

牛蒡子苷元抑制炎症反应和修复鼻上皮屏障减轻急性肺损伤

朱紫陌¹, 崔白梅¹, 聂发龙¹, 肖纯^{2*}, 李秀芳^{1*}

¹云南中医药大学药理实验室, 昆明 650500; ²云南中医中药研究院, 昆明 650021

摘要:基于体内动物实验、体外细胞实验和分子对接探讨牛蒡子苷元 (arctigenin, ARG) 对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 滴鼻致小鼠急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 模型及 LPS 诱导 NP-69 细胞损伤中的保护作用及机制。采用 LPS 滴鼻致小鼠鼻黏膜损伤, Western blot 法检测小鼠鼻黏膜闭合蛋白 (Occludin)、闭锁小带蛋白 1 (zonula occludens-1, ZO-1) 的蛋白表达, 检测小鼠肺泡灌洗液中炎症因子的含量, 测定小鼠肺组织湿/干质量比评估肺水肿程度, HE 染色法观察小鼠肺组织病理改变; 采用 LPS 诱导 NP-69 细胞炎症损伤模型, 检测细胞上清液中炎症因子的含量考察其抗炎作用, RT-PCR 法检测 ZO-1、人 β -防御素 3 (human beta-defensin 3, HBD3)、白介素 22 受体亚基 α 1 (interleukin-22 receptor subunit alpha-1, IL-22Ra1)、Janus 激酶 1 (Janus kinase 1, JAK1)、酪氨酸激酶 2 (tyrosine kinase 2, Tyk2)、信号转导和转录激活因子 1 (signal transducer and activator of transcription 1, STAT1) mRNA 的表达水平, Western blot 法检测 ZO-1、HBD3、IL-22Ra1、JAK1、p-JAK1、Tyk2、STAT1、p-STAT1 的蛋白表达情况; 分子对接技术预测 ARG 与相关靶蛋白的结合能力。结果显示, ARG 可显著减轻 LPS 诱导的小鼠 ALI 模型肺水肿和病理改变, 降低炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 的水平, 上调小鼠鼻黏膜 Occludin、ZO-1 的蛋白表达。RT-PCR 结果显示, ARG 处理后, LPS 诱导的体外上皮屏障破坏得到改善。在机制上, ARG 上调了 ZO-1、HBD3、IL-22Ra1、JAK1 和 TYK2 的 mRNA 表达, 上调 ZO-1、HBD3、IL-22Ra1、JAK1、p-JAK1、p-STAT1、Tyk2 的蛋白表达水平。分子对接实验表明, ARG 的化学成分对 TNF- α 、JAK1 和 STAT1 具有良好的亲和力。以上结果表明, ARG 可以通过减轻炎症, 促进鼻黏膜上皮屏障修复, 减轻急性肺损伤, 其机制与激活 IL-22/JAK1/STAT1 信号通路有关。

关键词:急性肺损伤; 牛蒡子苷元; 鼻上皮屏障; 分子机制

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)8-1298-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.8.003

Arctigenin alleviates acute lung injury by inhibiting the inflammation reaction and repairing the nasal epithelial barrier

ZHU Zi-mo¹, CUI Bai-mei¹, NIE Fa-long¹, XIAO Chun^{2*}, LI Xiu-fang^{1*}

¹Department of Pharmacology, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

²Yunnan Institute of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Kunming 650021, China

Abstract: The effects of arctigenin (ARG) in acute lung injury (ALI) were investigated based on animal experiments *in vivo*, cell experiments *in vitro*, and molecular docking. The model of ALI in mice and NP-69 cell injury induced by lipopolysaccharide (LPS) were used. Western blot was used to detect the protein expression of Occludin and zonula occludens-1 (ZO-1) in the nasal mucosa of mice after nasal injury induced by LPS. The levels of inflammatory factors in the mouse alveolar lavage fluid were detected by ELISA. The wet/dry mass ratio of mouse lung tissue was measured to evaluate the degree of pulmonary edema. Lung histopathological changes in mice were observed by HE staining. The inflammatory injury model of NP-69 cells induced by LPS was used to detect the content of inflammatory factors in the cell supernatant to investigate the anti-inflammatory effects of ARG. The mRNA expression levels of ZO-1, human beta-defensin 3 (HBD3), interleukin-22 receptor subunit alpha-1 (IL-22Ra1), Janus kinase 1 (JAK1), tyrosine kinase 2 (Tyk2), and signal transducer and activator of transcription

收稿日期: 2024-02-18

接受日期: 2024-06-05

基金项目: 国家自然科学基金 (81860724); 云南省科技厅中医药基础研究联合专项 (202001AZ070001-001); 云南省科技厅中医药基础研究联合专项 (202101AZ070001-287); 云南省科技厅科技人才与平台计划 (202305AC160043)

* 通信作者 Tel: 86-013908856005; E-mail: sofinelxf@163.com, Cherish_xc23@163.com

1 (STAT1) were determined by RT-PCR. The protein expression of ZO-1, HBD3, IL-22Ra1, JAK1, p-JAK1, JAK1, Tyk2, STAT1 and p-STAT1 were detected by Western blot. Molecular docking techniques were used to predict the binding ability of ARG with related target proteins. The results showed that ARG significantly reduced the pulmonary edema and pathological changes in mice, reduced the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β), and upregulated the protein expression of Occludin and ZO-1 in the mouse nasal mucosa. RT-PCR results showed that the epithelial barrier disrupted by LPS was alleviated after ARG treatment *in vitro*. Mechanistically, ARG upregulated the mRNA expression of ZO-1, HBD3, IL-22Ra1, JAK1, and TYK2, identically upregulated the protein expression levels of ZO-1, HBD3, IL-22Ra1, JAK1, p-JAK1, p-STAT1, and Tyk2. Molecular docking experiments showed that ARG has good affinity with TNF- α , JAK1, and STAT1. The above results indicate that ARG could alleviate acute lung injury by reducing inflammation, and promoting nasal mucosal epithelial barrier repair. Its mechanism is related to the activation of IL-22/JAK1/STAT1 signaling pathway.

Key words: acute lung injury; arctigenin; nasal epithelial barrier; molecular mechanism

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是由创伤、脓毒症和感染等因素导致的肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞损伤,造成弥漫性肺间质及肺泡水肿,进而导致的急性低氧性呼吸功能不全的复杂临床综合征^[1]。它是一种具有高发病率和死亡率的急性炎症性疾病,其进一步发展将演变为急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS)^[2],抑制 ALI 的进一步发展是预防 ARDS 的有效策略。2016 年全球最大规模的一项流行病学统计^[3],全球范围内有 220 万 ARDS 患者,其死亡率高达 40%。随着新型冠状病毒肺炎疫情的暴发,全球已有 5 亿多例临床确诊病例,其中 600 多万例死亡,其导致的 ALI 患者人数显著增加,给人类健康带来严重危害^[4]。研究表明,一些药物可以改善 ALI,如糖皮质激素等^[5]。然而,迄今为止对 ALI 的治疗还未取得重大进展。

目前普遍认为,肺内先天免疫细胞,如巨噬细胞和中性粒细胞的迁移和招募以及炎症细胞因子的大量释放是导致 ALI 中过度炎症反应的主要因素之一^[6]。因此,大多数关于 ALI 的研究集中在抑制炎症性风暴,很少有人关注如何防止病原体的进一步入侵。鼻黏膜作为首个接触病原微生物的部位,在防御病原体经鼻入侵、维持机体内环境稳态发挥了至关重要的作用。鼻黏膜上皮细胞之间由紧密连接、粘附连接、桥粒和半桥粒组成的顶端连接复合体连接^[7],是构成鼻黏膜的第一道屏障。紧密连接是位于最顶端的细胞间连接复合体,也是鼻黏膜物理屏障的重要构成部分^[8],可防止吸入物质和病原体入侵。 β -防御素主要分布于鼻黏膜上皮及呼吸道黏膜下腺体组织中,具有独特二硫键的阳离子抗菌肽,是鼻腔免疫屏障的重要效应分子,不仅可通过靶向

细菌细胞膜和病毒外壳蛋白的方式快速杀灭病原微生物,还可通过提高免疫细胞的活性和趋化性,调节并增强呼吸道黏膜的防御功能^[9]。病毒和细菌可以直接破坏鼻黏膜上皮屏障,某些病理条件,如慢性鼻窦炎伴有炎症,可能导致鼻黏膜上皮屏障无法抵御病原体的入侵^[10]。当屏障功能失调时,来自鼻腔的有害物质感染可能向下呼吸道迁延引起肺部的异常免疫反应,导致 ALI 的发生和发展。因此,维持鼻黏膜上皮屏障的功能有利于呼吸道疾病特别是 ALI 的预防和治疗。

牛蒡子是菊科牛蒡属植物牛蒡的干燥成熟果实,具有疏散风热、解毒利咽、宣肺透疹的功效,常用于治疗咳多痰饮,丹毒痒腮,感冒发热,痈肿化脓,麻疹风疹等病症^[11]。现代药理学研究表明,牛蒡子具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用^[12]。牛蒡子苷元 (arctigenin, ARG) (见图 1) 作为牛蒡子的主要活性成分,可维持炎症性肠病中肠上皮屏障的完整性^[13]。据报道,ARG 可能是 SARS-CoV-2 的潜在抑制剂^[14],但 ARG 对鼻黏膜炎症损伤是否有保护作用尚不清楚。

本研究从促进鼻黏膜上皮紧密连接蛋白表达和诱导 β -防御素生成的角度,对牛蒡子苷元促进鼻黏膜物理屏障修复、增强免疫屏障以减轻 ALI 的作用及机制进行了研究。

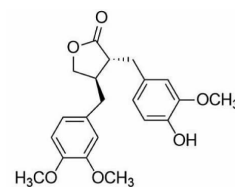


图 1 ARG 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of ARG

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

雄性 KM 小鼠, 40 只, 体质量 18 ~ 20 g, 购于成都达硕实验动物有限公司, 许可证号: SCXK(川) 2020-030。动物饲养在温度(25 ± 2)℃、湿度为 55% ~ 65%、光暗交替(12 h/12 h)环境。本研究按照云南中医药大学实验动物伦理委员会的指导方针进行。本研究方案经云南中医药大学机构实验动物伦理委员会批准, 审查编号为 R0820183034。

1.1.2 实验细胞、试剂

人鼻咽上皮细胞(NP-69 细胞系)(北纳创联生物技术有限公司, 货号: 49415); RPMI1640 培养基(批号: 2103012, Bimake 公司); 5% 胎牛血清(批号: 1601001, Thermo 公司); 100 U/mL 青霉素链霉素双抗溶液(批号: 1744939, Gibco 公司); 精氨酸(Arginine, 批号: LV10773, 北京百灵威科技有限公司); 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(批号: 0000155607, SIGMA 公司); 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)和白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)试剂盒(批号分别为: 20210105、20210105、20210105, 南京建成生物工程研究所); 一氧化氮(nitric oxide, NO)检测试剂盒(批号: No. 20210727, 北京索莱宝科技有限公司); 总 RNA 抽提试剂(TRIZOL)(批号: 15596-018)、RNA 逆转录试剂盒(批号: k1622, Thermo 公司); Q-PCR 检测试剂盒(批号: 31598800, Roche 公司); 闭锁小带蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)抗体(批号: 21773-1-AP)、闭合蛋白(Occludin)抗体(批号: 00081829)、酪氨酸激酶 2(recombinant tyrosine kinase 2, Tyk2)抗体(批号: 10015957)、信号转导和转录激活因子 1(signal transducer and activator of transcription 1, STAT1)抗体(批号: 10005400)、Janus 激酶 1(Janus Kinase 1, JAK1)抗体(批号: 10004856)、白介素 22 受体亚基 $\alpha 1$ (interleukin-22 receptor subunit α -1, IL-22Ra1)抗体(批号: 00045040)、 β -肌动蛋白(beta-actin)(批号: 10021787)、Mouse 源二抗、Rabbit 源二抗(批号分别为: 20000374、00116609)(Proteintech 公司); 人 β -防御素 3(human beta-Defensin 3, HBD3)抗体(批号: GR3207641-3)、p-STAT1 抗体(批号: GR3283930-4)、p-JAK1 抗体(批号: GR3381990-1)(Abcam 公司)。

1.2 方法

1.2.1 急性肺损伤小鼠模型建立

将小鼠随机分为五组: 正常组(control, Con)、模型组(model, Mod)、地塞米松组(dexamethasone, Dex)、ARG 低剂量组(ARG low dose, ARG-L)和 ARG 高剂量组(ARG high dose, ARG-H), 每组 8 只小鼠。牛蒡子苷元和地塞米松用双蒸水溶解至所需浓度(加入千分之一 DMSO 助溶)。造模前禁食不禁水 12 h, 正常组缓慢滴鼻 PBS(20 μ L/20 g), 模型组、地塞米松组、牛蒡子苷元低、高剂量组缓慢滴鼻 2 mg/kg LPS(20 μ L/20 g), 1 次/d, 连续滴鼻 3 d, ARG-L 组和 ARG-H 组小鼠每天滴鼻结束后 6 h 分别灌胃给予 50、100 mg/kg ARG, Dex 组灌胃给予 2 mg/kg Dex, Con 组和 Mod 组灌胃给予等体积蒸馏水, 各组小鼠在末次给药后 24 h 腹腔注射戊巴比妥钠过量麻醉处死, 取鼻黏膜和肺组织。

1.2.2 肺湿/干质量比

称取小鼠左肺上叶为湿重, 放入恒温 80 °C 干燥箱烘烤 72 h, 烘烤至恒重后, 称取干重。计算其肺湿干重比 = 湿重/干重, 考察肺水肿的程度。

1.2.3 HE 染色

取左肺下叶, 用 10% 多聚甲醛固定 48 h, 脱水、透明、石蜡包埋后切片, 切片用苏木精和伊红染色, 在光学显微镜下观察病理组织学改变。

1.2.4 检测支气管肺泡灌洗液中炎症介质的水平

肺组织灌洗 3 次, 收集支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF), 4 °C 以 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书方法检测肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的水平。

1.2.5 Western blot 法检测小鼠鼻黏膜 Occludin、ZO-1 的蛋白表达水平

取鼻黏膜组织, 加入 RIPA 强裂解液和蛋白酶抑制剂后匀浆, 冰上裂解 30 min, 离心取上清, 采用 BCA 法进行定量, SDS-PAGE 电泳后湿转法转膜将蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 ~ 2 h, 加入目标一抗(Occludin、ZO-1) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 加入相应 HRP 标记的二抗室温孵育 2 h, 滴加 ECL 发光, 显影, 封闭相应的内参作为对照, 保存显影图片, 使用 Image J 进行灰度分析。

1.2.6 细胞培养和处理

复苏 NP-69 细胞, 次日更换完全培养基。细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养。牛蒡子苷元和脂多糖, 用不完全培养基溶解至所需浓度过滤除菌。取对数生长期的细胞, 调整细胞密度为 4 × 10⁵ 个/

mL,实验细胞设为正常组(Con)、模型组(Mod)、牛蒡子苷元组(ARG)。将细胞接种于6孔培养板中,培养24 h,第2 d加入不含血清的培养基饥饿处理24 h。第3 d加入不同浓度的ARG(0.01、0.1、1 μmol/L)预处理细胞24 h,第4 d加入1 μg/mL LPS刺激细胞24 h。

1.2.7 检测炎症介质和细胞因子的水平

获取各组细胞后按照NO试剂盒说明检测细胞上清液中的NO含量。ELISA法检测细胞上清液中TNF-α、IL-6和IL-1β的含量。

1.2.8 RT-PCR法检测ZO-1、HBD3以及IL-22/JAK1/STAT1信号通路相关基因的mRNA表达

获取各组细胞后使用TRIZol试剂提取总RNA,RT-PCR检测IL-22Ra1、ZO-1、HBD3、Tyk2、JAK1和STAT1 mRNA表达水平。在以下顺序热循环条件孵化:95℃预变性15 min;95℃变性10 s,60℃退火30 s,循环45次;95℃60 s;55℃30 s,为一个周期。以β-actin为内参,用2^{-ΔΔCt}的统计学方法测定mRNA的相对表达量。计算方法如下:ΔCt = Ct(目的基因) - Ct(β-actin);ΔΔCt = ΔCt(处理样本) - ΔCt(对照样本)。所使用的引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	长度 Length(bp)
IL22Ra1	F:TGTGCCGACTGAAGACACTG R:FGGTGACATATCTGTAGCTCAGG	120
ZO-1	F:CAACATACAGTACCGTTCACA R:CACTATTGACGTTTCCCCACTC	105
HBD3	F:CTTCCTGTTTTGGTGCCCTGT R:FGCCGATCTGTTCCCTCCTTTG	128
TYK2	F:GAACCCGCTGTGTACCGTT R:ACGTCATTACAAACTCATGCTT	128
JAK1	F:TCAGTGTGGCGTCATCTCC R:CAGTGAGCTGGCATCAAGGA	137
STAT1	F:ATCAGCCTCAGTCGGGGAATA R:FGGTCTCGTGTCTCTCTTCT	186

1.2.9 Western blot法检测ZO-1、HBD3以及IL-22/JAK1/STAT1信号通路相关蛋白表达水平

获取各组细胞,吸去上清液,PBS清洗2次,每孔加入100 μL裂解液(含蛋白酶和磷酸酶抑制剂)。冰上裂解5 min,收集细胞裂解液,离心,取上清液。采用BCA法进行定量,SDS-PAGE电泳后电转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭1~2 h,加入目标一抗ZO-1(1:2 000);IL-22Ra1(1:500);

JAK1(1:500);STAT1(1:500);HBD3(1:500);Tyk2(1:500);p-STAT1(1:500);p-JAK1(1:500);β-actin(1:1 000)4℃孵育过夜或室温条件孵育2 h,TBST洗膜3次,加入相应HRP标记的二抗(1:5 000)室温孵育1~2 h,滴加ECL发光,显影,封闭相应的内参作为对照,保存显影图片,使用Image J进行灰度分析。

1.2.10 分子对接

利用分子对接技术,预测ARG与可能的靶蛋白JAK1、STAT1和TNF-α之间的潜在结合能力。通过TCMSP数据库获取中药单体牛蒡子苷元的化学结构,保存为mol2格式文件;通过PDB数据库获取靶蛋白受体-配体的化学结构,保存为pdb格式文件。使用Pymol软件对靶点蛋白提取原配体、去水,加氢,使用AutoDock tools将蛋白、配体和小分子化合物保存为PDBQT的格式备用。对接模拟使用AutoDock 1.5.6进行,结果使用Pymol 1.7.x表示。

1.2.11 数据分析

采用SPSS 26.0统计软件进行分析。实验数据采用单因素方差分析进行比较。方差齐性采用LSD法检验,方差的异质性采用Tamhane法检验。P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺湿/干质量比

与正常组相比,LPS滴鼻刺激后小鼠肺组织湿/干质量比值明显上升(P < 0.01),与模型组相比,给药后牛蒡子苷元高剂量组、地塞米松组小鼠肺组织湿/干重比值均明显下降(P < 0.01)(见图2)。

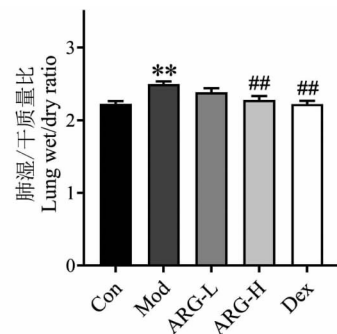


图2 ARG对LPS滴鼻小鼠肺组织湿/干质量比值的影响
Fig. 2 Effect of ARG on the wet/dry weight ratio of lung tissue of mice treated with LPS by intranasal administration

注:与正常组比较,*P < 0.05,**P < 0.01;与模型组比较,#P < 0.05,##P < 0.01,下同。Note: Compared with Con,*P < 0.05,**P < 0.01;Compared with Mod,#P < 0.05,##P < 0.01, the same below.

2.2 HE 染色结果

正常组小鼠肺泡结构完整,未见明显炎症反应, LPS 滴鼻刺激后模型组小鼠肺组织间隙中中性粒细

胞浸润红细胞渗出,显示有一定的炎症损伤。牛蒡子苷元及地塞米松给药后小鼠肺组织炎症细胞浸润减少,较模型组炎症损伤情况有一定的改善(见图 3)。

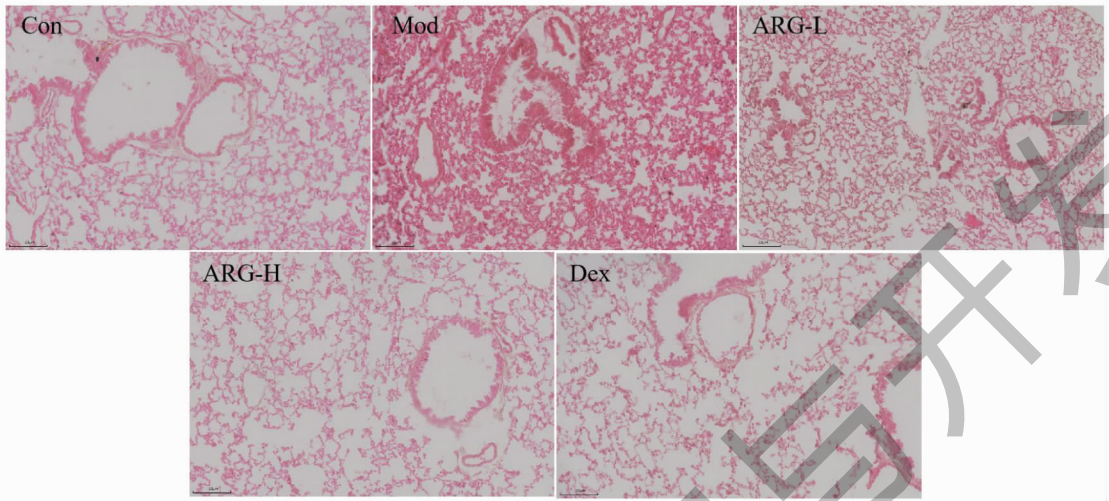


图 3 各组小鼠肺组织 HE 染色结果($\times 200$)

Fig. 3 HE staining results of Lung tissue in each group of mice($\times 200$)

2.3 BALF 中炎症因子的水平

与正常组相比, LPS 滴鼻刺激后模型组小鼠肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的水平显著增加(P

< 0.01);与模型组相比,牛蒡子苷元高剂量组、地塞米松组给药后均能降低 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的水平($P < 0.05, P < 0.01$)(见图 4)。

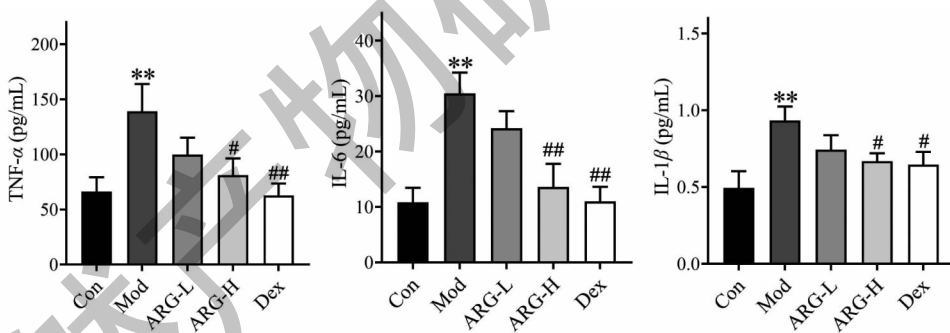


图 4 ARG 对 LPS 滴鼻小鼠肺泡 BALF 中炎症因子的影响

Fig. 4 The effect of ARG on the inflammatory cytokines in BALF of mice treated with LPS by intranasal administration

2.4 小鼠鼻黏膜 Occludin、ZO-1 蛋白表达水平

与正常组相比, LPS 滴鼻刺激后模型组小鼠鼻黏膜 Occludin、ZO-1 蛋白表达水平明显下降($P < 0.01$);与模型组相比,牛蒡子苷元高、低剂量组、地塞米松组给药后小鼠 Occludin 蛋白表达明显上升($P < 0.05, P < 0.01$),牛蒡子高剂量组、地塞米松组给药后小鼠 ZO-1 蛋白表达明显上升($P < 0.01$)(见图 5)。

2.5 NP-69 细胞上清液中 NO 和炎症细胞因子水平

与正常组相比, LPS 刺激 NP-69 细胞 24 h 后细

胞上清液中 NO、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平明显上升($P < 0.01$)。与模型组相比,牛蒡子苷元($1 \mu\text{mol/L}$)均能下调 NO 和 TNF- α 、IL-6 的水平($P < 0.05, P < 0.01$),牛蒡子苷元($0.1 \mu\text{mol/L}$)能下调 NO 和 TNF- α 的含量($P < 0.05, P < 0.01$)(见图 6)。

2.6 ZO-1、HBD3 以及 IL-22/JAK1/STAT1 信号通路相关基因 mRNA 表达水平

与正常组相比, LPS 刺激 NP-69 细胞 24 h 后 ZO-1、HBD3、JAK1 mRNA 表达水平明显降低($P < 0.05, P < 0.01$), STAT1 mRNA 表达水平明显升高

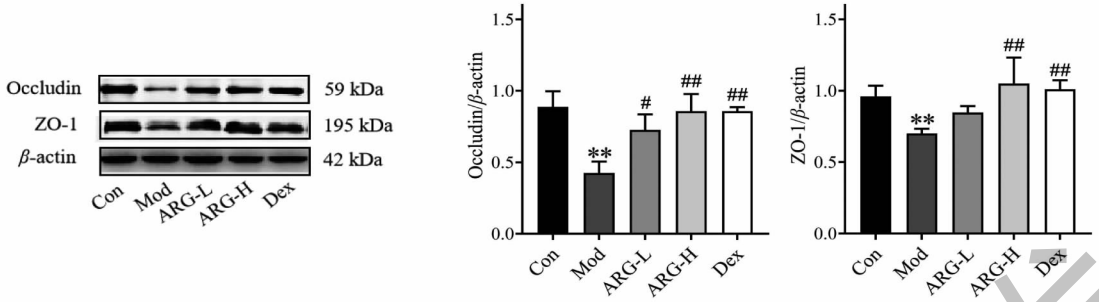


图5 ARG对LPS滴鼻小鼠鼻黏膜Occludin、ZO-1蛋白表达的影响

Fig. 5 The effect of ARG on the proteins expression of Occludin and ZO-1 of mice treated with LPS by intranasal administration

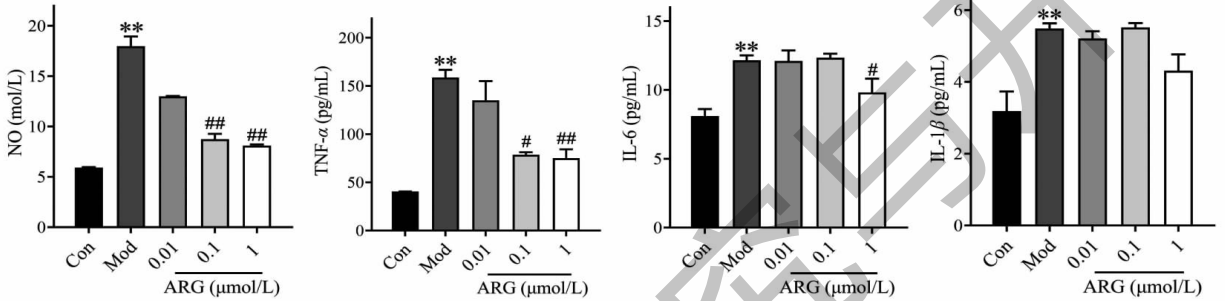


图6 ARG对LPS致NP-69细胞释放NO和炎症因子水平的影响

Fig. 6 The effect of ARG on the level of NO and inflammatory factors in LPS-induced NP-69 cells

($P < 0.05$)。与模型组相比,牛蒡子苷元(1 $\mu\text{mol/L}$)能提高 IL-22Ra1 mRNA 表达水平($P < 0.05$)。与模型组相比,牛蒡子苷元(1 $\mu\text{mol/L}$)能提高 ZO-1、HBD3、IL-22Ra1、JAK1、Tyk2 mRNA 表达水平($P < 0.05, P < 0.01$),牛蒡子苷元(0.1 $\mu\text{mol/L}$)能提高 ZO-1、HBD3、IL-22Ra1、JAK1、Tyk2 mRNA 表达水平($P < 0.05, P < 0.01$) (见图7)。

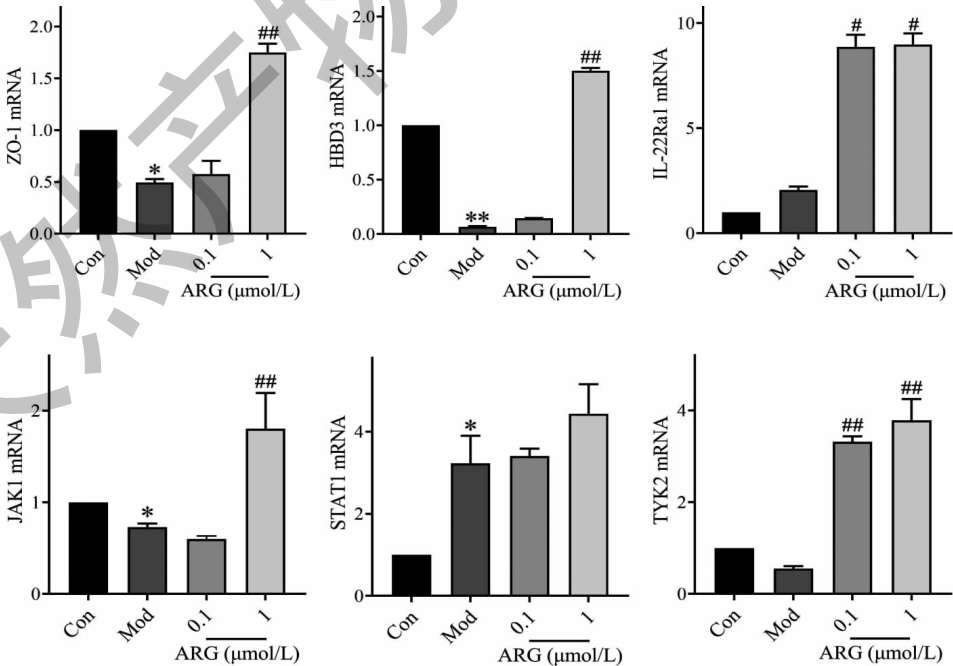


图7 ARG对LPS致NP-69细胞ZO-1、HBD3及IL-22/JAK1/STAT1信号通路相关基因mRNA表达水平的影响

Fig. 7 The effect of ARG on the mRNA expression of genes related to the ZO-1, HBD3 and IL-22/JAK1/STAT1 signaling pathway in LPS-induced NP-69 cells

2.7 ZO-1、HBD3 以及 IL-22/JAK1/STAT1 信号通路相关蛋白表达水平

与正常组相比, LPS 刺激 NP-69 细胞 24 h 后 ZO-1、HBD3、IL-22Ra1、p-JAK1、p-STAT1 蛋白表达

水平明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组相比, 牛蒡子苷元 (0.1、1 $\mu\text{mol/L}$) 能提高 ZO-1、HBD3、IL-22Ra1、JAK1、p-JAK1、p-STAT1、Tyk2 的蛋白表达水平($P < 0.05$, $P < 0.01$) (见图 8)。

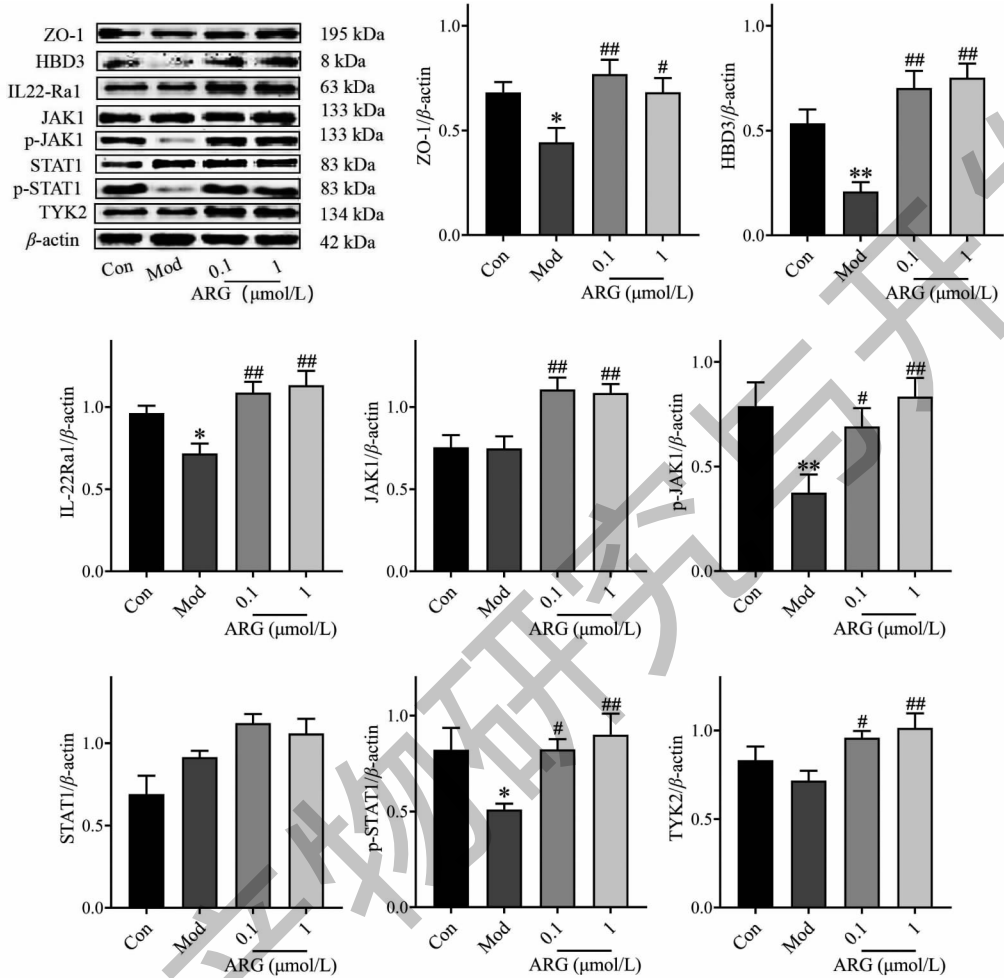


图 8 ARG 对 LPS 致 NP-69 细胞 ZO-1、HBD3 及 IL-22/JAK1/STAT1 信号通路相关蛋白表达水平的影响

Fig. 8 The effect of ARG on the protein expression related to the ZO-1, HBD3 and IL-22/JAK1/STAT1 signaling pathway in LPS-induced NP-69 cells

2.8 分子对接结果

结合能 ≤ -7.0 kJ/mol 被认为可以诱导配体与靶标之间具有良好的结合活性。ARG 与三个核心靶点 JAK1、STAT1 和 TNF- α 的结合能分别为 -7.7、

-7.3 和 -10.6 kJ/mol。因此, JAK1、STAT1 和 TNF- α 与 ARG 具有良好的结合活性, 其中 ARG 与 TNF- α 的结合活性最强 (见表 2 和图 9)。

表 2 ARG 与核心靶点的结合能

Table 2 Binding energy of ARG to core targets

成分 Component	靶点 Target	结合能 Binding energy (kJ/mol)	氢键数 Hydrogen bond number
ARG	JAK1	-7.7	0
	STAT1	-7.3	3
	TNF- α	-10.6	1

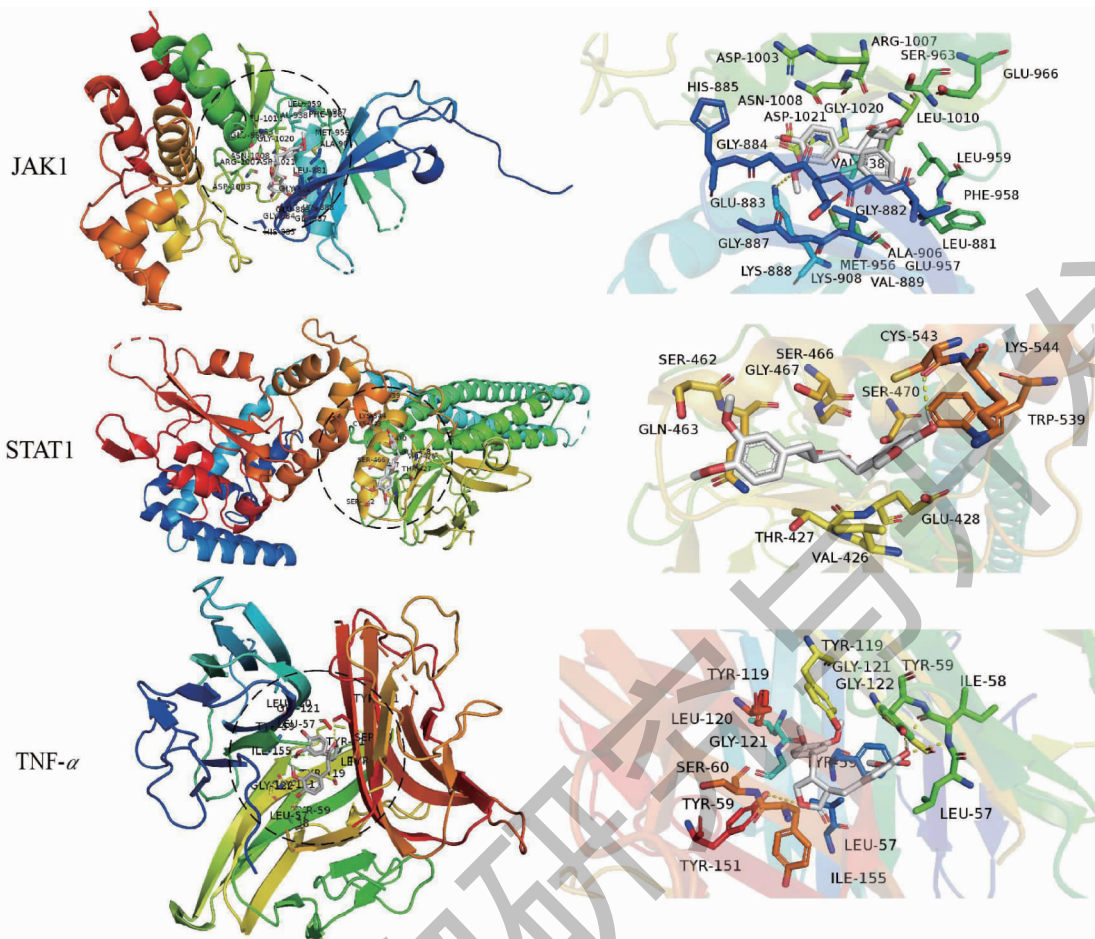


图9 ARG与核心靶点的分子对接3D图

Fig. 9 Molecular docking 3D diagram of ARG with core targets

3 讨论与结论

由细菌和病毒感染引起的ALI是ARDS最常见的危险因素之一,是世界范围内高发病率和死亡率的主要原因之一^[15]。目前,发病机制仍不完全明确,临床治疗方法及效果有限。

鼻上皮细胞组成的黏膜屏障是呼吸道接触病原微生物攻击的首要部位,在宿主的先天免疫防御中起着重要作用。研究证实了冠状病毒引起的严重感染^[16]和流感^[17]等患者体内与呼吸道黏膜屏障的结构损伤或功能障碍密切相关。提高呼吸道黏膜屏障的防御能力是治疗包括ALI在内的呼吸道疾病的重要途径。本研究结果表明,ARG对脂多糖诱导的炎症损伤小鼠具有明显的抗炎活性。鼻黏膜相邻上皮细胞之间的紧密连接蛋白主要负责离子和分子的屏障和细胞旁通道的结构完整性,并维持高的跨上皮阻力^[7]。减少ZO-1和Occludin的水平可能增加鼻黏膜上皮细胞的通透性,使一些病原微生物更容易侵入体内,引起一系列炎症反应继而损伤鼻黏膜屏

障,最终导致上呼吸道感染和其他疾病^[18]。本研究结果表明,ARG降低小鼠肺泡灌洗液中TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的水平,减轻肺组织水肿程度。本研究使用LPS滴鼻致ALI模型,推测LPS破坏小鼠的鼻黏膜上皮屏障,进而导致肺损伤。

为了进一步探讨ARG减轻损伤向肺组织迁延的机制,本研究复制了LPS诱导的鼻上皮细胞炎症损伤的模型。鼻上皮细胞是抵御病原体的关键角色。它们构成了对抗致病微生物的物理屏障,并分泌趋化因子、细胞因子和抗菌肽(antimicrobial peptide, AMPs)来启动免疫反应。当细菌或病毒侵入鼻黏膜时,对鼻黏膜的损伤可能包括紧密连接蛋白完整性改变,增加炎症细胞因子的释放, β -防御素等AMPs减少,从而导致上皮屏障功能受损和渗透性增强。在本研究中,我们使用LPS刺激NP-69细胞模拟病原微生物的侵入。结果表明,ARG降低炎症细胞因子TNF- α 、IL-6、NO的水平,LPS刺激后,并上调ZO-1和HBD3的基因表达,ARG可以修复鼻黏

膜上皮屏障提高其防御能力和减少 NP-69 细胞的炎症损伤。

研究表明,IL-22 在抗菌肽的产生中发挥重要作用,IL-22 是 IL-10 家族的成员之一,通过与受体 IL-22Ra1 结合启动信号转导过程。IL-22Ra1 的表达具有典型的组织特异性,上皮细胞是其表达的唯一细胞类型。IL-22Ra1 的激活导致 JAK1 和 Tyk2 的激活,这种激活导致 STAT1 中的酪氨酸残基磷酸化^[19]。IL-22/JAK1/STAT1 在宿主防御中的三个主要作用:(1)诱导抗菌肽的产生;(2)维持上皮屏障的完整性,(3)与其他细胞因子协作招募免疫细胞^[20]。本研究结果显示,LPS 刺激 NP-69 细胞后,造成 IL-22 信号通路的抑制,IL-22Ra1、p-STAT1、p-JAK1 蛋白表达均下降,给予 ARG 预处理增加了 IL-22Ra1、TYK2、JAK1 和 STAT1 的 mRNA 的表达,增加 IL-22Ra1、Tyk2、JAK1、p-JAK1、p-STAT1 的蛋白表达,显著激活 IL-22/JAK1/STAT1 通路,进而诱导下游抗菌肽 HBD3 的产生,提高了鼻黏膜上皮屏障的非特异性防御功能,同时,提高了 ZO-1 蛋白表达水平。为了探讨 ARG 与靶蛋白的相互作用力,我们利用分子对接技术研究来评估蛋白质和配体的热力学结合效应。结果表明,ARG 与靶蛋白 JAK1、STAT1、TNF- α 具有较强的结合能力。

综上所述,ARG 可通过激活 IL-22/JAK1/STAT1 信号通路,改善 LPS 诱导的鼻上皮屏障功能损伤,减轻炎症反应。本研究的不足之处是 ARG 的作用机制需要进一步补充 IL-22/JAK1/STAT1 通路的抑制剂组的实验进一步阐明。但我们的结果认为 ARG 可以防止鼻腔炎症进一步迁延到肺部。牛蒡子临床应用广泛,我们对其主要活性成分牛蒡子苷元治疗 ALI 药效作用机制进行了研究,为其更好地发挥抗炎、抗菌、保护黏膜屏障功能的临床用途,以期 ARG 临床上治疗 ALI 提供理论研究基础及新思路。

参考文献

- 1 Bos LDJ, Ware LB. Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes[J]. *Lancet*, 2022, 400: 1145-1156.
- 2 Liu YH, Pan GT, Shang LR, et al. Clinical efficacy of Danggui Shaoyao Powder in COVID-19 and network pharmacology study of its mechanism[J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2021, 33: 490-499.
- 3 Bellani G, Laffey JG, Pham T, et al. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries[J]. *JAMA*,

2016, 315: 788-800.

- 4 Li ZH, Pan HT, Yang JH, et al. Xuanfei Baidu formula alleviates impaired mitochondrial dynamics and activated NLRP3 inflammasome by repressing NF- κ B and MAPK pathways in LPS-induced ALI and inflammation models[J]. *Phytomedicine*, 2023, 108: 154545.
- 5 Vettorazzi S, Bode C, Dejager L, et al. Glucocorticoids limit acute lung inflammation in concert with inflammatory stimuli by induction of SphK1[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7796.
- 6 Kumar V. Pulmonary Innate immune response determines the outcome of inflammation during pneumonia and sepsis-associated acute lung injury[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1722.
- 7 Husan SMN, Tan HTT, Shukri NM, et al. Nasal epithelial barrier integrity and tight junctions disruption in allergic rhinitis: overview and pathogenic insights[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 663626.
- 8 Nomura K, Obata K, Keira T, et al. *Pseudomonas aeruginosa* elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells[J]. *Respir Res*, 2014, 15: 21.
- 9 Fruitwala S, El-Naccache DW, Chang TL, et al. Multifaceted immune functions of human defensins and underlying mechanisms[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2019, 88: 163-172.
- 10 Tuli JF, Ramezanpour M, Cooksley C, et al. Association between mucosal barrier disruption by *Pseudomonas aeruginosa* exoproteins and asthma in patients with chronic rhinosinusitis[J]. *Allergy*, 2021, 76: 3459-3469.
- 11 Zhang H, Gao Y, Zhang J, et al. The effect of total lignans from *Fructus Arctii* on streptozotocin-induced diabetic retinopathy in Wistar rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 255: 112773.
- 12 Suzuki Y, Sato M, Awazuhara T, et al. Simultaneous quantification of arctigenin and its glucuronide conjugate in mouse plasma using ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry[J]. *J Sep Sci*, 2021, 44: 1299-1306.
- 13 Tao Y, Yue M, Lv C, et al. Pharmacological activation of ER-beta by arctigenin maintains the integrity of intestinal epithelial barrier in inflammatory bowel diseases[J]. *FASEB J*, 2020, 34: 3069-3090.
- 14 Elkaeed EB, Metwaly AM, Alesawy MS, et al. Discovery of potential SARS-CoV-2 papain-like Protease Natural inhibitors employing a multi-phase in silico approach[J]. *Life (Basel)*, 2022, 12: 1407.
- 15 Matthay MA, et al. Acute respiratory distress syndrome[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5: 18.

(下转第 1287 页)