

【基础研究】

作者简介:齐咏(1976-),女,河南封丘人,博士,主任医师,主要从事慢性呼吸系统疾病的基础与临床研究。

than that in the model group ($P < 0.01$). The expression of PGC-1 α , NRF1, Tfam, COX IV protein and mRNA in skeletal muscle tissues of rats in the resveratrol group and model group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.01$). The expression of PGC-1 α , NRF1, Tfam, COX IV protein and mRNA in skeletal muscle tissues of rats in the resveratrol group was significantly higher than that in the model group ($P < 0.01, P < 0.05$). **Conclusion** Resveratrol can reduce the level of TNF- α in serum and skeletal muscle tissues of COPD rats, increase the expression of PGC-1 α , thereby improving the mitochondrial biosynthesis function.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease; resveratrol; mitochondrial biosynthesis

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是以不完全可逆的气流持续受限为特征且进行性发展的慢性呼吸道炎症性疾病^[1]。重度 COPD 患者存在骨骼肌强度下降, 骨骼肌功能异常是导致 COPD 患者运动耐量下降的重要因素。研究显示, COPD 患者外周骨骼肌中存在线粒体异常, 主要表现为线粒体数量减少和线粒体基因转录及生物合成异常^[2-3]。过氧化物酶增殖物激活受体因子 γ 辅激活因子-1 α (peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 可作用于下游物质核呼吸因子 1 (nuclear respiratory factor 1, NRF1), 激活一系列核编码的呼吸相关基因, 促进细胞色素 C 氧化酶 IV (cytochrome c oxidase IV, COX IV) 的表达, 增强线粒体转录因子 A (mitochondria transcription factor A, Tfam) 的表达, 调控线粒体生物合成功能^[4]。本研究拟通过观察白藜芦醇干预前后 COPD 大鼠骨骼肌线粒体生物合成相关指标的改变, 探讨其对 COPD 大鼠骨骼肌线粒体生物合成及机体炎症反应的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 无特定病原体级雄性 Sprague Dawley 大鼠 45 只, 体质量 (200 ± 20) g, 由河南省实验动物中心提供, 合格证号: 豫 XK20050001。将 45 只大鼠随机分为对照组、模型组和白藜芦醇组, 每组 15 只。

1.2 药物、试剂与仪器 白藜芦醇 (美国 LITOZIN 公司, 中华人民共和国出入境检验检疫卫生证书编号: 120000113142900), 兔抗大鼠 PGC-1 α 多克隆抗体 (sc-13067)、山羊抗大鼠 NRF1 多克隆抗体 (sc-30911)、小鼠抗大鼠 Tfam 单克隆抗体 (sc-166965)、山羊抗大鼠 COX IV 多克隆抗体 (sc-69359) (美国 Santa Cruz 公司), 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (美国 PeproTech 公司), 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试剂盒

(美国 Invitrogen 公司)。低温高速离心机 (德国 Heraeus 公司), 7300 型 qRT-PCR 仪 (美国 ABI 公司), PowerPac Universa C 型电泳系统 (美国 BIO-RAD 公司)。

1.3 COPD 模型制备与各组大鼠处理措施 除对照组外, 模型组和白藜芦醇组大鼠通过气管内滴注脂多糖和反复烟雾暴露法构建 COPD 模型^[5]。烟雾暴露第 29 天, 模型组和白藜芦醇组各取 3 只大鼠, 对照组取 1 只大鼠处死, 肺病理学检查验证 COPD 建模成功。自烟雾暴露第 29 天起, 对照组和模型组大鼠给予 2 mL 生理盐水灌胃, 白藜芦醇组大鼠给予 2 mL 白藜芦醇溶液灌胃 ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 连续灌胃 30 d。所有实验操作均符合实验动物伦理规范要求。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 大鼠血清和小腿骨骼肌组织中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平测定

药物干预 30 d 后, $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠, 穿刺腹主动脉采集血样, $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, -80°C 保存。采集血样后处死大鼠, 取小腿三头肌约 1 g, 匀浆后 $3\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液。采用 ELISA 法测定大鼠血清和小腿骨骼肌组织中 TNF- α 水平, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.4.2 qRT-PCR 检测大鼠小腿骨骼肌组织中 PGC-1 α 、NRF1、Tfam 及 COX IV mRNA 表达 取大鼠小腿三头肌 100 mg, 液氮中磨碎, 加入 TRIzol 后匀浆, 提取总 RNA。通过 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳和分光光度计测定总 RNA 的纯度, 计算总 RNA 浓度。根据 Supre® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR 说明书进行反转录操作。通过 ROX 的 Platinum SYBR® Green® SuperMix-UDG 进行 qRT-PCR 检测。GAPDH 上游引物序列为 5'-GGGTCAGAAG-GATTCCTATG-3', 下游引物序列为 5'-GGTCTCAAA-CATGATCTGGG-3'; PGC-1 α 上游引物序列为 5'-AAGGTCCCCAGGCAGTAGAT-3', 下游引物序列为 5'-TTCAGACTCCCGCTTCTCAT-3'; NRF1 上游引物

序列为 5'-TTACTCTGCTGTGGCTGATGG-3',下游引物序列为 5'-CCTCTGATGCTTGCGTCGTCT-3';Tfam 上游引物序列为 5'-GAAAGCACAAATCAAGAG-GAG-3',下游引物序列为 5'-CTGCTTTTCATCAT-GAGACAG-3';COX IV 上游引物序列为 5'-TCACT-GCGCTCGTTCTGAT-3',下游引物序列为 5'-CGATCGAAAGTATGAGGGATG-3'。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 相对表达量。

1.4.3 Western blot 法检测大鼠小腿骨骼肌组织中 PGC-1 α 、NRF1、Tfam 及 COX IV 蛋白表达 将小腿三头肌组织研磨成粉末状,收集组织裂解产物,4℃下 10 000 r·min⁻¹离心 10 min,二喹啉甲酸法测定上清液中蛋白含量,-70℃保存备用。各取 100 μ g 蛋白质样本进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,封闭,添加一抗,室温下孵育 1 h,4℃孵育 24 h。漂洗 3 次,每次 5 min,加入偶联辣根过氧化物酶的抗鼠 IgG 二抗,室温孵育 1 h,再次漂洗 3 次,每次 5 min;采用增强化学发光法显色,运用图像分析软件定量测定杂交信号的吸光度。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。正态分布资料以($\bar{x} \pm s$)表示,非正态分布资料以中位数和四分位间距表示,符合正态分布且方差齐的定量数据组间比较采用单因素方差分析;非正态分布数据组间比较采用秩和检验;检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠血清和骨骼肌组织中 TNF- α 水平比较 结果见表 1。模型组和白藜芦醇组大鼠血清和骨骼肌组织中 TNF- α 水平显著高于对照组,白藜芦醇组大鼠血清和骨骼肌组织中 TNF- α 水平显著低于模型组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。

表 1 各组大鼠血清和骨骼肌组织中 TNF- α 水平比较
Tab.1 Comparison of the TNF- α level in serum and skeletal muscle tissues of the rats among the groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TNF- α /(ng·L ⁻¹)	
		血清	骨骼肌
对照组	14	154.7 \pm 13.0	129.8 \pm 11.8
模型组	12	378.1 \pm 26.3 ^a	330.6 \pm 23.8 ^a
白藜芦醇组	12	248.0 \pm 23.5 ^{ab}	229.3 \pm 26.5 ^{ab}

注:与对照组比较^a $P<0.01$;与模型组比较^b $P<0.01$ 。
2.2 各组大鼠骨骼肌组织中 PGC-1 α 、NRF1、Tfam 及 COX IV mRNA 表达比较 结果见表 2。

白藜芦醇组和模型组大鼠骨骼肌组织中 PGC-1 α 、NRF1、Tfam 及 COX IV mRNA 相对表达量显著低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$);白藜芦醇组大鼠骨骼肌组织中 PGC-1 α 、NRF1、Tfam 及 COX IV mRNA 相对表达量显著高于模型组,差异均有统计学意义($P<0.01$, $P<0.05$)。

表 2 各组大鼠骨骼肌组织中 PGC-1 α 、NRF1、Tfam 及 COX IV mRNA 表达比较
Tab.2 Comparison of the expression of PGC-1 α , NRF1, Tfam and COX IV mRNA in skeletal muscle tissues of the rats among the groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	PGC-1 α mRNA	NRF1 mRNA	Tfam mRNA	COX IV mRNA
对照组	14	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
模型组	12	0.17 \pm 0.05 ^a	0.20 \pm 0.08 ^a	0.21 \pm 0.04 ^a	0.25 \pm 0.07 ^a
白藜芦醇组	12	0.38 \pm 0.22 ^{ab}	0.40 \pm 0.19 ^{ab}	0.50 \pm 0.21 ^{ac}	0.63 \pm 0.37 ^{ab}

注:与对照组比较^a $P<0.01$;与模型组比较^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。

2.3 各组大鼠骨骼肌组织中 PGC-1 α 、NRF1、Tfam 及 COX IV 蛋白表达比较 结果见图 1 和表 3。模型组和白藜芦醇组大鼠骨骼肌组织中 PGC-1 α 、NRF1、Tfam 及 COX IV 蛋白表达显著低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$);白藜芦醇组大鼠骨骼肌组织中 PGC-1 α 、NRF1、Tfam 及 COX IV 蛋白表达显著高于模型组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。

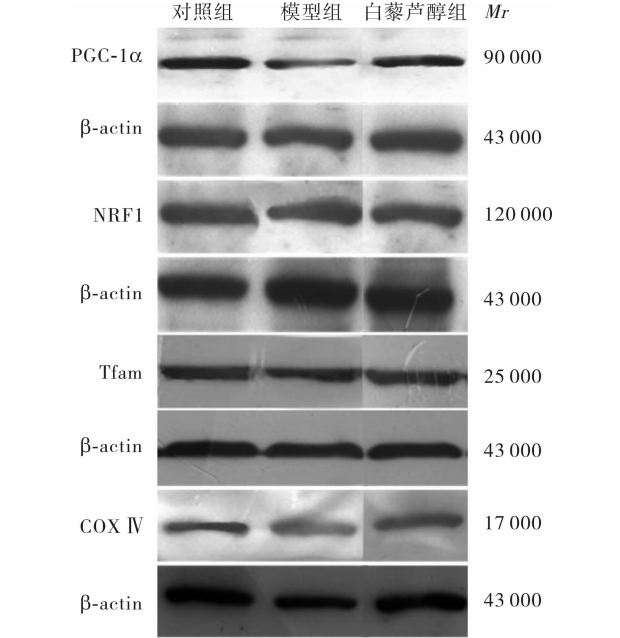


图 1 各组大鼠骨骼肌组织中 PGC-1 α 、NRF1、Tfam 及 COX IV 蛋白表达(Western blot)
Fig.1 Expression of PGC-1 α , NRF1, Tfam and COX IV protein in skeletal muscle tissues of the rats among the groups(Western blot)

表 3 各组大鼠骨骼肌组织中 PGC-1α、NRF1、Tfam 及 COX IV 蛋白表达比较

Tab.3 Comparison of the expression of PGC-1α, NRF1, Tfam and COX IV protein in skeletal muscle tissues of the rats among the groups (x̄±s)

组别	n	PGC-1α	NRF1	Tfam	COX IV
对照组	14	0.65±0.05	0.54±0.05	0.48±0.04	0.60±0.04
模型组	12	0.16±0.03 ^a	0.14±0.02 ^a	0.12±0.02 ^a	0.11±0.02 ^a
白藜芦醇组	12	0.39±0.03 ^{ab}	0.34±0.04 ^{ab}	0.29±0.04 ^{ab}	0.31±0.03 ^{ab}

注:与对照组比较^a*P*<0.01;与模型组比较^b*P*<0.01。

3 讨论

骨骼肌运动所需能量来源于线粒体,线粒体功能的改变会引发细胞能量代谢异常。研究发现,COPD 患者运动过程中早期出现乳酸释放,乳酸并非由呼吸肌产生,而是产生于腿部肌肉,这或许可以解释为什么 COPD 患者的运动耐受力下降^[6]。研究显示,COPD 模型大鼠小腿三头肌中线粒体出现数量减少、肿胀、空泡化以及内膜、嵴破坏溶解改变^[7],提示 COPD 大鼠存在线粒体形态学异常。

研究显示,COPD 患者骨骼肌病理变化伴随着 PGC-1α 水平变化,COPD 时骨骼肌纤维可以发生由 I 型向 II 型的转变,而 PGC-1α 可以强力介导 II 型肌纤维向 I 型肌纤维的转变^[8],但其具体机制仍有待研究。齐咏等^[5]研究显示,COPD 大鼠 NRF1 和 Tfam 蛋白及 mRNA 表达水平均下降,提示 COPD 大鼠线粒体存在生物合成障碍,这一结果与 REMELS 等^[8]研究结果一致。

本研究结果显示,模型组大鼠骨骼肌组织中 PGC-1α、NRF1、Tfam、COX IV 蛋白及 mRNA 表达显著低于对照组,白藜芦醇组大鼠骨骼肌组织中 PGC-1α、NRF1、Tfam、COX IV 蛋白及 mRNA 表达显著高于模型组,提示白藜芦醇可以显著改善 COPD 大鼠骨骼肌细胞的线粒体生物合成功能,从而促进改善骨骼肌的能量代谢。研究显示,白藜芦醇诱导的线粒体生物合成及细胞保护作用的机制主要有:(1)激活沉默调节蛋白 1,促进 PGC-1α 活化,改变线粒体生物合成状态;(2)上调线粒体锰超氧化物歧化酶水平,进而调节线粒体氧化还原状态;(3)上调解偶联蛋白 2 的表达,诱导解偶联依赖的线粒体活性类物质产生,改变氧化还原环境^[9-10]。有研究表明,在实验性糖尿病神经病变时,白藜芦醇可以降低 TNF-α、白细胞介素-6 和环氧合酶-2 水平^[11-12]。本研究结果也显示,白藜芦醇可以降低 COPD 大鼠骨骼肌组织及血清中 TNF-α 水平,改善 COPD 大鼠的

炎症反应状态。线粒体功能异常可以导致机体炎症反应增强^[13],白藜芦醇可能通过改善机体线粒体生物合成功能减轻 COPD 大鼠全身及局部炎症反应,但其具体机制仍需进一步研究。

综上所述,白藜芦醇可以降低 COPD 大鼠血清及骨骼肌组织中 TNF-α 水平,提高 PGC-1α 表达水平,从而改善线粒体生物合成功能。

参考文献:

[1] 李航,郭伟丽,安珍,等. PM_{2.5} 对慢性阻塞性肺疾病影响研究进展[J]. 新乡医学院学报,2016,33(3):234-238.

[2] HOPKINSON N S,TENNANT R C,DAYER M J,*et al.* A prospective study of decline in fat free mass and skeletal muscle strength in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Respir Res*, 2007, 13(3):8-25.

[3] 肖亚军,王宋平. 慢性阻塞性肺疾病骨骼肌功能障碍的相关因素及机制的研究进展[J]. 临床肺科杂志,2016,21(2):340-343.

[4] ISLAM H,EDGETT B A,GURD B J. Coordination of mitochondrial biogenesis by PGC-1alpha in human skeletal muscle;a reevaluation [J]. *Metabolism*,2017,79:42-51.

[5] 齐咏,刘青锋,尚俊依,等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠骨骼肌过氧化物酶体增生激活受体 γ 辅激活因子-1α 表达对线粒体合成的影响[J]. 中华实验外科杂志,2015,32(2):367-369.

[6] PUENTE-MAESTU L,LÁZARO A,HUMANES B. Metabolic derangements in COPD muscle dysfunction [J]. *J Appl Physiol*, 2013,114(9):1282-1290.

[7] QI Y,SHANG J Y,MA L J,*et al.* Inhibition of AMPK expression in skeletal muscle by systemic inflammation in COPD rats[J]. *Respir Res*,2014,15(1):156.

[8] REMELS A H,SCHRAUWEN P,BROEKHUIZEN R,*et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor expression is reduced in skeletal muscle in COPD[J]. *Eur Respir J*,2007,30(2):245-252.

[9] JARDIM F R,DE ROSSI F T,NASCIMENTO M X,*et al.* Resveratrol and brain mitochondria;a review[J]. *Mol Neurobiol*,2018,55(3):2085-2101.

[10] LAGOUGE M,ARGMANN C,GERHART-HINES Z,*et al.* Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha [J]. *Cell*, 2006,127(6):1109-1122.

[11] KUMAR A,SHARMA S S. NF-κB inhibitory action of resveratrol:a probable mechanism of neuroprotection in experimental diabetic neuropathy[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2010,394(2):360-365.

[12] 刘海凤,张向东,杨洋. 白藜芦醇对青光眼视网膜氧化损伤的保护作用[J]. 眼科新进展,2014,34(8):732-734.

[13] ZHOU R,YAZDI A S,MENU P,*et al.* A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation[J]. *Nature*,2011,469(7329):221-225.

(本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超)