文章编号:1000-5404(2006)03-0257-03

论著

西洛司特对COPD患者PBMC分泌IL-8和TNF-α的影响

廖秀清[1],宋云熙[1],王 彦[1],李 琦[1],廖 伟[1],王长征[1],钱桂生[1],张孝彬[2],张 翼[2] ([1]第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037;[2]重庆市涪陵中心医院呼吸内科,涪陵 408000)

提 要:目的 研究西洛司特在体外对COPD患者PBMC分泌IL-8和TNF-α的影响。**方法** 从12例COPD患者外周血中分离的单个核细胞(PBMC)分别与不同浓度的西洛司特、氨茶碱和甲基强的松龙共培养24 h,用ELISA的方法检测PBMC培养上清的IL-8和TNF-α水平。**结果** 西洛司特和氨茶碱对PBMC分泌IL-8和TNF-α均呈显著的浓度依赖性抑制作用($P<0.01$)。甲基强的松龙对PBMC分泌IL-8和TNF-α则无显著抑制作用。1 μmol/L的西洛司特使LPS刺激PBMC活化分泌的IL-8减少54%,15 μg/ml的氨茶碱可使其减少39%,两者在治疗剂量所能达到的血药浓度比较有显著性差异($P<0.01$)。1 μmol/L的西洛司特使LPS刺激PBMC活化分泌的TNF-α减少51%,15 μg/ml的氨茶碱可使其减少32%,两者在治疗剂量所能达到的血药浓度比较有显著性差异($P<0.01$)。**结论** 西洛司特和氨茶碱在体外可显著地抑制抑制PBMC分泌IL-8和TNF-α,且西洛司特的抑制作用显著强于氨茶碱,甲基强的松龙这种抗炎作用不明显,提示西洛司特对COPD患者有显著的抗炎活性,具有广阔的临床应用前景。

关键词:COPD;PDE4;西洛司特;气道炎症;外周血单个核细胞IL-8;TNF-α

中图法分类号:R392.11;R563.8;R974.3 **文献标识码**:A

Effect of cilomilast on IL-8 and TNF-α release by peripheral blood mononuclear cells in COPD patients

LIAO Xiu-qing[1], SONG Yun-xi[1], WANG Yan[1], LI Qi[1], LIAO Wei[1], WANG Chang-zheng[1], QIAN Gui-sheng[1], ZHANG Xiao-bin[2], ZHANG Yi[2] ([1]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, [2]Department of Respiratory Diseases, Fuling Central Hospital, Fuling 408000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of cilomilast on IL-8 and TNF-α release by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) separated from blood of COPD patients were cultured in the presence of different concentrations of cilomilast, methylprednisolone and aminophylline for 24 h. After the incubation the absolute values of IL-8 and TNF-α in supernatants were assessed using ELISA. The effects on IL-8 and TNF-α of different drugs and different concentrations were compared. **Results** All three concentrations of cilomilast (0.1, 1, 10 μmol/L) and aminophylline (5, 15, 25 μg/ml) significantly reduced IL-8 and TNF-α release by PBMC ($P<0.01$). But all three concentrations of methylprednisolone (0.05, 0.10, 0.15 μmol/L) did not significantly reduce IL-8 and TNF-α release by PBMC. Cilomilast (1 μmol/L) reduced the release of IL-8 by 54% and aminophylline (15 μg/ml), by 39% ($P<0.01$). Cilomilast (1 μmol/L) reduced the release of TNF-α by 51% and aminophylline (15 μg/ml), by 32% ($P<0.01$). **Conclusion** Cilomilast and aminophylline significantly reduce IL-8 and TNF-α release by PBMC *in vitro*, and the effect of cilomilast on IL-8 and TNF-α is stronger than that of aminophylline, but methylprednisolone has no such anti-inflammation effect. Cilomilast is effective on airway inflammation of COPD and has broad clinical prospect.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease; PDE4; cilomilast; airway inflammation; peripheral blood mononuclear cells; IL-8; TNF-α

作者简介:廖秀清(1971-),男,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事慢性阻塞性肺疾病的发病机制及治疗方面的研究,现在重庆市涪陵中心医院呼吸内科工作。电话:(023)72220721,E-mail:98116lxq@163.com

通讯作者:王长征,电话:(023)68774603

收稿日期:2005-04-08;**修回日期**:2005-09-05

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种非特异性的慢性炎症性疾病,主要由中性粒细胞、巨噬细胞、$CD8^+$ T 淋巴细胞等参与形成。目前尚无有效抗 COPD 炎症的药物。近年发现 PDE4 抑制剂具有抑制 COPD 发病中主要的炎症细胞活化的作用,是具有临床应用前景的新型 COPD 抗炎药物。本研究通过观察 PDE4 抑制剂西洛司特在体外对 COPD 患者 PBMC 分泌 IL-8 和 TNF-α 的影响,进一步研究其对 COPD 的抗炎活性,以期为其临床治疗 COPD 提供依据。

1 资料与方法

1.1 试验药物及主要试剂

西洛司特由 GSK 公司提供,甲基强的松龙由 Pharmacin&Upjohn 公司提供,氨茶碱由重庆药友制药有限公司提供。IL-8、TNF-α 的 ELISA 试剂盒均购自深圳晶美公司,RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司,小牛血清购自美国 Hyclone 公司,LPS(O111:B_4)购自美国 Sigma 公司,淋巴细胞分离液购自上海试剂二厂。

1.2 试验对象

本试验对象均为本院门诊或住院的 COPD 稳定期患者,所有患者均符合 2002 年中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病诊治指南的诊断标准[1]。、实验中共收集 12 例 COPD 稳定期患者外周血标本。

1.3 试验方法

1.3.1 PBMC 分离及培养[2] 取试验对象空腹无菌静脉血(肝素抗凝)10 ~ 15 ml,以等量无菌生理盐水稀释。将淋巴细胞分离液 20 ml 加入离心管,再将等量的稀释后的外周血标本缓慢滴入管内,与淋巴细胞分离液形成明显分界。2 000 r/min 离心 25 min。吸取中间层细胞即为单个核细胞(PBMC),PBS 缓冲液洗涤 3 次。以含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液调细胞浓度为 1×10^6/ml,台盼蓝染色示细胞活性 >95%。

1.3.2 试验分组 共设对照组、西洛司特组、甲基强的松龙组及氨茶碱组 4 组。对照组不加任何药物;西洛司特组设 3 个浓度梯度:0.1、1、10 μmol/L;甲基强的松龙组设 3 个浓度梯度:0.05、0.1、0.15 μmol/L;氨茶碱组设 3 个浓度梯度:5、15、25 μg/ml[3-5]。取 48 孔培养板,各孔注入细胞悬液 0.5 ml,LPS 0.1 μg/ml,再加入预定浓度药物。于 37 ℃、5% CO_2、95% ~ 100% 湿度的培养箱内培养 24 h,取上清于 -70 ℃冰箱冻存待测。

1.3.3 检测 IL-8、TNF-α 水平 用 ELISA 法检测 IL-8、TNF-α 的水平,具体操作按试剂盒说明书进行。IL-8 检测灵敏度 15.625 pg/ml,TNF-α 检测灵敏度 31 pg/ml。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.0 统计软件包行方差分析及 t 检验。

2 结果

2.1 3 种药物对 PBMC 分泌 IL-8 的影响

西洛司特和氨茶碱对 PBMC 分泌 IL-8 呈显著的浓度依赖性抑制作用($P<0.01$),甲基强的松龙对 PBMC 分泌 IL-8 无显著抑制作用($P>0.05$)。见表 1。

表 1 3 种药物对 PBMC 分泌 IL-8 和 TNF-α 的影响
($n=12$, $\bar{x} \pm s$, pg/ml)

组别	IL-8	IL-8 分泌减少(%, $\bar{x} \pm s$)	TNF-α	TNF-α 分泌减少(%, $\bar{x} \pm s$)
对照组	1 330.74 ± 148.06		751.85 ± 81.74	
西洛司特 (μmol/L)				
0.1	1 048.98 ± 169.05[a]		572.41 ± 69.64[a]	
1	600.93 ± 78.21[a]	54.19 ± 8.46[b]	368.19 ± 74.75[a]	50.82 ± 9.96[b]
10	489.78 ± 114.43[a]		309.79 ± 62.74[a]	
甲基强的松龙 (μmol/L)				
0.05	1 335.65 ± 196.56		704.61 ± 60.12	
0.10	1 308.56 ± 152.54		747.59 ± 90.84	
0.15	1 336.40 ± 237.90		722.03 ± 89.30	
氨茶碱 (μg/ml)				
5	1 019.11 ± 129.00[a]		595.18 ± 65.26[a]	
15	808.17 ± 57.78[a]	38.50 ± 8.46	506.89 ± 61.01[a]	31.96 ± 10.13
25	696.70 ± 108.19[a]		447.67 ± 71.36[a]	

a: $P<0.01$, 与对照组比较; b: $P<0.01$, 与氨茶碱 15 μg/ml 比较

1 μmol/L 西洛司特可使 LPS 刺激 PBMC 活化分泌的 IL-8 减少 54%,15 μg/ml 氨茶碱可使 LPS 刺激 PBMC 活化分泌的 IL-8 减少 39%。与氨茶碱比较,西洛司特对 PBMC 分泌 IL-8 的抑制作用更为明显($P<0.01$)。见表 1。

2.2 3 种药物对 PBMC 分泌 TNF-α 的影响

西洛司特和氨茶碱对 PBMC 分泌 TNF-α 呈显著的浓度依赖性抑制作用($P<0.01$),甲基强的松龙对 PBMC 分泌 TNF-α 均无显著抑制作用($P>0.05$),见表 1。

1 μmol/L 西洛司特可使 LPS 刺激 PBMC 活化分泌的 TNF-α减少 51%,15 μg/ml 氨茶碱可使 LPS 刺激 PBMC 活化分泌的 TNF-α 减少 32%。与氨茶碱比较,西洛司特对 PBMC 分泌 TNF-α 的抑制作用更为明显($P<0.01$)。见表 1。

3 讨论

IL-8 和 TNF-α 在 COPD 慢性炎症中起着重要的作用。IL-8 是一种选择性的中性粒细胞趋化因子,由巨噬细胞、中性粒细胞以及气道上皮细胞分泌,它是 COPD 患者肺内中性粒细胞增多的重要原因,对 COPD 患者肺内中性粒细胞的活化起主要作用,也是评估气道炎症程度的重要指标。COPD 患者诱导痰及血清中 TNF-α 浓度也有明显增高,TNF-α 可活化转录因子 NF-κB,后者可调控上皮细胞及巨噬细胞中的 IL-8 基因表达。TNF-α 与 IL-8 等其他细胞因子是构成 COPD

肺部炎症的复杂的炎症细胞-细胞因子网络的重要组成成分,能相互促进,加速局部炎症的发生发展,最终导致气道重塑和气流阻塞的形成[6]。

糖皮质激素对哮喘治疗作用已得到公认。哮喘的炎性细胞以嗜酸性粒细胞、肥大细胞、$CD4^+$ T淋巴细胞(Th2)为主,而参与COPD的炎性细胞主要是中性粒细胞、巨噬细胞、$CD8^+$ T淋巴细胞[7,8]。糖皮质激素对中性粒细胞、巨噬细胞、$CD8^+$ T淋巴细胞的活化无明显的抑制作用。本研究结果也显示甲基强的松龙对COPD患者PBMC分泌IL-8和TNF-α无显著抑制作用。炎性细胞的差异导致了COPD和哮喘对激素治疗反应的不同。临床上部分COPD患者使用口服激素有效,可能与这部分患者合并哮喘有关。另外,激素还能减轻COPD急性加重期的患者支气管黏膜的水肿从而改善症状[9]。本研究的结果提示激素不能有效的抑制COPD肺部炎症反应,故不能阻断COPD的自然病程,寻找有效的抗炎症反应的新型药物是目前的研究方向。

茶碱类药物作为非选择性的PDE抑制剂,但其抗炎活性较弱,有研究表明治疗浓度的茶碱仅能够抑制肺内总的PDE表达的5%~20%[10]。而且茶碱主要作用于气道平滑肌细胞的磷酸二酯酶,对AM、淋巴细胞等COPD主要炎症细胞内的PDE4作用均较弱,临床实践亦证明长期口服茶碱尚不能有效阻断COPD的自然病程。

西洛司特是一种选择性的PDE4抑制剂。研究表明,西洛司特可抑制小鼠体内TNF-α及IL-4的合成,抑制中性粒细胞的募集[11]。体外研究还显示,西洛司特可抑制人单核细胞分泌TNF-α,中性粒细胞脱颗粒以及抗原诱导的T细胞增殖和细胞因子的分泌[12]。同时西洛司特对气道上皮细胞释放中性粒细胞趋化因子也有一定的抑制作用[13]。本实验结果显示西洛司特可显著抑制PBMC释放IL-8、TNF-α,提示西洛司特对COPD具有抗炎作用。我们比较了西洛司特和氨茶碱临床使用剂量在体外对PBMC释放IL-8、TNF-α的作用。治疗剂量的西洛司特所能达到的血药浓度为1 μmol/L[14]。而常用剂量氨茶碱的血药浓度为15 μg/ml。本研究结果显示浓度为1 μmol/L的西洛司特对PBMC释放IL-8、TNF-α的抑制作用明显强于浓度为15 μg/ml的氨茶碱,进一步证明西洛司特作为选择性的PDE4抑制剂,其抗炎活性较非选择性的茶碱更强,在体内可能会有更强的抗炎作用。

综上所述,西洛司特在体外对于COPD患者PBMC释放IL-8、TNF-α有显著抑制作用,提示西洛司特对COPD患者有显著的抗炎活性,具有广阔的临床应用前景。

参考文献:

[1] 中华医学会呼吸病分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(8): 453-460.

[2] 朱立平,陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社, 2000: 264-277.

[3] PROFITA M, CHIAPPARA G, MIRABELLA F, *et al*. Effect of cilomilast (Ariflo) on TNF-α, IL-8, and GM-CSF release by airway cells of patients with COPD[J]. Thorax, 2003, 58(7): 573-579.

[4] BRIGGS W A, GAO Z H, GIMENEZ L F, *et al*. Lymphocyte responsiveness to glucocorticoids, cyclosporine, or both[J]. J Clin Pharmacol, 1996, 36(8): 707-714.

[5] 王　玲,李　玉,薛玉文. 茶碱对哮喘患者肺泡巨噬细胞释放TNF-α、IL-8及IL-10的影响[J]. 中国免疫学杂志, 1999, 15(6): 249.

[6] SCHLEIMER R P, BENENATI S V, FRIEDMAN B, *et al*. Do cytokines play a role in leukocyte recruitment and activation in the lungs[J]? Am Rev Respir Dis, 1991, 143(5 Pt 1): 1169-1174.

[7] ZETTERLUND A, LINDEN M, LARSSON K. Effects of beta2-agonists and budesonide on interleukin-1beta and leukotriene B4 secretion: studies of human monocytes and alveolar macrophages[J]. J Asthma, 1998, 35(7): 565-573.

[8] BRINKMANN V, KRISTOFIC C. Regulation by corticosteroids of Th1 and Th2 cytokine production in human $CD4^+$ effector T cells generated from CD45RO- and CD45RO+ subsets[J]. J Immunol, 1995, 155(7): 3322-3328.

[9] MONTUSCHI P, KHARITONOV S A, CIABATTONI G, *et al*. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in COPD[J]. Thorax, 2003, 58(7): 585-588.

[10] DAL PIAZ V, GIOVANNONI M P. Phosphodiesterase 4 inhibitors, structurally unrelated to rolipram, as promising agents for the treatment of asthma and other pathologies[J]. Eur J Med Chem, 2000, 35(5): 463-480.

[11] COMPTON C H, GUBB J, NIEMAN R, *et al*. Cilomilast, a selective phosphodiesterase-4 inhibitor for treatment of patients with chronic obstructive pulmonary disease: a randomised, dose-ranging study[J]. Lancet, 2001, 358(9278): 265-270.

[12] UNDERWOOD D C, BOCHNOWICZ S, OSBORN R R, *et al*. Antiasthmatic activity of the second-generation phosphodiesterase 4 (PDE4) Inhibitor SB 207499 (Ariflo) in the guinea pig[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1998, 287(3): 988-955.

[13] SPOND J, CHAPMAN R, FINE J, *et al*. Comparison of PDE 4 inhibitors, rolipram and SB 207499 (Ariflo), in a rat model of pulmonary neutrophilia[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2001, 14(2): 157-164.

[14] ZUSSMAN B D, DAVIE C C, KELLY J, *et al*. Bioavailability of the oral selective phosphodiesterase 4 inhibitor cilomilast[J]. Pharmacotherapy, 2001, 21(6): 653-660.

(编辑　龙　亮)