

文章编号:1001-6880(2017)8-1307-05

# 紫苏干预 COPD 系统性炎症的大鼠模型研究

魏克强\*,李娟娟

山西大学生命科学学院,太原 030006

**摘要:**为揭示导入紫苏基因的新型烟草的生物学效应,将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。对血清进行ELISA分析显示,香烟烟雾染毒56 d能诱发COPD大鼠的系统性炎症反应;但与GT组相比,NT组的CRP、IL-8以及TNF- $\alpha$ 水平显著降低( $P < 0.05$ )。取肝和脾组织进行IHC检测发现,COPD大鼠的NF- $\kappa$ B p65表达水平明显升高,且GT组与NT组脾组织间的差异显著( $P < 0.05$ )。结果表明,导入紫苏基因的新型烟草能够抑制大鼠吸烟相关性COPD的全身性炎症反应,干预肺外组织NF- $\kappa$ B的过度活化,延缓疾病的进程。

**关键词:**慢性阻塞性肺疾病;紫苏;香烟烟雾;系统性炎症

中图分类号:R563.3;Q949.95

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.8.008

## Interventional Effect of *Perilla frutescens* (L.) Britt on Systemic Inflammation of COPD Rats

WEI Ke-qiang\*, LI Juan-juan

School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

**Abstract:** Fifty-four SD rats were randomly divided into 3 groups: control (CK), general tobacco (GT) and new-type tobacco (NT). The COPD model was duplicated in cigarette smoke-exposed rats in order to reveal the biological effect of tobacco introduced *Perilla frutescens* (L.) Britt genes. ELISA analysis showed cigarette smoke can induce inflammatory response of COPD rats after 56 d exposure. Compared to GT group, the serum levels of CRP, IL-8 and TNF- $\alpha$  in NT group significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The expression of NF- $\kappa$ B p65 in liver and spleen tissues was detected by immunohistochemical method. Compared to CK group, there was a significant increase in their levels in COPD rats. With the extension of exposure time, there were obvious differences between NT and GT group ( $P < 0.05$ ). The results indicated that the new-type tobacco can suppress the systemic inflammatory of smoking-related COPD and intervene in the overactivation of NF- $\kappa$ B in extrapulmonary tissues, resulting in delaying the progression of the disease.

**Key words:** chronic obstructive pulmonary disease; *Perilla frutescens* (L.) Britt; cigarette smoke; systemic inflammation

近年来,随着空气环境污染的日益加剧、烟草流行水平的居高不下,我国慢性阻塞性肺疾病(COPD)呈现出逐年升高的趋势。COPD是一种以持续性气流受限为特征的慢性呼吸系统疾病,严重影响患者的生活质量。它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,吸烟被认为是诱发COPD最主要的危险因素。COPD还是一种累及肺外各种器官的全身性疾病,存在多种并发症(也称肺外效应),增加了患者的住院风险和病死率<sup>[1]</sup>。临床发现,COPD患者呈现出以血循环中多

种炎性细胞和炎症因子明显升高为特征的系统性炎症反应,这可能是导致COPD及其并发症的重要病理基础<sup>[2]</sup>。目前,对COPD系统性炎症的发生机制还不太清楚,可能与肺部炎症的“溢出”有关,或者只是慢性系统性炎症综合征(CSIS)的一部分<sup>[3]</sup>,而干预或抑制炎症反应对减缓COPD的进程具有重要的意义。

香烟烟雾富含4800余种化学成分,特别是大量的自由基以及氮氧化物、过氧化物、醛类等氧化剂,这些物质经呼吸道进入体内后,会导致氧化-抗氧化失衡和炎症反应增强。药用植物中的抗炎、抗氧化成分对防治COPD、哮喘等呼吸系统疾病具有显著的疗效,如留兰香(*Mentha spicata* L.)的挥发油含有柠檬烯、 $\beta$ -蒎烯、香芹酮等成分,具有抑制熏烟大鼠

COPD 气道炎症的作用<sup>[4]</sup>;桃金娘(*Rhodomyrtus tomentosa*)的主要成分桉油素、柠檬烯和  $\alpha$ -蒎烯等,能减少 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的释放,对哮喘具有免疫调节和抗炎效应<sup>[5]</sup>。紫苏中的榄香素、木犀草素、肉豆蔻酸和迷迭香酸等成分可有效抑制 COPD 小鼠炎症细胞因子的表达和 NF- $\kappa$ B 的活化,黄酮类物质具有显著的清除自由基和抗氧化能力<sup>[6,7]</sup>。

目前,香烟烟雾暴露是构建 COPD 模型较为理想的方法,可以模拟出慢性支气管炎、肺气肿、气道重塑等复杂的病理改变,与人类 COPD 的疾病特征最接近。本课题的前期研究表明,利用远缘杂交技术将紫苏的基因导入普通烟草中,培育出的新型烟草化学成分独特<sup>[8]</sup>,释放的烟雾显著降低 COPD 大鼠局部(肺组织)和全身性的氧化应激水平以及对肺、肝、脾等多器官的病理损伤,明显抑制气道的异常炎症反应和 NF- $\kappa$ B 活化,延缓大鼠吸烟相关性 COPD 的进程<sup>[9-11]</sup>。目前,对新型烟草是否影响 COPD 的系统性炎症还不清楚,基于此,我们以单纯烟熏法构建的 COPD 大鼠为材料,分析血清中炎症生物标志物(CRP、IL-8 和 TNF- $\alpha$  等)的水平以及肝和脾组织中 NF- $\kappa$ B p65 的表达,探讨导入紫苏基因的新型烟草可能的生物学效应,旨在为挖掘与利用药用植物的基因资源提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

54 只健康清洁级雄性 SD 大鼠,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,温度 20 ~ 25 ℃,湿度 50% ~ 60%,自由饮水和进食。

#### 1.1.2 烟草品种

普通烟草栽培品种“78-04”和新型烟草品种“紫苏烟”<sup>[8,12]</sup>,由山西农业大学药烟育种研究室提供,分别卷制成单料烟,置于温度 22 ± 2 ℃、相对湿度 60 ± 2% 平衡 48 h 待用。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

C 反应蛋白(CRP)、白介素 8(IL-8)和肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )ELISA 检测试剂盒,购自南京建成生物工程公司。兔抗大鼠 NF- $\kappa$ B p65 多克隆抗体、生物素标记的山羊抗兔抗体以及链霉亲和素-过氧化物酶复合物,购自北京中杉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);KDC-140HR 型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);Olympus BX51 型显微镜(日本 Olympus 公司);Leica RM2255 型石蜡切片机(德国 Leica 公司)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<sup>[13,14]</sup>的方法构建 COPD 模型:自制有机玻璃染毒箱(60 cm × 80 cm × 100 cm),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 56 天暴露染毒,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。以 1 mL 注射器心脏采血,静置于肝素钠抗凝管中,30 min 后以 1500 rpm,4 ℃ 离心 10 min,取上清液氮保存。

解剖取肺、肝和脾,生理盐水清洗,滤纸吸干,称湿重,计算脏器系数[脏器系数 = 脏器质量(mg)/大鼠体重(g)]。

#### 1.2.3 ELISA 检测

按照试剂盒说明书,ELISA 法测定血清中 CRP、IL-8 和 TNF- $\alpha$  的水平。

#### 1.2.4 免疫组化检测

另取部分肝、脾组织置于 4% 多聚甲醛中固定,常规石蜡包埋、切片,SABC 法检测 NF- $\kappa$ B p65 的表达,Image-proplus 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 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较以 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 大鼠脏器系数比较

染毒 8 周后,与 CK 组比较,GT 组和 NT 组肺和脾组织的脏器系数呈现出显著的差异( $P < 0.05$ ),表明这两个器官对香烟烟雾暴露比较敏感;而 GT

组与 NT 组之间的各脏器系数差异不明显 ( $P > 0.05$ ) , 这提示不论是普通烟草还是新型烟草均具有一定的毒理学效应, 能导致组织器官的损伤。可

能由于肝脏对烟雾中的有毒物质具有较强的代谢和转化能力, 各组间的系数差异不显著 ( $P > 0.05$ ) (表 1)。

表 1 香烟烟雾暴露 8 周对大鼠脏器系数的影响 ( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of cigarette smoke on organ coefficient of COPD rats after 8 weeks exposure ( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

处理组 Group	肺 Lung	肝 Liver	脾 Spleen
健康对照组 Control (CK)	$3.47 \pm 0.84$	$27.91 \pm 2.34$	$3.69 \pm 0.56$
普通烟草组 General tobacco (GT)	$2.58 \pm 0.87^*$	$25.70 \pm 1.85$	$1.72 \pm 0.35^*$
新型烟草组 New-type tobacco (NT)	$2.30 \pm 0.33^*$	$26.47 \pm 3.63$	$1.77 \pm 0.31^*$

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 血清的 ELISA 检测

在 COPD 的形成进程中, GT 组血清中的 CRP、IL-8 以及 TNF- $\alpha$  水平均显著高于 CK 组 ( $P < 0.05$ ), 这表明血液循环中存在多种炎性生物标志物, 烟雾暴露导致全身系统性炎症反应增强(图 1A-C)。与 CK 组比较, 染毒 56 d 后, NT 组血清中的

IL-8 浓度也显著增加 ( $P < 0.05$ ), 但 CRP 和 TNF- $\alpha$  的水平仅呈现上升的趋势 ( $P > 0.05$ ); 相对于 GT 组, NT 组大鼠烟气暴露 56 d 后, 其 CRP、IL-8 以及 TNF- $\alpha$  的浓度均显著降低, 分别下降了 45.18%、23.76% 和 35.60% ( $P < 0.05$ ), 这提示新型烟草减缓了系统性的炎症反应。

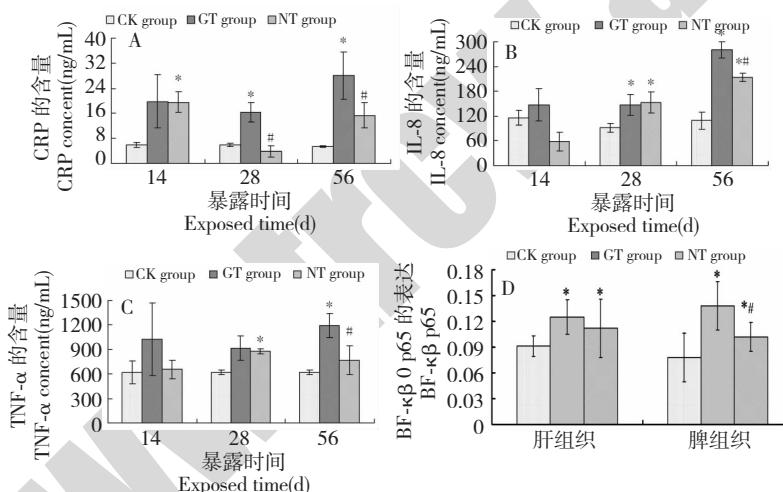


图 1 烟雾暴露对大鼠炎症细胞因子及 NF- $\kappa$ B p65 水平的影响

Fig. 1 The levels of inflammatory cytokines and NF- $\kappa$ B p65 in the smoking rats

A-C: 血清中 CRP、IL-8 及 TNF- $\alpha$  水平的 ELISA 分析; D: 肝和脾组织中 NF- $\kappa$ B p65 表达的免疫组化分析。

A-C: ELISA analysis of CRP, IL-8 and TNF- $\alpha$  in serum; D: IHC analysis of NF- $\kappa$ B p65 protein in liver and spleen tissues.

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,  $^{\#} P < 0.05$

## 2.3 NF- $\kappa$ B 的免疫组化检测

对各处理组肝、脾组织的 NF- $\kappa$ B p65 表达分析可见(图 1D 和图 2), 烟雾暴露染毒 56 d 后, COPD 大鼠的表达水平明显高于 CK 组; 染毒大鼠的 NF- $\kappa$ B p65 表达还存在组织差异, 与 GT 组相比, NT 组脾组织的表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), 而肝组织的表达下降了 10.4%, 差异不显著 ( $P > 0.05$ )。这表明

普通烟草对 NF- $\kappa$ B 有很强的激活作用, 促进了 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的过度表达, 启动和放大了大炎症反应; 而新型烟草中的某些成分能够阻抑 NF- $\kappa$ B p65 的表达, 缓解或减轻了炎症反应。

## 3 讨论与结论

本研究显示, 以不同基因型的烟草对大鼠进行

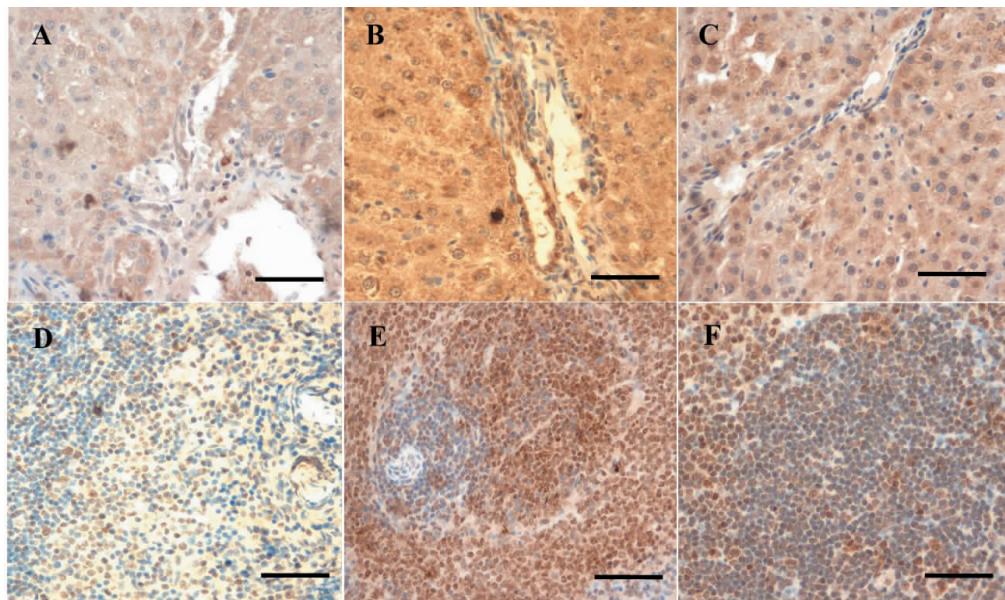


图 2 烟雾暴露对大鼠肝和脾组织 NF- $\kappa$ B p65 表达的影响

Fig. 2 The expression levels of NF- $\kappa$ B p65 protein in liver and spleen tissues of the smoking rats

A:对照组肝;B:染毒 56 d GT 组肝;C:染毒 56 d NT 组肝;D:对照组脾;E:染毒 56 d GT 组脾;F:染毒 56 d NT 组脾. 100 $\times$   
Liver tissue:CK group (A), GT group at 56 d (B) and NT group at 56 d (C). Spleen tissue:CK group (D), GT group at 56 d (E) and NT group at 56 d (F). 100 $\times$

56 d 染毒,其生物学效应呈现出了明显的差异:普通烟草可以诱发系统性炎症,增强肝、脾等组织 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达,与 COPD 的临床特征相似;而新型烟草能够延缓或抑制系统性炎症的发生,干预吸烟相关性 COPD 的进程。

基因型是影响烟草化学成分形成的主要因素之一,这导致释放的烟雾在化学物质组成和含量上发生变化。将药用植物紫苏的基因导入普通烟草,通过基因组间的渐渗、交流和重组,新型烟草产生了普通烟草所没有的多种有益成分,如  $\alpha$ -丁香烯、 $\beta$ -丁香烯、芳樟醇、薄荷醇、 $\alpha$ -桉醇、香叶烯、桉油精、 $\gamma$ -榄香烯等;同时,总糖、还原糖、总氮、烟碱、蛋白质、芸香苷等主要内在化学成分也存在一定的差异<sup>[8]</sup>。研究发现,芳樟醇可有效抑制香烟烟雾诱导的炎症细胞浸润、NF- $\kappa$ B 活性,降低促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-8 和 MCP-1 的产生; $\beta$ -丁香烯、桉油精、薄荷醇、 $\gamma$ -榄香烯等化学物质,具有抑制促炎因子释放、阻断 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 通路等作用。经燃烧、裂解、蒸馏、冷凝等一系列复杂的物理化学过程,尽管目前还不清楚这些成分对烟气特征产生了哪些影响,但新型烟草释放的烟雾参与了局部和全身性的氧化应激和炎症反应<sup>[9-11]</sup>。

COPD 的本质是异常炎症反应,包括局部炎症(气道与肺组织)和全身系统性炎症,烟雾中的自由

基和氧化剂是引发炎症的主要因素。研究表明,这些物质经呼吸道进入体内,破坏机体氧化与抗氧化之间的平衡,促进炎症细胞在气道和肺组织的募集,活化的炎症细胞释放大量的内源性氧化剂,进一步加剧氧化应激反应<sup>[15]</sup>;在氧化应激状态下,炎症细胞上调 IL-8、TNF- $\alpha$  等炎症介质的释放,造成肺部的炎症级联反应,炎症细胞和炎症介质经循环系统到达全身,会促进系统性炎症反应<sup>[16]</sup>。因此氧化应激与炎症反应彼此影响和促进,共同介导了烟雾暴露引起的全身性效应,参与了 COPD 的疾病进程。

系统性炎症的典型特征是活化的炎症细胞释放多种急性时相蛋白和炎症细胞因子进入血液循环。临床研究显示,COPD 患者的血液循环中 CRP、IL-8 和 TNF- $\alpha$  的水平明显升高,并与患者的肺功能、炎症程度以及病情变化密切相关。CRP 是一种由巨噬细胞释放的炎症介质刺激肝脏合成的急性时相反应蛋白,血清 CRP 水平是反映全身性炎症的敏感指标。IL-8 是参与 COPD 炎症反应最重要的细胞因子,能活化中性粒细胞使之脱颗粒释放多种炎症介质,起着引发、维持甚至加重炎症反应的作用。TNF- $\alpha$  是一种具有多种效能的炎性因子,可作为强有力的诱导剂使 IL-8 的合成和释放增加,促使 COPD 炎症进行性加重,IL-8 和 TNF- $\alpha$  的持续存在可能是 COPD 反复发作、恶化的可能原因之一。

研究发现,烟雾化学成分及其诱导的内源性产物会造成肝、脾等组织的氧化应激和损伤,促进募集并活化炎症细胞引发炎症反应<sup>[17,18]</sup>。王雄明等(2015)认为,上述系统性炎症因子也可能是由全身多种组织及器官分泌生成的,通过血液循环参与COPD 的疾病进程<sup>[19]</sup>。NF-κB 几乎存在于哺乳动物的所有细胞中,为 Rel 家族构成的 p50/p65 异源二聚体蛋白,被认为是应激反应尤其是炎症过程的关键调控因子。通常 NF-κB 与其抑制蛋白(IκB)相结合以无活性的形式存在于细胞质中,当细胞受到有害烟雾、细胞因子、活性氧等刺激时,NF-κB 与 IκB 发生解离,活化的 NF-κB 移位进入细胞核,诱导多种炎症因子的转录和表达;而 NF-κB 与 TNF-α 的相互作用又促进炎症细胞合成多种炎症因子,使 COPD 的炎症反应持续和放大<sup>[20]</sup>。因此,NF-κB 过度激活是增强炎症反应的关键分子机制之一,阻抑肺外组织 NF-κB 的活化对防治 COPD 可能具有的重要意义。

## 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, 36:484-491.
- 2 Wen FQ(文富强). Pay attention to comorbidities of chronic obstructive pulmonary disease. *Chin J Lung Dis* (中华肺部疾病杂志), 2013, 6 (2):99-102.
- 3 Fabbri LM, RAbe KF. From COPD to chronic systemic inflammatory syndrome? *Lancet*, 2007, 370:797-799.
- 4 Xia JF(夏锦芳), Wang Y(王砚), Tang FD(唐法娣), et al. Effect of Spearmint oil on airway inflammation, interleukin-8 and CCR2 expression in lung tissue of COPD rats. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2010, 45:423-428.
- 5 Cao LH(曹丽华), Kang J(康健), Wang Y(王洋), et al. Impact of Myrtol standardized on airway inflammation of rats with COPD. *J Dalian Med Univ* (大连医科大学学报), 2010, 32 (1):18-21.
- 6 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 (1):62-67.
- 7 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.
- 8 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.
- 9 Wu J(武娟). The effects of environmental smoke exposure on the specific injury in an animal model. Taiyuan: Shanxi University (山西大学), MSc. 2016.
- 10 Li JM(李佳美). Effects of environmental smoke exposure on the tissues damage in SD rat. Taiyuan: Shanxi University (山西大学), MSc. 2016.
- 11 Li YY(李媛媛), Wei KQ(魏克强), Wu J(武娟), et al. Intervention to smoking-related lung injury of SD rat by introducing medical plants *Perilla frutescens* (L.) Britt genes into tobacco. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28:1891-1895.
- 12 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.
- 13 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 Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2011, 27: 138-139.
- 14 Zeng LX, Dong JC, Yu WQ, et al. Baicalin attenuates inflammation by inhibiting NF-κB activation in cigarette smoke induced inflammatory models. *Pulm Pharmacol Ther*, 2010, 23:411-419.
- 15 Bezerra FS, Valenca SS, Pereira KM, et al. Long-term exposure to cigarette smoke impairs lung function and increases HMGB-1 expression in mice. *Respir Physiol Neurobiol*, 2011, 177:120-126.
- 16 Robert F, Jeanine DA. The effect of cigarette smoke-derived oxidants on the inflammatory response of the lung. *Clin Appl Immunol Rev*, 2006, 6(1):53-72.
- 17 Ramesh T, Sureka C, Bhuvana S, et al. *Sesbania grandiflora* diminishes oxidative stress and ameliorates antioxidant capacity in liver and kidney of rats exposed to cigarette smoke. *J Physiol Pharmacol*, 2010, 61:467-476.
- 18 Yilmaz S, Benzer F, Ozan S, et al. Oxidative damage and arginase activity in tissues of rats exposed to cigarette smoke. *Rev Med Vet-Toulouse*, 2008, 159(2):79-86.
- 19 Wang XM(王雄明), Zhang SY(张睢扬), Sun L(孙丽). The blood biological markers of the chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Respir* (国际呼吸杂志), 2015, 35: 384-387.
- 20 Christman JW, Sadikot RT, Blackwell TS. The role of nuclear factor-κB in pulmonary disease. *Chest*, 2000, 117: 1482-1487.