

低浓度乙醇对糖尿病大鼠肺纤维化的影响

宫蓓蕾 王文连 刘黎明 赵成岭 胡俊锋

【摘要】 目的 探讨低浓度乙醇对糖尿病大鼠肺纤维化的影响。**方法** 应用 24 只 SD 大鼠复制 I 型糖尿病大鼠模型,平均分为正常对照组(CON 组)、低剂量乙醇组(EtOH 组)、糖尿病组(DM 组)和糖尿病+低剂量乙醇组(DM+EtOH 组)四组,每组 6 只。分别喂养 6~12 周。称取大鼠肺湿重及体重,计算肺系数;HE 染色观察肺脏形态变化,Western blot 检测肺脏组织线粒体乙醛脱氢酶 2(ALDH2)蛋白表达。天狼猩红染色观察肺脏纤维化变化。ELISA 法测定肺脏组织 AGE 含量变化。**结果** 与 CON 组相比,DM 组大鼠肺系数明显增大,肺组织结构破坏明显,肺组织 ALDH2 蛋白表达降低,12 周组较 6 周组损伤加重。12 周 DM 组肺脏 AGE 含量和胶原纤维增加。与 DM 组相比,DM+EtOH 组肺组织病理改变减轻,ALDH2 蛋白表达升高,胶原纤维和 AGE 含量减少。**结论** 低浓度乙醇可减轻糖尿病大鼠肺组织形态结构变化,肺纤维化程度减轻,可能与其抑制线粒体 ALDH2 表达有关。

【关键词】 糖尿病; 乙醛脱氢酶 2; 大鼠; 肺纤维化

[中图分类号]R587.1 [文献标识码]A DOI:10.3969/j.issn.1002-1256.2020.24.001

Low concentration of ethanol ameliorate diabetes induced lung fibrosis in rat model GONG Bei-lei.

Department of respiratory and critical care medicine, the first affiliated hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui, 233030, China.

【Abstract】 Objective To investigate the effect of low concentration of ethanol on lung fibrosis in diabetic rat model.**Methods** Type I diabetic rats were prepared in 24 rats and grouped into 4 groups: normal control group (CON group), low dose ethanol group (EtOH group), diabetes mellitus group (DM group), diabetes plus low dose ethanol group (DM+EtOH group), 6 rats in each group. The rats were feed for 6 weeks and 12 weeks respectively. The lung wet weight and body weight of rats were weighed, and the lung coefficient was calculated. The changes of lung morphology were observed by HE staining method, ALDH2 protein expression was measured by Western blot. The changes of lung fibrosis were measured by Sirius red staining method. The lung AGE content was measured by ELISA method.**Results** Compared with the CON group, the lung coefficient in the DM group was increased, obvious damage of lung tissue structure was observed, ALDH2 protein expression was decreased, when compared with the rats in DM-6 weeks group, the injury was aggravated in DM-12 weeks group. In DM-12 weeks group, the collagen fiber numbers and AGE contents were increased. Compared with the DM group, the lung pathological change was alleviated in DM+EtOH group, ALDH2 protein expression was increased, the collagen fiber numbers and AGE content were reduced.**Conclusions** Low dose ethanol could attenuate morphological and structural changes of lung tissue and lung fibrosis degree in diabetic rats, which may be related to depress ALDH2 expression in mitochondria.

【Key words】 Diabetes mellitus; Acetaldehyde dehydrogenase 2; Rat; Lung fibrosis

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一种常见的代谢紊乱性疾病,其致死致残率与其并发症密不可分。肺损伤是糖尿病严重的并发症之一,随糖尿病病程延长,患者常出现肺部感染、肺纤维化、呼吸功能障碍等,严重影响生活质量^[1]。如何减轻糖尿病肺损伤近年来引起关注。已有报道低浓度乙醇可发挥脏

器保护作用。外源性乙醇干预可减轻肾小管上皮细胞缺血/再灌注损伤^[2],低剂量乙醇干预可减轻糖尿病大鼠心肌损伤,其机制可能与激活线粒体乙醛脱氢酶 2(aldehyde dehydrogenase 2, ALDH2)、减轻氧化应激损伤等有关^[3]。脏器纤维化改变严重影响脏器正常功能,是多种慢性疾病的共同病理特征,肺脏纤维化表现为肺泡结构紊乱、肺泡实变、纤维增生等,严重时导致肺功能衰竭^[4]。随糖尿病病程延长,肺组织是否发生结构改变和纤维化变化?本研究采用低浓度乙醇喂养糖尿病大鼠,观察随病程延长糖尿病大鼠肺脏结构和肺纤维化的变化,分析低浓度乙醇是否可改善糖尿病大鼠肺纤维化的发生。

基金项目:安徽省自然科学基金项目(1808085MH280);蚌埠医学院第一附属医院科技发展基金项目(Byyfykj201702)

作者单位:233004 蚌埠医学院第一附属医院呼吸与危重症医学科(宫蓓蕾、刘黎明、赵成岭、胡俊锋),210000 南京中医药大学附属南京医院(南京市第二医院)结核科(王文连)

通信作者:胡俊锋,Email:bbmchj@126.com

一、材料与方法

1.实验材料:雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠由蚌埠医学院实验动物中心提供,体重 150~180 g,自由饮水、饮食,环境温度在 26 ℃ 左右。大鼠普通饲料适应性喂养 1 周后开始实验;链脲佐菌素 (streptozocin,STZ)购自美国 sigma 公司,细胞蛋白提取液、蛋白酶抑制剂 (PMSF)、BCA 蛋白定量试剂购自上海碧云天公司,兔抗大鼠 ALDH2 购自美国 Abcam 公司,HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体购自武汉博士德生物公司。AGEs 的 ELISA 试剂盒购自苏州卡尔文生物科技有限公司;高速离心机 (BECKMAN, 德国),酶标仪 (BIOTEK, 美国),ChemiDo-cTM Toch Image Syste 化学发光仪 (BIO-RAD, 美国),罗氏血糖仪 (ACCU-CHEK 德国)。

2.实验方法:(1) 糖尿病肺损伤模型建立:大鼠随机分 4 组:正常对照组 (CON 组)、低剂量乙醇组 (EtOH 组)、糖尿病组 (DM 组)、糖尿病+低剂量乙醇组 (DM+EtOH 组)。糖尿病大鼠过夜禁食 12 h 后,称取体重,单次快速腹腔注射 1% 的 STZ (55 mg/kg)。72h 后尾静脉采血检测大鼠空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L 并持续 1 周为造模成功。造模成功后 EtOH 组、DM+EtOH 组大鼠先以 2.5% 的乙醇适应性喂养 1 周,之后以 5% 的乙醇持续喂养 6~12 周,其他组大鼠常规饮水至 6 周和 12 周。(2) 大鼠肺系数测定:大鼠禁食 12 h 后测定体重 (g),4% 水合氯醛腹腔注射麻醉后取肺,测定肺湿重 (mg),计算每只大鼠肺系数 (lung coefficient),肺系数=肺湿重 (mg)/体重 (g) $\times 100\%$ 。(3) 大鼠肺脏组织 HE 染色:取 6~12 周大鼠左下肺组织 0.1 g,于 10% 福尔马林中固定,石蜡固定切片,按照试剂盒说明进行 Harris 苏木素-伊红 (HE) 染色,树胶封片,显微镜下观察读片。(4) Western blot 检测肺脏 ALDH2 蛋白表达:取 0.1 g 肺组织配置裂解液 (RIPA : PMSF = 100 : 1),裂解 30 min 获得组织匀浆,4 ℃ 离心 (12 000 r/min, 15 min),取上清,按 BCA 试剂盒说明蛋白定量,SDS-PAGE 凝胶 (5% 浓缩胶+10% 分离胶) 90~110V 稳压电泳,200 mA 稳流转膜至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 90 min,加入一抗 ALDH2 (1 : 5 300),4 ℃ 过夜,次日 TBST 洗涤并加入 HRP 标记的二抗 (1 : 6000) 孵育,ECL 试剂盒曝光成像。凝胶成像系统进行条带的光密度测量,统计各组蛋白条带的表达水平。

(5) 大鼠肺脏组织天狼猩红染色:取 12 周各组大鼠肺组织石蜡切片,进行脱蜡复水,按照试剂盒说明进行天狼猩红染色,冲洗,待晾干后封片,显微镜下观察读片。(6) ELISA 测定肺脏组织 AGE 含量:取 12 周各组大鼠右肺下叶,按照 ELISA 试剂盒说明书进行组织匀浆,测定 AGE 含量。

3.统计学处理:采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析。计量资料均采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析进行统计学分析,并用 Newman-Keuls 检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

二、结果

1.各组大鼠肺系数变化:与对照组相比,糖尿病组大鼠 6 周、12 周肺系数均明显升高 ($P < 0.01$),12 周时肺系数进一步增大。与 DM 组相比,DM+EtOH 组肺系数降低。见表 1。

表 1 各组大鼠肺系数变化 ($\bar{x} \pm s$, mg/g)

组别	肺系数	
	6 W	12 W
CON 组 (n=6)	3.70 $\pm$ 0.05	3.73 $\pm$ 0.01
EtOH 组 (n=6)	3.80 $\pm$ 0.02	3.00 $\pm$ 0.01
DM 组 (n=6)	5.45 $\pm$ 0.03 **	7.85 $\pm$ 0.01 **
DM+EtOH 组 (n=6)	4.50 $\pm$ 0.01 ***	7.08 $\pm$ 0.02 ***

注:与对照组 CON 组比较, ** $P < 0.01$;与 DM 组比较, ~ $P < 0.01$

2 大鼠肺脏 HE 染色变化:HE 染色显示:与 Con 组相比,DM 组大鼠 6 周时肺泡壁增厚,肺泡结构紊乱,部分肺泡腔狭窄、闭塞。与 6 周相比,12 周大鼠完整的肺泡腔较少,肺脏呈现实变。DM+EtOH 组肺组织病理改变较 DM 组有所减轻。见图 1。

3.大鼠肺脏 ALDH2 蛋白表达变化:Western blot 结果可见,与 CON 组相比,EtOH 组 6 W 和 12 W 时肺组织 ALDH2 蛋白表达升高 ($P < 0.05$),DM 组 ALDH2 蛋白表达降低;与 DM+EtOH 组相比,DM 组 ALDH2 蛋白表达降低。见图 2。

4.大鼠肺脏天狼猩红染色变化:天狼猩红染色显示:胶原纤维呈红色。12 周 DM 组红色染色明显增多,DM+EtOH 组红色染色较 DM 组有所减轻。见图 3。

5. 大鼠肺脏晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products,AGE) 含量变化:ELISA 结果可见,12 周时,与 CON 组相比,EtOH 组无明显差异,DM 组肺组织 AGE 水平明显升高;与 DM 组相比,DM+EtOH 组 AGE 水平降低。见表 2。

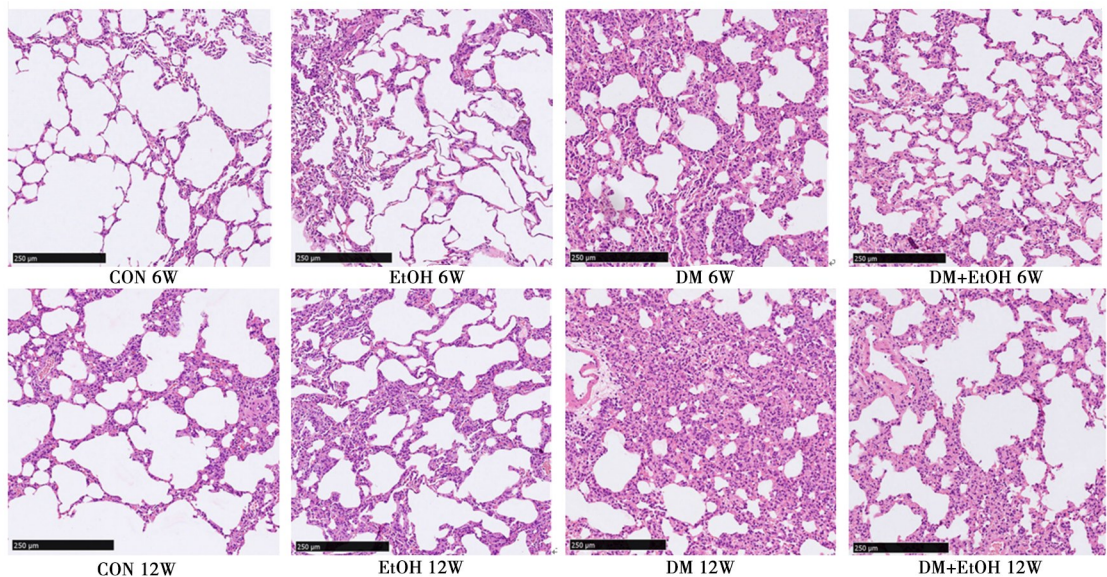
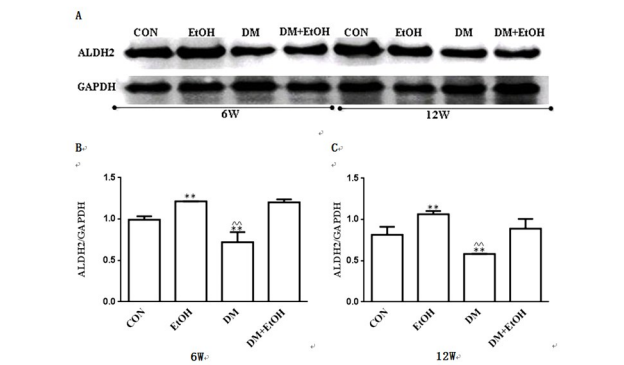


图 1 各组大鼠 6 W、12 W 肺脏 HE 染色结果(100×)



与对照组 CON 组比较(** $P<0.01$); 与 DM+EtOH 组比较(~ $P<0.01$)

A:ALDH2 蛋白表达典型代表图;B 和 C:糖尿病大鼠 6 W 和 12 W 时肺脏 ALDH2 蛋白表达统计结果

图 2 糖尿病大鼠 6W、12W 时肺脏 ALDH2 蛋白表达变化

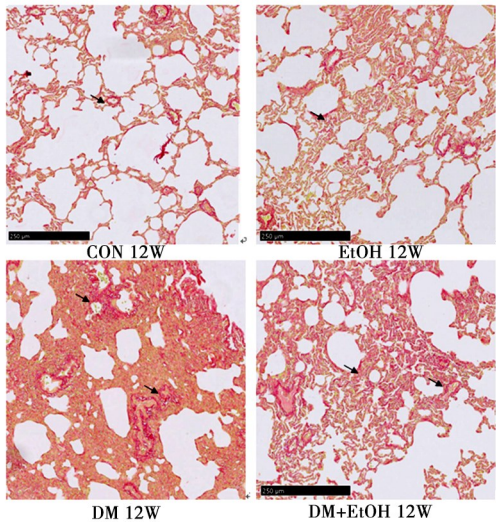


图 3 糖尿病大鼠 12 W 肺脏天狼猩红染色结果(100×)

表 2 12 W 糖尿病大鼠肺组织 AGE 含量变化($\bar{x}\pm s$, pg/ml)

组别	晚期糖基化终末产物 AGE
CON 组	267.06±21.75
EtOH 组	264.50±26.44
DM 组	493.16±41.00 * *
DM+EtOH 组	282.72±16.92 * * ~

注:与对照组 CON 组比较, * * $P<0.01$;与 DM 组比较, ~ $P<0.01$

讨论 糖尿病已成为严重危害人类健康的慢性非传染性疾病之一,根据国际糖尿病联盟最新报告,2019 年全球约 4.63 亿成人患糖尿病,预计到 2030 年,糖尿病患者会达到 5.784 亿;到 2045 年,糖尿病患者会达到 7.002 亿。2019 年,死于糖尿病或其并发症的人数达到 420 万人,约占全球死亡人数的 11.3%^[5]。如何有效控制糖尿病并发症已成为全球性的健康问题^[6]。糖尿病患者肺部感染并发症较常见,占糖尿病感染的 45%,患者常出现通气功能障碍,呼吸困难等症状,随糖尿病病程延长,肺纤维加剧病程发展^[7]。预防或减轻慢性糖尿病患者肺纤维化具有重要的临床应用价值。

本研究观察到随糖尿病大鼠病程延长,肺系数增加,肺脏 ALDH2 表达降低,6 周时出现肺结构改变,12 周时肺结构破坏更明显,基膜增厚,无完整的肺泡结构,天狼猩红染色显示肺脏出现明显的纤维化改变。以上结果提示糖尿病诱导肺损伤的发生;随着糖尿病病程的延长,肺组织损伤加重,并伴有肺纤维化的发生。

糖尿病发生过程中,肺组织纤维化可能发生的相关因素。本研究通过 ELISA 检测观察到,12 周

时,肺组织晚期 AGE 含量增加。晚期 AGE 是指蛋白质、核酸或脂质等大分子物质的氨基在不需酶参与条件下,自发与葡萄糖或其它还原糖的醛基或酮基反应所生成的不可逆聚合物。AGE 与脏器的纤维化密切相关。AGE 可直接修饰细胞外基质(ECM),抑制 ECM 降解,促进成纤维细胞生成等。高血糖可使胶原糖基化增多,增加的 AGE 交联积累,促进纤维细胞增生,导致脏器纤维化的发生^[8];AGE 还通过与特异受体 RAGE 结合介导一系列病理反应,导致内皮功能失调和血管内皮损伤,并诱导促纤维化因子、促炎因子释放等,加重脏器纤维化的发生^[9]。本研究中观察到糖尿病大鼠肺脏形态受损同时,肺脏组织胶原增多,AGE 亦增加,以上变化提示糖尿病大鼠肺组织纤维化的发生与 AGEs 生成增加有关。

ALDH2 是一种限制酒精代谢的酶,是催化酒精代谢中间产物乙醛氧化分解的关键酶,同时参与了各种内、外源性脂肪族和芳香族醛类物质代谢或解毒的过程^[10]。亚洲人群 ALDH2 基因缺失易引起心脑血管疾病的发生。文献报道,ALDH2 缺陷加重乙醇诱导的小鼠肝脏的炎症反应和纤维化的发生^[11],高糖引起大鼠心肌成纤维细胞 ALDH2 表达降低^[12],提示 ALDH2 可改善疾病引起的脏器纤维化的发生。本课题组前期实验观察到,低浓度乙醇可以刺激糖尿病 8 周大鼠肺脏 ALDH2 表达增加,减轻高糖诱导的大鼠肺脏氧化应激损伤^[13],但未监测不同病程阶段肺脏 ALDH2 增加时肺脏纤维化的改变。本研究结果显示,低剂量乙醇喂养糖尿病大鼠 6 周和 12 周,与单纯糖尿病组相比,肺脏组织损伤减轻的同时,ALDH2 表达持续增高,提示激动 ALDH2 在糖尿病肺脏损伤中持续发挥保护作用。

临床资料显示,患者血浆中的 AGE 水平与急性肺损伤的发生发展密切相关,还可用于预测急性肺损伤的转归^[14]。本研究中天狼猩红染色显示,通过低浓度乙醇喂养 12 周激动 ALDH2,肺组织胶原纤维化程度减轻,进一步观察到与纤维化发生密切相关的晚期糖基化终末产物 AGE 释放减少,提示低剂量乙醇减轻了不同病程阶段高糖对肺脏的损伤作用,其机制可能与增加肺脏 ALDH2 的表达减轻肺纤维

化的发生有关。

综上所述,本研究结果表明低浓度乙醇可以刺激肺脏 ALDH2 表达,减轻糖尿病不同病程阶段引起的肺组织病理损伤,减少 AGEs 的释放从而减轻肺组织纤维化,其具体机制还有待更深入研究。本研究有望为临床选取合适的 ALDH2 激动剂,以期达到预防和治疗糖尿病引起的肺纤维化提供理论基础。

参 考 文 献

- [1] Zheng H, Wu J, Jin Z, et al. Potential biochemical mechanisms of lung injury in diabetes[J]. Aging Dis, 2017, 8(1): 7-16.
- [2] Yuan Q, Hong S, Han S, et al. Preconditioning with physiological levels of ethanol protect kidney against ischemia/reperfusion injury by modulating oxidative stress [J]. PLoS One, 2011, 6(10): e25811.
- [3] Kang PF, Wu WJ, Tang Y, et al. Activation of ALDH2 with low concentration of ethanol attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetes rat model [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 6190504.
- [4] 韩敏, 裴静, 李萃, 等. 脏器纤维化的研究进展和重要科学问题[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(8): 1518-1526.
- [5] International Diabetes Federation (2019) IDF Diabetes Atlas. 9th Edition, Brussels, Belgium. <https://www.diabetesatlas.org>
- [6] Yang L, Shao J, Bian Y, et al. Prevalence of type 2 diabetes mellitus among inland residents in China (2000-2014): A meta-analysis[J]. J Diabetes Investig, 2016, 7, 845-852.
- [7] Klein OL, Aviles-Santa L, Cai J, et al. Hispanics/latinos with type 2 diabetes have functional and symptomatic pulmonary impairment mirroring kidney microangiopathy: findings from the hispanic community health study/study of latinos (HCHS/SOL) [J]. Diabetes Care, 2016, 39(11): 2051-2057.
- [8] 郑晓茂, 茹琴, 陈琳, 等. 晚期糖基化终产物对糖尿病及其并发症的影响和干预的研究进展[J]. 重庆医学, 2019, 13: 2292-2296.
- [9] 胡秀, 方朝晖. 糖基化终产物对糖尿病微血管病变的影响及中医药研究[J]. 山西中医学院学报, 2018, 1: 72-74.
- [10] Mol M, Regazzoni L, Altomare A, et al. Enzymatic and non-enzymatic detoxification of 4-hydroxynonenal: Methodological aspects and biological consequences [J]. Free Radic Biol Med, 2017, 111: 328-344.
- [11] Kwon HJ, Won YS, Park O, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 deficiency ameliorates alcoholic fatty liver but worsens liver inflammation and fibrosis in mice [J]. Hepatology, 2014, 60(1): 146-157.
- [12] 谷小雨, 方婷婷, 高琴, 等. 高糖对线粒体乙醛脱氢酶 2 在大鼠心肌成纤维细胞中表达的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2017, 33(3): 267-270.
- [13] Hu JF, Zhang GJ, Wang L, et al. Ethanol at low concentration attenuates diabetes induced lung injury in rats model [J]. J Diabetes Res, 2014, 2014: 107-152.
- [14] 蔡兴俊, 黄奕江, 莫濡冰, 晚期糖基化终末产物与急性肺损伤的关系[J]. 广东医学, 2013, 34(12): 1844-1845.

(收稿日期: 2020-05-10)