

不同诱导剂致慢性阻塞性肺疾病模型小鼠氧化应激损伤的实验研究*

覃文慧^{1,2}, 杨柯², 邓家刚^{1,2**}, 张帅², 黄思诗²

(1. 成都中医药大学研究生院 成都 610075; 2. 广西中医药大学药学院 南宁 530001)

摘要:目的:观察脂多糖和博来霉素两种诱导剂对小鼠不同时间点氧化/抗氧化状态的干预作用,为采用以上诱导剂建立气虚痰阻型(COPD)动物模型提供实验依据。方法:96只小鼠随机分为正常组、博来霉素组、脂多糖组,每组32只。博来霉素组、脂多糖组小鼠采用滴鼻一次诱导分别给予浓度为 $3.75\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的博来霉素 $40\mu\text{L}$ 、 $5\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的脂多糖 $40\mu\text{L}$ 建立慢性阻塞性肺疾病动物模型。各组小鼠于造模第1天、7天、14天、28天观察记录小鼠整体状态、活动情况,并在采集四肢皮肤颜色、舌底颜色、尾巴颜色等中医体征后处死动物,每个时间点处死8只,取出肺组织,检测肺组织匀浆液中谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)含量。结果:与正常组比较,博来霉素组小鼠双目略显呆滞,毛发干枯无光泽,被毛蓬松直立,耳廓及四爪颜色紫暗,精神倦怠,不喜活动,偶见出现咳嗽、气喘、气急等;在7天、14天、28天时肺组织GSH含量明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);1天、7天、14天、28天时MDA、SOD、T-AOC含量明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与正常组比较,脂多糖组小鼠双目略显呆滞,被毛柔顺稍有光泽,耳廓及四爪颜色淡红,精神倦怠,部分小鼠有扎堆现象;1天、7天时肺组织GSH、SOD含量明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),1天、7天、14天时MDA、T-AOC含量明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:博来霉素组小鼠肺组织在第7天开始出现明显氧化抗氧化的失衡,随后有所减缓,氧化失衡持续持续至造模结束。脂多糖组小鼠肺组织在第1天开始出现明显的氧化抗氧化的失衡,随着时间的推移,氧化/抗氧化失衡得到调整至正常。

关键词:氧化 抗氧化 脂多糖 博来霉素

doi: 10.11842/wst.2014.01.017 中图分类号:R285.5 文献标识码:A

慢性阻塞性肺疾病(Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD)是常见呼吸系统疾病,多属于中医学的“肺胀”、“喘病”、“咳嗽”等病证范畴,以气道不完全可逆性气流受限为特征,与肺对有害气体或有毒颗粒的异常炎症反应有关,同时伴有气道高反应性。氧化应激是由于氧化剂增多或抗氧化剂减少导致的氧化/抗氧化失衡状态,氧化应激损伤被认为是COPD主要发病机制之一。脂多糖为常用的

COPD动物模型的诱导材料,博来霉素可引起肺的纤维化,也可作为COPD的诱导剂,本研究将对以上两种诱导剂对小鼠氧化/抗氧化状态的进行动态观察,研究结果将为采用以上两种诱导剂建立气虚痰阻型COPD小鼠模型提供实验依据。

1 实验材料

1.1 实验动物

雄性SPF级昆明种小鼠,体质量18~22g,由广西医科大学实验动物中心提供。动物许可证号:

收稿日期:2013-04-15

修回日期:2013-08-30

* 广西壮族自治区科技厅基础条件平台建设项目(KJT13003) 病证结合优化设计和系统评价肺虚痰湿-慢阻肺小鼠模型及其应用 负责人 杨柯。

** 通讯作者:邓家刚,本刊编委,博士生导师,主要研究方向:中药基础理论与中药药效筛选研究。

SCXK 桂检 2009-0002。

1.2 仪器和试剂

全波长酶标仪(BIOTEK 公司);紫外可见分光光度计(日本岛津公司);WH-986 静音混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);实验动物体征采集分析系统(广西中医药大学定制,重庆森特科技开发 2010 版);脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)(美国 Sigma 公司,批号:L2880);博来霉素(Bleomycin, BLM)(日本化药株式会社,批号:420202);丙二醛(Malondialdehyde, MDA)试剂盒,总抗氧化能力(Total Antioxidant Capacity, T-AOC)试剂盒,谷胱甘肽(L-Glutathione, GSH)试剂盒,超氧化歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)试剂盒,羟脯氨酸(Hydroxyproline, HYP)试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所。

2 实验方法

2.1 分组与处理

96 只小鼠随机分为正常组、博来霉素(BLM)组、脂多糖(LPS)组,每组 32 只。BLM 组、LPS 组小鼠采用滴鼻一次攻击分别给予浓度为 $3.75 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的博来霉素 $40 \mu\text{L}$, $5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的脂多糖 $40 \mu\text{L}$ 。各组小鼠于造模第 1 天、7 天、14 天、28 天处死动物,每个时间点处死 8 只,取材进行指标测定。

2.2 体征采集

各组小鼠于造模第 1 天、7 天、14 天、28 天观察记录整体状态、活动情况,并采用照相方式对四肢皮肤颜色、舌底颜色等中医体征进行采集。根据其颜色的变化,通过实验动物体征采集分析系统换算其灰度值,根据灰度的数值进行比较。

2.3 小鼠肺的采集及处置

用乙醚吸入性麻醉小鼠,取出肺组织。其中左下肺精密称取湿重分装于 EP 管测定肺组织中羟

脯氨酸的含量,右肺和左上肺装入离心管,迅速放入液氮罐,再存放至 -80°C 冰箱,到生化指标测试前一天在进行匀浆,制备成生化指标所需要的浓度。

2.4 指标检测

按相关试剂盒说明检测肺组织匀浆液中 GSH、MDA、SOD、T-AOC 含量。

2.5 数据统计处理

所有数据均采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 一般状态

与正常组比较,BLM 素组小鼠双目略显呆滞,被毛干枯无光泽,蓬松直立,耳廓及四爪颜色紫暗,精神倦怠,不喜活动,偶见出现咳嗽、气喘、气急等;LPS 组小鼠双目略显呆滞,形体一般,被毛柔顺稍有光泽,耳廓及四爪颜色淡红,精神倦怠,部分小鼠有扎堆现象。

3.2 舌底颜色变化

与正常组比较,BLM 组小鼠舌底颜色紫暗明显,灰度值在第 28 天明显降低($P < 0.05$),提示该组小鼠出现瘀血症状。见表 1。

3.3 肺组织中 GSH 含量

与同时间点正常组比较,7 天、14 天、28 天时 BLM 素组小鼠肺组织 GSH 含量明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),1 天、7 天时 LPS 组明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。具体见表 2。

3.4 肺组织中 MDA 含量

与同时间点正常组比较,在 1 天、7 天、14 天、28 天博来霉素组小鼠肺组织 MDA 含量明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),1 天、7 天、14 天时 LPS 组 MDA

表 1 各组小鼠第 1、7、14、28 天舌底颜色灰度比较($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

| 组别 | 1 天 | 7 天 | 14 天 | 28 天 |
|-------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| 正常组 | 61.641±12.505 | 49.608±11.987 | 43.562±12.397 | 36.894±14.899 |
| 博来霉素组 | 63.994±9.658 | 46.080±13.598 | 48.932±13.752 | 21.930±15.936* |
| 脂多糖组 | 64.480±14.150 | 50.950±15.901 | 42.163±14.580 | 30.075±18.230 |

注:与同时间点正常组比较, $P < 0.05$ 。

含量明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。具体见表 3。

3.5 肺组织中 SOD 含量

与同时间点正常组比较,1 天、7 天、14 天、28 天时 BLM 组小鼠肺组织 SOD 含量明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),1 天、7 天时 LPS 组 SOD 含量明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。具体见表 4。

3.6 肺组织中 T-AOC 含量

与同时间点正常组比较,1 天、7 天、14 天、28

天时 BLM 组小鼠肺组织 T-AOC 含量明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),1 天、7 天、14 天时 LPS 组 T-AOC 含量明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。具体见表 5。

4 讨论

COPD 的发病机制尚未完全明了,氧化/抗氧化失衡所引起的氧化应激损伤被认为是 COPD 主要发病机制之一。氧化应激(Oxidative Stress)是指由于氧

表 2 各组小鼠肺组织 GSH 含量的比较($\bar{x}\pm s$ $n=8$ $\mu\text{g}\cdot\text{gprot}^{-1}$)

| 组别 | 1 天 | 7 天 | 14 天 | 28 天 |
|-------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| 正常组 | 4.022±0.892 | 4.374±1.942 | 4.390±1.421 | 4.263±1.382 |
| 博来霉素组 | 3.241±1.001 | 1.033±0.858** | 2.687±1.089* | 2.863±0.802* |
| 脂多糖组 | 2.471±0.873** | 2.647±0.915* | 3.235±0.960 | 3.519±0.823 |

注:与同时间点正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

表 3 各组小鼠肺组织 MDA 含量的比较($\bar{x}\pm s$ $n=8$ $\mu\text{mol}\cdot\text{mgprot}^{-1}$)

| 组别 | 1 天 | 7 天 | 14 天 | 28 天 |
|-------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| 正常组 | 0.998±0.334 | 1.032±0.238 | 1.123±0.404 | 1.097±0.106 |
| 博来霉素组 | 1.322±0.268* | 1.479±0.254** | 1.694±0.129* | 1.271±0.182* |
| 脂多糖组 | 1.509±0.225** | 1.331±0.250* | 1.532±0.356* | 1.219±0.130 |

注:与同时间点正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

表 4 各组小鼠肺组织 SOD 含量的比较($\bar{x}\pm s$ $n=8$ $\mu\cdot\text{mgprot}^{-1}$)

| 组别 | 1 天 | 7 天 | 14 天 | 28 天 |
|-------|----------------|----------------|---------------|---------------|
| 正常组 | 35.899±6.609 | 39.326±7.311 | 40.55±5.551 | 39.139±6.843 |
| 博来霉素组 | 28.955±6.541* | 27.527±5.868** | 33.973±5.206* | 31.908±4.752* |
| 脂多糖组 | 26.852±4.603** | 31.709±6.412* | 35.981±5.229 | 36.448±6.081 |

注:与同时间点正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

表 5 各组小鼠肺组织 T-AOC 含量的比较($\bar{x}\pm s$ $n=8$ $\mu\cdot\text{mgprot}^{-1}$)

| 组别 | 1 天 | 7 天 | 14 天 | 28 天 |
|-------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| 正常组 | 0.126±0.019 | 0.123±0.023 | 0.125±0.047 | 0.125±0.023 |
| 博来霉素组 | 0.096±0.032* | 0.074±0.040** | 0.070±0.052* | 0.086±0.038* |
| 脂多糖组 | 0.070±0.039** | 0.087±0.025* | 0.082±0.021* | 0.094±0.036 |

注:与同时间点正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

化剂增多或抗氧化剂减少导致的氧化/抗氧化失衡状态。GSH 是肺内重要的抗氧化剂,在氧化剂介导的肺部炎症和肺损伤中起着非常重要的防御作用。GSH 是一种重要的非蛋白硫醇,是体内重要的氧化还原缓冲系统,与多种抗氧化酶以及抗氧化剂组成机体的抗氧化网络^[1],维持蛋白的巯基水平,从而维持机体的氧化-抗氧化平衡。GSH 是细胞内抗氧化防御系统的最主要成分^[2],可以直接清除活性氧,同时还是肺内 2 个主要抗氧化酶 GPx 和 GST 的底物,作用在于清除和修复氧化剂损伤。现常将 GSH 作为评价氧化反应的一个指标^[3,4]。

SOD 是体内催化超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)为过氧化氢的关键酶,SOD 有较强的抗氧化作用,能清除氧自由基以及过氧化氢等。SOD(超氧化物歧化酶)超氧化物歧化酶能催化各种自由基或氧化物转化为过氧化氢(H_2O_2)。SODs 存在于所有的呼吸道细胞内,在正常细胞中可以促进氧化物的消耗,维持细胞的稳态,且能延缓各种氧化应激相关疾病的发展。SOD 是生物体内抗氧化系统第一防线^[5],其活性增加可以阻止氧自由基的连锁反应,清除氧自由基及保护细胞免受损害,所以是反映机体清除自由基的能力。在肺组织中,EC-SOD 表达增加可以延缓慢性缺氧所致肺血管重构^[6]。大量研究显示 COPD 患者血浆及肺组织中的 SOD 活力明显下降^[7,8],可能是体内产生大量的自由基中消耗了大量的 SOD 及活性氧对 SOD 结构的破坏致 SOD 活性下降、丧失^[9]。MDA(Malondialdehyde,MDA)是氧化过程中最终产物之一,是脂质过氧化产物,它能使蛋白质、核酸和脂类发生交联,使生物膜变性,细胞衰老死亡。其增加可能与危险因素活化中性粒细胞,产生活性氧自由基增多有关。研究结果表明 COPD 患者的急性发作和缓解期,患者血中的 MDA 浓度均增高,病情重且病程长的 COPD 患者血清中的 MDA 浓度明显升高^[10]。丙二醛是细胞膜脂质受到活性氧物质损伤后的产物,可作为氧化应激的标志物^[11,12]。Stanojkovic I 等^[13]研究证实 COPD 患者血浆 MDA 水平高于非 COPD 患者。体内 MDA 产生的多少与氧自由基的生成平行,通过测定 MDA 可反映脂质过氧化水平,间接反映细胞受损坏的程度。

总抗氧化能力的高低直接反映体内抗氧化剂的多寡。Ahmed 等^[14]研究报道,与正常对照相比,COPD 血浆总抗氧化能力明显降低。

本研究中博来霉素组小鼠出现耳廓及四爪颜色紫暗,精神倦怠,不喜活动,偶见出现咳嗽、气喘、气急等气虚痰阻血瘀证的中医临床表现。脂多糖组小鼠也有气虚表现,但痰阻和血瘀表现不明显。博来霉素组小鼠 GSH 在第 7 天时下降明显,其次第 14 天和 28 天均下降;MDA 整个造模过程都出现升高,其中第 7 天升高最明显;SOD、T-AOC 整个造模过程都出现降低,其中第 7 天降低最明显,说明博来霉素组在整个造模过程小鼠肺均呈现出氧化和抗氧化的失衡,其中第 7 天最为明显。脂多糖组小鼠 GSH 在第 1 天时下降明显,其次 7 天下降,第 14、28 天有下降的趋势;MDA 第 1 天升高最明显,其次是第 7 天和第 14 天,第 28 天有升高的趋势;SOD、T-AOC 第 1 天降低最明显,其次是第 14 天,第 14、28 天有升高的趋势,说明脂多糖组在造模早期小鼠肺均呈现出氧化和抗氧化的失衡,其中第 7 天最为明显。

本研究提示用博来霉素做为诱导剂,在第 7 天开始小鼠肺组织出现明显氧化抗氧化的失衡,随后有所减缓,氧化失衡持续持续至造模结束。用脂多糖做为诱导剂,在第 1 天开始小鼠肺组织出现明显的氧化抗氧化的失衡,随着时间的推移,氧化/抗氧化失衡得到调整至正常。研究结果为采用以上两种诱导剂建立气虚痰阻血瘀型 COPD 动物模型提供实验依据,两种诱导剂联合应用干预小鼠氧化/抗氧化状态有待进一步研究。

参考文献

- 1 Termini J. Hydroperoxide-induced DNA damage and mutations. *Mutat Res*, 2000, 450(1):107~124.
- 2 邹朝霞,何志义,冉丕鑫.吸烟对大鼠肺内谷胱甘肽与 γ -GCS 的影响及乙酰半胱氨酸的干预作用. *中国病理生理杂志*,2007,23(1):86~89.
- 3 孙雯雯,李燕芹,刘斌,等.慢性阻塞性肺疾病患者的细胞免疫及细胞因子水平变化. *中国老年学杂志*,2010,30(15):2124~2126.
- 4 闫莉,平芬,韩小雯.舒血宁对慢性阻塞性肺病急性加重期患者氧化/抗氧化失衡的影响. *中国现代医学杂志*,2007,17(12):1499~1451.
- 5 胡一航,牛健康.超氧化物研究进展. *生物学教学*,2005,30(1):2~4.
- 6 Nozik-Grayek E, Suliman H B, Majka S, et al. Lung EC-SOD overexpression attenuates hypoxic induction of Egr-1 and chronic hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295(3):422~430.
- 7 孙莹,孙文青,李琦.富露施对慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者氧化应激及肺功能的影响. *山东医药*,2008,48(20):68~69.
- 8 刘小虹,梁直英,林文芳,等.慢性阻塞性肺疾病证治规律探讨. *新中医*,1994,26(9):21.

- 9 王慧,卢文菊,陈柏铭.慢性阻塞性肺病患者红细胞内超氧化物歧化酶的测定及其临床意义.现代临床医学生物工程杂志,2003,9(1):50.
- 10 Kluchová Z, Petrášová D, Joppa P, *et al.* The association between oxidative stress and obstructive lung impairment in Patients with COPD. *Physiol Res*, 2007, 56(1):51~56.
- 11 Rangasamy T, Misra V, Zhen L, *et al.* Cigarette smoke-induced emphysema in A/J mice is associated with pulmonary oxidative stress, apoptosis of lung cells, and global alterations in gene expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 296(6):888~900.
- 12 Sussan T E, Rangasamy T, Blake D J, *et al.* Targeting Nrf2 with the triterpenoid CDDO-imidazole attenuates cigarette smoke-induced emphysema and cardiac dysfunction in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(1):250~255.
- 13 Marzec J M, Christie J D, Reddy S P, *et al.* Functional polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury. *FASEB J*, 2007, 21(9):2237~2246.
- 14 Nadeem A, Guru Raj H, Chhabra S K. Increased Oxidative Stress and Altered Levels of Antioxidants in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Inflammation*, 2005, 29(1):23~32.

Experimental Observation of Lung Oxidative Stress Injury in Mice Model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Induced by Different Inducers

Qin Wenhui^{1,2}, Yang Ke², Deng Jiagang², Zhang Shuai², Huang Sishi²

(1. College of Graduate, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China;

2. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

Abstract: This study was aimed to observe the intervention effect of oxidation/antioxidation at different time point among mice induced by lipopolysaccharide (LPS) and bleomycin. It provided experimental basis for the establishment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) animal model with *qi*-deficiency and phlegm-obstructing pattern with inducers mentioned above. A total of 96 mice were randomly divided into the normal control group, bleomycin group, and LPS group, with 32 mice in each group. In the bleomycin group and LPS group, 40 μ L of nasal drops were given with bleomycin at the concentration of 3.75 μ g/ μ L or LPS at the concentration of 5 μ g/ μ L, respectively to establish the COPD animal model with *qi*-deficiency and phlegm-obstructing pattern. On the 1st day, 7th day, 14th day and 28th day after the model establishment, the general status and activities of mice were recorded. And traditional Chinese medicine (TCM) signs such as skin color of the four limbs, skin color under the tongue and color of the tail were also collected when the animal model was sacrificed. At each time point, 8 mice were sacrificed. The lung tissues were removed. And the contents of GSH, MDA, SOD and T-AOC were detected in the homogenate of lung tissues. The results showed that compared with the normal control group, mice in the bleomycin group had slightly dull eyes, dry hair without burnish, upright and fluffy hair, dark purple skin color of the auricle and four claws, tiredness, inactivity, occasional cough, asthma or rapid breathing. The GSH content of lung tissues on the 7th day, 14th day and 28th day was obviously reduced ($P < 0.05$, or $P < 0.01$). The MDA, SOD and T-AOC contents on the 1st day, 7th day, 14th day and 28th day were obviously reduced ($P < 0.05$, or $P < 0.01$). Compared with the normal control group, mice in the LPS group had slightly dull eyes, soft hair with slight burnish, pale red skin color of the auricle and four claws, tiredness; some mice preferred to gather. Contents of GSH and SOD in lung tissues on the 1st day and 7th day were obviously reduced ($P < 0.05$, or $P < 0.01$). Contents of MDA and T-AOC on the 1st day, 7th day and 14th day were obviously reduced ($P < 0.05$, or $P < 0.01$). It was concluded that obvious oxidation/antioxidation imbalance started on the 7th day in lung tissues of mice in the bleomycin group. It reduced later on. And the oxidation/antioxidation imbalance continued until the end of the model establishment. Obvious oxidation/antioxidation imbalance started on the 1st day in lung tissues of mice in the LPS group. However, this oxidation/antioxidation imbalance was adjusted back to normal level through time.

Keywords: Oxidation, antioxidation, lipopolysaccharide, bleomycin

(责任编辑 张丰丰 张志华,责任译审 王 晶)