

[文章编号] 1671-587X(2024)02-0295-08

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240201

川陈皮素对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠气道黏液高分泌的抑制作用及其分子机制

陈家亮^{1,2}, 李琪^{1,2}, 周向东^{1,2}, 陈小妹³, 刘峰^{1,2}, 刘畅^{1,2}, 钟有清^{1,2}, 李亮^{1,2}

(1. 海南医学院第一附属医院呼吸内科, 海南 海口 570100; 2. 海南省呼吸疾病中心, 海南 海口 570100; 3. 海南医学院第一附属医院健康管理中心, 海南 海口 570100)

[摘要] **目的:** 探讨川陈皮素 (NOB) 对慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 大鼠气道黏液高分泌的影响, 阐明其对内质网应激 (ERS) 信号通路调控的分子机制。**方法:** 按随机数字表法将45只SD大鼠随机分为对照组、模型组、NOB组、ERS抑制剂4-苯基丁酸 (4-PBA) 组和NOB+4-PBA组, 每组9只。除对照组外, 其他各组大鼠均采用烟熏联合气道内注入脂多糖 (LPS) 建立COPD大鼠模型, 建模成功后给予相应药物 ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Nob或 $0.35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 4-PBA) 干预, 每天1次, 连续干预4周。完成药物干预后, 采用小动物呼吸机和血气分析仪检测各组大鼠肺功能指标 [肺动态顺应性 (Cdyn) 和 气道阻力 (RL)] 和 动脉血气指标 [血二氧化碳分压 (PaCO_2) 和 动脉血氧分压 (PaO_2)] ; 苏木精-伊红 (HE) 染色法观察各组大鼠肺组织杯状细胞增生情况; 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法检测各组大鼠肺泡灌洗液 (BALF) 中气道杯状细胞内黏蛋白5AC (MUC5AC)、白细胞介素1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白细胞介素6 (IL-6) 水平; 实时荧光定量PCR (RT-qPCR) 法检测各组大鼠肺组织中MUC5AC mRNA表达水平; Western blotting法检测各组大鼠肺组织MUC5AC和ERS相关蛋白肌醇依赖酶1 α (IRE1 α)、转录激活因子6 (ATF6)、C/EBP环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白 (CHOP) 及葡萄糖调节蛋白78 (GRP78) 表达水平。**结果:** 与对照组比较, 模型组大鼠肺气道杯状细胞大量增生, Cdyn和 PaO_2 水平明显降低 ($P < 0.05$), 而RL和 PaCO_2 水平明显升高 ($P < 0.05$), BALF中MUC5AC、IL-1 β 、TNF- α 和IL-6水平及肺组织中MUC5AC、IRE1 α 、ATF6、CHOP以及GRP78蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, NOB组、4-PBA组和NOB+4-PBA组大鼠肺功能、动脉血气指标以及肺气道杯状细胞增殖情况均有明显缓解, 且BALF中IL-1 β 、TNF- α 和IL-6水平及肺组织中MUC5AC、IRE1 α 、ATF6、CHOP以及GRP78蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$), 而NOB+4-PBA组大鼠的缓解效果最佳。**结论:** NOB能有效缓解COPD大鼠肺气道黏液高分泌情况, 其作用机制可能与抑制ERS介导的MUC5AC高表达有关。

[关键词] 川陈皮素; 慢性阻塞性肺疾病; 内质网应激; 气道黏液

[中图分类号] R563.9 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2023-04-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82160012); 海南省科技厅重点研发计划国际科技合作项目 (GHYF2022011); 海南省卫健委卫生健康行业科研项目 (22A200052); 海南省科技厅自然科学基金创新团队项目 (820CXTD448)

[作者简介] 陈家亮 (1987-), 男, 海南省乐东黎族自治县人, 副主任医师, 主要从事呼吸内科方面的研究。

[通信作者] 李琪, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师 (E-mail: lqlq198210@sina.com)

Inhibitory effect of nobiletin on airway mucus hypersecretion in model rats with chronic obstructive pulmonary disease and its molecular mechanism

CHEN Jialiang^{1,2}, LI Qi^{1,2}, ZHOU Xiangdong^{1,2}, CHEN Xiaomei³, LIU Feng^{1,2}, LIU Chang^{1,2},
ZHONG Youqing^{1,2}, LI Liang^{1,2}

(1. Department of Respiratory Medicine, First Affiliated Hospital, Hainan Medical College, Haikou 570100, China; 2. Respiratory Disease Center, Hainan Province, Haikou 570100, China; 3. Health Management Center, First Affiliated Hospital, Hainan Medical College, Haikou 570100, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of nobiletin (NOB) on airway hypersecretion in the rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and to clarify the molecular mechanism of endoplasmic reticulum stress (ERS) signaling pathway regulation. **Methods:** A total of 45 SD rats were randomly divided into control group, model group, NOB group, endoplasmic reticulum stress inhibitor 4-phenylbutyric acid (4-PBA) group, and NOB+4-PBA group, and there were 9 rats in each group. Except for control group, all the rats in the other groups were exposed to smoke and intratracheally injected with lipopolysaccharide (LPS) to establish the COPD models. After successful modeling, the rats were injected with the corresponding drugs ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ NOB or $0.35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 4-PBA) once daily for 4 consecutive weeks. After the drug intervention, the pulmonary function indexes [dynamic compliance (C_{dyn}) and airway resistance (RL)] and arterial blood gas indexes [partial pressure of carbon dioxide (PaCO₂) and oxygen partial pressure (PaO₂)] of the rats in various groups were detected by small animal ventilator and blood gas analyzer. Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to observe the hyperplasia of the goblet cells in lung tissue of the rats in various groups; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the levels of mucin 5AC (MUC5AC), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-6 (IL-6) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of the rats in various groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression level of MUC5AC mRNA in lung tissue of the rats in various groups; Western blotting method was used to detect the protein expression levels of MUC5AC and ERS-related proteins inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α), activating transcription factor 6 (ATF6), CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP), and glucose-regulated protein 78 (GRP78) in lung tissue of the rats in various groups. **Results:** Compared with control group, the number of airway goblet cells of the rats in model group was increased ($P < 0.05$), the C_{dyn} and PaO₂ levels were decreased ($P < 0.05$), and the levels of RL and PaCO₂ were increased ($P < 0.05$); the levels of MUC5AC, IL-1 β , TNF- α , and IL-6 in BALF and the expression levels of MUC5AC, IRE1 α , ATF6, CHOP, and GRP78 proteins in lung tissue were increased ($P < 0.05$). Compared with model group, the lung function, arterial blood gas indexes, and proliferation of airway goblet cells of the rats in NOB group, 4-PBA group, and NOB+4-PBA group were significant improved, the levels of IL-1 β , TNF- α , and IL-6 in BALF and the expression levels of MUC5AC, IRE1 α , ATF6, CHOP, and GRP78 proteins in lung tissue were increased ($P < 0.05$); the rats in NOB+4-PBA group exhibited the best alleviation effect. **Conclusion:** NOB can effectively alleviate the airway mucus hypersecretion in the rats with COPD, and its mechanism may be related to the suppression of MUC5AC overexpression mediated by ERS.

KEYWORDS Nobiletin; Chronic obstructive pulmonary disease; Endoplasmic reticulum stress; Airway mucus

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是最常见的肺部疾病之一, 其特征是持续的不完全可逆的气流限制, 通常与呼吸道接触有毒颗粒和有害气体有关, 导致慢性炎症反应^[1]。COPD患者临床上表现为气道黏液分泌过多, 伴有胸闷、气短、疲劳加重、痰多和黏液黏稠, 如不及时治疗可能发展为气道阻塞和窒息^[2]。气道黏液高分泌是COPD疾病进展及预后的独立危险因素^[3]。研究^[4]显示: 气道黏液高分泌过程中, 气道杯状细胞内黏蛋白5AC (mucin 5 subtype AC, MUC5AC) 合成急剧上升, 出现大量需进一步折叠修饰的蛋白肽, 诱发内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS), 进而导致细胞凋亡。目前, 临床上常采用吸入性支气管扩张剂和糖皮质激素治疗COPD, 但由于气道黏液分泌过多, 吸入的药物随痰液咳出, 导致药物无法发挥疗效。因此, 寻找不良反应少和祛痰效果好的天然药物是当前研究热点之一。陈皮作为祛痰平喘常用的中药, 常被用于COPD以及其他肺部相关疾病的治疗。川陈皮素 (nobiletin, NOB) 作为陈皮中主要黄酮类化合物之一, 具有抗癌、抗炎和抗过敏等生物学活性^[5], 但NOB是否能够缓解COPD气道黏液高分泌及其分子调控机制目前仍不清楚。本研究通过烟熏联合脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导建立大鼠COPD模型, 探讨NOB对大鼠COPD疾病气道黏液高分泌的作用以及对ERS信号通路调控情况, 为中药陈皮治疗COPD提供可靠的科学依据和潜在的分子靶点。

1 材料与方 法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 45只雄性Sprague Dawley (SD) 大鼠, 7周龄, 体质量(200±20) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物生产许可证号: SCXK (京) 2021-0006; 购回后置于环境温度(18℃~26℃), 相对湿度(40%~70%)中饲养, 自由进食饮水, 适应性饲养1周。Nob和LPS购自上海源叶生物科技有限公司, ERS抑制剂4-苯基丁酸 (4-phenylbutyric acid, 4-PBA) 购自美国Sigma公司; 大鼠MUC5AC、白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素6 (interleukin-6, IL-6) 酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司, 石蜡包埋组

织RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒和荧光定量PCR试剂盒均购自爱必信(上海) 生物科技有限公司, BCA试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, 鼠抗MUC5AC、兔抗肌醇依赖酶1 α (inositol-requiring enzyme 1 α , IRE1 α) 和鼠抗C/EBP环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP) 购自美国Novus公司, 兔抗转录激活因子6 (activating transcription factor 6, ATF6)、兔抗葡萄糖调节蛋白78 (glucose-regulated protein78, GRP78)、兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗和山羊抗鼠二抗购自英国ABCAM公司。小动物呼吸机购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司, MedLab生物信号系统购自南京美易公司, 动脉血气分析仪购自德国西门子股份公司, 奥林巴斯BX53显微镜购自日本奥林巴斯公司。

1.2 COPD大鼠模型的建立及分组 将45只SD大鼠按随机数字表法随机分为对照组、模型组、NOB组、4-PBA组和NOB+4-PBA组, 每组9只。除对照组外, 其他各组大鼠均采用烟熏联合气道内注入LPS建立COPD大鼠模型^[6]。建模周期为30 d, 分别于第1和14天腹腔注射4%戊巴比妥(45 mg·kg⁻¹) 将大鼠麻醉后, 气管内注入200 μ L LPS (1 g·L⁻¹), 其他时间进行烟熏, 每日2次, 每次40 min。完成造模操作后, 每组随机选择1只大鼠进行肺部病理染色鉴定, 符合气道上皮杯状细胞增生则提示模型建立成功。造模成功次日, 对大鼠进行药物干预处理。NOB组大鼠采用50 mg·kg⁻¹·d⁻¹ NOB灌胃处理, 4-PBA组大鼠采用0.35 g·kg⁻¹·d⁻¹ 4-PBA灌胃处理, NOB+4-PBA组大鼠采用50 mg·kg⁻¹·d⁻¹ NOB和0.35 g·kg⁻¹·d⁻¹ 4-PBA灌胃处理, 而对照组和LPS组大鼠采用相应体积的0.9%氯化钠灌胃处理, 连续干预4周后进行后续检测。

1.3 各组大鼠肺功能及动脉血气分析 完成药物干预4周后, 每组取8只大鼠, 腹腔注射4%戊巴比妥进行麻醉, 行气管切开术后进行气管插管并固定。将大鼠仰卧于小动物呼吸机体描箱中, 待呼吸平静后, 外加压力迫使大鼠深呼吸, 采用MedLab生物信号系统记录大鼠气道流速、气道压力、肺泡压和潮气量, 计算跨肺压 (气道压力/肺泡压)、肺

动态顺应性(dynamic lung compliance, C_{dyn})和气道阻力(airway resistance, RL)。C_{dyn} (mL/cmH₂O) = 潮气量/跨肺压, RL (cmH₂O·L/s) = 跨肺压/气道流速。取腹主动脉血0.5 mL, 采用动脉血气分析仪进行血气分析, 记录动脉血二氧化碳分压(arterial carbon dioxide partial pressure, PaCO₂)和动脉血氧分压(partial pressure of oxygen, PaO₂)。

1.4 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色法观察各组大鼠肺组织杯状细胞增生情况 取一部分大鼠左肺组织, 置于4%多聚甲醛固定过夜后, 采用常规石蜡包埋法进行包埋, 另一部分大鼠左肺置于-80℃保存备用。将蜡块切成厚度为5 μm的石蜡切片后, 进行常规脱蜡、脱水过程, 蒸馏水冲洗2次, 加入阿辛蓝溶液染色20 min, 蒸馏水冲洗2次, 加入Schiff溶液染色20 min, 流水冲洗30 s。经乙醇梯度浓度脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固后, 置于光学显微镜下观察各组大鼠肺组织杯状细胞增生和黏液分泌情况。

1.5 ELISA法检测各组大鼠肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中MUC5AC、IL-1β、TNF-α和IL-6水平 取大鼠右肺组织, 剪开颈部皮肤, 暴露气管, 在气管下段行小T型切口, 插入直径约1 mm的钝钢针头, 手术线固定, 用注射器沿气管下端切口处注入1 mL生理盐水, 2 min后缓慢回抽, 将收集到的液体置于离心管中。将上述操作反复5次后, 收集约5 mL液体, 4℃、1 500 r·min⁻¹离心10 min, 取上清分装后, 根据ELISA试剂盒方法, 建立标准曲线, 每孔加入100 μL待测样本, 按说明书依次进行一抗、酶标抗体、底物液和终止液反应, 最后采用酶标仪于450 nm处检测各孔吸光度(A)值, 根据标准曲线计算BALF中MUC5AC、IL-1β、TNF-α和IL-6水平, 浓度单位为ng·L⁻¹。

1.6 实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)法检测各组大鼠肺组织中MUC5AC mRNA表达水平 取适量大鼠左肺组织, 采用TRIzol法提取肺组织总RNA。采用紫外分光光度计检测总RNA的浓度和纯度。根据逆转录试剂盒操作说明将提取的总RNA逆转录成cDNA, 再按RT-qPCR试剂盒操作说明进行扩增检测。扩增反应程序: 95℃、5 min, 95℃、30 s; 60℃、30 s; 72℃、50 s, 循环40次, 72℃、10 min。

由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成大鼠MUC5AC引物和内参GAPDH引物, MUC5AC上游引物5'-CCTTGAGGACACTCGGAA-3', 下游引物5'-TGGTATGTGCTGGGTTGA-3'; GAPDH上游引物5'-GACATGCCGCCTGGAGAAC-3', 下游引物5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'。通过内参基因GAPDH校正, 采用2^{-ΔΔCt}法计算各组MUC5AC mRNA相对表达水平。

1.7 Western blotting法检测各组大鼠肺组织中MUC5AC及ERS相关蛋白表达水平 取备用的大鼠左肺组织约30 mg, 剪碎后, 加入250 μL RIPA裂解液, 冰上裂解30 min, 4℃、12 000 r·min⁻¹离心10 min, 取上清, 利用BCA试剂盒检测蛋白浓度。各组取20 μg蛋白上样, 进行SDS-PAGE电泳, 约2 h。完成凝胶电泳后, 转膜至聚偏二氟乙烯膜, 浸至5%脱脂奶粉中室温封闭2 h。分别加入对应的一抗抗体MUC5AC(稀释度1/1 000)、IRE1α(稀释度1/1 000)、ATF6(稀释度1/1 000)、CHOP(稀释度1/500)、GRP78(稀释度1/1 000)和GAPDH(稀释度1/10 000), 4℃孵育过夜。TBST洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(1:10 000)和山羊抗小鼠二抗(1:10 000), 室温孵育1 h, 洗膜, ECL显影。利用Image J图像分析软件测定目的条带与内参条带的灰度值, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值, 重复8次。

1.8 统计学分析 采用SPSS 22.0统计软件进行统计学分析。各组大鼠肺功能指标C_{dyn}和RL水平, 动脉血气指标PaCO₂和PaO₂水平, BALF中MUC5AC、IL-1β、TNF-α和IL-6水平, 肺组织MUC5AC mRNA表达水平和MUC5AC、IRE1α、ATF6、CHOP及GRP78蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肺功能指标和动脉血气指标 与对照组比较, 模型组大鼠C_{dyn}和PaO₂水平明显降低($P < 0.05$), 而RL和PaCO₂水平明显升高($P < 0.05$); 与模型组比较, NOB组和4-PBA组大鼠C_{dyn}和PaO₂水平明显升高($P < 0.05$), 而RL和PaCO₂水平明显降低($P < 0.05$); 与NOB组比较,

NOB+4-PBA 组大鼠 Cdyn 和 PaO₂ 水平明显升高 ($P<0.05$), 而 RL 和 PaCO₂ 水平明显降低 ($P<0.05$)。见表 1。

2.2 各组大鼠肺组织杯状细胞增生情况 HE 染色

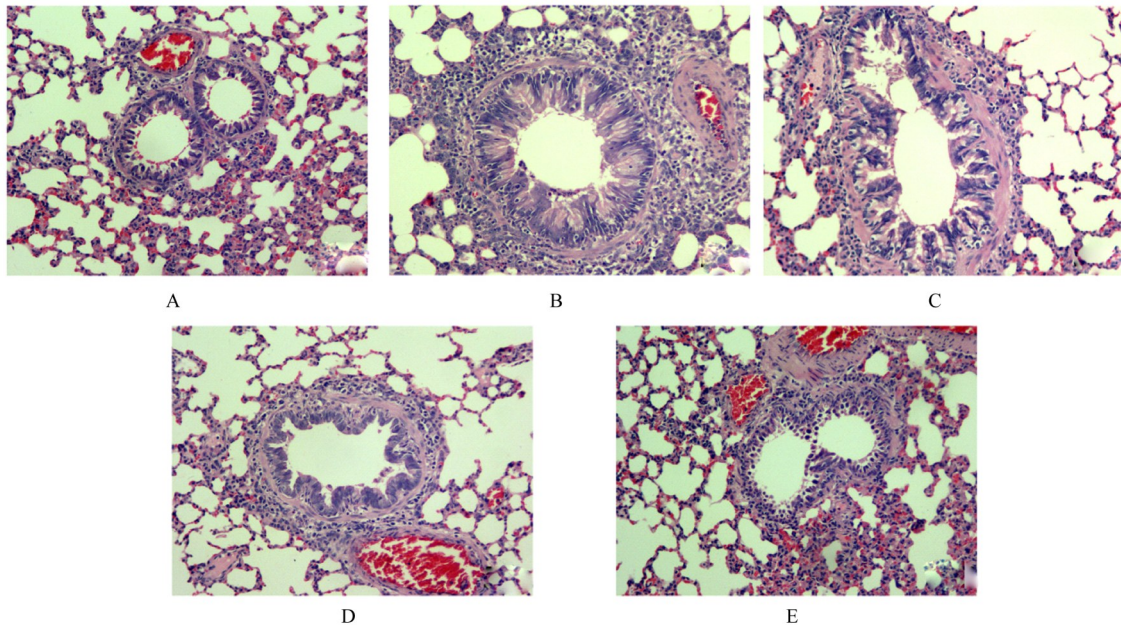
检测结果显示: 与对照组比较, 模型组大鼠肺部气道上皮杯状细胞大量增生; 与模型组比较, NOB 组、4-PBA 组和 NOB+4-PBA 组大鼠肺部气道上皮杯状细胞数量逐渐减少。见图 1。

表 1 各组大鼠 Cdyn、RL、PaCO₂ 和 PaO₂ 水平
Tab. 1 Levels of Cdyn, RL, PaCO₂, and PaO₂ of rats in various groups

($n=8, \bar{x}\pm s$)

Group	Cdyn (mL/cmH ₂ O)	RL (cmH ₂ O·L/s)	PaCO ₂ (P/mmHg)	PaO ₂ (P/mmHg)
Control	0.26±0.03	2.85±0.38	48.77±7.05	97.85±11.05
Model	0.03±0.01*	7.61±0.61*	67.28±9.54*	70.12±9.43*
NOB	0.10±0.02* [△]	5.15±0.82* [△]	60.56±6.62* [△]	80.49±7.42* [△]
4-PBA	0.18±0.03* [△]	3.96±0.55* [△]	53.94±4.45* [△]	90.11±7.37* [△]
NOB+4-PBA	0.20±0.02* [△] #	3.51±0.34* [△] #	50.82±5.57* [△] #	93.60±8.86* [△] #

* $P<0.05$ compared with control group; [△] $P<0.05$ compared with model group; # $P<0.05$ compared with NOB group.



A: Control group; B: Model group; C: NOB group; D: 4-PBA group; E: NOB+4-PBA group.

图 1 各组大鼠肺组织杯状细胞增生情况 (HE, ×200)

Fig. 1 Proliferation of goblet cells in lung tissue of rats in various groups (HE, ×200)

2.3 各组大鼠 BALF 中 MUC5AC、IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 水平

与对照组比较, 模型组大鼠 BALF 中 MUC5AC、IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 水平明显升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, NOB 组和 4-PBA 组大鼠 BALF 中 MUC5AC、IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 水平明显降低 ($P<0.05$); 与 NOB 组比较, NOB+4-PBA 组大鼠 BALF 中 MUC5AC、IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 水平明显降低 ($P<0.05$)。见表 2。

2.4 各组大鼠肺组织中 MUC5AC mRNA 表达水平

与对照组 (1.03±0.13) 比较, 模型组大鼠肺

组织中 MUC5AC mRNA 表达水平 (7.62±0.59) 明显升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, NOB 组 (5.01±0.47) 和 4-PBA 组 (3.34±0.44) 大鼠肺组织中 MUC5AC mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.05$); 与 NOB 组比较, NOB+4-PBA 组大鼠肺组织中 MUC5AC mRNA 表达水平 (3.17±0.57) 明显降低 ($P<0.05$)。

2.5 各组大鼠肺组织 MUC5AC 和 ERS 相关蛋白表达水平

与对照组比较, 模型组大鼠肺组织中 MUC5AC、IRE1 α 、ATF6、CHOP 和 GRP78 蛋白

表2 各组大鼠BALF中MUC5AC、IL-1 β 、TNF- α 和IL-6水平Tab. 2 Levels of MUC5AC, IL-1 β , TNF- α , and IL-6 in BALF of rats in various groups [$n=8, \bar{x} \pm s, \rho_B / (\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$]

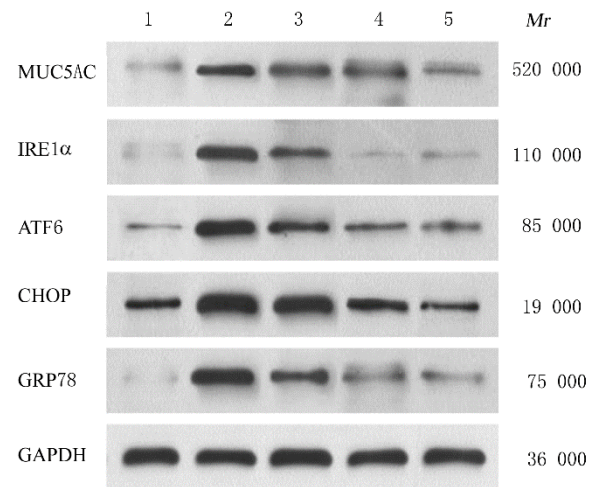
Group	MUC5AC	IL-1 β	TNF- α	IL-6
Control	351.23 \pm 30.19	181.63 \pm 35.72	52.15 \pm 8.94	4.36 \pm 0.39
Model	724.66 \pm 35.72*	584.58 \pm 29.10*	234.67 \pm 16.62*	13.81 \pm 0.58*
NOB	545.73 \pm 40.18 $^{\Delta}$	411.51 \pm 24.39 $^{\Delta}$	156.33 \pm 12.58 $^{\Delta}$	10.70 \pm 0.62 $^{\Delta}$
4-PBA	477.09 \pm 30.37 $^{\Delta}$	308.11 \pm 23.08 $^{\Delta}$	100.12 \pm 10.67 $^{\Delta}$	8.11 \pm 0.53 $^{\Delta}$
NOB+4-PBA	410.55 \pm 24.43 $^{\Delta\#}$	276.18 \pm 26.57 $^{\Delta\#}$	86.14 \pm 9.89 $^{\Delta\#}$	7.82 \pm 0.47 $^{\Delta\#}$

* $P < 0.05$ compared with control group; $^{\Delta}P < 0.05$ compared with model group; $^{\#}P < 0.05$ compared with NOB group.

表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, NOB组和4-PBA组大鼠肺组织中MUC5AC、IRE1 α 、ATF6、CHOP和GRP78蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 与NOB组比较, NOB+4-PBA组大鼠肺组织中MUC5AC、IRE1 α 、ATF6、CHOP和GRP78蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见图2和表3。

3 讨论

吸烟或颗粒物吸入可导致COPD患者出现慢性气道炎症、气道上皮损伤和黏液高分泌等病理症状。气道黏液高分泌作为COPD的一个重要临床特征, 可导致肺功能进行性下降、促炎因子高表达、气道纤毛清除功能降低, 进而引起黏液分泌过多, 加重细菌定植, 出现肺部慢性炎症^[7-9]。因此, 明确气道黏液高分泌与气道上皮细胞炎症之间的关系, 深入探讨气道黏液高分泌的分子机制, 对治疗COPD具有重要临床指导意义。LPS作为革兰阴性菌的细菌外膜成分, 常被用于诱导气道炎症相关模型。当LPS进入气道时可诱发起道炎症, 产生过量黏液^[10]。MUC5AC是气道黏液中最主要的分泌蛋白之一, 由上皮杯状细胞产生, 可作为气道杯状细胞增生的标志蛋白。本研究以SD大鼠作为研究对象, 采用烟熏联合气道内滴注LPS, 以肺组织病



Lane 1: Control group; Lane 2: Model group; Lane 3: NOB group; Lane 4: 4-PBA group; Lane 5: NOB+4-PBA group.

图2 各组大鼠肺组织中MUC5AC、IRE1 α 、ATF6、CHOP和GRP78蛋白表达电泳图

Fig. 2 Electrophoregram of expressions of MUC5AC, IRE1 α , ATF6, CHOP, and GRP78 proteins in lung tissue of rats in various groups

理学变化即出现杯状细胞增生为参数建立COPD大鼠模型。与对照组比较, 模型组大鼠气道上皮杯状细胞增生肥大, BALF炎症因子表达水平升高, 且大鼠肺组织MUC5AC mRNA和蛋白表达水平上

表3 各组大鼠肺组织中MUC5AC、IRE1 α 、ATF6、CHOP和GRP78蛋白表达水平Tab. 3 Expression levels of MUC5AC, IRE1 α , ATF6, CHOP, and GRP78 proteins in lung tissue of rats in various groups

($n=8, \bar{x} \pm s$)

Group	MUC5AC	IRE1 α	ATF6	CHOP	GRP78
Control	0.27 \pm 0.02	0.20 \pm 0.03	0.31 \pm 0.04	0.54 \pm 0.07	0.21 \pm 0.05
Model	0.89 \pm 0.05*	0.85 \pm 0.06*	0.91 \pm 0.05*	1.23 \pm 0.08*	0.90 \pm 0.06*
Nob	0.61 \pm 0.04 $^{\Delta}$	0.71 \pm 0.03 $^{\Delta}$	0.75 \pm 0.04 $^{\Delta}$	0.97 \pm 0.05 $^{\Delta}$	0.71 \pm 0.04 $^{\Delta}$
4-PBA	0.49 \pm 0.03 $^{\Delta}$	0.23 \pm 0.02 $^{\Delta}$	0.35 \pm 0.06 $^{\Delta}$	0.60 \pm 0.02 $^{\Delta}$	0.28 \pm 0.03 $^{\Delta}$
Nob+4-PBA	0.44 \pm 0.03 $^{\Delta\#}$	0.22 \pm 0.03 $^{\Delta\#}$	0.34 \pm 0.04 $^{\Delta\#}$	0.57 \pm 0.05 $^{\Delta\#}$	0.26 \pm 0.07 $^{\Delta\#}$

* $P < 0.05$ compared with control group; $^{\Delta}P < 0.05$ compared with model group; $^{\#}P < 0.05$ compared with Nob group.

调。上述结果说明烟熏联合LPS气道滴注成功诱导大鼠气道黏液高分泌,建立了COPD大鼠模型。

COPD的典型临床症状是咳嗽和咳痰^[11],且由于气道黏液高分泌,导致常规祛痰药物如氨溴索或止咳糖浆疗效不佳,因此,如何有效祛痰成为治疗COPD的关注热点。NOB作为柑橘属中常见的一种多甲氧基黄酮,具有广泛的生物活性(抗肿瘤、抗炎和抗糖尿病)^[12-14]。研究^[15]表明:淫羊藿苷联合NOB能有效改善COPD大鼠肺功能,减轻肺组织损伤,降低肺组织促炎因子表达水平。由丹皮酚、淫羊藿苷、NOB、人参总皂苷和黄芪甲苷IV组成的补肺益肾方能改善COPD大鼠肺功能和肺组织损伤,减轻气道炎症和氧化应激,有效缓解肺组织黏液高分泌,降低MUC5AC和MUC5B蛋白表达水平及杯状细胞增生^[16]。然而,NOB的具体抗炎机制尚未完全明确。本研究结果表明:NOB能显著降低烟熏和LPS诱导的大鼠气道上皮组织炎症损伤及杯状细胞增生。采用RT-qPCR法和Western blotting法进一步分析大鼠肺组织中MUC5AC mRNA及蛋白表达水平,结果显示:NOB能够明显抑制肺组织中MUC5AC的高表达。该结果提示:NOB对烟熏联合LPS诱导的COPD大鼠气道黏液高分泌具有保护作用,其机制需要更进一步探讨。

内质网在蛋白翻译、修饰和正确折叠等过程中均发挥重要作用。正常情况下,内质网内出现大量未折叠蛋白或错误的折叠蛋白积累时,可诱发ERS,启动未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR),维持内质网稳态。而在气道黏液高分泌过程中,气道杯状细胞积累大量未折叠蛋白,严重超出内质网最大折叠负荷,诱导ERS。ERS通过影响炎症和黏液痰分泌的气道反应性免疫细胞(上皮细胞、树突状细胞、嗜酸性粒细胞和中性粒细胞)参与气道平滑肌细胞及上皮细胞的分化以及增生过程,进而诱导COPD疾病气道炎症、上皮细胞增生和黏液高分泌等病理进展^[17-19]。现阶段研究^[20]明确GRP78/IRE1 α /ATF6是ERS下游重要的通路分子,其中GRP78是ERS的重要分子伴侣蛋白。在病理条件下,GRP78与ERS跨膜蛋白IRE1 α 和ATF6分离,启动ERS反应。另外,机体内一定程度的ERS可以激活细胞的适应性保护,而严重的ERS通过激活凋亡信号通路(CHOP)诱导细胞死亡^[21]。研究^[22]发现:NOB通过介导

胞内ERS通路中GRP78/IRE1 α /ATF6以及CHOP蛋白的表达,诱导人胃癌细胞SNU-16的凋亡,达到抗肿瘤疗效。NOB预处理显著下调大鼠心肌中GRP78和CHOP在内的ERS相关信号分子表达水平^[23]。为了进一步明确NOB对气道黏液高分泌的作用机制,本研究采用ERS抑制剂4-PBA作为阳性对照,对ERS通路相关蛋白进行探究,结果显示:NOB灌胃干预后COPD大鼠肺组织MUC5AC的mRNA和蛋白表达水平、GRP78/IRE1 α /ATF6蛋白表达水平均降低;给予4-PBA干预后,ERS相关通路蛋白和MUC5AC的mRNA及蛋白表达水平明显下调;提示NOB可能通过抑制ERS信号转导通路GRP78/IRE1 α /ATF6及CHOP的激活,下调MUC5AC的表达来发挥作用。

综上所述,NOB对COPD具有良好的抗炎祛痰作用,有效降低气道黏液高分泌,具有潜在的应用价值,其药效发挥的分子机制可能与调节GRP78/IRE1 α /ATF6以及CHOP信号通路有关。但NOB生物学功能多,且现阶段主要集中在抗肿瘤,发挥生物学功能涉及到的信号通路较为复杂,后续需进一步明确其相关分子机制并筛选出关键靶点分子,为精准治疗COPD气道黏液高分泌提供临床指导。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

李琪和陈家亮负责论文的整体设计,周向东、刘峰、钟有清和李亮负责实验过程,陈小妹负责论文的统计学分析,陈家亮和刘畅负责论文的撰写。

[参考文献]

- [1] ZHANG C, ZHU W, MENG Q, et al. Halotherapy relieves chronic obstructive pulmonary disease by alleviating NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis[J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(23): 1279.
- [2] TANNER L, SINGLE A B. Animal models reflecting chronic obstructive pulmonary disease and related respiratory disorders: translating pre-clinical data into clinical relevance [J]. *J Innate Immun*, 2020, 12(3): 203-225.
- [3] LIN V Y, KAZA N, BIRKET S E, et al. Excess mucus viscosity and airway dehydration impact COPD airway clearance [J]. *Eur Respir J*, 2020, 55(1): 1900419.

- [4] ZHANG L, LUO B, TING Y, et al. SIRT1 attenuates endoplasmic reticulum stress and apoptosis in rat models of COPD[J]. *Growth Factors*, 2020, 38(2): 94-104.
- [5] SP N, KANG D Y, LEE J M, et al. Mechanistic insights of anti-immune evasion by nobiletin through regulating miR-197/STAT3/PD-L1 signaling in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18): 9843.
- [6] 傅慧婷, 平 键, 吴冬梅, 等. 泽漆化痰方对慢性阻塞性肺疾病气道黏液高分泌模型大鼠肺组织EGFR信号通路相关蛋白表达的影响[J]. *中医杂志*, 2021, 62(9): 802-807.
- [7] HE M, ZHANG G, SHEN F, et al. Effects of Z-VaD-Ala-Asp-Fluoromethyl ketone (Z-VAD-FMK) and Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-Aldehyde (Ac-DEVD-CHO) on inflammation and mucus secretion in mice exposed to cigarette smoke [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2023, 18: 69-78.
- [8] LIU W, HOU H P, LI C F, et al. Effects of Shiwei Longdanhua formula on LPS induced airway mucus hypersecretion, cough hypersensitivity, oxidative stress and pulmonary inflammation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 163: 114793.
- [9] ROJAS D A, PONCE C A, BUSTOS A, et al. Pneumocystis exacerbates inflammation and mucus hypersecretion in a murine, elastase-induced-COPD model[J]. *J Fungi (Basel)*, 2023, 9(4): 452.
- [10] LEE E H, SHIN M H, GI M, et al. Inhibition of pendrin by a small molecule reduces lipopolysaccharide-induced acute lung injury[J]. *Theranostics*, 2020, 10(22): 9913-9922.
- [11] HUGHES R, RAPSOMANIKI E, JANSON C, et al. Frequent productive cough: Symptom burden and future exacerbation risk among patients with asthma and/or COPD in the NOVELTY study[J]. *Respir Med*, 2022, 200: 106921.
- [12] GAO C, PAN H, MA F, et al. Centipeda minima active components and mechanisms in lung cancer [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2023, 23(1): 89.
- [13] GHASEMI-TARIE R, KIASALARI Z, FAKOUR M, et al. Nobiletin prevents amyloid β 1-40-induced cognitive impairment via inhibition of neuroinflammation and oxidative/nitrosative stress[J]. *Metab Brain Dis*, 2022, 37(5): 1337-1349.
- [14] YUAN S, YE Z, LI Y, et al. Hypoglycemic effect of nobiletin via regulation of islet β -cell mitophagy and gut microbiota homeostasis in streptozocin-challenged mice[J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(19): 5805-5818.
- [15] LU R, XU K, QIN Y, et al. Network pharmacology and experimental validation to reveal effects and mechanisms of icariin combined with nobiletin against chronic obstructive pulmonary diseases [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 4838650.
- [16] LI J, MA J, TIAN Y, et al. Effective-component compatibility of Bufei Yishen formula II inhibits mucus hypersecretion of chronic obstructive pulmonary disease rats by regulating EGFR/PI3K/mTOR signaling[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 257: 112796.
- [17] DUAN Q, ZHOU Y, YANG D. Endoplasmic reticulum stress in airway hyperresponsiveness [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 149: 112904.
- [18] YU Y, YANG A, YU G, et al. Endoplasmic reticulum stress in chronic obstructive pulmonary disease: mechanisms and future perspectives [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(11): 1637.
- [19] ZAIDI MAL, MARGGRAF V, REPGES E, et al. Relevance of serum levels of the endoplasmic reticulum stress protein GRP78 (glucose-regulated protein 78 kDa) as biomarker in pulmonary diseases [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2023, 28(3): 333-341.
- [20] WANG J, DING L, WANG K, et al. Role of endoplasmic reticulum stress in cadmium-induced hepatocyte apoptosis and the protective effect of quercetin [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 241: 113772.
- [21] LI Y R, FAN H J, SUN R R, et al. Wuzi Yanzong Pill plays a neuroprotective role in parkinson's disease mice via regulating unfolded protein response mediated by endoplasmic reticulum stress [J]. *Chin J Integr Med*, 2023, 29(1): 19-27.
- [22] MOON J Y, CHO S K. Nobiletin induces protective autophagy accompanied by ER-stress mediated apoptosis in human gastric cancer SNU-16 cells [J]. *Molecules*, 2016, 21(7): 914.
- [23] ZHANG B F, JIANG H, CHEN J, et al. Nobiletin ameliorates myocardial ischemia and reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis through regulation of the PI3K/AKT signal pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 73: 98-107.