

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2023.12.002

❖ 基础研究 ❖

# 芒柄花素调节 Nrf2/HO-1 信号通路对急性肺栓塞大鼠肺组织损伤的影响

赵博韬<sup>1</sup>, 毛宏宇<sup>1</sup>, 姚春霞<sup>2</sup>, 吴清华<sup>1</sup>

(1. 沧州市中心医院心内科, 河北 沧州 062450; 2. 河北工程大学医学院, 河北 邯郸 056000)

**【摘要】目的:** 探究芒柄花素(FN)调节核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶-1(Nrf2/HO-1)信号通路对急性肺栓塞(APE)大鼠肺组织损伤的影响。**方法:** 将 SD 大鼠采用随机数字表法分为对照组(Control 组)、APE 模型组(APE 组)、低分子肝素钙组(LMWH 组)、低剂量 FN 组(L-FN 组)、高剂量 FN 组(H-FN 组)、Nrf2 抑制剂 Brusatol 组(BR 组)、高剂量 FN + Brusatol 组(H-FN + BR 组), 每组各 12 只。APE 模型采用自体血栓回输法构建。以相应药物或生理盐水干预 7 d 后, 检测动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>)、氧合指数(OI)和血清 B 型脑钠肽(BNP)、肌钙蛋白 I(Tn I)、缺血修饰性白蛋白(IMA)水平; HE 染色检测肺组织病理; ELISA 法测定血清白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)水平; 试剂盒测定肺组织超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平; Western blot 检测肺组织 Nrf2、HO-1、核因子 κB(NF-κB)、p-NF-κB 蛋白水平。**结果:** 与 Control 组比较, APE 组大鼠肺组织结构紊乱, 肺泡破裂融合, 有渗液, 间质区水肿且大量炎性细胞浸润, PaO<sub>2</sub>、OI 和肺组织 SOD、Nrf2、HO-1 水平降低, 血清 BNP、Tn I、IMA、IL-6、TNF-α 水平和肺组织 MDA、p-NF-κB/NF-κB 水平升高(P < 0.05); 与 APE 组比较, LMWH 组、L-FN 组和 H-FN 组大鼠肺组织病变减轻, PaO<sub>2</sub>、OI 和肺组织 SOD、Nrf2、HO-1 水平升高但 L-FN 组在 3 组中最低(P < 0.05), 血清 BNP、Tn I、IMA、IL-6、TNF-α 水平和肺组织 MDA、p-NF-κB/NF-κB 降低但 L-FN 组在 3 组中最高(P < 0.05), BR 组与上述指标水平变化相反(P < 0.05); 与 H-FN 组比较, H-FN + BR 组大鼠肺组织病理变化加重, 炎性细胞增多, PaO<sub>2</sub>、OI 和肺组织 SOD、Nrf2、HO-1 水平降低, 血清 BNP、Tn I、IMA、IL-6、TNF-α 水平和肺组织 MDA、p-NF-κB/NF-κB 升高(P < 0.05)。**结论:** FN 可能通过激活 Nrf2/HO-1 通路, 减轻 APE 大鼠肺组织损伤。

**【关键词】** 芒柄花素; 核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶-1; 急性肺栓塞; 肺损伤

**【中图分类号】** R563.5 **【文献标志码】** A

## Influence of formononetin on lung tissue damage in rats with acute pulmonary embolism by regulating Nrf2/HO-1 signaling pathway

ZHAO Bo-tao<sup>1</sup>, MAO Hong-yu<sup>1</sup>, YAO Chun-xia<sup>2</sup>, WU Qing-hua<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 062450; 2. Medical College, Hebei University of Engineering, Handan 056000, Hebei, China)

**【Abstract】Objective:** To investigate the influence of formononetin (FN) on lung tissue damage in rats with acute pulmonary embolism (APE) by regulating nuclear factor E2-related factor 2/heme oxygenase-1 (Nrf2/HO-1) signaling pathway. **Methods:** SD rats were randomly divided into control group, APE model group (APE group), low molecular weight heparin calcium group (LMWH group), low-dose FN group (L-FN group), high-dose FN group (H-FN group), Nrf2 inhibitor Brusatol group (BR group), and high-dose FN + Brusatol group (H-FN + BR group) using a random number table method, 12 cases in each group. APE model was constructed by autothrombus transfusion. After 7 days of intervention with corresponding drugs or physiological saline, arterial partial pressure of oxygen (PaO<sub>2</sub>), oxygenation index (OI) and the serum levels of B-type natriuretic peptide (BNP), troponin I (Tn I), ischemia-modified albumin (IMA) were measured, lung tissue pathology was detected by HE staining, the levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor (TNF)-α in serum were determined by ELISA, kits were used to measure the levels of superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) in lung tissue, Western blot was applied to detect the protein levels of Nrf2, HO-1, NF-κB, and p-NF-κB in lung tissue. **Results:** Compared with the control group, the lung tissue structure of the APE group was disordered, the alveoli were ruptured and fused, with exudate, the interstitial area was edema and a large number of inflammatory cells were infiltrated, the levels of PaO<sub>2</sub>, OI and SOD, Nrf2, HO-1 in lung tissue were decreased, the serum levels of BNP, Tn I, IMA, IL-6, TNF-α, and MDA, p-

**基金项目:** 河北省自然科学基金资助项目(H2020402004); 河北省沧州市科技局科技研究与发展指导计划(172302180)

**作者简介:** 赵博韬(1983-), 男, 硕士, 主治医师。E-mail: vtjmrw@163.com

**通讯作者:** 吴清华。E-mail: qiaod0430961@163.com

NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B in lung tissue were increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the APE group, the lung tissue lesions of the LMWH group, L-FN group and H-FN group were alleviated, the levels of PaO<sub>2</sub>, OI and SOD, Nrf2, HO-1 in lung tissue were increased, and the L-FN group was the lowest among the groups ( $P < 0.05$ ). The serum levels of BNP, Tn I, IMA, IL-6, TNF- $\alpha$ , and MDA, p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B in lung tissue were decreased, and the L-FN group was the highest among the groups ( $P < 0.05$ ), the above indexes in BR group showed reverse changes ( $P < 0.05$ ). Compared with the H-FN group, the pathological changes of the lung tissue of the H-FN + BR group were aggravated, the inflammatory cells increased, the levels of PaO<sub>2</sub>, OI and SOD, Nrf2, HO-1 in lung tissue were decreased, the serum levels of BNP, Tn I, IMA, IL-6, TNF- $\alpha$ , and MDA, p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B in lung tissue were increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** FN may alleviate lung tissue damage in APE rats by activating the Nrf2/HO-1 pathway.

**[Key words]** Formononetin; Nuclear factor E2-related factor 2/heme oxygenase-1; Acute pulmonary embolism; Lung damage

急性肺栓塞(acute pulmonary embolism, APE)是以各种栓子堵塞肺动脉而引起呼吸功能和肺循环功能障碍,其病情凶险且病死率高<sup>[1]</sup>。栓子堵塞肺动脉可阻碍血液引起氧化应激损伤,导致肺动脉高压;并且栓子可刺激血管内皮,引起炎症反应进一步加重疾病<sup>[2-3]</sup>。目前,APE的治疗以抗凝、溶栓等为主,但会增加出血风险,因此仍需探索新型有效的治疗药物。

芒柄花素(formononetin, FN)是一种在黄芪、鸡血藤及红车轴草中普遍存在的异黄酮类化合物,具有抗炎、抗菌和抗氧化特性<sup>[4]</sup>。芒柄花素对急性肺损伤具有保护作用<sup>[5]</sup>;还可通过抑制大鼠肺血管重构减轻肺动脉高压<sup>[6]</sup>。然而, FN对 APE的治疗作用及其可能的机制尚不清楚。核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)/血红素加氧酶 1(heme oxygenase-1, HO-1)通路是抗氧化应激的关键信号通路,并且能够调控核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)表达与活化参与炎症反应过程<sup>[7-8]</sup>。研究<sup>[9]</sup>发现, Nrf2 是 FN 诱导 HO-1 表达的上游信号调节因子,当 Nrf2 沉默时, FN 诱导的 HO-1 水平提升被显著抑制, FN 通过激活 Nrf2/HO-1 途径发挥其抗炎和抗氧化作用,从而减轻小鼠高氧性急性肺损伤。但 FN 调控 Nrf2/HO-1 信号通路对 APE 大鼠肺组织损伤影响及作用机制尚未明确。因此,本实验通过构建 APE 大鼠模型,探究 FN 调控 Nrf2/HO-1 信号通路对 APE 大鼠肺组织损伤的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

从广东维通利华实验动物技术有限公司购入 100 只 SD 大鼠(SYXK(粤)2022-00683),雄性,体质量为(280 ± 10)g,大鼠适应性饲养 1 周。

### 1.2 试剂

芒柄花素(纯度 ≥ 99.0%, 47752)、Nrf2 抑制剂 Brusatol(纯度 ≥ 95.0%, SML1868)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;低分子肝素钙注射液购自深圳赛保尔生物药业有限公司;B 型脑钠肽(BNP)(ml028489)、肌钙蛋白 I(Tn I)(ml092662)、缺血修饰性白蛋白(IMA)(ml001923)检测试剂盒均购自上海酶联生

物科技有限公司;白细胞介素 6(IL-6)(PI328)、肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )(PT516)检测酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)(799594)、丙二醛(MDA)(D799762)检测试剂盒均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;兔源一抗 Nrf2 抗体(ab31163)、HO-1 抗体(ab68477)、NF- $\kappa$ B 抗体(ab16502)、p-NF- $\kappa$ B 抗体(ab76302)均购自英国 Abcam 公司。

### 1.3 主要仪器

ABL90 血气分析仪(丹麦雷度米特医疗设备有限公司);ELx808 酶标仪(美国 Lonza 公司);BX51 电动显微镜(日本 Olympus 公司)。

### 1.4 方法

1.4.1 模型建立 大鼠采用颈静脉回输自体血栓栓子建立 APE 模型<sup>[10]</sup>。经大鼠自身眼眶静脉取血 0.5 mL,待凝血后将凝块分割成 0.5 × 2 mm<sup>2</sup> 大小的血栓栓子 20 个左右,吸入 2 mL 无菌注射器内,生理盐水补足至 2 mL 制成血栓悬液备用。50 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,于颈部右侧做一约 1 cm 的纵行切口,游离颈静脉后,经右侧颈总静脉迅速注入血栓悬液(约 20 个栓子),消毒并缝合。术后 2 h 内大鼠有发绀,呼吸加快、加深的症状出现表示成功建立 APE 模型。

1.4.2 实验分组与给药 88 只大鼠建立 APE 模型,共造模成功 72 只,随机分为 APE 组、低分子肝素钙组(LMWH 组)、低剂量 FN 组(L-FN 组)、高剂量 FN 组(H-FN 组)、Nrf2 抑制剂 Brusatol 组(BR 组)、高剂量 FN + Brusatol 组(H-FN + BR 组),每组各 12 只;另取 12 只大鼠作为对照组(Control 组),仅分离颈静脉,不注射血栓悬液。造模后,L-FN 组和 H-FN 组大鼠分别以 30 mg/kg、60 mg/kg 剂量腹腔注射 FN 溶液,LMWH 组造模后立即腹腔注射低分子肝素钙注射液(0.01 mL/kg)<sup>[9]</sup>,BR 组大鼠腹腔注射 2 mg/kg 剂量<sup>[11]</sup> Brusatol,H-FN + BR 组大鼠腹腔注射 60 mg/kg FN 溶液和 2 mg/kg Brusatol,Control 组和 APE 组大鼠腹腔注射同量生理盐水;1 次/d,连续给药 7 d。

## 1.5 观察指标

### 1.5.1 动脉血氧分压 (PaO<sub>2</sub>)、氧合指数 (OI) 检测

末次给药 16 h 后,将大鼠麻醉,剪开腹腔,暴露腹主动脉,采用普通负压管取血 2 mL 用于分离血清,并采用抗凝负压管经腹主动脉取大鼠血液 2 mL,血气分析仪测量动脉血氧分压 (PaO<sub>2</sub>),计算氧合指数 (OI)。OI = PaO<sub>2</sub>/吸入氧浓度 (氧浓度为 0.21)。

### 1.5.2 BNP、Tn I、IMA 水平检测

将普通负压管中的血液离心 (3 000 r/min, 10 min),取上层血清。采用 ELISA 法测定 BNP、Tn I、IMA 水平,按试剂盒操作步骤进行。

### 1.5.3 肺组织病理检查

取多聚甲醛固定的肺组织经脱水、透明、浸蜡、包埋及切片制作石蜡切片,切片厚度在 4~6 μm,制作好的切片再经脱蜡、水化、浸染、分化、返蓝等步骤进行 HE 染色,再分别浸泡于 70%、80%、90% 以及 100% 梯度酒精 1 min,二甲苯浸泡 5 min,中性树胶封片,在光学显微镜下进行观察。

### 1.5.4 血清中炎症因子检测

采用 ELISA 法测定血清 IL-6、TNF-α 水平,按说明书严格操作。制备标准品并绘制标准曲线,取血清置于冰上备用,每孔加入样品 100 μL,37 °C 孵育 2 h,加入炎性抗体于检测孔中,孵育、洗板、显色,于 450 nm 处使用酶标仪测定吸光度值,计算各组大鼠 IL-6、TNF-α 水平。

### 1.5.5 肺组织氧化应激指标检测

肺组织匀浆后,3 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液于 96 孔板中,酶标仪中测定吸光度值 (检测波长 450 nm),计算各组大鼠 SOD、MDA 水平,操作步骤严格按照说明书进行。

### 1.5.6 Western blot 法检测 Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白水平

Western blot 检测 Nrf2、HO-1、NF-κB、p-NF-κB 蛋白水平,肺组织匀浆后,提取总蛋白。按照试剂盒操作步骤通过 Tris-甘氨酸 SDS-PAGE 分离蛋白质并转移到硝酸纤维素膜上,经 4 °C 封闭过夜,然后将硝酸纤维素膜有蛋白一面置于一抗 Nrf2、HO-1、NF-κB、p-NF-κB 稀释液 (稀释比例 1:1 000) 中孵育过夜,取硝酸纤维膜洗净一抗后常温下二抗孵育 1 h, TBST 洗脱 4 次。滴加 ECT 显影液检测蛋白质印迹,分析目标蛋白灰度值。

## 1.6 统计学分析

采用 SPSS26.0 软件用于进行数据统计分析。计量资料表示为 ( $\bar{x} \pm s$ ),多组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠动脉血 PaO<sub>2</sub>、OI 比较

与 Control 组比较,APE 组大鼠动脉血 PaO<sub>2</sub>、OI

降低 ( $P < 0.05$ )。与 APE 组比较,LMWH 组、L-FN 组和 H-FN 组大鼠动脉血 PaO<sub>2</sub>、OI 升高 ( $P < 0.05$ ),BR 组大鼠动脉血 PaO<sub>2</sub>、OI 降低 ( $P < 0.05$ );与 L-FN 组比较,LMWH 组和 H-FN 组大鼠动脉血 PaO<sub>2</sub>、OI 升高 ( $P < 0.05$ );与 H-FN 组比较,H-FN + BR 组大鼠动脉血 PaO<sub>2</sub>、OI 降低 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 各组大鼠动脉血 PaO<sub>2</sub>、OI 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	PaO <sub>2</sub> (mm/Hg)	OI
Control 组 (n = 12)	94.17 ± 9.25	442.62 ± 43.86
APE 组 (n = 12)	55.36 ± 4.77*	264.00 ± 23.54*
LMWH 组 (n = 12)	85.50 ± 8.12 <sup>#</sup> Δ	403.29 ± 37.65 <sup>#</sup> Δ
L-FN 组 (n = 12)	67.38 ± 7.04 <sup>#</sup>	320.57 ± 29.78 <sup>#</sup>
H-FN 组 (n = 12)	82.94 ± 7.89 <sup>#</sup> Δ	394.95 ± 41.52 <sup>#</sup> Δ
BR 组 (n = 12)	43.59 ± 4.46 <sup>#</sup>	204.38 ± 24.17 <sup>#</sup>
H-FN + BR 组 (n = 12)	58.61 ± 6.21 <sup>▲</sup>	279.10 ± 28.03 <sup>▲</sup>
F 值	82.875	80.149
P 值	<0.001	<0.001

\*  $P < 0.05$ ,与 Control 组比较;#  $P < 0.05$ ,与 APE 组比较;Δ  $P < 0.05$ ,与 L-FN 组比较;▲  $P < 0.05$ ,与 H-FN 组比较。

### 2.2 各组大鼠 BNP、Tn I、IMA 水平比较

与 Control 组比较,APE 组大鼠 BNP、Tn I、IMA 水平升高 ( $P < 0.05$ );与 APE 组比较,LMWH 组、L-FN 组和 H-FN 组大鼠 BNP、Tn I、IMA 水平降低 ( $P < 0.05$ ),BR 组 BNP、Tn I、IMA 水平升高 ( $P < 0.05$ );与 L-FN 组比较,LMWH 组和 H-FN 组大鼠 BNP、Tn I、IMA 水平降低 ( $P < 0.05$ );与 H-FN 组比较,H-FN + BR 组大鼠 BNP、Tn I、IMA 水平升高 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组大鼠 BNP、Tn I、IMA 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	BNP (U/mL)	Tn I (ng/mL)	IMA (ng/mL)
Control 组 (n = 12)	42.33 ± 6.08	0.18 ± 0.02	0.50 ± 0.06
APE 组 (n = 12)	86.17 ± 9.05*	0.86 ± 0.09*	2.48 ± 0.27*
LMWH 组 (n = 12)	53.20 ± 5.19 <sup>#</sup> Δ	0.25 ± 0.04 <sup>#</sup> Δ	0.67 ± 0.09 <sup>#</sup> Δ
L-FN 组 (n = 12)	72.46 ± 6.97 <sup>#</sup>	0.54 ± 0.06 <sup>#</sup>	1.34 ± 0.15 <sup>#</sup>
H-FN 组 (n = 12)	56.18 ± 6.84 <sup>#</sup> Δ	0.29 ± 0.03 <sup>#</sup> Δ	0.71 ± 0.08 <sup>#</sup> Δ
BR 组 (n = 12)	110.35 ± 10.26 <sup>#</sup>	1.13 ± 0.08 <sup>#</sup>	2.96 ± 0.25 <sup>#</sup>
H-FN + BR 组 (n = 12)	78.25 ± 7.01 <sup>▲</sup>	0.56 ± 0.05 <sup>▲</sup>	1.43 ± 0.22 <sup>▲</sup>
F 值	112.938	433.089	337.615
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

\*  $P < 0.05$ ,与 Control 组比较;#  $P < 0.05$ ,与 APE 组比较;Δ  $P < 0.05$ ,与 L-FN 组比较;▲  $P < 0.05$ ,与 H-FN 组比较。

### 2.3 各组大鼠肺组织病理变化比较

Control 组大鼠肺组织结构清晰完整;APE 组大鼠肺组织可观察到肺泡破裂,有渗液,间质水肿,并

伴有大量炎性细胞浸润;LMWH 组、L-FN 组和 H-FN 组肺组织病变减轻,LMWH 组和 H-FN 组病理变化改善更为明显;BR 组大鼠肺组织病变较 APE 组加

重,肺泡壁增厚进一步增厚,肺泡腔内可见大量炎症细胞浸润;H-FN + BR 组大鼠肺组织病变较 H-FN 组加重,炎性细胞增多。见图 1。

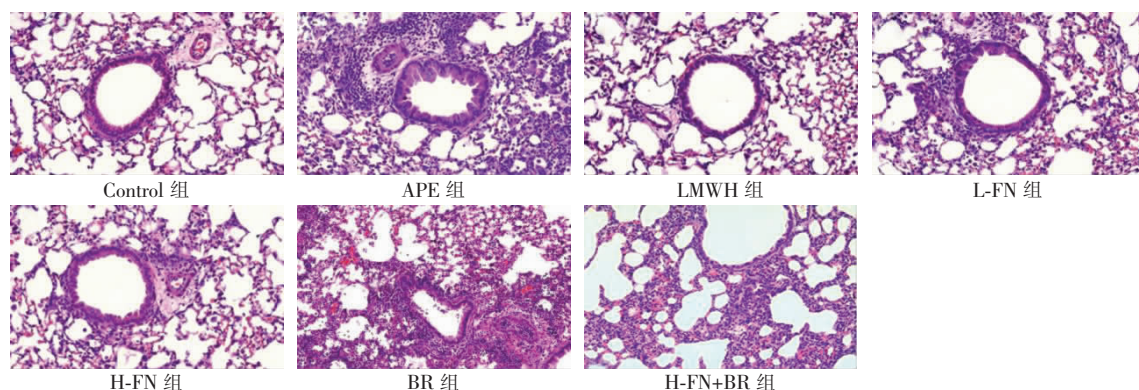


图 1 各组大鼠肺组织病理变化(HE 染色,200 $\times$ ,n=12)

## 2.4 各组大鼠血清炎性因子 IL-6、TNF- $\alpha$ 水平比较

与 Control 组比较,APE 组大鼠血清炎性因子 IL-6、TNF- $\alpha$  水平升高( $P < 0.05$ );与 APE 组比较,LMWH 组、L-FN 组和 H-FN 组大鼠血清炎性因子 IL-6、TNF- $\alpha$  水平降低( $P < 0.05$ ),BR 组大鼠血清炎性因子 IL-6、TNF- $\alpha$  水平升高( $P < 0.05$ );与 L-FN 组比较,LMWH 组和 H-FN 组大鼠血清炎性因子 IL-6、TNF- $\alpha$  水平降低( $P < 0.05$ );与 H-FN 组比较,H-FN + BR 组大鼠血清炎性因子 IL-6、TNF- $\alpha$  水平升高( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 各组大鼠血清炎性因子 IL-6、TNF- $\alpha$  水平比较( $\bar{x} \pm s$ ,ng/L)

组别	IL-6	TNF- $\alpha$
Control 组( $n = 12$ )	54.13 $\pm$ 5.73	42.47 $\pm$ 6.38
APE 组( $n = 12$ )	132.94 $\pm$ 14.07*	156.31 $\pm$ 15.21*
LMWH 组( $n = 12$ )	66.75 $\pm$ 8.12 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	70.64 $\pm$ 8.05 <sup>#<math>\Delta</math></sup>
L-FN 组( $n = 12$ )	114.28 $\pm$ 11.96 <sup>#</sup>	107.39 $\pm$ 11.42 <sup>#</sup>
H-FN 组( $n = 12$ )	71.52 $\pm$ 6.88 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	74.54 $\pm$ 7.25 <sup>#<math>\Delta</math></sup>
BR 组( $n = 12$ )	180.30 $\pm$ 15.27 <sup>#</sup>	212.09 $\pm$ 14.46 <sup>#</sup>
H-FN + BR 组( $n = 12$ )	118.36 $\pm$ 12.35 <sup>▲</sup>	113.62 $\pm$ 10.87 <sup>▲</sup>
F 值	190.647	329.667
P 值	< 0.001	< 0.001

\* $P < 0.05$ ,与 Control 组比较;# $P < 0.05$ ,与 APE 组比较; $\Delta P < 0.05$ ,与 L-FN 组比较;▲ $P < 0.05$ ,与 H-FN 组比较。

## 2.5 各组大鼠肺组织 SOD、MDA 水平比较

与 Control 组比较,APE 组大鼠肺组织 SOD 水平降低,MDA 水平升高( $P < 0.05$ );与 APE 组比较,LMWH 组、L-FN 组和 H-FN 组大鼠肺组织 SOD 水平升高,MDA 水平降低( $P < 0.05$ ),BR 组大鼠肺组织 SOD 水平降低,MDA 水平升高( $P < 0.05$ );与 L-FN

组比较,LMWH 组和 H-FN 组大鼠肺组织 SOD 水平升高,MDA 水平降低( $P < 0.05$ );与 H-FN 组比较,H-FN + BR 组大鼠肺组织 SOD 水平降低,MDA 水平升高( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 4 各组大鼠肺组织 SOD、MDA 水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	SOD(U/mg)	MDA(nmol/mg)
Control 组( $n = 12$ )	120.71 $\pm$ 10.48	4.16 $\pm$ 0.57
APE 组( $n = 12$ )	57.64 $\pm$ 6.32*	16.25 $\pm$ 1.38*
LMWH 组( $n = 12$ )	98.32 $\pm$ 10.41 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	6.08 $\pm$ 0.65 <sup>#<math>\Delta</math></sup>
L-FN 组( $n = 12$ )	71.56 $\pm$ 7.26 <sup>#</sup>	11.83 $\pm$ 1.52 <sup>#</sup>
H-FN 组( $n = 12$ )	92.05 $\pm$ 9.61 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	6.29 $\pm$ 0.71 <sup>#<math>\Delta</math></sup>
BR 组( $n = 12$ )	35.08 $\pm$ 5.23 <sup>#</sup>	29.60 $\pm$ 1.82 <sup>#</sup>
H-FN + BR 组( $n = 12$ )	65.38 $\pm$ 7.09 <sup>▲</sup>	11.31 $\pm$ 1.34 <sup>▲</sup>
F 值	142.320	605.202
P 值	< 0.001	< 0.001

\* $P < 0.05$ ,与 Control 组比较;# $P < 0.05$ ,与 APE 组比较; $\Delta P < 0.05$ ,与 L-FN 组比较;▲ $P < 0.05$ ,与 H-FN 组比较。

## 2.6 各组大鼠肺组织 Nrf2、HO-1、NF- $\kappa$ B、p-NF- $\kappa$ B 蛋白水平比较

与 Control 组比较,APE 组大鼠 Nrf2、HO-1 水平降低,p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 升高( $P < 0.05$ );与 APE 组比较,LMWH 组、L-FN 组和 H-FN 组大鼠 Nrf2、HO-1 水平升高,p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 降低( $P < 0.05$ ),BR 组大鼠 Nrf2、HO-1 水平降低,p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 升高( $P < 0.05$ );与 L-FN 组比较,LMWH 组和 H-FN 组大鼠 Nrf2、HO-1 水平升高,p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 降低( $P < 0.05$ );与 H-FN 组比较,H-FN + BR 组大鼠 Nrf2、HO-1 水平降低,p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 升高( $P < 0.05$ )。见图 2 及表 5。

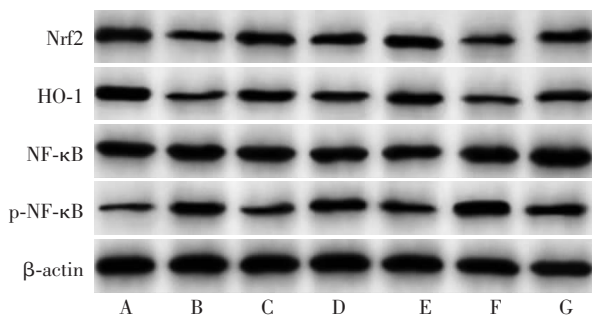


图 2 各组大鼠肺组织 Nrf2、HO-1、NF-κB、p-NF-κB 蛋白表达条带图

A. Control 组; B. APE 组; C. LMWH 组; D. L-FN 组; E. H-FN 组; F. BR 组; G. H-FN+BR 组。

表 5 各组大鼠肺组织 Nrf2、HO-1、p-NF-κB 蛋白水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Nrf2	HO-1	p-NF-κB/NF-κB
Control 组 (n=12)	0.91 ± 0.10	0.95 ± 0.09	0.12 ± 0.02
APE 组 (n=12)	0.24 ± 0.03 *	0.21 ± 0.02 *	0.68 ± 0.07 *
LMWH 组 (n=12)	0.83 ± 0.07 <sup>#Δ</sup>	0.67 ± 0.07 <sup>#Δ</sup>	0.25 ± 0.04 <sup>#Δ</sup>
L-FN 组 (n=12)	0.45 ± 0.06 <sup>#</sup>	0.36 ± 0.05 <sup>#</sup>	0.54 ± 0.06 <sup>#</sup>
H-FN 组 (n=12)	0.79 ± 0.09 <sup>#Δ</sup>	0.65 ± 0.08 <sup>#Δ</sup>	0.27 ± 0.04 <sup>#Δ</sup>
BR 组 (n=12)	0.13 ± 0.02 <sup>#</sup>	0.11 ± 0.02 <sup>#</sup>	0.85 ± 0.09 <sup>#</sup>
H-FN + BR 组 (n=12)	0.50 ± 0.06 <sup>▲</sup>	0.33 ± 0.05 <sup>▲</sup>	0.50 ± 0.06 <sup>▲</sup>
F 值	244.711	295.381	237.815
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

\*  $P < 0.05$ , 与 Control 组比较; #  $P < 0.05$ , 与 APE 组比较; Δ  $P < 0.05$ , 与 L-FN 组比较; ▲  $P < 0.05$ , 与 H-FN 组比较。

### 3 讨论

APE 常引起肺梗塞, 导致肺实质缺血、出血和最终坏死<sup>[12]</sup>。BNP 和 Tn I 是临床上 APE 常用的诊断指标, 能够有效预测肺血栓短期预后状况<sup>[13]</sup>。此外 APE 的发生发展与 IMA 水平升高密切相关<sup>[14]</sup>。对高危 APE 患者来说, 体内低氧血症会更加明显, 肺动脉压急剧增高, 血清中 BNP 的水平显著升高<sup>[15]</sup>。IMA 可用作评估 APE 严重程度的临床标志物。崔波等<sup>[16]</sup>研究发现, 在 APE 患者中 IMA 水平呈高水平表达。在本研究中, APE 大鼠肺组织可见肺泡破裂融合, 有渗液, 间质区水肿且大量炎性细胞浸润, PaO<sub>2</sub>、OI、SOD 水平降低, BNP、Tn I、IMA、IL-6、TNF-α、MDA 水平升高。由此可知, APE 不仅会引起机体 BNP、Tn I、IMA 升高, 还有诱导炎症反应和氧化应激, 损伤肺组织。

研究<sup>[17]</sup>表明, FN 能够通过激活 Nrf2/HO-1 信号传导, 抑制氧化应激以及炎症反应, 对甲氨蝶呤肾毒性大鼠发挥保护作用。Zhou 等<sup>[18]</sup>发现, 在深静脉血栓大鼠模型中, FN 可减少血栓形成并抑制促炎介质 IL-1β 和 IL-18 的分泌, 改善静脉血栓。此外,

胡志平等<sup>[19]</sup>研究显示, FN 可通过促进 Nrf2/HO-1 通路激活, 抑制氧化应激反应, 减轻脑外伤小鼠脑水肿并改善其行为障碍。以上研究表明 FN 具有显著的抗炎和抗氧化作用。在本研究中, 低、高剂量 FN 可降低 BNP、Tn I、IMA、IL-6、TNF-α、MDA 水平, 升高 SOD 水平, 减轻 APE 大鼠肺组织病变。这与既往的研究结果一致, 进一步证实了 FN 具有抗炎、抗氧化能力; 提示 FN 可抑制炎症和氧化应激, 改善 APE 大鼠肺组织损伤。

Nrf2 和 Kelch 样 ECH 相关蛋白 (Keap1) 在细胞质中以二聚体的形式结合, 当受到刺激时, Nrf2 会从 Keap1 上解离并转移到细胞核中, 从而诱导编码的相关酶 HO-1 的表达<sup>[20]</sup>。HO-1 是 Nrf2 的下游信号蛋白, 具有催化血红素降解作用, 其降解产物胆绿素具有较强的抗氧化活性, 因而 Nrf2/HO-1 信号通路表现出抗氧化能力<sup>[21]</sup>。Huang 等<sup>[22]</sup>的研究发现, 在 IL-13 刺激的人鼻上皮 JME/CF15 细胞中, FN 预处理可促进 Nrf2 的核移位, 抑制 IL-13 诱导的 JME/CF15 细胞中促炎性细胞因子的分泌。NF-κB 是一种由 p50/p65 二聚体形成的核转录因子, 研究发现在机体病理状态下能够诱导 NF-κB 磷酸化为 p-NF-κB p65, 其具有诱导炎性因子转录表达能力, 加重炎症反应。Hao 等<sup>[23]</sup>研究表明, FN 通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路, 抑制炎症和氧化应激, 防止顺铂诱导的急性肾损伤。在本研究中, APE 大鼠肺组织 Nrf2、HO-1 水平降低, p-NF-κB/NF-κB 升高, 提示 Nrf2/HO-1 信号通路表达受到抑制, NF-κB 通路激活; 且 Nrf2 抑制剂 Brusatol 可进一步抑制 Nrf2/HO-1 信号通路, 加重 APE 大鼠肺组织损伤, 表明 APE 大鼠肺损伤与 Nrf2/HO-1 信号通路的活化被抑制有关。给予 FN 处理后, APE 大鼠肺组织 Nrf2、HO-1 水平升高, p-NF-κB/NF-κB 降低, 提示 FN 可诱导 Nrf2/HO-1 信号通路激活, 抑制 NF-κB 磷酸化。为了进一步验证 FN 对 APE 大鼠肺损伤的保护机制, 本研究在 FN 处理的基础上采用 Nrf2 抑制剂 Brusatol 进行干预, 发现 Brusatol 可降低 APE 大鼠肺组织 Nrf2、HO-1 水平, 升高 NF-κB 磷酸化水平, 减弱 FN 对 APE 大鼠肺损伤的保护作用。由此可见, FN 可能通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路, 抑制 NF-κB 磷酸化, 保护 APE 大鼠肺组织损伤。

综上, FN 可通过抑制氧化应激和炎症反应减轻 APE 大鼠肺损伤, 改善大鼠肺功能, 其可能是通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路实现的。本研究表明 FN 可能是一种有前途的治疗 APE 的药物, 可能为 APE 的治疗提供新的选择和研究方向。在未来的研究中, 将采用体外细胞实验, 深入验证 FN 对 APE 发挥

保护作用的分子机制。此外,APE 的机制复杂, FN 是否能通过其他途径发挥保护作用仍需进一步研究。

## 参考文献

- [1] Giri J, Sista AK, Weinberg I, *et al.* Interventional therapies for acute pulmonary embolism: current status and principles for the development of novel evidence: a scientific statement from the American heart association [J]. *Circulation*, 2019, 140 ( 20 ): e774 - e801.
- [2] Sagcan G, Konukoglu D, Uzun H, *et al.* Importance of oxidative stress in the evaluation of acute pulmonary embolism severity[J]. *BMC Pulmonary Medicine*, 2022, 22(1): 382.
- [3] 蔡娟娟, 黄静, 苏玲玲, 等. 黄芩苷对血栓栓塞致急性肺栓塞大鼠 NF- $\kappa$ B 信号通路抑制作用的实验研究[J]. *中国中医药科技*, 2022, 29(3): 378 - 383.
- [4] Zhao L, Han J, Liu J, *et al.* A novel formononetin derivative promotes anti-ischemic effects on acute ischemic injury in mice[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 786464.
- [5] Ma Z, Ji W, Fu Q, *et al.* Formononetin inhibited the inflammation of LPS-induced acute lung injury in mice associated with induction of PPAR gamma expression [J]. *Inflammation*, 2013, 36 ( 6 ): 1560 - 1566.
- [6] Cai C, Xiang Y, Wu Y, *et al.* Formononetin attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension via inhibiting pulmonary vascular remodeling in rats[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2019, 20(6): 4984 - 4992.
- [7] Amata E, Pittalù V, Marrazzo A, *et al.* Role of the Nrf2/HO-1 axis in bronchopulmonary dysplasia and hyperoxic lung injuries [J]. *Clinical Science*, 2017, 131(14): 1701 - 1712.
- [8] 李颖异, 朱德钰, 李岩. Nrf2 信号通路在锰致 TM3 细胞氧化损伤中的作用[J]. *遵义医科大学学报*, 2021, 44(1): 70 - 82.
- [9] Chen Y, Wei D, Zhao J, *et al.* Reduction of hyperoxic acute lung injury in mice by Formononetin [J]. *PLoS One*, 2021, 16 ( 1 ): e0245050.
- [10] 李亚南, 闫凤, 宋兆华, 等. 姜黄素通过调控 NOTCH 相关因子表达降低急性肺栓塞模型大鼠血小板聚集[J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(3): 65 - 69.
- [11] 石俊杰, 宁改丽, 石一民. 藏红花素通过 Nrf2/HO-1 通路减轻大鼠肺缺血再灌注损伤的实验研究[J]. *中国中医急症*, 2022, 31(7): 1170 - 1173.
- [12] Kaptein FHJ, Kroft LJM, Hammerschlag G, *et al.* Pulmonary infarction in acute pulmonary embolism [J]. *Thrombosis Research*, 2021, 202: 162 - 169.
- [13] 苏振华. 血清 BNP、Tn I 及 Hcy 水平与急性肺栓塞患者病情严重程度及预后的关系[J]. *医学信息*, 2020, 33(5): 175 - 176.
- [14] 李小晴, 许启霞, 庞颖颖. 肺血栓栓塞症预后因素分析[J]. *中华全科医学*, 2017, 15(6): 1022 - 1026.
- [15] 庞颖颖, 刘海涛. 生物标志物与急性肺栓塞危险分层及预后的关联性研究[J]. *中华全科医学*, 2022, 20(2): 199 - 201, 281.
- [16] 崔波, 靳斐, 王莉格. IMA 与 SCUBE1 联合检测在急性肺栓塞诊断中的价值[J]. *安徽医学*, 2018, 39(6): 669 - 672.
- [17] Aladaileh SH, Hussein OE, Abukhalil MH, *et al.* Formononetin up-regulates Nrf2/HO-1 signaling and prevents oxidative stress, inflammation, and kidney injury in methotrexate-induced rats [J]. *Antioxidants*, 2019, 8(10): 430.
- [18] Zhou Z, Zhou H, Zou X, *et al.* Formononetin regulates endothelial nitric oxide synthase to protect vascular endothelium in deep vein thrombosis rats [J]. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2022, 36: 3946320221111117.
- [19] 胡志平, 马俊, 陈彦蓉, 等. 刺芒柄花素激活脑外伤小鼠 Nrf2/HO-1 通路减轻脑水肿并改善行为障碍[J]. *中国实验诊断学*, 2021, 25(6): 887 - 893.
- [20] Van Nguyen T, Piao CH, Fan YJ, *et al.* Anti-allergic rhinitis activity of  $\alpha$ -lipoic acid via balancing Th17/Treg expression and enhancing Nrf2/HO-1 pathway signaling [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 12528.
- [21] 高原, 于文慧, 张美君, 等. Nrf2/HO-1 信号通路对缺血再灌注损伤的研究进展[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2020, 26(4): 776 - 778.
- [22] Huang J, Chen X, Xie A. Formononetin ameliorates IL-13-induced inflammation and mucus formation in human nasal epithelial cells by activating the SIRT1/Nrf2 signaling pathway [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2021, 24(6): 832.
- [23] Hao Y, Miao J, Liu W, *et al.* Formononetin protects against cisplatin? induced acute kidney injury through activation of the PPAR $\alpha$ /Nrf2/HO? 1/NQO1 pathway [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2021, 47(2): 511 - 522.

(收稿日期: 2023 - 07 - 14

修回日期: 2023 - 08 - 04)