

文章编号:1001-6880(2016)12-1891-06

药用植物紫苏基因导入烟草干预 大鼠吸烟相关性肺损伤的研究

李媛媛¹,魏克强^{1*},武娟¹,魏治中²¹山西大学生命科学学院,太原 030006;²山西农业大学农学院,太谷 030801

摘要:54只清洁级雄性SD大鼠随机分为健康对照组(CK)、普通烟草组(GT)和新型烟草组(NT),采用烟雾熏吸法构建COPD模型。分别于染毒14、28 d和56 d后,对右肺组织H.E.、Masson和PAS染色发现,实验大鼠逐步呈现出典型的气道炎症和肺气肿,各组的病理学评分依次为 1.97 ± 0.30 、 23.93 ± 0.73 和 17.43 ± 0.60 。ELISA和IHC分析显示,与CK组相比,GT和NT组BALF中IL-8、TNF- α 、MMP-9、TIMP-1、MMP-9/TIMP-1以及肺组织中NF- κ Bp65的水平变化显著($P < 0.05$);与GT组相比,NT组的上述指标显著降低($P < 0.05$)。结果表明,导入紫苏基因的新型烟草明显减缓了肺损伤、抑制了异常炎症反应,能够干预大鼠吸烟相关性COPD的进程,这可能与其有益成分调控NF- κ B通路有关。

关键词:新型烟草;紫苏;大鼠;慢性阻塞性肺疾病

中图分类号:R563.3;Q949.95

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.12.007

Intervention to Smoking-Related Lung Injury of SD Rat by Introducing Medical Plants *Perilla frutescens* (L.) Britt Genes into Tobacco

LI Yuan-yuan¹, WEI Ke-qiang^{1*}, WU Juan¹, WEI Zhi-zhong²¹School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; ²College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China

Abstract: The fifty-four SD rats were randomly divided into three groups: control (CK), general tobacco (GT) and new-type tobacco (NT). The COPD model was duplicated by exposing GT and NT rats to cigarette smoke until 56 days. Pathological changes in lung tissue were analyzed using H. E., Masson and PAS staining at 14 d, 28 d and 56 d, respectively. The obvious COPD features, such as inflammatory cells infiltration, airway remodeling and destroyed alveoli, were observed in the smoking rats. Lung injury scores were as follows: 1.97 ± 0.30 (CK group), 23.93 ± 0.73 (GT group) and 17.43 ± 0.60 (NT group). Simultaneously, the levels of IL-8, TNF- α , MMP-9 and TIMP-1 in BALF and NF- κ Bp65 in lung tissue were detected by ELISA and immunohistochemical method. Compared to CK group, there was a significant increase in their levels in GT and NT groups, but the ratio of MMP-9/TIMP-1 was obviously decreased ($P < 0.05$). With the extension of exposure time, there were obvious differences in the pathologic changes and abnormal inflammatory response between NT and GT group ($P < 0.05$). The results indicated that the new-type tobacco exposure can slow the progression of COPD, which was probably related to the regulation of NF- κ B pathway by some beneficial components.

Key words: new-type tobacco; *Perilla frutescens* (L.) Britt; rat; COPD

目前,慢性阻塞性肺疾病(COPD)以超过两亿人的患病率高居全球死亡原因的第四位,也是导致慢性残疾和永久性肺损伤的重要疾患,已造成了严重的经济和社会负担。COPD以不完全可逆的气流受限为特征,与气道和肺组织对有害气体或颗粒的

异常炎症反应密切相关,而吸烟被认为是诱发COPD最主要危险因素^[1]。烟草通过燃烧、裂解、蒸馏、冷凝等一系列复杂的物理化学过程,形成的烟雾气溶胶含有4800余种化学成分,这些物质经呼吸道沉积在肺泡中,强烈地刺激组织细胞释放活性氧自由基、各种细胞因子、炎症介质和蛋白水解酶,导致氧化/抗氧化失衡、慢性炎症反应、蛋白酶/抗蛋白酶失衡以及病理生理改变。

紫苏[*Perilla frutescens* (L.) Britt]为唇形科紫

苏属一年生草本植物,其茎、叶和籽均可入药,具有平喘、止咳、化痰、清肺等功效,是中医治疗肺部疾患的重要药物^[2]。大量研究表明,紫苏富含抗炎、抗氧化的化学成分,如榄香素、肉豆蔻酸和迷迭香酸可有效抑制 COPD 小鼠的肺部炎症^[3];黄酮类物质具有显著清除自由基和抗氧化的能力^[4]。

近年来,我们采用创新育种的方法,将普通烟草(母本)与紫苏(父本)进行远缘杂交,培育出了烟草的新类型-紫苏烟^[5]。代谢组学分析初步表明:通过紫苏与烟草基因组间的渐渗、交流和重组,紫苏烟中转入了 α -丁香烯、 β -丁香烯、芳樟醇和薄荷醇等紫苏的有益成分;大幅度提高了普通烟草中黄酮类物质(芦丁)的含量;还产生了 α -桉醇、香叶烯、桉油精、 γ -榄香烯等新的医药成分;但未检出对肺部有毒性作用的紫苏固有成分-紫苏酮^[6,7]。利用国际烟草科学研究合作中心(CORESTA)推荐的三种体外方法,即 Ames 试验、微核试验和中性红细胞毒性试验,发现这些化学成分的改变显著降低了烟气的体外毒性(待发表),但对吸烟相关性的肺损伤有何影响目前还不清楚。基于此,我们采用单纯烟熏法构建 SD 大鼠的 COPD 模型,通过组织病理、炎症反应和蛋白酶/抗蛋白酶失衡分析,探讨了导入药用植物紫苏基因的新型烟草可能的生物学效应,旨在为我国药用植物基因资源的利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

健康清洁级雄性 SD 大鼠 54 只,5 周龄,体重(185.25 ± 24.26)g,购自军事医学科学院实验动物中心。分笼饲养,恒温恒湿($20 \sim 25$ °C, 50% ~ 60%),自由饮水与进食。

1.1.2 烟草品种

普通烟草品种“78~04”和新型烟草“紫苏烟”^[5,6],由山西农业大学药烟育种研究室提供,分别卷制成单料烟。

1.1.3 主要试剂和仪器

白介素 8(IL-8)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)、基质金属蛋白酶抑制剂 1(TIMP-1)以及核转录因子 κ B p65(NF- κ B p65)的 ELISA 检测试剂盒,购自南京建成生物工程公司。兔抗大鼠 NF- κ B p65 多克隆抗体、生物素标记的山羊抗兔抗体、链霉亲和素-过氧化物酶复合物,购自

北京中山金桥生物技术有限公司。

Spectra Max M5 型多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);Olympus BX51 型显微镜(日本 Olympus 公司);Leica RM2255 型石蜡切片机(德国 Leica 公司);KDC-140HR 型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);S10 型高速匀浆机(宁波新芝生物科技有限公司);HHS-214 型电热恒温水浴锅(上海博讯实业有限公司)等。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组及模型构建

将 54 只 SD 大鼠随机分为 3 组:健康对照组(CK)、普通烟草组(GT)和新型烟草组(NT),每组 18 只。参考文献的方法^[8,9](略作改动),自制有机玻璃染毒箱($60\text{ cm} \times 80\text{ cm} \times 100\text{ cm}$),构建 COPD 模型:大鼠置于染毒箱内,点烟室同时点燃 10 支烟,通过气泵和导管装置将烟雾导入染毒箱,分别以“78-04”和“紫苏烟”进行暴露染毒 56 d,2 次/天,每次间隔 4 h,10 支烟/1 小时/6 只大鼠/次,6 天/周。对照组大鼠仅吸入新鲜空气。

1.2.2 样品采集与处理

分别于 14、28 d 和 56 d 后,各组随机取 6 只大鼠,腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(3 mL/kg)麻醉,打开胸腔,剥离气管,结扎右支气管,以 3 mL 0.01 mol/L 的 PBS 缓冲液缓慢冲洗左肺,收集的支气管肺泡灌洗液(BALF)以 1000 rpm、4 °C 离心 10 min,取上清液液氮保存。取右肺 2 叶置于 4% 多聚甲醛中固定,常规石蜡包埋、切片,分别进行 H. E.、Masson、PAS 染色和免疫组化测定,光镜下观察;另取 2 叶以生理盐水制备 10% 的肺组织匀浆,3000 rpm、4 °C 离心 15 min,取上清液液氮保存。

1.2.3 肺组织病理学评分

参考文献^[10]的方法,选取直径 $\leq 100\text{ }\mu\text{m}$ 的膜性细支气管及肺实质、肺间质,观察以下 9 项指标:
①小气道阻塞;②上皮脱落糜烂;③鳞状上皮化生;
④杯状细胞化生;⑤炎症细胞浸润;⑥色素沉积;
⑦结缔组织增生;⑧平滑肌增生;⑨肺气肿。对各组肺组织进行评分:无病变者为 0 分;轻度病变者为 1 分;中度病变者为 2 分;重度病变者为 3 分。每只大鼠肺组织切片选取 10 个视野,先得到每个视野评分,计算平均值作为最终评分。

1.2.4 ELISA 检测

按照试剂盒说明书,ELISA 法测定 BALF 中 IL-8、TNF- α 、MMP-9、TIMP-1 以及肺组织匀浆液中 NF-

κB p65 的水平。

1.2.5 免疫组化检测

组织切片常规脱蜡至水, SABC 法检测大鼠肺组织中 NF- κB p65 的表达; Image-pro plus 6.0 图像扫描软件分析, 每个切片在 100 倍光镜下随机选取 5 个视野, 测定平均光密度值。

1.3 统计分析

所有计数资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和 Pearson 相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 肺组织病理学观察及评分

H. E.、Masson 及 PAS 染色显示, 对照组大鼠的肺组织无明显的炎症细胞聚集, 支气管上皮及肺泡

结构完整, 管壁平滑肌未见增厚。随着烟熏时间的延长, GT 和 NT 组大鼠肺组织均逐步呈现出不同严重程度的 COPD 病理特征: 14 d 时, 可见少量炎症细胞浸润、小气道腔内粘液分泌和杯状细胞化生, 但肺泡结构完整, 纤维未见增生; 28 d 时, 呈现较为严重的纤毛脱落和粘液分泌, 炎症细胞浸润和杯状化生加重, 肺泡开始出现融合现象, 纤维增生; 到 56 d 时病变最为典型, 小气道和肺血管大量的炎症细胞浸润, 部分肺泡间隔断裂, 肺泡腔不规则扩大, 肺泡结构紊乱, 支气管管壁上皮增生, 平滑肌层增厚, 粘膜皱壁增多变长, 导致支气管管腔狭窄。但与 GT 组比较, NT 组的肺损伤程度相对轻缓。肺组织病理评分进一步表明(见表 1), 随着烟雾暴露时间的延长, 与 CK 组相比, GT 和 NT 组的病理变化显著 ($P < 0.05$); 与 GT 组相比, NT 组的病程明显减缓 ($P < 0.05$)。

表 1 烟雾染毒大鼠的肺组织病理评分 ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Pathological scores of lung tissues from rats exposed to cigarette smoke ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

暴露时间(天) Exposure time (d)	健康对照组 Control (CK)	普通烟草组 General tobacco (GT)	新型烟草组 New-type tobacco (NT)
14	2.03 ± 0.23	$6.33 \pm 1.17^*$	$5.40 \pm 0.78^*$
28	2.0 ± 0.10	$16.4 \pm 0.56^*$	$13.0 \pm 0.85^* \#$
56	1.97 ± 0.30	$23.93 \pm 0.73^*$	$17.43 \pm 0.60^* \#$

注:与 CK 比较, $^* P < 0.05$; 与 GT 比较, $\# P < 0.05$ 。

Note: Compared with CK, $^* P < 0.05$; Compared with GT, $\# P < 0.05$.

2.2 ELISA 和免疫组化检测

随着烟雾暴露时间的延长, GT 和 NT 组 BALF 的 IL-8、TNF- α 、MMP-9 和 TIMP-1 浓度均明显高于 CK 组, 尤以第 56 d 的变化最为显著 ($P < 0.05$) (图 1)。大鼠染毒 56 d 后, 与 CK 组相比, GT 和 NT 组的 MMP-9、TIMP-1 浓度分别升高了 97.88%、266.84% 和 28.14%、135.35%, 其中 TIMP-1 的上升更为明显, 导致 MMP-9/TIMP-1 比值显著降低 ($P < 0.05$)。与 GT 组相比, NT 组染毒 56 d 的 IL-8、TNF- α 浓度分别下降了 20.02% 和 21.75%, 差异显著 ($P < 0.05$); 虽然 NT 组的 MMP-9、TIMP-1 水平也明显降低 ($P < 0.05$), 但与 GT 组的 MMP-9/TIMP-1 比值近似。NF- κB 是调控多种炎症因子和氧化应激的关键转录因子, 与 CK 组相比, 在肺组织中其可被烟雾暴露而显著激活; 但 NT 组的 NF- κB p65 活性水平较 GT 组降低了 23.82% ($P < 0.05$) (图 1)。免疫组化分析进一步表明, NT 组大鼠肺组织支气管上皮细胞中的 NF- κB p65 表达水平低于 GT 组(图 2)。

这表明, 烟雾暴露均导致了肺组织和气道内的炎症细胞被大量激活, 引起了炎症反应; 可能由于新型烟草中的某些成分调控了 NF- κB 通路, 与 NT 组相比, GT 组的炎症程度明显减缓。

3 讨论与结论

COPD 是一种肺组织的不同部位呈现不同病理变化的异质性疾病: 如中央气道的慢性炎症, 外围气道的炎症和重塑, 肺实质的小叶中央型肺气肿^[1]。目前, 通过香烟烟雾暴露是构建 COPD 动物模型的常用方法。本实验给予 SD 大鼠 56 d 的烟气染毒后, 其呈现出典型的 COPD 病理特征, 与国内外文献的报道一致^[9,11], 这表明动物疾病模型构建成功。

研究表明, TNF- α 是由多种细胞产生的、在炎症细胞因子网络中发挥关键作用的代表性促炎因子; IL-8 在 COPD 异常炎症中可聚集和趋化炎症细胞, 引发中性粒细胞的呼吸爆发; 二者是表征气道炎症严重程度的标志物和评价 COPD 预后的重要指

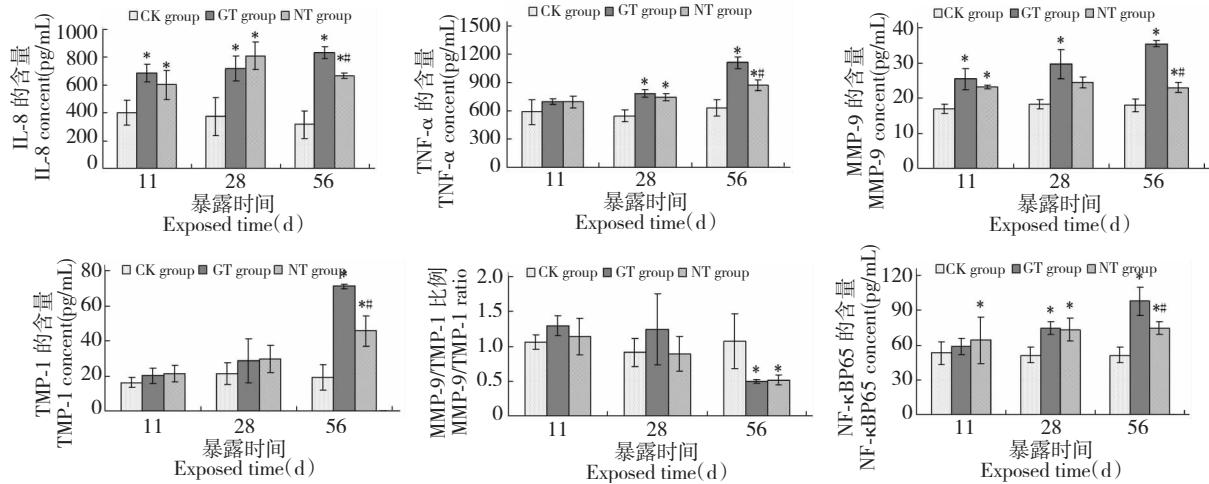


图 1 烟雾暴露对大鼠 BALF 中 IL-8、TNF-α、MMP-9、TIMP-1 及肺组织中 NF-κB p65 水平的影响

Fig. 1 The contents of IL-8, TNF-α, MMP-9, TIMP-1 in BALF and NF-κB p65 in lung tissue of the smoking rats

注:与 CK 比较, * $P < 0.05$;与 GT 比较, # $P < 0.05$

Note: Compared with CK, * $P < 0.05$; Compared with GT, # $P < 0.05$

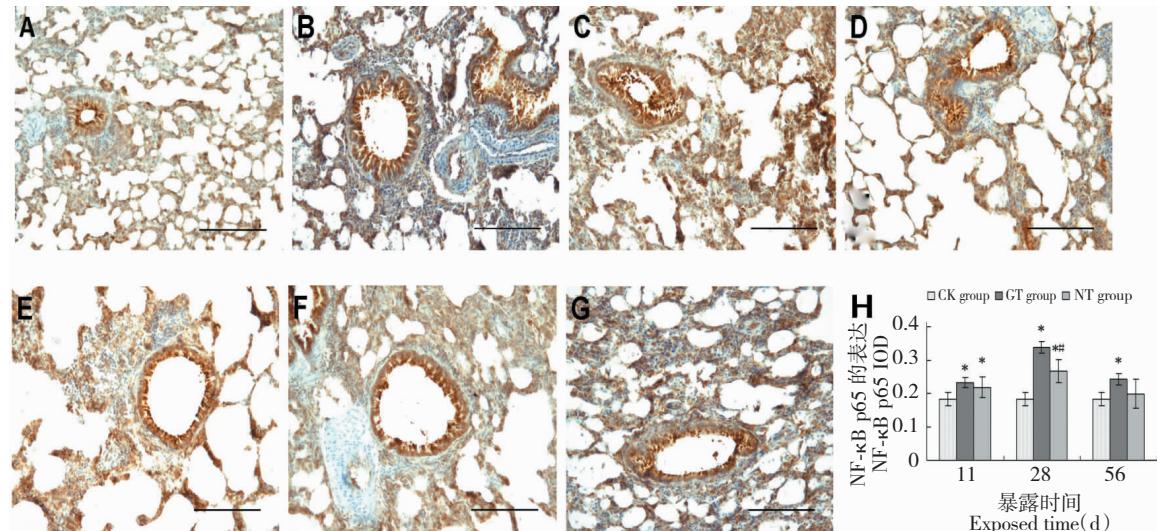


图 2 烟雾暴露对大鼠肺组织 NF-κB p65 表达的影响(100 \times)

Fig. 2 The expression level of NF-κB p65 in lung tissue of the smoking rats (100 \times)

注:A;对照组;B-D;14 d,28 d 和 56 d GT 组;E-G;14 d,28 d 和 56 d NT 组;H:NF-κB p65 表达定量分析。与 CK 比较, * $P < 0.05$;与 GT 比较, # $P < 0.05$

Note: CK group (A); GT group at 14 d, 28 d and 56 d (B, C and D); NT group at 14 d, 28 d and 56 d (E, F and G). H: Quantitative analysis of NF-κB p65. Compared with CK, * $P < 0.05$; Compared with GT, # $P < 0.05$

标^[12]。基质金属蛋白酶(MMPs)和其内源性抑制物(TIMPs)是调节细胞外基质的合成与降解、参与COPD气道重塑的主要蛋白酶类;MMP-9/TIMP-1的比值可以作为反映气道组织破坏、重塑与修复动态平衡的标志^[13]。基于此,我们以气道炎症和气道重塑为切入点,进一步探讨了两种基因型烟草产生的烟雾对COPD大鼠吸烟相关性肺损伤的影响。相关

性分析表明,NF-κB p65 的表达水平与 IL-8 ($r = 0.785, P < 0.05$)、TNF-α ($r = 0.876, P < 0.05$)、MMP-9 ($r = 0.543, P < 0.05$)、TIMP-1 ($r = 0.461, P < 0.05$)的活性以及病理评分($r = 0.632, P < 0.05$)呈明显的正相关,这表明在COPD的形成过程中,这些成分的表达又主要受多功能核转录因子NF-κB的调控^[14,15]。

结果显示,与健康对照组相比,不论是以普通烟草还是新型烟草对大鼠染毒,烟雾暴露均可导致大鼠气道内炎症细胞的活化与聚集,并释放大量的促炎性细胞因子和趋化因子(TNF- α 、IL-8 等)。同时,大鼠 BALF 中 MMP-9 和 TIMP-1 活性升高,而 MMP-9/TIMP-1 的比值显著降低,这可能是 TIMP-1 的表达超过了 MMP-9 的表达,从而引起了气道的重塑。但与普通烟草相比,新型烟草暴露 56 d 后,肺组织的病变程度明显减轻,异常炎症反应显著降低,NF- κ B p65 的表达呈现出抑制效应,这说明导入紫苏基因的新型烟草可能减缓了大鼠吸烟相关性 COPD 的进程,并可能与其某些化学成分干预 NF- κ B 通路有关。

研究表明,芳樟醇可有效抑制香烟烟雾诱导的小鼠肺部的炎症细胞浸润和 NF- κ B 的活性,降低促炎因子 TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-1 β 和 MCP-1 的产生^[16]。芦丁能明显减轻苯并芘诱导的小鼠肺组织的脂质过氧化和 DNA 损伤,增加还原型 GSH 的含量和修复抗氧化酶的活性,调节炎症因子的表达^[17]。柠檬烯、 β -丁香烯、桉油精、薄荷醇、 γ -榄香烯等化学物质,还具有抑制促炎因子释放、阻断 NF- κ B 和 MAPK 通路等作用^[18],对治疗哮喘、支气管炎、病毒性肺炎、肺癌等呼吸系统疾病具有很好的疗效。普通烟草导入紫苏基因后形成复杂而特殊的化学成分,经过燃烧、裂解和蒸馏等过程对烟气特征会产生哪些影响?烟气组分中哪些物质干预或减缓了吸烟相关性的肺损伤?这些问题有待于深入研究。这对利用药用植物基因资源进行烟草品种的遗传改良具有重要的意义。

参考文献

- 1 Research group of COPD of the Chinese Thoracic Society (中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic obstructive pulmonary disease-2013 edition. *Chin J Tuberc Respir Dis* (中华结核和呼吸杂志), 2013, 36: 255-258.
- 2 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (中华人民共和国药典). Beijing: Chemical Industry Publishing House, 2005. Vol I, 53.
- 3 Lim HJ, Woo KW, Lee KR, et al. Inhibition of proinflammatory cytokine generation in lung inflammation by the leaves of *Perilla frutescens* and its constituents. *Biomol Ther*, 2014, 22: 62-67.
- 4 Lin ES, Chou HJ, Kuo PL, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extracts of *Perilla frutescens*. *J Med Plants Res*, 2010, 4: 477-483.
- 5 Wei ZZ (魏治中), Wei KQ (魏克强). *Distant Hybridization Breeding of Tobacco* (烟草远缘杂交育种). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2008.
- 6 Wei KQ (魏克强), Yang JX (杨俊仙), Wei ZZ (魏治中). Chemical components and medicine ingredients in the hybrid of families between tobacco and medicinal plant *Perilla frutescens* (L.) Britt. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2010, 22: 801-806.
- 7 Wei KQ (魏克强), Yang JX (杨俊仙), Wei ZZ (魏治中). Effect of introducing *Perilla frutescens* (L.) Britt DNA on rutin content in tobacco leaves. *Acta Sci Natur Univ Sunyatseni* (中山大学学报), 2011, 50: 102-104.
- 8 Zhang ZY (张知远), Yao YN (姚一楠), Cao J (曹婕), et al. Establishment of a new cigarette smoke exposure device. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2011, 27: 138-139.
- 9 Zeng LX, Dong JC, Yu WQ, et al. Baicalin attenuates inflammation by inhibiting NF- κ B activation in cigarette smoke induced inflammatory models. *Palm Pharmacol Ther*, 2010, 23: 411-419.
- 10 Chen YH, Wang PP, Wang XM, et al. Involvement of endogenous hydrogen sulfide in cigarette smoke-induced changes in airway responsiveness and inflammation of rat lung. *Cytokine*, 2011, 53: 334-341.
- 11 Onoue S, Misaka S, Aoki Y, et al. Inhalable powder formulation of vasoactive intestinal peptide derivative, [R 15, 20, 21, L 17]-VIP-GRR, attenuated neutrophilic airway inflammation in cigarette smoke-exposed rats. *Eur J Pharm Sci*, 2010, 41: 508-514.
- 12 Hacievliyagil SS, Gunen H, Mutlu LC, et al. Association between cytokines in induced sputum and severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*, 2006, 100: 846-854.
- 13 Lagente V, Manoury B, Nenan S, et al. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. *Braz J Med Bio Res*, 2005, 38: 1521-1530.
- 14 Edwards MR, Bartlett NW, Clarke D, et al. Targeting the NF- κ B pathway in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Ther*, 2009, 121: 1-13.
- 15 Hou G, Yin Y, Han D, et al. Rosiglitazone attenuates the metalloprotease/anti-metalloprotease imbalance in emphysema induced by cigarette smoke: involvement of extracellular signal-regulated kinase and NF- κ B signaling. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2015, 10: 715-724.