

☆ XXXX ☆

电针对慢性阻塞性肺疾病小鼠肺组织 Nur77、TRAF2 蛋白表达及巨噬细胞自噬的影响

张 珍¹, 方丹群¹, 尹修文¹, 刘 娜¹, 张新芳², 项水英¹, 刘自兵^{1,2}

(¹安徽中医药大学针灸推拿学院, 合肥 230012; ²安徽中医药大学中西医结合学院, 合肥 230012)

【摘要】 目的:观察电针是否通过调控核受体 77(Nur77)的表达及其核-胞质转位,影响 Nur77 与肿瘤坏死因子受体相关因子 2(TRAF2)的相互作用,进而抑制肺组织巨噬细胞过度自噬,改善慢性阻塞性肺疾病(COPD)小鼠的肺部炎症反应。方法:取 40 只 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠,随机选取 10 只作为空白组,其余 30 只通过香烟烟雾暴露 3 个月复制 COPD 小鼠模型。成功建立动物模型之后,将实验小鼠按照随机原则划分为三个组别:模型组、电针组以及拮抗剂+电针组,各组均为 10 只小鼠。予以电针组和拮抗剂+电针组小鼠电针双侧“肺俞”“足三里”干预,每日 1 次,20 min/次,共 14 d;拮抗剂+电针组小鼠于每日电针前 30min 腹腔注射 Nur77 拮抗剂 DIM-C-pPhOH(25 mg/kg),每日 1 次,持续 14 d。使用动物呼吸功能分析仪检测小鼠肺功能;HE 染色观察肺组织病理形态变化;ELISA 检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中细胞因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量;比色法检测肺组织超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量;Western blot 检测肺组织 Nur77(核蛋白和胞质蛋白)、TRAF2、微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)、自噬衔接蛋白 P62(P62)的表达;实时荧光定量 PCR 检测肺组织 Nur77、Traf2 mRNA 表达水平;免疫共沉淀(Co-IP)检测 Nur77 与 TRAF2 的相互作用;透射电镜观察肺组织巨噬细胞内自噬小体的变化。结果:与空白组相比,模型组小鼠呼吸功能参数呈现显著降低趋势($P<0.05$, $P<0.01$),病理切片可见肺泡壁结构变厚,多个肺泡相互融合形成较大囊泡样结构,同时伴有大量炎性细胞的弥漫性浸润,支气管肺泡灌洗液检测显示促炎因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平呈现显著性增高,肺组织 SOD 活性显著降低、MDA 含量显著升高($P<0.01$);肺组织 LC3II/LC3I 比值显著升高($P<0.05$),P62 蛋白表达明显降低($P<0.01$),TRAF2 蛋白水平显著升高($P<0.01$),同时 Nur77 在细胞核内的表达量明显增加,而在胞质中的表达量则显著减少($P<0.01$),此外 Nur77 基因转录水平显著下降($P<0.01$),Traf2 基因转录水平则明显上升($P<0.05$),Nur77 与 TRAF2 的相对结合量显著降低($P<0.01$),电镜下可见巨噬细胞内自噬小体数量显著增多。与模型组相比,电针组以上指标均有不同程度改善($P<0.05$, $P<0.01$),SOD 活性显著增加($P<0.01$),MDA 含量显著减少($P<0.05$);LC3II/LC3I 比值显著降低($P<0.01$),P62 蛋白表达显著升高($P<0.01$),TRAF2 蛋白水平显著降低($P<0.05$),Nur77 核内表达量明显降低而胞质内表达量明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),Nur77 mRNA 表达上调、Traf2 mRNA 表达显著降低($P<0.05$);Nur77 与 TRAF2 的相对结合量显著升高($P<0.05$),巨噬细胞内自噬小体数量明显减少。与电针组相比,拮抗剂+电针组上述指标均有所逆转($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:电针可通过上调 Nur77 表达并促进其由细胞核向胞质转位,增强 Nur77 与 TRAF2 的相互作用,调控自噬相关蛋白,抑制肺巨噬细胞过度自噬,减轻 COPD 肺部炎症反应。

【关键词】 电针;慢性阻塞性肺疾病;核受体 77;肿瘤坏死因子受体相关因子 2;巨噬细胞自噬

Effects of Electroacupuncture on Nur77 and TRAF2 Protein Expression and Macrophage

项目来源:安徽省高校自然科学基金重点项目(No.KJ2021A0569);安徽省自然科学基金面上项目(No.2008085MH267);安徽中医药大学校级探索性科研项目(No.AHUCM2024TS024)

通信作者:刘自兵, E-mail: zibingliu@163.com

Autophagy in Lung Tissue of Mice with Chronic Obstructive Pulmonary Disease

ZHANG Zhen¹, FANG Danqun¹, YIN Xiuwen¹, LIU Na¹, ZHANG Xinfang², XIANG Shuiying¹, LIU Zibing^{1,2} (¹School of Acupuncture, Moxibustion and Tuina, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; ²School of Integrated Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012)

【ABSTRACT】 Objective To investigate whether electroacupuncture (EA) can regulate the expression of nuclear receptor 77 (Nur77) and its nuclear-cytoplasmic translocation, affect the interaction between Nur77 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2), thereby inhibiting excessive autophagy of pulmonary macrophages and improving pulmonary inflammation in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) mice. **Methods** Forty SPF-grade C57BL/6 male mice were used, with 10 randomly selected as the normal group and the remaining 30 exposed to cigarette smoke for 3 months to establish the COPD model. After successful model establishment, the model mice were randomly divided into COPD model group, EA group, and antagonist+EA group, with 10 mice in each group. Mice in the EA group and the antagonist+EA group received EA stimulation at bilateral “Feishu” (BL13) and “Zusanli” (ST36) for 20 min, once daily, for 14 days. The Nur77 antagonist DIM-C-pPhOH (25 mg/kg) was administered to mice in the antagonist+EA group via intraperitoneal injection 30 min before each EA session, once daily, for 14 days. Pulmonary function was assessed using an animal respiratory function analyzer. The pathological morphology of lung tissue was observed after H. E. staining. The contents of interleukin (IL)-6, IL-1 β and tumor necrosis factor (TNF)- α in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured using ELISA. Superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content in pulmonary tissue were detected by colorimetric assay. The expressions of Nur77 (nuclear and cytoplasmic proteins), TRAF2, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), and sequestosome 1 (P62) proteins in the lung tissue were detected using Western blot. The expressions of Nur77 and Traf2 mRNA were detected using real-time fluorescence quantitative PCR. The interaction between Nur77 and TRAF2 was detected using co-immunoprecipitation (Co-IP). The changes of autophagosomes in pulmonary macrophages were observed under transmission electron microscopy. **Results** Compared with the normal group, the COPD model group showed a significant decrease in respiratory function parameters ($P<0.05$, $P<0.01$). Pathological sections revealed thickened alveolar wall structure, multiple alveoli fused into larger vesicle-like structures, accompanied by diffuse infiltration of a large number of inflammatory cells. BALF analysis demonstrated markedly elevated levels of inflammatory mediators IL-6, IL-1 β , and TNF- α . Pulmonary tissue showed substantially reduced SOD activity with increased MDA content ($P<0.01$). The LC3II/LC3I ratio was significantly increased ($P<0.05$), while P62 protein expression was markedly decreased ($P<0.01$). TRAF2 protein level was significantly elevated ($P<0.01$). Nur77 demonstrated predominantly nuclear localization with elevated nuclear expression and reduced cytoplasmic distribution ($P<0.01$). Nur77 mRNA expression level was significantly decreased ($P<0.01$), and Traf2 mRNA expression level was increased ($P<0.05$). The relative binding of Nur77 to TRAF2 was significantly decreased ($P<0.01$), and the number of autophagosomes in macrophages was significantly increased under electron microscopy. Compared with the model group, all the above indicators were improved to varying degrees in the EA group ($P<0.05$, $P<0.01$). SOD activity was significantly increased ($P<0.01$), and MDA content was significantly decreased ($P<0.05$). The LC3II/LC3I ratio was significantly decreased ($P<0.01$), and P62 protein expression was significantly elevated ($P<0.01$). TRAF2 protein level was significantly decreased ($P<0.05$). Nur77 showed reduced nuclear expression with increased cytoplasmic localization ($P<0.05$, $P<0.01$). Nur77 mRNA was upregulated while Traf2 mRNA expression was significantly decreased ($P<0.05$). The relative binding of Nur77 to TRAF2 was significantly increased ($P<0.05$), and the number of autophagosomes in macrophages was significantly decreased. Compared with the EA group, all the above indicators were reversed in the antagonist+EA group ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** EA can up-regulate Nur77 expression and promote its translocation from nucleus to cytoplasm, enhance the interaction between Nur77 and TRAF2, regulate autophagy-related proteins, inhibit excessive autophagy of pulmonary macrophages, and reduce pulmonary inflammatory reaction in COPD.

【KEYWORDS】 Electroacupuncture; Chronic obstructive pulmonary disease; Nuclear receptor 77; Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2; Macrophage autophagy

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种以不可逆性气道阻塞为主要表现的慢性呼吸系统疾患,可通过

积极干预实现预防与治疗,其病理基础涉及复杂的肺部及全身性炎性反应,已成为全球范围内重大公共卫生挑战^[1]。吸烟作为COPD最主要的环境危险因素,长期香烟烟雾(CS)暴露是驱动其发生发展的核心环节,可导致气道重塑与肺实质的渐进性破坏^[2]。除了经典的炎性细胞浸润和以白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 为代表的促炎因子水平升高外,近年来越来越多的证据表明,自噬功能障碍在COPD发病机制中发挥关键作用。自噬是一种在进化中高度保守的细胞内降解机制,其主要功能是移除损伤的细胞器以维护细胞稳态^[3]。在COPD病理状态下,肺巨噬细胞中存在自噬调控失衡,导致炎性反应持续放大^[4-5]。核受体77(Nur77)是一种配体依赖性转录因子,可通过核-胞质转位,在胞质中与肿瘤坏死因子受体相关因子2(TRAF2)相互作用,参与线粒体自噬的调控^[6-7]。在COPD患者的肺组织中观察到Nur77表达异常及其亚细胞定位紊乱^[8-9],提示Nur77和TRAF2参与自噬可能是COPD炎性反应的重要调控机制,然而Nur77在COPD肺巨噬细胞自噬调控中的作用机制尚未明确。针灸疗法作为传统中医的核心治疗手段,已被证实可在COPD急性发作期和稳定期显著改善呼吸功能并抑制炎性反应^[10]。《针灸科学研究行动计划》指出,对确有疗效的针灸技术应进行深入研究,明确其调控路径和刺激效应的因果关联^[11]。研究表明针刺干预可有效减轻COPD模型动物的肺部炎性浸润与氧化应激损伤,其机制可能涉及调控炎性信号通路及气道重塑^[12]。然而,电针治疗COPD的具体分子机制尚不清楚,因此,本研究旨在探讨电针能否通过调控Nur77表达及其核-胞质转位,影响Nur77与TRAF2的相互作用,进而调节肺巨噬细胞自噬失衡,减轻COPD的肺部炎性损伤,从分子机制角度为电针干预COPD提供新的理论支撑和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

本研究选用SPF级C57BL/6雄性小鼠40只,鼠龄为8周,小鼠购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司[生产许可证编号:SCXK(豫)2020-0005]。并于安徽中医药大学实验动物中心进行饲养管理,每笼5只,环境温度控制在22~25℃,湿度保持50%~60%,光照周期为12h光照/12h黑暗交替,自由摄食饮水。适应性饲养1周后,随机选取10只

作为空白组,其余30只用于构建COPD模型。造模成功后,将造模小鼠按随机数字表法分为3组,每组10只,分别为:模型组、电针组、拮抗剂+电针组。本实验方案经安徽中医药大学实验动物伦理审查委员会批准实施(批准号:AHUCM-mouse-2023099)。

1.2 主要试剂与仪器

黄山牌香烟(安徽中烟),LC3、P62、TRAF2、Nur77抗体(美国Affinity),LaminB1(合肥SciBen), β -actin抗体、山羊抗小鼠IgG、山羊抗兔IgG(北京中杉金桥),F4/80抗体(武汉三鹰),ECL超敏发光试剂盒(美国GLPbio),苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(北京Solarbio),免疫沉淀试剂盒(上海碧云天),IP用Nur77抗体(美国Proteintech),预染蛋白Marker(美国Thermo),PVDF膜(美国Millipore),拮抗剂DIM-C-pPhOH(上海Ambeed),IL-6、TNF- α 、IL-1 β ELISA试剂盒(武汉基因美),反转录试剂盒(日本TaKaRa),SOD、MDA试剂盒(南京建成)。

一次性针灸针(规格:0.25 mm \times 25 mm)、电子针疗仪(苏州医疗用品厂),Ani-Res2005动物呼吸功能分析仪(北京贝兰博),BX53光学显微镜(日本奥林巴斯),电泳仪、转膜仪(上海天能),酶标仪(美国雷杜),荧光定量PCR仪(美国赛默飞),高速冷冻离心机(安徽嘉文),自动曝光仪(上海培清),电热恒温鼓风干燥箱(上海三发),透射电镜(日本电子)。

1.3 造模方法

空白组小鼠正常饲养,不予任何干预;其余30只小鼠通过香烟烟雾暴露3个月复制COPD动物模型。采用PAB-S200被动吸烟动物染毒系统进行烟雾暴露,使用黄山牌香烟(焦油含量10 mg,尼古丁含量0.8 mg)。暴露方案为每天2次,每次1 h,两次暴露间隔5 h,连续3个月,每次暴露同时点燃10支香烟。染毒过程中CO浓度维持在1200 ppm。空白组小鼠在相同条件下暴露于正常空气^[13]。造模成功判定标准:肺功能检测显示FEV_{0.1}/FVC比值显著降低,提示存在明显气流受限;病理切片观察显示肺泡结构显著紊乱,肺泡间质显著增宽,肺泡腔呈现明显扩张状态,并伴随大量炎性细胞的聚集与浸润^[14]。

1.4 干预方法

给药方式:造模完成后,进行分组干预。参照文献^[15-16]的给药方法并加以改进,将拮抗剂溶于DMSO配制成120 mg/mL的储备液。临用前,取适

量储备液,依次与PEG300、Tween-80和0.9%氯化钠溶液混合,制成浓度为2.08mg/mL的澄清工作液。拮抗剂+电针组小鼠通过腹腔注射方式给予该拮抗剂溶液,给药剂量为25 mg/kg,注射体积为0.30 mL/只(以25 g体质量小鼠计)。每日给药1次,共持续14d。

电针干预方式:对拮抗剂+电针组小鼠,于每次腹腔给药后0.5h,与电针组一同接受双侧“足三里”穴位的电针刺激。参照小鼠体表腧穴定位标准^[17],选取双侧“足三里”与“肺俞”。其中,“足三里”取外膝眼下方、腓骨小头前下缘约2 mm处;“肺俞”取第3胸椎棘突下缘,距脊柱正中线外侧3 mm。操作时,于“足三里”垂直进针,深度约3 mm;于“肺俞”朝脊柱方向斜刺,深度约1~2 mm。随后连接电针治疗仪,将同侧的“肺俞”与“足三里”连接为一组输出电极。电针仪参数配置为疏密波型,脉冲频率选用2 Hz与10 Hz交替模式,刺激电流强度调节至1 mA,以观察到小鼠肢体出现轻微颤动反应为适宜标准,干预频率为每天1次,单次持续时间为20 min。

1.5 观察指标及检测方法

肺功能仪器检测小鼠肺通气功能:完成治疗后,从各组中随机选取5只实验小鼠,使用质量分数为2%戊巴比妥钠溶液按照75 mg/kg的剂量实施腹腔注射麻醉。麻醉充分后将动物仰卧固定,于颈部中线做纵形切口显露气管结构,实施气管切开操作并置入插管,整个过程中确保呼吸道持续畅通。将气管导管与小动物呼吸功能测试系统相连接,通过配套分析程序获取肺通气指标数据:用力肺活量(FVC)、0.05 s用力呼气容积(FEV_{0.05})及0.1 s用力呼气容积(FEV_{0.1}),FEV_{0.05}/FVC比值及FEV_{0.1}/FVC比值。

HE染色法观察肺组织形态学改变:从各组中随机选取6只小鼠的右侧肺组织,将组织固定后,组织块遵循标准流程,标本经梯度浓度的乙醇进行逐级脱水处理,随后使用二甲苯进行透明化处理,完成石蜡浸润包埋操作后,运用组织切片设备连续制备厚度为4 μm的病理切片。切片脱蜡水化后,依次进行苏木精核染色、盐酸乙醇(1%)分化处理、伊红胞质染色,染色完成后,将切片再次脱水透明,并以中性树胶封固。于光学显微镜下随机选择5个非重叠区域(中倍视野,×200)进行病理观察并评估肺泡结构完整性、肺泡间隔增厚及炎性细胞浸润等病理学改变。

ELISA法检测小鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中炎症因子含量:肺功能检测完成后,进行BALF采集,结扎右主支气管后向左肺缓慢灌注预冷的PBS缓冲液并回收,重复3次以获取支气管肺泡灌洗液(BALF)。将BALF于4℃、3 000 r/min离心15 min,收集上清液并于-80℃冻存备用。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法对IL-6、TNF-α和IL-1β进行定量测定,所有实验步骤严格遵循试剂盒操作规程执行。通过酶标检测仪于450 nm波长下测定各反应孔的吸光度值,结合标准曲线计算各细胞因子的最终含量。

比色法检测小鼠肺组织SOD活性和MDA含量:取小鼠右肺组织,按重量(g):体积(mL)=1:9比例加入预冷0.9%氯化钠溶液,冰浴条件下充分研磨制成10%组织匀浆。匀浆液4℃、3 500 r/min离心10 min,取上清液。实验操作严格遵循试剂盒说明书。将准备好的样品加入96孔板中,置于酶标仪内,分别在450 nm和532 nm波长下测定其吸光度值。最后,依据绘制的标准曲线,计算出肺组织样本中SOD的活性水平及MDA的具体含量。

透射电子显微镜观察自噬小体的变化:随机选取每组3只小鼠,迅速分离肺组织,采集1 mm×1 mm×1 mm的肺组织块,立即固定于2.5%戊二醛溶液中24 h。用0.1 mol/L PBS清洗6 h后,1%四氧化锇后固定2 h。经梯度乙醇脱水(30%、50%、70%、80%、95%、100%)和环氧丙烷处理后,环氧树脂浸透、包埋,45℃烤箱12 h,72℃烤箱24 h聚合硬化。使用超薄切片机将包埋块切成厚度约为70 nm的超薄切片,并将其捞置于铜网上。随后,切片先后经醋酸双氧铀和柠檬酸铅溶液进行电子染色。处理完毕的切片置于透射电子显微镜下观察,以分析自噬小体的形态结构并统计其数量变化。

Western blot法检测小鼠肺组织中相关蛋白的表达:取小鼠肺组织,分别采用RIPA裂解液提取总蛋白,以及使用核浆蛋白抽提试剂盒分离胞核与胞质蛋白,BCA法测定蛋白浓度。取30 μg蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳(LC3检测采用12%分离胶,其余均采用10%分离胶),随后湿转至PVDF膜。5%脱脂牛奶室温封闭2 h后,加入一抗Nur77(1:1 000)、TRAF2(1:1 000)、P62(1:1 000)、LC3(1:500)、胞质内参β-actin(1:1 000)及胞核内参Lamin B1(1:2 000),一抗溶液于4℃环境下孵育过夜,翌日经充分洗涤后,添加辣根过氧化物酶偶联的二抗工作液(稀释倍数为1:10 000),在室温条件下反应

2 h,采用ECL增强化学发光试剂显影。使用Image J软件对Western blot获得的蛋白条带进行灰度值分析。其中,TRAF2与P62蛋白的相对表达量,通过计算其条带灰度值与内参蛋白 β -actin条带灰度值的比值来确定;Nur77在胞核和胞质中的相对表达量分别以其与Lamin B1和 β -actin的灰度值比值表示;LC3的表达以LC3-II/LC3-I的比值表示。

采用实时荧光定量PCR技术检测肺组织中Nur77与Traf2基因的转录水平:从各组中随机抽取6只小鼠,称取50~100 mg肺组织样本。将组织样本置于液氮环境中研磨至粉末状态,随后加入1 mL TRIzol试剂进行裂解并提取总RNA。利用微量分光光度计对提取的RNA浓度进行精确测

定。使用PrimeScript™RT反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA,反应条件设置为37℃孵育15 min,随后85℃处理5 s。配制总体积为20 μ L的PCR反应体系,其中包含10 μ L的2 \times SYBR Green混合液、各1 μ L的上下游引物(浓度为10 μ mol/L)、3 μ L的cDNA模板以及5 μ L的无核酸酶水。PCR扩增程序设定如下:首先在95℃条件下预变性1 min;然后进行40个循环,每个循环包括95℃变性20 s、60℃退火并延伸1 min。选用 β -actin作为内参照基因,通过 $2^{-(-\Delta\Delta Ct)}$ 计算方法对Nur77与Traf2基因的相对表达量进行定量分析。引物由上海生工合成,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因		引物序列(5'→3')	产物长度/bp
Nur77	上游	CCCCACTATTTGTCTTATCCC	112
	下游	TTACAGTAGCGTCAGCTTATTT	
Traf2	上游	GGAACACCTAGCCCTACT	148
	下游	GTTCAAGACGCAGACAAT	
β -actin	上游	AGTGTGACGTTGACATCCGT	120
	下游	TGCTAGGAGCCAGAGCAGTA	

注:Nur77为核受体 Nur77, Traf2为肿瘤坏死因子受体相关因子2。

免疫共沉淀实验验证 Nur77 与 TRAF2 的蛋白互作关系:提取肺组织,加入预冷的含蛋白酶及去乙酰化酶抑制剂的裂解缓冲液充分研磨,于4℃条件下高速离心,收集上清。采用Protein A+G磁珠法,将4 μ g的Nur77抗体与Protein A+G磁珠于室温孵育1小时进行偶联,并设IgG为阴性对照。将蛋白上清液与偶联了抗体的磁珠于4℃条件下孵育过夜,以形成免疫复合物。用裂解液充分洗涤磁珠以去除所有非特异性结合蛋白,最后加入SDS-PAGE上样缓冲液于95℃加热洗脱。洗脱的蛋白样品通过10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,随后转印到PVDF膜上,用5%脱脂奶粉于室温封闭2 h。分别以兔源Nur77(1:1 000)和TRAF2(1:1 000)为一抗,4℃孵育过夜;HRP标记的山羊抗兔二抗(1:10 000)室温孵育2 h。最后采用ECL化学发光法进行检测,并使用Image J软件分析条带,以TRAF2与Nur77信号比值表示相对结合量。数据以空白组为对照标准化(设为1.0),其他各组表示为相对于空白组的倍数变化。

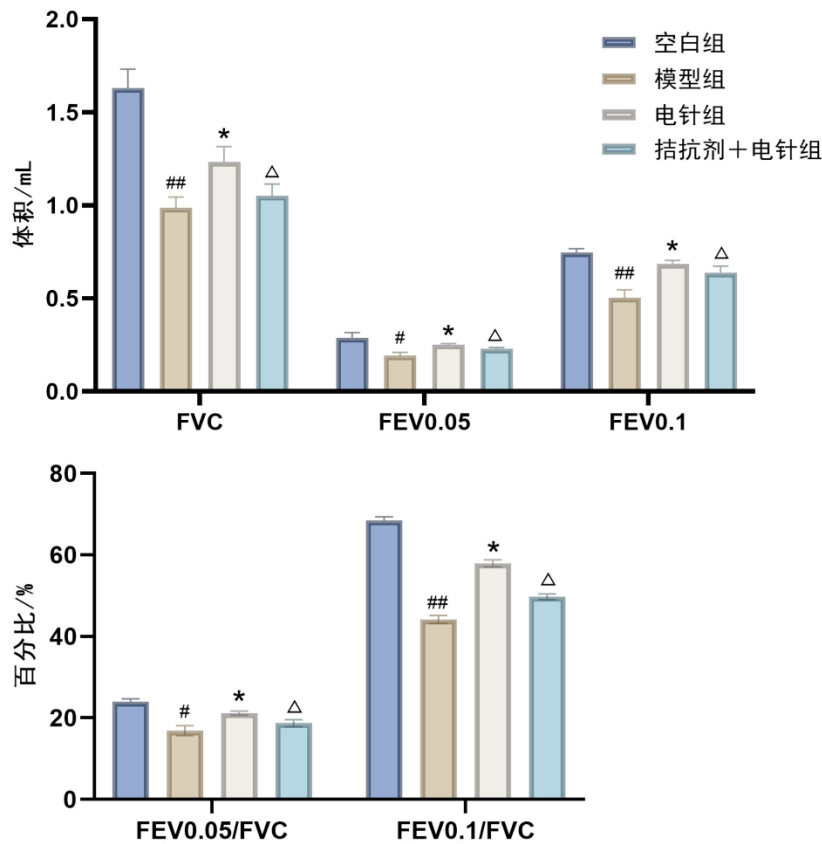
1.6 统计学分析

本研究所有数据均使用GraphPad Prism 9统计软件进行处理。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。在进行组间比较前,首先对数据进行正态性检验与方差齐性检验。对于多组间的总体差异,采用单因素方差分析进行评估。若需要进行两两比较,则根据方差齐性检验的结果选择相应方法:方差齐时采用Tukey's检验,方差不齐时则选用Dunnett's T3检验。以 $P \leq 0.05$ 作为差异具有统计学意义的判定标准。

2 结果

2.1 各组小鼠肺通气功能指标比较

与空白对照组相比,模型组小鼠的FVC、FEV0.05、FEV0.1及FEV0.05/FVC、FEV0.1/FVC比值下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);经电针干预后,电针组的上述各项肺功能参数较模型组均提升($P < 0.05$);拮抗剂+电针组肺功能指标较单纯电针组降低($P < 0.05$)。见图1。



注:FVC:用力肺活量;FEV:用力呼气量。与空白组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$;与电针组比较, $\Delta P<0.05$ 。

图 1 各组小鼠肺通气功能指标比较($\bar{x}\pm s$,5只鼠/组)

Fig. 1 Comparison of pulmonary ventilation function parameters of mice in the 4 groups($\bar{x}\pm s$,5 mice/group)

2.2 各组小鼠肺组织病理形态变化的比较

空白对照组小鼠肺泡结构完整,间隔纤薄,未见明显炎性细胞浸润;模型组小鼠肺组织损伤严重,表现为肺泡壁广泛增厚、结构断裂,多个肺泡融合形成肺大泡,并伴有大量炎性细胞浸润。电针组

肺泡融合及肺大泡明显减少,肺泡结构趋于完整,仅见少量散在炎性细胞;拮抗剂+电针组呈现肺泡间隔增厚、炎性细胞聚集及肺组织结构紊乱等病理改变。见图2。

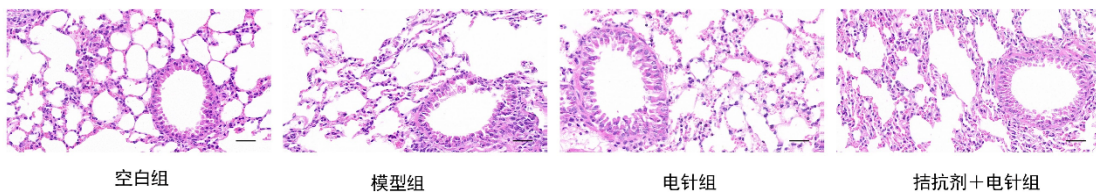


图 2 各组小鼠肺组织病理形态变化的比较(HE染色,标尺=50 μm)

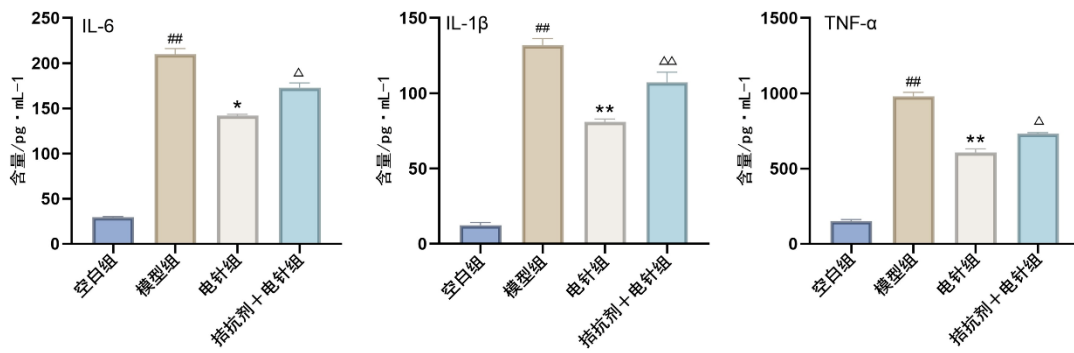
Fig. 2 Comparison of lung histopathological morphology changes of mice in the 4 groups(HE staining, scale=50 μm)

2.3 各组BALF中炎性因子(IL-6、IL-1β、TNF-α)水平的比较

模型组BALF中的IL-6、IL-1β及TNF-α含量较空白组均显著升高($P<0.01$);电针组与模型组相比,IL-6、IL-1β和TNF-α的水平均显著降低($P<$

0.05, $P<0.01$);拮抗剂+电针组相较于电针组,BALF中三种炎性因子的浓度发生了显著性升高($P<0.05$, $P<0.01$)。见图3。

2.4 各组小鼠肺组织氧化应激指标SOD活性与



注: BALF 为支气管肺泡灌洗液。IL-6 为白细胞介素-6; IL-1 β 为白细胞介素-1 β ; TNF- α 为肿瘤坏死因子- α 。与空白组比较, $^{##}P<0.01$; 与模型组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$; 与电针组比较, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$ 。

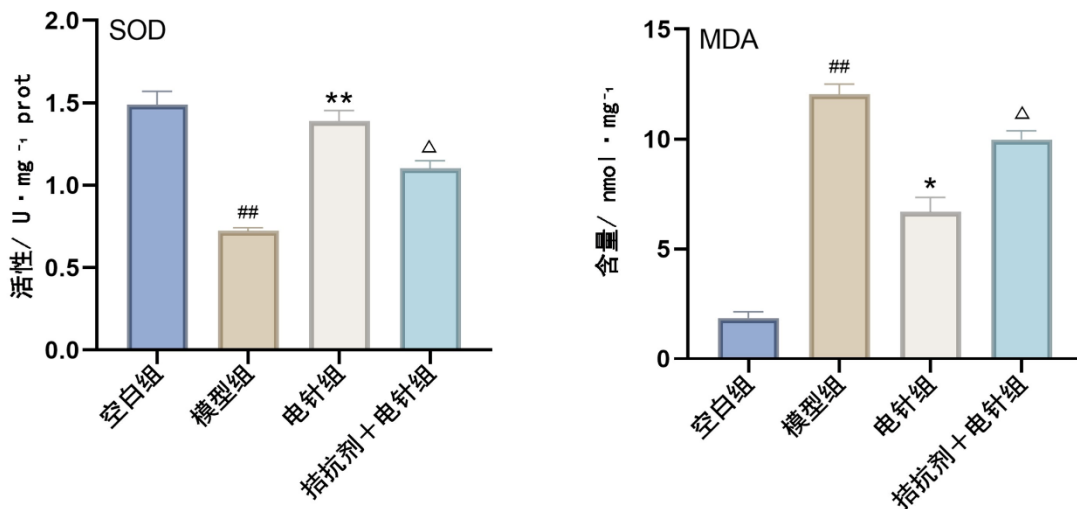
图 3 各组 BALF 中炎症因子 (IL-6、IL-1 β 、TNF- α) 水平的比较 ($\bar{x}\pm s$, 6 只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of inflammatory cytokine (IL-6, IL-1 β , TNF- α) levels in BALF of mice in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 mice/group)

MDA 含量比较

模型组肺组织中 SOD 酶活性较空白组显著下降 ($P<0.01$), 而 MDA 含量则显著上升 ($P<0.01$); 电针组相比模型组, SOD 酶活性呈现显著增加 ($P<$

0.01), MDA 含量减少 ($P<0.05$); 与电针组比较, 拮抗剂+电针组 SOD 活性降低 ($P<0.05$), MDA 含量升高 ($P<0.05$)。见图 4。



注: MDA 为丙二醛, SOD 为超氧化物歧化酶。与空白组比较, $^{##}P<0.01$; 与模型组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$; 与电针组比较, $^{\Delta}P<0.05$ 。

图 4 各组小鼠肺组织 SOD 活性与 MDA 含量比较 ($\bar{x}\pm s$, 6 只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of SOD activity and MDA content in lung tissue of mice in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 mice/group)

2.5 各组小鼠肺组织巨噬细胞内自噬小体的变化

空白组小鼠肺组织中, 巨噬细胞结构清晰完整, 胞质内仅见少量正常形态的自噬小体; 模型组巨噬细胞内自噬小体数量显著增多; 电针干预后, 电针组巨噬细胞内自噬小体数量明显减少; 而在拮抗剂+电针组中, 巨噬细胞内的自噬小体数量则相对较多。见图 5。

2.6 各组肺组织中 LC3II/LC3I 比值、P62 及

TRAF2 蛋白水平, 以及 Nur77 核质分布的比较

与空白组相比, 模型组肺组织中 LC3II/LC3I 的比值显著上升 ($P<0.05$), 而自噬底物蛋白 P62 的表达水平则明显下调 ($P<0.01$); TRAF2 蛋白水平显著升高 ($P<0.01$), Nur77 蛋白的核内表达量显著升高, 而胞质内表达量显著降低 ($P<0.01$)。

与模型组比较, 电针组 LC3II/LC3I 比值明显下降 ($P<0.01$), 同时 P62 蛋白水平显著增加 ($P<$

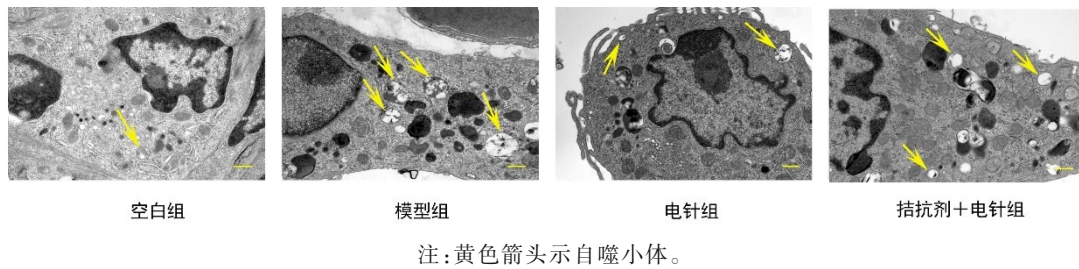


图5 各组小鼠肺组织巨噬细胞内自噬小体的情况(透射电镜,标尺=500 nm)

Fig.5 Autophagosome formation in lung tissue macrophages of mice in the 4 groups (Electron microscopy, scale=500 nm)

0.01), TRAF2蛋白水平显著降低($P < 0.05$), Nur77核内表达量明显降低,胞质内表达量则明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);相较于单纯电针组,联合拮抗剂干预后的拮抗剂+电针组LC3II/LC3I比值显著增高($P < 0.01$), P62蛋白水平明显下降($P < 0.01$), TRAF2蛋白水平显著升高($P < 0.05$), Nur77核内表达量显著升高,胞质内表达量显著下降($P < 0.05$)。见图6。

2.7 各组小鼠肺组织中 Nur77、Traf2 mRNA 的表达比较

模型组肺组织中 Nur77 基因的 mRNA 表达量较空白组显著降低($P < 0.01$), 而 Traf2 基因的 mRNA 表达量则显著升高($P < 0.05$);电针组与模型组相比, Nur77 基因的 mRNA 表达呈现上调趋势($P < 0.05$), Traf2 基因的 mRNA 表达下降($P < 0.05$);拮抗剂+电针组相较于电针组, Nur77 基因的 mRNA 表达量显著降低($P < 0.05$), 而 Traf2 基因的 mRNA 表达量显著升高($P < 0.05$)。见图7。

2.8 各组小鼠肺组织中 Nur77 蛋白与 TRAF2 蛋白的相互作用水平

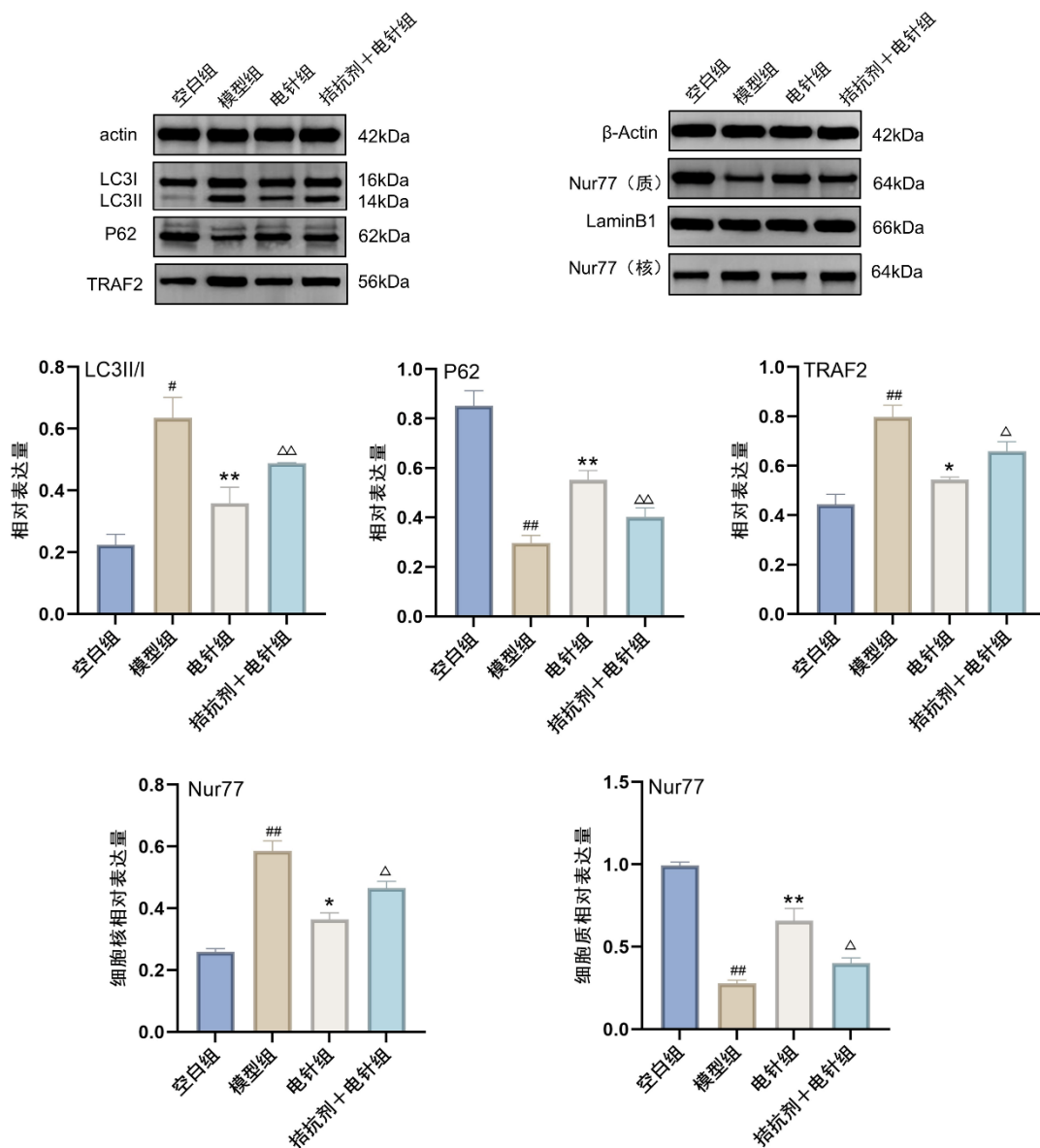
与空白组相比,模型组中 TRAF2 与 Nur77 的相对结合量显著降低($P < 0.01$);与模型组相比,电针组的 TRAF2 与 Nur77 的相对结合量显著升高($P < 0.05$);与电针组相比,拮抗剂+电针组的 TRAF2 与 Nur77 相对结合量呈现出进一步降低的趋势($P < 0.05$)。见图8。

3 讨论

针灸作为中医药的重要组成部分,在临床上广泛用于治疗各类慢性疾病,并已被证实能有效改善 COPD 患者的肺功能与生活质量^[18]。从中医理论视角看, COPD 多表现为“肺胀”“喘证”“咳嗽”,属本虚标实范畴,病久肺气虚弱,痰浊瘀阻,病及脾肾。临床针灸常以肺经为主,配合脾经肾经及胸背局部穴位施治^[19]。大量 Meta 分析及本课题组既往研究

表明,“足三里”和“肺俞”穴位为治疗 COPD 的重要腧穴,对这两个穴位进行电针刺激能显著改善肺功能,抑制炎症并缓解组织损伤^[20-22]。基于此,本研究围绕 Nur77 介导的自噬通路,探讨电针对 COPD 肺部炎症的作用机制。

吸烟是 COPD 的主要病因,其致病机制涉及慢性气道及肺实质的持续炎症,表现为巨噬细胞、中性粒细胞及 CD8+ T 细胞的浸润激活,以及多种促炎细胞因子的持续释放,如 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α , 这些因素共同介导气道重塑、肺气肿等病理改变,引起肺通气功能进行性损害^[23-24]。氧化应激作为 COPD 发病的另一重要病理机制,与炎症反应相互促进,形成正反馈放大效应^[25]。SOD 作为机体重要的抗氧化酶系统,能够催化超氧阴离子自由基歧化,保护细胞免受氧化损伤,而 MDA 是脂质过氧化反应的终产物,其含量升高直接反映组织氧化损伤程度^[26-27]。本研究结果显示,模型组小鼠肺组织 SOD 活性显著降低,MDA 含量显著升高,提示 COPD 小鼠肺组织存在明显的氧化应激损伤。电针干预后, SOD 活性显著升高,MDA 含量明显降低,同时 BALF 中 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 等炎症因子水平显著下降,表明电针能够增强机体抗氧化能力,减轻氧化应激损伤,抑制炎症反应。值得注意的是,应用 Nur77 拮抗剂后,电针对 SOD、MDA 及炎症因子的调节作用均被明显削弱,提示 Nur77 在电针调控氧化应激-炎症网络中发挥关键作用。自噬系统是细胞内物质降解与循环的重要通路,对保持细胞内稳态至关重要。然而,过度或失调的自噬可导致细胞功能障碍,甚至促进细胞死亡和组织损伤^[28-29]。研究表明, COPD 患者肺组织中自噬水平异常升高,自噬小体大量累积,这种过度自噬不仅未能有效清除受损成分,反而加剧了细胞损伤和炎症反应^[30]。肺巨噬细胞作为肺部固有免疫的关键效应细胞,其自噬功能失衡在 COPD 炎症病理中扮演重要角色^[5]。本实验结果表明, COPD 模型组呼吸



注:LC3为微管相关蛋白1轻链3;P62为自噬衔接蛋白P62;Nur77为核受体 Nur77;TRAF2为肿瘤坏死因子受体相关因子2。与空白组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与电针组比较,^Δ $P < 0.05$,^{ΔΔ} $P < 0.01$ 。

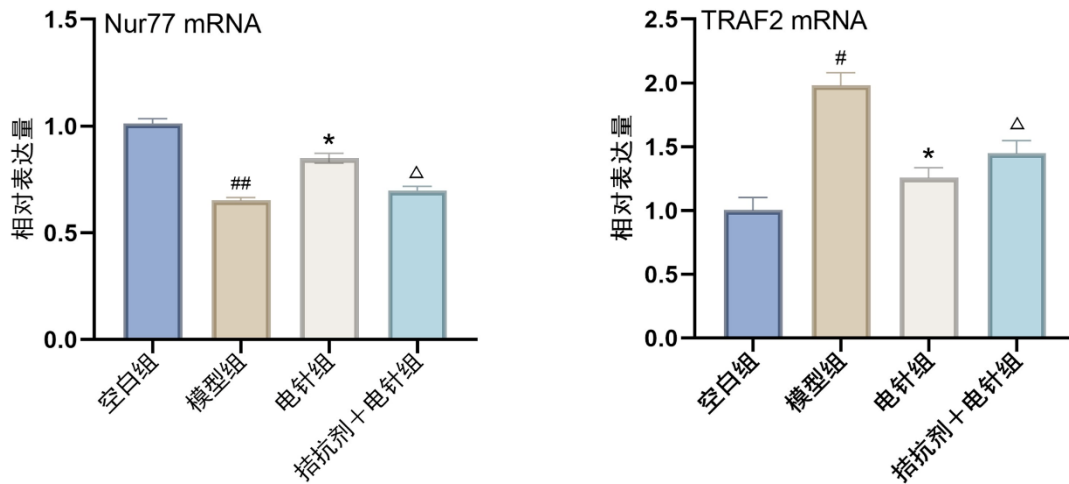
图 6 各组肺组织中 LC3II/LC3I 比值、P62 及 TRAF2 蛋白水平,以及 Nur77 核质分布的比较($\bar{x} \pm s$, 3 只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of LC3II/LC3I ratio, P62 and TRAF2 protein levels, and Nur77 nuclear-cytoplasmic distribution in lung tissue of mice in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 mice/group)

功能明显受损,同时 BALF 中 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 等炎症因子水平显著增高,透射电镜下巨噬细胞内自噬小体数量显著增多且异常堆积,LC3II/LC3I 比值显著升高,P62 蛋白表达明显降低,表明 COPD 肺组织存在自噬过度激活。自噬底物 P62 作为自噬降解的经典标志物,其水平降低进一步证实了自噬活性的异常增强。电针治疗后肺通气功能明显改善,炎症细胞因子含量降低,巨噬细胞内自噬小体数量明显减少,LC3II/LC3I 比值显著降低,P62 蛋白表

达显著升高,提示电针治疗可通过抑制过度自噬,减轻 COPD 肺部炎症反应。

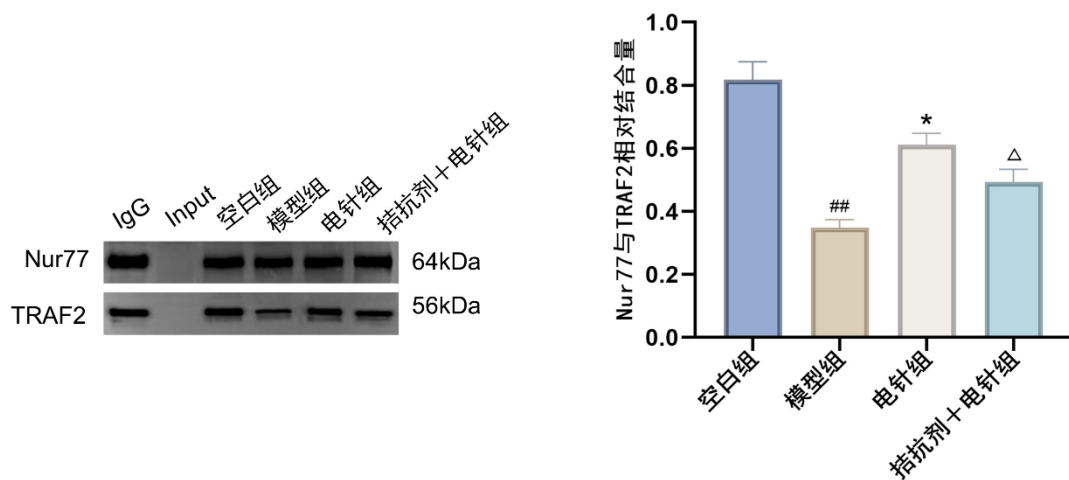
Nur77 作为核受体超家族成员,在细胞应激反应、炎症调控及自噬调节中发挥关键作用。Nur77 的功能高度依赖于其亚细胞定位:在细胞核内,Nur77 作为转录因子调控靶基因表达;当细胞受到应激刺激时,Nur77 可发生核-胞质转位,在胞质中发挥非转录功能^[31]。研究表明,胞质中的 Nur77 可定位于线粒体外膜,通过与 TRAF2 相互作用,介导



注:与空白组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$;与电针组比较,[△] $P < 0.05$ 。

图7 各组小鼠肺组织中 Nur77、Traf2 mRNA 的表达比较($\bar{x} \pm s$, 6只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of Nur77 and Traf2 mRNA expression in lung tissue of mice in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 mice/group)



注:Input为总蛋白; IgG为免疫球蛋白G。与空白组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$;与电针组比较,[△] $P < 0.05$ 。

图8 各组肺组织中 Nur77与 TRAF2相对结合量的比较($\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 8 Comparison of relative binding levels between Nur77 and TRAF2 in lung tissues in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 mice/group)

Parkin 依赖性线粒体自噬的启动^[32]。TRAF2 作为 E3 泛素连接酶,可催化 Nur77 发生非降解性 K63 泛素化修饰,促进 Nur77 在线粒体的富集,进而募集自噬相关蛋白,启动受损线粒体的选择性降解^[6]。本研究证实 COPD 模型小鼠肺组织 Nur77 核内表达量显著升高而胞质内表达量显著降低, TRAF2 蛋白水平显著升高, Nur77 与 TRAF2 的相对结合量显著降低,同时伴随巨噬细胞内自噬小体异常堆积、LC3II/LC3I 比值升高和 P62 蛋白降低。这些结果提示, COPD 病理状态下存在 Nur77 核-胞质转位障碍及 Nur77 与 TRAF2 互作减弱,导致对自噬的负向调控作用减弱,进而引起自噬过度激活。电针干预后, Nur77 核内表达量明显降低而胞质内表达量

明显升高,同时巨噬细胞内自噬小体数量减少, LC3II/LC3I 比值降低, P62 蛋白表达升高,炎症反应缓解。为进一步从转录水平验证上述蛋白表达变化,本研究采用实时荧光定量 PCR 检测了 Nur77 和 Traf2 的 mRNA 表达水平。结果显示,模型组 Nur77 mRNA 表达显著下调, Traf2 mRNA 表达显著上调,与蛋白水平变化趋势一致,表明 COPD 状态下 Nur77-TRAF2 通路在转录和翻译水平均受到抑制。电针干预显著上调 Nur77 mRNA 表达,下调 Traf2 mRNA 表达,从基因转录层面调控该通路。这些结果表明,电针可通过促进 Nur77 核-胞质转位,增强 Nur77 与 TRAF2 的相互作用,调控自噬相关蛋白表达,抑制过度自噬,从而改善 COPD 肺部

炎性反应。

基于Nur77-TRAF2介导的线粒体自噬的已知机制,我们推测电针可能通过促进Nur77在线粒体的富集,增强受损线粒体的选择性清除,减少线粒体源性ROS的产生,从而阻断线粒体损伤-氧化应激-炎性放大的级联反应。然而,本研究尚未直接检测线粒体自噬标志物(如PINK1、Parkin等)及线粒体功能指标(如线粒体膜电位、ROS水平),无法确证线粒体自噬在电针抑制COPD炎性中的具体作用。未来研究需通过透射电镜观察线粒体形态、检测线粒体自噬相关蛋白、评估线粒体功能动态变化,并结合线粒体-溶酶体共定位分析,系统验证这一假设。

综上所述,香烟烟雾刺激可导致肺组织Nur77表达下调及核-胞质转位障碍,Nur77与TRAF2相互作用减弱,从而引起自噬过度激活,导致COPD持续存在的肺部炎性反应;电针可通过上调Nur77表达并促进其核-胞质转位,增强Nur77与TRAF2的相互作用,调控自噬相关蛋白表达(LC3II/LC3I比值降低、P62升高),抑制肺巨噬细胞过度自噬,从而改善COPD肺部炎性反应。本研究不仅为电针治疗COPD提供了新的实验证据和机制阐释,也为靶向调控Nur77-TRAF2-自噬轴以治疗慢性炎性肺病提供了新的思路。

利益冲突

参考文献

- [1] Agustí A, Celli B R, Criner G J, et al. Global initiative for chronic obstructive lung disease 2023 report: gold executive summary [J]. Arch De Bronconeumología, 2023, 59 (4) : 232-248.
- [2] Guo P, Li R, Piao T H, et al. Pathological mechanism and targeted drugs of COPD [J]. Int J Chronic Obstr Pulm Dis, 2022, 17: 1565-1575.
- [3] Levine B, Kroemer G. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective [J]. Cell, 2019, 176 (1/2) : 11-42.
- [4] Kono Y, Colley T, To M, et al. Cigarette smoke-induced impairment of autophagy in macrophages increases galectin-8 and inflammation [J]. Sci Rep, 2021, 11: 335.
- [5] Zhang L, Cheng T, Liu C H, et al. The role and mechanism of macrophage autophagy in the experimental model of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Tob Induc Dis, 2024, 22: 186403.
- [6] Hu M J, Luo Q, Alitongbieke G, et al. Celastrol-induced Nur77 interaction with TRAF2 alleviates inflammation by promoting mitochondrial ubiquitination and autophagy [J]. Mol Cell, 2017, 66(1): 141-153.e6.
- [7] Hu M J, Alitongbieke G, Su Y, et al. Moving nuclear receptor Nur77 to damaged mitochondria for clearance by mitophagy [J]. Mol Cell Oncol, 2018, 5(3): e1327005.
- [8] Reddy A T, Lakshmi S P, Banno A, et al. Cigarette smoke downregulates Nur77 to exacerbate inflammation in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [J]. PLoS One, 2020, 15(2): e0229256.
- [9] Qin H P, Gao F, Wang Y N, et al. Nur77 promotes cigarette smoke-induced autophagic cell death by increasing the dissociation of Bcl2 from Beclin-1 [J]. Int J Mol Med, 2019, 44(1): 25-36.
- [10] Zeng Q, Liu L, Chen Y, et al. Efficacy and safety of acupuncture in managing COPD: an overview of systematic reviews [J]. Int J Chronic Obstr Pulm Dis, 2024, 19: 1721-1739.
- [11] 针灸科学研究联盟. 针灸科学研究行动计划 [J]. 针刺研究, 2025, 50(1): 1-2.
Acupuncture Scientific Research Alliance. A plan for acupuncture-moxibustion scientific research (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2025, 50(1): 1-2.
- [12] Li J, Wu S, Tang H T, et al. Long-term effects of acupuncture treatment on airway smooth muscle in a rat model of smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease [J]. Acupunct Med, 2016, 34(2): 107-113.
- [13] Ma H M, Zhou Z Y, Chen L Y, et al. Anemoside B4 prevents chronic obstructive pulmonary disease through alleviating cigarette smoke-induced inflammatory response and airway epithelial hyperplasia [J]. Phytomedicine, 2022, 107: 154431.
- [14] 吴慧慧, 潘祝, 刘海燕, 等. 电针调控 miR-19b-3p 表达介导 SOCS3/JAK1/STAT3 信号通路改善慢性阻塞性肺疾病小鼠肺部炎性反应 [J]. 针刺研究, 2024, 49(12): 1248-1256.
Wu H H, Pan Z, Liu H Y, et al. Electroacupuncture improves pulmonary function by reducing inflammatory reaction via inhibiting miR-19b-3p to regulate SOCS3/JAK1/STAT3 signaling pathway in mice with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Acupuncture Research, 2024, 49 (12) : 1248-1256.
- [15] Li M D, Hu Y Y, Zhou H, et al. NR4A1 aggravates myocardial ischaemia-reperfusion injury by inhibiting OPA1-mediated mitochondrial fusion [J]. J Cardiovasc Transl Res, 2023, 16(5): 1050-1063.
- [16] Lee S O, Andey T, Jin U H, et al. The nuclear receptor TR3 regulates mTORC1 signaling in lung cancer cells expressing wild-type p53 [J]. Oncogene, 2012, 31(27): 3265-3276.
- [17] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位第3部分: 小鼠 [J]. 针刺研究, 2021, 46(5): 445-446.
China Association of Acupuncture-Moxibustion. Nomenclature and location of acupoints commonly used in laboratory animals. Part 3: mice (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2021, 46 (5): 445-446.
- [18] Fernández-Jané C, Vilaró J, Fei Y T, et al. Acupuncture techniques for COPD: a systematic review [J]. BMC

- Complementary Med Ther, 2020, 20(1): 138.
- [19] Liu Q X, Duan H X, Lian A B, et al. Rehabilitation effects of acupuncture on the diaphragm dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2021, 16: 2023-2037.
- [20] Zhang X F, Zhu J, Geng W Y, et al. Electroacupuncture at Feishu (BL13) and Zusanli (ST36) down-regulates the expression of orexins and their receptors in rats with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Integr Med*, 2014, 12(5): 417-424.
- [21] 程晨, 张新芳, 苏景超, 等. 电针对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺组织自噬相关蛋白表达的影响[J]. *针刺研究*, 2021, 46(4): 266-271, 277.
- Cheng C, Zhang X F, Su J C, et al. Effect of electroacupuncture on the expression of autophagy related protein in lung tissue of rats with chronic obstructive pulmonary disease (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(4): 266-271, 277.
- [22] 李尹, 张新芳, 刘自兵, 等. 电针对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺泡巨噬细胞 M1 极化的影响[J]. *针刺研究*, 2020, 45(3): 173-179.
- Li Y, Zhang X F, Liu Z B, et al. Effect of electroacupuncture on pulmonary function and M1 polarization of alveolar macrophages in rats with chronic obstructive pulmonary disease (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2020, 45(3): 173-179.
- [23] Qi Y N, Yan Y Y, Tang D W, et al. Inflammatory and immune mechanisms in COPD: current status and therapeutic prospects[J]. *J Inflamm Res*, 2024, 17: 6603-6618.
- [24] Subedi S, Guntipally M, Suwal N, et al. Cellular senescence in chronic obstructive pulmonary disease: Molecular mechanisms and therapeutic interventions [J]. *Ageing Res Rev*, 2025, 110: 102813.
- [25] Barnes P J. Oxidative stress-based therapeutics in COPD [J]. *Redox Biol*, 2020, 33: 101544.
- [26] Forman H J, Zhang H Q. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(9): 689-709.
- [27] Ayala A, Muñoz M F, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014: 360438.
- [28] Lith S C, Evers T M J, Freire B M, et al. Nuclear receptor Nur77 regulates immunomechanics of macrophages [J]. *Eur J Cell Biol*, 2024, 103(2): 151419.
- [29] Yim W W, Mizushima N. Lysosome biology in autophagy [J]. *Cell Discov*, 2020, 6: 6.
- [30] Ryter S W, Lee S J, Choi A M. Autophagy in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2010, 4(5): 573-584.
- [31] Chen L Q, Fan F T, Wu L J, et al. The nuclear receptor 4A family members: mediators in human disease and autophagy [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2020, 25(1): 48.
- [32] Peng S Z, Chen X H, Chen S J, et al. Phase separation of Nur77 mediates celastrol-induced mitophagy by promoting the liquidity of p62/SQSTM1 condensates [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 5989.