

# 基于 Nrf2/Keap1/p62 信号通路探讨百合固金汤对 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤的保护作用

张敏, 许成辰, 徐婷贞, 董春鸽\*  
(浙江中医药大学附属第一医院, 杭州 310000)

**[摘要]** **目的:** 探究百合固金汤对脂多糖诱导的急性肺损伤(LPS-ALI)小鼠的预防作用及其机制。**方法:** 将 KM 小鼠随机分为 5 组:空白组,模型组,地塞米松组(0.002 g·kg<sup>-1</sup>),百合固金汤组(0.417, 1.25 g·kg<sup>-1</sup>)。除空白组外,其余各组采用 LPS 诱导小鼠 ALI 模型。给药组分别在造模前的第 1~7 天连续灌胃给药 7 d。在造模后 6 h 取小鼠肺组织,测定左肺湿/干质量比(W/D);收集小鼠血清检测超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA),活性氧(ROS),一氧化氮(NO)的水平;应用苏木素-伊红(HE)染色方法观察肺组织病理改变;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺组织中核转录因子 E2 相关因子 2(Nrf2),Kelch 样环氧氯丙胺相关蛋白 1(Keap1),p62 以及自噬相关蛋白(LC3) II 蛋白的表达水平。**结果:** 与空白组比较,模型组小鼠 W/D 显著升高( $P < 0.01$ ),血清中 MDA 水平显著性升高( $P < 0.01$ ),SOD 显著降低( $P < 0.01$ ),肺组织病变严重,并显著降低肺组织 Nrf2,Keap1,升高 p62,LC3 II 的蛋白表达( $P < 0.01$ )。与模型组比较,地塞米松组、百合固金汤 1.25 g·kg<sup>-1</sup>组 W/D 显著降低( $P < 0.01$ );百合固金汤 1.25 g·kg<sup>-1</sup>组及地塞米松组,能够明显抑制血清中 MDA 的水平( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),升高 SOD( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )水平,地塞米松组及百合固金汤各剂量组对小鼠肺组织病变较模型组有不同程度的改善,且显著性升高肺组织 Nrf2,Keap1,降低 p62 及 LC3 II 的蛋白表达( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),但百合固金汤各剂量组对 LC3 II 无影响。**结论:** 百合固金汤对 LPS-ALI 小鼠具有明显的预防作用,其机制可能与调控 Nrf2/Keap1/自噬反馈回路有关。

**[关键词]** 急性肺损伤;百合固金汤;核转录因子 E2 相关因子 2(Nrf2);Kelch 样环氧氯丙胺相关蛋白 1; p62; 自噬

**[中图分类号]** R2-0;R285;R289;R318.13 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)15-0077-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20191540

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190426.0844.001.html>

**[网络出版时间]** 2019-04-29 10:46

## Effect of Baihe Gujin Tang on LPS-induced Acute Lung Injury in Mice Based on Nrf2/Keap1/p62 Signaling Pathway

ZHANG Min, XU Cheng-chen, XU Ting-zhen, DONG Chun-ge\*

(The First Affiliated Hospital of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effect and mechanism of Baihe Gujin Tang on lipopolysaccharide induced acute lung injury (LPS-ALI). **Method:** KM mice were randomly divided into 5 groups: blank control group, model group, dexamethasone 0.002 g·kg<sup>-1</sup> group, Baihe Gujin Tang (0.417, 1.25 g·kg<sup>-1</sup>) group. Except for the blank control group, the other groups were given LPS to induce the mouse ALI model. Except for the blank control group and the model group, the other groups were continuously given intragastric administration for 7 days on the 1<sup>st</sup> to 7<sup>th</sup> days before modeling. The lung tissue of the mice was taken 6 h after modeling, and the wet/dry mass ratio (W/D) of the left lung was measured. The serum levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) were

**[收稿日期]** 20190117(019)

**[基金项目]** 浙江省中医药科技计划项目(2016ZA067)

**[第一作者]** 张敏, 硕士, 住院医师, 从事药理与毒理学研究, E-mail: zjzyzm@163.com

**[通信作者]** \*董春鸽, 硕士, 副主任医师, 从事呼吸系统相关疾病研究, E-mail: 634923029@qq.com

detected in the mice. The pathological changes of the lung tissues were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The expression levels of nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2), Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), p62 and autophagy associated proteins LC3 II proteins in the lung tissues were detected by Western blot. **Result:** Compared with the blank control group, the W/D of the model group was significantly increased ( $P < 0.01$ ), the MDA level in the serum was significantly increased ( $P < 0.01$ ), and the SOD was significantly decreased ( $P < 0.01$ ), lung tissue lesions were severe, and significantly reduced the expression of lung tissue Nrf2, Keap1, but increased p62, LC3 II protein expression ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, the W/D of dexamethasone group and Baihe Gujin Tang 1.25 g·kg<sup>-1</sup> group was significantly lower ( $P < 0.01$ ). Baihe Gujin Tang 1.25 g·kg<sup>-1</sup> group and dexamethasone group were able to significantly inhibited MDA levels in serum ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), improved the expression of SOD ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), dexamethasone group and Baihe Gujin Tang group have different extents of improvement the pathological changes of the lung tissues the pathological changes of the lung tissues, and the lung tissue Nrf2 and Keap1 were significantly increased, and the protein expression of p62, LC3 II was decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), each dose group of Baihe Gujin Tang had no effect on LC3B. **Conclusion:** Baihe Gujin Tang has obvious protective effect on LPS-ALI mice, and its mechanism may be related to the regulation of Nrf2/Keap1/autophagy feedback loop.

[**Key words**] acute lung injury; Baihe Gujin Tang; nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2); Kelch-like ECH-associated protein 1; p62; autophagy

急性肺损伤 (ALI) 在临床上较为常见, 致病因素多样, 可由多种致病因素如烧伤、败血症、误吸、肺创伤等引起, 以肺部急性炎症为特征, 表现多为急性肺顺应性降低、出现肺水肿以及出现顽固性、进行性低氧血症<sup>[1]</sup>。目前的治疗方法主要以激素 (糖皮质激素) 冲击疗法等对症治疗为主, 有时辅助机械通气<sup>[2]</sup>, 治疗效果非常有限而副作用极大, 急需通过完善其发病机制, 从而寻找新的、有效的治疗方法。在 ALI 发病过程中, 除发生直接损伤, 在损伤组织周围还存在着继发性的病理改变, 包括氧化损伤、炎症反应等<sup>[3-4]</sup>, 其中巨噬细胞及中性粒细胞介导的促炎性反应及氧化损伤反应是 ALI 的最重要致病机制之一<sup>[5]</sup>。氧化应激损伤被认为是导致间接损伤进一步扩大的重要因素<sup>[6]</sup>。因此, 除抗炎治疗外, 在治疗时干预 ALI 后的氧化损伤, 可能成为 ALI 临床治疗中的新的潜在靶点。脂多糖诱导的脂多糖诱导的 ALI 主要通过激活 Toll 样受体 (TLR) 4-MD2 复合物, 进而活化下游髓样分化因子 88 (MyD88) 依赖及非依赖的炎症相关信号通路, 释放炎症因子, 造成肺损伤<sup>[7]</sup>。氧化应激在脂多糖诱导的 ALI 中发挥着怎样的作用, 目前研究还较少。越来越多的证据表明, 自噬对 ALI 的多种刺激产生反应, 包括细菌感染, 脂多糖 (LPS), 脓毒症, 高氧, 氯等。此外, 自噬相关基因如 Atg7, Atg5, Atg4b 的缺失显著加重了小鼠 ALI 的发生发展, 提示自噬可能在一定程度上对 ALI 的发生发展起到保护作用<sup>[8]</sup>。百合固金汤由熟

地黄、生地黄、当归、白芍、生甘草、桔梗、玄参、浙贝母、麦冬及百合 10 味中药组成<sup>[9]</sup>, 生地黄具有调节免疫、抗炎等的作用。中医理论认为百合固金汤可以恢复处于亢进状态的代谢功能, 抑制过高的内分泌功能所引起的阴虚内热的病情。其中, 熟地黄、麦冬、当归通过调节免疫与百合免疫兴奋、玄参增强免疫力及抗菌的作用协同增效<sup>[10]</sup>, 联合贝母 (镇痛、抗炎、抗菌), 诸药合用, 清肺强身。然而, 百合固金汤应用对 ALI 的作用尚未见研究。因此, 本研究利用脂多糖诱导的急性肺损伤模型, 探讨百合固金汤对 ALI 的预防作用及其机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 30 只 SPF 级 KM 小鼠, 6~8 周龄, 体重 (20±2) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2016-0002, 使用许可证号 SYXK (浙) 2018-0012。饲养于 SPF 级别饲养室, 室内环境温度 (22±3) °C, 相对湿度 40%~70%, 光照时间为 12 h/12 h 明暗交替。实验期间动物自由摄食饮水。

**1.2 药物** 百合固金汤组成: 熟地黄 (批号 YP18080102), 生地黄 (批号 181001), 当归 (批号 1801021) 各 9 g, 白芍 (批号 1801032), 生甘草 (批号 180526), 桔梗 (批号 1809007), 玄参 (批号 181101) 各 3 g, 浙贝母 (批号 170922), 麦冬 (批号 180702), 百合 (批号 181005) 各 12 g, 上述中药饮片均购自北京同仁堂公司。醋酸地塞米松片 (浙江仙居制药股

份有限公司,批号 20180218),给药前将一剂百合固金汤溶于 1 000 mL 蒸馏水中煮沸至 300 mL,约 30 min,去除药物残渣,重复上述操作 1 次,共得药液 600 mL,制成  $0.125 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的母液备用。

**1.3 试剂** 苏木素染色液(上海伯奥生物科技有限公司,批号 18016);伊红(国药集团化学试剂有限公司,批号 20161101);氯化钠注射液(江西科伦药业有限公司,批号 C18032403);LPS(美国 Sigma 公司,批号 127M4030V);超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA),一氧化氮(NO)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20180824,20180824,20190311);活性氧(ROS)检测试剂盒(上海江莱公司,批号 20190317);兔源 p62 抗体,兔源 LC3 II 抗体,鼠源  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 5114S,12741S,3700S);兔源核转录因子 E2 相关因子 2(Nrf2)抗体,兔源 Kelch 样环氧氯丙胺相关蛋白 1(Keap1)抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 GR298097-4,GR27823-1);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G 二抗,山羊抗兔 IgG/辣根酶标记二抗(美国 Proteintech 公司,批号分别为 SA00001-1,SA00001-15)。

**1.4 仪器** Multiskan GO 型全波长酶标仪(美国赛默飞公司);RM2245 型转轮式切片机,TP1020 型自动组组脱水机(德国徕卡公司);D160 型手持匀浆器(北京大龙公司);5417R 型低温离心机(德国艾本德公司);BX53M 型正置显微镜(日本奥林巴斯公司);ME 型分析天平(中国梅特勒公司);Power Pac H 型电泳仪,Chemi Doc Touch 型凝胶成像仪(美国伯乐公司)。

## 2 方法

**2.1 造模、分组及给药** 雄性 KM 小鼠 30 只,应用随机法分成 5 组:空白组,模型组,地塞米松组( $0.002 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),百合固金汤( $0.417, 1.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )组,每组 6 只。各治疗组连续灌胃 7 d,空白组和模型组灌胃生理盐水,灌胃体积为  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。末次灌胃 1 h 后,除空白组外,其余各组别腹腔注射  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  LPS 复制小鼠 ALI 模型<sup>[11-12]</sup>。

**2.2 标本采集及处理** 造模后 6 h,取血,脱颈处死小鼠,取左肺组织检测肺湿/干重(W/D)的值;取右肺组织  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  储存备用。

**2.3 肺组织(W/D)值** 取新鲜左肺组织称质量(湿重)后,将其在鼓风干燥箱内  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  烘烤 24 h 后称重(干重),计算肺组织 W(湿重)/D(干重)值。

**2.4 试剂盒检测血清 SOD,MDA 的水平** 于末次给药 6 h,取血,在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,取上清,严格按照试剂盒说明操作,检测血清中 SOD(WST-1 法于 450 nm 处检测),MDA(TBA 法于 523 nm 处检测),ROS 酶联免疫吸附测定(ELISA)法于 450 nm 处检测,NO(酶比色法于 550 nm 处检测)的水平。

**2.5 苏木素-伊红(HE)染色观察肺组织病理学变化** 在实验结束之后,取肺组织,浸泡于多聚甲醛溶液中固定,24 h 后取出,用水进行充分冲洗后,浸泡于 8.8% 甲酸脱钙,脱钙完毕可进行常规脱水、浸蜡、包埋,制备蜡块,使用轮转式切片机做超薄切片,脱蜡后进行 HE 染色,在 Olympus 倒置显微镜下(200 倍),观察肺脏组织的形态改变。

**2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺组织 Nrf2,Keap1,p62 及 LC3 II 蛋白的表达** 取肺组织,称质量,加入蛋白裂解液,在冰浴条件下机械研磨,在充分研磨后静置 20 min,在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。样品的上样量均为每孔  $30 \text{ } \mu\text{g}$  蛋白,依次进行 SDS-PAGE 电泳、转膜、用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 溶液封闭 1 h。洗膜,加入 Nrf2,Keap1,p62,LC3 II, $\beta$ -actin 一抗抗体(1:1 000),在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下孵育过夜。洗膜,加入相应二抗(1:5 000)室温孵育 1 h。洗膜,加入 ECL 发光液,显影、洗片、晾干。采用凝胶图像扫描仪扫描,并采用灰度分析软件 Image J 计算各蛋白条带的灰度值。

**2.7 统计学处理** 采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计学分析。数据结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析结合 Tukey's 检验进行多组间比较, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对 ALI 小鼠肺组织 W/D 的影响** 与空白组比较,模型组肺组织 W/D 显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,地塞米松组、百合固金汤  $1.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组肺组织 W/D 显著降低( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 百合固金汤对 W/D 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	W/D
空白	-	$4.47 \pm 0.13$
模型	-	$4.86 \pm 0.10^{2)}$
地塞米松	0.002	$4.53 \pm 0.10^{4)}$
百合固金汤	0.417	$4.67 \pm 0.15$
	1.25	$4.50 \pm 0.08^{4)}$

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

**3.2 对 ALI 小鼠血清中 SOD,MDA,NO,ROS 水平的影响** 与空白组比较,模型组小鼠血清中 MDA,NO,ROS 水平显著升高,SOD 水平显著降低( $P < 0.01$ );

与模型组比较,地塞米松组、百合固金汤 1.25 g·kg<sup>-1</sup>组均能明显降低血清中 MDA,NO,ROS 水平,升高 SOD 水平( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 2。

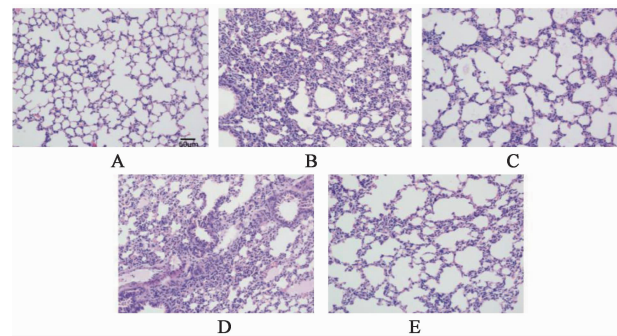
表 2 百合固金汤对小鼠血清中 SOD,MDA,NO,ROS 水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of Baihe Gujin Tang on SOD, MDA, NO and ROS levels in serum of mice( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	SOD/U·mL <sup>-1</sup>	MDA/nmol·L <sup>-1</sup>	NO/μmol·L <sup>-1</sup>	ROS/U·mL <sup>-1</sup>
空白	-	83.81 ± 11.31	3.38 ± 0.53	13.68 ± 2.50	27.00 ± 4.15
模型	-	37.98 ± 5.32 <sup>2)</sup>	9.67 ± 1.70 <sup>2)</sup>	30.77 ± 4.12 <sup>2)</sup>	85.16 ± 10.42 <sup>2)</sup>
地塞米松	0.002	57.36 ± 9.00 <sup>3)</sup>	6.82 ± 1.93 <sup>3)</sup>	21.68 ± 3.47 <sup>4)</sup>	47.18 ± 9.75 <sup>4)</sup>
百合固金汤	0.417	43.98 ± 6.02	8.64 ± 1.53	28.02 ± 3.13	77.88 ± 8.84
	1.25	67.34 ± 12.45 <sup>4)</sup>	5.68 ± 1.09 <sup>4)</sup>	18.27 ± 3.33 <sup>4)</sup>	44.18 ± 9.72 <sup>4)</sup>

**3.3 对 ALI 小鼠肺脏病理学的影响** 空白组肺泡结构清晰可见,肺泡壁薄,肺泡腔内未见渗液。模型组小鼠肺组织结构明显遭到破坏,肺泡壁增厚,毛细血管充血,可见大量红细胞渗出,水肿并有中性粒细胞渗出。百合固金汤 0.417 g·kg<sup>-1</sup>组肺组织的破坏程度轻微改善,而地塞米松组及百合固金汤 1.25 g·kg<sup>-1</sup>组显著性改善肺组织的破坏程度。见图 1。

**3.4 对 ALI 小鼠肺组织 Nrf2,Keap1,p62 及 LC3 II 蛋白表达的影响** 与空白组比较,模型组肺组织 Nrf2,Keap1 蛋白表达量显著降低,p62,LC3 II 显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,地塞米松组可以明显升高 Nrf2,降低 LC3 II 的蛋白表达量( $P < 0.05$ ),百合固金汤 1.25 g·kg<sup>-1</sup>组能明显升高肺组织 Nrf2,Keap1,降低 p62 的蛋白表达量( $P < 0.05, P < 0.01$ ),但对 LC3 II 无显著性影响。见图 2,表 3。



A. 空白组;B. 模型组;C. 地塞米松组;D. 百合固金汤 0.417 g·kg<sup>-1</sup>组;E. 百合固金汤 1.25 g·kg<sup>-1</sup>组(图 2 同)

图 1 百合固金汤对 ALI 小鼠肺脏病理形态的影响(HE, ×200)

Fig.1 Effect of Baihe Gujin Tang on pathological morphology of lung in ALI mice (HE, ×200)

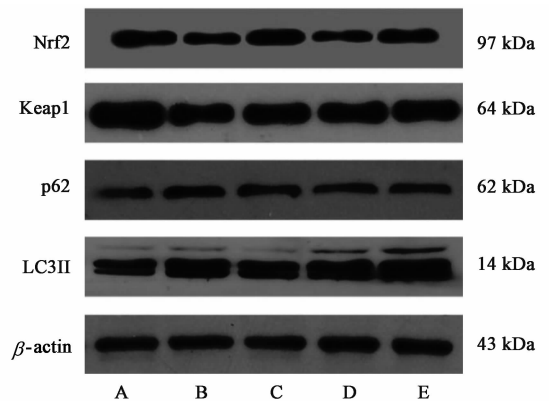


图 2 小鼠肺组织中 Nrf2,Keap1,p62 及 LC3 II 蛋白表达电泳

Fig.2 Electrophoresis of Nrf2, Keap1, p62 and LC3 II proteins expression in lung tissue of mice

表 3 百合固金汤对 ALI 小鼠肺组织中 Nrf2,Keap1,p62 及 LC3 II 蛋白表达量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of Baihe Gujin Tang on expression of Nrf2, Keap1, p62 and LC3 II protein in lung tissue of ALI mice( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Nrf2/β-actin	Keap1/β-actin	p62/β-actin	LC3 II/β-actin
空白	-	100.00 ± 8.64	100.00 ± 13.38	100.00 ± 12.33	100.00 ± 10.41
模型	-	61.60 ± 7.97 <sup>2)</sup>	60.85 ± 12.76 <sup>2)</sup>	150.31 ± 22.61 <sup>2)</sup>	189.27 ± 9.01 <sup>2)</sup>
地塞米松	0.002	83.70 ± 11.34 <sup>3)</sup>	75.01 ± 13.58	130.32 ± 21.90	134.24 ± 13.84 <sup>3)</sup>
百合固金汤	0.417	62.79 ± 13.44	77.63 ± 15.65	135.02 ± 19.19	171.51 ± 36.84
	1.25	91.78 ± 9.09 <sup>4)</sup>	87.58 ± 7.86 <sup>3)</sup>	102.31 ± 16.93 <sup>4)</sup>	197.23 ± 11.91

#### 4 讨论

ALI/急性呼吸窘迫综合征(ARDS)属临床上常见的危急重症,其发病机制复杂,直至目前尚未完全阐明,且病情发展凶猛,病死率极高。研究表明,细胞凋亡在 ALI 发病机制中起到重要作用,包括上皮细胞、内皮细胞、中性粒细胞的凋亡;在 ALI 中炎症可以通过触发细胞表面受体激活细胞内炎症相关信号通路,释放促炎因子,加重病情。两种损伤机制中,氧化应激都起到了一定的作用<sup>[13]</sup>。LPS 由革兰阴性菌产生,是主要的治病成分,同时是引起 ALI 并最终导致患者死亡最重要的原因之一。在 LPS 刺激下,炎症细胞可以通过迅速浸润肺组织,引起炎症细胞聚集进而诱发氧化应激反应<sup>[14]</sup>,氧化应激是 ALI 中炎症激发的重要机制之一,是导致 AKI 致死的重要原因<sup>[15]</sup>。

氧化应激指在遭受各种有害刺激时,ROS 及活性氮(RNS)等自由基过度堆积,机体内氧化与抗氧化之间系统动态平衡被打破,导致组织发生损伤。ROS 是有氧代谢过程产生的,一系列活性含氧化化合物的总称,ROS 生成和代谢的相对平衡状态是正常细胞生长和生存的关键因素<sup>[16]</sup>,MDA 是自由基与生物膜多聚不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的产物,其含量水平直接反映脂质过氧化程度及自由基水平<sup>[17]</sup>,SOD 是存在于机体细胞内负责清除氧自由基的一种过氧化物酶,SOD 水平的高低则可以间接反映机体清除氧自由基的能力。当 SOD 活性下降和/或 MDA 含量升高时,说明体内氧化/抗氧化平衡的失调,这种失衡可以进一步引起信号传导通路异常激活,诱导细胞异常凋亡,继而引起肺组织的过度损伤<sup>[18]</sup>。百合固金汤预处理可以显著降低血清中 MDA 水平,升高 SOD 水平,说明抗氧化应激是百合固金汤减轻 LPS 诱导的 ALI 的重要途径。

Nrf2 介导的信号通路是机体内维持氧化应激、氧化还原平衡的重要信号通路<sup>[19]</sup>。Nrf2 是负责调节机体抗氧化应激反应过程的核转录因子,能够通过胞浆蛋白 Keap1 以及抗氧化反应元件(ARE)相互作用,诱导相关基因差异表达,包括具有抗氧化、抗炎及生物转化酶等功能的基因<sup>[20-22]</sup>。在一般状态下,Nrf2 与 Keap1-Cul3-E3 复合体连接,在 Cul3-E3 泛素连接酶作用下迅速泛素化,经由泛素-蛋白酶体通路降解。而机体内氧化应激或在亲电信号增强时,Keap1 蛋白结构中半胱氨酸残基发生氧化,构象改变,继而与 Nrf2 解偶联,游离的 Nrf2 进入细胞核,诱导相应的靶基因差异表达<sup>[23]</sup>。有研究表明

缺乏 Nrf2 与 ALI 密切相关,而药物发挥保护作用与激活 Nrf2/ARE 信号通路有关<sup>[24-25]</sup>。实验结果显示,LPS 降低肺组织 Nrf2,Keap1 蛋白表达;与模型组比较,百合固金汤 $1.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 预防给药组能够增加 Nrf2,Keap1 蛋白表达,说明 Nrf2 信号通路参与了百合固金汤对小鼠 LPS-ALI 的保护作用。

自噬是一种高度保守的分解代谢过程,涉及多种细胞成分[包括蛋白聚集体、受损细胞器(如线粒体、内质网等)和各种病原体]的自溶酶体降解。因此,自噬通路代表了一种适应性反应,以维持细胞和组织稳态,应对细胞应激。越来越多的证据表明,自噬与多种人类疾病密切相关,ALI 引起的炎症反应已被报道与自噬变化有关<sup>[8]</sup>。泛素化结合蛋白 p62/SQSTM1 作为自噬底物,能够与自噬效应蛋白 LC3 相互作用,被溶酶体降解<sup>[26]</sup>。实验结果显示,模型组能够显著增加 p62 及 LC3 II 的表达;与模型组相比,百合固金汤预防给药组能够显著降低 p62 的表达,但对 LC3 II 表达无显著影响。以上结果说明百合固金汤对自噬形成没有显著的抑制作用,但能够通过逆转 LPS 所致自噬成熟障碍起到保护作用。

本研究发现百合固金汤预防给药组能够显著抑制血清中 MDA 的水平,升高 SOD 水平,对小鼠肺组织病变较模型组有不同程度的改善。而对其机制的研究中发现,其可以显著升高肺组织 Nrf2 及 Keap1 蛋白表达,降低 p62 的蛋白表达,可以推测百合固金汤对预防 LPS 诱导的小鼠 ALI 作用明显,其机制可能与调控 Nrf2/Keap1/自噬通路有关。百合固金汤可能通过调控 Nrf2/Keap1/自噬通路调节细胞内氧化应激过程,发挥对 ALI 的预防作用。

#### [参考文献]

- [1] 王保健,毛旭,朱建伟.β七叶皂苷(β-aescin)通过抑制脂质过氧化及炎症反应减轻脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤[J].细胞与分子免疫学杂志报,2018,34(7):600-604.
- [2] Miller A C, Ferrada P A, Kadri S S, et al. High-frequency ventilation modalities as salvage therapy for smoke inhalation-associated acute lung injury: a systematic review[J]. J Intensive Care Med,2018,33(6):335-345.
- [3] Stormann P, Lustenberger T, Relja B, et al. Role of biomarkers in acute traumatic lung injury[J]. Injury, 2017,48(11):2400-2406.
- [4] Elicker B M, Jones K T, Naeger D M, et al. Imaging

- of acute lung injury[J]. *RadiolClin North Am*,2016,54(6):1119-1132.
- [ 5 ] LIU W W, HAN C H, ZHANG P X, et al. Nitric oxide and hyperoxic acute lung injury [ J ]. *Med Gas Res*, 2016,6(2) :85-95.
- [ 6 ] Ebenezer D L, FU P, Suryadevara V, et al. Epigenetic regulation of pro-inflammatory cytokine secretion by sphingosine 1-phosphate (S1P) in acute lung injury: role of S1P lyase [ J ]. *Adv Biol Regul*, 2017, 63: 156-166.
- [ 7 ] Nova Z, Skovierova H, Calkovska A. Alveolar-Capillary membrane-related pulmonary cells as a target in endotoxin-induced acute lung injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2019,20(4) :1-20.
- [ 8 ] WANG K, CHEN Y, ZHANG P, et al. Protective features of autophagy in pulmonary infection and inflammatory diseases [ J ]. *Cells*,2019, 8 ( 2 ) :1-19.
- [ 9 ] 许济群,方剂学[M].3版.上海:上海科学技术出版社,1985,173-174.
- [10] 刘永萍,蒋建纲.百合固金汤治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期 50 例 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*,2013, 19 ( 10 ) :331.
- [11] 宗绍波,孙兰,吕耀中,等.金振口服液对 LPS 致急性肺损伤模型小鼠 NF- $\kappa$ B, MAPK 信号通路的影响 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*,2018,24(9) :155-159.
- [12] SHEN W F, GAN J X, XU S W, et al. Penhexylidene hydrochloride attenuates LPS-induced acute lung injuryinvolvement of NF- $\kappa$ B pathway [ J ]. *Pharmacol Res*,2009,60(4) :296-302.
- [13] 朱凯锐,赵航.急性肺损伤机制研究进展 [ J ]. *医学理论与实践*, 2018,31(19) :2872-2874.
- [14] 池明,高玲,吴巍巍,等.黄连素对脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤和炎症的改善作用及其机制 [ J ]. *吉林大学学报:医学版*,2018,40(6) :1194-1199.
- [15] Samia B, Wilson M A, Karim B, et al. Reactive oxygen species in chronic obstructive pulmonary disease [ J ]. *Oxid Med Cell Longev*,2018,2018:1-9.
- [16] Karwatsky J, Lincoln M C, Georges E. A mechanism for P-glycoprotein-mediated apoptosis as revealed by verapamil hypersensitivity [ J ]. *Biochemistry*,2003, 42 ( 42 ) :12163-12173.
- [ 17 ] 杨翠萍,杨晓金,田真真,等.槐定碱对 LPS 致急性肺损伤模型小鼠血清 IL-6、IL-10、NO、SOD 和 MDA 含量的影响 [ J ]. *中药药理与临床*,2012,28(3) :31-33.
- [ 18 ] 杨翠萍,杨晓金,田真真,等.槐定碱对急性肺损伤小鼠肺组织 SOD,MDA 及 TLR4 表达的影响 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*, 2012,18(14) :180-183.
- [ 19 ] Stepkowski T M, Kruszewski M K. Molecular cross-talk between the NRF2/KEAP1 signaling pathway, autophagy, andapoptosis [ J ]. *Free RadicBiol Med*, 2011,50(9) :1186-1195.
- [ 20 ] ZHAO C Y, WANG X L, PENG Y K. Role of Nrf2 in neurodegen-erative diseases and recent progress of its activators [ J ]. *Acta Pharm Sin*,2015,50(4) :375-384.
- [ 21 ] Kwak M K, Itoh K, Yamamoto M, et al. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the Nrf2 promoter [ J ]. *Mol Cell Biol*,2002, 22 ( 9 ) : 2883-2892.
- [ 22 ] 邱炳勋,刘珂,邹利,等.五味子诱导的 CYPs 和 Nrf2 活化对乙酰氨基酚急性肝损伤的影响 [ J ]. *中国中药杂志*,2018,43(24) :4908-4915.
- [ 23 ] Kobayashi M, LI L, Iwamoto N, et al. The antioxidantdefense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensingmechanism for responding to a wide range of chemicalcompounds [ J ]. *Mol Cell Biol*,2009,29(2) :493-502.
- [ 24 ] 李媛,谢克亮,陈红光,等.氢气对脓毒症小鼠肺组织 Nrf2/ARE 通路的影响 [ J ]. *中华麻醉学杂志*, 2014, 34(7) :852-855.
- [ 25 ] 孙亚林,李廷坤,李长生,等.盐酸戊乙奎醚对新生大鼠内毒素急性肺损伤 Nrf2/ARE 信号通路的影响 [ J ]. *中华医学杂志*, 2019,99(6) :453-457.
- [ 26 ] Pankiv S, Clausen T H, Lamark T, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy [ J ]. *J Biol Chem*, 2007, 282(33) :24131-24145.

[责任编辑 孙丛丛]