

云药七龙天对慢性阻塞性肺病大鼠 Nrf2 和 DJ-1 调控作用研究 *

刘 青, 付 义, 杨春艳[△], 吴洪波, 张爱华, 张俊图, 李建梅, 景海卿
(云南中医药大学第三附属医院/昆明市中医医院, 云南 昆明 650011)

摘要: **目的** 观察云药七龙天对慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)大鼠 Nrf2 和 DJ-1 的影响。**方法** 60 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、阳性药对照组、七龙天低、中、高剂量组, 每组 10 只。采用气管注入脂多糖加熏香烟方法诱导 COPD 模型, 正常组注入生理盐水。七龙天低、中、高剂量组分别灌胃给予七龙天 0.35、0.7、1.4 g/kg, 阳性对照组灌胃孟鲁司特片 13 mg/kg。分别检测各组大鼠肺泡灌洗液中有核细胞数、肺功能指标、血清和肺组织匀浆中的 Nrf2 和 DJ-1 水平。**结果** 与正常组比较, 模型组肺泡灌洗液中有核细胞数显著增加($P<0.05$), 肺功能减弱、血清和肺组织匀浆中的 Nrf2 和 DJ-1 水平降低($P<0.05$); 给予七龙天药物治疗后, 大鼠肺功能改善, Nrf2 和 DJ-1 水平逐渐升高, 并呈现出剂量依赖性。与模型组比较, 七龙天中、高剂量组血清 Nrf2 和 DJ-1 的水平增加, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 七龙天可以通过调节 Nrf2 和 DJ-1 水平改善机体氧化应激平衡, 从而对 COPD 大鼠具有一定的治疗作用。

关键词: 慢性阻塞性肺病; 七龙天; Nrf2; DJ-1

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2020)04-0019-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2020.04.004

Study on the Regulation of Qilongtian on Nrf2 and DJ-1 in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Rats

LIU Qing, FU Yi, YANG Chunyan, WU Hongbo, ZHANG Aihua, ZHANG Juntu, LI Jianmei, JING Haiqing
(The Third Affiliated Hospital of Yunnan University of Chinese Medicine/Kunming Municipal Hospital
of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650011, China)

ABSTRACT: Objective To explore the effect of an Yunnan national drug Qilongtian on the levels of Nrf2 and DJ-1 in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** 60 SD rats were randomly divided into normal control group, model group, positive control group, Qilongtian low, medium and high dose groups, with 10 rats in each group. The COPD model was induced by tracheal injection of lipopolysaccharide plus smoked cigarettes, and normal group was injected with saline. Qilongtian low, medium and high dose treatment groups were given 0.35, 0.7 and 1.4 g/kg Qilongtian by gavage respectively, and positive control group was given 13 mg/kg Montelukast Tablets. The number of nuclear cells in the alveolar lavage fluid were recorded, lung function indexes, levels of Nrf2 and DJ-1 in serum and lung tissue homogenate were measured. **Results** Compared with the normal group, the number of nuclear cells in the alveolar lavage fluid in the model group was significantly increased ($P<0.05$), lung function was impaired, meanwhile the levels of Nrf2 and DJ-1 in serum and lung tissue homogenate were decreased ($P<0.05$). After Qilongtian treatment, the lung function of rats were improved, and the levels of Nrf2 and DJ-1 were gradually increased in a dose dependent manner. Compared with the model group, the changes of medium and high dose groups showed statistical significance ($P<0.05$). **Conclusion** Qidongtian could optimize the redox homeostasis in the body by regulating the levels of Nrf2 and DJ-1, which leads to a therapeutic effect on COPD rats.

KEY WORDS: chronic obstructive pulmonary disease; Qilongtian; Nrf2; DJ-1

收稿日期: 2020-07-10

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81160467、81860804); 云南省卫生内设研究机构项目(2017NS106); 云南省基础研究重点项目(2018FA050); 云南省应用基础项目(2017FD184); 云南省卫生计生委、卫生科技计划项目(2017NS107)

第一作者简介: 刘青(1982-), 男, 主治医师, 研究方向: 中西医结合治疗肺病研究。

[△]通信作者: 杨春艳, E-mail: 1627124613@qq.com

慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是临床常见的呼吸系统疾病, 严重危害着人类的身心健康^[1]。其发病原因主要是患者吸入香烟、粉尘等有害气体或有害颗粒造成的肺部异常炎症, 表现为反复咳嗽、咳痰、呼吸困难、胸闷以及肺功能下降等临床症状, 集中发病于 40 岁以上的中老年人群^[2]。随着社会工业化的发展, 空气质量不断下降, COPD 的发病率持续升高, 已成为全球关注的公共卫生问题^[3]。COPD 的发病机制复杂, 其中患者肺部的氧化应激反应, 近年来被广泛认为是该病的主要病因^[4], 若不及时给予药物干预, 会对病人的健康造成极大的威胁^[5]。核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 和帕金森病蛋白 (DJ-1) 是细胞内调控多种抗氧化应激反应的重要调控因子^[6], 其中 DJ-1 能够通过抑制核内 Nrf2 降解的速率, 增加细胞对氧化应激的抵抗能力^[7-9]。云南特色民族药七龙天是以三七、红景天为主的中药复方, 课题组前期将七龙天应用于 COPD 患者, 取得了较好疗效, COPD 患者的临床症状得到了显著改善^[10]。本文主要研究云南特色中草药七龙天对 COPD 大鼠的药效, 以及对 Nrf2 和 DJ-1 调控的影响, 为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 60 只 SD 大鼠, 7~8 周龄, 体质量 180~220 g, 雄雌各半, 成都达硕生物科技有限公司提供, 合格证号: SCXK(川)2008-24。动物饲养于云南省中医中药研究院实验动物屏障系统 (SYXK 滇 2017-0003), 至少饲养 1 周后使用, 实验操作符合云南中医药大学动物伦理委员会的相关规定。饲养条件: 温度 (22 ± 1) °C, 湿度 (55 ± 5) %, 12 h 光暗循环。饲料和水均在消毒后由动物自由摄取。

1.2 药物与试剂 七龙天 (云南省医疗机构制剂注册批件: ZJZ2020003) 的制备与质控主要在昆明市中医药制剂中心 (GPP 认证, 滇: 2010009HZ) 完成, 利戊巴比妥钠和细菌脂多糖购自 Sigma 公司; 红河牌香烟 (烟碱含量为 15 mg/支), 购自云南红河卷烟厂; 孟鲁司特购自杭州默沙东制药有限公司; 大鼠 Nrf2、DJ-1 ELISA 试剂盒购自江苏卡尔文生物有限公司。

1.3 仪器 Epoch 连续波长酶标仪购自美国 Bio-Tek 公司; Megafugel 1.0R 离心机购自德国 Thermo Scientific Heraeus; 玻璃熏箱自制; MP160 16 通道生理仪购自 Biopac 公司。

1.4 COPD 大鼠模型的诱导及分组给药 60 只 SD 大鼠随机分成正常对照组、模型组、阳性药对照组、七龙天低、七中、高剂量组, 每组 10 只。除正常对照组外, 每组采用气管注入脂多糖加熏香烟方法诱导 COPD。具体方法为: 第 1 天和第 14 天, 用 1% 的利戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 仰卧位固定于大鼠固定板, 暴露声门, 将 18 号静脉套管针快速插入气管, 拔出针芯, 用 1 mL 注射器注入溶于生理盐水的脂多糖 200 μL (1 mg/mL), 然后将大鼠固定板直立旋转, 使脂多糖能够均匀分布于两肺。正常组注入生理盐水。第 2~28 天将大鼠放入 60 cm × 50 cm × 40 cm 熏吸箱内, 注入红河牌过滤嘴香烟烟雾, 浓度约 5%, 每天上午、下午各 1 h。七龙天低、中、高剂量组分别灌胃给予七龙天 0.35、0.7、1.4 g/kg, 阳性对照组灌胃给予孟鲁司特片 13 mg/kg, 正常对照组和模型组灌胃给予等体积的生理盐水, 每日 1 次, 持续 27 d。

1.5 观测指标及方法

1.5.1 计算肺泡灌洗液 (BALF) 中有核细胞数 使用细胞计数板对肺泡灌洗液中的有核细胞数进行计数。

1.5.2 COPD 大鼠肺功能测定 采用 MP160 16 通道生理仪系统测定各组大鼠肺功能。具体方法如下: 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠, 待大鼠彻底麻醉后用小动物剃毛机剃出颈部被毛, 并碘伏消毒。打开 16 通道生理仪, 将大鼠用胶布仰卧位固定。将呼吸换能器准确连接到 ECG100C 放大器上, 调节通道并设置通道参数。剪刀剪开颈部皮肤, 并记录实验开始时间。左手持眼科弯镊, 右手持眼科直镊钝性分离皮下组织及肌肉。显露气管及上甲状腺腺体后上拉钩。于腺体后方钝性分离气管并带线, 注意勿损伤腺体及气管。提起丝线, 剪刀于气管环之间剪开气管半周。行气管插管, 接呼吸换能器。待大鼠呼吸稳定后打开 MP160 软件开始测试呼吸波, 呼吸波数据采集不少于 30 s。选取所采集的波形, 通过 MP160 分析软件自动分析出呼吸数据。

1.6 COPD 大鼠肺组织及血清中 Nrf2 和 DJ-1 含量测定 末次给药后, 腹主动脉取血, 血液凝固后以 2 500 r/min 离心 10 min, 取血清, -20 °C 保存备用。然后取肺组织, 称量肺组织 50 mg, 加入 450 μL 1 × PBS, 细胞破碎仪在冰盒中充分匀浆, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, BCA 法测定蛋白浓度, 调成统一浓度, -80 °C 保存备用。采用酶联免疫吸附法测定

Nrf2 和 DJ-1 含量。

1.7 统计学分析 采用 SPSS19.0 统计分析软件进行统计学处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较用 t 检验。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 七龙天对 COPD 大鼠有核细胞数的影响 与正常组比较,模型组肺泡灌洗液中有核细胞数显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,阳性药孟鲁司特和七龙天低、中、高剂量组药物干预后,给药组肺泡灌洗液中有核细胞数显著下降($P<0.05$),见表 1。

表 1 七龙天对 COPD 大鼠有核细胞数的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	有核细胞数/(10 ⁴ 个)
正常对照组	—	10.00±3.60*
模型组	—	38.80±14.36
阳性药对照组	0.013	12.81±1.56*
七龙天低剂量组	0.35	19.39±8.73*
七龙天中剂量组	0.7	7.35±3.42*
七龙天高剂量组	1.4	4.35±1.56*

注:与模型组比较,* $P<0.05$ 。

2.2 七龙天对 COPD 大鼠肺功能的影响 检测了七龙天对大鼠最大呼气流速(PEF)、潮气量(TV)、每分钟呼气量(VE)的影响。与正常对照组比较,模型组大鼠 PEF、TV、VE 显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,阳性药孟鲁司特和七龙天中、高剂量组干预后 COPD 大鼠肺 PEF、TV 显著增加($P<0.05$),阳性药孟鲁司特和七龙天低、中、高剂量组干预后肺 VE 明显高于模型组($P<0.05$),见表 2。

表 2 七龙天对模型大鼠肺 PEF、TV、VE 的影响

($\bar{x}\pm s, n=10$)				
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	PEF/(mL·s ⁻¹)	TV/mL	VE/mL
正常对照组	—	7.76±0.91*	1.79±0.08*	162.94±5.31*
模型组	—	3.56±0.90	1.12±0.10	98.63±6.52
阳性药对照组	0.013	6.31±0.31*	1.55±0.08*	154.35±6.50*
七龙天低剂量组	0.35	4.47±0.52	1.25±0.07	114.92±7.16*
七龙天中剂量组	0.7	5.60±0.65*	1.36±0.06*	128.02±6.23*
七龙天高剂量组	1.4	6.48±0.41*	1.51±0.07*	152.56±4.27*

注:与模型组比较,* $P<0.05$ 。

2.3 七龙天对 COPD 大鼠 DJ-1 水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清中 DJ-1 水平明显降低($P<0.05$),与模型组比较,七龙天低、中、高剂量组大鼠血清中 DJ-1 水平逐渐升高,且七龙天中、高剂量组 DJ-1 水平明显高于模型组($P<0.05$);而匀浆肺组织中,各组大鼠 DJ-1 水平无明显变化($P>0.05$),见表 3。

表 3 七龙天对慢性阻塞性肺病模型 DJ-1 水平的影响

($\bar{x}\pm s, n=10$)			
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	血清 DJ-1/(pg·mL ⁻¹)	肺匀浆 DJ-1/(pg·mL ⁻¹)
正常对照组	—	87.51±3.24*	52.08±3.51
模型组	—	60.55±4.05	54.31±1.08
阳性药对照组	0.013	68.52±8.55	49.70±2.13
七龙天低剂量组	0.35	69.57±3.81	45.36±1.80
七龙天中剂量组	0.7	73.66±3.27*	46.92±2.38
七龙天高剂量组	1.4	84.35±1.56*	50.36±3.56

注:与模型组比较,* $P<0.05$ 。

2.4 七龙天对 COPD 大鼠 Nrf2 水平的影响 与正常组比较,模型组血清 Nrf2 水平明显降低($P<0.05$);与模型组比较,七龙天中、高剂量组大鼠血清 Nrf2 水平明显升高($P<0.05$)。大鼠肺组织匀浆中,与正常组比较,模型组 Nrf2 水平也明显降低($P<0.05$),给予七龙天药物治疗后,各治疗组 Nrf2 水平逐渐升高,药效呈现出了剂量依赖性,与模型组比较,七龙天中、高剂量组和阳性药对照组,肺组织 Nrf2 水平有增加趋势,但结果无统计学差异($P>0.05$),见表 4。

表 4 七龙天对慢性阻塞性肺病模型 Nrf2 水平的影响

($\bar{x}\pm s, n=10$)			
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	血清 Nrf2/(pg·mL ⁻¹)	肺匀浆 Nrf2/(pg·mL ⁻¹)
正常对照组	—	1 091.62±45.2*	1 085.22±64.30*
模型组	—	970.54±53.78	956.16±37.08
阳性药对照组	0.013	976.86±29.35	1 010.60±48.29
七龙天低剂量组	0.35	1 039.83±53.78	972.48±37.08
七龙天中剂量组	0.7	1 083.77±40.4*	999.56±21.90
七龙天高剂量组	1.4	1 149.79±13.0*	1 000.26±49.83

注:与模型组比较,* $P<0.05$ 。

3 讨论

COPD 是全球范围内发病率较高的一种常见疾病,且发病率呈上升趋势,给全世界带来了沉重的经济、社会负担。香烟及其它有毒颗粒的吸入会使患者肺部产生炎症,导致肺功能破坏的同时,还损害了机体正常的修复以及防御机制^[11]。本实验研究发现,COPD 大鼠造模成功后,与正常组比较,大鼠肺泡灌洗液中有核细胞数显著增加。由于 COPD 患者肺功能损伤,病人会表现为慢性咳嗽、呼吸困难、咳痰等症状,且长期受到气道损伤、气流受限以及心血管病等多种并发症的困扰,这些都会对患者生命健康造成威胁^[12]。肺功能指标 PEF、TV、VE 水平是反映 COPD 气流受限及严重程度的重要参数^[9],实验结果显示,与正常对照组比较,COPD 模型组大鼠的 PEF、TV、VE 水平均显著下降,给予阳性药孟鲁司特和七龙天药物干预后肺功能指标显著提高,说明七龙天对 COPD 大鼠有改善肺功能的作用。

研究显示,COPD 患者的氧化应激反应较为严重,被认为在发病机制中起着关键作用^[13]。而在机体发生慢性氧化应激损伤时,DJ-1 和 Nrf2 是 2 个关键因子,二者均参与了氧化应激反应的发生发展过程。一方面,DJ-1 可以通过稳定 Nrf2 的表达水平增强抗氧化能力^[14-15];另一方面,DJ-1 的表达水平上调也能够通过增加氧化应激的相关酶活性参与氧化应激,诱导机体的抗氧化能力增强^[16]。本研究中,脂多糖和香烟烟雾联合在大鼠肺部造成了严重的氧化应激。临床上对于 COPD 常规西药治疗效果不甚理想,长期使用糖皮质激素和抗生素等药物会造成患者免疫功能下降^[17]。因此,对 COPD 的治疗有必要进行抗氧化和抗炎的联合用药。七龙天是以三七、红景天为主的具有云南民族医药特色的中药复方,三七、红景天均具有显著的抗炎作用。三七能明显抑制炎症反应对组织的损害^[18];红景天能够提高机体对低氧环境的适应性,增强机体对缺氧和疲劳的耐力^[19]。上述药物共用,可对患者的肺功能进行改善。七龙天应用于 COPD 可显著控制临床症状,改善心肺功能,提高生存质量。在实验中,与正常组比较,COPD 造模后大鼠的 DJ-1 和 Nrf2 水平明显降低,给予七龙天药物治疗后,各治疗组 DJ-1 和 Nrf2

的水平逐渐升高,药效呈现出了剂量依赖性,且与模型组比较,七龙天中、高剂量组的变化显著。但这种上升趋势仅表现在大鼠血清中,在肺组织匀浆中变化不明显。这些结果表明,七龙天对 COPD 的影响可能是通过调节血清中 DJ-1 和 Nrf2 的水平,改善机体氧化应激能力实现的。

综上所述,结合前期研究基础,COPD 肺功能损伤严重,且氧化应激在 COPD 发生发展中起到了关键作用^[20]。DJ-1 和 Nrf2 可调控氧化应激的关键步骤,并在 COPD 发病过程中发挥重要作用。七龙天对 COPD 大鼠具有一定的治疗作用,可以提高大鼠的抗氧化相关因子水平,但仍需要更多研究确认七龙天对肺功能的保护作用。本研究紧跟现代医学对 COPD 发病机制的研究前沿,对于开发云南特色民族药七龙天对慢性呼吸道相关疾病的防治具有重要的理论及实践意义。

参考文献:

- [1] 陈春玲,陈雪营. 比索洛尔治疗慢性阻塞性肺疾病急性发作的远期预后观察[J]. 数理医药学杂志,2020,33(7): 1008-1010.
- [2] 宋竹翠,崔朝勃. 麻杏石甘汤联合沙丁胺醇治疗慢性阻塞性肺疾病的临床疗效研究及对炎症因子的影响[J]. 中华中医药学刊,2020,38(10):222-225.
- [3] 孙丽凤,杨华,陈伟,等. 自血疗法对慢阻肺稳定期模型大鼠炎症反应相关指标的影响[J]. 世界中医药,2020,15(12):1747-1750.
- [4] 李宁,赵雅丽,程永霞,等. 叶酸对铅诱导的大鼠肺脏中氧化应激相关蛋白和内质网应激相关蛋白表达的影响[J]. 动物营养学报,2020,32(9):4318-4326.
- [5] 杨玲玲,石广军. 依达拉奉对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠的干预作用[J]. 临床肺科杂志,2020,25(7):1076-1081.
- [6] 张彪,玉艳红,成秋宸,等. 慢性乙型肝炎患者肝纤维化不同阶段 DJ-1 蛋白的表达与临床相关性研究[J]. 广西医科大学学报,2020,37(3):464-468.
- [7] 杨婷婷,颜建英. DJ-1 与子痫前期关系的研究进展[J]. 国际妇产科学杂志,2018,45(4):373-377.
- [8] 卢鸽,解子婧,汪倩,等. 针刺对卵巢储备功能减退模型大鼠血清炎症因子及卵巢组织 Nrf2/HO-1/NLRP3 信号通路的影响[J]. 中医杂志,2020,61(15):1350-1356.
- [9] 王琳,杜亚康,员富圆. 血府逐瘀片对老年 2 型糖尿病合

- 并慢性阻塞性肺疾病肺功能、氧化应激指标和炎症指标的影响[J]. 药物评价研究, 2020, 43(7): 1378-1381.
- [10] 付义, 杨春艳, 焦丽杰, 等. 七龙天肺动脉高压大鼠的 MPAP、wW、RV/LV+S 的影响[J]. 中国中医急症杂志, 2010, 19(11): 1914-1915.
- [11] 李久荣, 周炜洵, 赵召霞, 等. 炎症相关趋化因子/细胞因子在香烟暴露和戒烟小鼠肺组织中的表达[J]. 中国医学科学院学报, 2014, 36(3): 241-248.
- [12] 周岩, 邵文婷. 温针灸联合耳针对脾肾阳虚型慢性阻塞性肺病患者心肺功能和血氧饱和度的影响[J]. 云南中医学院学报, 2018, 41(5): 69-71.
- [13] 杨江明, 王红芝, 石庆新, 等. 黄芩总黄酮对慢性阻塞性肺疾病大鼠炎症和氧化应激的影响及机制研究[J]. 中国药师, 2020, 23(6): 1069-1072.
- [14] AMATULLAH H, SHAN Y, BEAUCHAMP B L, et al. DJ-1/PARK7 Impairs bacterial clearance in sepsis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2017, 195(7): 889-905.
- [15] 李茹茹. 红景天苷通过调节 ROS/RNS/Complex I 通路在帕金森病模型中发挥神经保护作用[D]. 西安: 中国人民解放军空军军医大学, 2019.
- [16] CUEVAS S, YANG Y, KONKALMATT P, et al. Role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in the oxidative stress-dependent hypertension associated with the depletion of DJ-1[J]. Hypertension, 2015, 65(6): 1251-1257.
- [17] 余群, 陈代珍, 陈音. 清热祛痰法联合西药对 COPD 急性加重期痰热壅肺型患者肺功能及免疫功能的影响[J]. 云南中医学院学报, 2018, 41(4): 51-53.
- [18] 黄家林, 田代雄. 三七总皂苷抗炎免疫药理研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(11): 4657-4660.
- [19] 王永新, 詹皓, 魏日胞, 等. 复方红景天抗缺氧作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 152-153.
- [20] MALHOTRA D, THIMMULAPPA R, NAVAS-ACIEN A, et al. Decline in NRF2-regulated antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease lungs due to loss of its positive regulator, DJ-1[J]. Am J Respir Crit Care Med. 2008, 178(6): 592-604.