

## 罗氟司特抑制吸烟诱导的慢性阻塞性肺疾病大鼠气道黏液高分泌的分子机制研究

董玉<sup>1)</sup>, 李满祥<sup>2)</sup>, 刘志燕<sup>1)</sup>

(1) 西安市中心医院呼吸内科; 2) 西安交通大学医学院第二附属医院呼吸内科, 陕西 西安 710003)

**[摘要]** **目的** 探讨磷酸二酯酶 4 抑制剂罗氟司特对慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 大鼠肺组织 MUC5AC 表达的影响及其分子机制。 **方法** Wistar 大鼠随机分为对照组、烟雾组、罗氟司特组、烟雾 + 罗氟司特组。对照组和罗氟司特组大鼠置于无烟环境中饲养, 烟雾组和烟雾 + 罗氟司特组大鼠暴露于有烟环境, 免疫组化法检测各组大鼠肺组织 MUC5AC、p-ERK1/2 及 p-JNK1/2 的表达, Western Blot 检测 MUC5AC、ERK1/2、p-ERK1/2、JNK1/2 p-JNK1/2 蛋白的表达情况。 **结果** 与对照组相比, 烟雾组大鼠肺组织 MUC5AC 的阳性率显著升高。且相关通路分子 ERK1/2 及 JNK1/2 的磷酸化水平明显升高。而烟雾 + 罗氟司特组 MUC5AC 的表达水平较烟雾组显著降低, 其 ERK1/2 及 JNK1/2 的磷酸化水平低于烟雾组。 **结论** 磷酸二酯酶 4 抑制剂罗氟司特可能通过抑制 ERK、JNK 等通路活化而减少吸烟鼠肺组织 MUC5AC 的表达, 改善 COPD。

**[关键词]** 罗氟司特; 慢性阻塞性肺疾病; 气道黏液高分泌; MUC5AC

**[中图分类号]** R563.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 04 - 0021 - 05

## The Molecular Mechanism of Roflumilast on Mucus Hypersecretion in Cigarette Smoking-induced COPD Rat Airway

DONG Yu<sup>1)</sup> LI Man-xiang<sup>2)</sup>, LIU Zhi-yan<sup>1)</sup>

(1) Dept. of Respiratory Medicine, Xi'an Central Hospital; 2) Dept. of Respiratory Medicine, The 2nd Affiliate Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Shanxi Xi'an 710003, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of phosphodiesterase-4 inhibitor roflumilast on airway mucus hypersecretion in rats and its molecular mechanism. **Methods** Wistar rats were randomly divided into control group, smoking group, roflumilast group, smoking + roflumilast group. Control group and roflumilast group rats were placed in smoke-free environment, while, rats in smoking group and smoking + roflumilast group are exposed to smoke environment. Immunohistochemical method was used to detect the expression of MUC5AC, p-ERK1/2 and p-JNK1/2 in lung tissue of each group. The protein expression of MUC5AC and related pathways molecular (ERK1/2, P-ERK1/2, JNK1/2, P-JNK1/2) were measured Western Blot. **Results** The protein expression levels of MUC5AC were significantly increased in lung tissue of smoking group as compared with the normal control group, accompanying with the increased phosphorylation level of ERK1/2, JNK1/2. The expression level of MUC5AC in smoking + roflumilast group was reduced significantly as compared with the smoking group, and the ERK1/2, JNK1/2 pathway activity was also inhibited. **Conclusion** Phosphodiesterase-4 inhibitor roflumilast can reverse the smoking induced MUC5AC expression in rat lung tissue and improve COPD via inhibiting ERK1/2, JNK1/2 pathway.

**[Key words]** Roflumilast; Chronic obstructive pulmonary disease; Airway mucus hypersecretion; MUC5AC

**[基金项目]** 陕西省科学技术研究发展计划基金资助项目 (2012K16-01-06)

**[作者简介]** 董玉 (1973~), 女, 陕西西安市人, 在读医学博士, 副主任医师, 主要从事呼吸系统疾病研究工作。

**[通讯作者]** 李满祥. E-mail:ongyu126@126.com

慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 已成为全球常见疾病和致人死亡的主要病因之一<sup>[1]</sup>。慢性阻塞性肺病以不完全可逆的进行性气流受限为特征, 迄今为止, 尚无一药显示能够减缓或中止慢性阻塞性肺病的进展。吸烟是公认的导致 COPD 最重要的危险因素之一<sup>[2,3]</sup>, 而气道黏液高分泌是 COPD 重要病理生理特征之一<sup>[4]</sup>。以咳嗽、咳痰为代表的慢性气道黏液高分泌现象已不仅仅是简单的临床症状, 黏液高分泌与 COPD 的发生、进展和临床结局密切相关, 是影响 COPD 患者肺功能、生命质量、住院率和病死率的重要因素, 基于气道黏液高分泌理论的去痰治疗已成为 COPD 治疗的重要靶点<sup>[5,6]</sup>, 并且已对传统的支气管舒张剂和糖皮质激素治疗提出了挑战。罗氟司特属口服磷酸二酯酶-4 (PDE4) 抑制剂, 2010 年 7 月已首次在欧盟获得批准, 是全球十多年来批准用于慢性阻塞性肺病治疗的第一个新型药效类别药物<sup>[7,8]</sup>。西班牙巴伦西亚大学药研室发现, 罗氟司特在人类气道上皮细胞 (A549) 可以抑制 EGF 诱导的 MUC5AC mRNA 和蛋白表达<sup>[9]</sup>。目前尚无在动物实验中的报道。之前的研究结果显示罗氟司特可以抑制吸烟诱导 COPD 鼠肺组织 MUC5AC 的表达, 本研究拟通过大鼠吸烟 COPD 模型, 对罗氟司特抑制气道黏液高分泌信号相关传导通路进行探讨, 从而为 COPD 预防和治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料和试剂

Wistar 大鼠购自西安交通大学医学院动物实验中心; 兔抗 MUC5 AC 抗体购自美国 Abcam; 兔抗 ERK1/2、JNK1/2 及磷酸化 p-ERK1/2、p-JNK1/2 抗体购自美国 Bioworld; SP 试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥。

### 1.2 COPD 大鼠模型建立及分组

分组: 选用 12 w 清洁级健康 Wistar 大鼠 24 只雌雄各半, 体重 190 ~ 220 g, 体重降次排序, 按随机数字表方法将大鼠分为对照组、烟雾组、药物组、烟雾 + 药物组 (简称烟 + 药组), 每组 6 只。饲养环境: 对照组和药物组大鼠置于无烟环境中饲养, 烟雾组和烟 + 药组大鼠暴露于有烟环境; 对照组和烟雾组大鼠以等剂量注射用水灌胃, 药物组和烟 + 药组大鼠用等剂量罗氟司特灌胃; 雌雄分箱同温 (18 ~ 20 °C)、同湿度 (40% ~ 60%), 自由饮水, 普通食料喂养 16 周。大鼠模型建立: (1)

罗氟司特灌胃: 药物组和烟 + 药组大鼠给予罗氟司特 0.5 mg/d, 每日上午 9:00 灌胃 1 次, 共 16 周。其他 2 组等量注射用水灌胃。(2) 熏烟: 将烟雾组和烟 + 药组大鼠置于自制有机玻璃染毒箱内, 箱顶留有直径为 1.5 cm 的通气孔, 箱内放置钠石灰吸收 CO<sub>2</sub>, 以无水 CaCl<sub>2</sub> 吸收水蒸气。将香烟点燃后接于烟嘴上, 用 60 mL 注射器连续吸入烟雾, 并通过接有三通的输液管注入箱内, 每次 16 支香烟, 箱中烟雾浓度约为 7%。抽吸完毕等待 30 min, 2 次/d, 间隔 4 h, 共 16 周。其他 2 组大鼠不熏烟, 常氧下相同时间和条件饲养。(3) 标本采集: 16 周后结束造模, 各组大鼠麻醉后行气管插管, 夹闭其右主支气管, 缓慢注入生理盐水 2 mL 灌注左肺, 反复 3 次, 回收率为 60% ~ 80%。BALF 以 1500 r/min 离心 10 min。取上清液 -70 °C 保存。取右肺叶, 由肺门至肺缘作最大切面。部分肺组织液氮保存待测, 其余肺组织浸泡于 10% 中性甲醛中固定 4 h, 常规制备石蜡切片, 待 HE 染色常规病理学检查及免疫组织化学检测。

### 1.3 免疫组化法检测大鼠支气管 / 肺组织黏蛋白 MUC5 AC 表达水平

采用过氧化物酶标记的链霉卵白素 (SP) 染色法, 石蜡切片常规脱蜡、水化, 3% 过氧化氢, 室温 5 ~ 10 min 以灭活内源性酶, 蒸馏水洗 3 次, 微波抗原修复, 滴加正常山羊血清封闭液, 室温 20 min; 滴加适当稀释的一抗 (1:50), 4 °C 过夜; 滴加相应的生物标记二抗, 湿盒内室温孵育 30 min, 滴加链霉卵白素 (PBS 稀释), 室温孵育 20 min; 二氨基联本胺 (DAB) 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 2 min, 将 DAB 底物工作液滴加于切片上, 显微镜下控制显色, 自来水充分冲洗终止显色反应。苏木素轻度复染, 脱水, 透明, 封片, 显微镜观察。

### 1.4 Western 法检测大鼠支气管 / 肺组织粘蛋白 MUC5 AC 表达水平

提取各组大鼠支气管 / 肺组织总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳, 半干转膜法转至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h。加一抗稀释液 4 °C 孵育过夜。TBST 缓冲液洗膜后加入二抗稀释液室温孵育 1 h。ECL 化学发光, 暗室显影。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS 软件包对数据进行统计学分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-t 检验。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠肺组织 MUC5AC 表达情况

阴性对照组大鼠肺组织均无明显 MUC5AC 表达; 而吸烟组大鼠肺组织 MUC5AC 表达阳性率为 100% (6/6), 与对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 单纯罗氟司特干预组未检测到 MUC5AC 表达; 烟雾 + 罗氟司特组大鼠肺组织 MUC5AC 表达阳性率为 50% (3/6), 高于阴性对照组 ( $P < 0.05$ ), 但明显低于单纯烟雾组 ( $P < 0.01$ ), 见表 1.

### 2.2 大鼠肺组织中 P-JNK1/2、P-ERK1/2 免疫组化分析

通过对烟雾组及烟雾 + 罗氟司特组大鼠肺组织 P-JNK1/2 进行免疫组化染色, 结果显示烟雾 + 罗氟司特组大鼠肺组织 P-JNK1/2 的染色强度明显低于单纯烟雾组 ( $P < 0.05$ ), 见图 1A 及图 1B. P-ERK1/2 的免疫组化染色结果与 P-JNK1/2 染色结果一致, 与单纯吸烟组相比, 烟雾 + 罗氟司特组大鼠肺组织 P-ERK1/2 染色强度显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 1C 及图 1D.

### 2.3 大鼠肺组织中 JNK1/2、P-JNK1/2、ERK1/2、P-ERK1/2 蛋白表达情况

运用 Western Blot 法检测各实验组肺组织相关信号通路分子的蛋白表达变化, 结果显示, 与对照组相比, 烟雾处理组的 JNK1/2 及 ERK1/2 总量无明显差异, 但其磷酸化水平 (P-JNK1/2 及 P-ERK1/2) 明显升高, 与对照组相比, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ). 单纯罗氟司特干预组的 P-ERK1/2 表达水平低于对照组 ( $P < 0.05$ ). 而烟雾 + 罗氟司特组大鼠肺组织的 P-JNK1/2 及 P-ERK1/2 表达水平虽高于对照组, 但明显低于烟雾组 (表 2、图 2).

表 1 MUC5AC 在各组大鼠肺组织中表达的阳性率

Tab. 1 Comparison of MUC5AC expressions in each group

组别	n	阳性率 (%)
对照组	6	0
烟雾组	6	100*
罗氟司特	6	0*
烟雾 + 罗氟司特	6	50**

与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与烟雾组比较, \*\* $P < 0.05$ .

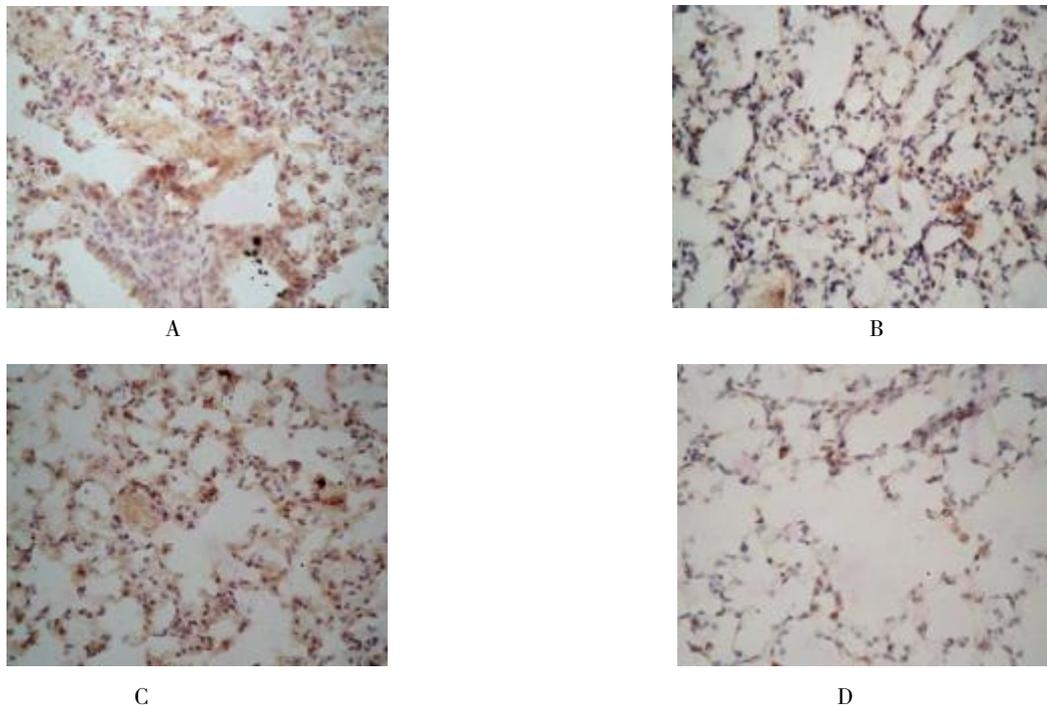


图 1 大鼠肺组织 P-JNK1/2 及 P-ERK1/2 免疫组化染色结果

Fig. 1 The immunohistochemical staining of P-JNK1/2 and P-ERK1/2 in lung tissue of rat

A: 烟雾组 P-JNK1/2 免疫组化染色; B: 烟雾 + 罗氟司特组 P-JNK1/2 免疫组化染色; C: 烟雾组 P-ERK1/2 免疫组化染色; D: 烟雾 + 罗氟司特组 P-ERK1/2 免疫组化染色.

表 2 各组 JNK1/2、p-JNK1/2、ERK 及 p-ERK 蛋白的表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ )Tab. 2 Protein expressions of JNK1/2, p-JNK1/2, ERK and p-ERK in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	JNK1/2	p-JNK1/2	ERK	p-ERK
对照组	6	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.04
烟雾组	6	0.97 ± 0.04	5.27 ± 0.16*	1.07 ± 0.10	2.07 ± 0.18*
罗氟司特	6	1.06 ± 0.07	1.36 ± 0.10*	0.95 ± 0.03	0.47 ± 0.04*
烟雾 + 罗氟司特	6	1.08 ± 0.04	2.62 ± 0.21#	1.03 ± 0.04	1.47 ± 0.13#

与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与烟雾组比较, # $P < 0.05$ .

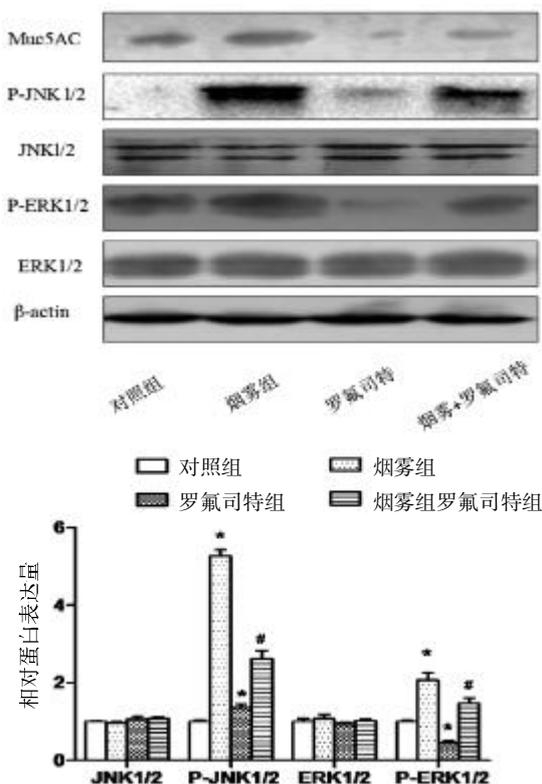


图 2 各组大鼠肺组织 MUC5AC、JNK1/2、P-JNK1/2、ERK1/2、P-ERK1/2 蛋白表达水平

Fig. 2 MUC5AC, JNK1/2, P-JNK1/2, ERK1/2, P-ERK1/2 protein expression in lung tissue of each group of rat

与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 烟雾组比较, # $P < 0.05$ .

### 3 讨论

伴随社会发展, 吸烟人数增多及环境严重污染, COPD 患病率和死亡率逐年上升, 严重影响人类健康<sup>[10]</sup>. 吸烟是 COPD 最重要的危险因素<sup>[3]</sup>, 而气道黏液高分泌是 COPD 重要病理生理特征之一. 而在目前已发现的 20 余种黏蛋白基因中, MUC5AC 是气道主要的分泌型黏蛋白, 在人气道上皮的杯状细胞中高度表达, 也是病理性增加的主要黏蛋白表型<sup>[11]</sup>. 本研究的结果表明, 烟雾诱导大鼠的气道及支气管 MUC5AC 的表达明显增

加, p-ERK1/2、p-JNK1/2 的表达也明显增加, 提示烟雾诱导的黏液高分泌状态, 可能是通过 P-ERK1/2 及 P-JNK1/2 通路调节 MUC5AC 的表达, 进而诱发 COPD.

最近的研究报道, 磷酸二酯酶-4 (PDE4) 抑制剂-罗氟司特, 能够舒张支气管、减轻水肿、抑制免疫及炎症细胞活性, 进而被广泛用于支气管哮喘和 COPD 的治疗<sup>[12]</sup>. 作为新型的抗炎药, 罗氟司特可以口服用药, 是全球十多年来批准用于慢性阻塞性肺病治疗的第一个新型药效类别药物. 罗氟司特作为选择性 PDE4 抑制剂的优势在于广泛抑制了 COPD 患者气道中各类炎症细胞的募集、炎症介质、细胞因子、趋化因子及蛋白酶的释放, 从而产生有效的抗炎作用<sup>[13]</sup>. 笔者的前期研究发现, 罗氟司特能够抑制黏液高分泌中 Muc5AC 表达, 继而改善气道黏液高分泌状态. 而对罗氟司特抑制蛋白表达的相关细胞信号转导机制目前还不明确. 本实验发现, 罗氟司特能够有效抑制烟雾诱导大鼠的气道及支气管 MUC5AC 的表达, 而同时 p-ERK1/2、p-JNK1/2 的表达也明显降低, 且与肺组织中 MUC5AC 表达的趋势一致, 表明罗氟司特可能是通过抑制 ERK 及 JNK 通路, 下调 MUC5AC 的表达, 进而抑制 COPD 气道黏液高分泌状态.

烟雾可以引起气道炎症反应和黏液高分泌状态, PDE4 抑制剂罗氟司特能够有效抑制黏蛋白 MUC5AC 的合成, 从而抑制 COPD 大鼠气道黏液高分泌, 而其作用机制, 可能与抑制 ERK 和 JNK 蛋白的活化有关.

### [参考文献]

- [1] VIJAYAN VK. Chronic obstructive pulmonary disease[J]. Indian J Med Res, 2013, 137(2):251-269.
- [2] 王西凤, 邢华. 吸烟对老年 COPD 患者肺功能和气道炎症反应的影响[J]. 疑难病杂志, 2013, 12(2):96-98.
- [3] RYAN D M, VINCENT T L, SALIT J, et al. Smoking Dysregulates the Human Airway Basal Cell Transcriptome at

(下转第 29 页)

- terations in brain protein kinase C isoforms following developmental exposure to a polychlorinated biphenyl mixture [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2003, 111(1-2): 123 - 135
- [6] PROVOST T L, JUAREZ D E K U L M, ZENDER C, et al. Dose and agedependent alterations in choline acetyltransferase (CHAT) activity, learning and memory, and thyroid hormones in 15- and 30-day old rats exposed to 1.25 or 12.5 PPM polychlorinated biphenyl (PCB) beginning at conception [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 1999, 23(5):915 - 928.
- [7] WU Q, OHSAKO S, ISHIMURA R, et al. Exposure of mouse preimplantation embryos to 2,3,7,8 - tetrachlorodibenzo - p-dioxin (TCDD) alters the methylation status of imprinted genes H19 and Igf2 [J]. *Biol Reprod*, 2004, 70 ( 6 ) : 1 790 - 1 797.
- [8] WIJNHOLDS J, CHOWDHURY K, WEHR R, et al. Segment specific expression of the neuronatin gene during early hindbrain development [J]. *Dev Biol*, 1995, 171 (1):73 - 84
- [9] ZHENG S, CHOU A H, JIMENEZ A L, et al. The fetal and neonatal brain protein neuroantigen protects PC12 cells against certain types of toxic insult [J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002, 136(2):101 - 110.
- [10] YU M L, HSU C C, GLADEN B C, et al. In utero PCB/PCDF exposure: relation of developmental delay to dysmorphology and dose [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 1991, 13 (2):195 - 202.
- [11] CHEN Y C, GUO Y L, HSU C C, et al. Cognitive development of Yu-Cheng ("oil disease") children prenatally exposed to heat-degraded PCBs [J]. *JAMA*, 1992, 268(22):3 213 - 3 218.

(2014 - 03 - 07 收稿)

(上接第 24 页)

- COPD Risk Locus 19q13.2 [J]. *PLOS ONE*, 2014, 9(2): e88 051.
- [4] VESTBO J. COPD: Definition and Phenotypes [J]. *Clin Chest Med*, 2014, 35(1):1 - 6.
- [5] 文富强, 申永春. 祛痰治疗在慢性阻塞性肺疾病中临床应用 [J]. *中华肺部疾病杂志(电子版)*, 2010, 3(4): 236 - 238.
- [6] 李彩霞, 田应选. 不同祛痰疗法对慢性阻塞性肺疾病患者的疗效观察 [J]. *白求恩军医学院学报*, 2009, 7 (5):299 - 300.
- [7] 马培奇. 慢性阻塞性肺病治疗新药罗氟司特 [J]. *上海医药*, 2011, 32(4):201 - 202.
- [8] 王瑞倩, 卞涛. 选择性磷酸二酯酶抑制剂罗氟司特在慢性阻塞性肺疾病抗炎作用的研究进展 [J]. *中华哮喘杂志(电子版)*, 2012, 6(6): 441 - 446.
- [9] MATA M, SARRIA B, BUENESTADO A, et al. Phosphodiesterase 4 inhibition decreases MUC5AC expression induced by epidermal growth factor in human airway epithelial cells [J]. *Thorax*, 2005, 60(2):144 - 152.
- [10] VIJAYAN V K. Chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Indian J Med Res*, 2013, 137(2):251 - 269.
- [11] DI Y P, ZHAO J, HARPER R. Cigarette smoke induces MUC5AC protein expression through the activation of Sp1 [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(33):27 948 - 27 958.
- [12] 杨君义. 选择性磷酸二酯酶4抑制药——罗氟司特 [J]. *医药导报*, 2012, 31(9):1 185 - 1 188.
- [13] 张哲, 卫小红. 罗氟司特治疗慢性阻塞性肺疾病患者的安全性和耐受性 Meta 分析 [J]. *临床合理用药杂志*, 2010, 3(4):8 - 11.

(2014 - 02 - 03 收稿)