR 在海马组织中的表达。采用石蜡包埋切片,用二甲苯脱去海马组织,用梯度乙醇水合。标本用 3%过氧化氢孵育,3%牛血清蛋白室温下封闭 2 h。孵育对应的一抗 anti-GR(1:50),在 4 °C 过夜。PBS 洗涤后,取标本孵育二抗 1 h,用共聚焦显微镜观察。

1.3 统计学处理 采用 SPSS21.0 对数据进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验小鼠体质量的变化 干预前,各组小鼠的体质量差异无统计学意义($P > 0.05$)。从第 6 周开始,空白+溶剂组、空白+氟西汀组小鼠体质量明显高于熏烟+溶剂组及熏烟+氟西汀组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

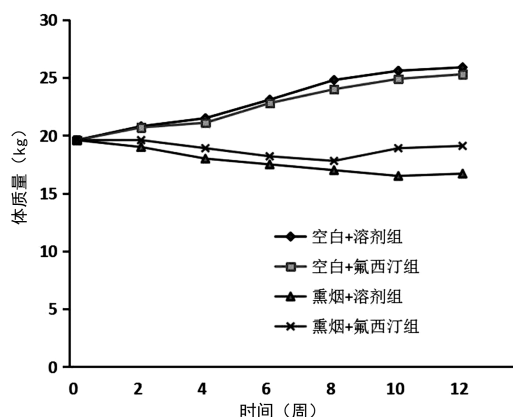
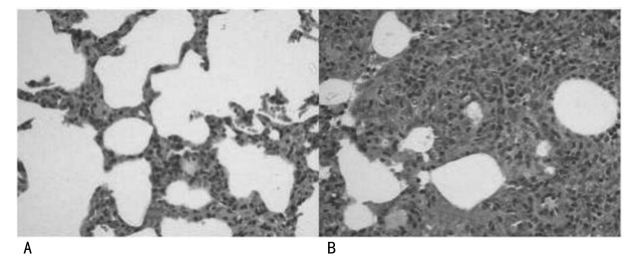


图 1 实验小鼠体质量的变化

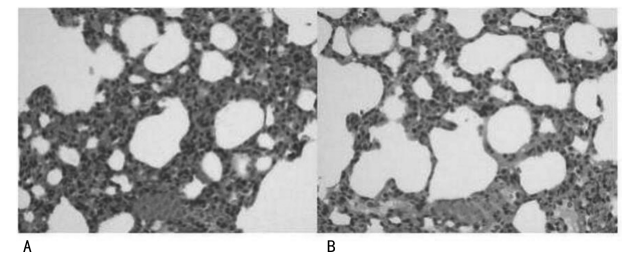
2.2 慢性阻塞性肺疾病模型的评价 慢性炎症反应是慢性阻塞性肺疾病的主要病理特征,病理切片检查是评价慢性阻塞性肺疾病建模是否成功的“金标准”,本实验采用病理切片以及 BALF 中主要炎症因子的水平来评价建模是否成功。熏烟小鼠的肺组织 HE 染色表现出明显的炎性细胞浸润,说明建模成功,见图 2。



注:A 为空白+溶剂组的肺组织 HE 染色(×200);B 为熏烟+溶剂组的肺组织 HE 染色(×200)

图 2 空白+溶剂组与熏烟+溶剂组小鼠肺组织 HE 染色

2.3 氟西汀治疗前后肺组织形态学对比 HE 染色结果显示,接受熏烟的小鼠的肺组织出现明显的炎性细胞浸润,熏烟+氟西汀组小鼠肺部组织炎症反应程度较低。说明氟西汀治疗能够减轻熏烟引起的肺组织炎症反应。见图 3。



注:A 为熏烟+溶剂组的肺组织 HE 染色(×200);B 为熏烟+氟西汀组的肺组织 HE 染色(×200)

图 3 熏烟+溶剂组与熏烟+氟西汀组小鼠肺组织 HE 染色图

2.4 4 组小鼠 BALF 中的炎症因子水平的比较 空白+氟西汀组 BALF 中的 IL-6 和 TNF-α 水平明显高于空白+溶剂组,差异有统计学意义($P<0.05$)。熏烟+氟西汀组 BALF 中 IL-6 和 TNF-α 水平明显低于熏烟+溶剂组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 4 组小鼠 IL-6 和 TNF-α 水平的比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)			
组别	n	IL-6	TNF-α
空白+氟西汀组	10	43.4±6.9	68.6±8.1
空白+溶剂组	10	21.4±4.2 [*]	47.4±6.1 [*]
熏烟+氟西汀组	10	45.3±6.0	69.6±8.4
熏烟+溶剂组	10	63.4±7.3 [‡]	97.4±9.1 [‡]

注:与空白+氟西汀组比较,^{*} $P<0.05$;与熏烟+氟西汀组比较,[‡] $P<0.05$

2.5 氟西汀对熏烟诱导的慢性阻塞性肺疾病小鼠的

GR 蛋白水平及其表达的影响 对海马区的总 GR 蛋白水平进行分析,发现与空白+溶剂组相比,熏烟+溶剂组小鼠 12 周后总 GR 蛋白水平显著降低(1.0 ± 0.1 vs. 0.5 ± 0.1 , $P<0.05$);建立慢性阻塞性肺疾病模型后,熏烟+氟西汀组的小鼠体内 GR 蛋白水平高于熏烟+溶剂组(0.9 ± 0.1 vs. 0.5 ± 0.1 , $P<0.05$),见图 4、5。

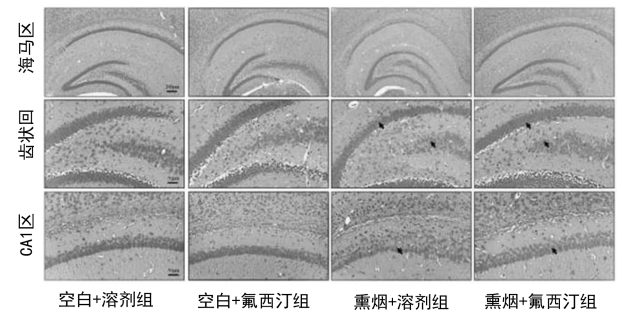


图 4 4 组小鼠海马区、齿状回、CA1 区 GR 表达情况

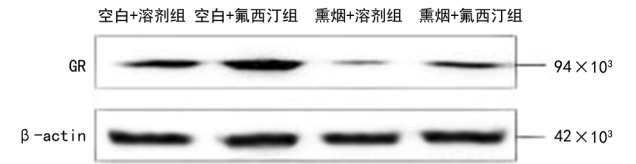


图 5 4 组小鼠海马组织 GR 表达情况的 Western blot 分析

3 讨 论

慢性阻塞性肺疾病是临床上常见的一种严重呼吸道疾病,主要特征是持续的气流受限,该病是全球第 4 大致死疾病,预计到 2020 年将成为第 3 大死因^[4-5]。慢性阻塞性肺疾病患者多有吸烟史,而吸烟又是慢性阻塞性肺疾病最重要的危险因素^[6-7],该病患者临床上常表现为呼吸困难、慢性咳嗽、咳痰、胸闷且反复发作等^[8]。

慢性阻塞性肺疾病的发生主要是系统性炎症所致^[9-10]。本研究结果显示,在肺的病理切片中,熏烟的小鼠支气管及支气管周围层炎性细胞浸润严重,肺组织内气隙增大,BALF 中 IL-6 和 TNF-α 水平升高,这是慢性阻塞性肺疾病动物模型的典型病理改变,说明模型建立成功。本研究将小鼠共分为 4 组,实验设计时为排除溶解氟西汀的溶剂即生理盐水的干扰,设置空白+溶剂组代表常规实验的对照组,设置熏烟+溶剂组代表常规实验的模型组,同时,为观察氟西汀对健康小鼠的影响,故设置空白+氟西汀组。同时,设置熏烟+氟西汀组意义为当常规实验模型成功后,运用氟西汀进行干预治疗,其与空白+氟西汀组相比较,可以了解氟西汀治疗对炎症反应的作用,与熏烟+溶剂组对比即可排除溶剂生理盐水的干扰,明确此过程发挥作用的是氟西汀而不是溶剂。本研究发现,进行熏烟处理的小鼠用氟西汀治疗后肺部炎症反应程度减弱,提示氟西汀治疗有利于改善慢性阻塞性肺疾病所致的肺损伤。而空白处理的小鼠接受氟西

汀治疗后,显示肺部炎症浸润有所增加。这些结果表明,长期氟西汀治疗,可能对肺组织产生双向作用,生理状态表现为促炎作用,病理状态表现为抗炎作用^[11]。GR 异常是糖皮质激素抵抗的机制之一^[12],影响机体的免疫调节、代谢、渗透压、生长发育等多种生理过程,并参与行为和认知的调节。有研究发现,慢性阻塞性肺疾病患者都伴有精神系统疾病,且多数患者都有吸烟史,而长期吸烟又与 GR 的激活密切相关,影响大脑的功能^[1]。氟西汀为临床广泛应用的 5-羟色胺再摄取抑制剂,可选择性地抑制 5-羟色胺转运体,阻断突触前膜对 5-羟色胺的再摄取,延长和增加 5-羟色胺的作用,从而对 GR 异常具有调节作用。氟西汀具有抗炎作用,同时对神经系统疾病有显著的治疗作用,为临床公认的神经系统治疗药物^[13],因此本研究采用氟西汀进行干预。结果显示,熏烟处理的小鼠 GR 蛋白水平降低,提示长期熏烟削弱了 GR 表达,氟西汀治疗后熏烟组降低的 GR 表达水平有所逆转,表现出氟西汀对 GR 的保护作用。

综上所述,熏烟能够诱导小鼠的炎症因子释放增加,影响肺功能,长期慢性炎症是导致慢性阻塞性肺疾病形成的重要因素。而经熏烟的慢性阻塞性肺疾病小鼠的神经系统 GR 蛋白水平及表达明显降低,氟西汀治疗能够减轻肺部炎症,改善肺功能,同时,能够逆转 GR 蛋白的持续降低,因此氟西汀对慢性阻塞性肺疾病小鼠的神经系统有一定的保护作用。

参考文献

- [1] YOHANNES A M, ALEXOPOULOS G S. Depression and anxiety in patients with COPD[J]. *Eur Respir*, 2014, 23(133):345-349.
- [2] BELLAVANCE M A, RIVEST S. The HPA-Immune Axis and the Immunomodulatory Actions of Glucocorticoids in the Brain[J]. *Front Immunol*, 2014, 5:136-141.
- [3] FRANK M G, HERSHMAN S A, WEBER M D, et al. Chronic exposure to exogenous glucocorticoids primes microglia to pro-inflammatory stimuli and induces NL-

RP3 mRNA in the hippocampus[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2014, 40:191-200.

- [4] BRATEK A, ZAWADA K, BEIL-GAWELCZYK J, et al. Depressiveness, symptoms of anxiety and cognitive dysfunctions in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD): possible associations with inflammation markers: a pilot study[J]. *J Neural Transm*, 2015, 122 (S1):83-91.
- [5] PUMAR M I, GRAY C R, WALSH J R, et al. Anxiety and depression-Important psychological comorbidities of COPD[J]. *J Thorac Dis*, 2014, 6(11):1615-1631.
- [6] GARVEY C. Recent updates in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Postgrad Med*, 2016, 128(2):231-238.
- [7] MATTE D L, PIZZICHINI M M, HOEPERS A T, et al. Prevalence of depression in COPD: a systematic review and meta-analysis of controlled studies[J]. *Respir Med*, 2016, 117:154-161.
- [8] 李艳玲, 张海松, 石丽娜, 等. 老年慢性阻塞性肺疾病患者应对与心理调适的关系[J]. *重庆医学*, 2015, 33(1):138-140.
- [9] 陈飞飞, 刘俊刚, 单俊好. 噻托溴铵对老年慢性阻塞性肺病患者肺功能及生活质量的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 21(1):26-28.
- [10] 石树青, 杨国华, 高峰, 等. 慢性阻塞性肺疾病并发焦虑抑郁的研究进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2016, 25(23):2619-2622.
- [11] 张宇. 氟西汀对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠 LCN2 及 CXCL10 的影响[D]. 太原:山西医科大学, 2014.
- [12] HORSBURGH S, ROBSON-ANSLEY P, ADAMS R, et al. Exercise and inflammation-related epigenetic modifications: focus on DNA methylation[J]. *Exerc Immunol Rev*, 2015, 21:26-41.
- [13] DU R H, TAN J, SUN X Y, et al. Fluoxetine Inhibits NL-RP3 Inflammasome Activation: Implication in Depression[J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2016, 19(9):pyw037.

(收稿日期:2019-03-22 修回日期:2019-07-21)

(上接第 3612 页)

- 管闭锁并食管气管瘘胸腔镜手术探讨[J]. *中华小儿外科杂志*, 2016, 37(10):738-741.
- [7] SHI K D, JI F. Prophylactic stenting for esophageal stricture prevention after endoscopic submucosal dissection[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(6):931-934.
- [8] 汪星, 刘海峰, 王玲, 等. 儿童难治性食管狭窄应用全覆膜支架治疗的并发症及处理对策[J]. *中国内镜杂志*, 2017, 23(7):91-95.
- [9] TRAPPEY A F, HIROSE S. Esophageal duplication and congenital esophageal stenosis[J]. *Semin Pediatr Surg*, 2017, 26(2):78-86.

- [10] 张大志, 吕建瑞. 全身麻醉复合表面麻醉在小儿咽喉部手术中的应用[J]. *陕西医学杂志*, 2017, 46(6):787-788.
- [11] 杨丽, 任贤俊, 董文理. 麻醉深度与小儿术后躁动的关系研究[J]. *检验医学与临床*, 2017, 14(23):3497-3499.
- [12] 吕晓红, 陈庆民, 孙治国, 等. 利多卡因三种方式用于预防老年患者全麻插管反应的临床效果观察[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(24):4699-4701.
- [13] 雷祖宝. 盐酸达克罗宁胶浆联合利多卡因雾化吸入在气管镜检查中麻醉效果评价[J]. *国际呼吸杂志*, 2017, 37(22):1732-1734.

(收稿日期:2019-04-18 修回日期:2019-08-18)