

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research吴茱萸次碱调节 NRF2/PINK1 通路对
慢性阻塞性肺疾病大鼠气道上皮屏障
修复作用的研究Regulation of NRF2/PINK1 pathway by rutaecarpine on airway epithelial barrier
repair in chronic obstructive pulmonary disease rats张 松, 洪 波, 陈 玲,
陈申达(宁波市中医院 感染(肺病)科, 浙江 宁波
315000)ZHANG Song, HONG Bo,
CHEN Ling, CHEN Shen-da(Department of Infection (Lung
Disease), Ningbo Traditional Chinese
Medicine Hospital, Ningbo 315000,
Zhejiang Province, China)基金项目:浙江省中医药科技计划基金资助项
目(2024ZL881, 2021ZB257)作者简介:张松(1980-),男,副主任医师,主要
从事慢性气道疾病的临床诊疗工作

通信作者:洪波,主任中医师

MP:15990210270

E-mail: hongboys1002@163.com

摘要:目的 基于核因子 E2 相关因子 2(NRF2)/PTEN 诱导假定激酶 1(PINK1)通路探索吴茱萸次碱对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠的改善作用,及其对气道上皮屏障的修复作用。**方法** 用烟熏联合气道滴注脂多糖的方法构建 COPD 大鼠模型,并随机分为模型组、对照组和低、中、高剂量实验组,每组 10 只;另取 10 只正常大鼠作为正常组。低、中、高剂量实验组按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量分别腹腔注射 $15, 30, 60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的吴茱萸次碱;对照组按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃给予 $4.05 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的醋酸泼尼松;正常组和模型组均腹腔注射等量 0.9% NaCl。6 组大鼠每天给药 1 次,连续给药 28 d。用小动物肺功能测定仪测定大鼠的第 1 秒用力呼气容积(FEV1)和用力肺活量(FVC),用酶联免疫吸附试验法测定肺泡灌洗液中白细胞介素(IL)和干扰素- γ (INF- γ)的水平,用蛋白质印迹法测定肺组织中 PINK1 和 NRF2 蛋白的表达水平。**结果** 中、高剂量实验组和对照组、模型组、正常组的 FEV1 分别为 (5.17 ± 0.16) 、 (6.36 ± 0.12) 、 (5.06 ± 0.07) 、 (2.24 ± 0.20) 和 $(6.84 \pm 0.11) \text{ mL}$, FVC 分别为 (6.71 ± 0.13) 、 (7.56 ± 0.12) 、 (6.81 ± 0.07) 、 (4.46 ± 0.14) 和 $(7.92 \pm 0.11) \text{ mL}$, 肺泡灌洗液中 IL-12 水平分别为 (7.08 ± 0.51) 、 (9.03 ± 0.54) 、 (7.92 ± 0.79) 、 (3.61 ± 1.01) 和 $(10.15 \pm 0.82) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 肺泡灌洗液中 IL-9 水平分别为 (22.49 ± 2.27) 、 (15.02 ± 1.41) 、 (17.47 ± 1.84) 、 (38.72 ± 1.28) 和 $(11.78 \pm 0.94) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 肺泡灌洗液中 INF- γ 水平分别为 (13.18 ± 0.54) 、 (16.25 ± 0.60) 、 (15.23 ± 0.43) 、 (6.97 ± 0.89) 和 $(17.22 \pm 1.15) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, PINK1 蛋白相对表达水平分别为 1.10 ± 0.06 、 1.30 ± 0.09 、 1.18 ± 0.15 、 0.42 ± 0.03 和 1.61 ± 0.05 , NRF2 蛋白相对表达水平分别为 0.91 ± 0.05 、 1.46 ± 0.03 、 1.35 ± 0.07 、 0.53 ± 0.07 和 1.64 ± 0.11 。中、高剂量实验组和对照组的上述指标与模型组相比,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** 吴茱萸次碱能够抑制 COPD 大鼠的炎症反应,改善 COPD 大鼠的肺功能,修复 COPD 大鼠的气道上皮屏障,其机制可能与调节 NRF2/PINK1 通路有关。

关键词:吴茱萸次碱;慢性阻塞性肺疾病;核因子 E2 相关因子 2/PTEN 诱导假定激酶 1 通路;气道改善

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.01.014

中图分类号:R28 文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2025)01-0065-06

Abstract: Objective Based on nuclear factor E2 associated factor 2 (NRF2) /PTEN induced hypothesized kinase 1 (PINK1) pathway, explored the ameliorating effect of rutaecarpine on chronic obstructive pulmonary disease (COPD) rats and its repairing effect on airway epithelial barrier. **Methods** COPD rat model were established by smoke

combined with airway infusion of lipopolysaccharide; and were randomly divided into model group, control group, and experimental - L group, experimental - M group, experimental - H group, 10 rats per group. Another 10 normal rats were selected as the normal group. Experimental - L, - M, - H groups were intraperitoneally injected 15, 30 and 60 mg · mL⁻¹ rutaecarpine at the dose of 10 mL · kg⁻¹, respectively. The control group was received 4.05 × 10⁻² mg · mL⁻¹ prednisone acetate at the dose of 10 mL · kg⁻¹ by gavage. The normal and model groups were given 0.9% NaCl by intraperitoneal injection. Six groups were treated for 28 days with once a day. The first second forced expiratory volume (FEV1) and forced vital capacity (FVC) of rats were measured by minor animal lung function tester. The levels of interleukin (IL) and interferon - γ (INF - γ) in alveolar lavage fluid were determined by enzyme - linked immunosorbent assay method. The expression levels of PINK1 and NRF2 proteins in the lung tissue were determined by Western blot. **Results** The levels of FEV1 in the experimental - M group, experimental - H group, control group, model group and normal group were (5.17 ± 0.16), (6.36 ± 0.12), (5.06 ± 0.07), (2.24 ± 0.20) and (6.84 ± 0.11) mL; the levels of FVC were (6.71 ± 0.13), (7.56 ± 0.12), (6.81 ± 0.07), (4.46 ± 0.14) and (7.92 ± 0.11) mL; the levels of IL - 12 in alveolar lavage fluid were (7.08 ± 0.51), (9.03 ± 0.54), (7.92 ± 0.79), (3.61 ± 1.01) and (10.15 ± 0.82) pg · mL⁻¹; the levels of IL - 9 in alveolar lavage fluid were (22.49 ± 2.27), (15.02 ± 1.41), (17.47 ± 1.84), (38.72 ± 1.28) and (11.78 ± 0.94) pg · mL⁻¹; the levels of INF - γ in alveolar lavage fluid were (13.18 ± 0.54), (16.25 ± 0.60), (15.23 ± 0.43), (6.97 ± 0.89) and (17.22 ± 1.15) pg · mL⁻¹; the relative expression levels of PINK1 protein were 1.10 ± 0.06, 1.30 ± 0.09, 1.18 ± 0.15, 0.42 ± 0.03 and 1.61 ± 0.05; the relative expression levels of NRF2 protein were 0.91 ± 0.05, 1.46 ± 0.03, 1.35 ± 0.07, 0.53 ± 0.07 and 1.64 ± 0.11, respectively. The differences of above indexes were statistically significant between the experimental - M group, experimental - H group, control group and the model group (all *P* < 0.05). **Conclusion** Rutaecarpine can inhibit inflammation, improve lung function and repair airway epithelial barrier in COPD rats, and its mechanism may be related to regulating NRF2/PINK1 pathway.

Key words: rutaecarpine; chronic obstructive pulmonary disease; nuclear factor erythroid 2 - related factor 2/PTEN - induced putative kinase 1 pathway; airway improvement

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是以咳嗽咳痰、胸闷喘息为主要临床特征的呼吸系统常见疾病。研究表明, COPD 的发生与吸烟、空气污染等因素密切相关^[1-2]。目前, COPD 的治疗存在治疗效果差, 患者依从性低等缺点, 所以 COPD 治疗药物及方案的研发仍是当前的主要任务之一。近年来, 研究发现, 核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2 - related factor 2, NRF2)/PTEN 诱导假定激酶 1(PTEN - induced putative kinase 1, PINK1) 通路是与 COPD 的发生及进展密切相关的重要通路, 其过度抑制可能是导致 COPD 进展的关键因素^[3]。吴茱萸次碱是从植物吴茱萸中提取得到的单体化合物, 其对肺组织具有一定的保护作用^[4]。本实验旨在探索吴茱萸次碱对 COPD 大鼠肺组织的保护作用, 以及其对 NRF2/PINK1 通路的调节作用, 为吴茱萸次碱的药理作用研究提供参考。

材料与方法

1 材料

动物 雄性无特定病原体级 SD 大鼠, 鼠龄 6~8 周,

体质量 220~280 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。动物生产许可证号: SCXK(湘)2021-0002。本实验经宁波市中医院动物伦理委员会批准(伦理批号: 2022 第 079 号-03)。

药品与试剂 吴茱萸次碱, 规格: 每瓶 20 mg, 纯度: ≥98%, 批号: 210318, 醋酸泼尼松, 规格: 每瓶 100 mg, 纯度: ≥98%, 批号: 210905, 均由北京索莱宝科技有限公司生产。白细胞介素(interleukin, IL) - 12 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒, 泉州市九邦生物科技有限公司生产; 干扰素(interferon, INF) - γ ELISA 试剂盒, 上海谷研实业有限公司生产; IL - 9、IL - 13 ELISA 试剂盒, 均由上海臻科生物科技有限公司生产; IL - 4、IL - 1β ELISA 试剂盒, 均由武汉华美生物工程有限公司生产; PINK1 兔抗体, 上海碧云天生物科技有限公司生产; 甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶(glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase, GAPDH)、闭锁小带蛋白 1(zonula occluden - 1, ZO - 1)、表皮 - 钙黏蛋白(E - cadherin)、NRF2 兔抗体, 均由美国 Cell Signaling

Technology 公司生产。引物,均由武汉赛维尔生物科技有限公司设计及合成。

仪器 GD-1000 凝胶成像系统,购自爱思进生物技术(杭州)有限公司;HCT-96G 梯度聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪,华威科创(武汉)科技有限公司产品;IX83 荧光倒置显微镜,日本奥林巴斯公司产品。

2 实验方法

2.1 溶液配制

分别称取吴茱萸次碱 0.75、1.50 和 3.00 g,用二甲基亚砷 2.5 mL 溶解后,缓慢加入含有吐温 80 5 mL 和 0.9% NaCl 42.5 mL 中,分别制成质量浓度为 15、30、60 mg · mL⁻¹ 的吴茱萸次碱溶液。

称取醋酸泼尼松 8.1 mg,加入 0.9% NaCl 200 mL 充分混匀,制成质量浓度为 4.05×10^{-2} mg · mL⁻¹ 的醋酸泼尼松溶液,备用。

2.2 模型构建

参照文献[5]的方法建立 COPD 模型大鼠。于造模开始后的第 1 和 15 天,向大鼠气管内滴入脂多糖 200 μL,其余时间将大鼠置于烟熏箱中,每次烟熏 10 min,每天 2 次,中间间隔 2 h,共造模 28 d,随机取 3 只大鼠进行肺组织病理检查,以大鼠出现精神萎靡,毛发脱落,同时肺组织出现明显的病理改变视为造模成功。

2.3 动物分组与给药方法

待造模完成后,将大鼠随机分为模型组、对照组和低、中、高剂量实验组,每组 10 只;另取 10 只正常大鼠作为正常组。低、中、高剂量实验组按 10 mL · kg⁻¹ 的剂量分别腹腔注射 15、30、60 mg · mL⁻¹ 的吴茱萸次碱^[6];对照组按 10 mL · kg⁻¹ 的剂量灌胃给予 4.05×10^{-2} mg · mL⁻¹ 的醋酸泼尼松^[7];正常组和模型组均腹腔注射等量 0.9% NaCl。6 组大鼠每天给药 1 次,连续给药 28 d。

2.4 小动物肺功能测定仪检测大鼠的肺功能^[8]

于末次给药 24 h 后,大鼠经水合氯醛麻醉,用小动物肺功能测定仪测定各组大鼠的肺功能,包括第 1 秒用力呼气容积(forced expiratory volume in the first second, FEV1)和用力肺活量(forced vital capacity, FVC),并计算 FEV1/FVC。

2.5 ELISA 法测定肺泡灌洗液中 IL 和 INF-γ 的水平^[9]

于末次给药 24 h 后,大鼠经水合氯醛麻醉,行气管插管,用磷酸盐缓冲液 5 mL 灌洗肺组织,重复 3 次,收集灌洗液,离心分离上清液,严格按照试剂盒说明

书的步骤进行操作,用 ELISA 法测定肺泡灌洗液中 IL-12、IL-9、IL-4、IL-13、IL-1β 和 INF-γ 的表达水平。

2.6 阿尔辛蓝-过碘酸雪夫(Alcian blue-periodic acid Schiff, AB-PAS)染色法测定大鼠杯状细胞比例^[10]

大鼠经颈椎脱臼法处死后,分离肺组织,用 4% 中性甲醛中固定 12 h,石蜡包埋并制成 5 μm 的切片,用二甲苯脱蜡后,切片经梯度乙醇脱水,用阿尔辛蓝染色 5 min 后,自来水冲洗,用过碘酸染色 10 min,蒸馏水清洗,雪夫避光染色 30 min,蒸馏水清洗,再经过苏木精染色 1 min,经脱水、透明、封片,在显微镜下观察拍照,计算杯状细胞比例。杯状细胞比例 = AB-PAS 阳性面积/总面积 × 100%。

2.7 实时定量 PCR 法测定肺组织中 ZO-1、E-cadherin、PINK1 和 NRF2 mRNA 的相对表达水平^[11]

取肺组织,用裂解液充分裂解后,离心取上清液,严格按照试剂盒说明书的步骤进行操作。反应体系:模板 DNA 1 μL,正反向引物各 0.8 μL,PCR 预混液 10 μL,用蒸馏水补充至 20 μL。反应程序:92 °C 预变性 3 min,92 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,68 °C 延伸 30 s,共计 30 个循环。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参,以 2^{-ΔΔCt}法测定 ZO-1、E-cadherin、PINK1 和 NRF2 mRNA 的相对表达水平。

2.8 蛋白质印迹法测定肺组织中 ZO-1、E-cadherin、PINK1 和 NRF2 蛋白的表达水平^[12]

取肺组织,用裂解液充分裂解后,离心取上清液,经电泳分离后,转膜,脱脂牛奶室温封闭 1 h,分别用 GAPDH、ZO-1、E-cadherin、PINK1、NRF2 兔抗体 4 °C 孵育过夜(1:500 稀释),经磷酸盐缓冲液洗涤后,用山羊抗兔二抗室温孵育 1 h(1:2 000 稀释),通过凝胶成像系统,以 GAPDH 为内参蛋白,用 Image J v1.8.0 软件计算 ZO-1、E-cadherin、PINK1 和 NRF2 蛋白的相对表达水平。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,两两比较用 LSD 检验。

结 果

1 吴茱萸次碱对 COPD 大鼠肺功能的影响

低、中、高剂量实验组分别给予 15、30、

60 mg · mL⁻¹的吴茱萸次碱;对照组给予4.05 × 10⁻² mg · mL⁻¹的醋酸泼尼松;正常组和模型组均给予等量0.9% NaCl。

模型组与正常组比较,FEV1、FVC和FEV1/FVC均显著降低,在统计学上差异均有统计学意义(均 *P* < 0.05);低、中、高剂量实验组和对照组的FEV1、FVC和FEV1/FVC均较模型组显著升高,在统计学上差异均有统计学意义(均 *P* < 0.05)。结果见表1。

2 吴茱萸次碱对 COPD 大鼠肺泡灌洗液中炎症因子的影响

模型组与正常组比较,肺泡灌洗液中 IL-12 和 INF-γ 水平均显著降低,IL-9、IL-4、IL-13 和 IL-1β 水平均显著升高,在统计学上差异均有统计学意义(均 *P* < 0.05);低、中、高剂量实验组及对照组的

IL-12、INF-γ 水平均较模型组显著升高,IL-9、IL-4、IL-13 和 IL-1β 水平均较模型组显著降低,在统计学上差异均有统计学意义(均 *P* < 0.05)。结果见表2。

3 吴茱萸次碱对 COPD 大鼠杯状细胞比例的影响

AB-PAS 染色结果表明:低、中、高剂量实验组和对照组、模型组、正常组的杯状细胞比例分别为(24.55 ± 1.93)%、(19.02 ± 1.59)%、(12.72 ± 3.45)%、(13.94 ± 2.84)%、(32.80 ± 3.84)%和(9.55 ± 1.20)%。模型组与正常组比较,杯状细胞比例显著升高,在统计学上差异有统计学意义(*P* < 0.05);低、中、高剂量实验组和对照组的杯状细胞比例均较模型组显著降低,在统计学上差异均有统计学意义(均 *P* < 0.05)。结果见图1。

表1 6组大鼠肺功能的比较(̄x ± s)

Table 1 Comparison of lung function in 6 groups of rats(̄x ± s)

Group	Dose(mg · mL ⁻¹)	<i>n</i>	FEV1(mL)	FVC(mL)	FEV1/FVC(%)
Normal	—	10	6.84 ± 0.11	7.92 ± 0.11	86.39 ± 1.32
Model	—	10	2.24 ± 0.20 [*]	4.46 ± 0.14 [*]	50.37 ± 4.97 [*]
Experimental - L	15.00	10	3.65 ± 0.13 [#]	5.93 ± 0.13 [#]	61.60 ± 2.14 [#]
Experimental - M	30.00	10	5.17 ± 0.16 ^{#Δ}	6.71 ± 0.13 ^{#Δ}	77.10 ± 2.55 ^{#Δ}
Experimental - H	60.00	10	6.36 ± 0.12 ^{#Δ▲}	7.56 ± 0.12 ^{#Δ▲}	84.11 ± 2.47 ^{#Δ▲}
Control	4.05 × 10 ⁻²	10	5.06 ± 0.07 [#]	6.81 ± 0.07 [#]	74.33 ± 1.43 [#]

FEV1: Forced expiratory volume in 1 second; FVC: Forced vital capacity; Compared with normal group, ^{*} *P* < 0.05; Compared with model group, [#] *P* < 0.05; Compared with experimental - L group, ^Δ *P* < 0.05; Compared with experimental - M group, [▲] *P* < 0.05.

表2 6组大鼠肺泡灌洗液中炎症因子表达水平的比较(pg · mL⁻¹, ̄x ± s)

Table 2 Comparison of expression levels of inflammatory factors in alveolar lavage fluid of 6 groups of rats(pg · mL⁻¹, ̄x ± s)

Group	IL-12	IL-9	IL-4	IL-13	IL-1β	INF-γ
Normal	10.15 ± 0.82	11.78 ± 0.94	20.82 ± 1.38	9.81 ± 1.02	33.17 ± 2.57	17.22 ± 1.15
Model	3.61 ± 1.01 [*]	38.72 ± 1.28 [*]	46.02 ± 1.95 [*]	30.16 ± 1.83 [*]	68.85 ± 2.36 [*]	6.97 ± 0.89 [*]
Experimental - L	5.45 ± 0.91 [#]	30.80 ± 2.20 [#]	38.46 ± 1.61 [#]	24.41 ± 1.16 [#]	53.13 ± 2.38 [#]	10.29 ± 0.77 [#]
Experimental - M	7.08 ± 0.51 ^{#Δ}	22.49 ± 2.27 ^{#Δ}	30.56 ± 2.00 ^{#Δ}	18.76 ± 1.20 ^{#Δ}	46.26 ± 2.14 ^{#Δ}	13.18 ± 0.54 ^{#Δ}
Experimental - H	9.03 ± 0.54 ^{#Δ▲}	15.02 ± 1.41 ^{#Δ▲}	25.77 ± 2.67 ^{#Δ▲}	14.28 ± 1.24 ^{#Δ▲}	36.78 ± 2.55 ^{#Δ▲}	16.25 ± 0.60 ^{#Δ▲}
Control	7.92 ± 0.79 [#]	17.47 ± 1.84 [#]	28.25 ± 1.60 [#]	15.55 ± 1.07 [#]	42.15 ± 1.71 [#]	15.23 ± 0.43 [#]

Dose and *n* refer to table 1; IL: Interleukin; INF-γ: Interferon - γ; Compared with normal group, ^{*} *P* < 0.05; Compared with model group, [#] *P* < 0.05; Compared with experimental - L group, ^Δ *P* < 0.05; Compared with experimental - M group, [▲] *P* < 0.05.

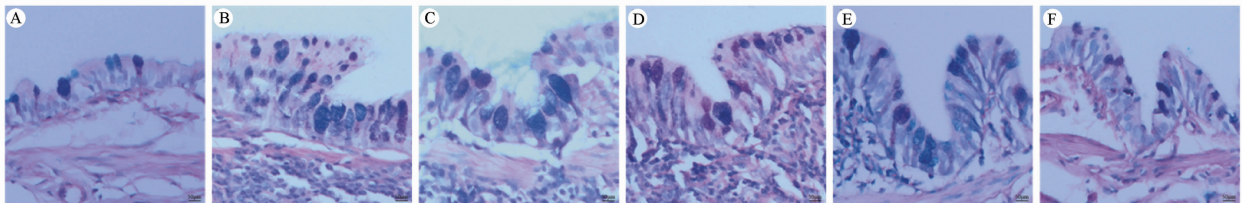


图1 6组大鼠肺组织中杯状细胞的染色情况(阿尔辛蓝-过碘酸雪夫染色, ×400)

Figure 1 Goblet cell staining in lung tissue of 6 groups of rats(Alcian blue-periodic acid Schiff, ×400)

A: Normal group; B: Model group; C, D, E: Experimental - L, - M, - H group, respectively; F: Control group.

表3 6组大鼠肺组织中闭锁小带蛋白1(ZO-1)、表皮-钙黏蛋白(E-cadherin)、PTEN诱导假定激酶1(PINK1)、核因子E2相关因子2(NRF2)mRNA和蛋白表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of mRNA and protein expression levels of zonula occluden-1 (ZO-1), E-cadherin, PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) and nuclear factor erythroid 2-related factor (NRF2) in lung tissues of 6 groups of rats ($\bar{x} \pm s$)

Group	mRNA			
	ZO-1	E-cadherin	PINK1	NRF2
Normal	5.74 ± 0.26	6.08 ± 0.13	5.55 ± 0.13	6.44 ± 0.18
Model	0.76 ± 0.09 [*]	0.55 ± 0.10 [*]	0.90 ± 0.06 [*]	0.65 ± 0.08 [*]
Experimental - L	1.39 ± 0.07 [#]	1.24 ± 0.11 [#]	1.39 ± 0.14 [#]	1.00 ± 0.13 [#]
Experimental - M	2.98 ± 0.06 ^{#△}	2.58 ± 0.17 ^{#△}	2.88 ± 0.04 ^{#△}	3.40 ± 0.04 ^{#△}
Experimental - H	5.00 ± 0.16 ^{#△▲}	4.76 ± 0.20 ^{#△▲}	4.08 ± 0.08 ^{#△▲}	4.98 ± 0.11 ^{#△▲}
Control	4.17 ± 0.16 [#]	4.05 ± 0.13 [#]	3.25 ± 0.05 [#]	4.00 ± 0.12 [#]

Group	Protein			
	ZO-1	E-cadherin	PINK1	NRF2
Normal	1.30 ± 0.02	1.47 ± 0.09	1.61 ± 0.05	1.64 ± 0.11
Model	0.20 ± 0.06 [*]	0.20 ± 0.04 [*]	0.42 ± 0.03 [*]	0.53 ± 0.07 [*]
Experimental - L	0.49 ± 0.05 [#]	0.47 ± 0.01 [#]	0.70 ± 0.02 [#]	0.65 ± 0.04 [#]
Experimental - M	0.74 ± 0.10 ^{#△}	0.66 ± 0.12 ^{#△}	1.10 ± 0.06 ^{#△}	0.91 ± 0.05 ^{#△}
Experimental - H	1.07 ± 0.07 ^{#△▲}	1.21 ± 0.03 ^{#△▲}	1.30 ± 0.09 ^{#△▲}	1.46 ± 0.03 ^{#△▲}
Control	0.92 ± 0.05 [#]	0.97 ± 0.06 [#]	1.18 ± 0.15 [#]	1.35 ± 0.07 [#]

Dose and *n* refer to table 1; Compared with normal group, ^{*} *P* < 0.05; Compared with model group, [#] *P* < 0.05; Compared with experimental - L group, [△] *P* < 0.05; Compared with experimental - M group, [▲] *P* < 0.05.

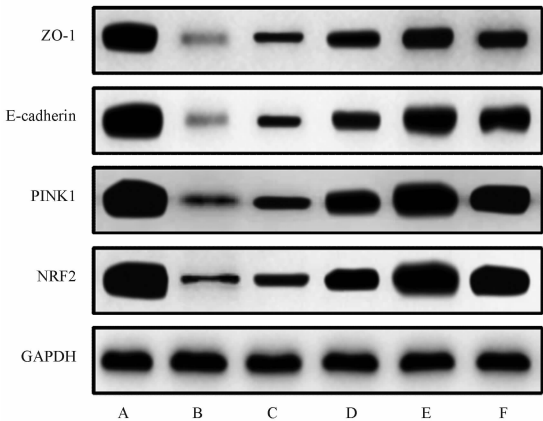


图2 用蛋白质印迹法检测6组大鼠肺组织中ZO-1、E-cadherin、PINK1和NRF2蛋白的表达情况

Figure 2 The expression of ZO-1, E-cadherin, PINK1 and NRF2 proteins in lung tissues of 6 groups were detected by Western blot

A - F refer to figure 1.

4 吴茱萸次碱对COPD大鼠肺组织中ZO-1、E-cadherin、PINK1、NRF2 mRNA及蛋白的影响

模型组与正常组比较,大鼠肺组织中ZO-1、E-cadherin、PINK1、NRF2 mRNA及蛋白相对表达水平均显著降低,在统计学上差异均有统计学意义(均*P* < 0.05);低、中、高剂量实验组和对照组肺组织中ZO-1、E-cadherin、PINK1、NRF2 mRNA及蛋白相对表达水平均显著升高,在统计学上差异均有统计学意

义(均*P* < 0.05)。结果见表3和图2。

讨 论

目前,临床中对于COPD的治疗存在有效率低、患者依从性差等缺点,所以对于COPD治疗药物的研发仍是当前工作重点之一。吴茱萸次碱是从中药材吴茱萸中提取得到的单体化合物,具有抗炎、免疫调节等作用^[13]。研究证实,吴茱萸次碱在改善大鼠肺功能及抑制气道炎症因子释放等方面具有显著的效果^[6]。FEV1、FVC和FEV1/FVC是反映肺功能的重要指标,其水平降低是肺功能下降的重要标志。本实验结果表明,经吴茱萸次碱治疗后,COPD大鼠的FEV1和FVC水平均显著升高,提示吴茱萸次碱能够促进COPD大鼠肺功能的恢复。

肺泡灌洗液中IL-12、IL-9、IL-4、IL-13、IL-1β和INF-γ水平是反映大鼠肺组织炎症状态的重要指标^[14-15]。本实验结果表明,经吴茱萸次碱治疗后,COPD大鼠肺泡灌洗液中IL-12和INF-γ水平均较模型组显著升高,IL-9、IL-4、IL-13和IL-1β水平均较模型组显著降低,这说明吴茱萸次碱能够呈剂量依赖性地显著抑制COPD大鼠肺泡炎症反应,有利于改善COPD大鼠肺功能。

ZO-1及E-cadherin水平变化与COPD的发生

及进展密切相关。ZO-1 及 E-cadherin 水平与气道上皮屏障功能有关,调节 ZO-1 及 E-cadherin 通路可能是促进 COPD 大鼠气道上皮屏障修复的有效途径^[16]。杯状细胞作为气道重要屏障,其百分比升高与气道黏液的高分泌及肺组织炎症损伤有关,降低杯状细胞比例则能够抑制气道炎症反应,促进肺功能恢复^[17]。本实验结果证实,吴茱萸次碱能够升高 COPD 大鼠肺组织中 ZO-1 及 E-cadherin 的表达水平,抑制杯状细胞比例,促进大鼠气道功能及结构的恢复,从而抑制气道炎症损伤。研究证实,NRF2/PINK1 通路与 COPD 的发生及进展相关,NRF2 表达水平升高可以提高肺组织抗氧化能力,修复线粒体功能^[18];PINK1 参与气道细胞凋亡及炎症反应的发生,提高 PINK1 表达水平能够显著降低气道阻力,调节气道细胞自噬^[19]。这说明调节 NRF2/PINK1 通路可能是治疗 COPD 的有效途径和方法。本实验结果表明,吴茱萸次碱能够显著升高 COPD 大鼠肺组织中 NRF2 和 PINK1 的表达水平,改善大鼠的肺功能,提示吴茱萸次碱能够通过激活 NRF2/PINK1 通路,抑制肺组织病理进展及炎症损伤,从而促进肺功能的恢复。

本研究提示:吴茱萸次碱能够抑制 COPD 大鼠炎症反应,改善 COPD 大鼠肺功能,修复 COPD 大鼠气道上皮屏障,其机制可能与调节 NRF2/PINK1 通路有关。

参考文献:

- [1] 张绍塘,陈伦,叶健. 多索茶碱联合盐酸氨溴索对老年稳定期慢阻肺患者血清 IL-33/sST2 轴表达的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2022,38(4):291—295.
- [2] 方圆圆,俞建洪. 不同剂量布地奈德治疗老年慢性阻塞性肺疾病的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志,2024,40(6):787—791.
- [3] LI M Y, QIN Y Q, TIAN Y G, et al. Effective-component compatibility of Bufeiyishen formula III ameliorated COPD by improving airway epithelial cell senescence by promoting mitophagy via the NRF2/PINK1 pathway [J]. *BMC Pulm Med*, 2022, 22(1):1—12.
- [4] 高云星,蒋莉莉,张倩,等. 吴茱萸次碱通过抑制 Notch1/eIF3a 信号通路保护博来霉素诱导的大鼠肺纤维化[J]. 中国中药杂志,2018,43(17):3530—3538.
- [5] 王文静,刘雪梅,张桂琴. 紫苏叶多糖通过 Wnt/PCP 通路对慢阻肺大鼠气道炎症反应及气道重塑的作用研究[J]. 中医药导报,2021,27(10):37—41.
- [6] 陈华,张柏盛,龙小平. 吴茱萸次碱对博来霉素诱导大鼠肺纤维化的影响[J]. 中药材,2020,43(12):3024—3028.
- [7] 黄勇,苏韞,龚红霞,等. 野菊花颗粒对 COPD 模型大鼠气道炎症与重塑及 MMP-9/TIMP-1 平衡的影响[J]. 中国老年学杂志,2023,43(17):4230—4233.
- [8] 吴永红,王可,刘春涛. PDK1 抑制剂对烟熏诱导的慢性阻塞性肺疾病小鼠模型体内 PGE2 表达的干预作用[J]. 中国呼吸与危重监护杂志,2023,22(5):349—355.
- [9] 李晓丹,王强. 补肺颗粒通过调控 Akt 通路对慢阻肺大鼠肺组织自噬和凋亡的影响[J]. 武汉大学学报(医学版),2020,41(6):904—910.
- [10] 张莉,何达,席俊峰. 丹酚酸 B 通过抑制 IL-13/STAT6 通路和恢复 Th17/Treg 平衡阻滞大鼠慢性阻塞性肺病研究[J]. 广西医科大学学报,2021,38(10):1893—1899.
- [11] 张蓝熙,田燕歌,朱丽华,等. 补肺益肾方通过调控 Nrf2 通路抗氧化应激治疗慢性阻塞性肺疾病机制[J]. 中华中医药杂志,2020,35(5):2374—2379.
- [12] 潘晓杰,范嘉铨,夏光琴. 葛根素通过调节 PINK1-parkin 信号通路介导的线粒体自噬抑制慢性阻塞性肺疾病大鼠肺泡上皮细胞凋亡[J]. 中国病理生理杂志,2022,38(10):1833—1839.
- [13] 王峥业,徐圣麟,王文文,等. 山柰酚对慢性阻塞性肺疾病大鼠气道炎症反应的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2024,40(2):215—219.
- [14] 凌刘,钟毅. 布地格福吸入气雾剂联合无创正压通气治疗慢性阻塞性肺疾病合并呼吸衰竭患者的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志,2024,40(8):1101—1105.
- [15] 王倩倩,刘莎莎,王丽斌,等. 大蒜素对 COPD 大鼠肺组织损伤及内质网应激的影响[J]. 广西医科大学学报,2023,40(12):1997—2003.
- [16] 张旺生,王世聪,陈慧,等. 全真一气汤通过 HIF-1 α /VEGF 通路抑制 COPD 大鼠气道重塑的研究[J]. 中医药导报,2023,29(6):28—33.
- [17] 李先莉,史利卿,马建岭,等. 宣肺健脾方对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺组织病理、气道杯状细胞及黏蛋白 5AC 的影响[J]. 中国医药导报,2022,19(34):8—12.
- [18] 刘杨,张蓝熙,卢瑞龙,等. 基于 Pkm2/Nrf2 通路探讨补肺益肾方改善线粒体氧化损伤治疗慢性阻塞性肺疾病的机制[J]. 中华中医药杂志,2023,38(5):1973—1981.
- [19] JIANG H, JIANG Y, XU Y, et al. Bronchial epithelial SIRT1 deficiency exacerbates cigarette smoke induced emphysema in mice through the FOXO3/PINK1 pathway [J/OL]. *Exp Lung Res*, 2022, 2:1—48. 2022-02-08 [2024-08-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35132913/>.

(收稿日期 2024-08-12; 本文编辑 戴荣源)