基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000919

茶黄素纳米粒雾化吸入对大鼠炎性气道黏蛋白 5AC 的调控

邬海桥，冯　霞，彭文宏
（重庆市中医院呼吸科，重庆　400011）

【摘　要】**目的**：探讨高频雾化吸入茶黄素乳酸-羟基乙酸共聚物（poly lactic-co-glycolic acid，PLGA）纳米粒对炎性气道黏蛋白 5AC（mucoprotein 5AC，MUC5AC）的作用。**方法**：通过改良法制备茶黄素 PLGA 纳米粒，用粒径分析仪检测纳米粒平均粒径，并进行包封率和载药量测定及体外释放试验。将 SD 大鼠分为 3 组：对照组（A 组）、香烟吸入组（B 组）及干预组（C 组）。RT-PCR 检测各组黏蛋白 5AC mRNA 含量；酶联免疫吸附测定法（ELISA）观察 MUC5AC 蛋白表达的变化，并进行组化对比大鼠气道组织黏蛋白变化情况。**结果**：制备的茶黄素 PLGA 纳米粒性质稳定，测得其的平均粒径为（108.24 ± 2.86）nm，适宜雾化吸入。香烟吸入组 MUC5AC 的蛋白表达明显升高，较对照组有显著性差异（P=0.000），而给予茶黄素 PLGA 纳米粒处理后，与香烟组比，指标明显下调（P=0.001）。MUC5AC mRNA 表达的 RT-PCR 电泳结果也有类似结果。气道组织化学 PAS 染色也提示雾化吸入茶黄素 PLGA 纳米粒后，气道表面黏蛋白表达显著下降。**结论**：通过改良法制备茶黄素 PLGA 纳米粒性质稳定，大小均匀；经雾化途径吸入可发挥抑制炎性气道的黏蛋白 5AC 的高分泌作用，为茶黄素的开发应用提供了新的途径。

【关键词】茶黄素；黏蛋白 5AC；纳米粒；雾化吸入
【中图分类号】R562.1+1　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-12-09

Effects of theaflavin-loaded nanoparticles by inhalation on MUC5AC of inflammation airway

Wu Haiqiao, Feng Xia, Pen Wenhong
(*Department of Respiratory Medicine, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the effects of theaflavin-loaded poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles by high frequency aerosol inhalation on MUC5AC of inflammatory airway. ***Methods***: Theaflavin-loaded PLGA nanoparticles were prepared by improved methods. The diameter of nanoparticles was detected; entrapment rate and drug-loading were determined; *in vitro* release test was conducted. SD rats were divided into control group (group A, n=8), cigarette inhaling group (group B, n=8), and intervention group (group C, n=8). All the rats were sacrificed on the 30th day and samples were obtained. MUC5AC mRNA in each group was examined by RT-PCR. Changes in protein expression of MUC5AC were observed by ELISA. Changes of MUC in airway were compared by histochemistry. The data were analyzed with SPSS 12.0 software. ***Results***: Theaflavin-loaded PLGA nanoparticles prepared by improved methods were stable in property, uniform in size with an average of (108.24 ± 2.86) nm, and suitable for nebulized inhalation. Both MUC5AC mRNA and protein expression in cigarette inhaling group increased obviously and there were significant differences compared with those of control group (P=0.000). But after the administration of theaflavin-loaded PLGA nanoparticles, all the indexes decreased obviously compared with those in cigarette inhaled group (P=0.001), and RT-PCR for MUC5AC mRNA expression showed similar electrophoresis results. Besides, histochemistry also indicated that after high frequency nebulized inhalation of theaflavin-loaded PLGA nanoparticles, MUC expression of the airway decreased significantly. ***Conclusion***: Theaflavin-loaded PLGA nanoparticles prepared by improved methods are stable in property, uniform in size, which by high frequency nebulized inhalation, can inhibit the high secretion of MUC5AC in inflammatory airway. It provides a new way to the exploitation and application of theaflavin.

【Key words】theaflavins; mucoprotein 5AC; nanoparticles; inhalation

作者介绍：邬海桥，Email：20571380@qq.com，
研究方向：气道慢性炎性疾病。
通信作者：冯　霞，Email：1131576079@qq.com。
基金项目：重庆市科委基金资助项目（编号：cstc2013jcyjA1062）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160428.1533.006.html
（2016-04-28）

慢性气道炎症是导致支气管哮喘、慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary diseases,COPD)等临床常见呼吸系统疾病的主要病理基础。长期的炎症反应损伤气道上皮，进而使气道上皮杯状细胞、黏膜下腺体增生，纤毛损伤，黏液分泌增多，黏液屏障破坏，引起气流阻塞，逐渐形成 COPD 等疾病。由此可见，气道慢性炎症和气流阻塞是 COPD的病理基础，而气道黏液高分泌又是导致气道阻塞的独立危险因素[1]。近些年发现从植物中提取的一系列黄酮类化合物对肺部疾病有明显的干预作用，其中从红茶中提取的茶黄素，其生物学特性广泛[2]。但提纯较困难，量少，故本实验结合雾化吸入优点，制备茶黄素乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒雾化吸入，观察其对大鼠气道炎性黏液高分泌的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 药物 黄素类(TFs)标准品购自浙江派诺生物技术有限公司(产品批号:TF40-080118H)，纯度 40%，再用聚酰胺层析柱分离法自行提纯使之达 80%以上，成品用色谱分析法检验其纯度后，制成干粉，冰箱 -20 ℃保存备用。以上由西南大学茶学系制备。

1.1.2 试剂 小鼠抗人黏蛋白 5AC(mucoprotein 5AC,MUC 5AC)单克隆抗体(美国 CHEMICON 公司)；FITC 标记的羊抗鼠 IgG；RNA 抽提试剂盒(FASTAGEN-RNAFAST200，上海飞捷生物技术有限公司)；逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(TaKaRa RNA PCR 大连宝生物工程有限公司)；黏蛋白 5AC、GAPDH 引物由大连宝生物工程有限公司合成；泊洛沙姆 188(德国 BASF 公司)；PLGA(山东省医疗器械研究所，75/25，MW 20 000)；透析袋(上海哈林生物有限公司，截留分子量 3 500)，其余试剂均为国产分析纯。

清洁级 SD 大鼠，体质量 250~280 g，由重庆医科大学实验动物中心提供，给予常规水和食物喂养。

1.2 实验方法

1.2.1 茶黄素乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒雾化液的制备 精密称取 TF 15 mg 和 PLGA 100 mg 溶于丙酮-乙醇(3:1)混合液 15 ml 中，使之形成有机相；另取泊洛沙姆 188 溶于水中配制成 1%的溶液作为水相(30 ml)。将有机相滴加至水相中，滴毕继续搅拌 10 min，恒温搅拌下(500 r/min)，旋转蒸除有机溶剂，得淡黄色纳米粒混悬液。

1.2.2 纳米形态及粒径分布 将纳米粒混悬液稀释后滴于铜网上，静置 15 min 后用滤纸吸干，再滴加 2%磷钨酸溶液负染 3 min，自然挥干，用透射电镜观察纳米粒形态(见图1)。结果所得纳米粒呈球形或类球形，表面圆滑，大小及分布均匀。取纳米粒混悬液，加水分散，稀释至适宜浓度，用粒径分析仪测得纳米粒的平均粒径为(108.24 ± 2.86) nm。并进行包封率(72.31 ± 1.18)% 和载药量测定(4.12 ± 0.16)%及体外释放试验。证实其具有良好的缓释作用，为后续的动物实验奠定了基础。

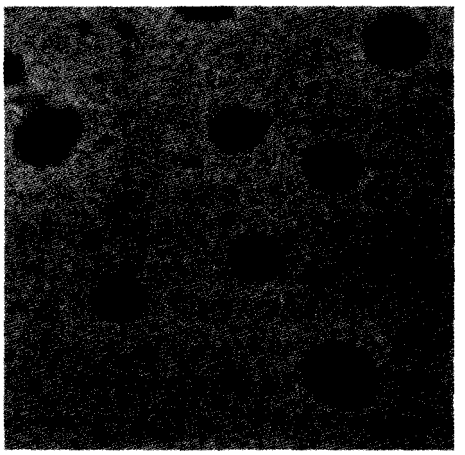


图 1 TF-PLGA 纳米粒透射电镜照片（50 000×）

Fig.1 TEM photograph of theaflavins-loaded PLGA nanoparticles（50 000×）

1.2.3 实验动物处理 将实验大鼠随机分为 3 组，每组 8只，①对照组(A 组)：仅予 5 ml 生理盐水高频雾化吸入，2 次/d；②香烟吸入组(B 组)：将大鼠置于烟雾箱，每天 6 h，每小时 10 根香烟(朝天门牌)，连续 30 d；③干预组(C 组)：在香烟吸入组处理间歇给予茶黄素乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒雾化液 5 ml 高频雾化吸入，2 次/d。

所有大鼠均在第 30 天用 10%水合氯醛 2 ml 麻醉处死并获取标本。

1.2.4 ELISA 检测支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid，BALF)中 MUC5AC 的含量 在甲状软骨与气管分叉的中点水平作 T 形切口，注入4 ℃的 BAL 冲洗液进行肺灌洗，每次 2 ml，共 3 次。收集BALF 约 5 ml，经 3 000 r/min 离心 15 min，取上清液贮于-70 ℃冰箱中备用。分别取 BALF 上清液 0.1 ml 包被酶标板，4 ℃过夜，用含 1 %牛血清白蛋白的 PBS(0.01% mol/L)-Tween 20(0.05%)室温封闭 1 h，1:500 稀释的小鼠抗大鼠气道 MUC5AC 单抗 100 μl，37 ℃孵育 1 h，1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 100 μl，37 ℃孵育 1 h，底物溶液100 μl，37 ℃显色 15 min 后停止反应。于 492 nm 处测吸光度(absorbance，A)值作为 MUC 含量的相对值。

1.2.5 RT-PCR 检测支气管肺组织中 MUC5AC mRNA 含量 取大鼠气管下 1/2 及右下肺作为检测标本。采用 Trizol 法分别提取各组动物组织的总 RNA，经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定，测 RNA 在 260 nm 和 280 nm 的 A 值，样品 $A_{260\,nm}/A_{280\,nm}$ 比值均介于 1.6~1.8，根据 260 nm 的 A 值对样品的总 RNA 初步定量，

保存于-20 ℃备用。随后以两步法行RT-PCR。MUC5AC 的 PCR 引物序列(由大连宝生物工程有限公司合成)上游引物 5'-TCAACGGAGACTGCGAGTACAC-3',下游引物:5'-TCTTGATGGCCTTGGAGCA-3',扩增长度为 135 bp。逆转录反应条件为 30 ℃、10 min,42 ℃、30 min,99 ℃、5 min,5 ℃、5 min,以上步骤为 1 个循环。MUC5AC+GAPDH 的 PCR 反应条件为 94 ℃、2 min,94 ℃、30 s,55 ℃、30 s,72 ℃、1 min,以上 2~4 步骤共 29 个循环。PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳鉴定,电泳结果经吸光度面积积分分析,以与 GAPDH 基因片段条带的比值作为 MUC5ACmRNA 的相对含量。

1.2.6 组织化学检测组织中 MUC5AC 表达 取大鼠右肺中叶作为标本,用 10%甲醛固定 24 h 后石蜡包埋切片。阿辛兰-PAS 染色,常规脱蜡,在 3% 冰醋酸溶液中浸泡 3 min,阿辛兰溶液染 5 min,流水冲洗 10 min,核固红溶液复染 5 min,以流水冲洗 10 min,再置于过碘酸溶液中 10 min,流水冲洗 5 min,Coleman 氏 Schif 试剂溶液中 10 min,流水冲洗 10 min,常规脱水、封片。

1.3 统计学处理

所有数据均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,应用 SPSS 12.0 软件包对结果进行统计分析,两样本均数采用多重比较法,多样本均数间比较采用单因素方差分析,检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 ELISA 检测 BALF 中 MUC5AC 的含量

MUC5AC 蛋白含量结果,以 MUC5AC/总蛋白(μg/mg)表示(见表 1)。香烟雾化吸入后 MUC5ACmRNA 的基因表达水平和黏蛋白含量明显升高,与对照组相比差异有统计学意义(P=0.000)。而 TF-PLGA 干预组的表达较香烟组有所下降(P=0.001)。

表 1 各组组织中 MUC5ACmRNA 水平和 MUC5AC 蛋白含量($\bar{x}\pm s$,n=8)

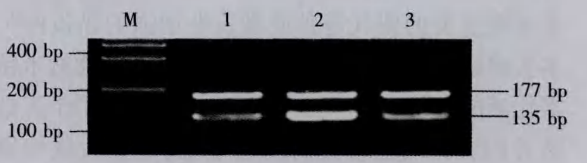
Tab. 1 Expression of MUC5AC at mRNA and protein levels in different groups($\bar{x}\pm s$,n=8)

组别	MUC5AC(μg/mg)	MUC5AC(μg/mg)
对照组	0.32±0.06	101.68±4.77
香烟吸入组	0.89±0.05[a]	173.46±8.57[a]
干预组	0.63±0.04[b]	129.51±4.63[b]
F 值	72.810	128.340
P 值	0.001	0.003

注:a,与对照组比,P=0.000;b,与香烟吸入组比,P=0.001

2.2 MUC5AC mRNA 表达的 RT-PCR 电泳结果

从 RT-PCR 产物凝胶电泳图(图 2)中可见在 135 bp、177 bp 左右位置处见两组明显 DNA 条带,符合 MUC5AC 和 GAPDH 基因扩增产物大小。当香烟刺激后,MUC5AC mRNA 表达明显增强,给予 TF-PLGA 处理后,MUC5AC mRNA 的转录也呈递减趋势。



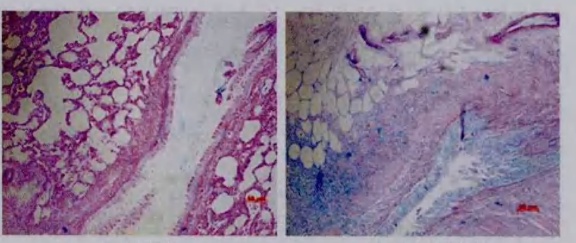
M: Marker;1:对照组;2:香烟吸入组;3:TF-PLGA 组

图 2 MUC5ACmRNA 表达的电泳结果

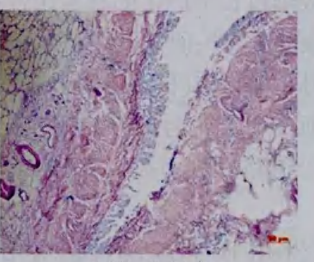
Fig.2 PCR results of MUC5ACmRNA in different groups

2.3 组织化学结果

组织化学 PAS 染色结果提示给予香烟雾化吸入后,大鼠气道黏膜明显增厚,黏液增多,伴大量炎性细胞浸润、杯状细胞增生明显(见图 3B),与 A 组相比有统计学差异。PAS 蓝色染色为增生的杯状细胞,其主要分布在大、中支气管。C 组的杯状细胞和黏蛋白较对照组(A 组)明显增多,而经 TF3-PLGA 干预后,分布数量明显减少。



A. 对照组 B. 香烟吸入组



C. TF-PLGA 组

图中标尺为 50 μm

图 3 大鼠气道黏蛋白组织化学结果(AB-PAS,200×)

Fig.2 Histochemical results of MUC5AC mRNA in different groups(AB-PAS,200×)

3 讨 论

黏液的主要来源是黏膜下腺体的黏液腺细胞和气道上皮杯状细胞合成的高度糖基化蛋白质。COPD 病人易致细菌于气道内定植,造成下呼吸道感染的发生。此外,高度硫酸化的黏液造成气道微环境酸化,使常用抗生素尤其是氨基甙类抗生素的杀菌效能明显降低,导致下呼吸道感染的致病菌难

以清除，使感染持续存在，进一步刺激黏液高分泌的加重[3]。MUC5AC 是气道黏液高分泌的产物之一，也是最主要的使气道黏液凝胶性增强的黏蛋白[4]。本实验通过对茶黄素乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒雾化液的制备，进而通过高频雾化方法应用于香烟诱导的大鼠气道黏液高分泌模型，观察大鼠气道 MUC5AC 的变化，探讨其调控作用。雾化吸入可有效减少药物送达肺部时的损失，提高肺组织的药物浓度同时降低血浆药物浓度。对于雾化吸入给药的纳米粒而言，决定药物沉积部位的主要因素是纳米粒雾化剂中雾滴的粒径，而不是制剂中所包含的单个纳米粒的粒径[5]。本研究借助压缩雾化器，可保证 98%的雾化液滴粒径小于 5 μm，平均粒径为 2 μm，药物吸入后更易进入肺泡内。

茶黄素是一种红茶中的色素复合物，众多研究证明茶黄素具有良好的抗氧化及抗肿瘤、清除自由基或抑制其产生的作用，茶黄素对肿瘤扩散和转移阶段的具有抑制作用[6]。茶黄素具有降低血液粘滞度的功效，可以预防和治疗心血管疾病、高脂血症、脂代谢紊乱、脑梗塞等疾病，改善微循环及血流变等功效在有些方面甚至优于儿茶素类[7]。另外，茶黄素对炎症和免疫调控过程也具有重要作用；可吸附和降解在吸烟过程中产生的有害化合物，减轻吸烟对人体健康的危害[8]；研究发现茶黄素可抑制 EGFR 通路的信号转导物质（核转录因子-κB、转录活性蛋白 1 等），而 EGFR 信号转导通路也是气道黏液高分泌的信号通路[9]，进而提示其对黏液高分泌也有调控作用。

本研究采用 TF-PLGA 纳米粒雾化吸入干预后，通过检测组织中 MUC5AC 蛋白含量以及 MUC5AC mRNA 在各组中地表达，观察其变化情况。RT-PCR 结果显示，经香烟处理后的大鼠气道 MUC5AC mRNA 含量较对照组非常显著增高，同时 ELISA 也检测到 MUC5AC 蛋白含量相应的改变。予 TF-PLGA 纳米粒处理后，黏蛋白高表达的作用受到不同程度的抑制，MUC5AC 蛋白含量以 MUC5ACmRNA 均有明显下调，在组织的 PAS 染色中也观察到相应的变化。此结果证实 TF-PLGA 纳米粒雾化吸入在阻滞香烟诱导的气道 MUC5AC 合成中有一定作用，且通过雾化吸入方式是可行的，其用药量小，作用直接，能通过 PLGA 纳米粒起到在气道表面的缓释作用，提高了作用效能。

茶黄素作为天然植物黄酮类的一种，具有生物学效能高、副作用小的特点。此实验证实了其在黏液高分泌中具有明显的作用，高频雾化吸入 TF-PLGA 纳米粒的用药途径，也为茶黄素的开发应用提供了新的道路。其作为一种绿色的药物，应用于预防和治疗气道炎性黏液高分泌所致的 COPD 等常见疾病是有前景的。

参 考 文 献

[1] Rubin BK, Priftis KN, Schmidt HJ, et al. Secretory hyperresponsiveness and pulmonary mucus hypersecretion[J]. Chest, 2014, 146(2): 496-507.

[2] Dias PM, Changarath J, Damodaran A, et al. Compositional variation among black tea across geographies and their potential influence on endothelial nitric oxide and antioxidant activity[J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(28): 6655-6668.

[3] Dijkstra AE, Boezen HM, van den Berge M, et al. Dissecting the genetics of chronic mucus hypersecretion in smokers with and without COPD[J]. Eur Respir J, 2015, 45(1): 60-75.

[4] Damiá Ade D, Gimeno JC, Ferrer MJ, et al. A study of the effect of proinflammatory cytokines on the epithelial cells of smokers, with or without COPD[J]. Arch Bronconeumol, 2011, 47(9): 447-453.

[5] Pandey R, Khuller GK. Antitubercular inhaled therapy: opportunities, progress and challenges[J]. J Antimicrob Chemother, 2005, 55(4): 430-435.

[6] Darvesh AS, Bishayee A. Chemopreventive and therapeutic potential of tea polyphenols in hepatocellular cancer[J]. Nutr Cancer, 2013, 65(3): 329-344.

[7] Fuchs D, de Graaf Y, van Kerckhoven R, et al. Effect of tea theaflavins and catechins on microvascular function[J]. Nutrients, 2014, 6(12): 5772-5785.

[8] Wu H, Li Q, Zhou X, et al. Theaflavins extracted from black tea inhibit airway mucous hypersecretion induced by cigarette smoke in rats[J]. Inflammation, 2012, 35(1): 271-279.

[9] Kim S, Schein AJ, Nadel JA. E-cadherin promotes EGFR-mediated cell differentiation and MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 289(6): 1049-1060.

（责任编辑：张辉洁）