

本文引用:刘慧芳,姜敏,马红霞.哮喘大鼠肺组织线粒体功能变化及其对氧化应激水平的影响[J].新乡医学院学报,2018,35(8):662-665. DOI:10.7683/xyxyxb.2018.08.004.

【基础研究】

# 哮喘大鼠肺组织线粒体功能变化及其对氧化应激水平的影响

刘慧芳,姜敏,马红霞

(新疆医科大学附属中医医院呼吸科,新疆 乌鲁木齐 830000)

**摘要:** **目的** 探讨哮喘大鼠肺组织细胞线粒体功能及氧化应激水平的变化。**方法** 将24只2~3个月龄雄性Sprague-Dawley大鼠随机分为哮喘模型组和正常对照组,每组12只。哮喘模型组大鼠第1、7天给予100 g·L<sup>-1</sup>卵清蛋白溶液1 mL腹腔注射致敏;第15天给予30 g·L<sup>-1</sup>卵清蛋白溶液雾化激发,每日1次,每次30 min,连续15 d,制作哮喘模型;正常对照组大鼠常规饲养。造模成功后水合氯醛麻醉,采集2组大鼠腹主动脉血检测血浆8-异前列腺素(8-iso)、硫代巴比妥物(TBARS)、活性氧(ROS)水平;分离2组大鼠肺组织,透射电镜下观察线粒体超微结构并检测肺组织细胞线粒体膜电位(MMP)、细胞色素C氧化酶(COX)和三磷酸腺苷(ATP)水平。**结果** 透射电镜下可见,哮喘模型组大鼠肺组织中肺泡Ⅱ型上皮细胞肿胀、脱落;板层体减少、肿胀,线粒体减少、肿胀,嵴结构不清;肺泡间隔增厚,可见嗜酸性粒细胞、巨噬细胞浸润,红细胞淤积。正常对照组大鼠肺组织中肺泡、肺泡Ⅱ型上皮细胞结构正常,肺泡间隔、血管壁无增厚。哮喘模型组大鼠血浆8-iso、TBARS、ROS水平高于正常对照组( $P < 0.05$ )。哮喘模型组大鼠肺组织线粒体MMP、COX及ATP水平均低于正常对照组( $P < 0.05$ )。**结论** 哮喘大鼠肺组织存在线粒体功能障碍,线粒体功能障碍可能是引起氧化应激的重要因素。

**关键词:** 哮喘;线粒体功能;氧化应激;大鼠

**中图分类号:** R256.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2018)08-0662-04

## Changes of mitochondrial function of cells in lung tissue and its effect on oxidative stress in asthmatic rats

LIU Hui-fang JIANG Min, MA Hong-xia

(Department of Respiration, Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumchi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the changes of mitochondrial function of cells in lung tissue and its effect on oxidative stress in asthmatic rats. **Methods** Twenty four male Sprague-Dawley rats aged 2–3 months were selected and randomly divided into asthma model group and normal control group, with 12 rats in each group. The rats of asthmatic model group were given 10% ovalbumin solution (1 mL) intraperitoneally sensitized on the first and the seventh day, then 3% ovalbumin solution was given by atomized inhalation on the fifteenth day, one time a day, 30 minutes each time for 15 days. The rats in the normal control group was reared routinely. The rats were anesthetized by chloral hydrate after modeling successfully. Abdominal aorta blood of all rats were collected to determine the plasma 8-isoprostane (8-iso), thiobarbituric acid reaction products (TBARS) and reactive oxygen species (ROS). The pulmonary tissue was isolated from the rats of the two groups to determine the mitochondrial transmembrane potential (MMP), activity of cytochrome C oxidase (COX), adenosine triphosphate (ATP) level and to observe the ultrastructure by transmission electron microscopy. **Results** Under the transmission electron microscope, the alveolar type II epithelial cells in the lung tissue were swollen and shedding, the lamellar body was reduced and swollen, mitochondria decreased and swelling, and the ridge structure was not clear; the alveolar septum was thickened; the eosinophils, macrophages infiltration and red cells deposition were observed in the asthmatic model group. In the normal control group, alveolar structure and alveolar type II epithelial cell structure was normal, alveolar septum was not thickened, and no thicken blood vessels wall was observed. The plasma levels of 8-iso, TBARS and ROS in the asthmatic model group was lower than those in the normal control group ( $P < 0.05$ ). The MMP, activity of COX, ATP level of lung tissue in the asthmatic model group was lower than those in the normal control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Mitochondrial dysfunction is found in lung

DOI: 10.7683/xyxyxb.2018.08.004

收稿日期: 2018-01-02

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金青年项目(编号: 2017D01C175)。

作者简介: 刘慧芳(1982-),女,甘肃武威人,硕士,主治医师,研究方向: 中西医结合呼吸系统疾病。

通信作者: 马红霞(1978-),女,江苏邳县人,硕士,副主任医师,研究方向: 中西医结合呼吸系统疾病; E-mail: jasmine0991@163.com。

tissue of asthmatic rats, and mitochondrial dysfunction may be an important factor contributing to oxidative stress.

**Key words:** asthma; mitochondrial function; oxidative stress; rat

支气管哮喘(简称哮喘)是一种以气道慢性炎症为特征的异质性疾病,不同程度的通气受限、气道高反应、黏液分泌增多是其主要发病特点,临床主要表现为反复发作的喘息、气促伴或不伴咳嗽<sup>[1]</sup>。哮喘反复发作可使气道结构重塑,严重影响患者的生活质量,所以深入研究并有效治疗哮喘极其迫切。目前研究已证实,机体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的蓄积是哮喘发病的关键环节<sup>[2-3]</sup>。机体内 95% 的 ROS 来源于细胞线粒体氧化磷酸化。线粒体是一种独立的细胞器<sup>[4-5]</sup>,是氨基酸、糖、脂肪等营养物质进行氧化并释放能量的场所,其主要功能是氧化磷酸化、合成三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP),提供直接能量,是自由基产生的主要来源。线粒体功能异常多指由于线粒体数量减少、膜受到破坏、呼吸链受到抑制、酶活性降低等引起的能量代谢障碍、产生 ROS 进而导致一系列相互作用的损伤过程。任何外源性或内源性病理因素引起线粒体损伤、呼吸链抑制,都会导致氧化磷酸化反应和氧化代谢的异常,进而产生大量的 ROS 和自由基。本研究通过测定哮喘模型大鼠及正常大鼠肺组织线粒体膜电位(mitochondrial transmembrane potential, MMP)、细胞色素 C 氧化酶(cytochrome C oxidase, COX)活性、ATP 水平及血浆 8-异前列腺素(8-iso-prostane, 8-iso)、硫代巴比妥物(thiobarbituric acid reaction product, TBARS)、ROS 水平并观察肺组织线粒体超微结构,旨在探讨哮喘大鼠肺组织细胞中线粒体功能及氧化应激水平的变化。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 2~3 个月龄雄性 Sprague-Dawley 大鼠 24 只,体质量(200±50)g,购自新疆医科大学动物中心(动物合格证号:65000700000599)。

**1.2 主要试剂与仪器** 卵清蛋白(≥98%)、JC-1(T4069)、ATP 检测试剂盒、COX 检测试剂盒购自美国 Sigma 公司;戊二醛固定液(电镜专用)购自北京雷根生物技术有限公司;TBARS、8-iso、ROS 酶联免疫吸附试验检测试剂盒购自北京安迪华泰科技有限公司。酶标仪、分光光度计、常温离心机、低温离心机购自美国 Thermo 公司;热恒温培养箱购自上海精宏实验设备有限公司;流式细胞仪购自德国 Merck 公司。

**1.3 动物分组及处理** 将所有大鼠随机分为哮喘模型组和正常对照组,每组 12 只。哮喘模型组大鼠第 1、7 天给予 100 g·L<sup>-1</sup> 卵清蛋白溶液 1 mL 腹腔注射致敏;第 15 天给予 30 g·L<sup>-1</sup> 卵清蛋白溶液雾化激发,每日 1 次,每次 30 min,连续 15 d,致敏后大鼠出现气促、鼻翼翕动、喷嚏、腹肌快速收缩等典型哮喘样发作样症状即为造模成功。正常对照组大鼠清洁动物房内室温下常规饲养。

**1.4 标本采集** 造模成功后,50 g·L<sup>-1</sup> 水合氯醛 1 mL·kg<sup>-1</sup> 麻醉大鼠,腹主动脉采血 4 mL,3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液,-80℃ 保存待测。同时分离肺组织,冰盐水冲洗,称取肺组织 100 mg,冰盐水冲洗后,立即用 20 g·L<sup>-1</sup> 戊二醛固定,树脂浸透、包埋、聚合,超薄切片,透射电镜下观察肺组织超微结构。再称取肺组织 100 mg,冰盐水冲洗后,采用组织匀浆法及梯度离心法提取肺组织线粒体。

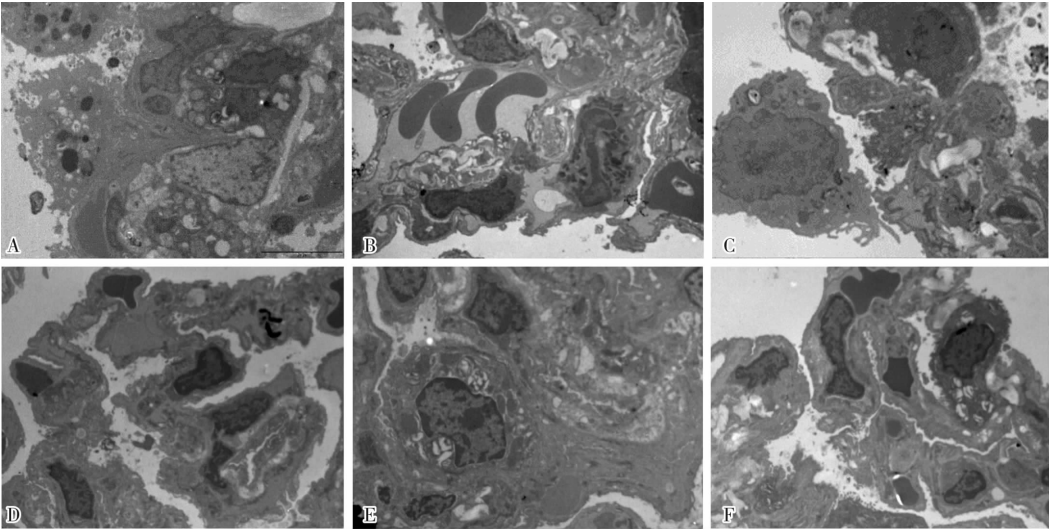
**1.5 大鼠血浆 8-iso、TBARS 和 ROS 水平检测** 采用酶联免疫吸附试验检测法测 2 组大鼠血浆 8-iso、TBARS 和 ROS 水平,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

**1.6 大鼠肺组织 MMP、COX 活性及 ATP 水平检测** 采用 JC-1 荧光探针流式细胞术检测 2 组大鼠肺组织 MMP,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行;采用 COX 检测试剂盒和 ATP 检测试剂盒检测肺组织线粒体中 COX 活性和 ATP 水平,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

**1.7 统计学处理** 应用 SPSS 17.0 软件进行数据处理,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,经正态性及方差齐性检验后,2 组间均数比较采用 *t* 检验;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 2 组大鼠肺组织超微结构** 结果见图 1。透射电镜下观察可见,哮喘模型组大鼠肺组织肺泡Ⅱ型上皮细胞肿胀,从基底面脱落;板层体减少、肿胀,线粒体数量减少、肿胀,嵴结构不清;肺泡间隔增厚,可见嗜酸粒细胞、巨噬细胞浸润,红细胞淤积。正常对照组大鼠肺组织肺泡和肺泡Ⅱ型上皮细胞结构正常,肺泡间隔和血管壁无增厚。



A: 哮喘模型组板层体减少、肿胀,线粒体减少、肿胀,嵴结构不清(×6 000);B: 哮喘模型组肺泡间隔增厚,可见嗜酸性粒细胞、巨噬细胞浸润,红细胞淤积(×5 000);C: 哮喘模型组肺泡Ⅱ型上皮细胞肿胀、脱落;板层体减少,线粒体减少、肿胀,嵴结构不清(×5 000);D~F:正常对照组(D、F:×5 000;E:×6 000)。

图 1 透射电镜下观察 2 组大鼠肺组织超微结构

Fig.1 Ultrastructural organization of lung tissue of the rats observed by transmission electron microscope in the two groups

2.2 2 组大鼠血浆 8-iso、TBARS 及 ROS 水平比较

结果见表 1。哮喘模型组大鼠血浆 8-iso、TBARS 及 ROS 水平高于正常对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

表 1 2 组大鼠血浆 8-iso、TBARS 及 ROS 水平比较

Tab.1 Comparison of 8-iso, TBARS and ROS levels between the asthma model group and normal control group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	8-iso/(ng·L <sup>-1</sup> )	TBARS/(ng·L <sup>-1</sup> )	ROS/(U·L <sup>-1</sup> )
正常对照组	12	656.47±103.49	305.94±156.41	0.43±0.45
哮喘模型组	12	782.49±60.54	454.59±154.54	0.96±0.42
t		3.641	2.342	3.011
P		<0.05	<0.05	<0.05

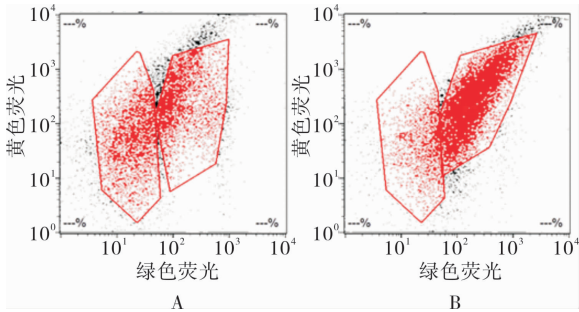
2.3 2 组大鼠肺组织 MMP、COX 活性、ATP 水平比较

结果见表 2 和图 2。哮喘模型组大鼠肺组织 MMP、COX 活性及 ATP 水平均低于正常对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

表 2 2 组大鼠肺组织 MMP、COX 活性、ATP 水平比较

Tab.2 Comparison of MMP,COX activity and ATP level in lung tissue between the asthma model group and normal control group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	MMP	COX/(U·mL <sup>-1</sup> )	ATP/(mmol·L <sup>-1</sup> )
正常对照组	12	2.02±1.09	0.04±0.01	0.99±0.84
哮喘模型组	12	0.99±0.84	0.05±0.02	2.02±1.09
t		-2.567	2.793	-2.21
P		<0.05	<0.05	<0.05



A: 正常对照组;B:哮喘模型组。

图 2 流式细胞术检测 2 组大鼠肺组织 MMP

Fig.2 MMP in lung tissue of the rats detected by flow cytometry in the two groups

3 讨论

支气管哮喘(简称哮喘)是一种以气道慢性炎症为特征的异质性疾病,机体内 ROS 的蓄积是哮喘发病的关键环节<sup>[2-3,6-7]</sup>。机体内 ROS 增多和蓄积引起气道组织细胞氧化损伤,导致大量炎性细胞聚集、活化,炎性介质释放,血管内皮受损后通透性增加,黏液分泌增多,气道反应性增高。而机体内 95% 的 ROS 来源于细胞线粒体氧化磷酸化。生理情况下,蛋白质、脂肪、糖等在细胞质中降解后进入线粒体,经过三羧酸循环,产生的氢离子进入线粒体内膜,在电子传递链(呼吸链)COX 的作用下,与氧分子结合进行氧化还原反应生成水和 ATP。正常情况下,氧还原为水的反应是无害的,当线粒体受损,COX 活性减低,呼吸链受到抑制,1 个或 2 个电子的转移就

会造成氧化磷酸化过程的异常,氧化还原反应的不完全导致超氧阴离子等 ROS 自由基的过度产生,由此造成机体内 ROS 蓄积和 ATP 合成减少<sup>[8-9]</sup>。膜电位是指细胞膜内外的电位差,当 ATP 的释放减少时,细胞膜内外离子的浓度发生改变,从而导致膜电位的下降。线粒体的氧化磷酸化主要通过线粒体内膜上的电子传递链(呼吸链)进行,机体内主要的 ROS 自由基均来源于线粒体内膜上呼吸链的氧化磷酸化反应。膜电位能够反映线粒体的活性,而 ATP 含量可以代表线粒体的功能是否正常,COX 活性决定着线粒体呼吸链功能是否受损抑制,是线粒体呼吸链功能的标志。线粒体功能还与线粒体的数量有关,当线粒体数量减少时,可引起线粒体功能降低。线粒体功能障碍可能会导致过量 ROS 产生,从而导致细胞内 ROS 蓄积和氧化损伤,促进炎症反应的发生。

哮喘发病的关键环节是 ROS 自由基的蓄积和氧化应激,由于机体内 ROS 主要来源于细胞线粒体,因此本研究对哮喘大鼠肺组织超微结构的观察及线粒体功能检测的结果显示,透射电镜下可见哮喘模型组大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞肿胀、脱落;板层体减少、肿胀;线粒体数量减少、肿胀,嵴结构不清;肺泡间隔增厚,可见嗜酸性粒细胞、巨噬细胞浸润,红细胞淤积;正常对照组大鼠肺泡结构正常,肺泡间隔无增厚。哮喘模型组大鼠肺组织 MMP、ATP、COX 活性较正常对照组显著下降,表明哮喘大鼠肺组织线粒体功能出现障碍,呼吸链受到抑制。哮喘模型组大鼠血浆 ROS、8-iso、TBARS 均较正常对照组显著升高,表明哮喘大鼠机体内存在 ROS 类物质的蓄积,与目前的研究<sup>[2-3]</sup>结果一致。肺组织由于解剖特点,同时受到内源性和外源性 ROS 的威胁,尽管外源性 ROS 会导致气道功能损伤,诱发哮喘等各种呼吸道疾病,但当疾病及病理状态已经形成,即使阻断 ROS 的来源,也无法阻止 ROS 的持续存在及其对组织的氧化损伤和疾病的进展<sup>[10-11]</sup>,而这种持续存在的 ROS 就是由内源性因素维系的,而在内源性因素中,线粒体呼吸作用是最主要的来源,线粒体的有氧

代谢主要通过线粒体内膜上呼吸链的氧化磷酸化进行,因此由于线粒体功能障碍和呼吸链的抑制,导致超氧阴离子等 ROS 自由基的过度产生、ATP 的减少及 MMP 的下降。因此,作者认为,哮喘大鼠存在肺组织线粒体功能障碍,而线粒体功能受损和呼吸链的抑制导致氧化磷酸化的异常,进而导致大量 ROS 自由基的生成,使氧化/抗氧化失衡。在哮喘发病过程中,线粒体功能障碍可能是引起氧化应激的重要因素。

参考文献:

[1] 孙莺. 健脾宣肺防喘汤对缓解期哮喘患儿气道反应性及哮喘控制的影响[J]. 世界中医药,2018,13(5):1195-1197.

[2] 赵彩霞. 支气管哮喘发病机制的研究进展[J]. 医学理论与实践,2016,29(7):870-872.

[3] KLENIEWSKA P,PAWLICZAK R. The participation of oxidative stress in the pathogenesis of bronchial asthma[J]. *Biomed Pharmacother*,2017,94:100.

[4] PALMIERI F,PIERRI C L,DE G A,*et al.* Evolution,structure and function of mitochondrial carriers;a review with new insights[J]. *Plant J*,2011,66(1):161-181.

[5] PRASAI K. Regulation of mitochondrial structure and function by protein import;a current review[J]. *Pathophysiology*,2017,24(3):107-122.

[6] 宋道兵. 孟鲁司特钠咀嚼片治疗儿童支气管哮喘疗效观察[J]. 新乡医学院学报,2017,34(12):1118-1120,1124.

[7] 牟京辉,邵明军,刘传合,等. 中国城市支气管哮喘儿童与非支气管哮喘儿童食物过敏患病情况比较[J]. 中华实用儿科临床杂志,2018,33(9):684-687.

[8] YK D,NOVGORODTSEVA T,KONDRAT'EVA E V,*et al.* Morpho-functional characteristics of blood cell mitochondria in bronchial asthma[J]. *Klin Med*,2015,93(10):47.

[9] ULAGANATHAN M,BALARAM G. Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome and asthma[J]. *J Allergy*,2013,2013:340476.

[10] 廖日滔,郭静科,李冰洁,等. 自由基相关细胞信号传导的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报,2014,36(11):1573-1583.

[11] ZHANG Q, QIU Z, CHUNG K F,*et al.* Link between environmental air pollution and allergic asthma:east meets west[J]. *J Thorac Dis*,2015,7(1):14-22.

( 本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博 )