

本文引用:李竹英,王 婷,田春燕.参芪补肺方对慢性阻塞性肺疾病稳定期大鼠 Nrf2 和 γ -GCS 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(12):1388-1392.

参芪补肺方对慢性阻塞性肺疾病稳定期大鼠 Nrf2 和 γ -GCS 表达的影响

李竹英¹,王 婷²,田春燕^{2*}

(1.黑龙江中医药大学附属第一医院,黑龙江 哈尔滨 150040;2.黑龙江中医药大学,黑龙江 哈尔滨 150040)

〔摘要〕 **目的** 探讨参芪补肺方对大鼠肺组织红系衍生核因子相关因子-2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -glutamylcysteine synthetase, γ -GCS)的 mRNA 及蛋白表达水平的影响。**方法** 将 40 只 Wistar 大鼠随机分为空白组、模型组、中药组、富露施组,每组各 10 只。除空白组外,其余 3 组均采用香烟烟雾熏制和经鼻给予脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)制作慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)大鼠模型,且给予相应干预,连续灌胃 30 d。于第 38 天对大鼠进行麻醉并提取肺组织,通过 RT-PCR 法检测 Nrf2 和 γ -GCS 的 mRNA 表达水平,通过免疫组化法、Western blot 法检测 Nrf2 和 γ -GCS 蛋白表达水平。**结果** 中药组、富露施组大鼠 Nrf2、 γ -GCS 的 mRNA 和蛋白表达均低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);中药组大鼠 Nrf2、 γ -GCS 的 mRNA 和蛋白表达与富露施组组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),疗效相当。**结论** 参芪补肺方能够通过降低 Nrf2、 γ -GCS 的 mRNA 及蛋白的表达,减轻 COPD 大鼠的氧化应激反应。

〔关键词〕 参芪补肺方;红系衍生核因子相关因子; γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶;脂多糖;慢性阻塞性肺疾病

〔中图分类号〕R285.5;R563 **〔文献标志码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.12.008

Effect of Shenqi Bufei Decoction on the Expression of Nrf2 and γ -GCS in Rats with Stable Chronic Obstructive Pulmonary Disease

LI Zhuqing¹, WANG Ting², TIAN Chunyan^{2*}

(1. The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang 150040, China;

2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang 150040, China)

〔Abstract〕 **Objective** To investigate the effect of Shenqi Bufei Decoction on the mRNA and protein expression levels of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), Gamma-glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) in rat lung tissue. **Methods** A total of 40 Wistar rats were equally and randomly divided into blank group, model group, traditional Chinese medicine group, and Fluimucil group. All rats except those in the blank group underwent cigarette smoke fumigation and nasal administration of lipopolysaccharide (LPS) to establish a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and received the corresponding intervention by gavage for 30 consecutive days. On the 38th day, the rats were given anesthesia and their lung tissues were collected. The mRNA expression levels of Nrf2 and γ -GCS were measured by RT-PCR, and the protein expression levels of Nrf2 and γ -GCS were measured by immunohistochemistry and Western blot. **Results** The mRNA and protein expression of Nrf2 and γ -GCS in the model group was significantly higher than that in the Fluimucil group and the traditional Chinese medicine group ($P <$

〔收稿日期〕2017-11-24

〔基金项目〕黑龙江省级领军人才梯队后备带头人资助项目(黑人社函[2014]455号);黑龙江中医药中青年科技攻关项目(ZQG-023);黑龙江省教育厅面上项目(12531616)。

〔作者简介〕李竹英,女,博士,教授,主任医师,研究方向:从事中西医结合防治慢性阻塞性肺疾病及支气管哮喘的研究。

〔通讯作者〕* 田春燕,女,在读博士研究生,E-mail:1173751956@qq.com。

0.05). There were no significant differences in the mRNA and protein expression of Nrf2 and γ -GCS between the traditional Chinese medicine group and the Flumucil group ($P>0.05$). **Conclusion** Shenqi Bufe Decoction can reduce the mRNA and protein expression of Nrf2 and γ -GCS, so as to reduce the oxidative stress response of COPD rats.

[**Keywords**] Shenqi Bufe Decoction; nuclear factor erythroid 2-related factor 2; Gamma-glutamylcysteine synthetase; lipopolysaccharide; chronic obstructive pulmonary disease

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是以气流受限且不完全可逆为特征, 常呈进行性发展, 与气道、肺的慢性炎症反应有关的疾病^[1]。因 COPD 发病率与病死率逐年增长、社会经济负担逐渐加重等, COPD 的防治现已受到全球的广泛重视^[2-3]。研究证实氧化/抗氧化失衡是 COPD 的主要发病机制^[4-7]。还原型谷胱甘肽 (GSH) 是一种含有巯基的抗氧化物, 在维持肺上皮屏障完整性方面起核心作用, 有消除体内氧自由基 (reactive oxygen species, ROS)、抵御外源性氧化剂对肺持续性损伤的作用。而 γ -GCS 又是 GSH 合成过程中的关键限速酶, 对 GSH 的合成起控制作用。肖敏敏^[8]发现氧化应激刺激 γ -GCS 上调, 增加 γ -GCS mRNA 表达及活性, 促进 GSH 生成速率及生成量, 增强 GSH 的抗氧化作用, 进而减轻氧化应激对肺组织的损伤。除 γ -GCS 以外, 红系衍生核因子相关因子-2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 也是一种重要的调控抗氧化基因表达的核转录因子^[9]。

前期实验结果表明参芪补肺方治疗 COPD 效果颇佳, 该药可以改善肺功能水平, 降低 COPD 大鼠 BALF 炎症程度, 抑制 COPD 大鼠肺组织病理进程, 提高 COPD 大鼠肺组织 miR-146 表达, 降低大鼠肺组织黏蛋白 5AC 水平^[10-11]。本文将探讨参芪补肺方对 COPD 大鼠肺组织 Nrf2、 γ -GCS 的影响, 并对其作用机制进行初步研究。

1 材料

1.1 动物

健康雌性 Wistar 大鼠 40 只, 鼠龄在 50 d 左右, 体质量 (200±30)g, 由黑龙江中医药大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(黑)2008-004。

1.2 药物制备

参芪补肺方: 党参 20 g, 黄芪 20 g, 熟地黄 15 g, 补骨脂 15 g, 五味子 15 g, 淫羊藿 15 g, 黄精 15 g, 山茱萸 15 g, 紫菀 15 g, 款冬花 15 g, 清半夏

10 g, 紫苏子 15 g, 地龙 10 g, 甘草 5 g, 共计 200 g。由黑龙江中医药大学附属第一医院制剂室制备 (每剂 56 mL, 含生药 200 g), 按照人 (70 kg) 与大鼠 (220 g) 体表面积系数 0.018 计算, 每只大鼠每日 5 mL/kg 灌胃治疗。富露施: 将富露施 (乙酰半胱氨酸颗粒) 配制成 185 mL 的溶液 (含富露施 2 g), 大鼠每日 0.054 g/kg 灌胃治疗。

1.3 主要试剂及仪器

脂多糖 (LPS) (美国 Sigma 公司); 富露施: 意大利赞邦集团 (批号: H20000471); 大前门牌香烟 (上海烟草公司生产); 总 RNA 提取 TRIZOL 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); 自制动物烟熏箱 (50 cm×65 cm×145 cm); 高速低温离心机 (Eppendorf 公司); 酶标仪 (北京六一公司 WD-9405B); 荧光定量 PCR 仪 (美国 BIO-RAD 公司); 水平电泳槽机 (美国 BIO-RAD 公司); 甩片机 (美国 BIO-RAD 公司); 一抗山羊抗兔 Nrf2、 γ -GCS (beyotime 公司 A0208); 二抗山羊抗小鼠 Nrf2、 γ -GCS (beyotime 公司 A0216)。

2 方法

2.1 分组

适应性喂养 1 周后, 将 40 只 Wistar 大鼠随机分为空白组、模型组、中药组、富露施组, 每组 10 只。

2.2 模型制备及干预

模型组、富露施组、中药组参照崔德健^[12]和赵春玲等^[13]实验方法建立 COPD 大鼠模型, 将大鼠置于自制烟熏箱 (50 cm×65 cm×145 cm) 内, 箱体下侧壁有一个通气孔, 箱体左顶端有排烟孔, 在箱内燃烧器内点燃 20 g 香烟烟丝, 待烟雾完全散去后取出各组大鼠, 全程约 30 min, 每日 1 次, 除滴药日外, 连续烟熏 24 d。除空白组外, 其余各组分别于实验开始的第 1、8、15、22 天给予 LPS (1 mg/mL) 0.1 mL 滴鼻。自实验第 9 天起, 中药组大鼠每日 17.86 g/kg 参芪补肺方汤剂灌胃 1 次; 富露施组每日 0.054 g/kg 富露施药液灌胃 1 次; 模型组每日 0.9% NaCl 5 mL/kg

灌胃,共计给药治疗 30 d。

2.3 标本采集

于实验第 38 天药物治疗结束后 4 h,称质量并 2%戊巴比妥(35 mg/kg)腹腔注射麻醉,将麻醉后的大鼠仰卧固定于鼠板,胸部皮消毒后切开胸部暴露肺部,沿肺门剪下右肺,经 PBS 漂洗后,取副叶、后叶 4 °C 下固定 2 h,进行石蜡包埋及切片,片厚 5 μm;前叶浸在 RNA later 保存液中,-80 °C 保存,留作 RT-PCR 检测;中叶放入 3 mL EP 管中,-80 °C 保存,备用。

2.4 标本检测

2.4.1 RT-PCR 检测 Nrf2、γ-GCS mRNA 表达 称取大鼠肺组织 100 mg 按照说明书提取 RNA,测量 RNA 的纯度,取 1 μL 总 RNA 用 DEPC 水稀释 100 倍,放于酶标仪测定 OD260、OD280 值。按照 RT-PCR 试剂盒说明书将 RNA 反转录成 cDNA,取上述反应产物 2 μL cDNA,其中加入上下游引物各 1.5 μL;TaqDNA 聚合酶混合物 8 μL;ddH₂O 7 μL。反应条件:预变性:95 °C 4 min;变性:温度 94 °C,时间 30 s;退火:温度 50 °C,时间 1 min;延伸:温度 72 °C,时间 30 s;终末延伸:温度 72 °C,时间 5 min。用凝胶数字成像系统扫描分析扩增产物条带,条带与内参照 GAPDH 扩增带的吸光度比值作为其 mRNA 表达水平的相对指标。各引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列及产物长度

引物名称	引物序列	产物长度/bp
GAPDH	Forward:5'-CGCTAACATCAAATGGGCTG-3'	201
	Reverse:5'-TTGCTGACAATCTTGAGGGAG-3'	
γ-GCS	Forward:5'-TCCCTTTTACCGAGGCTATGT-3'	512
	Reverse:5'-AAAGGATCACTCTGGTGAGCA-3'	
Nrf2	Forward:5'-AGTCCAGAAGCCAAACTGACA-3'	521
	Reverse:5'-ACACTTCAGGGCACTATCT-3'	

2.4.2 免疫组化法检测 Nrf2、γ-GCS 蛋白的表达 将后叶切片脱蜡至水(所用试剂为二甲苯、无水、95%、85%、70%酒精、蒸馏水)。然后依次进行灭活,暴露抗原结合位点,蒸馏水冲洗 3 次,用 PBS 按 1:100 稀释孵育一抗,湿盒内 4 °C 过夜,二抗用 PBS 稀释 200 倍,滴加至完全覆盖组织,湿盒内 37 °C 孵育 30 min,浸泡在 PBS 中 5 min,重复 3 次,滴加 SABC,DAB 显色,复染、脱水、透明、中性树胶封片,

每组内随机挑选 3 个 200 倍视野的照片。

2.4.3 Western blot 法检测 Nrf2、γ-GCS 蛋白的表达 分别提取各组组织蛋白,依据 BCA 法蛋白含量检测试剂盒说明测定蛋白浓度。将 0.5 μg/μL 的 BSA 蛋白标准液按照 0、1、2、4、8、12、16、20 μL 体积分装于酶标板各孔,剩余体积用 PBS 缓冲液补齐至 20 μL。将各组待测样本蛋白 1 μL 与 19 μL PBS 混匀。按照 A 液:B 液体积比 50:1 制成 BCA 工作液,加入各孔中充分混匀后,置于 37 °C 反应 20 min,将酶标板置于载台上,进行读数,记录数据。按照 Western blot 操作步骤操作,制备 8%分离胶、5%浓缩胶,每个泳道各加入 40 μg 样蛋白,经 SDS-PAGE 恒压电泳、转膜,脱脂牛奶封闭,用 1:500 比例稀释一抗进行孵育;二抗按 1:1 000 比例稀释,ECL 底物发光,将胶片进行扫描,用凝胶图像处理系统(Gel-Pro-Analyzer 软件)分析目标条带的光密度值。

2.5 统计学方法

运用 SPSS 16.0 软件分析数据。符合正态分布的计量资料运用 *t* 检验,不符合正态分布的计量资料运用非参数检验。计数资料采用卡方(χ^2)检验。若 $P < 0.05$ 则有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠肺组织 Nrf2、γ-GCS mRNA 表达水平比较 与空白组比较,其他各组大鼠 Nrf2、γ-GCS mRNA 表达均显著升高($P < 0.05$),说明 COPD 大鼠模型成立;富露施组、中药组 Nrf2、γ-GCS mRNA 表达均低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);中药组 Nrf2、γ-GCS mRNA 的表达与富露施组比较无显著差异($P > 0.05$),疗效相当。提示参芪补肺方能够缓解大鼠肺组织的氧化应激反应,降低 Nrf2、γ-GCS mRNA 水平。见表 2。

表 2 各组大鼠肺组织中 Nrf2、γ-GCS mRNA

组别	<i>n</i>	吸光度比值 ($\bar{x} \pm s$)	
		Nrf2	γ-GCS
空白组	10	0.34±0.05	0.25±0.06
模型组	8	0.86±0.06 [▲]	0.64±0.10 [▲]
富露施组	8	0.71±0.06 ^{▲*}	0.47±0.06 ^{▲*}
中药组	9	0.72±0.08 ^{▲*}	0.47±0.06 ^{▲*}

注:与空白组比较[▲] $P < 0.05$;与模型组比较[★] $P < 0.05$

3.2 大鼠肺组织 Nrf2、 γ -GCS 蛋白表达水平比较

空白组 Nrf2、 γ -GCS 蛋白的表达明显低于模型组、富露施组、中药组,具有统计学意义($P<0.05$);模型组 Nrf2、 γ -GCS 蛋白的表达高于富露施组、中药组($P<0.05$),提示参芪补肺方能够缓解大鼠肺组织的氧化应激反应,降低 Nrf2、 γ -GCS 蛋白水平。见表 3,图 1-图 3。

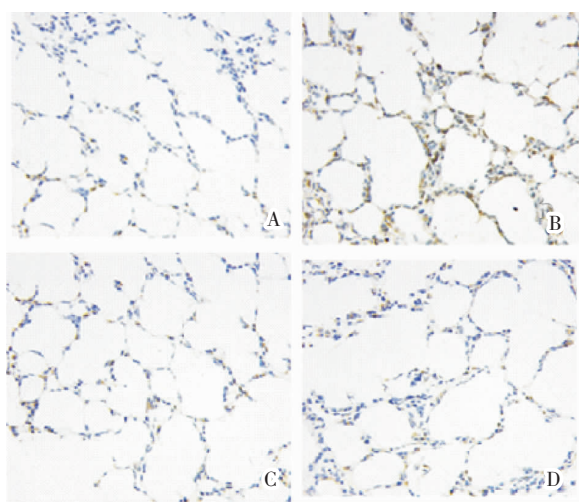
表 3 各组大鼠肺组织中 Nrf2、 γ -GCS 蛋白

组别	n	平均光密度值 ($\bar{x}\pm s$)	
		Nrf2	γ -GCS
空白组	10	0.193±0.014	1.228±0.456
模型组	8	0.407±0.055 [▲]	5.214±0.748 [▲]
富露施组	8	0.257±0.030 ^{▲*}	1.136±0.400 ^{▲*}
中药组	9	0.252±0.027 ^{▲*}	1.574±0.329 ^{▲*}

注:与空白组比较[▲] $P<0.05$;与模型组比较^{*} $P<0.05$



图 1 Western blot 检测各组大鼠肺组织中 Nrf2、 γ -GCS 蛋白表达电泳图

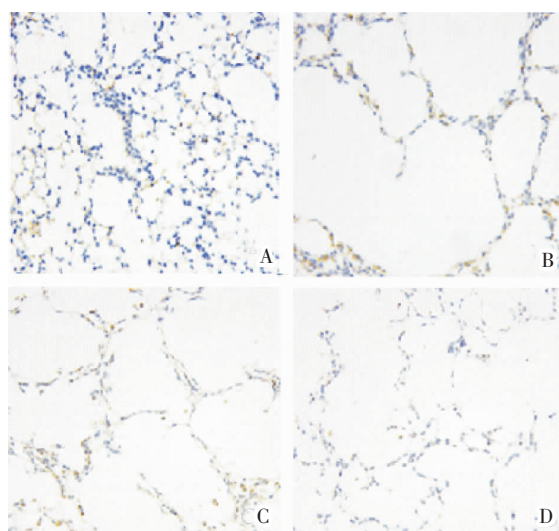


注:A.空白组;B.模型组;C.富露施组;D.中药组

图 2 各组大鼠肺组织 Nrf2 免疫组化光镜图($\times 200$)

4 讨论

研究发现,吸烟会刺激机体释放大量 ROS、炎症细胞及氧化剂,这种大量蓄积可引起细胞毒性,造成肺组织损伤^[14]。为了消除多余的氧化物质,机体诱导 γ -GCS 增加,刺激 GSH 大量合成、活化,起到抗氧化作用。相关研究证实 GSH 不仅具有重要的抗



注:A.空白组;B.模型组;C.富露施组;D.中药组

图 3 各组大鼠肺组织 γ -GCS 免疫组化光镜图($\times 200$)

氧化作用,而且具有维护气道上皮完整、减轻气道炎症等作用^[18]。Nrf2 是 COPD 治疗中的关键转录激活因子,具有调控 γ -GCS 基因表达的关键作用,在正常状态下,Nrf2 以非活化的形式存在于胞浆中,不具有抗氧化作用,但当机体氧化/抗氧化失衡时,则可活化 Nrf2,进而促进 γ -GCS 的高表达,来对抗氧化应激,因此对于 COPD 的治疗,可以通过增加 Nrf2 的活化使 γ -GCS 的表达快速增多,使机体产生更多的抗氧化物质,从而减慢和延缓 COPD 恶化^[15-16]。

COPD 可归为中医学中“肺胀”的范畴,气虚、血瘀、痰阻是 COPD 稳定期的主要病机特点,调补肺肾、化痰行瘀是治疗 COPD 稳定期的重要治法。参芪补肺方中君药为黄芪、党参,黄芪补肺脾元气、益卫固表,党参益气补肺,合用增补肺益气之效;臣药熟地黄、黄精补肾纳气平喘,五味子敛肺止咳,补骨脂、淫羊藿补肾壮阳,共奏滋阴补肾润肺,温肾助阳之功;佐药紫菀、款冬花降气止咳,紫苏子、清半夏、地龙敛肺化痰、祛风平喘,山茱萸补肝益肾、收敛固涩;使药甘草,止咳化痰,调和药性。全方肺肾得补,痰湿得消。临床表明运用参芪补肺方治疗 COPD 稳定期疗效显著^[17]。

本实验结果显示,中药组 Nrf2、 γ -GCS mRNA 和蛋白的表达均低于模型组,差异具有统计学意义($P<0.05$),说明中药组的氧化应激反应轻于模型组,参芪补肺方对 COPD 有治疗作用,这可能是由于通过参芪补肺方的灌胃治疗,缓解并减轻了外源性氧

化剂、ROS、炎症细胞等对大鼠肺组织的持续损伤,使得 Nrf2、 γ -GCS mRNA 和蛋白的表达相对性的降低,这为参芪补肺方治疗 COPD 的作用机制研究提供了新思路。参芪补肺方对 Nrf2、 γ -GCS mRNA 和蛋白表达的影响,将为 COPD 的治疗开辟新途径。

参考文献:

- [1] 李正武,龙芸芸,饶媛,等.培土生金法联合穴位敷贴治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期的临床研究[J].湖南中医药大学学报,2016,36(8):75-79.
- [2] 乔翠霞,李素云.慢性阻塞性肺疾病的流行病学研究现状[J].中国老年杂志,2010,30(11):1618-1621.
- [3] 许扬,张鹏俊,彭博,等.北京市某医联体内社区居民对慢性阻塞性肺疾病的认知现状调查[J].中国临床医生杂志,2017,45(1):57-59.
- [4] 张洋,李永霞.炎症及氧化应激反应在慢性阻塞性肺疾病发病机制中的研究进展[J].昆明医学院学报,2015,36(1):162-164,180.
- [5] 田燕歌,李亚,李建生,等.调补肺肾三法对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺组织氧化应激的影响和远后效应[J].中华中医药杂志,2014,29(2):621-624.
- [6] SUNDAR I K, YAO H, RAHMAN I. Oxidative stress and chromatin remodeling in chronic obstructive pulmonary disease and smoking-related diseases [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18(15):1956-1971.
- [7] 平芬,牛占丛,马国强,等.N-乙酰半胱氨酸对慢性阻塞性肺疾病急性加重患者氧化应激的影响[J].河北医药,2013,35(9):1285-1287.
- [8] 肖敏敏.KLF2 调控 Nrf2/Bach1 在屋尘螨抗原处理的支气管上皮细胞中对氧化应激的作用[D].衡阳:南华大学,2012.
- [9] 杨丽梦,熊旭东.Keap1-Nrf2/ARE 氧化应激信号通路与脓毒症急性肺损伤的相关性研究[J].临床急诊杂志,2016,17(8):590-592,596.
- [10] 邹扶旻.基于黏液高分泌机制探讨 Nrf2 对慢阻肺大鼠 miR-146、MUC5AC 调控及参芪补肺方的干预作用[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2016.
- [11] 田春燕,李竹英.参芪补肺方对慢性阻塞性肺疾病稳定期大鼠 Nrf2 和 MUC5AC 表达的影响[J].世界最新医学信息文摘,2016,16(36):198-199.
- [12] 宋一平,崔德健,茅培英,等.慢性阻塞性肺疾病大鼠模型气道重塑及生长因子的研究[J].中华结核和呼吸杂志,2001,24(5):283-287,1001.
- [13] 邹海峰,赵春玲,陈燕,等.慢性阻塞性肺疾病大鼠肺牵张反射对心率的影响[J].西部医学,2007,19(1):9-11.
- [14] 陈聆,李敏.阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者的氧化应激状态和血管内皮的改变[J].诊断学理论与实践,2009,8(3):348-351.
- [15] 陈林,戴爱国,胡瑞成.慢性阻塞性肺疾病大鼠 Nrf2 和 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶表达的改变[J].中国应用生理学杂志,2008,24(3):339-342.
- [16] NGUYEN T, SHERRATT P J, HUANG H C, et al. Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(7): 4536-4541.
- [17] 王婷.参芪补肺方治疗慢阻肺稳定期(肺肾气虚兼血瘀证)的临床观察及对血清 IL-17 的影响[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2017.

(本文编辑 杨 瑛)