

肺泡巨噬细胞胞葬功能障碍体外模型建立

娄翔宇 陈玉龙 刘雪宁 吴耀松 李晨旭 尚艺婉 高小玲 崔姗姗

河南中医药大学, 河南省中医方证信号传导重点实验室, 郑州 450046

通信作者: 崔姗姗, Email: sscui13@163.com

【摘要】 目的 通过筛选香烟烟雾提取物(CSE)刺激下大鼠肺泡巨噬细胞存活率高、胞葬功能弱的时间点,建立肺泡巨噬细胞胞葬功能障碍体外模型,用于研究以慢性炎症反应为主要病理变化的慢性呼吸系统疾病。**方法** ① 时间点筛选实验:体外培养大鼠肺泡巨噬细胞株 NR8383,取对数生长期细胞分为空白对照组(100 μ L 完全培养基)和 5% CSE 组(90 μ L 完全培养基 + 10 μ L 100% CSE);采用阿尔玛蓝法检测 5% CSE 作用 6、12、24、48 h 对 NR8383 细胞活性的影响。② 诱导凋亡实验:体外培养大鼠 II 型肺泡上皮细胞株 RLE-6TN 作为 NR8383 细胞的吞噬靶细胞,取对数生长期细胞分为空白对照组及紫外线暴露后 10、30、60 min 组(以 30 000 μ J/cm² 紫外线强度照射 15 min 诱导凋亡);采用流式细胞仪检测 RLE-6TN 细胞在紫外线暴露结束后 10、30、60 min 的凋亡率。③ 胞葬实验:另取对数生长期 NR8383 细胞分为空白对照组和 5% CSE 组。于 CSE 刺激 NR8383 细胞达到 6、12、24 h 前 2 h,将 RLE-6TN 细胞进行紫外线暴露诱导凋亡;将 RLE-6TN 细胞悬液加入 NR8383 细胞(RLE-6TN 细胞与 NR8383 细胞比例为 5 : 1)。采用流式细胞仪检测 5% CSE 作用不同时间点 NR8383 细胞对 RLE-6TN 细胞的胞葬率。**结果** ① 与空白对照组相比,5% CSE 作用 48 h 后 NR8383 细胞活性明显降低[细胞还原率:(68.5 \pm 4.1)% 比 (73.6 \pm 2.3)%, $P < 0.05$];而 5% CSE 作用 6、12、24 h 对 NR8383 细胞活性的影响与空白对照组比较差异均无统计学意义,故选择这 3 个时间点用于后续建立肺泡巨噬细胞胞葬功能障碍体外模型实验。② 与空白对照组相比,紫外线暴露后 10、30、60 min 时 RLE-6TN 细胞凋亡率均显著升高[(66.87 \pm 8.63)%、(85.51 \pm 2.39)%、(96.13 \pm 2.74)% 比 (9.13 \pm 3.17)%, 均 $P < 0.01$],并且呈一定时间依赖性。考虑在胞葬实验中 PKH26 膜标记探针标记 RLE-6TN 细胞大约需 50 min,因此,选择在紫外线暴露后 10 min 进行 RLE-6TN 细胞标记。③ 与空白对照组相比,5% CSE 作用 12 h 时 NR8383 细胞的胞葬功能明显降低[细胞胞葬率:(33.64 \pm 1.30)% 比 (44.02 \pm 2.71)%, $P < 0.01$],而作用 6 h、24 h 时对 NR8383 细胞的胞葬功能无明显影响。**结论** CSE 可诱导肺泡巨噬细胞胞葬功能障碍,基于 5% CSE 对 NR8383 细胞活性、胞葬功能影响的检测结果,可选择 NR8383 细胞存活率高、胞葬作用弱的 12 h 作为肺泡巨噬细胞胞葬功能障碍体外模型条件。

【关键词】 慢性炎症反应; 肺泡巨噬细胞; 胞葬功能

基金项目: 国家自然科学基金(81873285);河南省科技攻关项目(182102310296, 182102310320)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200820-00587

Establishment of an *in vitro* model of alveolar macrophage cell efferocytosis dysfunction

Lou Xiangyu, Chen Yulong, Liu Xuening, Wu Yaosong, Li Chenxu, Shang Yiwang, Gao Xiaoling, Cui Shanshan

Henan University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Henan Key Laboratory of TCM Prescription and Syndrome Signaling, Zhengzhou 450046, Henan, China

Corresponding author: Cui Shanshan, Email: sscui13@163.com

【Abstract】 Objective To screen the time points of high survival rate and efferocytosis dysfunction of rat alveolar macrophages stimulated by cigarette smoke extract (CSE), establish an *in vitro* model of alveolar macrophage efferocytosis function, and study chronic respiratory diseases with chronic inflammatory reaction as the main pathological changes. **Methods** ① Time point screening experiment: rat alveolar macrophages (NR8383 cells) were cultured *in vitro*, and the cells in logarithmic growth phase were divided into blank control group (100 μ L complete medium) and 5% CSE group (90 μ L complete medium + 10 μ L 100% CSE). Alma blue method was used to detect the effect of 5% CSE on the activity of NR8383 cells at 6, 12, 24 and 48 hours. ② Apoptosis induction experiment: rat type II alveolar epithelial cells (RLE-6TN cells) were cultured *in vitro* as phagocytic target cells of NR8383 cells, and the cells in logarithmic growth phase were divided into blank control group and 10, 30 and 60 minutes groups after ultraviolet exposure (apoptosis was induced by 30 000 μ J/cm² ultraviolet irradiation for 15 minutes). Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of RLE-6TN cells cultured for 10, 30 and 60 minutes after ultraviolet exposure. ③ Cell efferocytosis experiment: NR8383 cells in logarithmic phase were divided into blank control group and 5% CSE group. Two hours before NR8383 cells were stimulated by CSE for 6, 12 and 24 hours, RLE-6TN cells were exposed to ultraviolet to induce apoptosis, and the RLE-6TN cell suspension was added to NR8383 cells (the ratio of RLE-6TN cells to NR8383 cells was 5 : 1). Flow cytometry was used to detect the efferocytosis rate of NR8383 cells to RLE-6TN cells at different time points treated with 5% CSE. **Results** ① Compared with the blank control group, the activity of NR8383 cells significantly decreased after treatment with 5% CSE for 48 hours [cell reduction rate: (68.5 \pm 4.1)% vs. (73.6 \pm 2.3)%, $P < 0.05$]. However, there were no significant differences when the activities of NR8383 cells treated with 5% CSE for 6, 12 and 24 hours were compared with the blank control group, so these three time points were selected for the subsequent establishment

of alveolar macrophage cell efferocytosis dysfunction *in vitro* model experiment. ② Compared with the blank control group, the apoptosis rate of RLE-6TN cells significantly increased at 10, 30 and 60 minutes after ultraviolet exposure [(66.87 ± 8.63)%, (85.51 ± 2.39)%, (96.13 ± 2.74)% vs. (9.13 ± 3.17)%, all $P < 0.01$] in a time-dependent manner. Considering that it took about 50 minutes for RLE-6TN cells to be labeled with PKH26 membrane labeling probe, 10 minutes after ultraviolet exposure was selected to label RLE-6TN cells. ③ Compared with the blank control group, the efferocytosis function of NR8383 cells was significantly decreased after treatment with 5% CSE for 12 hours [cell efferocytosis rate: (33.64 ± 1.30)% vs. (44.02 ± 2.71)%, $P < 0.01$], but there was no significant effect on the efferocytosis function of NR8383 cells at 6 hours and 24 hours. **Conclusions** CSE can induce alveolar macrophage cell efferocytosis dysfunction. Based on the test results of the effect of 5% CSE on NR8383 cell activity and cell efferocytosis function, 12 hours with high survival rate and weak efferocytosis effect of NR8383 cells can be selected as the *in vitro* model condition of alveolar macrophage cell efferocytosis dysfunction.

【Key words】 Chronic inflammatory reaction; Alveolar macrophage; Efferocytosis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81873285); Henan Provincial Science and Technology Research Project of China (182102310296, 182102310320)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200820-00587

胞葬功能即吞噬细胞清除凋亡细胞的能力。香烟烟雾可诱导肺内多种细胞凋亡,并影响吞噬细胞的胞葬功能。通常肺组织中的凋亡细胞能迅速被吞噬细胞识别并有效清除。病理状态下,凋亡细胞大量积聚、继发性坏死,细胞碎片及有害内容物持续释放,触发损伤相关分子模式,最终导致过度的炎症反应及肺组织破坏,与慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)急性发作频率和严重程度密切相关^[1-2]。目前,虽有多种药物及治疗手段得以应用,但以 COPD 为代表的以慢性炎症反应为主要特点的呼吸系统疾病的发病率和病死率仍持续攀升,消耗着大量的医疗资源,造成极大的个人和社会负担。因此,本研究以大鼠 II 型肺泡上皮细胞(type II alveolar epithelial cell, AEC II)作为大鼠肺泡巨噬细胞的吞噬靶细胞,通过筛选香烟烟雾提取物(cigarette smoke extract, CSE)刺激下肺泡巨噬细胞存活率高、胞葬功能弱的时间点,建立肺泡巨噬细胞胞葬功能障碍体外模型,以期用于研究以慢性炎症反应为主要病理变化的慢性呼吸系统疾病。

1 材料与方 法

1.1 细胞来源:大鼠肺泡巨噬细胞株 NR8383 购于中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库;大鼠 AEC II 细胞株 RLE-6TN 购于上海富衡生物科技有限公司,本实验室传代培养。

1.2 伦理学:本实验为国家自然科学基金(81873285)的子项目内容,该基金相关研究符合医学伦理学标准,并通过河南中医药大学实验动物伦理委员会审核批准(审批号:DWLL2018030047)。

1.3 细胞传代培养:NR8383 细胞用含 20% 胎牛血清的 F12K 完全培养基培养;RLE-6TN 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基培养。将培养皿

置于含 5% CO₂、37 °C 培养箱中常规培养。NR8383 细胞隔天换液,待细胞呈团簇状生长、密度较高时传代;RLE-6TN 细胞传代后 1~2 d 换液,显微镜下观察,当细胞铺满皿底 80% 以上时传代。

1.4 CSE 制备:参考文献方法^[3-4]稍改进,将 10 mL 无血清 F12K 培养基置于无菌玻璃瓶中,作为香烟烟雾吸收液。点燃去除过滤嘴的香烟(“红旗渠”香烟,硬金红,烤烟型,焦油量 11 mg,烟气烟碱量 0.9 mg,烟气一氧化碳量 11 mg),借助负压以 50 mL 注射器连续抽吸 300 mL 高浓度的香烟烟雾,通过连通装置快速注入玻璃瓶,使烟雾充分溶解于培养基中。调整吸光度(absorbance, A)值在 1.8~2.0, 0.22 μm 过滤器过滤除菌,得到的悬液定义为 100% CSE。

1.5 阿尔玛蓝法检测 NR8383 细胞活性:依据前期实验结果^[5-6],5% CSE 是在不影响巨噬细胞活性的前提下,触发炎症环境的较适宜浓度,故本实验设置空白对照组和 5% CSE 组,每组设 5 个复孔。每孔加入 100 μL 细胞悬液(含 1 × 10⁴ 个细胞);CO₂ 培养箱孵育 24 h 后,5% CSE 组每孔加入 90 μL 完全培养基和 10 μL 100% CSE,空白对照组每孔加入 100 μL 完全培养基;同时,每孔加入 10 μL 阿尔玛蓝。将 96 孔板置于 CO₂ 培养箱孵育,使用酶联免疫检测仪检测 6、12、24、48 h 时波长为 570 nm、600 nm 的 A 值,通过 A 值计算还原率,代表细胞活性。

1.6 流式细胞仪检测 RLE-6TN 细胞凋亡情况:取对数生长期 RLE-6TN 细胞,以 8 × 10⁶ 个细胞接种于细胞培养皿。设空白对照组及紫外线暴露后 10、30、60 min 组。CO₂ 培养箱孵育 24 h,紫外线暴露组补充完全培养基至 20 mL,以 30 000 μJ/cm² 紫外线强度照射 15 min 后于 CO₂ 培养箱继续培养。分别于 10、30、60 min 收集细胞,离心 5 min 后,用预冷的磷

酸盐缓冲液重悬,然后按照膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide, Annexin V-FITC/PI)细胞凋亡检测试剂盒说明书进行细胞染色后,用流式细胞仪检测细胞凋亡率〔凋亡率=(早期凋亡细胞数+中晚期凋亡细胞数)/总细胞数×100%〕。

1.7 流式细胞仪检测 NR8383 细胞胞葬功能

1.7.1 NR8383 细胞染色、种植及 RLE-6TN 细胞种皿:取对数生长期 NR8383 细胞,设空白对照组和 5% CSE 组。将细胞悬液移至无菌离心管,离心 5 min 后弃上清,用细胞示踪剂重悬细胞并染色,CO₂ 培养箱孵育 40 min;离心 5 min,用 F12K 完全培养基重悬,CO₂ 培养箱孵育 30 min;离心 5 min,用完全培养基重悬,以每孔 3×10⁵ 个细胞接种于 6 孔板,CO₂ 培养箱孵育过夜。同时,收集 RLE-6TN 细胞,分组同 NR8383 细胞。将 RLE-6TN 细胞以 5 倍 NR8383 细胞的量接种于细胞培养皿,于 CO₂ 培养箱过夜稳定。

1.7.2 制备并加入 CSE 溶液:在使用前 40 min 制备 CSE 溶液,并以细胞培养液终体积 5% 的含量向 5% CSE 组中加入 100 μL CSE 溶液;空白对照组补充完全培养基至 2 mL。移至 CO₂ 培养箱,6、12、24 h 后进行 NR8383 细胞胞葬过程。

1.7.3 诱导 RLE-6TN 细胞凋亡并染色:在 CSE 刺激 NR8383 细胞达 6、12、24 h 前 2 h,以 30 000 μJ/cm² 紫外线强度照射覆盖 20 mL 完全培养基的 RLE-6TN 细胞 15 min 诱导凋亡;暴露结束后,将培养皿置于 CO₂ 培养箱中再培养 10 min。用 PKH26 膜标记探针标记 RLE-6TN 细胞后,以 1 mL RPMI 1640 完全培养基重悬,RLE-6TN 细胞染色后携带红色荧光。

1.7.4 NR8383 细胞胞葬:以每孔 0.5 mL RLE-6TN 细胞悬液加入 NR8383 细胞空白对照组和 5% CSE 组(RLE-6TN 细胞与 NR8383 细胞比例为 5:1),CO₂

培养箱孵育 30 min,收集细胞悬液至含 4% 多聚甲醛的离心管中,避光固定 20 min。用 0.04% 锥虫蓝淬灭外荧光,离心 5 min,磷酸盐缓冲液重悬,用流式细胞仪检测胞葬率(胞葬率=吞噬凋亡 RLE-6TN 细胞的 NR8383 细胞数/总 NR8383 细胞数×100%)。

1.8 统计学方法:数据采用 SPSS 22.0 软件进行分析。计量资料符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)进行统计描述,根据情况选择独立样本 *t* 检验或单因素方差分析。若方差齐,以 LSD 为统计依据;若方差不齐,以 Dunnett *T3* 为统计依据。显著水准取 $\alpha = 0.05, P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

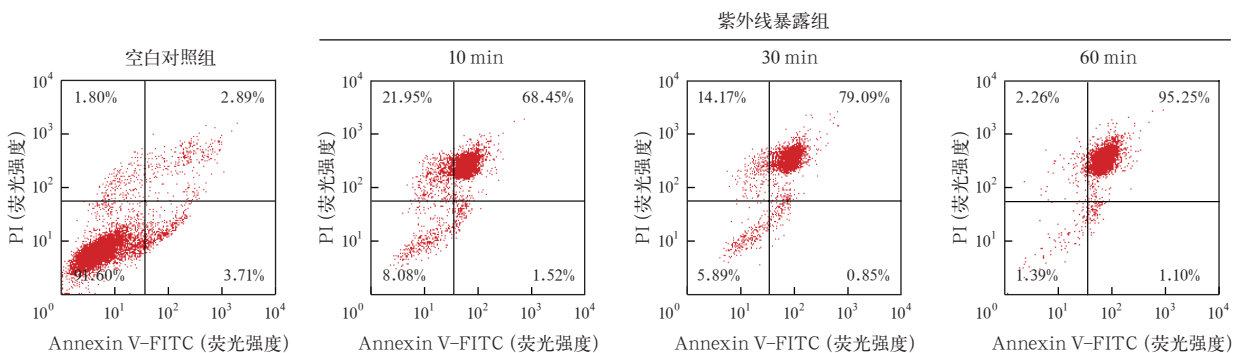
2.1 5% CSE 对 NR8383 细胞活性的影响(表 1):5% CSE 作用 48 h 后 NR8383 细胞活性较空白对照组明显降低($P < 0.05$),而 6、12、24 h 时与空白对照组差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。因此选择 5% CSE 对 NR8383 细胞活性无显著影响的 6、12、24 h 作为筛选肺泡巨噬细胞胞葬功能障碍体外模型的时间点。

表 1 两组不同时间点 NR8383 细胞活性变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	细胞还原率(%)			
		6 h	12 h	24 h	48 h
空白对照组	5	25.2±1.6	34.7±0.8	52.5±2.1	73.6±2.3
5% CSE 组	5	24.6±0.9	33.4±1.1	50.6±2.0	68.5±4.1 ^a

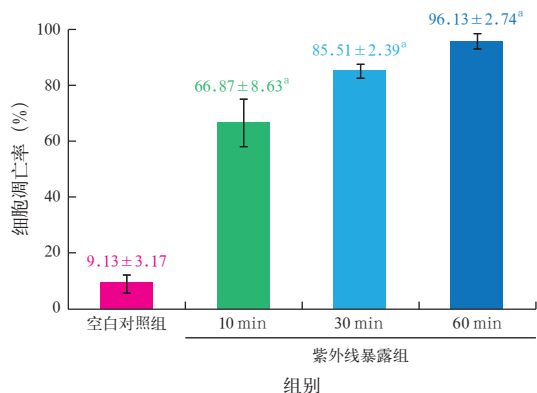
注:NR8383 细胞为小鼠肺泡巨噬细胞,CSE 为香烟烟雾提取物;与空白对照组比较,^a $P < 0.05$

2.2 紫外线暴露对 RLE-6TN 细胞凋亡的影响:紫外线暴露后 10、30、60 min RLE-6TN 细胞凋亡率均较空白对照组显著升高(均 $P < 0.01$),且呈时间依赖性(图 1~2)。考虑胞葬实验中 PKH26 标记 RLE-6TN 细胞大约需 50 min,故选择在紫外线暴露后继续培养 10 min 再进行细胞标记(PKH26 染色后 RLE-6TN 细胞凋亡率可达 90% 以上)。



注:RLE-6TN 细胞为小鼠 II 型肺泡上皮细胞,Annexin V-FITC 为膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素,PI 为碘化丙啶

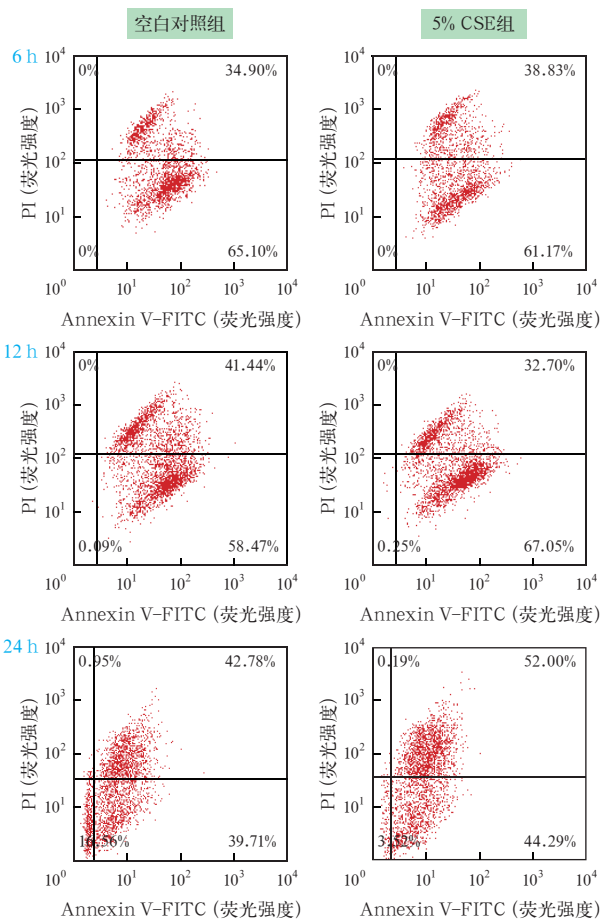
图 1 流式细胞仪检测各组 RLE-6TN 细胞凋亡情况



注：RLE-6TN 细胞为小鼠 II 型肺泡上皮细胞；与空白对照组比较，^a*P*<0.01

图 2 各组 RLE-6TN 细胞凋亡率比较

2.3 5% CSE 对 NR8383 细胞胞葬功能的影响(图 3; 表 2): 5% CSE 作用 12 h 时 NR8383 细胞胞葬率较空白对照组明显下降 (*P*<0.01), 而 6 h 和 24 h 时与空白对照组差异无统计学意义 (均 *P*>0.05)。因此, 可选择 5% CSE 作用 NR8383 细胞 12 h 作为肺泡巨噬细胞胞葬功能障碍体外模型条件。



注：NR8383 细胞为小鼠肺泡巨噬细胞，CSE 为香烟烟雾提取物，Annexin V-FITC 为膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素，PI 为碘化丙啶

图 3 流式细胞仪检测两组不同时间点 NR8383 细胞的胞葬率

表 2 两组不同时间点 NR8383 细胞胞葬率变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	细胞胞葬率 (%)		
		6 h	12 h	24 h
空白对照组	3	37.46 ± 8.30	44.02 ± 2.71	43.52 ± 6.58
5% CSE 组	3	41.33 ± 7.63	33.64 ± 1.30 ^a	45.90 ± 5.70

注：NR8383 细胞为小鼠肺泡巨噬细胞，CSE 为香烟烟雾提取物；与空白对照组比较，^a*P*<0.01

3 讨论

香烟烟雾吸入是导致 COPD 慢性炎症反应的重要危险因素。香烟烟雾产生的多种有害物质可激活肺内炎性细胞, 促进炎性因子分泌; 降低巨噬细胞的吞噬能力, 增加呼吸道细菌定植的风险; 诱发氧化应激, 破坏组织结构, 导致肺功能损伤^[7-8]。近年来, 巨噬细胞在 COPD 炎症反应中的作用日益凸显, 肺泡巨噬细胞作为肺微环境中数量最多、功能最重要的巨噬细胞类型, 贯穿肺部炎症反应的发生发展, 其不仅能吞噬吸入性异物、受损及凋亡细胞, 还能激活多种免疫细胞, 调节先天及获得性免疫系统^[9]。肺泡巨噬细胞的胞葬功能对消除慢性炎症及组织重塑至关重要。研究表明, 肺泡巨噬细胞胞葬功能障碍引起的促炎反应和异常组织修复与 COPD 发病密切相关^[10-11]。还有研究表明, 现有治疗肺部疾病的多类药物, 如他汀类、糖皮质激素、大环内酯类、抗氧化剂, 均可增强肺泡巨噬细胞的胞葬功能, 而国内外缺少中医药影响肺泡巨噬细胞胞葬功能的系统研究^[12-13]。基于此, 本研究旨在构建肺泡巨噬细胞胞葬功能障碍的体外模型, 观察病理过程中肺泡巨噬细胞胞葬功能状态的变化, 以期后续研究中中医药对慢性呼吸系统疾病的改善机制奠定基础。

本研究选择 5% CSE 干预 NR8383 细胞, 并于干预后 6、12、24、48 h 4 个时间点检测细胞活性。结果显示, 与空白对照组相比, 除 48 h 时 NR8383 细胞活性明显下降外, 其他时间点对细胞活性均无明显的增强或抑制。为避免细胞活性对肺泡巨噬细胞胞葬功能的影响, 因此选用 6、12、24 h 作为筛选肺泡巨噬细胞胞葬功能障碍体外模型的适宜时间点。

AEC II 细胞作为肺组织中的主要结构细胞, 在合成肺泡表面活性物质、维持肺泡细胞增殖分化、修复炎性损伤等方面发挥着关键作用。在 COPD 临床及动物实验研究中发现, AEC II 细胞是肺组织凋亡细胞中的主要类型, 其异常凋亡所造成的继发性坏死进一步加重了 COPD 炎症反应^[14-15]。因此, 本研究选择小鼠 AEC II 细胞株 RLE-6TN 作为小鼠肺泡巨噬细胞株 NR8383 的吞噬靶细胞。本实验在固

定的紫外线强度和暴露时间下诱导 RLE-6TN 细胞凋亡,用 Annexin V-FITC/PI 荧光染色结合流式细胞仪检测细胞凋亡情况。结果显示,随着紫外线暴露后时间延长,RLE-6TN 细胞凋亡率呈递增趋势(凋亡率在紫外线暴露后 1 h 可达 90% 以上),考虑胞葬实验中 PKH26 标记 RLE-6TN 细胞大约需 50 min,因此选择在紫外线暴露后 10 min 进行细胞标记。

多项研究证明,CSE 可抑制人、小鼠和大鼠肺泡巨噬细胞胞葬功能^[16-18];也有研究者提出,有限剂量的 CSE 可激活巨噬细胞功能,或呈现先激活后抑制的状态,但伴随 CSE 浓度升高或暴露时间延长,巨噬细胞发生进行性损伤,细胞活性和免疫功能全面衰退^[19-20]。本研究通过对 5% CSE 干预 6、12、24 h NR8383 细胞胞葬功能的检测发现,在 5% CSE 刺激 6 h 和 24 h 时 NR8383 细胞胞葬率呈小幅上升趋势,但作用 12 h 时胞葬率受到明显抑制。结合目前国内外研究结果推断,5% CSE 作用于 NR8383 细胞,在较短时间内(6 h)细胞免疫功能可能处于被激活的状态;随着时间延长(12 h),其功能状态由急性的激活转变为损伤;而当作用时间延长至 24 h 时,因 5% CSE 未造成过度的细胞损伤,细胞可能修复或代偿了部分吞噬功能,但仍需进一步研究证实。根据细胞存活率高、胞葬作用弱的预设条件,并综合以上结果考虑,可选择 5% CSE 作用 NR8383 细胞 12 h 作为肺泡巨噬细胞胞葬功能障碍体外模型条件。

综上,特定浓度的香烟烟雾可造成肺泡巨噬细胞胞葬功能障碍,本研究建立的肺泡巨噬细胞胞葬功能障碍体外模型,可用于研究以慢性炎症反应为主要病理变化的慢性呼吸系统疾病。但胞葬过程涉及多个环节及信号通路,因此,慢性呼吸系统疾病病理过程中胞葬功能的变化机制仍有待深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Serban KA, Petrusca DN, Mikosz A, et al. Alpha-1 antitrypsin supplementation improves alveolar macrophages efferocytosis and phagocytosis following cigarette smoke exposure [J]. PLoS One, 2017, 12 (4): e0176073. DOI: 10.1371/journal.pone.0176073.
- [2] DeBerge M, Zhang S, Grinton K, et al. Efferocytosis and outside-in signaling by cardiac phagocytes. Links to repair, cellular programming, and intercellular crosstalk in heart [J]. Front Immunol, 2017, 8: 1428. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01428.
- [3] Sheridan JA, Zago M, Nair P, et al. Decreased expression of the NF- κ B family member RelB in lung fibroblasts from smokers with and without COPD potentiates cigarette smoke-induced COX-2 expression [J]. Respir Res, 2015, 16 (1): 54. DOI: 10.1186/s12931-015-0214-6.
- [4] Pace E, Ferraro M, Siena L, et al. Cigarette smoke increases Toll-like receptor 4 and modifies lipopolysaccharide-mediated responses in airway epithelial cells [J]. Immunology, 2008, 124 (3): 401-411. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2007.02788.x.

- [5] 陈玉龙,吴耀松,李建生,等.调补肺肾三法对香烟烟雾提取物和脂多糖刺激 A549 细胞分泌细胞因子的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28 (7): 1989-1993.
Chen YL, Wu YS, Li JS, et al. Effects of nourishing lung and kidney three methods on cytokines of A549 cells induced by CSE and LPS [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2013, 28 (7): 1989-1993.
- [6] 陈玉龙,吴耀松,李建生,等.调补肺肾三法对香烟烟雾提取物和脂多糖刺激单核巨噬细胞 THP-1 分泌细胞因子的影响 [J]. 中医杂志, 2012, 53 (22): 1948-1953.
Chen YL, Wu YS, Li JS, et al. Effect of three therapies of regulating and supplementing the lung and kidney on the cytokine secretion of THP-1 monocytes and macrophages stimulated with cigarette smoke extract and lipopolysaccharide [J]. J Tradit Chin Med, 2012, 53 (22): 1948-1953.
- [7] Macnee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Clin Chest Med, 2007, 28 (3): 479-513, v. DOI: 10.1016/j.ccm.2007.06.008.
- [8] Harvey CJ, Thimmulappa RK, Sethi S, et al. Targeting Nrf2 signaling improves bacterial clearance by alveolar macrophages in patients with COPD and in a mouse model [J]. Sci Transl Med, 2011, 3 (78): 78ra32. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002042.
- [9] Barnes PJ. Alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [J/OL]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2004, 50 Online Pub: OL627-637 [2020-06-15]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15579256.
- [10] Hodge S, Hodge G, Ahern J, et al. Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocytic ability: implications in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007, 37 (6): 748-755. DOI: 10.1165/rcmb.2007-00250C.
- [11] Belchamber KBR, Donnelly LE. Macrophage dysfunction in respiratory disease [J]. Results Probl Cell Differ, 2017, 62: 299-313. DOI: 10.1007/978-3-319-54090-0_12.
- [12] 薄禄龙,周莉,姜春玲.胞葬作用与肺部疾病的研究进展 [J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27 (10): 856-858. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.10.016.
Bo LL, Zhou L, Jiang CL. Research progress on the relationship between intercalation and lung diseases [J]. Chin Crit Care Med, 2015, 27 (10): 856-858. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.10.016.
- [13] 刘雪宁,崔姗姗,陈玉龙,等.肺泡巨噬细胞胞葬功能对 COPD 作用的研究进展 [J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31 (7): 913-915. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.07.024.
Liu XN, Cui SS, Chen YL, et al. Advances in research on the role of alveolar macrophage burial function in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Chin Crit Care Med, 2019, 31 (7): 913-915. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.07.024.
- [14] Comer DM, Elborn JS, Ennis M. Inflammatory and cytotoxic effects of acrolein, nicotine, acetaldehyde and cigarette smoke extract on human nasal epithelial cells [J]. BMC Pulm Med, 2014, 14: 32. DOI: 10.1186/1471-2466-14-32.
- [15] Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, et al. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema [J]. Respir Res, 2006, 7 (1): 53. DOI: 10.1186/1465-9921-7-53.
- [16] Hodge S, Hodge G, Scicchitano R, et al. Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells [J]. Immunol Cell Biol, 2003, 81 (4): 289-296. DOI: 10.1046/j.1440-1711.2003.t01-1-01170.x.
- [17] Masubuchi H, Ueno M, Maeno T, et al. Reduced transient receptor potential vanilloid 2 expression in alveolar macrophages causes COPD in mice through impaired phagocytic activity [J]. BMC Pulm Med, 2019, 19 (1): 70. DOI: 10.1186/s12890-019-0821-y.
- [18] Proulx LI, Paré G, Bissonnette EY. Alveolar macrophage cytotoxic activity is inhibited by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), a carcinogenic component of cigarette smoke [J]. Cancer Immunol Immunother, 2007, 56 (6): 831-838. DOI: 10.1007/s00262-006-0243-6.
- [19] Maitly PC, Bhattacharjee S, Majumdar S, et al. Potentiation by cigarette smoke of macrophage function against *Leishmania donovani* infection [J]. Inflamm Res, 2009, 58 (1): 22-29. DOI: 10.1007/s00011-008-8151-1.
- [20] 张文娟.香烟烟气对大鼠肺泡巨噬细胞免疫功能的影响研究 [D]. 衡阳: 南华大学, 2011.
Zhang WJ. Effects of cigarette smoke on immune function of alveolar macrophages in rats [D]. Hengyang: University of South China, 2011. (收稿日期: 2020-08-20)