

白藜芦醇对烟熏和脂多糖诱导大鼠慢性阻塞性肺疾病的改善及肺 Derlin-1 蛋白的调控作用

杜丽芬¹, 胡建武², 卢立¹, 陈镜楼¹, 宋红萍^{1*}

1. 武汉市第四医院 华中科技大学同济医学院附属普爱医院 药学部, 湖北 武汉 430033
2. 武汉市第四医院 华中科技大学同济医学院附属普爱医院 呼吸内科, 湖北 武汉 430033

摘要: 目的 考察白藜芦醇对烟熏和脂多糖诱导大鼠慢性阻塞性肺疾病的改善作用, 探讨其 Derlin-1 蛋白调控的作用机制。方法 通过烟熏和滴注脂多糖的方法建立大鼠慢性阻塞性肺疾病模型。分别每日 ig 15、45 mg/kg 白藜芦醇, 28 d 后采用 Tunel 法检测肺泡上皮细胞凋亡情况, ELISA 法检测肺促炎细胞因子水平, 免疫组化和 Western blotting 法评价 Derlin-1、JNK 和磷酸化 JNK (p-JNK) 的表达水平。结果 与模型组比较, 45 mg/kg 白藜芦醇能够改善大鼠肺泡上皮细胞凋亡, 显著降低促炎细胞因子、Derlin-1 和 JNK 的磷酸化水平。结论 白藜芦醇能够改善慢性阻塞性肺疾病大鼠的肺损伤, 其作用机制与调控肺 Derlin-1 蛋白有关。

关键词: 白藜芦醇; 慢性阻塞性肺疾病; 改善作用; 细胞凋亡; 促炎细胞因子; Derlin-1; JNK; 磷酸化 JNK

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2018)08-1865-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.08.002

Improvement of resveratrol on chronic obstructive pulmonary disease rat induced by smoking and lipopolysaccharide and regulation of lung Derlin-1 protein

DU Li-fen¹, HU Jian-wu², LU Li¹, CHEN Jing-lou¹, SONG Hong-ping¹

1. Department of Pharmacy, Wuhan Fourth Hospital, Puai Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430033, China
2. Department of Respiratory Medicine, Wuhan Fourth Hospital, Puai Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430033, China

Abstract: Objective To study the improvement of resveratrol on chronic obstructive pulmonary disease (COPD) rat induced by smoking and lipopolysaccharide, and explore its mechanism of regulation of lung Derlin-1 protein. **Methods** Rat models of COPD were induced by smoking and lipopolysaccharide instillation. Rats were ig administered with resveratrol of 15 or 45 mg/kg for 28 d. Then, the apoptosis was evaluated by Tunel staining. The levels of proinflammatory cytokines were determined by ELISA method. The expressions of Derlin-1, JNK, and phosphorylation (p)-JNK were detected by immunohistochemistry and Western blotting method. **Results** Compared with the model group, resveratrol (45 mg/kg) could improve the apoptosis of alveolar epithelial cells, and significantly reduce the levels of proinflammatory cytokines, Derlin-1, and JNK phosphorylation. **Conclusion** Resveratrol can improve the pulmonary injury in COPD rats and its mechanism is related to the regulation of lung Derlin-1 protein.

Key words: resveratrol; chronic obstructive pulmonary disease; improvement; apoptosis; proinflammatory cytokine; Derlin-1; JNK; phosphorylation-JNK

慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 是一种肺脏的慢性炎症性疾病, 吸烟是其常见的危险因素^[1]。COPD 使患者气流受限, 呼吸功能下降, 已成为全球公共

卫生关注的热点^[2]。COPD 的病理机制多样, 至今仍未阐明, 而内质网应激被认为是其可能的机制之一^[3]。白藜芦醇是葡萄和红酒中的主要功能性成分,

收稿日期: 2017-12-13

基金项目: 武汉市卫生计生科研基金项目 (WZ16C20, WX16B11)

作者简介: 杜丽芬, 女, 主管药师, 硕士。Tel: (027)68831324 E-mail: du-lifen@163.com

*通信作者 宋红萍, 女, 主任药师, 硕士。Tel: (027)68835024 E-mail: 77286292@qq.com

具有多种生物活性^[4]。研究显示,白藜芦醇的抗氧化作用、抗炎功能有助于改善 COPD 模型动物的肺损伤^[5]。因此本研究拟探讨白藜芦醇对 COPD 大鼠内质网特异性跨膜转运蛋白 Derlin-1 的作用,以丰富白藜芦醇抗 COPD 的可能作用机制。

1 材料

1.1 试药

白藜芦醇(质量分数>99%,批号 R107315)购于上海阿拉丁生化科技有限公司。乙酰半胱氨酸片(规格 0.6 g/片,批号 PL1605025)购于浙江金华康恩贝生物制药有限公司。脂多糖(LPS,批号 B-L2880-1)购于美国 Sigma 公司。白介素(IL)-8(批号 201703)、IL-13(批号 201702)、肿瘤坏死因子(TNF)- α (批号 201703)检测 ELISA 试剂盒均购于武汉基因美生物科技有限公司。Derlin-1(批号 12451)抗体购于台湾 Abnova 公司。JNK(批号 124956)、磷酸化(p)-JNK(批号 208035)抗体均购于英国 Abcam 公司。Tunel 细胞凋亡检测试剂盒(批号 PAB180037)购于澳大利亚 Bio-Swamp 公司。

1.2 仪器

MS353 型酶标仪(芬兰 Labsystems 公司);CX41 型显微镜(日本奥林巴斯公司);JS1075 型凝胶成像系统(上海培清科技有限公司)。

1.3 动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠,体质量 180~200 g,购于湖北省实验动物研究中心,动物生产许可证号 SCXK(鄂)2015-0018,合格证号 42000600019902。

2 方法

2.1 动物分组、造模和给药

大鼠适应环境 1 周后随机分为对照组、模型组、乙酰半胱氨酸组以及白藜芦醇高、低剂量组和白藜芦醇阳性组,每组各 6 只。第 2~13、15~28 天将模型组、乙酰半胱氨酸组和白藜芦醇组大鼠置 48 L 玻璃密闭箱内烟熏 20 min,每次烟熏燃烧 1 支/只红金龙牌香烟,2 次/d,间隔 4 h。此外,在第 1、14 天用水合氯醛麻醉大鼠并暴露气管。

模型组、乙酰半胱氨酸组和白藜芦醇组大鼠滴注 1 g/L LPS 200 μ L,对照组和白藜芦醇阳性组大鼠滴注等体积 0.9%氯化钠溶液^[6-7]。乙酰半胱氨酸组每日 ig 60 mg/kg 乙酰半胱氨酸(根据体表面积换算法由临床人使用剂量换算)。白藜芦醇组分别每日 ig 15、45 mg/kg 白藜芦醇。白藜芦醇阳性组每日 ig 45 mg/kg 白藜芦醇。

2.2 观察指标

28 d 实验周期结束后处死动物,收集肺组织,部分组织用 4%多聚甲醛在 4 $^{\circ}$ C 浸泡固定、石蜡包埋,切片用于 Tunel 染色检测细胞凋亡和免疫组化定性分析 Derlin-1 表达情况。操作步骤均依照试剂盒说明书进行,切片在显微镜下 200 倍观察拍照,标注 100 μ m 标尺。其中 Derlin-1 定性分析用 Image J 软件进行半定量计算积分吸光度值。

部分组织用冰冷的 0.9%氯化钠溶液制备成 10%组织匀浆,用于 ELISA 试剂盒检测促炎细胞因子 IL-8、IL-13 和 TNF- α 水平。

剩余新鲜组织在-80 $^{\circ}$ C 保存,用于采用 Western blotting 法定量分析肺组织 Derlin-1、JNK 和 p-JNK 表达情况。组织样本剪碎后液氮研磨,提取总蛋白,并以蛋白 5 \times loading buffer 按照 4:1 混匀,100 $^{\circ}$ C 变性 3 min 后取 20 μ L 进行 10% SDS-PAGE 电泳。电泳结束后,转膜在 5%脱脂奶粉中,于 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h,然后在 4 $^{\circ}$ C 孵育相应的一抗(Derlin-1、JNK 或 p-JNK, 1:1 000 稀释)12 h。清洗后在室温下孵育酶标二抗 1 h,化学发光并成像,吸光度定量分析通过 Bio-Rad Quantity One 完成,GAPDH 为内参。

2.3 统计学方法

实验数据采用 SPSS 11.5 软件分析,并以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(Tukey 检验)。

3 结果

3.1 白藜芦醇对 COPD 大鼠肺泡上皮细胞的影响

与对照组比较,模型组大鼠肺泡上皮细胞凋亡明显,白藜芦醇阳性组结果显示 45 mg/kg 白藜芦醇并未引起大鼠肺泡上皮细胞凋亡。与模型组比较,15、45 mg/kg 白藜芦醇能够改善烟熏和 LPS 诱导的大鼠肺泡上皮细胞凋亡。见图 1。

3.2 白藜芦醇对 COPD 大鼠肺组织促炎细胞因子水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠肺组织 IL-8、IL-13 和 TNF- α 水平均显著升高($P<0.01$)。15 mg/kg 白藜芦醇能够显著降低 COPD 大鼠肺 IL-13、TNF- α 、IL-8 水平($P<0.01$)。45 mg/kg 白藜芦醇能够抑制 IL-13、TNF- α 、IL-8 水平($P<0.01$)。对照组和白藜芦醇阳性组 IL-8、IL-13 和 TNF- α 水平均没有显著差异。见表 1。

3.3 白藜芦醇对 COPD 大鼠肺组织 Derlin-1、JNK 和 p-JNK 蛋白表达水平的影响

采用免疫组化法对肺组织 Derlin-1 蛋白的表达

进行检测, 见图 2。免疫组化半定量分析结果显示, 与对照组比较, 模型组 Derlin-1 表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。而相对于模型组, 45 mg/kg 白藜芦醇显著降低 Derlin-1 表达水平 ($P < 0.01$)。15 mg/kg 白

藜芦醇在一定程度上抑制 Derlin-1 的表达水平, 但与模型组比较并无显著性差异。相对于对照组, 5 mg/kg 白藜芦醇阳性药单独干预并未显著影响肺脏 Derlin-1 的表达水平。

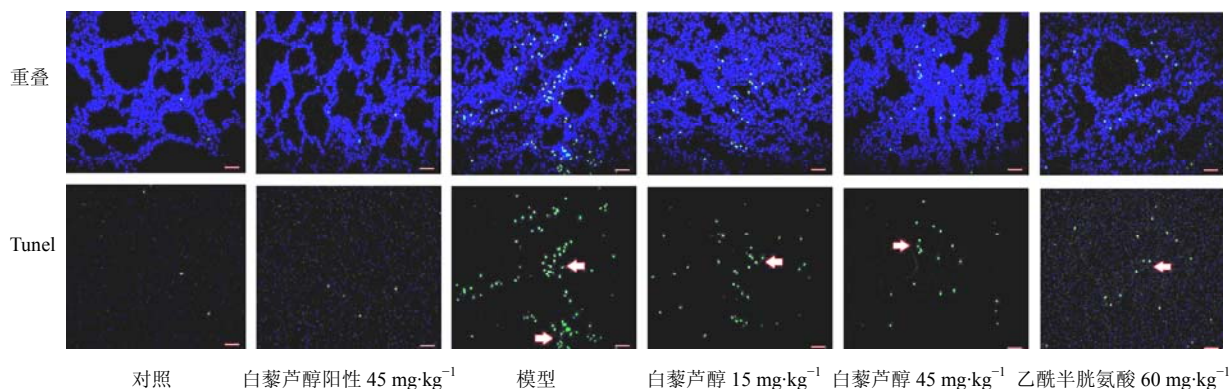


图 1 白藜芦醇对 COPD 大鼠肺泡上皮细胞 TUNEL 染色图

Fig. 1 TUNEL staining maps of resveratrol on alveolar epithelial cells in COPD rats

表 1 白藜芦醇对 COPD 大鼠肺 IL-8、IL-13 和 TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of resveratrol on levels of IL-8, IL-13, and TNF- α in COPD rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-8/(pg·mL ⁻¹)	IL-13/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	83.01 ± 10.41	51.91 ± 8.62	152.18 ± 10.20
白藜芦醇阳性	45	85.74 ± 7.45	54.34 ± 7.36	97.25 ± 19.42
模型	—	276.97 ± 35.98 ^{###}	161.28 ± 21.42 ^{###}	364.49 ± 26.53 ^{###}
乙酰半胱氨酸	60	143.95 ± 16.02 ^{###}	82.41 ± 11.52 ^{**}	224.05 ± 19.33 ^{**}
白藜芦醇	15	238.73 ± 36.18	127.84 ± 13.62 ^{**}	309.99 ± 22.03 ^{**}
	45	174.37 ± 20.22 ^{**}	94.06 ± 16.25 ^{**}	241.43 ± 17.62 ^{**}

与对照组比较: ^{###} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

^{###} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

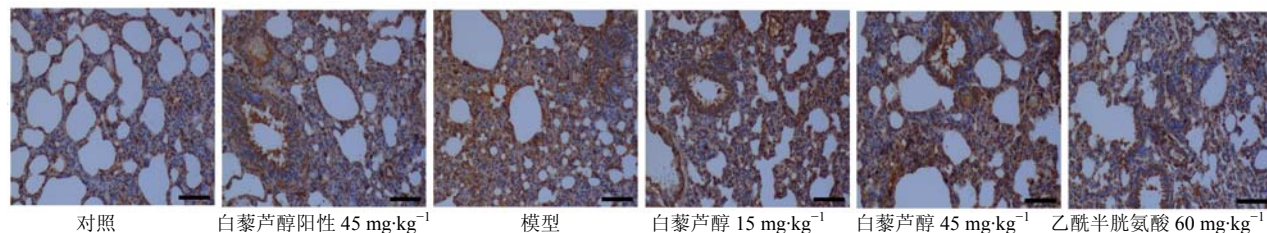


图 2 白藜芦醇对 COPD 大鼠肺泡上皮细胞 Derlin-1 免疫组化图

Fig. 2 Immunohistochemistry analysis for Derlin-1 of resveratrol on alveolar epithelial cells in COPD rats

采用 Western blotting 法对肺组织 Derlin-1 蛋白的表达进行检测, 见表 2 和图 3。可以看出, 与对照组比较, 模型组大鼠肺 Derlin-1 的蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。白藜芦醇 45 mg/kg 能明显抑

制 Derlin-1 蛋白表达 ($P < 0.01$)。模型组大鼠肺组织 JNK 的磷酸化水平相对于对照显著升高 ($P < 0.01$)。相对于模型组, 15、45 mg/kg 白藜芦醇均能够显著降低大鼠肺组织 p-JNK 水平 ($P < 0.01$)。

表 2 白藜芦醇对 COPD 大鼠肺泡上皮细胞 Derlin-1、JNK 和 p-JNK 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effects of resveratrol on expressions of Derlin-1, JNK, and p-JNK of alveolar epithelial cells in COPD rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Derlin-1/GAPDH (相对值)	p-JNK/JNK (相对值)
对照	—	1.00±0.13	1.00±0.21
白藜芦醇阳性	45	0.98±0.09	0.85±0.05
模型	—	2.39±0.19 ^{##}	1.99±0.26 ^{##}
乙酰半胱氨酸	60	1.45±0.11 ^{**}	0.99±0.17 ^{**}
白藜芦醇	15	2.17±0.16	1.63±0.24 ^{**}
	45	1.60±0.16 ^{**}	1.46±0.24 ^{**}

与对照组比较: ^{##}*P* < 0.01; 与模型组比较: ^{**}*P* < 0.01

^{##}*P* < 0.01 vs control group; ^{**}*P* < 0.01 vs model group

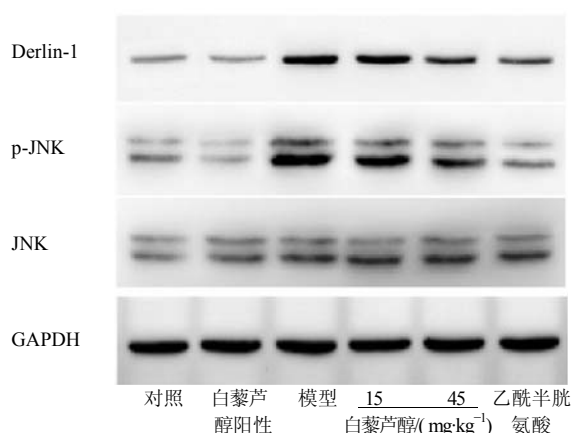


图 3 白藜芦醇对 COPD 大鼠肺泡上皮细胞 Derlin-1、JNK 和 p-JNK 表达 Western blotting 检测结果

Fig. 3 Western blotting analysis for the Derlin-1, JNK, and p-JNK expression of resveratrol on alveolar epithelial cells in COPD rats

4 讨论

现已知 COPD 是一种持续性气流受限的呼吸系统疾病, 烟雾诱导的慢性炎症是其发病的重要危险因素之一。TNF- α 和 IL-8 等是 COPD 促炎细胞因子网络的重要组成部分^[8]。本研究结果和相关研究报道均证实白藜芦醇能够有效抑制烟熏和 LPS 诱导的肺组织 IL-8、IL-13 和 TNF- α 等促炎细胞因子的水平, 改善肺泡上皮细胞凋亡^[5]。但白藜芦醇防治 COPD 的具体分子机制却尚不明确。研究显示, 肺泡上皮细胞凋亡在 COPD 气流受限、肺组织纤维化病变等过程中均扮演重要角色^[9-10]。在正常生理条件下, 内质网负责细胞内蛋白质的生物合成, 当外界有害刺激超出机体调节能力时, 内环境稳态将被破坏, 细胞出现内质网应激现象, 从而导致胞内蛋白结构紊乱, 最终诱导细胞凋亡^[11]。事实上, 内质网应激与线粒体通路和死亡受体通路并列, 是负责

细胞凋亡主流信号转导通路, 在 COPD 肺上皮细胞凋亡和肺脏纤维化等病理过程中发挥至关重要的作用^[10, 12]。Derlin-1 是内质网跨膜蛋白 Derlin 的亚型之一, 广泛参与正常生物功能和细胞信号通路的维持。Derlin-1 具有激活 MAPK 信号通路的能力, 在多种呼吸系统疾病(包括非小细胞肺癌和 COPD 等)中均呈高表达状态^[3]。JNK 通路是 MAPK 信号通路的重要组成部分, 参与细胞增殖和凋亡^[9]。进一步的探索发现, 在烟熏促进内质网应激、肺泡上皮细胞凋亡和加剧 COPD 的发展过程中, JNK 的磷酸化激活是内质网应激导致细胞凋亡的 3 条主要途径之一, 其活化程度与 COPD 肺泡上皮细胞凋亡程度正相关^[11]。一方面, 抑制 JNK 通路有助于改善内质网应激, 并协同抑制细胞凋亡^[12]; 另一方面, 阻断 JNK 的磷酸化激活是降低 TNF- α 和 IL-8 等促炎细胞因子水平重要手段之一^[8]。

综上所述, 白藜芦醇能够通过调控肺组织内质网应激相关蛋白 Derlin-1 的表达, 抑制 JNK 磷酸化和促炎细胞因子水平, 改善了肺泡上皮细胞。

参考文献

- [1] Yoshida T, Tudor RM. Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(3): 1047-1082.
- [2] Wei J, Fan G, Zhao H, et al. Heme oxygenase-1 attenuates inflammation and oxidative damage in a rat model of smoke-induced emphysema [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(5): 1384-1392.
- [3] 孙银辉, 胡瑞成, 戴爱国. 内质网膜蛋白 Derlin 家族与肺疾病 [J]. *临床与病理杂志*, 2014, 34(4): 440-445.
- [4] 李先宽, 李赫宇, 李 帅, 等. 白藜芦醇研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(14): 2568-2578.
- [5] 张明灯, 邓毅书, 刘世昌, 等. 白藜芦醇对慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的保护作用 [J]. *临床肺科杂志*, 2013,

- 18(8): 1359-1362.
- [6] 宋一平, 崔德健, 茅培英, 等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立及药物干预的影响 [J]. 中华内科学杂志, 2000, 39(8): 556-557.
- [7] 方庭正, 段蕴铀, 欧敏. 益肺活血汤对大鼠慢性阻塞性肺疾病模型肺组织氧化抗氧化失衡的影响 [J]. 天津中医药, 2016, 33(7): 419-424.
- [8] 潘勇军, 石聪颖, 张博. 院内清肺汤对 COPD 模型大鼠肺组织炎症因子的影响 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(6): 1317-1318.
- [9] 樊黎丽. JNK 与 ERK 在慢性阻塞性肺疾病大鼠骨骼肌细胞凋亡中的作用 [J]. 武汉大学学报: 医学版, 2015, 36(6): 891-895.
- [10] Roberson E C, Tully J E, Guala A S, *et al.* Influenza induces endoplasmic reticulum stress, caspase-12-dependent apoptosis, and c-Jun N-terminal kinase-mediated transforming growth factor- β release in lung epithelial cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 46(5): 573-581.
- [11] 甘桂香, 胡瑞成, 戴爱国, 等. 吸烟慢性阻塞性肺疾病大鼠肺组织内质网相关凋亡基因 Caspase-12 的表达 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2011, 10(1): 33-37.
- [12] 刘丽芳, 刘学军, 杜毓锋, 等. Ac-SDKP 通过抑制内质网应激对肺纤维化细胞凋亡的影响 [J]. 中华老年病研究电子杂志, 2016, 3(4): 33-40.