

余甘子醇提物对硅肺小鼠的保护作用及与 Nrf2/ARE 信号通路的相关性

张玉蝶¹, 李欣¹, 何晓艳¹, 吴丽娟¹, 余蓉¹, 杨培富², 陈大义^{1*}

(1. 成都中医药大学, 成都 611137;

2. 凉山州晟森生物科技有限公司, 四川 西昌 615000)

[摘要] 目的:探讨余甘子醇提物对二氧化硅(SiO₂)诱导的硅肺小鼠的影响及可能的作用机制。方法:将SPF级雄性昆明小鼠36只随机分为空白组、模型组、余甘子高剂量组(800 mg·kg⁻¹)、余甘子中剂量组(400 mg·kg⁻¹)、余甘子低剂量组(200 mg·kg⁻¹)、汉防己甲素组(0.039 mg·kg⁻¹),每组6只。除空白组以外,其余组均采用静式染毒法复制硅肺模型。灌胃28 d后取出肺组织计算脏器系数;采用苏木素-伊红(HE)染色和Masson染色检测小鼠肺组织的组织形态;采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中的羟脯氨酸(HYP)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)的含量;应用蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)技术检测核因子E₂相关因子2(Nrf2)、血红素氧合酶-1(HO-1)、依赖型辅酶还原酶/醌氧化还原酶1(NQO1)、Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1)蛋白和mRNA的表达。结果:与空白组比较,模型组小鼠肺组织形态结构严重损伤,炎性细胞浸润,纤维组织增生;血清中SOD和CAT的含量均显著减少($P<0.01$),HYP和MDA的含量均显著增加($P<0.01$);肺组织中Nrf2、HO-1、NQO1蛋白与mRNA的表达均显著减少($P<0.01$),Keap1蛋白与mRNA的表达均明显增加($P<0.05, P<0.01$)。与模型组比较,余甘子高、中剂量组小鼠的肺组织形态结构得到明显恢复,胶原沉积减少;余甘子高、中剂量组血清的SOD和CAT含量均明显增加($P<0.05, P<0.01$),HYP和MDA含量均显著减少($P<0.01$);余甘子高、中剂量组肺组织的Nrf2、HO-1、NQO1蛋白与mRNA的表达均明显增加($P<0.05, P<0.01$),Keap1蛋白与mRNA的表达均明显减少($P<0.05, P<0.01$)。结论:余甘子醇提物可以抑制硅肺小鼠肺纤维化,其机制可能与Nrf2/抗氧化反应元件(ARE)信号通路的调控有关。

[关键词] 余甘子; 硅肺; 抗纤维化; 抗氧化; 核因子E₂相关因子2(Nrf2)/抗氧化反应元件(ARE)信号通路

[中图分类号] R242; R2-0; R2-031; R285; R825.6; R56 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)09-0129-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230991

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220321.1938.036.html>

[网络出版日期] 2022-03-22 15:14:20

Protective Effect of Alcohol Extract of Phyllanthi Fructus on Silicosis Mice and Its Correlation with Nrf2/ARE Signaling Pathway

ZHANG Yudie¹, LI Xin¹, HE Xiaoyan¹, WU Lijuan¹, YU Rong¹, YANG Peifu², CHEN Dayi^{1*}

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

2. Liangshan Zhoushengsen Biological Technology Co. Ltd., Xichang 615000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect and underlying mechanism of alcohol extract of Phyllanthi Fructus on silicosis mice induced by silicon dioxide (SiO₂). **Method:** Thirty-six male Kunming mice of SPF grade were randomly divided into a blank group, a model group, high-, medium-, and low-dose Phyllanthi Fructus groups (800, 400, 200 mg·kg⁻¹), and a tetrandrine group (0.039 mg·kg⁻¹), with six mice in each group.

[收稿日期] 2021-10-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82004251);凉山州农业科技创新项目(19NYCX0022)

[第一作者] 张玉蝶,在读硕士,从事营养与食品卫生研究, E-mail: 1425679528@qq.com

[通信作者] * 陈大义, 硕士, 教授, 从事食物中生物活性成分研究, E-mail: chendayi0523@sina.com

The silicosis model was induced by static SiO₂ exposure in mice except for those in the blank group. After 28 days of administration by gavage, the lung tissues were collected and the organ coefficient was calculated. Hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson staining were used to detect the morphology of lung tissues. The content of hydroxyproline (HYP), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and catalase (CAT) in serum was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blot and Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) were used to detect the protein and mRNA expression of nuclear factor E₂-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1), and Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), respectively. **Result:** Compared with the blank group, the model group showed seriously damaged morphological structure of lung tissues with inflammatory cell infiltration and fibrous tissue proliferation, reduced serum content of SOD and CAT ($P < 0.01$), increased content of HYP and MDA ($P < 0.01$), down-regulated protein and mRNA expression of Nrf2, HO-1, and NQO1 ($P < 0.01$), and up-regulated protein and mRNA expression of Keap1 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the high- and medium-dose Phyllanthi Fructus groups showed significantly restored morphological structure of lung tissues with reduced collagen deposition, increased serum content of SOD and CAT ($P < 0.05$, $P < 0.01$), decreased content of HYP and MDA ($P < 0.01$), up-regulated protein and mRNA expression of Nrf2, HO-1, and NQO1 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and down-regulated protein and mRNA expression of Keap1 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** The alcohol extract of Phyllanthi Fructus can inhibit pulmonary fibrosis in silicosis mice, and the underlying mechanism may be related to the regulation of the Nrf2/antioxidant response element (ARE) signaling pathway.

[Keywords] Phyllanthi Fructus; silicosis; anti-fibrosis; anti-oxidation; nuclear factor E₂-related factor 2/ antioxidant response element (ARE) signaling pathway

硅肺是由于在职业活动中长期吸入大量含有游离二氧化硅(SiO₂)粉尘所引起的全身性疾病,以肺部广泛的结节性纤维化为特征^[1]。硅肺是一种进行性、不可逆且无法治愈的疾病,对工人的身心健康、劳动能力及生活质量都有很大的影响^[2]。迄今为止,还没有明确的药物能够延缓或逆转 SiO₂所造成的肺损伤,对于能降低其致残率和死亡率相关药物的研究也同样未取得突破性的进展^[3]。因此积极开展对治疗硅肺的机制研究,开发特色药物防治硅肺,具有重要意义。

研究表明, SiO₂进入肺组织后会导致大量成纤维细胞增殖和细胞外基质(ECM)沉积,并且进一步促进细胞损伤、氧化应激、肺部炎症相互影响的恶性循环,最终引发硅肺^[4-5]。硅肺病被认为是一种氧化应激相关疾病,有研究发现核因子 E₂相关因子 2(Nrf2)/抗氧化反应元件(ARE)信号通路参与了硅肺暴露的发病过程,通过激活 Nrf2/ARE 信号通路,可以增加抗氧化蛋白及 II 相解毒酶的合成,进而增强人体的抗氧化能力,达到延缓肺纤维化进展的目的^[6-7]。

余甘子又名滇橄榄,为大戟科植物余甘子 *Phyllanthus emblica* 的干燥成熟果实,归肺、胃经,

性凉味甘,已广泛用于治疗各种疾病,特别是肝炎、糖尿病甚至癌症等疾病^[8-10]。研究发现余甘子可以保护肺部免受炎症损伤,通过调节白细胞介素-1 β (IL-1 β)/微 RNA-101(miR-101)/Lin28B 信号通路有效地预防肺癌前病变^[11]。余甘子中提取的邻苯三酚可以通过调节支气管上皮细胞中促炎症基因的表达,对治疗肺囊性纤维化有积极作用^[12]。与此同时,有报道称余甘子叶的多酚对肺纤维化有改善作用,具有维持肺组织功能完整性的能力^[13]。本课题预实验结果提示,余甘子具有抗氧化的作用,对硅肺具有保护作用,但具体的机制尚不明确。为进一步探明余甘子抗硅肺的作用,本实验采用静式染毒法建立小鼠硅肺模型,应用蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 Nrf2/ARE 通路相关蛋白与 mRNA 的表达,以期首次揭示余甘子对硅肺作用机制,为防治硅肺提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性昆明种小鼠 46 只,4 周龄,体重(18 \pm 2) g,购于成都达硕实验动物有限公司,合格证号 SCXK(川)2015-030。动物饲养于成都中医药大学动物房,室温控制在(23 \pm 2) °C,相对湿度

保持在40%~60%。所有实验动物的管理及实验均遵守中华人民共和国卫生部动物实验管理条例和成都中医药大学实验动物管理条例,该研究获得中国成都中医药大学动物伦理委员会(2019-21)批准。

1.2 余甘子醇提物制备 称取余甘子粉末50 g放入2 L的无水乙醇中,40 °C温度下超声提取20 min,真空抽滤取滤液,旋转蒸发浓缩后,于40 °C温度下烘干至膏状,总提取率约为15%。余甘子醇提物使用前用超纯水溶解,配置成不同浓度。

1.3 材料及试剂 余甘子采购于西昌,经西昌学院蔡光泽教授鉴定为大戟科植物余甘子的成熟果实;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为1099211、1091639、1092355);BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号P0009);苏木素染液、伊红染液、血红素氧合酶-1(HO-1)抗体、依赖型辅酶还原酶/醌氧化还原酶1(NQO1)抗体、First Stand cDNA Synthesis Kit、2×SYBR Green qPCR Master Mix(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G1005-1、G1001、GB12104、GB11282、#LT203701、MPC2011003);Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国ABclonal公司,批号分别为a17062、AC026);Nrf2抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号BS-1074R);生物素化山羊抗鼠免疫球蛋白G(IgG)(H+L)、山羊抗兔IgG(H+L)(英国Abcam公司,批号分别为ab6789、ab6721);细胞/组织总RNA提取试剂盒(上海翌圣生物科技有限公司,批号M2010861)。

1.4 仪器 ESJ200-4B型分析电子天平(沈阳龙腾电子有限公司),BA400Digital型数码三目摄像显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司),JY-SCZ4⁺型垂直电泳槽、JY200C型电泳仪,JY-96G型基因扩增仪(北京君意东方电泳设备有限公司),TY-80A型水平脱色摇床(江苏科析仪器有限公司),5200型化学发光凝胶成像仪(上海天能科技有限公司),MK3型多功能酶标仪(美国Thermo Fisher仪器有限公司),TL88型Real-time PCR仪(西安天隆科技有限公司),ND5000型超微量紫外-可见分光光度计(北京百泰克生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 硅肺小鼠模型的建立及动物分组 46只雄性昆明小鼠,11只未染毒作为空白组,其余35只染毒小鼠每天按800 mg·m⁻³静式染毒微米级SiO₂ 6 h,

重复40 d复制硅肺纤维化模型^[14]。前期实验在染毒40 d后,未染毒组小鼠与染毒组各处死5只小鼠,取肺组织做病理切片,结果显示所有染毒组小鼠出现矽结节,证明造模成功。造模后随机分为模型组、汉防己甲素组、余甘子低、中、高剂量组,每组6只。

2.2 给药 2020年版《中华人民共和国药典》规定“余甘子推荐使用量为3~9 g,多入丸散服”^[15]。本实验余甘子提取率为15%,转换后的临床推荐量为0.45~1.35 g。根据“人和动物间按体表面积折算等效剂量比值表”折算成小鼠的药量为68.25~204.75 mg·kg⁻¹。由于本实验是单一用药,结合前期预实验结果,将小鼠灌胃的低剂量设定为200 mg·kg⁻¹,中、高剂量组按照400、800 mg·kg⁻¹剂量灌胃。汉防己甲素组按照0.039 mg·kg⁻¹剂量灌胃汉防己甲素药物,模型组和空白组灌胃超纯水,每日1次,持续给药28 d。

2.3 指标检测

2.3.1 脏器系数 所有小鼠解剖后取出肺组织,用0.9%生理盐水冲洗,用滤纸吸干水分,称重,计算脏器系数。计算公式:脏器系数=肺组织湿质量/体质量×100%。

2.3.2 肺组织病理状态改变 用4%多聚甲醛固定液按1:20的比例将肺组织固定,常温保存。然后经脱水、透明、石蜡包埋、切片处理后,用苏木素-伊红(HE)染色、Masson染色,光镜下观察肺组织病理改变。

2.3.3 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测HYP、SOD、MDA、CAT表达水平 在小鼠解剖前,先用采血针进行眼眶取血,血液室温静置10 min后,于4 °C下4 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径6 cm),取上层血清并分装。采用ELISA检测血清中HYP、SOD、MDA、CAT的表达水平,检测方法参照各试剂盒说明书。

2.3.4 Western blot检测HO-1、Keap1、Nrf2、NQO1蛋白表达水平 用RIPA裂解液从小鼠肺组织中提取蛋白样本,BCA蛋白检测试剂盒测定样本蛋白浓度。样本经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。在室温下用3%~5%脱脂牛奶封闭,用一抗稀释液稀释抗体HO-1(1:1 000)、Keap1(1:1 000)、抗体Nrf2(1:500)、抗体NQO1(1:1 000)、 β -actin(1:10 000),PVDF膜与一抗在4 °C孵育过夜。用TBST在室温下清洗PVDF膜3次(每次10 min),二抗(1:5 000)孵育30 min后,再次清洗PVDF膜3次(每

次10 min)。在化学发光成像系统下采集图像,用系统自带的ChemiScope analysis软件进行灰度分析。通过与标准蛋白 β -actin的比较,分析被测蛋白的相对表达量。

2.3.5 Real-time PCR 检测 HO-1、Keap1、Nrf2、NQO1 mRNA 表达水平 使用细胞/组织总RNA提取试剂盒从肺组织中提取总RNA,用Easy Script First-Strand cDNA Synthesis SuperMix合成cDNA。将含有荧光素的PCR试剂与模板DNA(即cDNA)混合,经过95℃变性15 s、55~65℃退火10 s、72℃延伸30 s的热循环40次,实时检测荧光信号强度,求 C_t 值。将甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参基因,计算出HO-1、Keap1、Nrf2、NQO1 mRNA相对表达定量。引物由武汉赛维尔生物科技有限公司设计合成,序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
HO-1	上游 GCTAAGACCGCCTTCTGCT	105
	下游 ACGAAGTGACGCCATCTGTGA	
Keap1	上游 CAGATTGACAGCGTGGTTCG	329
	下游 TGCGGGCAGTCGTATTTGA	
Nrf2	上游 CCTTTGGAGCAAGACATAGATC	290
	下游 CATCTACAAATGGGAATGTCTCTG	
NQO1	上游 ACGACAACGGTCCTTTCCAG	256
	下游 TCCTCCCAGACGGTTTCCA	
GAPDH	上游 CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	133
	下游 TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT	

2.4 统计学分析 采用SPSS 24.0软件进行统计学评价,所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间平均值差异采用单因素方差分析,然后进行最小显著性差异法(LSD)或Tamhane检验; $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 余甘子醇提物对脏器系数的影响 造模28 d后,取出肺组织进行称重,计算脏器系数。SiO₂复制硅肺模型后,与空白组比较,模型组小鼠脏器指数显著增加($P<0.01$)。与模型组比较,经不同剂量的余甘子醇提物治疗后,余甘子各剂量组脏器系数均显著下降($P<0.01$)。见表2。

表2 余甘子醇提物对硅肺小鼠脏器系数的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

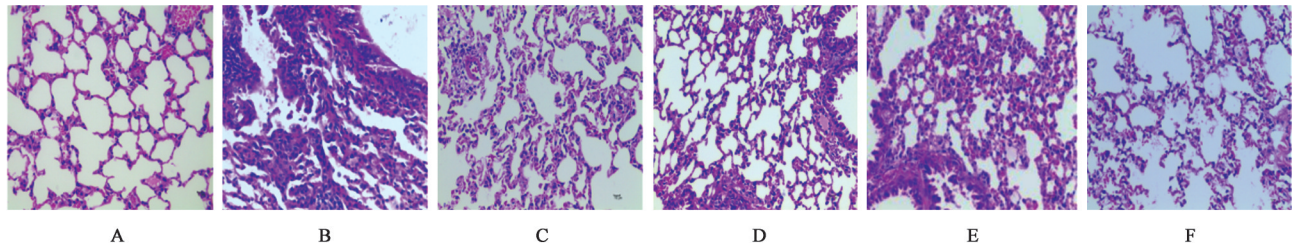
Table 2 Effect of ethanol extract of Phyllanthi Fructus on organ coefficient of silicosis mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	脏器系数/mg·g ⁻¹
空白组		4.84±0.45
模型组		6.94±0.46 ²⁾
汉防己甲素组	0.039	5.47±0.28 ⁴⁾
余甘子高剂量组	200	4.71±0.48 ⁴⁾
余甘子中剂量组	400	4.89±0.17 ⁴⁾
余甘子低剂量组	800	5.13±0.30 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表3-表6同)

3.2 余甘子醇提物对肺组织病理改变的影响 肺组织切片HE染色结果表明,SiO₂干预后,与空白组比较,模型组可见肺泡腔萎缩,肺间质明显增厚,上皮细胞变形坏死、胞核固缩,纤维组织增生及炎性细胞浸润。余甘子高、中剂量给药后,肺组织形态结构得到明显恢复,少量炎性细胞浸润,未见明显纤维组织增生;余甘子低剂量组与模型组病理改变接近,亦有明显的炎性细胞浸润,肺间质增厚,纤维组织增生。见图1。

Masson染色结果显示,空白组无明显染蓝,无胶原聚集,而模型组出现大面积染蓝,表明胶原纤维沉积增多,并呈现弥漫性。余甘子醇提物给药后,染蓝颜色变浅,面积减少,说明胶原纤维沉积减少。见图2。



注:A.空白组;B.模型组;C-E.余甘子高、中、低剂量组;F.汉防己甲素组(图2同)

图1 余甘子醇提物对硅肺小鼠肺组织病理的影响(HE,×400)

Fig. 1 Effect of alcohol extract of Phyllanthi Fructus on lung pathology of silicosis mice (HE,×400)

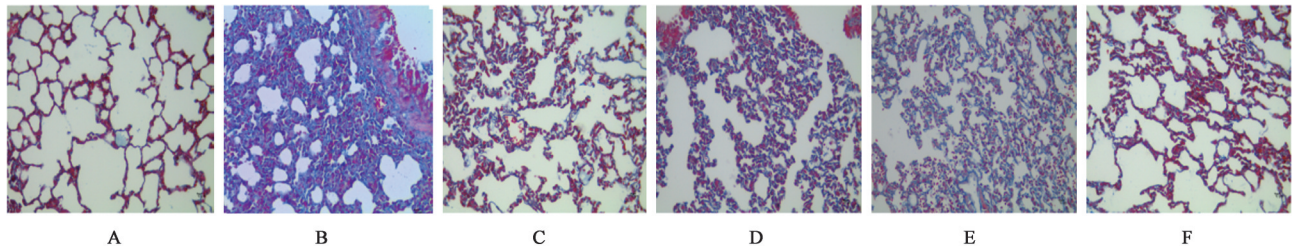


图2 余甘子醇提取物对硅肺小鼠肺组织病理的影响 (Masson, ×400)

Fig. 2 Effect of alcohol extract of Phyllanthi Fructus on lung pathology of silicosis mice (Masson, ×400)

3.3 余甘子醇提取物对硅肺小鼠血清中HYP含量的影响 HYP含量是反映胶原组织代谢及纤维化程度的一项重要指标。与空白组比较,模型组小鼠血清中的HYP显著增加($P<0.01$)。与模型组比较,余甘子高、中剂量组的HYP显著减少($P<0.01$)。余甘子醇提取物可以降低硅肺小鼠的HYP含量,其中余甘子中剂量组的作用效果最接近空白组。见表3。

3.4 余甘子醇提取物对硅肺小鼠血清中SOD、MDA、CAT含量的影响 空白组比较,模型组小鼠血清中的SOD、CAT的含量显著减少($P<0.01$),MDA的含量显著增加($P<0.01$)。与模型组比较,余甘子高、中剂量组小鼠血清中SOD、CAT的含量均增加($P<$

表3 余甘子醇提取物对硅肺小鼠血清中HYP含量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of alcohol extraction of Phyllanthi Fructus on content of HYP in serum of silicosis mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	HYP/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
空白组		6.02±0.82
模型组		8.93±1.43 ²⁾
汉防己甲素组	0.039	7.35±0.64 ⁴⁾
余甘子高剂量组	200	7.31±0.51 ⁴⁾
余甘子中剂量组	400	6.43±0.23 ⁴⁾
余甘子低剂量组	800	9.04±1.06

0.05, $P<0.01$),MDA的含量均减少($P<0.01$)。余甘子醇提取物可以增加CAT的含量和降低MDA的含量,其中余甘子中剂量组效果最为显著。见表4。

表4 余甘子醇提取物对硅肺小鼠血清中的SOD、MDA、CAT含量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of alcohol extract of Phyllanthi Fructus on contents of SOD,MDA and CAT in serum of silicosis mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	SOD/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	MDA/ $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	CAT/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$
空白组		149.70±8.41	7.29±0.68	36.43±2.44
模型组		87.35±8.82 ²⁾	9.88±0.42 ²⁾	15.95±1.03 ²⁾
汉防己甲素组	0.039	121.62±6.23 ⁴⁾	7.40±0.46 ⁴⁾	30.89±2.86 ⁴⁾
余甘子高剂量组	200	107.58±4.23 ³⁾	7.70±0.19 ⁴⁾	35.84±2.08 ⁴⁾
余甘子中剂量组	400	116.40±11.66 ⁴⁾	7.51±0.44 ⁴⁾	29.17±2.38 ⁴⁾
余甘子低剂量组	800	103.89±6.49 ³⁾	8.59±0.69 ³⁾	15.94±1.27

3.5 余甘子醇提取物对硅肺小鼠肺组织Keap1、Nrf2、HO-1、NQO1蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组Nrf2、HO-1、NQO1蛋白的表达水平均显著下降($P<0.01$),Keap1蛋白的表达显著上升($P<0.01$)。与模型组比较,余甘子高、中剂量组Nrf2、HO-1、NQO1蛋白表达均明显上升($P<0.05, P<0.01$),Keap1蛋白的表达明显下降($P<0.05, P<0.01$)。余甘子醇提取物可以升高Nrf2、NQO1蛋白的表达和降低蛋白的表达,其中余甘子中剂量组效果最为显著。见表5和图3。

3.6 余甘子醇提取物对硅肺小鼠肺组织Keap1、Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA表达的影响 与空白组比较,模型组Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA表达的水平均显

著下降($P<0.01$),Keap1 mRNA的表达明显上升($P<0.05$)。与模型组比较,余甘子高、中剂量组Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA表达的水平均明显上升($P<0.05, P<0.01$),Keap1 mRNA的表达明显下降($P<0.05$)。见表6。

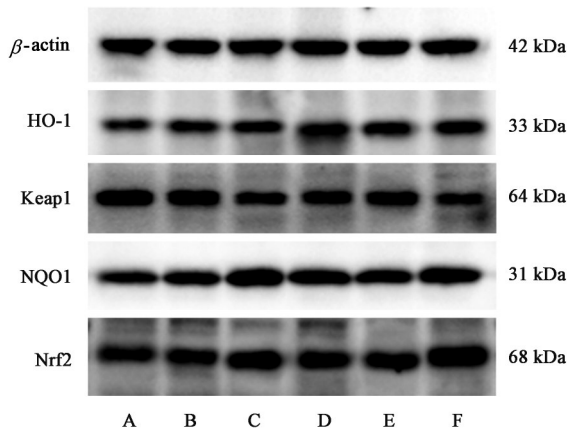
4 讨论

弥漫性肺纤维化是硅肺最基本的病理特征,表现为成纤维细胞过度增殖、纤维结缔组织大量增生、胶原代谢异常并不断堆积,进而逐步造成肺泡和肺泡间隔的损害并影响肺功能^[16]。本实验采用静式染毒法复制硅肺模型,HE染色与Masson染色结果表明,模型组小鼠肺泡腔萎缩,肺间质明显增厚,纤维组织增生并伴有炎性细胞浸润,这些特征

表5 余甘子醇提物对硅肺小鼠 Keap1、Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Effect of alcohol extract of Phyllanthi Fructus on expression of Keap1, Nrf2, HO-1 and NQO1 proteins in silicosis mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Keap1/ β -actin	Nrf2/ β -actin	HO-1/ β -actin	NQO1/ β -actin
空白组		1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组		1.81±0.13 ²⁾	0.73±0.04 ²⁾	0.48±0.03 ²⁾	0.59±0.17 ²⁾
汉防己甲素组	0.039	1.58±0.05 ³⁾	0.89±0.06 ³⁾	0.95±0.04 ⁴⁾	0.80±0.01
余甘子高剂量组	200	1.58±0.10 ³⁾	0.81±0.02 ⁴⁾	1.09±0.12 ⁴⁾	0.90±0.10 ³⁾
余甘子中剂量组	400	1.30±0.28 ⁴⁾	1.04±0.12 ⁴⁾	0.92±0.02 ⁴⁾	0.97±0.20 ⁴⁾
余甘子低剂量组	800	1.90±0.09	0.57±0.06	0.70±0.03 ⁴⁾	0.68±0.09



注:A.模型组;B~D.余甘子低、中、高剂量组;E.汉防己甲素组;F.空白组

图3 各组小鼠肺组织中HO-1、Keap1、NQO1、Nrf2蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of HO-1, Keap1, NQO1 and Nrf2 protein expression in lung tissue of mice in each group

均表明硅肺导致肺纤维化的发生^[17]。本实验在造模后给予余甘子醇提物干预并发现,余甘子醇提物可以明显改善肺组织形态结构,让肺组织病理改变得恢复,并且减少胶原纤维的沉积,说明余甘子醇提物能够在硅肺治疗中发挥积极作用。

氧化应激反应是与硅肺发生发展密切相关的病理因素,抗氧化应激也是目前公认的硅肺治疗靶点之一^[16]。暴露于SiO₂后,过多ROS的产生会导致细胞损伤和肺损伤,增加炎性细胞因子的表达,并且激活包括丝裂原活化蛋白激酶在内的细胞信号

通路,进而促进肺成纤维细胞增殖和合成多余的胶原^[18]。SOD、MDA、CAT为衡量氧化应激反应的重要指标,SOD反映机体抗氧化能力,MDA反应机体脂质过氧化程度,而CAT是避免H₂O₂积累对细胞的氧化破坏作用。本实验研究中,SiO₂干预后,SOD、CAT的含量显著减少,MDA含量显著增加,与既往研究一致^[19-20],有效说明硅肺小鼠模型存在着氧化应激的过度激活。余甘子具有抗氧化能力,已经在酒精性肝病、肾损伤、糖尿病、癌症等疾病中得到了证实^[21-24]。本实验使用余甘子醇提物对硅肺模型小鼠干预后观察到,SOD、CAT的含量明显增加,而MDA含量明显减少,说明余甘子醇提物能够减轻硅肺模型小鼠肺组织中的氧化应激反应。

Nrf2作为抗氧化和解毒系统的中央调节器,可通过调节抗氧化反应元件(ARE)介导的抗氧化酶诱导和多样II期解毒来保护细胞和组织免受氧化应激^[25]。在肺纤维化中,Nrf2及其下游基因(HO-1和NQO1)表达水平受到了抑制,可通过激活Nrf2/ARE信号通路减轻肺损伤,延缓肺纤维化的进展^[26-28]。在病理条件下,Nrf2和Keap1解离并转移入核与Maf蛋白结合形成异二聚体,再与ARE上相应的座位点结合,由此启动下游编码II相解毒酶基因和抗氧化蛋白mRNA的转录,发挥抗氧化作用^[29]。在本实验中,Nrf2、HO-1、NQO1蛋白与基因的表达显著降低,Keap1蛋白与mRNA的表达显著

表6 余甘子醇提物对硅肺小鼠 Keap1、Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Effect of alcohol extract of Phyllanthi Fructus on expression of Keap1, Nrf2, HO-1 and NQO1 mRNA in silicosis mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Keap1	Nrf2	HO-1	NQO1
空白组		1.005±0.005	1.003±0.003	1.000±0.002	1.000±0.001
模型组		7.017±0.098 ¹⁾	0.051±0.005 ²⁾	0.052±0.018 ²⁾	0.179±0.127 ²⁾
汉防己甲素组	0.039	2.481±0.008 ³⁾	0.771±0.086 ³⁾	0.928±0.058 ⁴⁾	0.576±0.106 ⁴⁾
余甘子高剂量组	200	3.410±0.671 ³⁾	0.513±0.068 ³⁾	0.715±0.114 ⁴⁾	0.541±0.094 ⁴⁾
余甘子中剂量组	400	4.586±0.361 ³⁾	0.545±0.057 ³⁾	0.592±0.000 ⁴⁾	0.380±0.096 ³⁾
余甘子低剂量组	800	5.122±0.072 ³⁾	0.272±0.041	0.126±0.008	0.313±0.091

升高,这表明SiO₂抑制了Nrf2/ARE信号通路,与肺组织中的氧化应激一致。而经余甘子醇提物处理后,Nrf2、HO-1、NQO1蛋白与基因的表达明显升高,Keap1蛋白与mRNA的表达明显降低,这些结果说明余甘子醇提物能够促进抗氧化通路Nrf2/ARE的激活,有效的延缓了纤维化的发展。

综合上述结果,表明余甘子可以通过减轻SiO₂诱导硅肺小鼠的氧化应激损伤,有效抑制纤维化,这种对硅肺小鼠模型的保护作用与Nrf2/ARE信号通路有关。本实验首次发现余甘子醇提物对肺纤维化具有保护作用,但目前仍缺乏系统、全面的物质基础的研究,尤其是其活性成分的关注较少。类黄酮、没食子酸、柯里拉京和鞣花酸在内的多酚被认为是余甘子醇提物抗氧化的关键生物活性化合物,已有很多报道发现从余甘子中分离出的多酚对肺癌细胞具有良好的活性^[30-33]。因此,课题组接下来会继续展开深入研究,探讨余甘子生物活性成分对肺纤维化的保护作用及具体机制。与此同时,研究发现余甘子中剂量组对升高血清中CAT的含量,降低血清中HYP、MDA的含量和上调NQO1蛋白、Nrf2蛋白与mRNA表达的效果优于余甘子高剂量组,由此说明本实验中的余甘子醇提物对硅肺的保护作用没有明显的剂量依耐性。本课题组现已初步得到余甘子的有效剂量,接下来会以余甘子高、中剂量为基础进行剂量摸索,以明确余甘子的有效剂量范围。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 郭晓琴. 浅析矽肺的临床症状、并发症及治疗[J]. 全科口腔医学电子杂志, 2018, 5(33): 189.

[2] MORRISON C, DAVEY G. Assessment of respiratory function in patients with podoconiosis[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2009, 103(3): 315-317.

[3] 李玉洁, 贾晓民. 矽肺的治疗进展[J]. 临床肺科杂志, 2017, 22(6): 1119-1122.

[4] GROTTO D, SANTA MARIA L D, BOEIRA S, et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43 (2) : 619-624.

[5] ZHANG X, JIA X, MEI L, et al. Global DNA methylation and PTEN hypermethylation alterations in lung tissues from human silicosis [J]. J Thorac Dis, 2016, 8(8): 2185-2195.

[6] HUANG H, CHEN M, LIU F, et al. N-acetylcysteine

therapeutically protects against pulmonary fibrosis in a mouse model of silicosis [J]. Biosci Rep, 2019, doi: 10. 1042/BSR20190681.

[7] 李少峰, 高洁, 兰智慧, 等. Nrf2/ARE 信号通路的调控与肺纤维化[J]. 江西医药, 2017, 52(9): 934-937.

[8] TUNG Y T, HUANG C Z, LIN J H, et al. Effect of *Phyllanthus emblica* L. fruit on methionine and choline-deficiency diet-induced nonalcoholic steatohepatitis [J]. J Food Drug Anal, 2018, 26 (4) : 1245-1252.

[9] HUANG H Z, QIU M, LIN J Z, et al. Potential effect of tropical fruits *Phyllanthus emblica* L. for the prevention and management of type 2 diabetic complications: A systematic review of recent advances [J]. Eur J Nutr, 2021, 60(7): 3525-3542.

[10] PINMAI K, CHUNLARATTHANABHORN S, NGAMKITIDECHAKUL C, et al. Synergistic growth inhibitory effects of *Phyllanthus emblica* and *Terminalia bellerica* extracts with conventional cytotoxic agents: Doxorubicin and cisplatin against human hepatocellular carcinoma and lung cancer cells [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(10): 1491-1497.

[11] WANG C C, YUAN J R, WANG C F, et al. Anti-inflammatory effects of *Phyllanthus emblica* L. on benzopyrene-induced precancerous lung lesion by regulating the IL-1 β /miR-101/Lin28B signaling pathway [J]. Integr Cancer Ther, 2017, 16 (4) : 505-515.

[12] NICOLIS E, LAMPRONTI I, DECHECCHI M C, et al. Pyrogallol, an active compound from the medicinal plant *Emblca officinalis*, regulates expression of pro-inflammatory genes in bronchial epithelial cells [J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(12): 1672-1680.

[13] TAHIR I, KHAN M R, SHAH N A, et al. Evaluation of phytochemicals, antioxidant activity and amelioration of pulmonary fibrosis with *Phyllanthus emblica* leaves [J]. BMC Complement Altern Med, 2016, 16(1): 406.

[14] 吴丽娟, 何晓艳, 梁静涛, 等. 大黄廬虫丸经 p38 MAPK/NF- κ B/TGF- β 通路抑制小鼠硅肺纤维化的机制探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(11) : 27-34.

[15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 186.

[16] 孙晓伟, 肖华, 宋学术, 等. 萝卜硫素通过 Nrf2/ARE 通路缓解矽肺模型大鼠肺组织纤维化及氧化应激的实验研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(6) : 586-589.

[17] WU L J, HE X Y, LIANG J T, et al. Intragastric

- administration of Dahuang Zhechong pill modulates TGF- β_1 /smad signaling pathway in murine model of experimental silicosis[J]. J King Saud Univ Sci, 2020, 32(8):3223-3229.
- [18] PENG H B, WANG R X, DENG H J, et al. Protective effects of oleanolic acid on oxidative stress and the expression of cytokines and collagen by the Akt/NF- κ B pathway in silicotic rats [J]. Mol Med Rep, 2017, 15(5):3121-3128.
- [19] NARDI J, NASCIMENTO S, GÖETHEL G, et al. Inflammatory and oxidative stress parameters as potential early biomarkers for silicosis[J]. Clin Chim Acta, 2018, 484:305-313.
- [20] PERUZZI C, NASCIMENTO S, GAUER B, et al. Inflammatory and oxidative stress biomarkers at protein and molecular levels in workers occupationally exposed to crystalline silica[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2019, 26(2):1394-1405.
- [21] CHAPHALKAR R, APTE K G, TALEKAR Y, et al. Antioxidants of *Phyllanthus emblica* L. Bark extract provide hepatoprotection against ethanol-induced hepatic damage: A comparison with silymarin [J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017:3876040.
- [22] TASANARONG A, KONGKHAM S, ITHARAT A. Antioxidant effect of *Phyllanthus emblica* extract prevents contrast-induced acute kidney injury [J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14:138.
- [23] SHARMA P, JOSHI T, JOSHI T, et al. In silico screening of potential antidiabetic phytochemicals from *Phyllanthus emblica* against therapeutic targets of type 2 diabetes [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 248:112268.
- [24] ZHAO T, SUN Q, MARQUES M, et al. Anticancer properties of *Phyllanthus emblica* (Indian Gooseberry) [J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015:950890.
- [25] FENG F, CHENG P, ZHANG H, et al. The protective role of tanshinone II_A in silicosis rat model via TGF- β_1 /Smad signaling suppression, NOX4 inhibition and Nrf2/ARE signaling activation [J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 13:4275-4290.
- [26] PENG L, WEN L, SHI Q, et al. Chelerythrine ameliorates pulmonary fibrosis via activating the Nrf2/ARE signaling pathway [J]. Cell Biochem Biophys, 2021, 79(2):337-347.
- [27] KIKUCHI N, ISHII Y, MORISHIMA Y, et al. Nrf2 protects against pulmonary fibrosis by regulating the lung oxidant level and Th1/Th2 balance [J]. Respir Res, 2010, 11(1):31.
- [28] XU Y, TAI W, QU X, et al. Rapamycin protects against paraquat-induced pulmonary fibrosis: Activation of Nrf2 signaling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 490(2):535-540.
- [29] 胡玉伟. Nrf2/ARE 信号通路在矽肺发生过程中的机制研究[D]. 济南: 济南大学, 2018.
- [30] LI W, ZHANG X, CHEN R, et al. HPLC fingerprint analysis of *Phyllanthus emblica* ethanol extract and their antioxidant and anti-inflammatory properties [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 254:112740.
- [31] TSAI C C, CHOU C H, LIU Y C, et al. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Phyllanthus emblica* L. and evaluation of antioxidant activities [J]. Int J Cosmet Sci, 2014, 36(5):471-476.
- [32] KHAN M T, LAMPONENTI I, MARTELLO D, et al. Identification of pyrogallol as an antiproliferative compound present in extracts from the medicinal plant *Emblica officinalis*: Effects on *in vitro* cell growth of human tumor cell lines [J]. Int J Oncol, 2002, 21(1):187-192.
- [33] THOIDINGJAM S, TIKU A B. Therapeutic efficacy of *Phyllanthus emblica*-coated iron oxide nanoparticles in A549 lung cancer cell line [J]. Nanomedicine (Lond), 2019, 14(17):2355-2371.

[责任编辑 王鑫]