

引用本文:秦玉春,邝向东,蔡林再,等.水蛭素抑制 RhoA/Rho 激酶信号通路对慢性阻塞性肺疾病大鼠炎症反应和纤维化的影响[J].安徽医药,2022,26(12):2350-2354.DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.12.004.

◇ 药学研究 ◇



水蛭素抑制 RhoA/Rho 激酶信号通路对慢性阻塞性肺疾病大鼠炎症反应和纤维化的影响

秦玉春,邝向东,蔡林再,谢景臣

作者单位:海南西部中心医院呼吸与危重症医学科,海南 儋州 571700

通信作者:邝向东,男,副主任医师,研究方向为慢性阻塞性肺疾病,Email:vem53y@163.com

基金项目:海南省卫生健康行业科研项目(20A200304)

摘要: **目的** 探讨水蛭素抑制 RhoA/Rho 激酶(ROCK)信号通路对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠炎症反应和纤维化的影响。**方法** 2020年1—6月,将52只清洁级SD大鼠随机数字表法分为造模组(42只)和对照组(10只)。造模组大鼠通过气管内滴注脂多糖(LPS)溶液建立 COPD 模型,建模后的大鼠随机数字表法分为模型组、水蛭素组(50 U/kg)、ROCK 激活剂组[溶血磷脂酸(LPA, 40 μ g/kg)组、水蛭素+LPA 组(50 U/kg 水蛭素+40 μ g/kg LPA)],10只/组。药物组和激活剂组分别按照相应剂量进行干预;其余各组给予生理盐水干预。干预结束后,检测各组大鼠肺功能指标-呼气峰值流速(PEF)及0.3秒用力呼气容积(FEV0.3)、用力肺活量比值(FVC);颈总动脉取血,检测血清中炎症因子指标[白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)]水平;分离肺组织,观察肺组织形态学变化、肺纤维化程度以及 RhoA/ROCK 信号通路蛋白表达情况。**结果** 对照组大鼠无肺组织损伤;与对照组 PEF(11.21 $\pm$ 1.12) V/mL, FEV0.3(31.68 $\pm$ 3.24) mL/s, FVC(8.56 $\pm$ 0.85) V/mL, IL-1 β (65.78 $\pm$ 6.66) ng/L, TNF- α (100.32 $\pm$ 10.02) ng/L 相比,模型组大鼠肺组织损伤及纤维化较为严重,PEF(7.41 $\pm$ 0.71) V/mL, FEV0.3(22.42 $\pm$ 2.21) mL/s, FVC(4.61 $\pm$ 0.46) V/mL 较显著降低($P<0.05$),而 IL-1 β (158.63 $\pm$ 15.89) ng/L、TNF- α (545.37 $\pm$ 54.56) ng/L 显著增加, RhoA、Rho 激酶 1(ROCK1)蛋白表达也增加($P<0.05$);与模型组相比,经水蛭素组大鼠肺组织损伤及纤维化程度得到改善,PEF(5.34 $\pm$ 0.53) V/mL、FEV0.3(16.15 $\pm$ 1.62) mL/s、FVC(8.21 $\pm$ 0.82) V/mL 较模型组显著增加($P<0.05$),而 IL-1 β (68.72 $\pm$ 6.88) ng/L、TNF- α (115.35 $\pm$ 11.55) ng/L 显著降低, RhoA、ROCK1 蛋白表达均显著降低($P<0.05$);LPA 可减弱水蛭素对 COPD 大鼠炎症反应和肺纤维化的改善作用($P<0.05$)。**结论** 水蛭素可以降低炎症细胞浸润,改善肺组织损伤和肺纤维化,可能与抑制 RhoA/ROCK 信号通路有关。**关键词:** 水蛭素类; 肺疾病,慢性阻塞性; 峰值呼气流速; 白细胞介素 1 β ; 肿瘤坏死因子 α ; 纤维化; RhoA/ROCK 信号通路; 大鼠, Sprague-Dawley

Influence of hirudin on inflammatory response and fibrosis in rats with chronic obstructive pulmonary disease by inhibiting RhoA/Rho kinase signaling pathway

QIN Yuchun, KUANG Xiangdong, CAI Linzai, XIE Jingchen

Author Affiliation: Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Hainan Western Central Hospital, Danzhou, Hainan 571700, China

Abstract: **Objective** To investigate the influences of hirudin on inflammation and fibrosis in rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) by inhibiting RhoA/Rho kinase (ROCK) signaling pathway. **Methods** The experimental study started and ended from January to June 2020. Fifty-two rats were grouped into model group (42 rats) and control group (10 rats) by random number table method. The rats in the model group were treated by intratracheal instillation of lipopolysaccharide (LPS) solution to establish a COPD model, and after modeling, the rats were separated into model group, hirudin group (50 U/kg), ROCK activator [lysophosphatidic acid (LPA), 40 μ g/kg], hirudin + LPA group (50 U/kg hirudin + 40 μ g/kg LPA), with 10 animals/group by random number table method. The drug group and the activator group were intervened according to the corresponding doses; the other groups were intervened with normal saline. After intervention, the pulmonary function indexes of rats in each group were detected, including peak expiratory flow rate (PEF), forced expiratory volume in 0.3 seconds (FEV0.3), and forced vital capacity ratio (FVC); blood was collected from the common carotid artery to detect the levels of inflammatory cytokines-interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum; lung tissue was isolated to observe the morphological changes of lung tissue, the degree of pulmonary fibrosis and the expression of RhoA/ROCK signaling pathway proteins. **Results** There was no lung tissue damage in the control group; Compared with the control group PEF (11.21 $\pm$ 1.12) V/mL, FEV0.3 (31.68 $\pm$ 3.24) mL/s, FVC (8.56 $\pm$ 0.85) V/mL, IL-1 β (65.78 $\pm$ 6.66) ng/L, TNF- α (100.32 $\pm$ 10.02) ng/L, In the model group, PEF (7.41 $\pm$ 0.71) V/mL, FEV0.3 (22.42 $\pm$ 2.21) mL/s and FVC (4.61 $\pm$ 0.46) V/mL were significantly lower than those

in the model group ($P<0.05$), while IL-1 β (158.63 ± 15.89) ng/L and TNF- α (545.37 ± 54.56) ng/L were significantly increased, and the protein expressions of RhoA and ROCK1 were also increased ($P<0.05$); Compared with the model group, the degree of lung tissue injury and fibrosis were improved in the hirudin group, PEF (5.34 ± 0.53) V/mL, FEV0.3 (16.15 ± 1.62) mL/s, FVC (8.21 ± 0.82) V/mL were significantly increased compared with the model group ($P<0.05$), while IL-1 β (68.72 ± 6.88) ng/L and TNF- α (115.35 ± 11.55) ng/L were significantly decreased, and the protein expression of RhoA and ROCK1 were significantly decreased ($P<0.05$). LPA was able to attenuate the improvement effects of hirudin on inflammation and pulmonary fibrosis in COPD rats ($P<0.05$). **Conclusion** Hirudin can reduce inflammatory cell infiltration, improve lung tissue damage and pulmonary fibrosis, which may be related to the inhibition of RhoA/ROCK signaling pathway.

Key words: Hirudins; Pulmonary disease, chronic obstructive; Peak expiratory flow rate; Interleukin-1beta; Tumor necrosis factor-alpha; Fibrosis; RhoA/ROCK signaling pathway; Rats, Sprague-Dawley

慢性阻塞性肺疾病(COPD)属于常见的肺部疾病,其发病机制主要是气道炎症、气流受限,而有害气体、吸烟、扬尘以及病原微生物等成为造成COPD的主要原因^[1]。该疾病的发病率呈现逐年增长的趋势,已成为全球第三大死亡的主要原因,给病人及家庭造成严重的经济负担^[2]。研究报道,西药对于COPD的治疗虽然具有一定的作用,但其副作用严重限制了该类药物的广泛使用,因此副作用小,药效稳定的中草药逐渐成为治疗COPD的研究热点^[3]。水蛭素是蚂蟥的主要活性成分,是目前发现的最高效的天然凝血酶抑制剂,临床上被广泛应用于治疗冠心病、肝硬化以及脑血栓等疾病,研究表明水蛭素还具有凝血、抗炎、抗纤维化等作用,但对于COPD的治疗目前鲜有报道^[4]。RhoA/Rho激酶(Rho kinase, ROCK)信号通路是重要的信号转导系统,在细胞迁移、发育、生长、分化等过程中发挥重要作用,也是神经突生长、骨形成、背侧闭合和肌生成所必需的,该途径的失调与不同类型的疾病有关,包括与肺部相关的疾病^[5]。于2020年1—6月,本研究通过气管内滴注脂多糖(LPS)溶液建立COPD模型,经水蛭素干预后,探索水蛭素对COPD大鼠炎症反应和纤维化以及RhoA/ROCK信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 北京维通利华实验动物技术有限公司提供52只8周龄、雄性、清洁级SD大鼠,体质量范围220~250 g,动物生产许可证号为SCXK(京)2016-0011,动物质量合格证号为1100111911008834。所有大鼠分笼饲养于温度范围22~25℃、湿度范围50%~60%、12 h光照/黑暗循环的饲养房中,常规喂养一周后开始实验。本研究符合一般动物实验伦理学原则。

1.1.2 实验试剂与仪器 水蛭素(BTN130542, 20 000 ATU/mL)购自北京百奥莱博科技有限公司; HE染色试剂盒(MM1013)购自上海懋康生物科技

有限公司;肿瘤坏死因子- α (TNF- α)试剂盒(EK-R38696)购自北京博沃尔斯生物科技有限公司; Masson三色胶原试剂盒(CSX10001)购自上海莼试生物科技有限公司;白细胞介素-1 β (IL-1 β)(H002)购自南京建成生物工程研究所; RhoA一抗(ab187027)、Rho激酶1(ROCK1)一抗(ab134181)购自abcam公司; ROCK激活剂[溶血磷脂酸(LPA)](L7260, 1 mg)购自Sigma公司。

MK3酶标仪购自芬兰雷勃公司; IX71荧光显微镜购自日本Olympus公司; 动物肺功能分析仪购自北京拜安吉科技有限公司; Optima MAX-TL台式超速离心机购自贝克曼库尔特国际贸易(上海)有限公司; 600D型通用型电泳仪电源购自北京鸿涛基业科技发展有限公司。

1.2 COPD大鼠模型的制备、分组及给药 参照文献[6]复制COPD大鼠模型:将适应性喂养一周的52只大鼠,按照随机数字表法选取10只作为对照组,剩余42只大鼠作为造模组,在实验第1、15天时,对造模组大鼠采用50 mg/kg戊巴比妥钠麻醉,于大鼠颈部中央消毒并切开切口,分离气管,采用头皮针穿刺气管,然后向气管内注入浓度为1 g/L LPS溶液(2 mg/kg);注入结束后,为使药物充分流入肺内,可将大鼠立起旋转2 min,之后缝合伤口,上述操作均在无菌条件下完成。当大鼠0.3秒用力呼气容积(FEV0.3)与用力肺活量(FVC)比值(FEV0.3/FVC)<70%时,表明大鼠模型建立成功^[7]。造模过程中大鼠死亡2只,将造模组剩余40只大鼠按照随机数字表法分为模型组、水蛭素组、LPA组、水蛭素+LPA组,10只/组。水蛭素组分别给予50 U/kg水蛭素灌胃干预^[8], LPA组给予腹腔注射40 μ g/kg LPA干预^[9];水蛭素+LPA组分别给予50 U/kg水蛭素、40 μ g/kg LPA干预;其余各组给予生理盐水干预,干预1次/天,连续干预4周。

1.3 观察指标

1.3.1 肺功能检测 次日,戊巴比妥钠麻醉大鼠,固定大鼠并对其颈部消毒,分离气管,将气管插管

与肺功能分析仪连接,分别记录FEV0.3、呼气峰值流速(PEF)、FVC。

1.3.2 炎症因子指标的检测 肺功能指标检测完成后,麻醉大鼠,经颈部总动脉取血0.6 mL,4 000 r/min离心10 min,取上清,按照Elisa试剂盒说明书检测TNF- α 、IL-1 β 水平。

1.3.3 观察肺组织形态学及肺纤维化变化 取适量肺组织,脱水、透明并用石蜡包埋,制作切片,行HE、Masson染色,脱水、封片,观察各组大鼠病理状况及肺纤维化。

1.3.4 检测大鼠肺组织中RhoA/ROCK通路蛋白表达 取适量肺组织,加入裂解液提取蛋白质,离心取上清,BCA试剂盒测定总蛋白浓度,取适量蛋白上样,电泳分离,转膜,封闭;分别加入稀释后(1:1 000)的RhoA一抗、ROCK1一抗,4℃过夜孵育;洗膜后,加入二抗(1:2 000)37℃孵育,ECL显色曝光,以 β -actin为内参,利用Image J图像分析软件分析条带图,得出目的蛋白的相对表达水平。

1.4 统计学方法 本研究所得数据采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均符合正态分布,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用SNK- q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 水蛭素对各组大鼠肺功能指标的影响 与对照组相比,模型组大鼠FEV0.3、FVC、PEF均显著降低($P < 0.05$);与模型组相比,水蛭素组大鼠FEV0.3、FVC、PEF均显著增加($P < 0.05$),LPA组大鼠FEV0.3、FVC、PEF均显著降低($P < 0.05$);与LPA组相比,水蛭素+LPA组大鼠PEF、FEV0.3、FVC均显著增加($P < 0.05$);与水蛭素组相比,水蛭素+LPA组大鼠PEF、FEV0.3、FVC均显著降低($P < 0.05$)。见表1。

2.2 水蛭素对各组大鼠肺组织病理学变化的影响 对照组大鼠肺细胞形态正常,结构正常;模型组与对照组相比,大鼠细胞出现炎性浸润,上皮细胞出现脱落,管壁增厚;与模型组相比,水蛭素组大鼠病理组织得到改善,炎性浸润减少,细胞脱落、管

壁增厚程度逐渐改善,LPA组大鼠炎性浸润、细胞脱落以及管壁增厚程度均明显增加;与LPA组相比,水蛭素+LPA组大鼠病理程度均得到缓解;与水蛭素组相比,水蛭素+LPA组大鼠炎性浸润、细胞脱落等均增加。见图1。

2.3 水蛭素对各组大鼠肺纤维化的影响 模型组大量细胞被染成蓝色,极少量细胞质呈现红色;与模型组相比,水蛭素组大量细胞质被染成红色,着蓝色细胞明显减少,LPA组肺纤维化程度明显加深;与LPA组相比,水蛭素+LPA组细胞着蓝色明显减少,红色细胞质逐渐加深;与水蛭素组相比,水蛭素+LPA组细胞着蓝色逐渐增加,红色细胞质逐渐变浅。见图2。

2.4 水蛭素对各组大鼠炎症因子水平的影响 模型组大鼠TNF- α 、IL-1 β 水平较对照组均显著增加($P < 0.05$);与模型组相比,水蛭素组大鼠TNF- α 、IL-1 β 水平均显著降低($P < 0.05$),LPA组大鼠TNF- α 、IL-1 β 水平均显著增加($P < 0.05$);与LPA组相比,水蛭素+LPA组大鼠TNF- α 、IL-1 β 水平均显著降低($P < 0.05$);与水蛭素组相比,水蛭素+LPA组大鼠TNF- α 、IL-1 β 水平均显著增加($P < 0.05$)。见表2。

表2 各组大鼠炎症因子指标的比较/(ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TNF- α	IL-1 β
对照组	10	100.32 $\pm$ 10.02	65.78 $\pm$ 6.66
模型组	10	545.37 $\pm$ 54.56 ^①	158.63 $\pm$ 15.89 ^①
水蛭素组	10	115.35 $\pm$ 11.55 ^②	68.72 $\pm$ 6.88 ^②
LPA组	10	768.39 $\pm$ 76.93 ^②	278.63 $\pm$ 27.91 ^②
水蛭素+LPA组	10	265.73 $\pm$ 27.11 ^{③④}	100.48 $\pm$ 10.05 ^{③④}
F值		427.46	322.29
P值		<0.001	<0.001

注:TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ,IL-1 β 为白细胞介素-1 β 。

①与对照组相比, $P < 0.05$ 。②与模型组相比, $P < 0.05$ 。③与水蛭素组相比, $P < 0.05$ 。④与LPA组相比, $P < 0.05$ 。

2.5 水蛭素对各组大鼠RhoA/ROCK通路蛋白表达的影响 模型组大鼠RhoA、ROCK1蛋白表达较对照组均显著增加($P < 0.05$);与模型组相比,水蛭素组大鼠RhoA、ROCK1蛋白表达均显著降低($P < 0.05$);与LPA组相比,水蛭素+LPA组大鼠RhoA、ROCK1蛋白表达均显著增加($P < 0.05$);与水蛭素组相比,水蛭素+LPA组大鼠RhoA、ROCK1蛋白表达均显著降低($P < 0.05$)。见表3。

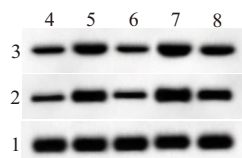
表1 各组大鼠肺功能指标的比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	FVC/(V/mL)	PEF/(mL/s)	FEV0.3/(V/mL)	FEV0.3/FVC/%
对照组	10	11.21 $\pm$ 1.12	31.68 $\pm$ 3.24	8.56 $\pm$ 0.85	76.12 $\pm$ 0.76
模型组	10	7.41 $\pm$ 0.71 ^①	22.42 $\pm$ 2.21 ^①	4.61 $\pm$ 0.46 ^①	62.11 $\pm$ 0.59 ^①
水蛭素组	10	10.98 $\pm$ 0.99 ^②	30.54 $\pm$ 3.05 ^②	8.21 $\pm$ 0.82 ^②	74.77 $\pm$ 0.75 ^②
LPA组	10	5.34 $\pm$ 0.53 ^②	16.15 $\pm$ 1.62 ^②	3.41 $\pm$ 0.35 ^②	63.85 $\pm$ 0.61 ^②
水蛭素+LPA组	10	8.83 $\pm$ 0.85 ^{③④}	26.43 $\pm$ 2.63 ^{③④}	6.25 $\pm$ 0.62 ^{③④}	70.78 $\pm$ 0.71 ^{③④}
F值		81.69	58.93	117.84	844.65
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:FVC为用力肺活量,PEF为呼气峰值流速,FEV0.3为0.3秒用力呼气容积。

①与对照组相比, $P < 0.05$ 。②与模型组相比, $P < 0.05$ 。③与水蛭素组相比, $P < 0.05$ 。④与LPA组相比, $P < 0.05$ 。

0.05), LPA组大鼠 RhoA、ROCK1 蛋白表达均显著增加($P<0.05$);与 LPA 组相比,水蛭素+LPA 组大鼠 RhoA、ROCK1 蛋白表达均显著降低($P<0.05$);与水蛭素组相比,水蛭素+LPA 组大鼠 RhoA、ROCK1 蛋白表达均显著增加($P<0.05$)。见图 3,表 3。



注:1— β -肌动蛋白(β -actin);2—蛋白 RhoA(RhoA);3—Rho 激酶 1(ROCK1);4—对照组;5—模型组;6—水蛭素组;7—LPA 组;8—水蛭素+LPA 组。

图 3 各组大鼠肺组织 RhoA、ROCK1 蛋白质印迹法图

表 3 各组大鼠 RhoA、ROCK1 蛋白表达的比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	RhoA/ β -actin	ROCK1/ β -actin
对照组	10	0.22 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.02
模型组	10	0.78 $\pm$ 0.07 ^①	0.74 $\pm$ 0.07 ^①
水蛭素组	10	0.27 $\pm$ 0.03 ^②	0.29 $\pm$ 0.03 ^②
LPA 组	10	1.02 $\pm$ 0.11 ^②	0.98 $\pm$ 0.09 ^②
水蛭素+LPA 组	10	0.58 $\pm$ 0.06 ^{③④}	0.57 $\pm$ 0.06 ^{③④}
F 值		262.05	263.77
P 值		<0.001	<0.001

注:RhoA 为蛋白 RhoA,ROCK1 为 Rho 激酶 1, β -actin 为 β -肌动蛋白。

①与对照组相比, $P<0.05$ 。②与模型组相比, $P<0.05$ 。③与水蛭素组相比, $P<0.05$ 。④与 LPA 组相比, $P<0.05$ 。

3 讨论

COPD 疾病已经影响全球十分之一的人口,被世界卫生组织确定为全球未被满足的主要健康需求,且数据显示,到 2030 年 COPD 将成为全球第三大致命疾病,预计将影响越来越多的全球人口^[10-11]。COPD 是一种使人衰弱但可预防的多因素疾病,其特征是无法治愈的进行性气流受限,临床表现多种多样,包括肺气肿、慢性支气管炎以及病人的呼吸道症状急性恶化,给医疗系统和社会均带来巨大的经济负担^[12]。本研究通过气管内滴注 LPS 溶液建立 COPD 模型,当 FEV0.3/FVC<70% 时,表明大鼠模型建立,可进一步研究。

COPD 的发病机理较为复杂,而异常的炎症反应被认为参与了 COPD 病情发展,因此炎症因子如 TNF- α 、IL-1 β 在 COPD 气道炎症反应中发挥关键作用^[13]。水蛭素是一种从中药水蛭中提取的分泌多肽,被认为是最有效的天然凝血酶抑制剂,含有抗癌、抗凝血、抑菌和降血脂等多种药理活性,与许多疾病的病理过程有关^[14]。Shen 等^[15]研究发现人锰超氧化物歧化酶与水蛭素的融合蛋白可以降低肺部炎症,阻止肺纤维化的发展。水蛭素可抑制博莱

霉素致特发性肺间质纤维化大鼠的肺组织炎症和纤维化,且呈现剂量依赖性^[16]。本研究发现模型组大鼠肺组织损伤及纤维化较严重,PEF、FEV0.3、FVC 较对照组显著降低,而 IL-1 β 、TNF- α 水平均显著增加;经水蛭素干预后,大鼠肺组织损伤及纤维化程度得到改善,PEF、FEV0.3、FVC 较模型组显著增加,而 IL-1 β 、TNF- α 水平均显著降低,表明水蛭素可以抑制 COPD 大鼠的炎症反应和肺纤维化,改善肺损伤。

RhoA/ROCK 信号通路参与多种器官纤维化、心脑血管以及肿瘤浸润等疾病的发生。研究表明通过 LPS 构建的肺损伤模型中可导致大量炎症细胞的产生,而 LPS 可激活 RhoA/ROCK 信号通路参与肺损伤的发展过程^[17]。贾海燕等^[18]研究发现乌司他丁可以通过抑制 RhoA/ROCK 信号通路,降低脓毒症小鼠的肺水肿,改善血管通透性和肺损伤。陈勇等^[19]研究发现抑制 RhoA/ROCK 信号通路可以降低炎症反应,减轻病人机械通气时的肺损伤。本实验研究发现模型组大鼠 RhoA、ROCK1 蛋白表达均显著增加;经水蛭素干预后,大鼠肺组织中 RhoA、ROCK1 蛋白表达均显著降低。表明水蛭素可以抑制 RhoA、ROCK1 蛋白表达,改善 COPD 大鼠肺损伤状况。为进一步验证该猜想,实验引入 ROCK 的激活剂-LPA,结果发现 LPA 组大鼠较模型组大鼠肺组织损伤及纤维化程度进一步加重,PEF、FEV0.3、FVC 较模型组显著降低,而 IL-1 β 、TNF- α 、RhoA、ROCK1 蛋白表达均显著增加;与水蛭素+LPA 组相比,水蛭素组大鼠肺组织损伤及纤维化程度得到改善,PEF、FEV0.3、FVC 较模型组显著增加,而 IL-1 β 、TNF- α 、RhoA、ROCK1 蛋白表达均显著降低。揭示了水蛭素可以抑制 COPD 大鼠的炎症反应和肺纤维化,改善肺损伤,可能与抑制 RhoA/ROCK 信号通路有关。

综上所述,水蛭素可以通过抑制 RhoA/ROCK 信号通路,抑制 COPD 大鼠的炎症反应和肺纤维化,阻止 COPD 疾病的进一步发展,为临床治疗 COPD 疾病提供新的研究方向。

(本文图 1,2 见插图 12-1)

参考文献

- [1] 徐高俊,潘选良,潘微微.孟鲁司特联合噻托溴铵用于治疗哮喘-慢性阻塞性肺疾病重叠综合征患者的临床观察[J].中国药师,2019,22(4):699-702.
- [2] GRAF J, GRRES RA, LUCKE T, et al. Medical treatment of COPD[J]. Dtsch Arztebl Int, 2018, 155(37):599-605.
- [3] 魏萍,陈志斌,王春娥,等.槲皮素对慢性阻塞性肺疾病大鼠的保护作用[J].中国免疫学杂志,2019,35(21):2570-2575.
- [4] CHEN J, XIE XF, ZHANG HQ, et al. Pharmacological activities and mechanisms of hirudin and its derivatives-a review[J]. Front

- Pharmacol, 2021, 12:660757. DOI: 10.3389/fphar.2021.660757.
- [5] DENG Z, JIA Y, LIU H, et al. RhoA/ROCK pathway: implication in osteoarthritis and therapeutic targets[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(9):5324-5331.
- [6] 周芳, 陈林, 蔡佳, 等. 姜黄素基于 IL-8/MUC5ac 信号通路对慢性阻塞性肺疾病大鼠的干预效果[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(23):5262-5266.
- [7] 骆志均, 何明丰. 补中益气汤加味对慢性阻塞性肺疾病大鼠的治疗作用及机制研究[J]. 广州中医药大学学报, 2020, 37(12):2401-2405.
- [8] 漆勇. 重组水蛭素对慢性阻塞性肺疾病大鼠气道重塑的影响及机制研究[D]. 泸州:西南医科大学, 2016.
- [9] 张丽美. 运动训练通过 RhoA/ROCK 信号通路调控自发性高血压的作用机制探讨[D]. 保定:河北大学, 2021.
- [10] FAZLEEN A, WILKINSON T. Early COPD: current evidence for diagnosis and management[J]. Ther Adv Respir Dis, 2020, 14:1753466620942128. DOI: 10.1177/1753466620942128.
- [11] GUO Z, LIU L, LI S, et al. Effect of BDNF on airway inflammation in a rat model of COPD[J]. Exp Ther Med, 2021, 22(4):1116.
- [12] IHEANACHO I, ZHANG S, KING D, et al. Economic burden of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a systematic literature review[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2020, 15:439-460.
- [13] 谢圆媛, 杨丹芬, 王莉. 藏红花素通过 PGC-1 α /SIRT3 信号通路抑制慢性阻塞性肺疾病模型大鼠的气道炎症[J]. 临床肺科杂志, 2020, 25(11):1648-1654.
- [14] DENG F, ZHANG J, LI Y, et al. Hirudin ameliorates immunoglobulin a nephropathy by inhibition of fibrosis and inflammatory response[J]. Ren Fail, 2019, 41(1):104-112.
- [15] SHEN LH, LEI SJ, HUANG LY, et al. Therapeutic effects of the rhSOD2-hirudin fusion protein on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 852:77-89.
- [16] 李红, 谢海彬, 刘敏, 等. 水蛭素对博来霉素致特发性肺间质纤维化大鼠肺组织病理变化的影响[J]. 中医临床研究, 2019, 11(7):1-6.
- [17] 刘建兵, 刘敏丽. RhoA/ROCK 信号通路相关疾病的研究进展[J]. 海南医学院学报, 2019, 25(6):472-476.
- [18] 贾海燕, 刘娜, 赵中松. 乌司他丁对脓毒症小鼠肺损伤的改善作用及相关机制研究[J]. 河北医药, 2019, 41(11):1729-1731.
- [19] 陈勇, 孙静, 郭莲, 等. 大鼠肉瘤基因同源物及其相关卷曲螺旋蛋白激酶信号通路在呼吸机相关性肺损伤中的作用[J]. 上海医学, 2021, 44(1):36-40.

(收稿日期:2022-03-11,修回日期:2022-03-29)

引用本文:郭贻龙,陈宝,黎伟. 抗氧化反应元件信号通路调控胆囊癌细胞增殖、侵袭、迁移、凋亡的机制研究[J]. 安徽医药, 2022, 26(12):2354-2358. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.12.005.



◇ 药学研究 ◇

抗氧化反应元件信号通路调控胆囊癌细胞增殖、侵袭、迁移、凋亡的机制研究

郭贻龙^a, 陈宝^b, 黎伟^a

作者单位:海口市人民医院,^a急诊科,^b药学部,海南 海口 570208

摘要: **目的** 探讨血根碱调控胆囊癌细胞增殖、侵袭、迁移、凋亡的分子机制。**方法** 于2018年1月至2019年9月体外培养人胆囊癌细胞 GBC-SD,用不同浓度(2、4、8 μ mol/L)的血根碱处理48 h。MTT法检测细胞增殖抑制率;Transwell实验检测细胞迁移、侵袭能力;流式细胞术检测细胞凋亡率;采用荧光探针DCFH-DA检测细胞内活性氧水平,应用多功能酶标仪检测丙二醛、还原型谷胱甘肽(GSH)含量与超氧化物歧化酶(SOD)活性;蛋白质印迹法检测增殖细胞核抗原(PCNA)、增殖标记蛋白细胞增殖核抗原-67(Ki-67)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、活化胱天蛋白酶-3(cleaved-caspase-3)与Kelch样ECH相关蛋白1(Keap1)/核因子E2相关因子2(Nrf2)/抗氧化反应元件(ARE)信号通路相关蛋白Keap1、Nrf2、血红素加氧酶1(HO-1)的表达量。**结果** 与空白组相比,血根碱不同浓度组细胞增殖抑制率[(2.07 $\pm$ 0.68)%比(12.49 $\pm$ 1.53)%、(23.08 $\pm$ 2.64)%、(44.67 $\pm$ 3.68)%]显著升高(P <0.05),迁移细胞数[(243.19 $\pm$ 15.48)个比(146.34 $\pm$ 12.56)个、(98.85 $\pm$ 9.82)个、(75.79 $\pm$ 7.37)个]与侵袭细胞数[(136.68 $\pm$ 8.37)个比(97.43 $\pm$ 7.15)个、(46.65 $\pm$ 5.34)个、(38.15 $\pm$ 4.53)个]显著减少(P <0.05),PCNA、Ki-67、MMP-2、MMP-9表达量显著降低(P <0.05),细胞凋亡率[(3.62 $\pm$ 0.63)%比(8.59 $\pm$ 1.02)%、(14.16 $\pm$ 1.14)%、(18.84 $\pm$ 1.65)%]显著升高(P <0.05),cleaved-caspase-3表达量显著升高(P <0.05);与空白组相比,血根碱低浓度组、血根碱中浓度组、血根碱高浓度组活性氧、丙二醛水平显著升高(P <0.05),SOD活性与GSH含量显著降低(P <0.05),Keap1、Nrf2、HO-1表达量显著降低(P <0.05)。**结论** 血根碱可能通过调控Keap1/Nrf2/ARE信号通路从而抑制胆囊癌细胞增殖、侵袭、迁移,促进细胞凋亡。**关键词:** 胆囊肿瘤; 中草药; 血根碱; Kelch样ECH相关蛋白1; 核因子E2相关因子2; 抗氧化反应元件; 增殖; 侵袭; 迁移; 凋亡