

艳山姜挥发油肺部定量给药用于缓解肺气肿的作用

蔡梓民, 彭剑青, 陈艺, 潘迪, 张彦燕, 陶玲, 沈祥春, 龙庆德*

(贵州医科大学 贵州省特色天然药物资源高效利用工程中心, 贵州省高等学校天然药物药理与成药性评价特色重点实验室, 贵州医科大学-贵阳市联合重点实验室, 天然药物资源优效利用重点实验室, 药学院, 贵阳 550025)

[摘要] 目的:初步研究艳山姜挥发油(EOFAZ)经肺部定量给药后对猪胰弹性蛋白(PPE)诱导小鼠产生肺气肿的防治作用,并探讨其相关机制。方法:C57BL/6J小鼠随机分为正常组,模型组,EOFAZ低、高剂量组(2, 20 mg·kg⁻¹)及地塞米松组(1 mg·kg⁻¹)。采用肺部给药定量雾化器每隔7 d给予PPE诱导小鼠产生肺气肿,共给药4次。在此期间,隔天使用肺部给药定量雾化器定量给予EOFAZ,共给药14次。小鼠肺部经苏木素-伊红(HE)染色用于观察各组形态学变化并测量和计算平均内衬间距(MLI),采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测小鼠血浆中肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β),白细胞介素-6(IL-6)的含量,通过生化试剂盒测定肺组织中超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT)的活性及丙二醛(MDA)的含量,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测核因子E₂相关因子2(Nrf2),醌氧化还原酶1(NQO1),B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax),Bcl-2的表达。结果:肺部形态学观察及MLI检测结果显示,与正常组比较,模型组小鼠肺部出现明显的炎症浸润、肺泡腔扩大和融合的现象,MLI升高($P<0.05$);与模型组比较,EOFAZ肺部定量给药后能有效地缓解PPE引起的肺泡腔扩张、肺部炎症细胞浸润及肺组织细胞凋亡等病理变化,MLI也出现下降($P<0.05$)。ELISA结果显示,模型组小鼠的炎症水平显著升高($P<0.01$),肺部定量给予EOFAZ后血浆中TNF- α ,IL-1 β 和IL-6的含量均下降($P<0.01$)。氧化应激结果显示,模型组小鼠的氧化应激水平显著升高($P<0.01$),肺部定量给予EOFAZ后提高了肺组织中SOD,CAT的活力($P<0.01$)和降低MDA的含量($P<0.01$)。Western blot结果显示,与正常组比较,模型组凋亡蛋白明显升高($P<0.01$),抗氧化应激蛋白Nrf2,NQO1表达明显下降($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,肺部定量给予EOFAZ后凋亡蛋白Bax/Bcl-2的蛋白相对表达量下降($P<0.01$),抗氧化应激蛋白Nrf2,NQO1的表达增加($P<0.05$)。结论:EOFAZ通过肺部定量给药能够有效降低炎症和氧化应激水平,减少肺组织细胞凋亡,缓解肺气肿的发生和发展,其抗氧化机制与提高Nrf2及其下游NQO1蛋白表达密切相关。

[关键词] 艳山姜挥发油;肺部定量给药;肺气肿;氧化应激;凋亡

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R284;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)03-0091-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212408

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20211027.0936.002.html>

[网络出版日期] 2021-10-27 16:51

Quantitative Pulmonary Administration of Essential Oil from *Alpiniae Zerumbet Fructus* for Treatment of Emphysema

CAI Zi-min, PENG Jian-qing, CHEN Yi, PAN Di, ZHANG Yan-yan, TAO Ling,
SHEN Xiang-chun, LONG Qing-de*

(Guizhou Province Specialized Natural Medicine Resource Efficient Utilization Engineering Center, Key Laboratory of Pharmacology and Pharmacological Evaluation of Natural Medicines in Guizhou Higher Education Institutions, Guizhou Medical University-Guiyang Joint Key Laboratory, Key Laboratory of Utilization of Natural Medicine Resources, College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

[收稿日期] 20210807(012)

[基金项目] 贵阳市科技计划项目(筑科合同[2020]16-9号);贵州省科技厅社发公关支撑项目(黔科合支撑[2017]2840);国家自然科学基金项目(82060775);贵州省科技支撑计划项目(黔科合支撑[2020]4Y093)

[第一作者] 蔡梓民,在读硕士,从事中药民族药体内递送研究,E-mail:caizimin97@126.com

[通信作者] *龙庆德,副教授,硕士生导师,从事中药资源开发利用的研究,E-mail:562194365@qq.com

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of quantitative pulmonary administration of the essential oil from *Alpiniae Zerumbet Fructus* (EOAZF) on porcine pancreatic elastase (PPE)-induced emphysema in mice and explore its action mechanism. **Method:** C57BL/6J mice were randomly divided into five groups, namely the control group, model group, low- ($2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and high-dose ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) EOFAZ groups, and positive control dexamethasone (DEX, $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) group. The mice were treated with pulmonary administration of PPE using a microsyringe aerosolizer, once every seven days, for four times in total, for inducing emphysema. During this period, EOFAZ were administered with a quantitative microsyringe aerosolizer once every other day, for 14 times. The lung tissues were then sampled and stained with hematoxylin-eosin (HE) for observing the morphological changes and calculating the pulmonary mean linear intercept (MLI). The concentrations of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin- 1β (IL- 1β), and interleukin-6 (IL-6) in the plasma were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and the content of malondialdehyde (MDA) in the lung tissues were measured using the biochemical assay kits. The protein expression levels of nuclear factor E₂-related factor 2 (Nrf2), quinone oxidoreductase 1 (NQO1), B cell lymphoma-2 (Bcl-2)-associated X protein (Bax), and Bcl-2 in lung tissues were detected by Western blot. **Result:** The results of lung morphological observation and MLI detection showed that compared with the control group, the model group showed obvious inflammatory infiltration, alveolar enlargement and fusion, and increased MLI ($P<0.05$). Compared with the model group, EOFAZ effectively alleviated the pathological changes such as alveolar dilatation, pulmonary inflammatory cell infiltration, and lung cell apoptosis caused by PPE, and decreased the MLI ($P<0.05$). As revealed by ELISA, the inflammatory level of mice in the model group increased significantly ($P<0.01$), while the TNF- α , IL- 1β , and IL-6 levels in the plasma were decreased after quantitative administration of EOFAZ ($P<0.01$). Compared with the control group, the model group exhibited significantly enhanced oxidative stress ($P<0.01$). After treatment with EOFAZ by quantitative administration, the activities of SOD and CAT in the lung tissue were increased ($P<0.01$) and the content of MDA was decreased ($P<0.01$). Western blot results demonstrated that the apoptosis-related protein expression in the model group was increased significantly as compared with that in the control group ($P<0.01$), whereas the expression levels of antioxidant stress proteins Nrf2 and NQO1 declined ($P<0.05$). The relative protein expression of apoptosis-related proteins Bax/Bcl-2 in the EOFAZ groups was lower than that in the model group ($P<0.01$), while the expression of antioxidant stress proteins Nrf2 and NQO1 was higher ($P<0.05$). **Conclusion:** Quantitative pulmonary administration of EOFAZ effectively alleviates the inflammation and oxidative stress, reduces lung cell apoptosis, and hinders the occurrence and development of emphysema. Its antioxidant mechanism is closely related to the up-regulation of Nrf2 and its downstream NQO1.

[Keywords] essential oil from *Alpiniae Zerumbet Fructus* (EOFAZ); quantitative pulmonary administration; emphysema; oxidative stress; apoptosis

慢性阻塞性肺病(COPD)是以持续性的气流受限,且呈进行性发展又完全不可逆为特征的一种慢性疾病,截止2018年,中国的慢性阻塞性肺病的患者超过1亿人,成为仅次于高血压、糖尿病的中国第三大常见慢性病^[1]。其中,肺气肿为COPD的主要病理改变之一,即指肺部终末细支气管远端出现持久的异常的扩张,同时还伴有肺泡壁的损坏,从而导致肺组织的弹性下降、容积扩大的一种病理状态^[2]。炎症和肺泡细胞凋亡是肺气肿患者表现出来的主要病理特征^[3-4]。不过,越来越多的研究表明肺

部发生氧化应激是导致肺气肿产生和发展的重要因素^[5-7]。因此,抑制氧化应激是缓解和防止肺气肿发生发展的关键步骤和重要手段。

艳山姜为姜科山姜属植物艳山姜的干燥成熟果实,艳山姜挥发油(EOFAZ)是艳山姜的有效活性部位,具有广泛的抗炎、抗氧化以及抑制内皮功能障碍等多方面的生物活性^[8]。本课题组前期研究揭示了EOFAZ具有抑制氧化应激和凋亡的药理作用^[9-11]。针对COPD这类呼吸系统疾病,肺部给药具有显著的优势^[12-13],已被广泛用于临床治疗。

由于EOFAZ具有挥发性、难溶性和不稳定等因素,如果采用口服或注射的方式会造成其在体内快速降解,生物利用度低,疗效差^[14]。因此,本研究采用肺部定量给药的方式,用量准确,将定量的EOFAZ直接送达肺部,避免了与剂量相关的不良反应;同时具有快速起效,避免首过效应,顺应性好等特点。因此,本研究首次提出将EOFAZ经肺部定量给药对肺气肿小鼠模型进行治疗,并探究其对PPE诱导的肺气肿的治疗效果及其作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性C57BL/6J小鼠30只,体重24~26 g,由贵州医科大学实验动物中心提供,动物合格证号SCXK(黔)2012-0001。于贵州医科大学实验动物中心适应性喂养1周后开展实验。本实验由贵州医科大学动物实验伦理委员会批准(批号1702135)。

1.2 药物与试剂 艳山姜采自贵州省贞丰县,经贵州医科大学药学院生药学与药用植物学教研室龙庆德副教授鉴定为姜科植物艳山姜 *Alpinia zerumbet* 的干燥成熟果实,采用水蒸气蒸馏法提取EOFAZ,收得率为1.0%;地塞米松(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号C11300889);猪胰弹性蛋白(PPE,上海麦克林生化科技有限公司,批号C10774130);苏木素-伊红(HE)染液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号G1005);脂质氧化(MDA)检测试剂盒及总超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号分别为S0131S,S0101);过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20200822);肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β)和白细胞介素-6(IL-6)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海泛音生物科技有限公司,批号分别为CK-E20852,CK-E20174,CK-E20188);核因子E₂相关因子2(Nrf2)抗体, β -肌动蛋白(β -actin)抗体,B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)抗体,Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体(美国Proteintech公司,批号分别为66504-1-1g,66009-1-1g,50599-2-1g,12789-1-AP);醌氧化还原酶(NQO1)抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号3187S);羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗(美国Bioworld公司,批号分别为BS13278,BS12478)。

1.3 仪器 YAN30012型肺部液体定量雾化器(上海玉研科学仪器有限公司);Y25G型实验室高剪切分散均质乳化机(上海约迪机械设备有限公司);

Beidi-650E型超声波细胞破碎仪(贝帝实验仪器有限公司);Leica实验室倒置显微镜,CFX型凝胶成像系统仪,170-3930型垂直电泳系统,170-3810型免疫印迹转膜系统(美国Bio-Rad公司);ELx800型酶标仪(美国GE公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药方案 将SPF级小鼠随机分为5组,正常组,模型组,EOFAZ低、高剂量组(2, 20 mg·kg⁻¹)及地塞米松组1 mg·kg⁻¹。参照ZHAO等^[15]采用吸入PPE进行造模,给药剂量参考文献^[16]小鼠肺部给药剂量。模型组,EOFAZ低、高剂量组,地塞米松组经腹腔注射乌拉坦(2 g·L⁻¹)麻醉后,使用肺部给药定量雾化器将PPE(100 U·mL⁻¹) 100 μ L在第1,7,14,21,28天注射进气管中。EOFAZ低、高剂量组隔天使用肺部给药定量雾化器分别给予不同浓度的EOFAZ 50 μ L,地塞米松组隔天腹腔注射地塞米松,正常组在第1,7,14,21,28天使用肺部给药定量雾化器将无菌生理盐水(0.9%, w/v) 50 μ L注射进气管中。在第28天给予造模药24 h后处死,收集血浆及肺组织样品进行分析。

2.2 HE染色检测肺组织病理学变化 将左肺组织固定在10%甲醛中24 h以上,然后用75%的乙醇脱水并包埋在石蜡中,切成4 μ m厚的切片,用HE染色,在光学显微镜(Nikon Eclipse Ci-L)下观察肺组织情况,通过测定平均内衬间距(MLI)来评估肺气肿状况^[17]。

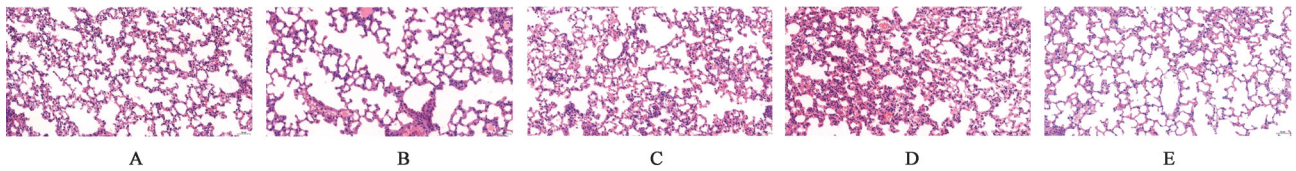
2.3 血浆中炎症因子的检测 小鼠经腹主动脉取血0.8 mL,4 $^{\circ}$ C条件5 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径18 cm),分离血浆。按照相应ELISA试剂盒说明书步骤测定TNF- α ,IL-1 β 和IL-6的含量。

2.4 肺组织中氧化应激相关指标的检测 将小鼠右肺组织在9倍冰冷生理盐水中匀浆以制备10% (w/v)的肺组织匀浆,将匀浆液在4 $^{\circ}$ C条件下离心(12 000 \times g,10 min),收集上清液用于测定CAT活性和MDA含量。将小鼠肺组织在10倍SOD制备液中匀浆以制备肺组织匀浆,将匀浆液在4 $^{\circ}$ C,12 000 \times g离心10 min,收集上清液用于测定SOD活性,具体步骤遵循市售试剂盒方法。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠肺组织氧化应激和凋亡相关蛋白的表达 取适量小鼠右肺组织将其剪碎,加入细胞裂解液,其中RPMI裂解液与蛋白酶抑制剂PMSF的体积比为100:1,于冰上裂解30 min后,4 $^{\circ}$ C,1万 r·min⁻¹离心10 min(离心半径9 cm),提取总蛋白。采用二喹啉甲酸

(BCA)进行定量,规定上样质量 50 μg 后进行分装。经 10% 及 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳后,移到 0.22 μm PVDF 膜上,采用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。分别加入 Nrf2 抗体 (1:1 000), NQO1 抗体 (1:1 000), Bax 抗体 (1:2 000), Bcl-2 抗体 (1:2 000), β -actin 抗体 (1:1 万),置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜后,次日回收一抗, TBST 洗膜 3 次,加入二抗室温孵育 1.5 h 后回收二抗,洗膜 3 次。采用化学发光液在暗室显影。使用 Image-Lab TM 软件对条带进行分析,并通过 GraphPad Prism 8 软件进行统计。

2.6 统计学方法 采用 GraphPad Prism 8 软件对实验结果进行统计学处理,所有实验结果数据均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间分析比较采用单因素方差分析所有数据, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。



A. 正常组; B. 模型组; C. EOFAZ 低剂量组; D. EOFAZ 高剂量组; E. 地塞米松组(图 2 同)

图 1 EOFAZ 肺部定量给药对肺气肿小鼠肺组织病理变化的影响(HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of pulmonary quantitative administration of EOFAZ on lung histopathology in emphysema mice (HE, $\times 200$)

表 1 EOFAZ 肺部定量给药对肺气肿小鼠肺组织 MLI 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of pulmonary quantitative administration of EOFAZ on MLI in emphysema mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	MLI/ $\mu\text{m}/\text{个}$
正常		48.42 \pm 3.43
模型		66.92 \pm 6.11 ¹⁾
EOFAZ	2	50.38 \pm 5.98 ³⁾
	20	50.51 \pm 7.01 ³⁾
地塞米松	1	52.05 \pm 5.63 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表 2~4 同)

3.2 对肺气肿小鼠血浆中炎症因子的影响 与正常组比较,PPE 诱导后模型组小鼠血浆中炎症因子 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 含量显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,地塞米松组小鼠血浆中 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 含量显著下降($P<0.01$)。EOFAZ 经肺部定量给药进行治疗后, TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 含量均有所下降,其中 EOFAZ 高剂量组小鼠血浆中 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 含量出现显著下降($P<0.01$),且小鼠血浆中炎症因子浓度下降的程度与 EOFAZ 的剂量呈正

3 结果

3.1 对肺气肿小鼠肺组织病理变化的影响 与正常组比较,模型组小鼠经 PPE 诱导后肺组织可见炎症细胞浸润,部分肺泡腔扩大,肺泡壁变薄,部分肺泡间隔破裂及肺泡腔融合,肺泡被破坏,肺气肿形成。与模型组比较,经腹腔注射地塞米松干预后可见肺组织炎症细胞浸润有所好转,肺泡腔面积有所减小。EOFAZ 经肺部定量给药后,肺泡腔扩张和炎症细胞浸润的情况得到明显改善,肺泡壁结构与地塞米松组比较更加完整,肺泡间隔破裂和肺泡腔融合现象有很大改善。见图 1。MLI 是量化肺组织结构变化的一个指标,在临床中用来判断肺气肿的产生^[18]。与正常组比较,模型组小鼠肺组织的 MLI 明显升高($P<0.05$);与模型组比较,地塞米松组小鼠肺组织的 MLI 明显下降($P<0.05$), EOFAZ 低、高剂量组小鼠肺组织的 MLI 明显下降($P<0.05$)。见表 1。

相关, EOFAZ 高剂量组 TNF- α 和 IL-6 含量明显低于 EOFAZ 低剂量组。见表 2。

表 2 EOFAZ 肺部定量给药对肺气肿小鼠血浆中 TNF- α , IL-1 β , IL-6 的测定 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of pulmonary quantitative administration of EOFAZ on levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 in plasma of emphysema mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	TNF- α	IL-1 β	IL-6
正常		62.29 \pm 2.10	9.43 \pm 0.67	11.44 \pm 0.75
模型		82.79 \pm 3.36 ²⁾	13.19 \pm 0.75 ²⁾	15.23 \pm 1.47 ²⁾
EOFAZ	2	64.91 \pm 3.99 ⁴⁾	10.58 \pm 1.11 ⁴⁾	12.83 \pm 1.03 ⁴⁾
	20	58.14 \pm 2.17 ⁴⁾	9.49 \pm 0.45 ⁴⁾	11.20 \pm 0.90 ⁴⁾
地塞米松	1	67.02 \pm 8.79 ⁴⁾	7.67 \pm 0.81 ⁴⁾	10.08 \pm 0.99 ⁴⁾

3.3 对肺气肿小鼠肺组织中氧化应激程度的影响

与正常组比较,PPE 诱导后模型组小鼠肺组织中氧化应激标志物 CAT, MDA 的活性显著下降($P<0.01$), SOD 的含量显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,地塞米松组小鼠肺组织中 CAT, SOD 的活性显著提高($P<0.01$), MDA 含量显著下降($P<0.01$)。与

模型组比较,EOFAZ低剂量组小鼠肺组织中CAT,SOD的活性出现显著升高($P<0.01$),MDA的含量显著降低($P<0.01$);而EOFAZ高剂量组小鼠肺组织中仅CAT,SOD的活性显著升高($P<0.01$),MDA含量有所下降但差异无统计学意义。见表3。

表3 EOfAZ肺部定量给药对肺气肿小鼠肺组织中氧化应激标志物CAT,MDA,SOD水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of pulmonary quantitative administration of EOfAZ on oxidative stress markers in lung tissue of emphysema mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	CAT/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	MDA/ $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$	SOD/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$
正常		2.80±1.05	1.98±0.39	22.89±1.57
模型		0.89±0.28 ²⁾	2.88±0.10 ²⁾	7.43±0.74 ²⁾
EOFAZ	2	5.39±0.55 ⁴⁾	2.27±0.48 ⁴⁾	24.35±0.98 ⁴⁾
	20	3.43±0.21 ⁴⁾	2.51±0.09	20.28±5.48 ⁴⁾
地塞米松	1	5.57±0.62 ⁴⁾	2.35±0.19 ⁴⁾	23.03±0.15 ⁴⁾

3.4 对肺气肿小鼠肺组织中凋亡相关蛋白的影响

与正常组比较,模型组中Bax/Bcl-2的蛋白相对表达量显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,地塞米松组Bax/Bcl-2的蛋白相对表达量显著下降($P<0.01$)。而EOFAZ低、高剂量经肺部定量给药进行治疗后,Bax/Bcl-2的蛋白相对表达量显著下降($P<0.01$)且呈剂量依赖性,其下降程度基本与地塞米松组持

平。见图2,表4。

3.5 对肺气肿小鼠肺组织中氧化应激相关蛋白的影响 与正常组比较,模型组中Nrf2和NQO1蛋白表达情况显著减少($P<0.01$)。与模型组比较,经腹腔注射地塞米松治疗后,Nrf2的蛋白表达水平有所降低,NQO1蛋白表达升高有所增加,但差异无统计学意义。而EOFAZ低、高剂量经肺部定量给药进行治疗后,Nrf2和NQO1的蛋白表达水平有所增加,其中高剂量EOFAZ组Nrf2和NQO1的蛋白表达水平明显增加($P<0.05$),且Nrf2和NQO1的蛋白表达情况与EOFAZ的剂量呈正相关性。见图2,表4。

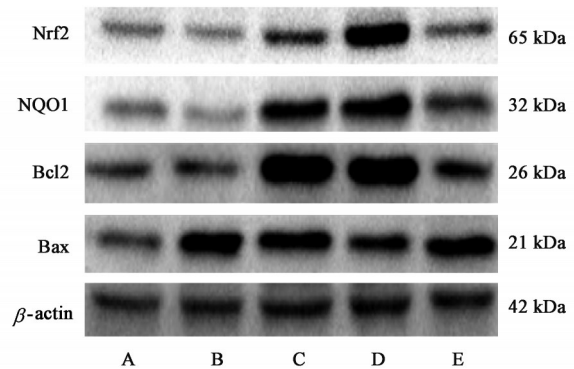


图2 各组肺气肿小鼠肺组织中Nrf2,NQO1,Bcl-2和Bax蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Nrf2, NQO1, Bcl-2 and Bax protein expression in lung tissue of emphysema mice

表4 EOfAZ肺部定量给药对肺气肿小鼠肺部Nrf2,NQO1,Bcl-2和Bax蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of pulmonary quantitative administration of EOfAZ on expression of Nrf2, NQO1, Bcl-2 and Bax in lung tissue of emphysema mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Nrf2/ β -actin	NQO1/ β -actin	Bax/Bcl-2
模型		62.64±13.70 ²⁾	71.69±17.54 ¹⁾	206.24±30.97 ²⁾
EOFAZ	2	90.34±16.15	123.34±21.33	102.64±25.26 ⁴⁾
	20	186.27±46.58 ³⁾	153.53±46.19 ³⁾	80.31±4.27 ⁴⁾
地塞米松	1	48.50±6.89	94.15±6.40	84.31±36.93 ⁴⁾

注:设正常组各指标蛋白相对表达量为1。

4 讨论

COPD作为一种常见的慢性呼吸道疾病,具有多发病、致残率高、疾病负担大等特点。肺气肿是COPD的重要病理过程之一。如果不及时对肺气肿进行干预治疗,最终会产生并导致COPD的恶化,因而缓解肺气肿对防止COPD发生发展具有重要意义^[19]。

本研究使用肺部给予PPE建立肺气肿模型,通过小鼠肺部组织HE切片发现肺泡间隔破裂,肺泡壁变薄,炎症细胞浸润,并计算MLI发现模型组

MLI增加,同时体内TNF- α ,IL-1 β 和IL-6的含量增加,SOD和CAT活性下降,MDA含量增加,Bax/Bcl-2蛋白相对表达升高。表明小鼠肺组织结构被破坏,炎症及氧化应激水平增加,肺组织发生凋亡情况,与之前文献中报道情况相符^[20-22],故肺气肿模型建立成功。EOFAZ具有抗炎、抗氧化的药理作用,具有治疗肺气肿的潜力。因此,本研究首次提出将EOFAZ肺部定量吸入至肺组织用于治疗肺气肿,以弥补EOFAZ全身给药生物利用率低,疗效差等问题,并具有快速起效、顺应性好、用量准确等特点。

结果显示,经过PPE诱导小鼠产生肺气肿后使用肺部定量给药雾化器给予EOFAZ治疗后,小鼠肺组织损伤减轻,肺泡形态较好,肺泡腔面积扩大情况有所改善,MLI下降。说明EOFAZ肺部定量给药可以有效改善肺气肿小鼠的肺损伤,保护肺泡结构及肺功能。炎症是肺气肿的主要病理特征^[4]。肺气肿患者的全身炎症状态比正常人高很多,这反映在细胞因子和一氧化氮等生物标志物上,随着病情加重,炎症状态会进一步加重^[23]。本研究结果表明,经过EOFAZ肺部定量给药治疗后,肺气肿小鼠的炎症水平有明显下降,TNF- α , IL-1 β 和IL-6的含量都有所下降,且与剂量呈正相关,提示EOFAZ肺部定量给药可以有效缓解肺气肿时体内炎症水平的增加。肺气肿另一个病理特征是肺部发生凋亡。Bax和Bcl-2是调控细胞凋亡的标志性基因之一^[24-25],肺气肿患者肺部标本中Bcl-2表达无明显变化,而Bax表达升高,说明肺部发生凋亡^[26]。糖胶树叶中的吡咯生物碱可以通过提高Bcl-2的表达防止肺部发生凋亡来组织小鼠肺气肿的发生^[15]。本实验结果显示,模型组小鼠肺组织中,说明肺气肿小鼠肺部,而经过EOFAZ肺部定量给药治疗后,肺气肿小鼠肺组织中Bax/Bcl-2的蛋白相对表达也有下降,这表明EOFAZ可以通过调控Bax/Bcl-2蛋白表达情况缓解肺部发生凋亡。氧化应激作为肺气肿的重要发病机制之一。通过检测肺组织中的氧化应激标志物水平可以反映肺部氧化应激的程度,同时也一定程度上反映疾病的活动度^[27-28]。本研究结果表明,经过EOFAZ肺部定量给药治疗后,肺气肿小鼠的肺组织中氧化应激标志物有所改善,SOD和CAT活性增加,MDA含量下降,但其改善程度与EOFAZ的剂量无相关性,提示EOFAZ肺部定量给药可以有效缓解肺气肿时肺部发生的氧化应激,但EOFAZ只能恢复肺气肿小鼠氧化-抗氧化平衡,而非不断增加抗氧化能力。

Nrf2作为一种重要的抗氧化转录因子,被证明参与多种抗氧化酶表达的调控。研究表明,肺气肿患者肺部Nrf2的蛋白水平和转录活性下降^[29]。Nrf2缺失小鼠对香烟诱导的肺气肿的敏感性增加^[30]。虾青素可以通过增强Nrf2表达保护小鼠免受香烟诱导产生肺气肿^[21]。本实验结果显示,模型组小鼠肺组织中Nrf2及其下游NQO1蛋白表达下降,说明肺气肿小鼠肺部发生了氧化应激,经过EOFAZ肺部定量给药治疗后,肺气肿小鼠肺组织中Nrf2,NQO1蛋白表达提高,说明EOFAZ可以通过

Nrf2/NQO1通路提高肺部抗氧化应激能力,缓解肺部发生的氧化应激。因此,EOFAZ可通过调控Nrf2/NQO1通路,降低肺部氧化应激,减轻全身性炎症水平和肺部发生凋亡,发挥治疗肺气肿的作用。

综上所述,本研究初步探究了通过肺部定量给与EOFAZ用于缓解肺气肿的治疗效果。结果表明,经肺部定量给药后,EOFAZ可显著减轻因PPE引发的小鼠肺气肿病理改变,该治疗作用可能与EOFAZ的抗炎、抗氧化和抗凋亡机制有关。机制研究表明,EOFAZ可能主要通过调控Nrf2/NQO1通路发挥缓解肺气肿的功能。本研究为EOFAZ临床应用及制剂开发提供了一定的实验依据。在下一步的研究中,计划通过开发EOFAZ纳米递送系统提高其体内稳定性和肺部靶向递送效率,从而进一步发挥其对肺气肿的治疗效果。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] WANG C, XU J, YANG L, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health [CPH] study): a national cross-sectional study [J]. *Lancet*, 2018, 391(10131):1706-1717.
- [2] KENNEDY-FEITOSA E, PINTO R F, PIRES K M, et al. The influence of 5-lipoxygenase on cigarette smoke-induced emphysema in mice [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(1):199-208.
- [3] HENSON P M, VANDIVIER R W, DOUGLAS I S. Cell death, remodeling, and repair in chronic obstructive pulmonary disease? [J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2006, 3(8):713-717.
- [4] BABUSYTE A, STRAVINSKAITE K, JEROCH J, et al. Patterns of airway inflammation and MMP-12 expression in smokers and ex-smokers with COPD [J]. *Respir Res*, 2007, 8:81.
- [5] DEMEDTS I K, DEMOOR T, BRACKE K R, et al. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema [J]. *Respir Res*, 2006, 7:53.
- [6] KIRKHAM P, RAHMAN I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy [J]. *Pharmacol Ther*, 2006, 111(2):476-494.
- [7] KOIKE K, ISHIGAMI A, SATO Y, et al. Vitamin C prevents cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in mice and provides pulmonary restoration [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014, 50(2):347-357.

- [8] XIAO T, HUANG J, WANG X, et al. *Alpinia zerumbet* and its potential use as an herbal medication for atherosclerosis: mechanistic insights from cell and rodent studies [J]. *Lifestyle Genom*, 2020, 13 (5) : 138-145.
- [9] 赵爽, 何丽, 黄梅, 等. 艳山姜挥发油通过 Nrf2/Notch1 信号通路抑制高糖诱导的内皮间质转分化 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(23):99-105.
- [10] 张彦燕, 赵爽, 付凌云, 等. 艳山姜挥发油对 TGF- β_1 诱导内皮细胞氧化应激损伤的保护作用研究 [J]. *西南民族大学学报: 自然科学版*, 2018, 44(6):556-560.
- [11] CHEN Y, LI D, XU Y, et al. Essential oils from fructus a zerumbet protect human aortic endothelial cells from apoptosis induced by ox-LDL *in vitro* [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, doi: 10.1155/2014/956824.
- [12] HE Y, LIANG Y, HAN R, et al. Rational particle design to overcome pulmonary barriers for obstructive lung diseases therapy [J]. *J Control Release*, 2019, 314:48-61.
- [13] DOUAFFER H, ANDRIEU V, BRUNEL J M. Scope and limitations on aerosol drug delivery for the treatment of infectious respiratory diseases [J]. *J Control Release*, 2020, 325:276-292.
- [14] 邢丽媛, 李慧婷, 万娜, 等. 中药精油在临床应用中的风险控制问题分析 [J]. *中草药*, 2021, 52(8) : 2458-2464.
- [15] ZHAO Y L, YANG Z F, WU B F, et al. Indole alkaloids from leaves of *Alstonia scholaris* (L.) R. Br. protect against emphysema in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 259:112949.
- [16] KENNEDY-FEITOSA E, CATTANI-CAVALIERI I, BARROSO M V, et al. Eucalyptol promotes lung repair in mice following cigarette smoke-induced emphysema [J]. *Phytomedicine*, 2019, 55:70-79.
- [17] UENO M, MAENO T, NISHIMURA S, et al. Alendronate inhalation ameliorates elastase-induced pulmonary emphysema in mice by induction of apoptosis of alveolar macrophages [J]. *Nat Commun*, 2015, 6:6332.
- [18] CROWLEY G, KWON S, CARAHER E J, et al. Quantitative lung morphology: semi-automated measurement of mean linear intercept [J]. *BMC Pulm Med*, 2019, 19(1):206.
- [19] BRANDSMA C A, VAN DEN BERGE M, HACKETT T L, et al. Recent advances in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis: from disease mechanisms to precision medicine [J]. *J Pathol*, 2020, 250(5):624-635.
- [20] POSSO S V, QUESNOT N, MORAES J A, et al. AT-RVD1 repairs mouse lung after cigarette smoke-induced emphysema via downregulation of oxidative stress by NRF2/KEAP1 pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 56:330-338.
- [21] KUBO H, ASAI K, KOJIMA K, et al. Astaxanthin suppresses cigarette smoke-induced emphysema through Nrf2 activation in mice [J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(12):673.
- [22] MORICHIKA D, MIYAHARA N, FUJII U, et al. A retinoid X receptor partial agonist attenuates pulmonary emphysema and airway inflammation [J]. *Respir Res*, 2019, 20(1):2.
- [23] FISCHER B M, PAVLISKO E, VOYNOW J A. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2011, 6:413-421.
- [24] 王彤, 刘存志, 刘玉珍, 等. bcl-2/bax 基因调控机体细胞凋亡的机制研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2008, 28(16):1658-1660.
- [25] 文建庭, 刘健, 王馨, 等. 新风胶囊含药血清对 TNF- α 诱导的类风湿关节炎滑膜成纤维细胞凋亡和炎症的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(2):436-443.
- [26] IMAI K, MERCER B A, SCHULMAN L L, et al. Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema [J]. *Eur Respir J*, 2005, 25(2):250-258.
- [27] 郭美华, 王健, 钟南山, 等. 慢性阻塞性肺疾病氧化应激生物标志物研究进展 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2015, 38(12):931-933.
- [28] 吴思骐, 刘建博. 慢性阻塞性肺疾病差异基因与中药预测的生物信息学分析 [J]. *世界中医药*, 2021, 16(14):2189-2195.
- [29] 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.
- [30] RANGASAMY T, CHO C Y, THIMMULAPPA R K, et al. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(9):1248-1259.

[责任编辑 周冰冰]