

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.13.006

文章编号: 1005-8982 (2018) 13-0033-07

羧甲司坦对人气道上皮细胞炎症的影响及调控机制研究

郭莹¹, 康健², 柴文成¹, 潘殿柱¹, 车丽燕¹, 王荣¹, 李靖¹, 阎雪¹, 安晓琴¹

(1. 锦州医科大学附属第一医院 呼吸科, 辽宁 锦州 121001; 2. 中国医科大学
附属第一医院 呼吸疾病研究所, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: **目的** 通过比较羧甲司坦单用或联合布地奈德对人气道上皮细胞炎症的影响探讨其调控机制。**方法** MTT法检测不同浓度烟雾提取物(CSE)对细胞生存率的影响。给予不同药物抑制剂和激动剂干预后,检测炎症因子水平、ERK和I κ B α 蛋白,以及ERK和NF- κ B mRNA的表达。**结果** 模型组炎症因子水平、p-ERK和p-I κ B α 蛋白,以及ERK和NF- κ B mRNA表达均增高;用药组上述指标较模型组均有所改善,但用药组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。羧甲司坦、PD98059干预后p-ERK蛋白及ERK、NF- κ B mRNA水平均降低,而给予EGF干预后上述指标较羧甲司坦组有所回升。**结论** 羧甲司坦的抗炎机制可能与糖皮质激素存在重叠,基础应用糖皮质激素者由于抑制了相同的信号转导通路,故再联合应用羧甲司坦时效果不佳。

关键词: 羧甲司坦; 布地奈德; 人气道上皮细胞; 炎症

中图分类号: R562.2

文献标识码: A

Effect of Carbocisteine on inflammatory factor levels in human 16HBE cells and its regulatory mechanisms

Ying Guo¹, Jian Kang², Wen-shu Chai¹, Dian-zhu Pan¹, Li-yan Che¹,

Rong Wang¹, Jing Li¹, Xue Yan¹, Xiao-qin An¹

(1. Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 2. Institute of Respiratory Diseases, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China)

Abstract: **Objective** To compare the anti-inflammatory effect of Carbocisteine alone or combined with Budesonide in the airway epithelial cell model, and identify the regulatory mechanisms. **Methods** MTT method was used to determine cell survival rate after treatment with cigarette smoke extract (CSE). After various drugs and inhibitor/stimulator treatment, ELISA was used to detect the inflammatory factor levels, Western blot was used for determination of ERK and I κ B α proteins, and RT-PCR was used to detect the transcription abundance of ERK and NF- κ B. **Results** The model group showed significant elevation of inflammatory factors, increased ERK and I κ B α protein abundance, and upregulation of ERK and NF- κ B mRNAs. Although treatment with Carbocisteine and glucocorticoid respectively showed anti-inflammatory effect, no statistical significance was detected when these two drugs were combined. Further study showed the significant decrease of p-ERK protein and ERK mRNA and NF- κ B mRNA abundance after Carbocisteine and the inhibitor (PD98059) treatment. The effect was partially reversed by the application of the stimulator (EGF). **Conclusions** Carbocisteine has similar anti-inflammatory mechanism as glucocorticoid. Combination of these two drugs doesn't show significant synergistic effect due to suppression of the same signal transduction pathway.

Keywords: Carbocisteine; Budesonide. airway epithelial cell; inflammation

收稿日期: 2017-09-17

气道上皮细胞是抵御外界环境刺激物的第一道防线,吸入的香烟烟雾首先与之接触,引起气道和肺部的炎症反应,释放各种炎症介质和细胞因子。其中白细胞介素 8 (Interleutin-8, IL-8) 是最为重要的细胞因子,是迄今发现的最强的中性粒细胞趋化因子,是中性粒细胞活化的标志。此外还有肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6、IL-10 等也与炎症过程有密切关系^[1]。其能有效地激活细胞内途径(即 NF- κ B 和其他信号),导致疾病的演变和各种相关症状的产生^[2]。

羧甲司坦除了作为一种临床常用的黏液调节剂^[3],还具有显著的抗炎作用。研究发现,含半胱氨酸的药物,如羧甲司坦和 N-乙酰半胱氨酸等能够减少促炎细胞因子(TNF- α 、IL-6、IL-8)的产生^[4]。已有大量的基础和临床研究证实,羧甲司坦的抗炎作用比其本身的祛痰作用更为显著。近年的临床研究发现,应用羧甲司坦可明显减少慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)患者的急性加重,延长发作间歇^[5]。但国外同等规模流行病学调查显示应用祛痰类药物效果不明显,分析 2 者之间的差异,发现国外 COPD 患者基础常规应用吸入性糖皮质激素,而我国 PEACE 研究中入选的 COPD 患者中仅有 16.7% 不规律应用吸入性糖皮质激素。由此推测合用吸入性糖皮质激素可能是差异产生的重要原因。众所周知,糖皮质激素具有全身抗炎作用,尤其是吸入糖皮质激素已被广泛应用于临床治疗哮喘及 COPD 患者。那么,糖皮质激素充分抗炎的“天花板效应”是否就是羧甲司坦未能发挥作用的原因呢?糖皮质激素影响羧甲司坦发挥作用的机制又是什么呢?因此,本研究旨在通过体外细胞实验证明:羧甲司坦的抗炎机制可能与糖皮质激素存在重叠,基础应用糖皮质激素者由于占用了相同的信号转导通路使某些炎症靶点受抑制,故再联合应用羧甲司坦时效果不佳。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

羧甲司坦、布地奈德(杭州宝仑生物公司),标准研究用烟(1R3F,美国肯塔基大学),RPMI 1640 培养基(美国 Hyclone 公司),胎牛血清、青链霉素混合液(北京 Solarbio 公司),EGF(美国 Pepro Tech 公司),PD98059(美国 Selleck 公司),MTT、DMSO(美

国 Sigma 公司),ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司),ERK、p-ERK、I κ B α 、p-I κ B α 抗体(英国 Abcam 公司),二抗(羊抗小鼠、羊抗兔)(北京中杉金桥公司), β -actin、ERK、NF- κ B 引物(上海生工公司),无水 RNA 酶(美国 Thermo 公司),RNAiso Plus(日本 TaKaRa 公司),实时聚合酶链反应(real-time PCR)试剂盒(日本 TaKaRa 公司),CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo Scientific HERA cell 150i),酶标仪(美国 Biotek 公司),电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),PCR 仪(英国 Techne 公司),实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)仪(TP800,日本 TaKaRa 公司)。

1.2 人气道上皮细胞培养、烟雾提取液制备及分组

1.2.1 人气道上皮细胞株(16HBE 细胞) 购于中国医学科学院肿瘤细胞库。

1.2.2 烟雾提取物的制备 参照文献[6]方法,点燃一支香烟用 50 ml 注射器连续抽吸,香烟燃烧速度约为 5 min/支,吸入的烟雾经三通管缓慢注入盛有 10 ml RPMI 1640 培养液的密封瓶中制成悬液,摇晃使其充分溶解,调定至 pH 7.4。经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌,存于冰中。制备的(cigarette smoke extract, CSE)浓度设定为 100.00%,稀释不同浓度的 CSE 30 min 内用于实验。

1.2.3 分组 分别给予不同干预因素,24 h 后收集细胞用于实验。①对照组(N 组):正常培养细胞。②模型组(CN 组):细胞培养液中加入 CSE。③羧甲司坦组(CC 组):细胞培养液中加入 CSE 和 10 ~ 4 M 羧甲司坦。④布地奈德组(CB 组):细胞培养液中加入 CSE 和 10 ~ 8 mol/L 布地奈德。⑤联合组(CCB 组):先加布地奈德处理细胞 1 d 后再加羧甲司坦干预。⑥抑制剂组(CNP 组):细胞培养液中加入 CSE 和 100 μ mol/L ERK1/2 抑制剂 PD98059。⑦激动剂组(CCE 组):在羧甲司坦组基础上加入 10 ng/ml ERK1/2 激动剂 EGF。

1.3 MTT 法检测不同浓度 CSE 对细胞生存率的影响

收集对数期细胞,铺板,孵育至细胞单层铺满孔底,加入不同浓度 CSE(分别为 80.00%、40.00%、20.00%、10.00%、5.00%、2.50%、1.25%、0.63% 和 0.00%),分别于干预后 1、3、6、12、24 和 48 h 处理细胞。每孔加入 20 μ l MTT 溶液,继续培养 4 h 终止培养,每孔加入 150 μ l 二甲基亚砷,摇床振

荡 10 min, 酶标仪检测吸光度。终吸光度 A 值 = A570 nm-A630 nm, 细胞生存率 (%) = A 加药孔 / A 对照孔 × 100%。

1.4 ELISA 检测炎症因子 IL-8、IL-6 水平的变化

准备试剂、样本, 按比例稀释标准品; 加样(标准品及样本)各 100 μl, 室温孵育 2 h; 吸弃, 洗板 4 次; 加酶标检测抗体 200 μl, 室温孵育 2 h; 吸弃, 洗板 4 次; 加显色底物 200 μl, 室温孵育 30 min; 加终止液 50 μl, 450 nm 波长酶标仪测量 OD 值, 540 nm 作为校正波长。

1.5 Western blot 检测 ERK、p-ERK、IκBα、p-IκBα 蛋白水平的变化

RIPA 裂解液(RIPA 75%、PMSF 10%、cocktail 15%)裂解细胞, 离心取上清液采用 BCA 法测定蛋白浓度。与上样缓冲液混合后上样, SDS-PAGE(10%分离胶, 5%浓缩胶)电泳, 电转移至 PVDF 膜。与一抗多克隆抗体 ERK、p-ERK、IκBα、p-IκBα 孵育, 4℃过夜。加入 1:2 500 稀释的二抗室温下孵育, 洗膜后显色, 于凝胶自动成像分析系统下成像, 采用 Image J 图像分析软件对条带进行灰度值测定。

1.6 qRT-PCR 检测 ERK、NF-κB mRNA 水平的变化

Trizol 法提取细胞总 RNA, 按 cDNA 合成试剂盒说明配置反应体系, 在 PCR 仪中 37℃ 15 min, 85℃ 5 s 逆转录合成 cDNA。以此为模板分别加入 NF-κB、ERK1/2、β-actin 的引物(β-actin-F: 5'-ATAGCACA GCCTGGATAGCAACGTAC-3'; β-actin-R: 5'-CACC TTCTACAATGAGCTGCGTGTG-3'; ERK1/2-F: 5'-CAACGTGCTCCACCGAGAT-3'; ERK1/2-R: 5'-TCA TGCTCAGGATCGGCAAT-3'; NF-κB-F: 5'-CAATCGT

GCCCCCAACACT-3'; NF-κB-R: 5'-GTCCTCTTTC TGCACCTTGTGCAC-3')和荧光染料在 qRT-PCR 仪上进行扩增, 95℃预变性 30 s, 95℃变性 5 s, 60℃退火/延伸 30 s, 40 个循环。基因相对表达量以 2^{-ΔΔCt} 法分析。即 ΔΔCt = (Ct 目的基因 - Ct 内参基因) 实验组 - (Ct 目的基因 - Ct 内参基因) 对照组。各组之间的表达差异用 2^{-ΔΔCt} 表示。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组样本间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同时间不同浓度 CSE 对 HBE 细胞生存率的影响

CSE 浓度在 0.63% ~ 5.00% 时, 对 HBE 细胞的抑制作用轻微, 不同时间点差异无统计学意义(*P* > 0.05)。随着 CSE 浓度的升高, HBE 细胞的生存率呈下降趋势。CSE 浓度在 10.00% ~ 80.00%, 随着作用时间的延长,

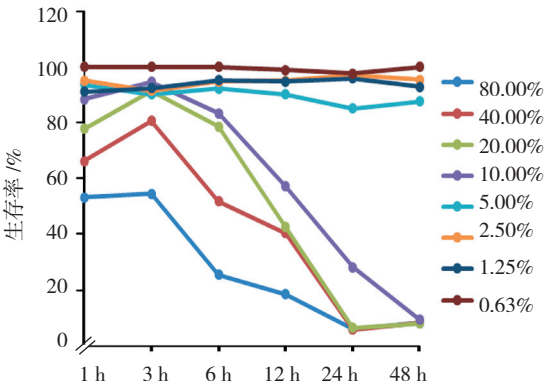


图 1 不同浓度 CSE 对 HBE 细胞生存率的影响

表 1 不同浓度 CSE 作用下不同时间 HBE 细胞的生存率 (% , $\bar{x} \pm s$)

浓度	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
0.63%	99.54 ± 0.44	99.27 ± 1.08	99.22 ± 0.95	99.30 ± 0.36	98.90 ± 1.23	99.30 ± 0.78	0.128	0.968
1.25%	92.21 ± 1.75	92.94 ± 2.02	94.88 ± 2.91	94.97 ± 1.55	95.57 ± 1.87	92.97 ± 1.50	1.443	0.278
2.50%	93.52 ± 14.93	91.39 ± 47.32	100.00 ± 37.29	95.44 ± 2.82	95.02 ± 3.06	95.73 ± 2.49	0.053	0.998
5.00%	88.41 ± 14.46	90.14 ± 15.42	95.23 ± 24.60	90.32 ± 4.46	85.61 ± 3.72	87.80 ± 2.53	0.198	0.960
10.00%	89.00 ± 13.56	94.62 ± 13.94	90.14 ± 15.42	95.23 ± 24.60	28.68 ± 10.81	9.18 ± 3.00	24.822	0.000
20.00%	77.73 ± 19.47	91.24 ± 26.46	78.81 ± 18.00	4.25 ± 8.30	6.29 ± 3.79	8.67 ± 5.41	15.826	0.000
40.00%	66.21 ± 4.84	80.33 ± 27.84	51.76 ± 12.60	40.38 ± 14.47	5.50 ± 1.74	7.83 ± 3.00	14.993	0.000
80.00%	53.21 ± 8.44	54.46 ± 7.16	25.49 ± 5.91	18.40 ± 4.13	5.95 ± 1.77	8.47 ± 2.61	50.898	0.000

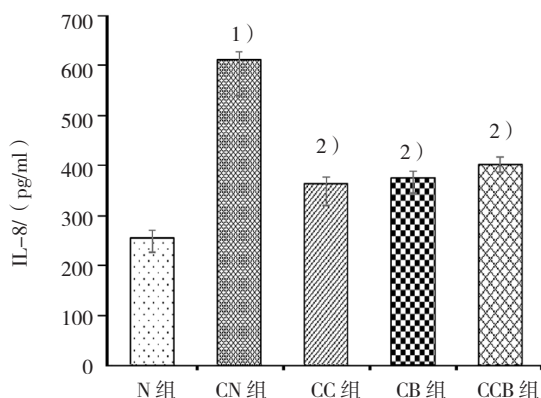
细胞生存率降低, 细胞大量死亡, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。故本实验选择 5.00% CSE 进行以下实验。见图 1 和表 1。

2.2 细胞上清中 IL-8、IL-6 水平

通过 ELISA 法检测细胞上清中炎症因子水平结果显示, CN 组 IL-8、IL-6 水平均较 N 组升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), CC 组、CB 组及 CCB 组上述指标均较模型组有所降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 但 3 组 IL-8、IL-6 水平作两两比较, 差异

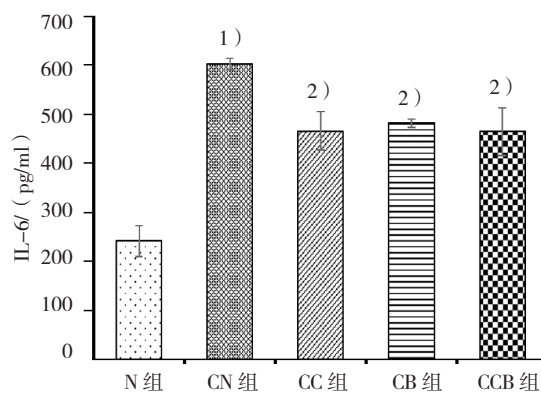
表 2 细胞上清中 IL-8、IL-6 水平 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-8	IL-6
N 组	254.67 $\pm$ 29.32	241.73 $\pm$ 30.88
CN 组	608.76 $\pm$ 71.55	602.12 $\pm$ 11.57
CC 组	361.60 $\pm$ 42.70	466.21 $\pm$ 39.60
CB 组	373.05 $\pm$ 30.13	481.73 $\pm$ 7.80
CCB 组	400.40 $\pm$ 14.66	464.72 $\pm$ 49.18
F 值	28.110	49.650
P 值	0.000	0.000



1) 与 N 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 CN 组比较, $P < 0.05$

图 2 细胞上清中 IL-8 水平



1) 与 N 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 CN 组比较, $P < 0.05$

图 3 细胞上清中 IL-6 水平

无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2 和图 2、3。

2.3 不同药物干预对 HBE 细胞 ERK、I κ B α 磷酸化的影响

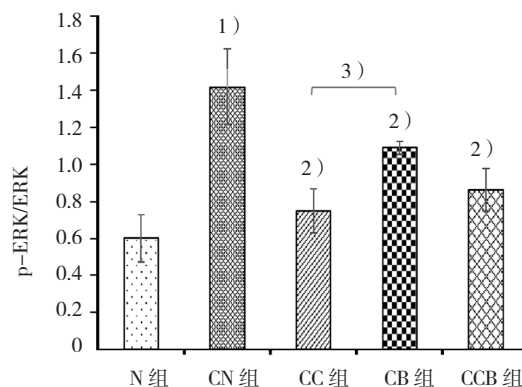
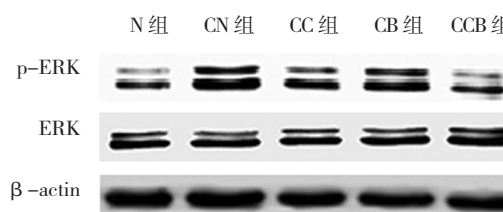
与 N 组比较, CN 组 HBE 细胞 p-ERK、p-I κ B α 蛋白表达均增高, 差异有统计学意义 ($t = 5.041$, $P = 0.000$); CC 组、CB 组及 CCB 组上述指标较 CN 组均降低, 差异有统计学意义 (p-ERK: 3 组 $t = 3.355$ 、2.306 和 2.896, $P = 0.004$ 、0.023 和 0.012; p-I κ B α : 3 组 $t = 2.896$ 、2.764 和 2.228; $P = 0.012$ 、0.015 和 0.020); CC 组与 CB 组 p-ERK 比较, 差异有统计学意义 ($t = 3.013$, $P = 0.034$), CCB 组与 CB 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); p-I κ B α 蛋白表达给药的 3 组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 4、5。

2.4 PD98059、EGF 对 HBE 细胞 ERK 磷酸化的影响

与 N 组比较, CN 组 HBE 细胞 p-ERK 表达增强 ($t = 2.718$, $P = 0.016$), 分别给予羧甲司坦、PD98059 干预后 p-ERK 均降低 ($t = 1.999$ 和 2.201, $P = 0.038$ 和 0.022), 而给予 EGF 干预后, p-ERK 的表达 CN 组与 CC 组比较, 差异有统计学意义 ($t = 1.812$, $P = 0.041$), CN 组有所回升。见图 6。

2.5 各组细胞 ERK、NF- κ B mRNA 水平的变化

与 N 组比较, CN 组细胞 ERK、NF- κ B mRNA 表达均增高 ($t = 2.262$ 和 1.940, $P = 0.025$ 和 0.031); 分



1) 与 N 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 CN 组比较, $P < 0.05$; 3) CC 组与 CB 组比较, $P < 0.05$

图 4 p-ERK 蛋白表达

别给予羧甲司坦、布地奈德、两药联合及 PD98059 干预后 ERK mRNA ($t=1.999$ 、 1.940 、 1.895 和 2.896 , $P=0.038$ 、 0.030 、 0.045 和 0.011) 及 NF- κ B mRNA ($t=1.812$ 、 2.005 、 1.857 和 2.998 , $P=0.042$ 、 0.036 、 0.043

和 0.009) 表达水平降低, 而给予 EGF 干预后 ERK 和 NF- κ B mRNA CN 组与 CC 组比较, 差异有统计学意义 ($t=2.764$ 和 2.228 , $P=0.015$ 和 0.021), CN 组有所回升。见图 7、8。

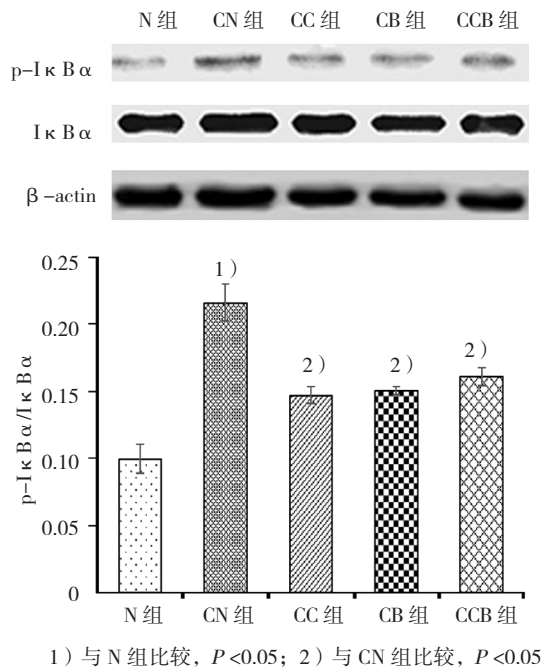


图 5 p-IκBα 蛋白表达

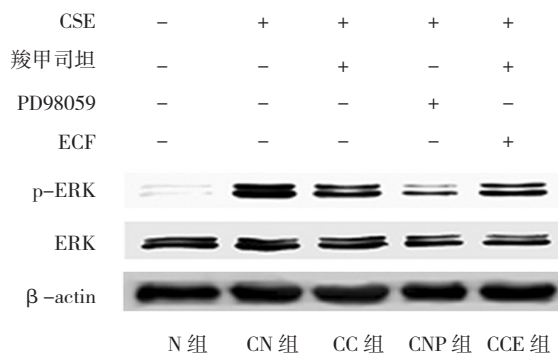


图 6 PD98059、EGF 对 ERK 磷酸化的影响

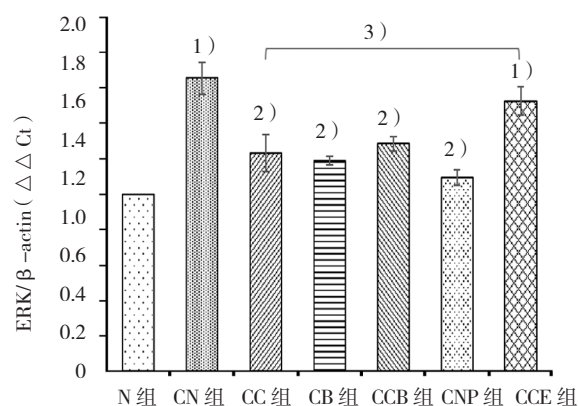


图 7 ERK mRNA 水平

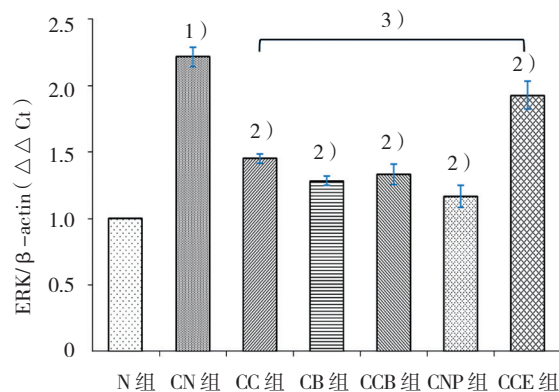


图 8 NF-κB mRNA 水平

3 讨论

CSE 是从香烟烟雾中提取的溶于细胞培养基的物质, 其中含有丙烯醛、尼古丁、烟碱、焦油和活性氧 (ROS) 等成分, 目前广泛用于体外实验中以研究香烟在细胞水平的作用^[7-9]。本研究采用 MTT 法检测不同浓度 CSE 对 HBE 细胞生存率的影响, 发现随着 CSE 浓度的升高, HBE 细胞的生存率呈下降趋势。CSE 浓度在 $0.63\% \sim 5.00\%$ 时, 对 HBE 细胞的抑制作用轻微, 不同时间差异无统计学意义。而 CSE 浓度在 $10.00\% \sim 80.00\%$ 时, 随着作用时间的延长, 细胞生存率降低, 细胞大量死亡。

香烟烟雾中含有的大量有害物质,能够对气道和肺组织造成直接损伤,促进气道炎症,活化气道上皮细胞,产生并释放炎症介质。TNF- α 、IL-8 及 IL-6 是 COPD 重要的炎症介质,其来源广泛,以支气管上皮细胞和肺泡巨噬细胞产生为主,在 COPD 的发病机制中起重要作用。本研究结果表明,HBE 细胞给予 CSE 干预后,其炎症因子 IL-8、IL-6 水平升高,而羧甲司坦、布地奈德及联合组均能不同程度降低上述炎症因子的水平,3 个药物干预组间差异无统计学意义,证明 CSE 能够诱导炎症因子水平的升高,羧甲司坦抑制气道炎症的作用与布地奈德相近,两药联合应用未能进一步提高控制炎症的作用。

已有体外实验证明,香烟烟雾提取物(CSE)引起 IL-8 等炎症因子的释放与 ERK 和 NF- κ B 信号转导通路的激活有关^[10-12]。细胞外调节蛋白激酶(ERK)作为 MAPK 通路的一部分,是将信号从表面受体传导至细胞核的关键。其包括 ERK1 和 ERK2 2 个亚型,统称为 ERK1/2。磷酸化激活的 ERK1/2 由胞质转位到核内,进而介导 ELK-1、NF- κ B、AP-1 等转录因子的转录活化,参与细胞增殖与分化、细胞凋亡和恶变过程,并参与应激刺激、细菌产物和炎症介质等引起的生物学反应,这表明 ERK 通路的激活与炎症反应有着密切关系^[13-15]。作为 ERK 通路的特异性抑制剂,PD98059 通过特异性地抑制其上游激酶 MEK1/2,进而抑制 ERK1/2 的激活与磷酸化。而 EGF 是研究常用的 ERK 通路的激动剂。本研究应用 ERK 通路的激动剂和抑制剂研究羧甲司坦的作用机制,结果显示 CSE 刺激下的 HBE 细胞 p-ERK 蛋白及 ERK mRNA 表达增高,分别给予羧甲司坦、布地奈德、两药联合及 PD98059 干预后上述指标均降低,而给予 EGF 干预后 p-ERK 及 ERK mRNA 较羧甲司坦组有所回升,证明羧甲司坦能够通过调控 ERK 的磷酸化发挥其抗炎作用。同时,本实验也观察到,糖皮质激素同样参与调节细胞内 ERK-MAPK 信号转导通路而抑制炎症介质,这与 CLARK 等^[15]报道一致。

NF- κ B 信号转导通路是炎症反应的另 1 个关键环节,也是体内多条信号途径的共同交汇点。它在肺组织炎症反应进展中起着核心地位,其活化及过度表达可造成机体细胞因子失衡,产生炎症反应的级联放大效应^[16-17]。NF- κ B 是由 2 个亚基组成的同源二聚体或异源二聚体,其最常见的活性形式是由 P65 和 P50 组成的异源二聚体^[18]。通常状态下,NF- κ B 与

其抑制因子 I κ B α 整合在细胞浆内。当机体受到内毒素、TNF- α 、细菌、病毒等刺激时,I κ B α 迅速发生磷酸化,NF- κ B 被激活进入细胞核,与目标基因启动子结合并调节其转录^[19]。研究发现,NF- κ B 的最初激活发生在肺泡巨噬细胞中,随后有活化的炎症因子进一步活化气道上皮细胞等周围细胞^[21]。目前研究普遍认为 NF- κ B 与 COPD 病情严重程度相关^[20-23]。已有研究证实,糖皮质激素在调节 NF- κ B 的活性中发挥了重要作用^[24-25]。本研究中发现,羧甲司坦亦能降低 CSE 诱导的 p-I κ B α 蛋白及 NF- κ B mRNA 表达水平,且与布地奈德及联合组比较差异无统计学意义,说明羧甲司坦的调控作用至少部分是通过 NF- κ B 信号转导通路进行的,这可能与糖皮质激素的作用机制存在重叠。

综上所述,羧甲司坦能够抑制香烟烟雾提取物诱导的气道炎症。羧甲司坦和布地奈德均能通过抑制 ERK 和 NF- κ B 信号转导通路减轻香烟所致的气道炎症,这说明 2 者的作用机制存在重叠部分,因此基础应用糖皮质激素后,由于其抑制相同的炎症靶点,再联合羧甲司坦时未能体现其应有的作用,或者由于 2 者之间对于作用位点的竞争拮抗甚至削弱了其原本的疗效。这些尚有待于进一步的深入研究。

参 考 文 献:

- [1] HENTSCHEL J, MÜLLER U, DOHT F, et al. Influences of nasal lavage collection-, processing- and storage methods on inflammatory markers - evaluation of a method for non-invasive sampling of epithelial lining fluid in cystic fibrosis and other respiratory diseases[J]. J Immunol Methods, 2014, 404(2): 41-51.
- [2] RAJENDRASOZHAN S, YANG S R, EDIRISINGHE I, et al. Deacetylases and NF-kappaB in redox regulation of cigarette smoke-induced lung inflammation: epigenetics in pathogenesis of COPD[J]. Antioxid Redox Signal, 2008, 10(4): 799-811.
- [3] ISHIBASHI Y, TAKAYAMA G, INOUE Y, et al. Carbocysteine normalizes the viscous property of mucus through regulation of fucosylated and sialylated sugar chain on airway mucins[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 641(2-3): 226-228.
- [4] MESSIER E M, DAY B J, KLEEBERGER S R, et al. N-Acetylcysteine protects murine alveolar type II cells from cigarette smoke injury in a nuclear erythroid 2-related factor-2-independent manner[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 48(5): 559-567.
- [5] ZHENG J P, KANG J, HUANG S G, et al. Effect of carbocysteine on acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (PEACE Study): a randomised placebo-controlled study[J]. Lancet, 2008, 371(9629): 2013-2018.

- [6] SU Y, HAN W, GIRALDO C, et al. 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.
- [7] VAYSSIER-TAUSSAT M, CAMILLI T, ARON Y, et al. Effects of tobacco smoke and benzo[a]pyrene on human endothelial cell and monocyte stress responses[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280(3): H1293-1300.
- [8] CARNEVALI S, PETRUZZELLI S, LONGONI B, et al. Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 284(6): L955-963.
- [9] VAN D T M, SMITDE VRIES M P, SLEBOS D J, et al. Cigarette smoke irreversibly modifies glutathione in airway epithelial cells[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 293(5): L1156-1162.
- [10] YANG S R, CHIDA A S, BAUTER M R, et al. Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF-kappaB and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 291(1): L46-57.
- [11] OENEMA T A, KOLAHIAN S, NANNINGA J E, et al. Pro-inflammatory mechanisms of muscarinic receptor stimulation in airway smooth muscle[J]. *Respir Res*, 2010, 11(9): 130.
- [12] BIOLLY B, VERCOUTER-EDOUART A S, HONDERMARK H, et al. FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2000, 11(4): 295-302.
- [13] WIDMANN C, GIBSON S, JARPE M B, et al. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human[J]. *Physiol Rev*, 1999, 79(1): 143-180.
- [14] DZIAREKE R, JIN Y P, GUPTA D. Differential activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1, ERK2, P38 and c-Jun NH2 terminal kinase mitogen-activated protein kinases by bacterial peptidoglycan[J]. *J Infect Dis*, 1996, 174(4): 777-785.
- [15] CLARK A R, LASA M. Crosstalk between glucocorticoids and mitogen-activated protein kinase signaling pathways[J]. *Curr Opin pharmacol*, 2003, 3(4): 404-411.
- [16] CUZZOCREA S, CRISAFULLI C, MAZZON E, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice[J]. *BJ Pharmacol*, 2006, 149(6): 687-702.
- [17] EVERHART M B, HAN W, SHERRILL T P, et al. Duration and intensity of NF-kappaB activity determine the severity of endotoxin-induced acute lung injury *J Immunol*[J]. 2006, 176(8): 4995-5005.
- [18] KARIN M, BEN-NERIAH Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kB activity[J]. *Annu Rev Immunol*, 2000, 18(4): 621-663.
- [19] MEDURI G U, CARRATU P, FREIRE A X. Evidence of biological efficacy for prolonged glucocorticoid treatment in patients with unresolving ARDS[J]. *European Respiratory Journal*, 2003, 22(Suppl 1): I57-I64.
- [20] BARNES P J, KARIN M. Nuclear factor-kappa B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases[J]. *N Engl J Med*, 1997, 336(15): 1066-1071.
- [21] CHAROKOPOS N, APOSTOLOPOULOS N, KALAPODI M, et al. Bronchial asthma, Chronic obstructive pulmonary disease and NF-Kb[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2009, 16(7): 867-883.
- [22] CHMITZ M L, BAEUERLE P A. The p65 unit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-Kb[J]. *EMBO J*. 1991, 10(12): 3805-3817.
- [23] CHEN L, SUN B B, WANG T, et al. Cigarette smoke enhances {beta}-defensin 2 expression in rat airways via nuclear factor-{kappa}B activation[J]. *Eur Respir J*, 2010, 36(3): 638-645.
- [24] FEMANDES A B, ZIN W A, ROCCO P R. Corticosteroids in acute respiratory distress syndrome[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2005, 38(2): 147-159.
- [25] LU N Z, CIDLOWSKI J A. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1024(6): 102-123.

(张西倩 编辑)