

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.03.003

文章编号: 1005-8982(2020)03-0012-04

小窝蛋白-1在白藜芦醇治疗小鼠 急性肺损伤中的作用研究*

董雷¹, 蔡宛如¹, 马春芳²

[1. 浙江中医药大学附属第二医院(浙江省新华医院), 浙江 杭州 310005;
2. 浙江省人民医院, 浙江 杭州 310014]

摘要: **目的** 研究小窝蛋白-1(Cav-1)在急性肺损伤(ALI)中的作用以及白藜芦醇抗炎的可能分子机制。**方法** 将50只BALB/c小鼠随机分为正常组、ALI组、ALI+白藜芦醇干预组、Cav-1过表达的ALI组、Cav-1过表达的ALI+白藜芦醇干预组,每组10只。采用脂多糖(LPS)气管滴注复制小鼠ALI模型,尾静脉注射GV287-Cav-1过表达载体复制Cav-1过表达小鼠,白藜芦醇腹腔给药干预小鼠ALI模型。模型复制成功后取肺组织观察病理组织学变化,采用免疫组织化学和Western blotting检测Cav-1在肺组织中的表达,提取小鼠血清检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)。**结果** 过表达Cav-1能促进ALI小鼠释放更多的TNF- α 、IL-6($P < 0.05$),白藜芦醇能降低Cav-1蛋白的表达水平,改善ALI,抑制TNF- α 、IL-6的释放($P < 0.05$),减轻肺组织炎症损伤。**结论** 白藜芦醇可能通过抑制Cav-1的表达起到对小鼠ALI的治疗作用。

关键词: 急性肺损伤;白藜芦醇;小窝蛋白-1;脂多糖

中图分类号: R563

文献标识码: A

Resveratrol participates in the protective effect of acute lung injury in mice through caveolin-1*

Lei Dong¹, Wan-ru Cai¹, Chun-fang Ma²

(1. The Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou, Zhejiang 310005, China; 2. Zhejiang Provincial Peoples Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310014, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of caveolin-1 (Cav-1) in acute lung injury and the anti-inflammatory effect of resveratrol in molecular mechanism. **Methods** Fifty BALB/c mice were randomly divided into five groups, the normal group ($n = 10$), ALI group ($n = 10$), resveratrol interference group ($n = 10$), ALI group with over-expression of Cav-1 ($n = 10$), and ALI with over-expression of Cav-1+resveratrol interference group ($n = 10$). ALI mice model was treated with tracheal instillation by lipopolysaccharides (LPS). Overexpression of Cav-1 was established by intravenous injection of GV287-Cav-1 over expression vector through tail vein, and ALI mice models were intervened by intraperitoneal administration of resveratrol. After the model was established, the lung tissue was taken for pathological examination, then immunohistochemistry and Western blotting were taken to detected the expression of Cav-1 in lung tissue, and the mouse serum were taken to test the inflammatory factors TNF- α and IL-6. **Results** Overexpression of Cav-1 could promote the release of TNF- α and IL-6 in ALI mice ($P < 0.05$). Resveratrol could significantly alleviate the acute lung injury through reducing the expression of Cav-

收稿日期: 2019-08-12

* 基金项目: 浙江省公益技术应用研究计划项目(No: 2016C37125), 浙江省中医药管理局科研项目(No: 2017ZA061)

[通信作者] 马春芳, Tel: zjusoso@aliyun.com

1 protein which could inhibit the release of inflammatory factors TNF- α and IL-6 ($P < 0.05$), and alleviate the inflammatory injury of lung tissue. **Conclusion** Resveratrol participates in the protective effect of acute lung injury in mice through Cav-1 protein.

Keywords: acute lung injury; resveratrol; caveolin 1; lipopolysaccharides

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是呼吸系统危重疾病。ALI 早期受损伤最明显的结构是肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞, 这些细胞损伤导致肺泡钠水转运失调, 引起肺水肿及炎症细胞聚集。近年来的研究表明, 小窝蛋白 (Caveolin, Cav) 在肺泡上皮细胞屏障功能变化中扮演重要作用。本研究探讨小窝蛋白-1 (Cav-1) 在 ALI 小鼠中的变化情况以及白藜芦醇作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

实验用雌性 BALB/c 小鼠购于浙江中医药大学动物实验中心, 体重 (18 \pm 2) g。脂多糖 (LPS) 购自美国 Sigma 公司, 型号为 E.coli. O55:B5, Sigma L-2880。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 异氟烷购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司, Cav-1 单抗购自 CST 美国公司。白藜芦醇购自杭州沃森生物科技有限公司, 过表达 Cav-1 基因的重组慢病毒为前期实验制备, 且已在 293T 细胞中验证为过表达 Cav-1。

1.2 动物分组及模型复制

BALB/c 小鼠共 50 只, 随机分为正常组、ALI 组、ALI+ 白藜芦醇干预组、Cav-1 过表达的 ALI 组、Cav-1 过表达的 ALI+ 白藜芦醇干预组, 每组 10 只。ALI 组采用小鼠雾化吸入异氟烷, 麻醉后使用 5 mg/kg LPS 进行气管滴注, 正常组使用生理盐水气管滴注。白藜芦醇干预组采用羟丙基 β -环糊精包合后以生理盐水溶解, 在模型复制前 4 天早晚使用 30 mg/kg 剂量腹腔给药。Cav-1 过表达的 ALI 组在小鼠模型复制前 1 个月使用尾静脉注射 GV287-Cav-1 过表达载体 5×10^8 pfu/鼠, 再使用 5 mg/kg LPS 进行气管滴注模型复制。Cav-1 过表达的 ALI+ 白藜芦醇干预组在模型复制前 1 个月尾静脉注射 GV287-Cav-1 过表达载体 5×10^8 pfu/鼠, 模型复制前 4 天早晚用 30 mg/kg 的白藜芦醇腹腔注射, 再使用 5 mg/kg LPS 进行气管滴注模型复制。本研究经医院动物伦理委员会批准, 并严格遵守伦理原则。

1.3 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测血清 TNF- α 、IL-6 水平

模型复制后 24 h 采用摘眼球处死法留取小鼠血清, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上层血清。参照试剂盒说明书操作检测血清 TNF- α 、IL-6 水平。

1.4 免疫组织化学染色观察 Cav-1 小鼠在肺组织中的表达和分布

模型复制后 24 h 处死小鼠, 取肺脏组织用于免疫组织化学检测肺脏 Cav-1。肺组织标本石蜡切片、脱蜡至水、阻断内源性过氧化物酶、抗原修复、加抗体后二氨基联苯胺法 (DAB) 显色。观察肺组织标本中弥漫性肺间质及肺泡水肿、肺泡上皮及肺组织内血管内皮细胞损伤等 ALI 特征性病理改变, 观察 Cav-1 小鼠在肺组织中的表达和分布情况。

1.5 Western blotting 检测 Cav-1 在肺组织中的表达

冰浴条件下取肺组织 200 mg 通过细胞裂解液裂解, 13 000 r/min 低温离心 5 min 后取上清液, 采用 BCA 法检测蛋白含量, 取 50 μ g 上样量用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离, 400 mA 1.5 h 转至聚偏二氟乙烯膜 (PVDF), 用 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭 2 h, Cav-1 抗体 (1 : 1 000)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (1 : 1 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日 TBST (Tris-HCl 缓冲盐溶液 + 吐温) 洗涤后, 用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗 (1 : 1 000) 孵育 2 h 后电化学发光 (ECL) 法显影。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

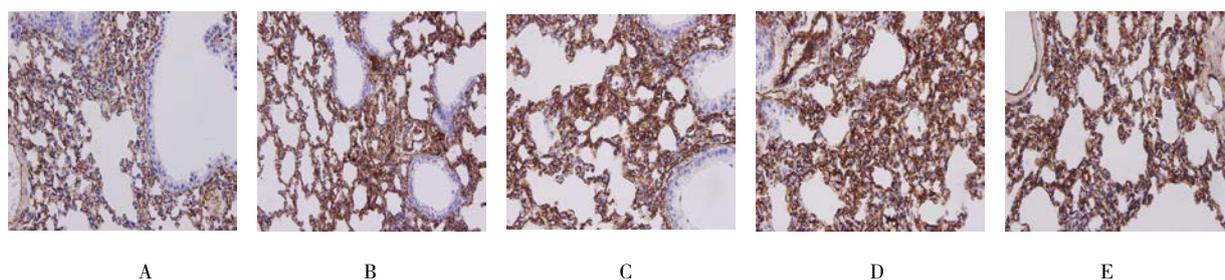
2.1 各组小鼠 Cav-1 的表达

各组小鼠 Cav-1 的表达水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 13.227$, $P = 0.023$)。与正常组小鼠 Cav-1 表达水平 (0.086 \pm 0.017) 比较, ALI 组小鼠 Cav-1 表达水平 (0.214 \pm 0.018) 升高 ($P < 0.05$),

ALI+ 白藜芦醇干预组小鼠的 Cav-1 表达水平 (0.180 ± 0.022) 较 ALI 组降低 ($P < 0.05$)。Cav-1 过表达的 ALI 组中的 Cav-1 表达水平 (0.399 ± 0.039) 比 ALI 组和 ALI+ 白藜芦醇干预组升高, 而 Cav-1 过表达的 ALI+ 白藜芦醇干预组的 Cav-1 表达水平 (0.264 ± 0.034) 较 Cav-1 过表达的 ALI 组降低 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 过表达 Cav-1 对小鼠肺组织病理的影响及白藜芦醇的抑制作用

正常组小鼠肺组织结构正常, Cav-1 定位在平滑肌细胞、肺泡细胞和血管内皮细胞的细胞膜; ALI 组小鼠肺部出现水肿, 肺泡间隔增宽, 形态破坏, Cav-1 的表达强于正常组 ($P < 0.05$); 而经白藜芦醇处理后的 ALI+ 白藜芦醇干预组小鼠肺水肿较 ALI 组小鼠减轻, 肺泡形态较 ALI 组小鼠有所好转, Cav-1 表达较 ALI 组有所降低 ($P < 0.05$); Cav-1 过表达的 ALI 组小鼠肺水肿更加明显, Cav-1 表达呈强阳性; Cav-1 过表达的 ALI+ 白藜芦醇干预组小鼠中 Cav-1 表达则较 Cav-1 过表达的 ALI 组降低。见图 2。



A: 正常组; B: ALI 组; C: ALI+ 白藜芦醇干预组; D: Cav-1 过表达的 ALI 组; E: Cav-1 过表达的 ALI+ 白藜芦醇干预组。

图 2 各组小鼠肺组织病理及 Cav-1 定位 ($\times 400$)

表 1 各组小鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 表达比较

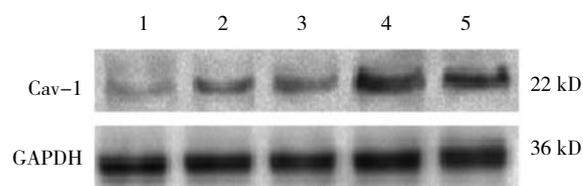
($n=10$, pg/ml)

组别	TNF- α	IL-6
正常组	260.29 ± 48.32	51.36 ± 17.23
ALI 组	680.32 ± 79.34 ^①	557.21 ± 69.73 ^①
ALI+ 白藜芦醇组	445.79 ± 53.67 ^②	417.45 ± 52.91 ^②
Cav-1 过表达的 ALI 组	$1\ 276.44 \pm 153.43$ ^②	947.75 ± 101.47 ^②
Cav-1 过表达的 ALI 组 + 白藜芦醇组	$1\ 003.95 \pm 113.74$ ^③	748.21 ± 95.55 ^③
F 值	25.434	33.168
P 值	0.021	0.016

注: ①与正常组比较, $P < 0.05$; ②与 ALI 组比较, $P < 0.05$; ③与 Cav-1 过表达的 ALI 组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 过表达 Cav-1 对 TNF- α 、IL-6 的影响以及白藜芦醇的作用

各组小鼠血清 TNF- α 、IL-6 表达比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与正常组比较, ALI 组小鼠血清 TNF- α 、IL-6 表达升高 ($P < 0.05$); 而 ALI+ 白藜芦醇组小鼠血清 TNF- α 、IL-6 表达则较 ALI 组降低 ($P < 0.05$)。同时 Cav-1 过表达的 ALI 组小鼠血清 TNF- α 、IL-6 表达较 ALI 组升高 ($P < 0.05$); 而 Cav-1 过表达的 ALI 组 + 白藜芦醇组小鼠血清 TNF- α 、IL-6 的浓度比 Cav-1 过表达的 ALI 组降低 ($P < 0.05$)。见表 1。



1: 正常组; 2: ALI 组; 3: ALI+ 白藜芦醇干预组; 4: Cav-1 过表达的 ALI 组; 5: Cav-1 过表达的 ALI+ 白藜芦醇干预组。

图 1 各组小鼠肺组织中 Cav-1 的表达

3 讨论

ALI 是临床常见危重症, 通常由感染、创伤、休克等因素诱发。疾病早期是以弥漫性肺泡损伤、肺泡上皮细胞屏障功能破坏受损, 激活肺内多种炎症细胞, 启动细胞内信号传导系统, 引起炎症因子的级联反应, 导致失控性炎症反应的发生^[1]。因此控制原发疾病和遏制炎症反应是防治 ALI 的一种有效策略和方法。

Cav-1 是一个分子量为 21 ~ 25 kD 的膜蛋白, 是膜小窝的结构性蛋白, 广泛存在于肺泡上皮细胞, 血管内皮细胞、纤维细胞的细胞膜表面。长期以来, 有关 Cav-1 的研究主要集中在肿瘤转移、物质转运、信号传导等方面, 在 ALI/ 急性呼吸窘迫综合征发病中的研究较为少见。有研究显示, Cav-1 参与丝裂原活化

蛋白激酶 (MAPKs)、细胞外调节蛋白激酶 (ERK)、核转录因子- κ B (NF- κ B) 等信号转导通路的磷酸化^[2-3], 而该信号通路影响着 ALI 发病过程中炎症反应的瀑布效应, 因此, 笔者推测 Cav-1 在 ALI 发病机制的炎症反应中起重要作用。研究发现^[4], 和 LPS 诱导的 ALI 野生型小鼠比较, Cav-1 基因敲除小鼠可通过内皮型一氧化氮合成酶 (eNOs) 途径抑制 NF- κ B 的活性, 减少炎症细胞因子的合成与分泌。然而另有学者发现, 在巨噬细胞中 Cav-1 能与 Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) 相互作用并经血红素氧化酶-1 途径抑制 TLR4 相关信号传导而减轻 ALI 病变程度^[5-6]。该研究发现, 高表达的 Cav-1 能在 LPS 的诱导下分泌更多的炎症因子, 加重肺部炎症损伤。

目前, 随着炎症机制深入研究, 中药及其有效成分的抗炎效果引起越来越多研究者的注意, 其安全可靠、物美价廉, 成为继甾体类抗炎药和肾上腺皮质激素类抗炎药后又一类广泛应用的抗炎中药^[7]。白藜芦醇, 一种多酚类化合物, 存在于多种中药如虎杖、藜芦中, 目前已证实具有清除自由基、抗肿瘤、抗氧化、抗炎、调节免疫等作用^[8]。有研究表明, 白藜芦醇能降低细胞中 TLR4 的表达和抑制 PI3K 和 NF- κ B 的磷酸化。本研究中, 白藜芦醇干预后能抑制 ALI 小鼠中 TNF- α 和 IL-6 的表达水平, 在高表达 Cav-1 的小鼠 ALI 中, 白藜芦醇同样能下调小鼠中炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的表达, 减轻肺组织炎症反应, 其机制与降低 Cav-1 的表达密切相关。为临床早期防治 ALI 提供新思路和新选择。

参 考 文 献:

- [1] FANELLI V, RANIERI V M. Mechanisms and clinical consequences of acute lung injury[J]. Annals of the American Thoracic Society, 2015, 12(s): 3-8.
- [2] WANG X X, WU Z, HUANG H F, et al. Caveolin-1, through its ability to negatively regulate TLR4, is a crucial determinant of MAPK activation in LPS-challenged mammary epithelial cells[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(4): 2295-2299.
- [3] DAI Y, LI F, WU L, et al. Roxithromycin treatment inhibits TGF-beta1 induced activation of ERK and AKT and down regulation of caveolin-1 in rat airway smooth muscle cells[J]. Respir Res, 2014(15): 96.
- [4] CAI L, YI F, DAI Z, et al. Loss of caveolin-1 and adiponectin induces severe inflammatory lung injury following LPS challenge through excessive oxidative/nitrative stress[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014, 306(6): 566-573.
- [5] WENG P, ZHANG X T, SHENG Q, et al. Caveolin-1 scaffolding domain peptides enhance anti-inflammatory effect of heme oxygenase-1 through interrupting its interact with caveolin-1[J]. Oncotarget, 2017, 8(25): 40104-40114.
- [6] TSAI T H, TAM K, CHEN S F, et al. Deletion of caveolin-1 attenuates LPS/GalN-induced acute liver injury in mice[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(11): 5573-5582.
- [7] 王洁. 中药有效成分抗炎机制研究进展[C]. 中华中医药学会 2014 年医院药学会分会学术年会世界中联中药专业委员会 2014 年国际学术会议暨北京药师协会慢病防治药专业委员会成立, 2014: 北京. 2014: 3.
- [8] 孙治刚, 李志娜, 李敏. 白藜芦醇的药理作用研究进展[J]. 淮海工学院学报(自然科学版), 2017, 26(2): 40-43.

(王荣兵 编辑)

本文引用格式: 董雷, 蔡宛如, 马春芳. 小窝蛋白-1 在白藜芦醇治疗小鼠急性肺损伤中的作用研究[J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(3): 12-15.