

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.07.001

❖ 基础研究 ❖

槲皮素对小鼠肺缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究

刘文, 康凯, 张健楠, 种阳, 赵鸣雁

(哈尔滨医科大学附属第一医院重症医学科, 黑龙江 哈尔滨 150001)

【摘要】目的: 探讨槲皮素对小鼠肺缺血再灌注损伤(LIRI)的保护作用及可能的机制。**方法:** 将40只C57BL/6雄性小鼠随机分为对照组、模型组、槲皮素低剂量(2.5 mg/kg)组、中剂量(5 mg/kg)组和高剂量(10 mg/kg)组, 每组各8只。实验前5 d, 槲皮素各剂量组小鼠灌胃给予相应剂量槲皮素, 对照组和模型组小鼠灌胃给予等体积生理盐水; 微血管钳闭塞左肺门肺血管建立LIRI小鼠模型; HE染色观察肺组织病理损伤; 测量小鼠肺组织湿/干重比(W/D)值; 酶联免疫吸附试验(ELISA)测量肺组织和血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)含量; 蛋白免疫印迹检测肺组织中PI3K-AKT-NF κ B信号相关蛋白的表达量。**结果:** 与模型组比较, 槲皮素呈剂量依赖性缓解LIRI引起的肺泡壁水肿、肺间质增厚、肺泡结构破坏和肺泡腔内大量炎性细胞浸润等病理变化, 降低肺损伤评分($P < 0.05$); ELISA结果显示, 槲皮素呈剂量依赖性降低LIRI小鼠肺组织和血清中TNF- α 、IL-6和IL-1 β 含量($P < 0.05$); 蛋白免疫印迹结果显示, 槲皮素呈剂量依赖性降低小鼠肺组织中p-p65/p65、p-I κ B α 、p-AKT/AKT和p-PI3K蛋白表达量($P < 0.05$)。**结论:** 槲皮素能有效改善小鼠LIRI, 机制可能与抑制PI3K-AKT-NF κ B信号通路有关。

【关键词】 急性肺损伤; 缺血再灌注; 槲皮素; 炎症因子; PI3K-AKT-NF κ B信号通路; 小鼠

【中图分类号】 R332; R563 **【文献标志码】** A

Protective effect and mechanism of quercetin on acute lung injury induced by ischemia-reperfusion in mice

LIU Wen, KANG Kai, ZHANG Jian-nan, CHONG Yang, ZHAO Ming-yan

(Department of Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang, China)

【Abstract】 Objective: To study the protective effect of quercetin on acute lung injury (LIRI) induced by ischemia-reperfusion in mice. **Methods:** 40 C57BL/6 male mice were randomly divided into control group, model group, low-dose quercetin (2.5 mg/kg) group, middle-dose (5 mg/kg) group and high-dose (10 mg/kg) group, 8 cases in each group. 5 days before the experiment, mice in each dose of quercetin group were given the corresponding concentration of quercetin by gavage, and the control group and the model group were given the same volume of normal saline by gavage. Mouse model of LIRI was established by occlusion of pulmonary vessels in the left hilum of lung with microvascular clamp. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological damage of lung tissue and score. The wet/dry weight ratio (W/D) value of mouse lung tissue was measured. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure lung tissue and serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β) content. Western blot was used to detect the expression of PI3K-AKT-NF κ B signal protein in lung tissue. **Results:** Compared with the model group, quercetin relieved LIRI-induced alveolar wall edema, pulmonary interstitial thickening, alveolar structure destruction, and massive inflammatory cell infiltration in the alveolar cavity in a dose-dependent manner, and reduced lung injury score ($P < 0.05$). ELISA results showed that quercetin decreased the levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in the lung tissue and serum of LIRI mice in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Western blot results showed that quercetin decreased the expression of p-p65/p65, p-I κ B α , p-AKT/AKT and p-PI3K in the lung tissue of mice in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). **Conclusion:** Quercetin improves acute lung injury induced by ischemia-reperfusion in mice, and the mechanism may be related to the inhibition of PI3K-AKT-NF κ B signaling pathway.

【Key words】 Acute lung injury; Ischemia-reperfusion; Quercetin; Inflammatory response; PI3K-AKT-NF κ B signaling pathway; Mice

肺缺血再灌注损伤 (lung ischemia-reperfusion injury, LIRI) 可发生于肺移植、肺切除、心脏骤停和

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81772045)

作者简介: 刘文(1983-), 男, 硕士, 主治医师。E-mail: liuwen2112@163.com

通讯作者: 赵鸣雁。E-mail: Mingyan19700927@126.com

肺栓塞患者,其引起的肺功能障碍是急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的重要危险因素,预示患者预后较差^[1]。LIRI 病理机制复杂,涉及炎症反应、氧化应激和细胞凋亡等^[2],靶向于无菌炎症反应和氧化应激是减轻患者 LIRI 和改善预后的主要治疗策略^[3]。槲皮素是一种黄酮类化合物,广泛存在于较多蔬菜、水果和饮料中,具有抗炎、抗增殖和抗氧化等多种药理学活性^[4-5]。研究^[6-10]发现,槲皮素对多种肺损伤模型均有保护作用,通过诱导血红素加氧酶-1(HO-1)抑制肺上皮细胞的氧化应激,并通过调节抗氧化剂基因的表达减少,可缓解百草枯介导的氧化损伤;通过与广泛的细胞靶标相互作用,可减少炎症性细胞因子和生长因子的表达及粘蛋白的分泌,降低金属蛋白酶的活性,减轻香烟中烟气引起的大鼠气道炎症和粘液产生,而其抗小鼠肺缺血再灌注损伤的活性尚未阐明。本研究旨在探讨槲皮素对 LIRI 的保护作用及可能的机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 SPF 级雄性小鼠 40 只,体质量 28~32 g。动物分笼饲养于 SPF 级动物房,自由饮水和饮食,12 h 交替光照,湿度 21~23 ℃,所有动物试验均经过伦理委员会批准同意。将小鼠随机分为对照组、模型组、槲皮素低剂量组、中剂量组和高剂量组,每组各 8 只。

1.1.2 主要试剂 槲皮素(B20527-1g)购买于上海源叶生物;Anti-p-AKT(protein kinase B, #13038)、AKT(#4685)、p-PI3K(phosphatidylinositol 3-kinases, #17366)、p-IκBα(Inhibitor of NF-κB, #2859)、p-p65(#3033)、p65(#8242)和 β-Actin(#4970)抗体购于美国 Cell signal 公司,均为兔源;髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒购自南京建成生物公司;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-1β(Interleukin-1β, IL-1β)小鼠 ELISA 试剂盒购于杭州联科生物技术股份有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 给药方法 槲皮素低剂量组(2.5 mg/kg)、中剂量组(5 mg/kg)、高剂量组(10 mg/kg)小鼠灌胃给予对应剂量的槲皮素;对照组和模型组给予等体积生理盐水,连续 5 d,最后一次给药 60 min 后,麻醉小鼠进行后续实验。

1.2.2 LIRI 小鼠模型建立^[11] 小鼠腹腔内注射

10% 水合氯醛(4.5 mL/kg)麻醉, RSP1002 型小动物呼吸机辅助机械通气,呼吸比(吸入/呼出空气)1:1,呼吸频率 80 次/min,潮气量 10 mL/kg,吸氧分数 100%。观察到肺塌陷和扩张后开胸,用微血管钳将左肺门肺血管(包括肺动脉,静脉和支气管)闭塞 60 min,再灌注 120 min,缝合胸腔切口。术后 2 h,小鼠眼球取血,脱颈椎处死。分离小鼠左肺下叶部分用于后续试验。通过检测肺湿干重比值(W/D)、观察病理变化验证建模成功与否。

1.2.3 苏木精-伊红(HE)染色 将小鼠肺组织于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,石蜡包埋,切片机制片,厚度 4 μm。二甲苯除蜡脱水,苏木精染色 5 min,盐酸乙醇分化 30 s,水浸泡 15 min;伊红染色 2 min;常规脱水、透明、密封。

1.2.4 肺损伤组织学评分 包括肺泡充血、肺泡壁增厚和水肿、肺泡细胞浸润 3 项内容,每项 0~3 分;0 分为无损伤,1 分为轻度损伤,2 分为中度损伤,3 分为严重损伤^[12]。

1.2.5 肺组织 W/D 测量 处死小鼠后,立即称重左肺下叶(即湿重),然后在 60 ℃干燥 24 h 至恒重称量(即干重),计算 W/D 值。

1.2.6 肺组织 MPO、MDA 和 SOD 测量 收集肺组织,加入生理盐水,组织匀浆,4 ℃ 2 000 rpm 离心 15 min,收集上清,比色法测量肺组织 MPO、MDA 和 SOD 含量,操作严格按试剂盒说明书进行。

1.2.7 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 测量 收集小鼠血清和肺组织匀浆上清液,酶联免疫吸附试验(ELISA)测量小鼠血清和肺组织 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的含量,操作严格按试剂盒说明书进行。

1.2.8 蛋白免疫印迹(Western blot) 称取左肺组织 50 mg,加入含有蛋白酶抑制剂混合物和磷酸酶抑制剂混合物的 RIPA 缓冲液,匀浆。4 ℃ 13 000 rpm 离心 20 min,收集上清,BCA 蛋白定量。每泳道上样 20 μg 蛋白质于聚丙烯酰胺凝胶,电泳分离后,将蛋白转于 PVDF 膜;用稀释后的特异性一抗(Anti-p-AKT、AKT、p-PI3K、p-IκBα、p-p65、p65 和 β-Actin,稀释比例 1:1 000)与膜 4 ℃ 孵育过夜;洗膜,HRP-二抗室温孵育 60 min 后,用增强型化学发光(ECL)试剂盒曝光显色。

1.3 统计学分析

采用 Graph Pad 5.0 软件对数据进行分析与处理。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组小鼠 LIRI 肺组织形态学变化及损伤评分

比较

HE 染色显示,与对照组比较,模型组小鼠肺泡壁水肿,肺间质增厚,肺泡结构破坏和肺泡腔内大量炎性细胞浸润,肺损伤评分增加 ($P < 0.05$);槲皮素各剂量组小鼠较模型组上述病理变化缓解,肺损伤评分降低 ($P < 0.05$)。模型组小鼠肺 W/D 值 (7.50 ± 0.36) 高于对照组 (3.10 ± 0.47) ($P < 0.05$),槲皮素低、中、高剂量组小鼠肺 W/D 值 ($7.00 \pm 0.38, 5.80 \pm 0.52, 4.86 \pm 0.48$) 较模型组减小 ($P < 0.05$)。见图 1。

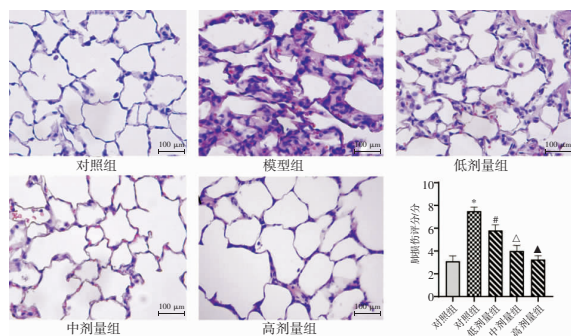


图 1 肺组织形态学变化及损伤评分(HE 染色,标尺 100 μm)

* $P < 0.05$,与对照组相比;# $P < 0.05$,与模型组相比;Δ $P < 0.05$,与低剂量组相比;▲ $P < 0.05$,与中剂量组相比。

2.2 各组小鼠肺组织 MPO、MDA 及 SOD 含量比较

模型组小鼠肺组织 MPO 和 MDA 含量高于对照组 ($P < 0.05$),SOD 含量低于对照组 ($P < 0.05$);槲皮素中剂量和高剂量组小鼠肺组织 MPO 和 MDA 含量低于模型组 ($P < 0.05$),SOD 含量高于模型组 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组小鼠肺组织 MPO、MDA 及 SOD 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	MPO (U/g)	MDA (nmol/mg)	SOD (U/mg)
对照组 (n=8)	1.07 ± 0.21	1.88 ± 0.97	35.18 ± 5.13
模型组 (n=8)	3.07 ± 0.44 *	6.84 ± 1.03 *	15.63 ± 1.94 *
低剂量组 (n=8)	2.61 ± 0.24	5.23 ± 0.58 #	18.61 ± 1.88
中剂量组 (n=8)	1.69 ± 0.16 #Δ	3.88 ± 0.54 #	24.54 ± 3.78 #
高剂量组 (n=8)	1.41 ± 0.09 #Δ	3.06 ± 0.41 #Δ	33.74 ± 4.87 #Δ

* $P < 0.05$,与对照组相比;# $P < 0.05$,与模型组相比;Δ $P < 0.05$,与低剂量组相比。

2.3 各组小鼠肺组织 TNF-α、IL-1β 及 IL-6 含量比较

模型组小鼠肺组 TNF-α、IL-1β 及 IL-6 含量高于对照组 ($P < 0.05$);槲皮素低、中、高剂量组小鼠肺组织 TNF-α、IL-1β 及 IL-6 含量低于模型组 ($P < 0.05$),且槲皮素高剂量组 < 中剂量组 < 低剂量组 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.4 各组小鼠血清 TNF-α、IL-6 及 IL-1β 含量比较

模型组小鼠血清 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 含量高

于对照组 ($P < 0.05$);槲皮素低、中、高剂量组小鼠血清 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 含量低于模型组 ($P < 0.05$),且槲皮素高剂量组 < 中剂量组 < 低剂量组 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 各组小鼠肺组织 TNF-α、IL-1β 及 IL-6 含量比较($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/mL}$)

组别	TNF-α	IL-1β	IL-6
对照组 (n=8)	10.92 ± 2.20	13.43 ± 2.43	10.80 ± 3.20
模型组 (n=8)	31.42 ± 5.13 *	44.11 ± 5.33 *	38.55 ± 5.81 *
低剂量组 (n=8)	28.09 ± 3.65 #	32.17 ± 2.58 #	30.14 ± 4.91 #
中剂量组 (n=8)	19.59 ± 1.68 #Δ	27.40 ± 1.97 #Δ	28.04 ± 2.35 #Δ
高剂量组 (n=8)	16.96 ± 1.70 #Δ▲	24.75 ± 3.27 #Δ▲	21.58 ± 2.67 #Δ▲

* $P < 0.05$,与对照组相比;# $P < 0.05$,与模型组相比;Δ $P < 0.05$,与低剂量组相比;▲ $P < 0.05$,与中剂量组相比。

表 3 各组小鼠血清 TNF-α、IL-1β 及 IL-6 含量比较($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/mL}$)

组别	TNF-α	IL-1β	IL-6
对照组 (n=8)	14.90 ± 3.28	15.23 ± 3.04	15.80 ± 2.23
模型组 (n=8)	44.47 ± 5.66 *	26.11 ± 3.44 *	43.07 ± 3.45 *
低剂量组 (n=8)	33.04 ± 5.83 #	20.17 ± 2.94 #	33.77 ± 4.37 #
中剂量组 (n=8)	28.79 ± 2.74 #Δ	18.80 ± 2.99 #Δ	30.25 ± 3.67 #Δ
高剂量组 (n=8)	22.36 ± 3.18 #Δ▲	19.15 ± 1.87 #Δ▲	23.61 ± 2.71 #Δ▲

* $P < 0.05$,与对照组相比;# $P < 0.05$,与模型组相比;Δ $P < 0.05$,与低剂量组相比;▲ $P < 0.05$,与中剂量组相比。

2.5 各组小鼠肺组织 PI3K-AKT-NFκB 蛋白表达量比较

模型组小鼠肺组织中 p-p65/p65、p-IκBα、p-AKT/AKT 及 p-PI3K 蛋白表达量高于对照组 ($P < 0.05$);槲皮素低、中、高剂量组小鼠肺组织 p-p65/p65、p-IκBα、p-AKT/AKT 及 p-PI3K 蛋白表达量低于模型组 ($P < 0.05$),且槲皮素高剂量组 < 中剂量组 < 低剂量组 ($P < 0.05$)。见图 2 及表 4。

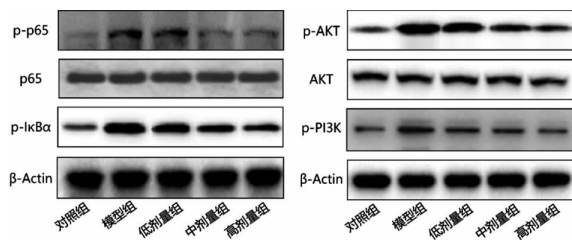


图 2 肺组织 PI3K-AKT-NFκB 蛋白表达电泳图

表 4 各组大鼠 PI3K-AKT-NFκB 蛋白表达量比较

组别	p-p65/p65	p-IκBα	p-AKT/AKT	p-PI3K
对照组 (n=8)	0.82 ± 0.05	0.47 ± 0.05	0.55 ± 0.08	0.66 ± 0.06
模型组 (n=8)	1.18 ± 0.04 *	1.07 ± 0.15 *	1.35 ± 0.12 *	0.88 ± 0.04 *
低剂量组 (n=8)	1.16 ± 0.04 #	0.82 ± 0.06 #	1.12 ± 0.45 #	0.71 ± 0.03 #
中剂量组 (n=8)	0.808 ± 0.10 #Δ	0.72 ± 0.05 #Δ	0.88 ± 0.08 #Δ	0.63 ± 0.05 #Δ
高剂量组 (n=8)	0.87 ± 0.05 #Δ▲	0.59 ± 0.08 #Δ▲	0.81 ± 0.03 #Δ▲	0.59 ± 0.03 #Δ▲

* $P < 0.05$,与对照组相比;# $P < 0.05$,与模型组相比;Δ $P < 0.05$,与低剂量组相比;▲ $P < 0.05$,与中剂量组相比。

3 讨论

有研究^[13]报道,炎症因子可引起肺泡-毛细血管屏障的肺通透性增加,进而导致动脉血氧合损伤及水肿。另有研究^[14-16]发现,许多天然类黄酮,如甘草查尔酮 A、千层纸素 A 和黄芪素均可通过抑制炎症细胞因子分泌缓解肺损伤。本研究发现,槲皮素预处理可减轻 I/R 肺损伤小鼠的肺泡壁增厚和炎性细胞浸润,并降低了肺湿/干重比($P < 0.05$),表明槲皮素对 LIRI 和水肿有保护作用。TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 是机体炎症反应的重要参与因子。TNF- α 主要由单核巨噬细胞和淋巴细胞激活、产生和释放,是一种强大的炎症介质。研究^[17]表明,TNF- α 可以增加肺泡毛细血管通透性,减少肺泡中液体的清除能力,与 IL-1 β 具有相似的作用。中性粒细胞是促炎性细胞因子的重要来源,中性粒细胞浸润是急性肺损伤的重要标志。本研究发现,模型组比较,槲皮素降低了 I/R 肺损伤小鼠炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 含量($P < 0.05$),表明槲皮素可能通过抑制炎症反应发挥抗急性肺损伤作用。

LIRI 与过度氧化应激有关。研究^[18]发现,过量 ROS 会导致脂质过氧化和其他有害的氧化反应,从而导致细胞死亡或凋亡。MDA 是脂质过氧化作用的最终产物,其含量反映了组织中脂质氧化的程度。本研究发现,与对照组相比,模型组小鼠肺组织中 MDA 含量增加($P < 0.05$),表明 LIRI 脂质过氧化增强;但与模型组比较,槲皮素组小鼠组织 MDA 含量降低($P < 0.05$),表明槲皮素可以缓解脂质过氧化。SOD 是肺组织中主要的内源性抗氧化剂,各种内源性抗氧化剂(如过氧化氢酶,GSHPx 等)和非酶性抗氧化剂(如维生素 C,维生素 E 等)共同构成了抗氧化剂系统,可以清除氧自由基并保持体内平衡^[19]。因此,SOD 可反映抗氧化程度。另外,组织 MPO 活性是嗜中性粒细胞浸润的关键指标^[6]。本研究发现,槲皮素升高了急性肺损伤小鼠组织 SOD 含量和 MPO 活性($P < 0.05$),表明槲皮素对 LIRI 有预防作用,可能与提高抗氧化酶和减少氧化应激密切相关。

NF- κ B 信号既是调节炎症因子(IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6)释放的重要通路,也是炎症因子表达的重要转录因子^[20]。病理条件下,NF- κ B 信号通路激活,IKK 活化,进而促进 I κ B α 磷酸化降解,引起 p65 磷酸化,调节炎症因子的转录表达。有研究^[21]报道,阻断 NF- κ B 信号通路可以发挥抗炎和抗氧化作

用,并缓解 LIRI。此外,PI3K/AKT 途径与细胞存活、增殖和氧化应激密切相关,但 PI3K/Akt 途径对 LIRI 的具体作用不清楚^[22],可能与 PI3K/AKT 信号通过降解 I κ B α 激活 NF- κ B 信号通路有关^[23]。本研究发现,与对照组相比,模型组小鼠肺组织 p-PI3K、p-AKT 和 p-p65 表达升高($P < 0.05$),表明 PI3K/Akt 介导的 NF- κ B 信号通路与急性肺损伤的病理变化密切相关^[24]。槲皮素组小鼠肺组织 p-PI3K、p-Akt 和 p-p65 的表达降低($P < 0.05$),表明槲皮素可以抑制 PI3K-AKT-NF- κ B 信号通路发挥抗急性肺损伤作用。

综上,槲皮素能有效改善小鼠 LIRI,机制可能与抑制 PI3K-AKT-NF κ B 信号通路有关,其具体机制及对 PI3K-AKT-NF- κ B 途径的调节是直接作用还是间接仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Beckers P, Gielis J, Van Schil P, et al. Lung ischemia reperfusion injury: the therapeutic role of dipeptidyl peptidase 4 inhibition[J]. *Ann Transl Med*, 2017, 5(6): 129.
- [2] Saito M, Chen-Yoshikawa T, Suetsugu K, et al. Pirfenidone alleviates lung ischemia-reperfusion injury in a rat model[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2019, 158(1): 289 - 296.
- [3] Ovechkin AV, Lominadze D, Sedoris KC, et al. Lung ischemia-reperfusion injury: Implications of oxidative stress and platelet-arteriolar wall interactions[J]. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 2007, 113(1): 1 - 12.
- [4] Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 585(2-3): 325 - 337.
- [5] Borska S, Gebarowska E, Wysocka T, et al. The effects of quercetin vs cisplatin on proliferation and the apoptotic process in A549 and SW1271 cell lines in vitro conditions[J]. *Folia Morphol*, 2004, 63(1): 103 - 105.
- [6] Park HK, Kim SJ, Kwon do Y, et al. Protective effect of quercetin against paraquat-induced lung injury in rats[J]. *Life Sci*, 2010, 87(5): 181 - 186.
- [7] Yang T, Luo F, Shen Y, et al. Quercetin attenuates airway inflammation and mucus production induced by cigarette smoke in rats[J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 13(1): 73 - 81.
- [8] Li N, Li Q, Zhou XD, et al. The effect of quercetin on human neutrophil elastase-induced mucin5AC expression in human airway epithelial cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(2): 195 - 201.
- [9] Li Y, Yao J, Han C, et al. Quercetin, inflammation and immunity[J]. *Nutrients*, 2016, 8(3): 167.
- [10] Silva Araújo NP, Matos NA, Leticia Antunes Mota S, et al. Quercetin Attenuates Acute Lung Injury Caused by Cigarette Smoke Both In Vitro and In Vivo[J]. *COPD*, 2020, 17(2): 205 - 214.

(下转第 825 页)