

论 著

(基础研究)

枸杞多糖通过 Nrf2/HO-1 信号对百草枯致肺损伤的保护作用

朱 宇, 张志俊, 刘科蓝

【摘要】 目的 探讨枸杞多糖(LBP)对百草枯(PQ)中毒肺损伤保护作用和分子机制。**方法** 将雄性 SD 大鼠 24 只(8~10 周龄, 180~200 g 体重)采用随机数字表法随机分为 3 组, 分别为百草枯组($n=8$): 腹腔注射百草枯(20 mg/kg); PQ+LBP 组($n=8$): 腹腔注射百草枯(20 mg/kg)后灌胃给予枸杞多糖(400 mg/kg); 对照组($n=8$): 腹腔注射等量等渗盐水。各组大鼠于干预后 3 d 麻醉处死并留取肺组织标本, 制作肺组织切片。通过 HE 染色观察分析组织损伤和炎症发生情况; 通过检测大鼠肺湿/干重比(W/D)和羟脯氨酸含量进一步评估渗出及胶原沉积情况; 通过试剂盒方法检测肺组织丙二醛(MDA)、髓过氧化物酶(MPO)和超氧化物歧化酶(SOD)水平; 采用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测肺组织白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的水平; Western blot 检测核转录因子 NF-E2 相关因子 2(Nrf2)和血红素加氧酶-1(HO-1)相关信号分子的表达情况。**结果** 枸杞多糖处理后, 百草枯造成的大鼠肺损伤得到减轻, PQ+LBP 组大鼠肺组织的湿/干重比和羟脯氨酸含量较百草枯组显著降低($P<0.05$)。PQ+LBP 组大鼠肺组织 MPO 活性[(6.54 \pm 0.65) U/g]和 MDA 含量[(7.71 \pm 0.42) nmol/mg]较百草枯组[(16.49 \pm 0.59) U/g, (14.34 \pm 0.55) nmol/mg]下调($P<0.05$), 而 SOD 水平[(25.27 \pm 0.58) U/mg]较百草枯组[(12.25 \pm 0.62) U/mg]显著增加($P<0.05$)。PQ+LBP 组大鼠肺组织中炎症因子 IL-1 β [(115.93 \pm 3.17) pg/mg]和 TNF- α [(66.34 \pm 4.27) pg/mg]的表达水平较百草枯组[(225.58 \pm 4.83) pg/mg, (167.00 \pm 5.80) pg/mg]下调($P<0.05$)。PQ+LBP 组大鼠肺组织中炎症因子 IL-1 β [(115.93 \pm 3.17) pg/mg]和 TNF- α [(66.34 \pm 4.27) pg/mg]的表达水平较百草枯组[(225.58 \pm 4.83) pg/mg, (167.00 \pm 5.80) pg/mg]下调($P<0.05$)。PQ+LBP 组大鼠肺组织 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平较百草枯组显著上调($P<0.05$)。**结论** 枸杞多糖能够通过抗氧化、抗炎等作用减轻百草枯造成的肺损伤, 相关保护作用与 Nrf2/HO-1 信号途径关系密切。

【关键词】 枸杞多糖; 百草枯; 肺损伤; 核转录因子 NF-E2 相关因子 2; 血红素加氧酶-1

【中图分类号】 R595.4; R563 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2021)06-0566-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2021.06.002

Protective effects of lycium barbarum polysaccharides on paraquat induced lung injury via Nrf2/HO-1 signaling

ZHU Yu, ZHANG Zhi-jun, LIU Ke-lan

(Intensive Care Unit, Liyang People's Hospital, Liyang 213300, Jiangsu, China)

【Abstract】 Objective To investigate the protective effects and molecular mechanisms of lycium barbarum polysaccharides (LBP) on paraquat (PQ) induced lung injury. **Methods** Male SD rats (8-10 weeks old, 180-200 g) were randomly divided into three groups: PQ group ($n=8$): intraperitoneal injection of PQ (20 mg/kg); PQ+LBP group ($n=8$): intraperitoneal injection of PQ (20 mg/kg), intragastric administration of LBP (400 mg/kg); control group ($n=8$): intraperitoneal injection of the same amount of saline. The rats were killed 3 days after the intervention, and the lung tissue samples were taken for further use. HE staining was used to analyze the occurrence of tissue injury and inflammation. The wet to dry weight ratio (W/D) and hydroxyproline content were detected to further evaluate the exudation and collagen deposition. The levels of malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO) and superoxide dismutase (SOD) in lung tissue were detected by kit.

作者单位: 213300 溧阳, 溧阳市人民医院重症医学科(朱 宇、张志俊、刘科蓝)

通信作者: 刘科蓝, E-mail: 34993703@qq.com

The levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in lung tissue were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of nu-

clear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) was detected by Western blotting assays.

Results After treatment with LBP, the lung injury induced by PQ was alleviated. The W/D ratio and hydroxyproline content of lung tissues in PQ+LBP group were significantly lower than those in PQ group ($P<0.05$). The MPO activity [(6.54 ± 0.65) U/g] and MDA content [(7.71 ± 0.42) nmol/mg] of rat lung tissues in PQ+LBP group were lower than those in PQ group [(16.49 ± 0.59) U/g, (14.34 ± 0.55) nmol/mg] ($P<0.05$), while SOD level [(25.27 ± 0.58) U/mg] was significantly higher than that in PQ group [(12.25 ± 0.62) U/mg] ($P<0.05$). The levels of IL-1 β [(115.93 ± 3.17) pg/mg] and TNF- α [(66.34 ± 4.27) pg/mg] in rat lung tissues of PQ+LBP group were lower than those of PQ group [(225.58 ± 4.83) pg/mg, (167.00 ± 5.80) pg/mg] ($P<0.05$). At the same time, Nrf2/HO-1 signaling was up-regulated in PQ+LBP group ($P<0.05$).

Conclusion LBP could alleviate the lung injury induced by PQ through anti-oxidation and anti-inflammatory effects via Nrf2/HO-1 signaling pathway.

[Key words] lycium barbarum polysaccharides; paraquat; lung injury; nuclear factor erythroid 2-related factor 2; heme oxygenase-1

0 引言

百草枯(paraquat, PQ)中毒是最常见的中毒类型之一。由于缺乏有效的特异性解毒药物,百草枯中毒患者的病死率极高,达到60%~80%^[1]。由于肺部的主动摄取机制,百草枯常积聚于肺并引起肺损伤和肺纤维化。百草枯中毒引起肺组织病变的相关分子机制并不明确,主要涉及氧化-抗氧化失衡、脂质过氧化、炎症激活和细胞凋亡等病理生理过程^[2]。近年来,中药以及中药相关活性成分对肺损伤的保护作用逐渐受到重视,如血必净^[3]、牛蒡子苷元^[4]等。其中枸杞多糖(lycium barbarum polysaccharides, LBP)被认为具有抗氧化自由基、抗肿瘤、免疫调节等作用,具备一定的转化应用价值^[5]。本研究拟探究枸杞多糖对百草枯所致大鼠肺损伤的保护作用并初步探索潜在的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 枸杞多糖(Solarbio, 纯度 $\geq 90\%$), 百草枯(Sigma 公司), 羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)含量测定试剂盒(Solarbio), 髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)测定试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量检测试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性测定试剂盒(南京建成生物工程研究所), 白细胞介素-1 β (IL-1 β)检测 ELISA 试剂盒、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)检测 ELISA 试剂盒(上海碧云天公司), 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测核转录因子 NF-E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)、 β -actin 相关抗体(美国 Abcam 公司)。

1.2 动物实验分组及取材 SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只(8~10 周龄, 体重 200~220 g)由江苏省人民医院

实验动物房提供, 实验动物许可证号: SCXK(苏)2016-0002。饲养于相对湿度 50%~60%、温度 22~24 °C 的环境中, 光照周期 12 h, 自由饮水和进食。采用随机数字表法分为 3 组: 百草枯组($n=8$): 腹腔注射百草枯(20 mg/kg); PQ+LBP 组($n=8$): 腹腔注射百草枯(20 mg/kg)后灌胃给予枸杞多糖(400 mg/kg); 对照组($n=8$): 腹腔注射等量等渗盐水。大鼠于实验后 3 d 麻醉处死并留取肺组织标本。

1.3 大鼠肺湿/干重比分析和羟脯氨酸含量检测

测定大鼠肺湿/干重比检测时, 取左肺擦干表面液体, 称取其湿质量(W), 将其置于烘箱中晾干至恒重, 称取干质量(D), 计算两者比值即为湿/干重比(W/D)。按照试剂盒标准流程检测检测肺组织羟脯氨酸含量。

1.4 MPO、MDA 和 SOD 水平检测 按照对应试剂盒说明书要求分别检测肺组织匀浆中 MPO、MDA 和 SOD 的水平。

1.5 IL-1 β 、TNF- α 表达水平检测 采用 ELISA 试剂盒分别检测 3 组大鼠肺组织匀浆中炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 的表达水平。

1.6 Western blot 检测肺组织 Nrf2 和 HO-1 表达水平 取大鼠肺组织按每 100 毫克加 1 mL 组织裂解液, 充分匀浆后收集上清并测定蛋白浓度。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 湿转法转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜, 采用含有 5% 牛血清白蛋白(BSA)的封闭液封闭后, 加入对应一抗, 孵育后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗, 孵育后增强化学发光法(ECL)显色, 条带灰度值采用 Image J 软件分析。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 22.0 进行统计学分析, 计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 3 组间均数比较采用单因素方差分析(ANOVA), 多重比较采用 LSD- t 检验; 以 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠肺组织学改变、湿/干重比和羟脯氨酸含量比较 大鼠肺组织切片经 HE 染色后,在光镜下观察发现:百草枯组大鼠在腹腔注射百草枯 3 d 后,肺部渗出明显增多,大量炎细胞浸润,肺泡塌陷,组织结构受损严重。与百草枯组比较,经枸杞多糖灌胃处理的 PQ+LBP 组大鼠肺部炎症渗出显著减少,炎细胞浸润得到一定的缓解,肺组织结构基本正常,见图 1。与对照组大鼠比较,百草枯组大鼠肺组织的湿/干重比和羟脯氨酸含量显著增加($P<0.05$),而 PQ+LBP 组大鼠肺组织的湿/干重比和羟脯氨酸含量较百草枯组显著降低($P<0.05$),见图 2。

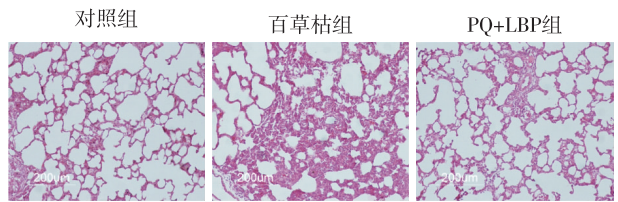
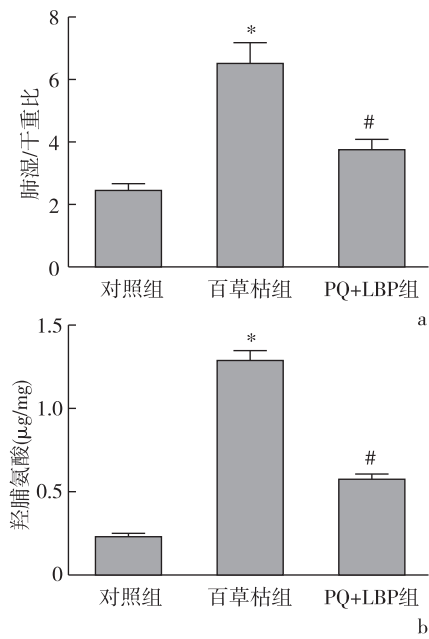


图 1 各组大鼠肺组织切片 (HE 染色 $\times 100$)



a: 肺组织湿/干重比; b: 羟脯氨酸
与对照组比较, $*P<0.05$; 与百草枯组比较, $\#P<0.05$

图 2 各组大鼠肺组织湿/干重比和羟脯氨酸含量比较

2.2 各组大鼠肺组织 MPO、MDA 和 SOD 水平比较 与对照组比较,百草枯组大鼠肺组织中 MPO 活性和 MDA 含量显著增加,而 SOD 活性降低($P<0.05$)。与百草枯组比较,PQ+LBP 组大鼠肺组织 MPO 活性和 MDA 含量下调($P<0.05$),而 SOD 水平显著增加($P<0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠肺组织 MPO、MDA、SOD 表达水平 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MPO (U/g)	MDA (nmol/mg)	SOD (U/mg)
对照组	8	3.66±0.42	5.01±0.31	33.74±0.75
百草枯组	8	16.49±0.59*	14.34±0.55*	12.25±0.62*
PQ+LBP 组	8	6.54±0.65**	7.71±0.42**	25.27±0.58**
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

与对照组比较, $*P<0.05$; 与百草枯组比较, $\#P<0.05$

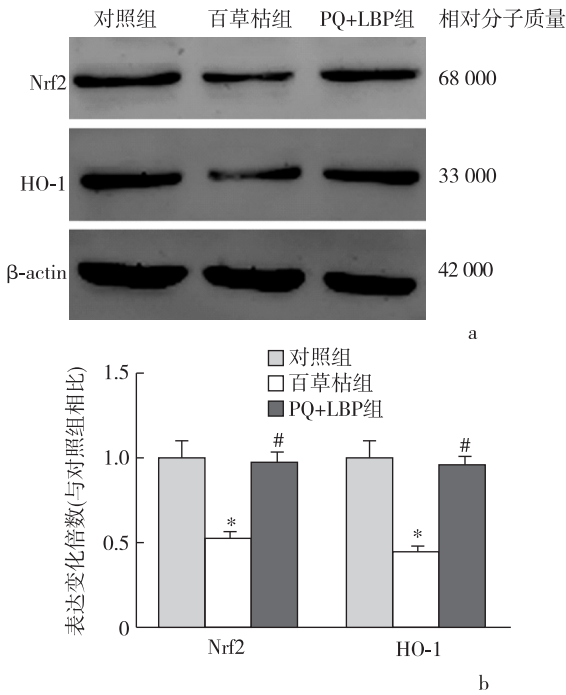
2.3 各组大鼠肺组织 IL-1 β 和 TNF- α 表达水平比较 与对照组比较,百草枯组大鼠肺组织中 IL-1 β 和 TNF- α 的表达水平显著增加($P<0.05$)。与百草枯组比较,PQ+LBP 组大鼠肺组织中 IL-1 β 和 TNF- α 的表达水平下调($P<0.05$),说明枸杞多糖能够降低大鼠肺组织中 IL-1 β 和 TNF- α 的表达水平,见表 2。

表 2 各组大鼠肺组织 IL-1 β 、TNF- α 表达水平 ($\bar{x}\pm s$, pg/mg)

组别	n	IL-1 β	TNF- α
对照组	8	82.01±2.90	43.90±2.38
百草枯组	8	225.58±4.83*	167.00±5.80*
PQ+LBP 组	8	115.93±3.17**	66.34±4.27**
P 值		<0.001	<0.001

与对照组比较, $*P<0.05$; 与百草枯组比较, $\#P<0.05$

2.4 各组大鼠肺组织 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平比较 与对照组比较,百草枯组大鼠肺组织 Nrf2 和 HO-1 的表达受到抑制($P<0.05$)。PQ+LBP 组大鼠肺组织 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平较百草枯组显著上调($P<0.05$),见图 3。



与对照组比较, $*P<0.05$; 与百草枯组比较, $\#P<0.05$

图 3 各组大鼠肺组织中 Nrf2 和 HO-1 分子蛋白表达水平

3 讨 论

百草枯导致的肺损伤和肺纤维化是中毒患者死亡的主要原因^[6],其发生发展的分子机制尚不明确,寻找有效的肺损伤和肺纤维化抑制剂对改善患者的预后具有重要意义^[7]。近年来,多种中药活性成分在不同病因导致的肺损伤治疗方面的价值逐渐受到重视^[8]。枸杞多糖作为枸杞的主要活性成分,主要由鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、等多种水溶性复合多糖组成,具有重要的药理学活性,包括抗癌、抗氧化、抗衰老、免疫调节等作用^[9-10]。

本研究通过构建大鼠动物模型发现,枸杞多糖能够减轻百草枯中毒导致的肺损伤、减少肺组织渗出、减少肺组织羟脯氨酸的沉积。通过对氧化应激相关分子 MPO、MDA 和 SOD 的检测和比较发现,枸杞多糖能够降低 MPO 活性和 MDA 水平,上调 SOD 活性,提示枸杞多糖有助于提升清除自由基的能力、抑制脂质过氧化反应、减少氧化应激造成的组织损伤。而 PQ+LBP 组大鼠肺组织中 IL-1 β 和 TNF- α 的表达水平下调,表明枸杞多糖具有一定的抗炎作用。在相关分子机制研究方面,枸杞多糖处理后,大鼠肺组织 Nrf2 和 HO-1 蛋白水平上调,该通路参与多种组织器官的抗氧化应激反应,是机体重要的抗氧化损伤机制。此外,Nrf2/HO-1 还具有调节免疫应激、抗炎、减少线粒体损伤和抗凋亡等作用^[11-12]。

对于其他病因引起的肺部疾患,枸杞多糖也能发挥一定的治疗作用。Chen 等^[13]在小鼠和人肺微血管内皮细胞 (HPMECs) 两个水平研究枸杞多糖对脂多糖 (LPS) 诱导的急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 的保护作用及分子机制,发现:枸杞多糖能够通过抑制 NF- κ B 信号途径发挥抗凋亡和抗氧化作用,减少内皮细胞损伤,减轻肺部炎症和水肿。也有报道枸杞多糖通过 Akt/eNOS 通路减轻 LPS 致 ARDS 小鼠肺损伤,发挥抗炎、抗氧化应激及抗凋亡作用^[14]。对于病情稳定的慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 患者中,枸杞多糖能够降低并稳定血清缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 浓度,抑制病情加重^[15]。在肺纤维化研究方面,枸杞多糖能够抑制肺纤维化相关基因 COL1A1 和 α -SMA 的表达,减少肺组织羟脯氨酸的沉积,同时还能够抑制成纤维细胞过度增殖和转分化^[16]。相关机制与百草枯中毒导致的肺纤维化发生发展关系密切,枸杞多糖是否能够抑制上述过程进而阻断百草枯所致的肺纤维化有待探讨。

综上所述,本研究中,枸杞多糖作为一种重要

的植物活性成分对百草枯诱导的肺损伤具有较好的保护作用,同时能够发挥抗氧化应激和抗炎活性,Nrf2/HO-1 信号途径可能参与这个过程。相关分子调控机制及转化应用前景还需进一步研究。

【参考文献】

- [1] 张迪,刘倩倩,彭瑾瑾,等. 肌腱蛋白 C 在百草枯中毒肺损伤中的作用[J]. 中国医科大学学报, 2020, 49(8): 711-715.
- [2] 刘倩倩,刘晓伟,张迪,等. 血清肌腱蛋白 C 评估急性百草枯中毒患者肺损伤[J]. 中华急诊医学杂志, 2019, 28(3): 292-297.
- [3] Wang T, Li S, Wu Y, *et al.* Mechanistic Investigation of Xuebi-jing for Treatment of Paraquat-Induced Pulmonary Fibrosis by Metabolomics and Network Pharmacology [J]. ACS Omega, 2021, 6(30): 19717-19730.
- [4] Gao F, Zhang Y, Yang Z, *et al.* Arctigenin Suppressed Epithelial-Mesenchymal Transition Through Wnt3a/ β -Catenin Pathway in PQ-Induced Pulmonary Fibrosis [J]. Front Pharmacol, 2020, 11:584098. doi: 10.3389/fphar.2020.584098.
- [5] 魏雪松,王海洋,孙智轩,等. 宁夏枸杞化学成分及其药理活性研究进展[J]. 中成药, 2018, 40(11): 2513-2520.
- [6] 徐华,陈建洪. 连续性静脉-静脉血液滤过联合血液灌流对百草枯中毒疗效的研究[J]. 东南国防医药, 2017, 19(2): 157-159.
- [7] 李辞茹. 百草枯中毒致肺纤维化临床治疗及分子机制研究进展[J]. 医学研究生学报, 2020, 33(3): 322-326.
- [8] Ren Y, Yang Z, Sun Z, *et al.* Curcumin relieves paraquat-induced lung injury through inhibiting the thioredoxin interacting protein/NLR pyrin domain containing 3-mediated inflammatory pathway[J]. Mol Med Rep, 2019, 20(6): 5032-5040.
- [9] 娜日苏,孔维雪. 枸杞多糖的纯化与生理功能的研究进展[J]. 中药材, 2019, 42(3): 704-707.
- [10] 李媛媛,亓翠玲,周芷晴,等. 枸杞多糖对自发乳腺癌 MMTV-PyMT 小鼠肿瘤生长和转移的作用[J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(6): 618-621.
- [11] 杨曼,于洋,谢克亮,等. 氢气对野生型及 Nrf2 基因敲除型脓毒症小鼠肺损伤的影响:与 Nrf2/HO-1/HMGB1 通路的关系[J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31(7): 862-866.
- [12] 范晓迪,姚明江,李澎,等. 塞络通通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路改善 OGD/R 诱导脑微血管内皮细胞损伤[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(7): 1018-1023.
- [13] Chen L, Li W, Qi D, *et al.* Lycium barbarum polysaccharide protects against LPS-induced ARDS by inhibiting apoptosis, oxidative stress, and inflammation in pulmonary endothelial cells [J]. Free Radic Res, 2018, 52(4): 480-490.
- [14] 李雯,陈兰,戚迪,等. 枸杞多糖通过 Akt/eNOS 通路减轻 LPS 致 ARDS 小鼠肺损伤[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(9): 1258-1263.
- [15] Chen LJ, Xu W, Li YP, *et al.* Lycium barbarum Polysaccharide Inhibited Hypoxia-Inducible Factor 1 in COPD Patients[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2020, 15:1997-2004.
- [16] 刘舵,董玲娟,雷婷,等. 枸杞多糖对博来霉素致肺纤维化小鼠的干预作用及其机制[J]. 医学研究生学报, 2016, 29(9): 918-922.

(收稿日期:2021-01-12; 修回日期:2021-08-16)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:朱一起)