

IL-33、IL-8和NETs在慢性阻塞性肺疾病患者肺组织中的表达及其意义

张 妍, 卢献灵

(石河子大学第一附属医院呼吸内科, 新疆 石河子 832000)

[摘要] **目的:** 探讨白细胞介素33 (IL-33)、白细胞介素8 (IL-8) 和中性粒细胞胞外诱捕网 (NETs) 的主要成分髓过氧化物酶 (MPO) 及瓜氨酸化组蛋白3 (CitH3) 在慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 患者肺组织中的表达情况, 阐明IL-33、IL-8和NETs对COPD发生发展的影响。**方法:** 选取因肺部结节或肺部肿瘤行肺叶切除术的77例患者作为研究对象, 分为不吸烟对照组20例、吸烟对照组18例, 不吸烟COPD组19例和吸烟COPD组20例。收集研究对象的肺组织标本, HE染色观察各组患者肺组织病理形态表现, 免疫组织化学染色检测各组患者肺组织中IL-33、IL-8、CitH3和MPO蛋白的表达。采用Spearman相关分析COPD组患者肺组织中IL-33、IL-8、CitH3和MPO的蛋白表达水平之间及其与肺功能指标、平均内衬间隔 (MLI)、平均肺泡数 (MAN) 和Bosken评分的相关性。**结果:** 吸烟对照组患者气道Bosken评分明显高于不吸烟对照组 ($P < 0.001$); 不吸烟COPD组患者气道Bosken评分和MLI明显高于不吸烟对照组和吸烟对照组 ($P < 0.05$), MAN明显低于不吸烟对照组和吸烟对照组 ($P < 0.05$); 吸烟COPD组患者气道Bosken评分明显高于不吸烟对照组、吸烟对照组和不吸烟COPD组 ($P < 0.05$), MLI明显高于不吸烟对照组和吸烟对照组 ($P < 0.05$), MAN明显低于不吸烟对照组和吸烟对照组 ($P < 0.05$)。免疫组织化学染色, 吸烟COPD组患者肺组织中IL-33蛋白表达水平明显高于不吸烟对照组、吸烟对照组和不吸烟COPD组 ($P < 0.05$), IL-8、CitH3和MPO蛋白表达水平明显高于不吸烟对照组和吸烟对照组 ($P < 0.05$); 不吸烟COPD组患者肺组织中IL-33、IL-8、CitH3和MPO蛋白表达水平明显高于不吸烟对照组和吸烟对照组 ($P < 0.05$); Spearman相关性分析, COPD组患者肺组织中IL-33蛋白表达水平与第1秒用力呼气容积占用力肺活量的百分比 (FEV1/FVC)、第1秒用力呼气容积占预计值百分比 (FEV1%pred) 和MAN等呈负相关关系 ($r = -0.406$, $P < 0.05$; $r = -0.493$, $P < 0.01$; $r = -0.567$, $P < 0.05$), 与Bosken评分和MLI等呈正相关关系 ($r = 0.935$, $P < 0.001$; $r = 0.590$, $P < 0.001$); COPD组患者肺组织中IL-8蛋白表达水平与FEV1/FVC、FEV1%pred和MAN等呈负相关关系 ($r = -0.527$, $P < 0.01$; $r = -0.497$, $P < 0.01$; $r = -0.463$, $P < 0.01$), 与Bosken评分和MLI等呈正相关关系 ($r = 0.557$, $P < 0.001$; $r = 0.486$, $P < 0.01$); COPD组患者肺组织中CitH3蛋白表达水平与FEV1/FVC、FEV1%pred和MAN等呈负相关关系 ($r = -0.527$, $P < 0.01$; $r = -0.640$, $P < 0.001$; $r = -0.531$, $P < 0.01$), 与Bosken评分和MLI等呈正相关关系 ($r = 0.565$, $P < 0.001$; $r = 0.585$, $P < 0.001$); COPD组患者肺组织中MPO蛋白表达水平与FEV1/FVC呈负相关关系 ($r = -0.329$, $P < 0.05$), 与Bosken评分呈正相关关系 ($r = 0.410$, $P < 0.05$); COPD组患者肺组织中IL-8蛋白表达水平与CitH3和MPO蛋白表达水平呈正相关关系 ($r = 0.390$, $P < 0.05$; $r = 0.349$, $P < 0.05$); COPD组患者肺组织中IL-33蛋白表达水平与IL-8、CitH3和MPO蛋白表达水平呈正相关关系 ($r = 0.602$, $P < 0.001$; $r = 0.616$, $P < 0.001$; $r = 0.387$, $P < 0.05$)。**结论:** IL-33、IL-8和NETs在COPD患者肺组织中的表达水平升高, 三者可能参与COPD的慢性炎症, 并与疾病严重程度相关。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病; 白细胞介素33; 白细胞介素8; 中性粒细胞胞外诱捕网; 吸烟

[收稿日期] 2023-03-22

[基金项目] 新疆生产建设兵团科技局兵团指导性科技计划项目 (2022ZD039)

[作者简介] 张妍 (1996-), 女, 河南省周口市人, 在读硕士研究生, 主要从事呼吸系统疾病方面的研究。

[通信作者] 卢献灵, 教授, 硕士研究生导师 (E-mail: luxianlingmary@163.com)

[中图分类号] R563.9 [文献标志码] A

Expressions of IL-33, IL-8, and NETs in lung tissue of patients with chronic obstructive pulmonary disease and their significances

ZHANG Yu, LU Xianling

(Department of Respiratory Medicine, First Affiliated Hospital, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the expression levels of interleukin-33 (IL-33), interleukin-8 (IL-8), and the major components of neutrophil extracellular traps (NETs) -myeloperoxidase (MPO) and citrullinated histone H3 (CitH3) in lung tissue of the patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and to clarify the effects of IL-33, IL-8, and NETs on the occurrence and development of COPD. **Methods:** Seventy-seven patients underwent lobectomy due to pulmonary nodules or lung tumors were selected as the subjects and divided into non-smoking control group (20 cases), smoking control group (18 cases), non-smoking COPD group (19 cases), and smoking COPD group (20 cases). The lung tissue samples from the subjects were collected. HE staining was used to observe the pathomorphology of lung tissue of the patients in various groups; immunohistochemistry staining was used to detect the expression levels of IL-33, IL-8, CitH3, and MPO proteins in lung tissue of the patients in various groups; Spearman correlation analysis was used to detect the relationship between expression levels of IL-33, IL-8, CitH3, and MPO proteins in lung tissue of the patients in COPD groups and their correlations with lung function index, mean linear intercept (MLI), mean alveolar number (MAN), and Bosken score. **Results:** Compared with non-smoking control group, the airway Bosken score of the patients in smoking control group was significantly increased ($P < 0.001$); compared with non-smoking control and smoking control groups, the airway Bosken score and MLI of the patients in non-smoking COPD group were significantly increased ($P < 0.05$), while the MAN was significantly decreased ($P < 0.05$); compared with non-smoking control group, smoking control group, and non-smoking COPD group, the airway Bosken score of the patients in smoking COPD group was significantly increased ($P < 0.05$); compared with non-smoking control group and smoking control group, the MLI of the patients in smoking COPD group was significantly increased ($P < 0.05$), and the MAN was significantly decreased ($P < 0.05$). The immunohistochemistry staining results showed that compared with non-smoking control group, smoking control group, and non-smoking COPD group, the expression level of IL-33 in lung tissue of the patients in smoking COPD group was significantly increased ($P < 0.05$); compared with non-smoking control group and smoking control group, the expression levels of IL-8, CitH3, and MPO proteins in lung tissue of the patients in smoking COPD group were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with non-smoking control group and smoking control group, the expression levels of IL-33, IL-8, CitH3, and MPO proteins in lung tissue of the patients in non-smoking COPD group were significantly increased ($P < 0.05$). The Spearman correlation analysis results showed that there was a negative correlation between the expression level of IL-33 protein and forced expiratory volume in first second/forced vital capacity (FEV1/FVC), the forced expiratory volume in first second predicted FEV1 (FEV1%pred), and MAN ($r = -0.406$, $P < 0.05$; $r = -0.493$, $P < 0.01$; $r = -0.567$, $P < 0.05$) in lung tissue of the patients in COPD group, and there was a positive correlation with Bosken score and MLI ($r = 0.935$, $P < 0.001$; $r = 0.590$, $P < 0.001$);

the expression level of IL-8 protein in lung tissue of the patients in COPD group was negatively correlated with the FEV1/FVC, FEV1%pred, and MAN ($r = -0.527, P < 0.01$; $r = -0.497, P < 0.01$; $r = -0.463, P < 0.01$), and was positively correlated with the Bosken score and MLI ($r = 0.557, P < 0.001$; $r = 0.486, P < 0.01$); the expression level of CitH3 protein in lung tissue of the patients in COPD group was negatively correlated with the FEV1/FVC, FEV1%pred, and MAN ($r = -0.527, P < 0.01$; $r = -0.640, P < 0.001$; $r = -0.531, P < 0.01$), and was positively correlated with the Bosken score and MLI ($r = 0.565, P < 0.001$; $r = 0.585, P < 0.001$); the expression level of MPO protein in lung tissue of the patients in COPD group was positively correlated with the FEV1/FVC ($r = -0.329, P < 0.05$), and was positively correlated with the Bosken score ($r = 0.410, P < 0.05$); the expression level of IL-8 protein was positively correlated with the expression levels of CitH3 and MPO proteins ($r = 0.390, P < 0.05$; $r = 0.349, P < 0.05$); the expression level of IL-33 protein was positively correlated with the expression levels of IL-8, CitH3, and MPO proteins ($r = 0.602, P < 0.001$; $r = 0.616, P < 0.001$; $r = 0.387, P < 0.05$). **Conclusion:** The expression levels of IL-33, IL-8, and NETs in lung tissue of the COPD patients are increased, and they may be involved in the chronic inflammation of COPD and correlated with the severity of the disease.

KEYWORDS Chronic obstructive pulmonary disease; Interleukin-33; Interleukin-8; Neutrophil extracellular traps; Smoking

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种由气道和/ (或) 肺泡异常导致的慢性疾病, 以持续性气流受限为主要特征, COPD 的发生与气道炎症反应、氧化应激以及蛋白酶/抗蛋白酶失衡等有关^[1]。其中, 炎症机制在 COPD 的发病中起核心作用。中性粒细胞炎症被认为是 COPD 的特征之一^[2], 近年来, 中性粒细胞胞外诱捕网 (neutrophil extracellular traps, NETs) 作为中性粒细胞受到刺激后发生的一种新的细胞死亡形式, 逐渐被医学界所关注。NETs 是由 DNA 骨架和组蛋白组成的细胞外网状结构, 结合有髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)、瓜氨酸化组蛋白 3 (citrulline histone 3, CitH3)、中性粒细胞弹性蛋白酶 (neutrophil elastase, NE) 和组织蛋白 G 等中性粒细胞的颗粒蛋白, 这种独特的结构有利于中性粒细胞捕获和病原体清除, 发挥抗菌作用^[3]。已有研究表明 NETs 参与动脉粥样硬化^[4] 和系统性红斑狼疮^[5] 等多种疾病的病理过程。研究^[6] 显示: 在稳定期和急性加重期 COPD 患者的痰液中发现了 NETs, 且 NETs 的增多与 COPD 的严重程度相关, 但其具体作用机制尚不清楚。白细胞介素 8 (interleukin-8, IL-8) 是中性粒细胞的重要趋化因子, 已被证实能够促进 NETs 的形成^[7]。近几年被发现的白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1) 超家族的新成员——白细胞介素 33 (interleukin-33, IL-

33) 在 COPD 的慢性气道炎症反应中发挥关键作用, IL-33 可以促进 COPD 患者外周血单核细胞中 IL-8 的分泌^[8], 但其在 COPD 中是否促进 NETs 形成仍不清楚。本课题组前期研究^[9] 结果显示: COPD 患者外周血中的 IL-33、IL-8 和 NETs 表达水平升高, 且 NETs 表达水平与 COPD 患者肺功能下降和症状严重程度以及 IL-33 和 IL-8 蛋白表达水平存在关系, 表明 NETs 可能参与了 COPD 的发生发展。研究^[10] 表明: 对于组织标本中的 NETs 主要是检测其自身具有代表性的成分, 其中 MPO 和 CitH3 是 NETs 存在的综合指标, 因此本研究通过比较 COPD 患者和肺功能正常者肺组织中 IL-33、IL-8 及 NETs 蛋白的主要成分 CitH3 以及 MPO 的表达水平, 探讨 COPD 患者肺组织中 IL-33、IL-8 和 NETs 蛋白表达水平与 COPD 的相关性, 以期为进一步机制研究提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象和标本来源 收集 2021 年 10 月—2023 年 1 月本院胸外科因肺部结节或肺部肿瘤行肺叶切除术 77 例患者的临床资料及肺叶标本, 根据术前肺功能检查结果及吸烟史分为不吸烟对照组 ($n=20$)、吸烟对照组 ($n=18$)、不吸烟 COPD 组 ($n=19$) 和吸烟 COPD 组 ($n=20$)。所有样本收集及基本信息记录均获得入组研究对象知情同意, 实验方案由本院伦理委员会审查批准, 伦理审批号: KJX-2021-070-01。

1.2 诊断标准、纳入标准和排除标准 COPD的诊断标准依据中华医学会呼吸病学分会COPD学组于2021年制定的《慢性阻塞性肺疾病诊治指南》进行。纳入标准：因肺部结节或肺部肿瘤行肺叶切除术；病例组患者符合COPD诊断标准；对照组患者肺通气功能测定不符合COPD的诊断标准。排除标准：①其他慢性肺部疾病，包括间质性肺疾病、支气管哮喘、肺结核和矽肺等；②患有冠心病、肝肾疾病、2型糖尿病及自身免疫性疾病；③纳入前1个月内使用过全身糖皮质激素；④COPD患者处于急性发作期；⑤有放疗或化疗史；⑥无法配合试验者。

1.3 主要试剂和仪器 无水乙醇和4%多聚甲醛固定液（北京索莱宝公司），抗IL-33抗体（ab207737）、抗IL-8抗体（ab106350）、抗CitH3抗体（ab5103）和抗MPO抗体（ab208670）均购自英国Abcam公司，柠檬酸盐、免疫组织化学抗体稀释液和鼠/兔通用二抗均购自北京中杉金桥公司，DAB显色试剂盒（丹麦Dako公司）；石蜡包埋机（型号：DB-09）购自湖北德立森科技有限公司，切片机（型号：RM2235）购自德国Leica公司，漂烘片机（型号：YABO200）购自常州雅博电子设备有限公司，光学显微镜（型号：UB200i）购自重庆光电仪器有限公司。

1.4 一般临床资料的收集 收集入组患者的一般资料，包括患者性别、年龄、身高、体质量指数（body mass index, BMI）和吸烟指数（smoking index, SI；SI=每日吸烟支数×吸烟年数）等。术前1周进行肺功能检测，记录肺功能检查结果：第1秒用力呼气容积占用力肺活量的百分比（forced expiratory volume in first second/forced vital capacity, FEV1/FVC）和第1秒用力呼气容积占预计值百分比（forced expiratory volume in first second predicted, FEV1%pred）等。

1.5 HE染色检测各组患者肺组织平均内衬间隔（mean linear intercept, MLI）、平均肺泡数（mean alveolar numbers, MAN）和Bosken评分 手术切除肺叶后，取远离肺部结节病灶边缘5 cm以上，无癌细胞浸润的新鲜肺组织，大小为1.0 cm×1.0 cm×0.3 cm。肺组织块用生理盐水冲洗后置于装有4%多聚甲醛固定液的玻璃瓶中固定48 h，石蜡包埋切片，行HE染色后，光学显微镜下观察肺组织病理形态表现。按照参考文献[11]的方法，

每张切片随机取3个视野（避开大血管和支气管），显微镜下用相同的放大倍数（×100）观察，在每个视野的正中心划十字交叉线，计数与交叉线相交的肺泡隔数，以NS（个）表示，每个视野内的肺泡总数，以Na（个）表示，同时测出十字线总长，以L（mm）表示，每个视野的面积，以S（mm²）表示，按公式计算MLI，MLI（mm）=L/NS，以表示肺泡的平均内径；按公式计算MAN，MAN（个/mm²）=Na/S，以反映肺泡的密度。3个视野评分取平均值为每张切片的最终得分。使用改良式Bosken病理半定量评分标准^[12]评估气道炎症。

1.6 免疫组织化学染色检测各组肺组织中IL-33、IL-8、MPO和CitH3蛋白的表达 烤片，二甲苯脱蜡，梯度乙醇脱水，高压热修复，阻断内源性过氧化物酶后滴加一抗：抗IL-33抗体（1：2 000）、抗IL-8抗体（1：400）、抗CitH3抗体（1：200）和抗MPO抗体（1：250）4℃冰箱孵育过夜，PBS缓冲液浸洗后滴加二抗37℃孵育30 min，DAB显色，苏木素复染，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树脂封片。光镜下选择5个具有代表性的高倍视野（×400），记录每个视野对应抗体阳性细胞百分比（<5%计0分，5%~25%计1分，26%~50%计2分，51%~75%计3分，76%~100%计4分）及染色强度（无着色计0分，浅棕黄色计1分，棕黄色计2分，棕褐色计3分），总分=阳性细胞百分比计分×染色强度计分，以5个高倍视野下总分的平均值代表蛋白表达水平。

1.7 统计学分析 采用GraphPad Prism 8.0软件制图，SPSS 25.0统计软件进行统计学分析。各组患者肺功能指标、MLI、MAN、Bosken评分均符合正态分布，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间样本均数比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用Bonferroni法。各组患者肺组织中IL-33、IL-8、CitH3和MPO蛋白表达水平均不符合正态分布，以中位数（四分位数）[M（P25，P75）]表示，多组间比较采用Kruskal-Wallis秩和检验，组间两两比较采用Bonferroni法。采用Spearman相关分析COPD组患者肺组织中IL-33、IL-8、CitH3和MPO蛋白表达水平之间及其与肺功能指标、MLI、MAN和Bosken评分的相关性。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料 4组患者的年龄分布、性别构成

和BMI等一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。与吸烟COPD组比较,吸烟对照组患者SI差异无统计学意义($P>0.05$)。吸烟对照组患者的FEV1/FVC低于不吸烟对照组($P<0.001$),FEV1%pred低于不吸烟对照组

($P<0.05$)。吸烟COPD组和不吸烟COPD组患者的FEV1/FVC、FEV1%pred均明显低于不吸烟对照组和吸烟对照组($P<0.001$),其他各组上述指标比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 各组患者一般资料

Tab. 1 General data of patient in various groups

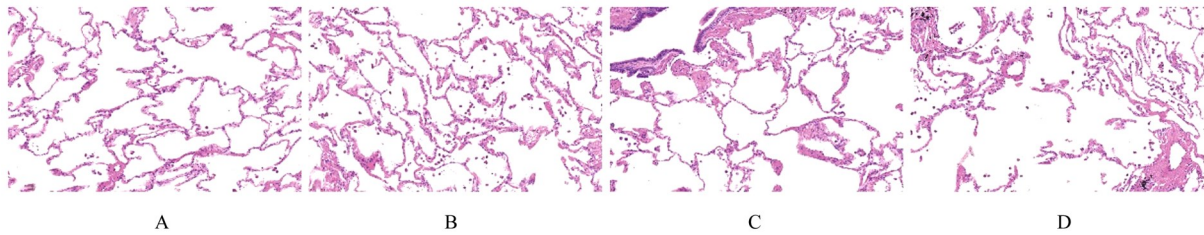
($\bar{x}\pm s$)

Group	<i>n</i>	Age(year)	Gender(Male/female)	BMI(kg·m ⁻²)	SI	FEV1/FVC	FEV1%pred
Non-smoking control	20	58.40±4.17	11/9	24.20±2.38	—	81.60±3.82	102.85±9.38
Smoking control	18	59.00±4.52	11/7	23.72±3.21	650.00±247.93	74.06±2.71*	93.78±9.83*
Non-smoking COPD	19	58.53±4.49	11/8	22.34±2.01	—	63.63±3.18* [△]	78.68±9.02* [△]
Smoking COPD	20	58.85±3.80	15/5	23.10±2.47	647.50±246.81	63.70±3.28* [△]	78.05±9.11* [△]
<i>F/χ²</i>		0.082	1.996	1.934	89.482	139.140	33.054
<i>P</i>		0.970	0.573	0.132	<0.001	<0.001	<0.001

“—”:No data.* $P<0.05$ compared with non-smoking control group; [△] $P<0.01$ compared with smoking control group.

2.2 各组患者肺组织病理形态表现 不吸烟对照组患者偶见支气管上皮纤毛倒伏,肺泡腔内偶见少量游离的巨噬细胞。吸烟对照组患者肺组织可见肺泡腔内有较多炎性细胞浸润,较多支气管上皮纤毛倒伏,肺泡腔略有扩大。不吸烟COPD组患者肺组织可见小面积肺泡壁增厚,肺泡壁可见少量结缔组织增生,伴有少量的炎性细胞浸润,较多支气管上皮纤毛倒伏,局部支气管可见少量支气管上皮细胞脱落,肺泡腔内可见少量游离的巨噬细胞;肺泡间隔变薄,肺泡腔扩大。吸烟COPD组患者肺组织可

见较多支气管上皮细胞脱落,偶见支气管堵塞,未见明显纤毛结构,支气管周围可见结缔组织增生,伴有较多中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞浸润;肺泡间隔明显变薄、断裂,肺大泡形成,见图1。吸烟COPD组患者Bosken评分明显高于不吸烟COPD组、吸烟对照组和不吸烟对照组($P<0.001$),不吸烟COPD组患者Bosken评分明显高于吸烟对照组和不吸烟对照组($P<0.001$),吸烟对照组患者Bosken评分明显高于不吸烟对照组($P<0.001$)。见表2。



A: Non-smoking control group; B: Smoking control group; C: Non-smoking COPD group; D: Smoking COPD group.

图1 各组患者肺组织形态表现(HE, ×200)

Fig. 1 Morphology of lung tissue of patients in various groups (HE, ×200)

2.3 各组患者肺组织MLI和MAN 不吸烟COPD组和吸烟COPD组MLI明显高于不吸烟对照组和吸烟对照组($P<0.001$);不吸烟COPD组和吸烟COPD组患者肺组织MAN明显低于不吸烟对照组和吸烟对照组($P<0.001$)。见表2。

2.4 各组患者肺组织中IL-33、IL-8、CitH3和MPO蛋白表达水平 IL-33蛋白主要在细胞核中表达,被标记为棕黄色颗粒,在气道、肺泡上皮细胞、气道周围和肺泡腔中浸润的炎细胞上表达。IL-8蛋白主要定位于细胞浆。CitH3和MPO阳性表达相似,在肺组织中呈单个或簇状黄褐色斑片,在肺泡壁、

表2 各组患者肺组织 Bosken 评分、MLI 和 MAN
Tab. 2 Bosken score, MIL, and NAN of lung tissue of patients in various groups

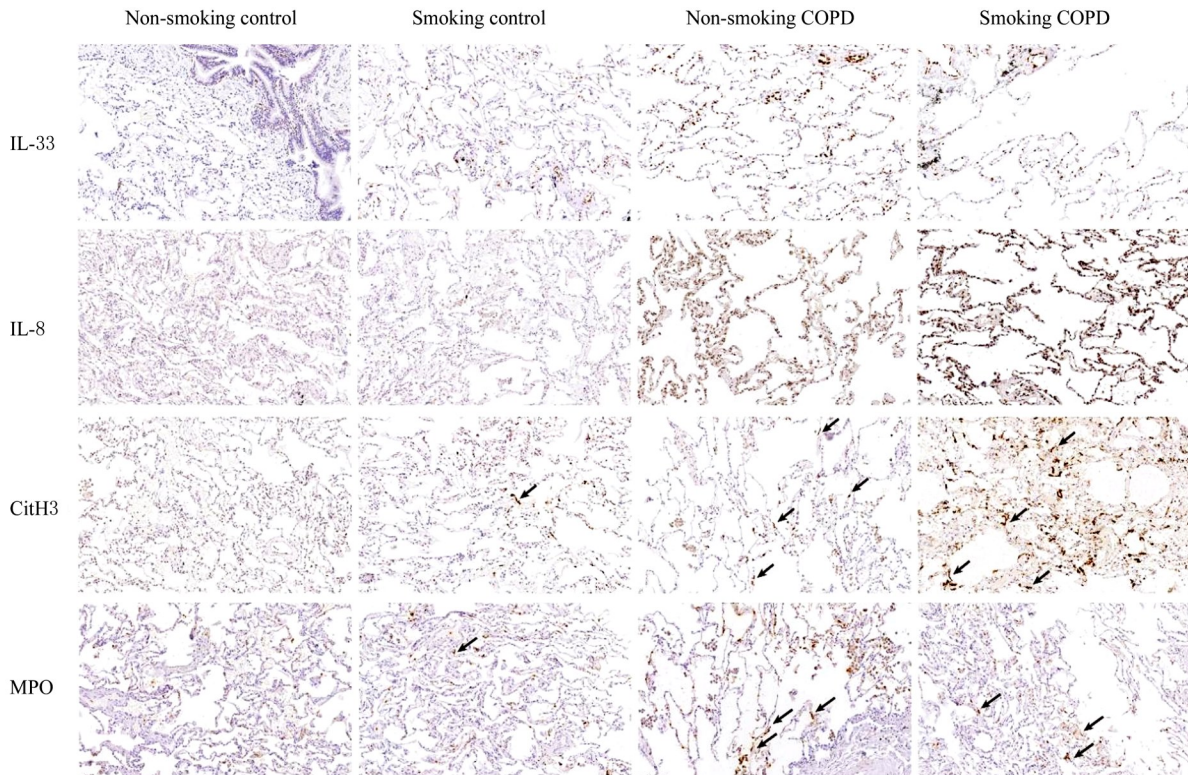
($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Bosken score	MLI(I/mm)	MAN(S/mm ²)
Non-smoking control	20	1.95 ± 1.28	0.10 ± 0.47	45.15 ± 3.82
Smoking control	18	7.28 ± 1.68*	0.12 ± 0.05	44.75 ± 4.55
Non-smoking COPD	19	12.11 ± 1.79 [△]	0.23 ± 0.04 [△]	30.72 ± 3.01 [△]
Smoking COPD	20	19.85 ± 1.90 ^{△#}	0.25 ± 0.06 [△]	29.53 ± 3.07 [△]
<i>F</i>		409.073	46.556	106.886
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

**P*<0.001 compared with non-smoking control group; [△]*P*<0.001 compared with smoking control group; #*P*<0.001 compared with non-smoking COPD group.

肺泡间隙和血管壁等部位均能观察到, 多数阳性信号存在于细胞外。见图 2。吸烟 COPD 组患者肺组织中 IL-33 蛋白的表达水平明显高于不吸烟对照组、吸烟对照组和不吸烟 COPD 组 (*P*<0.05), 吸烟 COPD 组患者肺组织中 IL-8、CitH3 和 MPO 蛋白表达水平明显高于不吸烟对照组和吸烟对照组 (*P*<0.05); 不吸烟 COPD 组患者肺组织中 IL-33、

IL-8、CitH3 和 MPO 蛋白的表达水平明显高于不吸烟对照组和吸烟对照组 (*P*<0.05); 不吸烟对照组与吸烟对照组患者肺组织中 IL-33 蛋白的表达水平比较差异无统计学意义 (*P*>0.05); 不吸烟对照组与吸烟对照组、不吸烟 COPD 组与吸烟 COPD 组患者肺组织中 IL-8、CitH3 和 MPO 蛋白表达水平比较差异无统计学意义 (*P*>0.05)。见表 3。



Arrows indicated expressions of CitH3 and MPO.

图2 各组患者肺组织中 IL-33、IL-8、CitH3 和 MPO 蛋白表达情况(免疫组织化学, ×200)

Fig. 2 Expressions of IL-33, IL-8, CitH3, and MPO proteins in lung tissue of patients in various groups (Immunohistochemistry, ×200)

表3 各组患者肺组织中IL-33、IL-8、CitH3和MPO蛋白表达水平

Tab. 3 Expression levels of IL-33, IL-8, CitH3, and MPO proteins in lung tissue of patients in various groups [M(P25, P75)]

Group	IL-33	IL-8	CitH3	MPO
Non-smoking control	0.30(0.05, 0.55)	0.00(0.00, 0.40)	0.00(0.00, 0.60)	0.40(0.00, 0.75)
Smoking control	0.60(0.35, 0.80)	0.10(0.00, 0.40)	0.80(0.30, 1.45)	0.70(0.15, 1.05)
Non-smoking COPD	6.00(4.80, 7.20)* [△]	5.20(1.60, 8.40)* [△]	2.80(2.00, 3.60)* [△]	2.40(2.00, 3.00)* [△]
Smoking COPD	10.20(8.55, 11.40)* ^{△#}	8.10(6.50, 10.05)* [△]	3.70(3.30, 4.60)* [△]	3.20(2.20, 4.00)* [△]
<i>H</i>	64.475	60.410	51.408	53.504
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$ compared with non-smoking control group; [△] $P < 0.05$ compared with smoking control group; [#] $P < 0.05$ compared with non-smoking COPD group.

2.5 COPD组患者肺组织中IL-33、IL-8、MPO和CitH3蛋白表达水平与肺功能指标、Bosken评分、MLI及MAN的相关性 Spearman相关性分析结果显示：COPD组患者肺组织中IL-33蛋白表达水平与FEV1/FVC、FEV1%pred和MAN均呈负相关关系 ($r = -0.406$, $P < 0.05$; $r = -0.493$, $P < 0.01$; $r = -0.567$, $P < 0.05$)，与Bosken评分和MLI呈正相关关系 ($r = 0.935$, $P < 0.001$; $r = 0.590$, $P < 0.001$)；IL-8蛋白表达水平与FEV1/FVC、FEV1%pred和MAN呈负相关关系 ($r = -0.527$, $P < 0.01$; $r = -0.497$, $P < 0.01$; $r = -0.463$, $P < 0.01$)，与Bosken评分和MLI呈正相关关系 ($r = 0.557$, $P < 0.001$; $r = 0.486$, $P < 0.01$)；CitH3蛋白表达水平与FEV1/FVC、FEV1%pred和MAN呈负相关关系 ($r = -0.527$, $P < 0.01$; $r = -0.640$, $P < 0.001$; $r = -0.531$, $P < 0.01$)，与Bosken评分和MLI呈正相关关系 ($r = 0.565$, $P < 0.001$; $r = 0.585$, $P < 0.001$)；MPO蛋白表达水平与FEV1/FVC呈负相关关系 ($r = -0.329$, $P < 0.05$)，与Bosken评分呈正相关关系 ($r = 0.410$, $P < 0.05$)。

2.6 COPD组患者肺组织中IL-33蛋白表达水平与IL-8和NETs蛋白表达水平的相关性 Spearman相关性分析结果显示：COPD组患者肺组织中IL-8蛋白表达水平与CitH3和MPO的蛋白表达水平呈正相关关系 ($r = 0.390$, $P < 0.05$; $r = 0.349$, $P < 0.05$)。COPD组患者肺组织中IL-33蛋白表达水平与IL-8、CitH3和MPO的蛋白表达水平呈正相关关系 ($r = 0.602$, $P < 0.001$; $r = 0.616$, $P < 0.001$; $r = 0.387$, $P < 0.05$)。

3 讨论

本研究通过对COPD患者及其对照患者肺组织形态学观察，采用免疫组织化学染色检测肺组织中IL-33、IL-8和NETs蛋白的表达，与对照组比较，COPD组患者肺组织中IL-33、IL-8和NETs蛋白表达水平明显升高，且与肺功能、气道炎症评分和肺气肿情况具有相关性，表明IL-33、IL-8和NETs可能参与了COPD的慢性炎症反应。

吸烟是COPD的主要危险因素，长期接触香烟烟雾会导致肺部不可逆的形态和功能改变，从而导致COPD的发展。部分COPD患者即使戒烟，气道中的慢性炎症仍然存在^[13]，但其具体机制仍不清楚。本研究结果显示：COPD组患者的气道炎症病理评分和肺气肿程度评分均明显高于肺功能正常组，提示COPD组患者肺组织存在慢性气道炎症，且气道壁和肺泡间隔中的炎细胞浸润严重破坏了肺组织正常形态，导致气道重塑。尽管吸烟对照组的肺气肿评分与不吸烟肺功能正常组相比差异无统计学意义，但气道和肺组织中的慢性炎症仍较明显，提示炎症反应在长期吸烟但肺功能正常的对照组中已经存在，但其肺组织内的慢性炎症尚未形成不可逆的组织损伤。终身吸烟者一生中只有10%~20%的COPD发病率，表明遗传易感性的重要性^[14]。本研究结果显示：吸烟COPD组患者较吸烟对照组的Bosken评分明显升高，而2组患者的SI比较差异无统计意义。本研究结果显示：相同吸烟量的COPD患者和肺功能正常者的肺泡损伤程度不同，本文作者推测吸烟COPD患者肺部异常炎症反应与吸烟对照组不同，是否肺气肿病变程度高者是COPD的易感人群，香烟烟雾诱导易感宿主产生持续气道炎症反应，最终导致COPD的发生，其具体

机制仍需进一步研究。

COPD患者的外周血和气道中存在NETs,且与气流受限、气道炎症和严重程度有关^[15]。本研究进一步在人体肺组织中检测到NETs的存在,作为NETs的主要蛋白成分,CitH3和MPO蛋白的表达水平可以反映NETs的水平,本研究结果显示:COPD组患者肺组织中CitH3和MPO蛋白的表达水平较肺功能正常组明显升高,表明NETs参与了COPD的气道炎症。但是目前关于NETs在COPD发病机制中的研究较少,本研究结果显示:COPD组患者肺组织中CitH3蛋白的表达水平与气道炎症水平、肺气肿评分和肺功能等指标具有相关性,随着CitH3和MPO蛋白表达水平升高,COPD患者肺功能下降越明显,气道周围炎症细胞浸润程度越高,肺泡破坏也越明显。本文作者推测NETs的形成是慢性气道炎症、肺气肿性肺泡破坏和COPD患者肺功能下降的重要因素。研究^[16]表明:COPD患者的当前吸烟状态及痰液的性质不会影响NETs的形成。COPD患者痰中的NETs水平升高与SI不相关^[17],这与本研究结果一致,本研究发现吸烟组与不吸烟组患者肺组织中NETs的形成没有差异,且吸烟组患者NETs蛋白的表达水平与SI无相关性。这与香烟烟雾能诱导NETs形成存在矛盾,本文作者推测烟草烟雾中含有多种成分,不同的成分对NETs的生成存在不同的影响。吸烟诱发的气道炎症在个体间存在差异,仍需进一步研究以确定香烟烟雾在NETs形成中的确切作用,以及NETs在COPD气道炎症中具体的作用机制。

IL-8是中性粒细胞的一种强效趋化细胞因子,不仅可以使中性粒细胞募集到炎症部位,还激活中性粒细胞释放颗粒内容物^[18]。本研究结果显示:COPD组患者肺组织中IL-8蛋白表达水平明显高于对照组,且IL-8蛋白表达水平与COPD患者的炎症水平和肺功能存在相关性,提示IL-8参与了COPD的气道炎症并与病情严重程度相关。IL-8通过促进NETs的形成参与癌症^[19]和动脉粥样硬化^[7]等疾病的进展。本研究发现COPD组患者肺组织中IL-8蛋白的表达水平与NETs蛋白的表达水平呈正相关关系,本文作者推测IL-8可能是通过促进NETs的形成参与COPD的发病机制。NETs的形成会上调IL-8蛋白的表达^[20]。由此本文作者推测当机体受到外界刺激时,一方面IL-8蛋白表达上调,将大量中性粒细胞招募到受损部位,刺激

NETs生成;另一方面,IL-8蛋白作为NETs中的成分进一步诱导NETosis,形成炎症因子之间的正反馈循环,这可能是COPD患者气道持续炎症反应的机制之一。

IL-33作为一种新型警报细胞因子,在多种慢性炎症疾病中参与调节免疫应答。本研究结果显示:对照组的支气管上皮细胞会表达少量IL-33蛋白,COPD患者不仅支气管上皮细胞中IL-33蛋白的表达水平明显升高,在肺泡上皮细胞中也可观察到IL-33蛋白的表达。结合本课题组前期研究^[9],本文作者推测IL-33蛋白可能与COPD全身和气道炎症有关。研究^[21]表明:IL-33可以诱导IL-8的生成从而参与疾病的发病。本研究结果显示:COPD组患者肺组织中IL-33蛋白表达水平与IL-8蛋白表达水平具有相关性,提示IL-33可能是通过促进IL-8的生成参与COPD的炎症反应。在不同病理情况下,IL-33可以募集中性粒细胞并且促进NETs形成^[22-23]。NETs蛋白的成分也能继续诱导IL-33蛋白的活化^[24]。本课题组前期研究^[9]也发现COPD急性加重期患者血浆IL-33蛋白表达水平与NETs蛋白表达水平具有相关性,结合本研究中COPD患者肺组织中IL-33蛋白表达水平与IL-8和NETs蛋白表达水平呈正相关关系,进一步证实三者在COPD的炎症机制中可能存在相互作用。本文作者推测IL-33蛋白可能是通过诱导释放中性粒细胞趋化因子IL-8,促进中性粒细胞向气道炎症部位聚集并形成NETs,NETs蛋白的成分一方面可能损伤气道,另一方面进一步诱导IL-33和IL-8蛋白的生成与释放,这种炎症因子之间的正反馈循环加重了肺组织的破坏,这可能是COPD慢性气道炎症和肺功能持续下降的一种机制。

暴露于香烟烟雾后,IL-33的受体ST2的分布发生改变^[25]。研究^[26]表明:使用香烟烟雾提取物刺激体外培养的支气管上皮细胞,COPD组患者肺组织中IL-33蛋白的分泌水平明显升高,而健康对照组研究对象肺组织中IL-33蛋白的表达水平差异无统计学意义。本研究结果显示:吸烟COPD组较不吸烟COPD组患者肺组织中IL-33蛋白表达水平明显升高,而对照组吸烟与不吸烟对IL-33蛋白表达的影响并不明显。本文作者推测这种差异可能与气道IL-33释放的个体易感性有关。气道和肺泡的上皮细胞是香烟烟雾的主要靶标,可能是吸烟导致COPD患者的气道上皮细胞损伤,从而使IL-33蛋

白的表达和释放增加,诱导COPD患者体内的炎症级联反应。然而本研究结果显示:COPD组患者肺组织中IL-33的蛋白表达水平与SI不相关,其原因可能是COPD患者体内除吸烟因素外,仍有其他因素影响IL-33蛋白的表达。本研究受规模限制,纳入的研究对象局限于本医院,样本量偏小,纳入的COPD患者多为轻中度患者,可能对研究结果存在一定影响,有待进一步完善。

综上所述,IL-33、IL-8和NETs在COPD患者的肺组织中表达水平升高,IL-33蛋白的表达水平与IL-8和NETs蛋白表达水平具有相关性,且三者与COPD患者的肺功能下降、气道炎症水平具有相关性,提示IL-33、IL-8和NETs在COPD患者的炎症机制及病情进展中发挥重要作用。但其具体机制较为复杂,后续仍需进一步深入探索。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

张好和卢献灵负责论文的整体设计,张好负责论文的撰写和数据的统计学分析。

[参考文献]

- [1] CELLI B, FABBRI L, CRINER G, et al. Definition and nomenclature of chronic obstructive pulmonary disease: time for its revision[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2022, 206(11): 1317-1325.
- [2] HERRERO-CERVERA A, SOEHNLEINO, KENNEE. Neutrophils in chronic inflammatory diseases [J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(2): 177-191.
- [3] LI T, ZHANG Z, LI X, et al. Neutrophil extracellular traps: signaling properties and disease relevance [J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 1-14.
- [4] DÖRING Y, SOEHNLEIN O, WEBER C. Neutrophil extracellular traps in atherosclerosis and atherothrombosis[J]. *Circ Res*, 2017, 120(4): 736-743.
- [5] 林笑颖, 周明倩, 李海昌. 中性粒细胞胞外诱捕网在系统性红斑狼疮发病机制中作用的研究进展[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2018, 44(4): 886-890.
- [6] GRABCANOVIC-MUSIJA F, OBERMAYER A, STOIBER W, et al. Neutrophil extracellular trap (NET) formation characterises stable and exacerbated COPD and correlates with airflow limitation[J]. *Respir Res*, 2015, 16(1): 59.
- [7] AN Z, LI J, YU J, et al. Neutrophil extracellular traps induced by IL-8 aggravate atherosclerosis via activation NF- κ B signaling in macrophages[J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(21): 2928-2938.
- [8] SHANG J, ZHAO J, WU X, et al. Interleukin-33 promotes inflammatory cytokine production in chronic airway inflammation[J]. *Biochem Biol*, 2015, 93(4): 359-366.
- [9] 范傲, 黄钟, 段宇清, 等. 慢性阻塞性肺疾病患者血浆中性粒细胞胞外诱捕网和白细胞介素-8及白细胞介素-33的表达水平及其临床意义[J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2022, 21(2): 84-89.
- [10] SANTOS A, MARTIN P, BLASCO A, et al. NETs detection and quantification in paraffin embedded samples using confocal microscopy [J]. *Micron*, 2018, 114: 1-7.
- [11] SHENG H, ZHANG Y, SHI X, et al. Functional, ultrastructural, and transcriptomic changes in rat diaphragms with different durations of cigarette smoke exposure [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2020, 15: 3135-3145.
- [12] ZHENG X R, ZHANG L Y, CHEN J, et al. Dendritic cells and Th17/Treg ratio play critical roles in pathogenic process of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2018, 108: 1141-1151.
- [13] HIKICHI M, MIZUMURA K, MARUOKA S, et al. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by cigarette smoke [J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(Suppl 17): S2129-S2140.
- [14] PÉREZ-RUBIO G, CÓRDOBA-LANÚS E, CUPERTINO P, et al. Role of genetic susceptibility in nicotine addiction and chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Rev Invest Clin*, 2019, 71(1): 36-54.
- [15] DICKER A J, CRICHTON M L, PUMPHREY E G, et al. Neutrophil extracellular traps are associated with disease severity and microbiota diversity in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(1): 117-127.
- [16] PEDERSEN F, MARWITZ S, HOLZ O, et al. Neutrophil extracellular trap formation and extracellular DNA in sputum of stable COPD patients [J]. *Respir Med*, 2015, 109(10): 1360-1362.
- [17] ZHANG H, QIU S L, TANG Q Y, et al. Erythromycin suppresses neutrophil extracellular traps in smoking-related chronic pulmonary inflammation [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(9): 678.
- [18] MATSUSHIMA K, YANG D, OPPENHEIM J J. Interleukin-8: an evolving chemokine [J]. *Cytokine*, 2022, 153: 155828.

- [19] NIE M, YANG L B, BI X W, et al. Neutrophil extracellular traps induced by IL8 promote diffuse large B-cell lymphoma progression via the TLR9 signaling[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(6): 1867-1879.
- [20] HUDOCK K M, COLLINS M S, IMBROGNO M, et al. Neutrophil extracellular traps activate IL-8 and IL-1 expression in human bronchial epithelia [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2020, 319(1): L137-L147.
- [21] WU H X, YANG S F, WU X J, et al. Interleukin-33/ST2 signaling promotes production of interleukin-6 and interleukin-8 in systemic inflammation in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(1): 110-116.
- [22] WANG X D, LI X Y, CHEN L Y, et al. Interleukin-33 facilitates cutaneous defense against *Staphylococcus aureus* by promoting the development of neutrophil extracellular trap [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 81: 106256.
- [23] TEMBHRE M K, SRIWASTVA M K, HOTE M P, et al. Interleukin-33 induces neutrophil extracellular trap (NET) formation and macrophage necroptosis via enhancing oxidative stress and secretion of proatherogenic factors in advanced atherosclerosis [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(12): 2343.
- [24] GEORGAKIS S, GKIRTZIMANAKI K, PAPADAKI G, et al. NETs decorated with bioactive IL-33 infiltrate inflamed tissues and induce IFN- α production in patients with SLE [J]. *JCI Insight*, 6(21): e147671.
- [25] KEARLEY J, SILVER J S, SANDEN C, et al. Cigarette smoke silences innate lymphoid cell function and facilitates an exacerbated type I interleukin-33-dependent response to infection [J]. *Immunity*, 2015, 42(3): 566-579.
- [26] XIA J, ZHAO J L, SHANG J, et al. Increased IL-33 expression in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 308(7): L619-L627.