



香烟烟雾暴露对大鼠支气管肺泡灌洗液及外周血 4-HNE 和 γ -GCS 表达的影响

张莉, 许建英

(山西医科大学第一医院, 太原 030001)

【摘要】 目的 研究香烟烟雾暴露对大鼠支气管肺泡灌洗液 (BALF) 及外周血 4-羟基壬稀醛 (4-hydroxynonenal, 4-HNE) 和 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (γ -Glutamylcysteine synthetase, γ -GCS) 表达的影响, 探讨 4-HNE 及 γ -GCS 在 COPD 氧化 / 抗氧化失衡发病机制中的作用。方法 30 只雄性 Wistar 大鼠随机分为不吸烟组、吸烟 6 周组和吸烟 12 周组; 采用双抗体夹心酶联免疫吸附 (ABC-ELISA) 法分别检测各组大鼠 BALF 及外周血 4-HNE 和 γ -GCS 的含量。结果 (1) 与不吸烟组 (15.917 ± 1.584 ; 12.305 ± 1.822) 比较, 吸烟 6 周组 (21.376 ± 2.80 ; 18.333 ± 2.585) 和吸烟 12 周组 (28.634 ± 2.999 ; 22.754 ± 3.882) 大鼠 BALF 和外周血中 4-HNE 含量明显增加, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01); 吸烟 12 周组与吸烟 6 周组比较有所增加, 差异也有统计学意义 ($P < 0.01$)。 (2) 与不吸烟组 (13.525 ± 2.311 ; 11.847 ± 1.171) 比较, 吸烟 6 周组 (15.802 ± 1.647 ; 16.221 ± 1.577) 大鼠 BALF 和外周血中 γ -GCS 的表达明显增加, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$; $P < 0.01$); 与不吸烟组比较, 吸烟 12 周组 (11.527 ± 1.606 ; 9.015 ± 1.569) 的表达明显减少, 差异也有统计学意义 ($P < 0.05$; $P < 0.01$)。 (3) 吸烟 6 周组 BALF 及外周血 4-HNE 和 γ -GCS 的表达呈正相关 ($r = 0.764$, $r = 0.674$), 吸烟 12 周组 BALF 中 4-HNE 和 γ -GCS 表达呈负相关 ($r = -0.777$), 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05), 而外周血中二者表达无显著相关性。结论 香烟烟雾暴露可使大鼠体液 4-HNE 及 γ -GCS 的表达水平增高, 随着吸烟时间延长, γ -GCS 逐渐降低, 提示二者在 COPD 氧化 / 抗氧化失衡中发挥一定的作用。

【关键词】 香烟烟雾; 氧化 / 抗氧化失衡; 4-羟基壬稀醛; γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)02-0043-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.002.010

Effect of Cigarette Smoke Exposure on the Expression of 4-HNE and γ -GCS in Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) and Peripheral Blood of Rats

ZHANG Li, XU Jian-ying

(Department of Respiratory Medicine, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

【Abstract】 Objective To explore the effect of cigarette smoke exposure on the expression of 4-hydroxynonenal (4-HNE) and gamma-glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and peripheral blood of rats. **Methods** Thirty male Wistar rats were randomly divided into three groups: non-smoking group, 6-weeks smoking group and 12-weeks smoking group. 4-HNE and γ -GCS in BALF and peripheral blood were quantitatively analyzed by avidin-biotin complex enzyme-linked immunosorbent assay (ABC-ELISA). **Results** (1) The expressions of 4-HNE in

BALF and peripheral blood of rats in the 6-weeks smoking group (21.376 ± 2.80 ; 18.333 ± 2.585) and the 12-weeks smoking group (28.634 ± 2.999 ; 22.754 ± 3.882) were significantly higher than those in the non-smoking group (15.917 ± 1.584 ; 12.305 ± 1.822) (all $P < 0.01$), and those of the 12-weeks smoking group were significantly higher than those of the 6-weeks smoking group (all $P < 0.01$). (2) The expression of γ -GCS in BALF and peripheral blood of rats in the 6-weeks smoking group (15.802 ± 1.646 ; 16.221 ± 1.577) were significantly higher than those in the non-smoking group (13.525 ± 2.311 ; 11.847 ± 1.171) ($P < 0.05$; $P < 0.01$), and those of the 12-weeks smoking group (11.527 ± 1.606 ; 9.015 ± 1.569) were significantly lower than those of the non-smoking group ($P < 0.05$; $P < 0.01$). (3) The level of 4-HNE in BALF and peripheral blood in the 6-weeks smoking group was positively related with that of γ -GCS ($r = 0.764$, $r = 0.674$), and the level of 4-HNE in BALF of the 12-weeks smoking group was negatively related with γ -GCS ($r = -0.777$) (all $P < 0.05$), but there was no significant correlation between the 4-HNE and γ -GCS in peripheral blood of the 12-weeks smoking group. **Conclusions** Cigarette smoke exposure can upregulate the expression of 4-HNE and γ -GCS in BALF and peripheral blood in rats. As smoking is prolonged, the expression of γ -GCS is gradually reduced, which indicates that 4-HNE and γ -GCS may play an important role in the oxidation/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease.

【Key words】 Cigarette smoke; Oxidation/antioxidant imbalance; 4-HNE; γ -GCS; Chronic obstructive pulmonary disease; Rats

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease COPD) 是一种以气道不完全可逆性阻塞为特征的慢性炎症性疾病,吸烟是其发生发展的重要病因,氧化/抗氧化失衡为其主要的发病机制之一^[1]。4-HNE 是脂质过氧化反应醛基产物中最具代表性的物质^[2],在 COPD 患者中,4-HNE 水平的升高在肺部炎症的信号转导中发挥作用,导致炎症介质和保护性抗氧化基因表达的失衡。 γ -GCS 是谷胱甘肽合成过程中的限速酶,它的数量、活性等直接影响谷胱甘肽的水平^[3],有学者发现^[4]吸烟所致 COPD 大鼠肺组织中 γ -GCS 含量较之不吸烟大鼠明显增高,研究亦证实^[5]4-HNE 对大鼠肺泡上皮细胞中 γ -GCS 的合成有明显的促进作用,另有部分研究表明, γ -GCS 在不吸烟者肺组织中较之吸烟者有更高的水平。以往对 4-HNE 和 γ -GCS 的研究多集中在细胞水平,本实验通过观察不同吸烟量、吸烟持续时间对大鼠 BALF 及外周血 4-HNE 和 γ -GCS 表达的影响及其相关性,探讨 4-HNE 及 γ -GCS 在 COPD 氧化/抗氧化失衡发病机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料与仪器

6~8 周龄雄性 Wistar 大鼠 {山西医科大学实验动物中心提供,合格证号 SXCK(晋)2009-0001} 30 只,平均体重 (200 ± 20) g。实验用香烟为湖南中烟工业公司生产的芙蓉牌过滤嘴香烟 (烟碱 1.0 mg/支,焦油 12 mg/支)。大鼠 4-HNE 和 γ -GCS 酶联免

疫吸附测定试剂盒均购自北京优博奥生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型建立与分组:实验动物分为不吸烟组、吸烟 6 周组和吸烟 12 周组,每组 10 只。分笼饲养于山西医科大学第一医院呼吸科实验室,室温 (20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度 40%~70%,普通饲料喂养,自由饮水进食。参照文献[4]自制实验性大鼠被动吸烟装置制备模型(自动助燃装置连接密闭玻璃箱)。吸烟组:每次吸烟 15 支,大约 2 h,每天吸烟 2 次(上、下午各一次),每周吸烟 6 d,各吸烟 6 周、12 周,不吸烟组大鼠正常饲养 12 周,与吸烟组饲养条件及环境相同。

1.2.2 标本采集:麻醉动物,开腹暴露腹主动脉,取动脉血 4 mL,肝素抗凝,离心并留取上清,EP 管分装, -70°C 冰箱中冻存 ELISA 备用;左肺用 4 mL 生理盐水行支气管肺泡灌洗,缓慢地经气道把液体注入肺脏,再缓慢回抽液体,反复推抽 4 次,重复 2 次,最终回抽量约 5~6 mL。3 000 r/min 离心 10 min 后,取上清液,EP 管分装,保存于 -70°C 冰箱 ELISA 待用。

1.2.3 BALF 及外周血中 4-HNE 含量的测定:采用双抗体夹心酶联免疫吸附 (ABC-ELISA) 法检测 BALF 及外周血中 4-HNE 的表达水平,实验步骤按试剂盒说明书进行,试剂盒灵敏度 pg/mL。

1.2.4 BALF 及外周血中 γ -GCS 含量的测定:采用双抗体夹心酶联免疫吸附 (ABC-ELISA) 法检测 BALF 及外周血中 γ -GCS 的表达水平,实验步骤按

试剂盒说明书进行,试剂盒灵敏度 U/mL。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件,所有数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间差异采用方差分析,多组样本均数两两比较,用 LSD-T 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。相关分析用 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 BALF 及外周血 4-HNE 含量的比较

吸烟 6 周组和吸烟 12 周组大鼠 BALF 及外周血 4-HNE 含量分别较不吸烟组明显增加,差异具有统计学意义 (P 均 < 0.01),吸烟 6 周组 4-HNE 含量较吸烟 12 周组低 ($P < 0.01$),差异有统计学意义。(表 1)

2.2 各组大鼠 BALF 及外周血 γ -GCS 含量的比较

吸烟 6 周组大鼠 BALF 及外周血 γ -GCS 含量较之不吸烟组增高, ($P < 0.05; P < 0.01$), 差异有统计学意义;吸烟 12 周组 γ -GCS 含量低于不吸烟组 ($P < 0.05; P < 0.01$), 差异也有统计学意义(表 2)。

2.3 4-HNE 含量与 γ -GCS 含量的相关分析

采用 Pearson 相关分析,对 4-HNE 含量及 γ -GCS 含量的实验数据进行综合分析,吸烟 6 周组 BALF 及外周血中二者表达呈正相关 ($r = 0.764, r = 0.674$);吸烟 12 周组 BALF 中二者表达呈负相关 ($r = -0.777$),而在外周血中二者表达无显著相关性。

3 讨论

正常情况下,肺部产生一定量的氧化物,同时肺部具有抗氧化系统,使氧化物的产生和清除处于

平衡状态。吸烟是 COPD 的主要危险因素,大量的研究证明,吸烟者和 COPD 患者体内的氧化负担加重。4-HNE 是脂质过氧化反应醛基产物中最具代表性的物质,生成后能保留在细胞膜中,只有一部分向周围介质中扩散并达到一定浓度,攻击远离原始自由基产生部位的靶目标。在 COPD 患者中,4-HNE 水平的升高在肺部炎症的信号转导中发挥作用,导致炎症介质和保护性抗氧化基因表达的失衡。 γ -GCS 是谷胱甘肽合成过程中的限速酶,分为重链 (γ -GCS-HS) 和轻链 (γ -GCS-LS) 两个亚基,它的数量、活性等直接影响谷胱甘肽的水平。谷胱甘肽是肺部抗氧化的重要屏障,可以保护细胞免受 4-HNE 的损伤。已知氧化应激可刺激大鼠支气管上皮细胞 γ -GCS 表达水平增加^[3]。4-HNE 通过对 AP-1 介导的信号传导途径的激活对 γ -GCS 的合成有明显的促进作用。但也有研究表明,与吸烟者相比, γ -GCS 在不吸烟者肺泡巨噬细胞中有更高的水平^[12]。本研究发现:吸烟 6 周组大鼠 BALF 及外周血 4-HNE 含量均显著高于不吸烟组;吸烟 6 周组大鼠 BALF 及外周血 γ -GCS 含量较之不吸烟组增高,差异均有统计学意义,同时本研究分别对 BALF 及外周血中 4-HNE 含量与 γ -GCS 含量作相关性比较显示吸烟 6 周组两者的表达呈正相关,因此认为大鼠体液中 4-HNE 的增加在一定程度上促进了 γ -GCS 的增加。有研究发现在小鼠吸入香烟烟雾 1 h 后,小鼠肺组织切片上与对照组相比可以观察到 4-HNE 水平升高^[6]。吸烟者与非吸烟者相比,在诱导痰中 4-HNE 含量明显增高。还有学者证实,随着吸烟时间的延长,支气管肺组织中 γ -GCS 的 mRNA

表 1 4-HNE 含量 (pg/mL) 表达 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)
Tab.1 The expression of 4-HNE in BALF and peripheral blood of the rats

| 组别 Groups | 肺泡灌洗液 BALF | 外周血 Peripheral blood |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 不吸烟组 Non-smoking | 15.917 ± 1.584 | 12.305 ± 1.822 |
| 吸烟 6 周组 6-weeks smoking | 21.376 ± 2.80 [△] | 18.333 ± 2.585 [△] |
| 吸烟 12 周组 12-weeks smoking | 28.634 ± 2.999 [▲] | 22.754 ± 3.882 [▲] |

注: [△] 与不吸烟组比较 $P < 0.01$; [▲] 与吸烟 6 周组比较, $P < 0.01$
[△] Compared with the non-smoking group, $P < 0.01$; [▲] Compared with the 6-weeks smoking group, $P < 0.01$

表 2 γ -GCS 含量 (U/mL) 表达 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)
Tab.2 The expression of γ -GCS in BALF and peripheral blood of the rats

| 组别 Groups | 肺泡灌洗液 BALF | 外周血 Peripheral blood |
|---------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 不吸烟组 Non-smoking | 13.525 ± 2.311 | 11.847 ± 1.171 |
| 吸烟 6 周组 6-weeks smoking | 15.802 ± 1.647 [△] | 16.221 ± 1.577 [▲] |
| 吸烟 12 周组 12-weeks smoking | 11.527 ± 1.606 ^{△●} | 9.015 ± 1.569 ^{▲●} |

注: [△] 与不吸烟组比较, $P < 0.05$; [▲] 与不吸烟组比较, $P < 0.01$; [●] 与吸烟六周组比较, $P < 0.01$
Note: [△] Compared with the non-smoking group, $P < 0.05$; [▲] Compared with the non-smoking group, $P < 0.01$; [●] Compared with the 6-weeks smoking group, $P < 0.01$

及其蛋白表达水平逐渐增高,本实验吸烟 6 周组与其结论基本相符^[4]。有报道研究了 23 例(包括 11 例 COPD 和 12 例非 COPD)现在和以往有相似吸烟年包数的肺切除患者后,证实 4-HNE 能在肺细胞水平上调 γ -GCS 的 mRNA^[7]。还有研究观察了在生理学相关剂量时 4-HNE 诱导 GSH 生物合成的信号传导途径,表明 4-HNE 通过 JNK 信号途径诱导谷胱甘肽的生物合成,并指出了由 AP-1 驱动在人支气管上皮细胞 γ -GCS 两个亚基的基因表达中所起的巨大作用^[8,9]。上述研究均提示了 4-HNE 在一定程度上可以诱导 γ -GCS 的产生,但本实验中导致该结果的确切机制尚不清楚。

本研究还发现:吸烟 12 周组大鼠 BALF 及外周血 4-HNE 含量高于吸烟 6 周组,而吸烟 12 周组 γ -GCS 含量低于不吸烟组,差异均有统计学意义。相关性分析显示吸烟 12 周组外周血中 4-HNE 与 γ -GCS 表达无相关性,而在 BALF 中二者表达呈负相关,提示随着 4-HNE 的大幅增加, γ -GCS 逐渐呈下降趋势,谷胱甘肽逐渐耗竭,长期香烟烟雾暴露引起了肺部氧化/抗氧化失衡,在最终导致 COPD 的发生发展过程中发挥着重要作用。有研究^[8]发现:谷胱甘肽浓度在 10 $\mu\text{mol/L}$ 4-HNE 刺激后 12 h 达到最高水平,24 h 后谷胱甘肽的水平开始降低,当细胞内谷胱甘肽被消耗时,细胞对 4-HNE 的毒性作用变得敏感。Harju 等^[10]通过免疫组织化学的方法对 22 位患有慢性阻塞性肺疾病(COPD)的患者,20 位吸烟没有患 COPD 者及 13 位终身未吸烟者进行研究,通过免疫电镜方法评定,证实 γ -GCS 重链和轻链两个亚单位大部分显著地表达在大气道,与所有吸烟者相比不吸烟者中央支气管上皮细胞 γ -GCS-HS 的表达显示更高的趋势,与吸烟者相比 γ -GCS-HS 和 γ -GCS-LS 在不吸烟者肺泡巨噬细胞有更高的水平。此研究还表明 γ -GCS 在吸烟者肺部气道内的免疫活性降低。另有研究也证实了该结论,该研究还发现 γ -GCS 在不吸烟非慢性支气管炎者表达最强,而在吸烟者与慢性支气管炎者的气道内表达下调。本实验对大鼠体液中的 γ -GCS 进行测定,吸烟 12 周组结果与在人中央支气管上皮细胞和肺泡巨噬细胞中的变化基本一致^[11]。已证实在生理条件下谷胱甘肽可以直接通过谷胱甘肽-S-转移酶与 4-HNE 反应形成复合物排出细胞,在 4-HNE 导致谷胱甘肽逐渐消耗中发挥作用,而在具体不同的细胞系中,该代谢途径仍报道不一^[12]。至于该解

毒机制是否导致了本实验中 γ -GCS 的逐渐降低,尚需后续的实验来证实。

氧化/抗氧化失衡是 COPD 的重要发病机制,近年来人们对 4-HNE 的认识已逐渐深入,长期接触香烟烟雾会导致肺内氧化产物的大量蓄积和抗氧化剂的不断消耗,4-HNE 的不断增加与抗氧化酶 γ -GCS 的逐渐消耗可能在 COPD 的发生发展过程中发挥重要作用,在未来的发展中,进一步深入探索二者表达的失衡与吸烟所致 COPD 的关系,有助于发现新的治疗方法用以预防或治疗慢性阻塞性肺疾病。

参考文献:

- [1] 何志义,冉丕鑫,钟南山. 氧化/抗氧化失衡与慢性阻塞性肺疾病[J]. 国外医学呼吸系统分册,2003,23:5-7.
- [2] Yang Y, Sharmal R, Sharmal A, et al. Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling[J]. Acta Biochim Pol,2003,50:319-336.
- [3] Yang H, Wang J, Huang ZZ, et al. Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the rat glutamate-cysteine ligase catalytic subunit [J]. Biochemical Journal, 2001, 357: 447-455.
- [4] 许建英,孙丽娜,庞敏. C-谷氨酰半胱氨酸合成酶/转化生长因子 β 1 在吸烟大鼠肺组织中的表达[J]. 山西医科大学学报,2009,40:103-107.
- [5] Liu RM, Borok Z, Forman HJ. 4-Hydroxy-2-nonenal increases γ -glutamylcysteine synthetase gene expression in alveolar epithelial cells [J]. Am J Resp Cell Mol Biol,2001,24:499-505.
- [6] Aoshiba K, Koinuma M, Yokohori N, et al. Immunohistochemical evaluation of oxidative stress in murine lungs after cigarette smoke exposure[J]. Inhal Toxicol, 2003,15:1029-1038.
- [7] Rahman I, van Schadewijk AA, Crowther AJ, et al. 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Resp Crit Care Med,2002,166:490-495.
- [8] Dickinson DA, Iles KE, Watanabe N, et al. 4-hydroxynonenal induces glutamate cysteine ligase through JNK in HBE1 cells [J]. Free Rad Biol Med, 2002,33:974-987.
- [9] Rinna A, Forman HJ. SHP-1 inhibition by 4-hydroxynonenal activates Jun N-terminal kinase and glutamate cysteine ligase [J]. Am J Resp Cell Mol Biol, 2008, 39:97-104.
- [10] Harju T, Kaarteenaho-Wiik R, Soini Y, et al. Diminished immunoreactivity of γ -glutamylcysteine synthetase in the airways of smokers' lung [J]. Am J Resp Crit Med, 2002,166:754-759.
- [11] 韩玲,许建英,姚宏. γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶在吸烟气道上皮细胞表达的研究[J]. 中国药物与临床,2011,11:279-282.
- [12] 陈娟,冉丕鑫. 4-羟基壬烯醛在疾病发生机制方面的研究进展[J]. 国际呼吸杂志,2006,26:821-824.

[修回日期]2011-09-20