

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.01287

## 白藜芦醇对博来霉素诱导小鼠肺损伤的保护作用

张红霞<sup>1,2△</sup>, 王蒙蒙<sup>3△</sup>, 李惠萍<sup>1\*</sup>

1. 同济大学医学院附属上海市肺科医院呼吸内科, 上海 200433

2. 上海市杨浦区控江医院呼吸内科, 上海 200093

3. 第二军医大学学员旅, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 研究白藜芦醇对博来霉素所致小鼠肺损伤的保护作用及其机制。**方法** 将雄性 ICR 小鼠随机分为对照组、博来霉素组、白藜芦醇组、博来霉素+白藜芦醇组, 每组 10 只。小鼠气管内滴注博来霉素(3 mg/kg)制作肺损伤模型, 白藜芦醇(0.3 mg/kg)在滴注博来霉素前注射于小鼠腹腔内。24 h 后取肺组织行 H-E 染色进行组织病理学观察, 用试剂盒检测氧化应激指标丙二醛(MDA)含量, 炎症因子髓过氧化物酶(MPO)活性, 炎症因子 IL-6、IL-8、IL-10 水平。**结果** 白藜芦醇治疗可以改善小鼠肺组织因博来霉素所致的损伤性病理变化。经白藜芦醇治疗后, 博来霉素诱导的氧化应激反应得到抑制, 脂质过氧化生物标记物 MDA 含量减少( $P<0.01$ ); 博来霉素导致的肺部炎症反应减轻, MPO 活性降低( $P<0.01$ ), IL-6、IL-8 水平下降(IL-6:  $P<0.01$ ; IL-8:  $P<0.05$ ), IL-10 水平增加( $P<0.01$ )。**结论** 白藜芦醇对博来霉素所致的小鼠肺损伤有一定的保护作用, 作用机制可能与其抑制氧化应激及炎症反应有关。

**[关键词]** 白藜芦醇; 博来霉素; 肺损伤; 炎症; 氧化性应激

**[中图分类号]** R 563

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2013)12-1287-04

### Resveratrol protects against bleomycin-induced lung injury in mice

ZHANG Hong-xia<sup>1,2△</sup>, WANG Meng-meng<sup>3△</sup>, LI Hui-ping<sup>1\*</sup>

1. Department of Respiratory Medicine, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200433, China

2. Department of Respiratory Medicine, Kongjiang Hospital of Shanghai Yangpu District, Shanghai 200093, China

3. Student Brigade, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To study the protective effects of the resveratrol on bleomycin-induced lung injury in mice and its underlying mechanism. **Methods** Male ICR mice were randomly divided into four groups ( $n=10$ ): control group, bleomycin group, resveratrol group, and bleomycin+resveratrol group. Mice were anesthetized and infused intratracheally with 3 mg/kg bleomycin to create lung injury model. Resveratrol (0.3 mg/kg) was administered intraperitoneally before bleomycin infusion. The severity of pulmonary injuries was evaluated 24 h after inducing lung injury. H-E staining was used to assess the lung pathology. The levels of lipid peroxidation marker malondialdehyde (MDA), neutrophil infiltration marker myeloperoxidase (MPO) activity, and cytokines IL-6, IL-8, and IL-10 were determined by commercial kits. **Results** Resveratrol treatment improved the bleomycin-induced lung injury in mice by significantly inhibiting the oxidative stress and decreasing lipid peroxidation marker MDA level ( $P<0.01$ ). Resveratrol treatment also attenuated the bleomycin-induced pulmonary infection by significantly decreasing MPO activity ( $P<0.01$ ) and the production of pro-inflammatory cytokines IL-6 ( $P<0.01$ ) and IL-8 ( $P<0.05$ ) and increasing anti-inflammatory cytokine IL-10 production ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Resveratrol can protect against bleomycin-induced lung injury in mice, probably through its antioxidant and anti-inflammatory effects.

**[收稿日期]** 2013-08-18

**[接受日期]** 2013-10-11

**[基金项目]** 2013 年度上海市卫生和计划生育委员会委级科研项目(2013-347). Supported by Science and Technology Projects of Shanghai Municipal Health and Family Planning Commission (2013-347).

**[作者简介]** 张红霞, 硕士. E-mail: zhanghongxia7512@126.com; 王蒙蒙, 第二军医大学临床医学专业 5 年制 2011 级学员. E-mail: mengmengwang@163.com

△共同第一作者(Co-first authors).

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-35090031, E-mail: lihuiping1234567@163.com

[Key words] resveratrol; bleomycin; lung injuries; inflammation; oxidative stress

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(12): 1287-1290]

各种肺内外病因均可导致急性、进行性肺脏病变,进展到最终严重阶段则被定义为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)。ARDS是临床上常见的危重疾病,即使在医疗水平已经显著提高的当下,其病死率仍高达35%~40%<sup>[1]</sup>。

白藜芦醇(resveratrol, RSV)是一种天然植物多酚,主要存在于葡萄、浆果和坚果等植物中。鉴于白藜芦醇已知具有包括抑制肿瘤、抗炎、抗氧化和代谢调节等多种生物活性<sup>[2]</sup>,这种天然活性物质受到越来越多的关注。我们以往的研究发现白藜芦醇可以减轻革兰阴性菌胞壁成分脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的肺损伤<sup>[3]</sup>,但是对于非感染因素所致的肺损伤是否同样具有保护作用尚不清楚。本研究通过博来霉素(bleomycin, BLM)气管内滴注方式构建非感染性肺损伤小鼠模型,观察白藜芦醇对肺组织病理、氧化应激和炎症反应的调节作用。

## 1 材料和方法

1.1 试剂及动物 白藜芦醇(批号: R5010)和博来霉素(批号: B2434)购自 Sigma-Aldrich 公司。ICR 小鼠,雄性,体质量 25~30 g,由中国上海斯莱克实验动物有限公司提供,实验动物生产许可证号: SCXK(沪)2012-0003,使用许可证号: SYXK(沪)2012-0003。

1.2 动物分组及处理 将 ICR 小鼠随机分为 4 组:对照组、博来霉素组、白藜芦醇组、博来霉素+白藜芦醇组,每组 10 只。对小鼠进行麻醉。将博来霉素溶解在无菌生理盐水中,以 3 mg/kg 的剂量进行气管内滴注制作肺损伤模型。白藜芦醇溶解于无菌生理盐水后以 0.3 mg/kg 的剂量在滴注博来霉素前注射于小鼠腹腔内。对照组给予同等体积的生理盐水。24 h 后处死小鼠并取肺组织进行检测。

1.3 小鼠肺组织病理学观察 取各组小鼠左下肺组织,用 10% 甲醛溶液固定,行石蜡包埋切片,脱蜡后行 H-E 染色。

1.4 小鼠肺组织丙二醛(MDA)含量测定 各组小鼠分别取 100 mg 肺组织进行匀浆,离心后取上清,采用南京建成科技有限公司相关试剂盒检测 MDA 水平。

1.5 小鼠肺组织炎症因子检测 各组小鼠分别取 100 mg 肺组织进行匀浆,离心后取上清,采用南京

建成科技有限公司相关试剂盒检测髓过氧化物酶(MPO)活性,采用 R&D 公司的 ELISA 试剂盒分别检测 IL-6、IL-8 和 IL-10 水平。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,计量数据以  $\bar{x} \pm s_x$  表示,多组数据间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 SNK-*q* 检验,检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 小鼠肺组织病理学改变 H-E 染色发现,与对照组(图 1A)相比,博来霉素处理导致肺组织内弥漫性间质水肿、肺泡增厚,在肺间质及肺泡内有广泛的白细胞浸润(图 1B)。白藜芦醇处理本身对肺组织没有显著影响(图 1C),然而白藜芦醇处理明显减轻博来霉素所致的肺损伤病理改变(图 1D)。

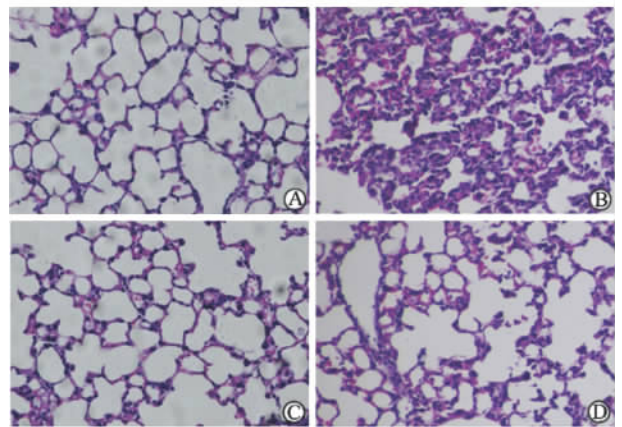


图 1 小鼠肺组织切片 H-E 染色观察

Fig 1 H-E staining of mouse lung tissues

A: Control group; B: Bleomycin group; C: Resveratrol group; D: Bleomycin+resveratrol group. Original magnification:  $\times 400$

2.2 白藜芦醇抑制博来霉素诱导的肺组织急性氧化应激反应 MDA 是检测膜脂质过氧化水平的生物学标记物。由图 2 可见,博来霉素处理的小鼠肺组织内 MDA 含量高于对照组( $P < 0.01$ ),说明博来霉素导致小鼠肺组织发生氧化应激反应。与对照组相比,白藜芦醇处理本身对肺组织内 MDA 含量没有显著影响,然而白藜芦醇处理可明显抑制博来霉素所致的 MDA 含量增多( $P < 0.01$ )。结果表明白藜芦醇可以抑制博来霉素诱导的肺组织急性氧化应

激反应。

2.3 白藜芦醇抑制博来霉素诱导的肺组织中性粒细胞浸润 MPO 是检测组织中中性粒细胞浸润的生物学标记物。由图 3 可见, 博来霉素处理的小鼠肺组织内 MPO 活性明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 说明博来霉素导致小鼠肺组织中中性粒细胞浸润增多。与对照组相比, 白藜芦醇处理本身对肺组织内 MPO 活性没有显著影响, 然而白藜芦醇处理可明显抑制博来霉素所致的 MPO 活性升高 ( $P < 0.01$ )。结果表明白藜芦醇可以抑制博来霉素诱导的肺组织中中性粒细胞浸润。

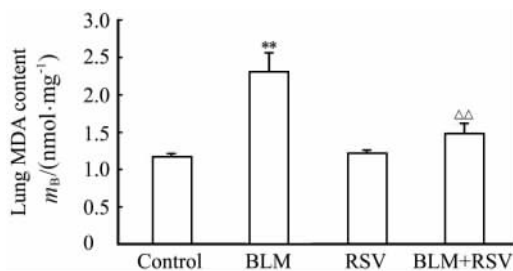


图 2 白藜芦醇抑制博来霉素诱导的小鼠肺组织急性氧化应激反应

Fig 2 Inhibitory effect of resveratrol (RSV) against acute oxidative stress in lung tissues of BLM-induced lung injury mice

BLM: Bleomycin; MDA: Malondialdehyde. \*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs BLM group.  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s_x$

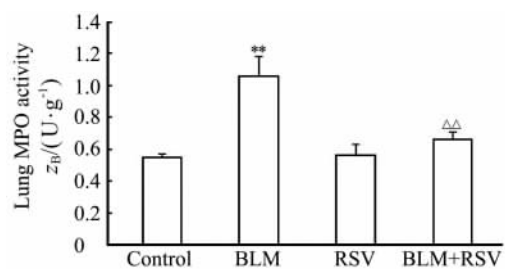


图 3 白藜芦醇抑制博来霉素诱导的小鼠肺组织中性粒细胞浸润

Fig 3 Inhibitory effect of resveratrol (RSV) against neutrophil infiltration in lung tissues of BLM-induced lung injury mice

BLM: Bleomycin; MPO: Myeloperoxidase. \*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs BLM group.  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s_x$

2.4 白藜芦醇抑制博来霉素诱导的肺组织内 IL-6 和 IL-8 表达 由图 4 可见, 博来霉素处理的小鼠肺组织内促炎因子 IL-6 和趋化因子 IL-8 表达水平明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 说明博来霉素所致小鼠肺

组织炎症反应增强。与对照组相比, 白藜芦醇处理本身对肺组织内 IL-6 和 IL-8 表达水平没有显著影响, 然而白藜芦醇处理可明显抑制博来霉素所致的肺组织内 IL-6 和 IL-8 表达 (IL-6:  $P < 0.01$ , IL-8:  $P < 0.05$ )。结果表明白藜芦醇可以抑制博来霉素诱导的肺组织炎症反应。

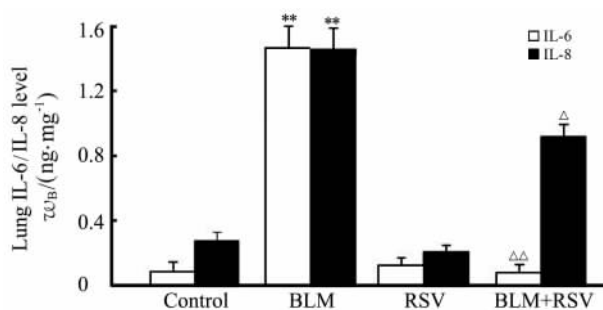


图 4 白藜芦醇抑制博来霉素诱导的小鼠肺组织内 IL-6 和 IL-8 的表达

Fig 4 Inhibitory effect of resveratrol (RSV) against IL-6 and IL-8 expression in lung tissues of BLM-induced lung injury mice

BLM: Bleomycin; IL: Interleukin. \*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs BLM group.  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s_x$

2.5 白藜芦醇逆转博来霉素诱导的肺组织内 IL-10 表达降低 由图 5 可见, 博来霉素处理的小鼠肺组织内抗炎因子 IL-10 表达水平明显低于对照组 ( $P < 0.01$ )。与对照组相比, 白藜芦醇处理本身对肺组织内 IL-10 表达没有显著影响, 然而白藜芦醇处理可明显逆转博来霉素对肺组织 IL-10 的表达抑制 ( $P < 0.01$ )。结合 IL-6 和 IL-8 表达的检测结果, 提示白藜芦醇可以在抑制促炎介质表达同时还可促进抗炎介质表达, 从而抑制博来霉素诱导的肺组织炎症反应。

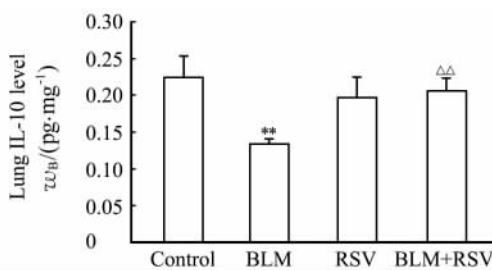


图 5 白藜芦醇逆转博来霉素诱导的小鼠肺组织内 IL-10 的表达降低

Fig 5 Resveratrol (RSV) promoting IL-10 levels in lung tissues of BLM-induced lung injury mice

BLM: Bleomycin; IL: Interleukin. \*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs BLM group.  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s_x$

### 3 讨论

肺组织由于其独特的结构和功能极易受到氧化应激的影响<sup>[4]</sup>。在正常条件下,肺内抗氧化剂和促氧化剂的水平处于平衡状态<sup>[2]</sup>。各种原因导致的促氧化物质生成超过组织本身抗氧化能力后造成的氧化应激是多种急慢性肺部疾病,如 ARDS、肺缺血再灌注损伤等的重要致病机制<sup>[5]</sup>。MDA 是反映组织中脂质过氧化物含量的生物标记物,可以间接评价组织氧化应激水平<sup>[6]</sup>。本研究观察到在博来霉素导致的非感染性肺损伤中,肺组织中 MDA 含量明显升高,说明博来霉素可以导致肺组织发生氧化应激损伤。已有研究表明,白藜芦醇具有抗氧化作用,它不仅可以直接清除组织中的活性氧成分<sup>[7]</sup>,还可间接地通过提高抗氧化酶的活性而发挥抗氧化作用<sup>[8]</sup>。本研究结果表明白藜芦醇治疗可降低博来霉素所致 ARDS 小鼠肺组织中的 MDA 含量,提示白藜芦醇在博来霉素导致的非感染性肺损伤中发挥着抑制氧化应激的作用。

已知炎症反应在 ARDS 中起着重要的作用<sup>[9]</sup>。肺组织的炎症反应表现为中性粒细胞迁移和滞留在肺部,进而在趋化因子的作用下扩大此反应<sup>[10]</sup>。已有报道表明,在多种原因导致的 ARDS 肺组织中存在炎症反应,表现为促炎因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-8 水平明显升高,抗炎因子 IL-10 水平显著降低<sup>[11-12]</sup>。动物实验发现 IL-10 治疗可使移植后肺损伤动物肺组织内促炎细胞因子表达明显减少,从而提示 IL-10 的抗炎作用对 ARDS 有显著保护作用<sup>[13]</sup>。目前多项研究结果已证实白藜芦醇具有一定的抗炎作用。白藜芦醇可以抑制促炎转录因子核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) 的活性,抑制促炎细胞因子表达等<sup>[8]</sup>。本研究结果发现,在博来霉素导致的非感染性肺损伤中,肺组织内 MPO 活性升高,促炎因子 IL-6、IL-8 表达水平增加,抗炎因子 IL-10 表达水平降低。这些结果提示博来霉素确实造成了肺部急性炎症反应。进一步观察发现,经白藜芦醇药物治疗后,可以明显抑制博来霉素诱导的促炎细胞因子 IL-6 和 IL-8 表达,也可减少中性粒细胞的浸润、抑制 MPO 活性,同时促使抗炎细胞因子 IL-10 表达的增加,结果表明白藜芦醇可以抑制博来霉素导致的非感染性肺损伤中的炎症反应。

综上所述,我们的研究结果表明,白藜芦醇对博来霉素诱导的小鼠肺损伤具有保护作用,这一保护作用的机制可能与其抗氧化应激和抗炎作用有关。

### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

### [参考文献]

- [1] Shafeeq H, Lat I. Pharmacotherapy for acute respiratory distress syndrome[J]. *Pharmacotherapy*, 2012, 32:943-957.
- [2] Wood L G, Wark P A, Garg M L. Antioxidant and anti-inflammatory effects of resveratrol in airway disease[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13:1535-1548.
- [3] Zhang H X, Duan G L, Wang C N, Zhang Y Q, Zhu X Y, Liu Y J. Protective effect of resveratrol against endotoxemia-induced lung injury involves the reduction of oxidative/nitrative stress[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2013 Aug 3, pii: S1094-5539(13)00147-8.
- [4] Guo R F, Ward P A. Role of oxidants in lung injury during sepsis[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9:1991-2002.
- [5] Crapo J D. Redox active agents in inflammatory lung injury[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 168:1027-1028.
- [6] Larsen M, Webb G, Kennington S, Kelleher N, Sheppard J, Kuo J, et al. Mannitol in cardioplegia as an oxygen free radical scavenger measured by malondialdehyde[J]. *Perfusion*, 2002, 17:51-55.
- [7] Wang J, He D, Zhang Q, Han Y, Jin S, Qi F. Resveratrol protects against Cisplatin-induced cardiotoxicity by alleviating oxidative damage[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2009, 24:675-680.
- [8] Chung J H, Manganiello V, Dyck J R. Resveratrol as a calorie restriction mimetic: therapeutic implications[J]. *Trends Cell Biol*, 2012, 22:546-554.
- [9] Crimi E, Slutsky A S. Inflammation and the acute respiratory distress syndrome [J]. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2004, 18:477-492.
- [10] Zhou X, Dai Q, Huang X. Neutrophils in acute lung injury[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2012, 17:2278-2283.
- [11] Kumar A, Zanotti S, Bunnell G, Habet K, Añel R, Neumann A, et al. Interleukin-10 blunts the human inflammatory response to lipopolysaccharide without affecting the cardiovascular response[J]. *Crit Care Med*, 2005, 33:331-340.
- [12] Yang T, Zhang J, Sun L, Zhu X, Li J, Wang J, et al. Combined effects of a neutrophil elastase inhibitor (sivelestat sodium) and a free radical scavenger (edaravone) on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats[J]. *Inflamm Res*, 2012, 61:563-569.
- [13] Fischer S, Liu M, MacLean A A, de Perrot M, Ho M, Cardella J A, et al. *In vivo* transtracheal adenovirus-mediated transfer of human interleukin-10 gene to donor lungs ameliorates ischemia-reperfusion injury and improves early posttransplant graft function in the rat[J]. *Hum Gene Ther*, 2001, 12:1513-1526.