

• 论 著 •

鹰嘴豆芽素 A 对 LPS 诱导的肺泡上皮细胞氧化应激损伤的影响*

唐敏强, 黄 婕, 陈佳娣

南通市海门区人民医院/南通大学附属海门医院呼吸与危重医学科, 江苏南通 226100

摘要:目的 探讨鹰嘴豆芽素 A(BCA)调节核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)/血红素加氧酶 1(HO-1)信号通路对脂多糖(LPS)诱导的肺泡上皮细胞氧化应激损伤的影响。方法 将肺泡上皮细胞 BEAS-2B 分为 ctrl 组(正常培养的 BEAS-2B 细胞)、LPS 组(10 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的 LPS)、BCA 低剂量组(5 $\mu\text{mol/L}$ BCA)、BCA 中剂量组(10 $\mu\text{mol/L}$ BCA)、BCA 高剂量组(20 $\mu\text{mol/L}$ BCA)、抑制剂组(20 $\mu\text{mol/L}$ BCA + 5 $\mu\text{mol/L}$ Nrf2 抑制剂 ML385),除 ctrl 组外,其余组均给予 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS 刺激 24 h。采用 CCK-8 法检测细胞增殖,流式细胞仪检测细胞凋亡,DCFH-DA 荧光探针法检测细胞内活性氧(ROS)水平,分光光度法检测细胞上清液中超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)水平,试剂盒检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6 水平,免疫印迹法(Western blotting)检测细胞 Nrf2、HO-1、增殖细胞核抗原(PCNA)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、激活型半胱氨酸蛋白酶-3(cleaved caspase-3)/半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)蛋白表达。结果 与 ctrl 组比较,LPS 组 BEAS-2B 细胞的吸光度(A_{450})、SOD 活性、Nrf2、HO-1、PCNA 表达明显降低($P < 0.05$),细胞凋亡率、ROS 和 MDA 水平、TNF- α 、IL-6、Bax、cleaved caspase-3/caspase-3 表达明显上升($P < 0.05$);与 LPS 组比较,BCA 低、中、高剂量组 BEAS-2B 细胞的 A_{450} 、SOD 活性、Nrf2、HO-1、PCNA 表达显著升高($P < 0.05$),细胞凋亡率、ROS 和 MDA 水平、TNF- α 、IL-6、Bax、cleaved caspase-3/caspase-3 表达明显降低($P < 0.05$);BCA 高剂量处理细胞并加入 Nrf2 抑制剂 ML385 后,BCA 对 BEAS-2B 细胞增殖的促进作用减弱,细胞凋亡率、炎症反应和氧化应激损伤增强。结论 BCA 可通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路抑制 LPS 诱导的肺泡上皮细胞氧化应激损伤。

关键词: 鹰嘴豆芽素 A; 急性肺损伤; Nrf2/HO-1; 氧化应激; 肺泡上皮细胞; 脂多糖; 信号通路

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.10.009

中图法分类号:R285.5

文章编号:1673-4130(2023)10-1195-05

文献标志码:A

Effects of Biochanin A on oxidative stress injury of alveolar epithelial cells induced by LPS*

TANG Minqiang, HUANG Jie, CHEN Jiadi

Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Nantong Haimen People's Hospital, Nantong, Jiangsu 226100, China

Abstract: **Objective** To investigate the influence of Biochanin A (BCA) on lipopolysaccharide (LPS)-induced oxidative stress injury in alveolar epithelial cells by regulating nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase 1 (HO-1) signaling pathway. **Methods** Alveolar epithelial cells BEAS-2B were divided into control group (ctrl group, normally cultured BEAS-2B cells), LPS group (10 $\mu\text{g/mL}$ LPS), BCA low-dose group (5 $\mu\text{mol/L}$ BCA), BCA medium-dose group (10 $\mu\text{mol/L}$ BCA), BCA high-dose group (20 $\mu\text{mol/L}$ BCA) and inhibitor group (20 $\mu\text{mol/L}$ BCA + 5 $\mu\text{mol/L}$ Nrf2 inhibitor ML385), all groups except ctrl group were stimulated with 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS for 24 h. Cell proliferation was detected by CCK-8 method, cell apoptosis was detected by flow cytometry, intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were detected by DCFH-DA fluorescent probe method, and the activity of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) levels in the supernatant of cells were detected by spectrophotometry. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin (IL-6) expression were detected by the kit. The expressions of Nrf2, HO-1, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Bcl-2 associated X protein (Bax) and activated cleaved caspase-3/caspase-3 were detected by Western blotting. **Results** Compared with the ctrl group, the A_{450} , SOD activity, expressions of

* 基金项目:江苏省南通市卫生健康委员会科研课题(QA2021063)。

作者简介:唐敏强,男,医师,主要从事呼吸系统疾病研究。

Nrf2, HO-1, and PCNA of BEAS-2B cells in the LPS group significantly decreased ($P < 0.05$), while the apoptosis rate, levels of ROS and MDA, expressions of TNF- α , IL-6, Bax, cleaved caspase-3/caspase-3 significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the LPS group, the A_{450} value, SOD activity, expressions of Nrf2, HO-1, and PCNA of BEAS-2B cells in the BCA low, medium and high dose groups significantly increased ($P < 0.05$), the apoptosis rate, ROS and MDA level, expressions of TNF- α , IL-6, Bax, cleaved caspase-3/caspase-3 significantly decreased ($P < 0.05$). After high-dose treatment of cells with BCA and the addition of Nrf2 inhibitor ML385, the promoting effect of BCA on BEAS-2B cell proliferation was weakened, and the apoptosis rate, inflammatory response and oxidative stress damage of BEAS-2B cells were enhanced.

Conclusion BCA may inhibit LPS-induced oxidative stress injury of alveolar epithelial cells by activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway.

Key words: Biochanin A; acute lung injury; Nrf2/HO-1; oxidative stress; alveolar epithelial cells; lipopolysaccharide; signaling pathway

急性肺损伤(ALI)是肺部炎症性综合反应,其病理特征为严重的动脉低氧血症、肺水肿和肺内中性粒细胞聚集,严重的 ALI 患者可转为急性呼吸窘迫综合征(ARDS),ALI/ARDS 是导致急性呼吸衰竭的主要原因^[1]。ALI 的病理生理基础包括免疫细胞过度激活、氧化应激、炎症等,其发病率和死亡率均较高,严重威胁着人们的生命健康安全^[2]。尽管目前对于 ALI/ARDS 的发生发展机制及治疗方法研究有明显的进展,但治疗带来的不良反应严重降低了患者的生存质量^[3]。因此,积极深入探索 ALI/ARDS 的发病机制至关重要。鹰嘴豆芽素 A(BCA)是从鹰嘴豆中提取出的异黄酮的主要成分,具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗菌和神经保护等多种生物学活性^[4],其可通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路进而抑制炎症反应,缓解脂多糖(LPS)诱导的小鼠 ALI^[5]。核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)/血红素加氧酶 1(HO-1)是调节氧化应激的重要通路,山姜素可通过激活 PI3K/Nrf2/HO-1 信号通路,减少炎症和氧化应激反应来改善穿刺诱导的脓毒症大鼠的 ALI^[6]。但 BCA 通过调节 Nrf2/HO-1 信号通路对 LPS 诱导肺泡上皮细胞氧化应激损伤的影响尚不清楚。本研究旨在探讨 BCA 对 LPS 诱导肺泡上皮细胞氧化应激损伤的影响及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人肺泡上皮细胞 BEAS-2B 购自上海碧云天生物技术有限公司。BCA(纯度: HPLC $\geq 98\%$, 货号: PB3024)购自北京普非生物科技有限公司; LPS(货号: YT1319)购自北京伊塔生物科技有限公司; Nrf2 的抑制剂 ML385(货号: S86700)购自上海源叶生物科技有限公司; DCFH-DA 活性氧 ROS 荧光探针(货号: D6470)、SOD 活性检测试剂盒(货号: BC0170)、MDA 水平检测试剂盒(货号: BC0020)、IL-6 的 ELISA 试剂盒(货号: SEKR-0013)、TNF- α 的

ELISA 试剂盒(货号: SEKR-0047)均购自北京索莱宝科技有限公司; 兔源一抗 Nrf2(货号: ab137500)、HO-1(货号: ab13248)、PCNA(货号: ab265585)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)(货号: ab53154)、caspase-3(货号: ab4051)、cleaved caspase-3(货号: ab2302)以及辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗(货号: ab288151)均购自美国 Abcam 公司。

1.2 细胞培养 将 BEAS-2B 细胞置于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青-链霉素的 RPMI 1640 培养基中,在 37 °C、5% CO₂ 的稳定环境下常规培养,定期观察,每 1~2 天更换一次培养基,当细胞融合度达到 85% 以上时,消化、传代培养,收集对数期的细胞进行实验。

1.3 LPS 诱导与分组 将对数生长期的 BEAS-2B 细胞分为 ctrl 组、LPS 组、BCA 低剂量组、BCA 中剂量组、BCA 高剂量组、抑制剂组,除 ctrl 组外,其余各组细胞给予 10 μ g/mL^[7] 的 LPS 刺激 24 h, BCA 低、中、高剂量组分别采用 5、10、20 μ mol/L^[8] 的 BCA 处理,抑制剂组^[9]采用 20 μ mol/L BCA 和 5 μ mol/L 的 Nrf2 的抑制剂 ML385 共同处理。

1.4 CCK-8 法检测细胞增殖 各组细胞以 1×10^4 个/孔接种到 96 孔板中。分别将细胞培养 24、48、72 h, 弃去细胞上清液,在指定的时间点向每个孔中加入含有 10 μ L CCK-8 溶液的 100 μ L 完全培养基。孵育 2 h 后,使用酶标仪检测其在 450 nm 处的吸光度(A_{450})。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 收集处理 48 h 的各组 BEAS-2B 细胞,以预冷的 PBS 洗涤 2 次,添加 100 μ L 结合缓冲液悬浮各组 BEAS-2B 细胞,再分别添加 Annexin V-FITC 和碘化丙啶(PI)染液 5 μ L,充分混匀,与室温下避光染色 15 min,使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.6 荧光探针法检测细胞内 ROS 水平 收集各组

细胞,按照说明书以活性氧荧光探针(DCFH-DA)重悬细胞,37℃下孵育 25 min 后,以对照组的荧光强度为阈值,在流式细胞仪上检测各组荧光强度。

1.7 试剂盒检测细胞上清液中 SOD 活性、MDA 及 TNF- α 、IL-6 水平 收集各组细胞上清液,按照 SOD、MDA、TNF- α 、IL-6 试剂盒说明书检测 SOD 活性、MDA 及 TNF- α 、IL-6 水平。

1.8 免疫印迹法(Western blotting)检测蛋白表达 利用 RIPA 裂解缓冲液提取 BEAS-2B 细胞总蛋白。采用电泳分离蛋白,100 V 恒压转移蛋白至 PVDF 膜上,用 5% 的脱脂牛奶封闭 2 h,将膜与一抗 Nrf2、HO-1、PCNA、Bax、caspase-3、cleaved caspase-3、GAPDH 在 4℃孵育过夜,再将膜与 HRP 偶联的羊抗兔二抗在室温下孵育 2 h,弃去液体,洗涤 3 次,加入 ECL 试剂显影,采用 Image J 软件评估蛋白的灰度值。

1.9 统计学处理 采用 GraphPad Prism 7.0 软件分析数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行多组间比较,进一步两组间的比较采用 SNK- q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 BEAS-2B 细胞增殖能力比较 与 ctrl 组比较,LPS 组 BEAS-2B 细胞的 A_{450} 降低($P < 0.05$);与 LPS 组比较,BCA 低、中、高剂量组 BEAS-2B 细胞的 A_{450} 升高($P < 0.05$);与 BCA 高剂量组比较,抑制剂组 BEAS-2B 细胞的 A_{450} 降低($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组 BEAS-2B 细胞 A_{450} 比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	24 h	48 h	72 h
ctrl 组	1.32 $\pm$ 0.14	1.46 $\pm$ 0.12	1.57 $\pm$ 0.13
LPS 组	0.51 $\pm$ 0.07 ^a	0.58 $\pm$ 0.06 ^a	0.63 $\pm$ 0.08 ^a
BCA 低剂量组	0.67 $\pm$ 0.05 ^b	0.75 $\pm$ 0.08 ^b	0.86 $\pm$ 0.06 ^b
BCA 中剂量组	0.83 $\pm$ 0.06 ^{bc}	0.96 $\pm$ 0.05 ^{bc}	1.05 $\pm$ 0.10 ^{bc}
BCA 高剂量组	1.14 $\pm$ 0.11 ^{bcd}	1.21 $\pm$ 0.13 ^{bcd}	1.26 $\pm$ 0.11 ^{bcd}
抑制剂组	0.95 $\pm$ 0.08 ^e	1.04 $\pm$ 0.11 ^e	1.03 $\pm$ 0.07 ^e

注:与 ctrl 组比较,^a $P < 0.05$;与 LPS 组比较,^b $P < 0.05$;与 BCA 低剂量组比较,^c $P < 0.05$;与 BCA 中剂量组比较,^d $P < 0.05$;与 BCA 高剂量组比较,^e $P < 0.05$ 。

2.2 各组细胞凋亡情况比较 各组细胞凋亡率如下:ctrl 组(5.64 $\pm$ 2.13)%、LPS 组(38.47 $\pm$ 3.24)%、BCA 低剂量组(31.72 $\pm$ 3.12)%、BCA 中剂量组(24.53 $\pm$ 2.21)%、BCA 高剂量组(11.86 $\pm$ 2.15)%、抑制剂组(27.35 $\pm$ 2.23)%。与 ctrl 组比较,LPS 组 BEAS-2B 细胞的凋亡率升高($P < 0.05$);与 LPS 组比较,BCA 低、中、高剂量组 BEAS-2B 细胞的凋亡率降低($P < 0.05$);与 BCA 高剂量组比较,抑制剂组 BEAS-2B 细胞的凋亡率升高($P < 0.05$)。

2.3 各组细胞氧化损伤情况比较 与 ctrl 组比较,LPS 组 BEAS-2B 细胞 ROS、MDA 水平升高,SOD 活性减弱($P < 0.05$);与 LPS 组比较,BCA 低、中、高剂量组 BEAS-2B 细胞 ROS、MDA 水平明显降低,SOD 活性显著增强($P < 0.05$);与 BCA 高剂量组比较,抑制剂组细胞 ROS、MDA 水平升高,SOD 活性减弱($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组 BEAS-2B 细胞 ROS、SOD 活性及 MDA 水平情况比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	相对荧光强度阈值	SOD(kU/L)	MDA(μ mol/L)
ctrl 组	8.73 $\pm$ 2.15	48.51 $\pm$ 4.23	1.18 $\pm$ 0.16
LPS 组	37.56 $\pm$ 3.23 ^a	15.63 $\pm$ 2.24 ^a	3.25 $\pm$ 0.23 ^a
BCA 低剂量组	28.96 $\pm$ 3.14 ^b	22.47 $\pm$ 2.13 ^b	2.37 $\pm$ 0.21 ^b
BCA 中剂量组	21.48 $\pm$ 2.21 ^{bc}	29.38 $\pm$ 2.25 ^{bc}	1.94 $\pm$ 0.14 ^{bc}
BCA 高剂量组	13.64 $\pm$ 2.12 ^{bcd}	37.86 $\pm$ 3.21 ^{bcd}	1.52 $\pm$ 0.12 ^{bcd}
抑制剂组	23.57 $\pm$ 2.13 ^e	26.75 $\pm$ 2.16 ^e	2.03 $\pm$ 0.24 ^e

注:与 ctrl 组比较,^a $P < 0.05$;与 LPS 组比较,^b $P < 0.05$;与 BCA 低剂量组比较,^c $P < 0.05$;与 BCA 中剂量组比较,^d $P < 0.05$;与 BCA 高剂量组比较,^e $P < 0.05$ 。

2.4 各组 BEAS-2B 细胞上清液 TNF- α 、IL-6 水平比较 与 ctrl 组比较,LPS 组 BEAS-2B 细胞的 TNF- α 、IL-6 表达水平明显升高($P < 0.05$);与 LPS 组比较,BCA 低、中、高剂量组 BEAS-2B 细胞的 TNF- α 、IL-6 表达显著降低($P < 0.05$);与 BCA 高剂量组比较,抑制剂组 BEAS-2B 细胞的 TNF- α 、IL-6 表达水平升高($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 各组 BEAS-2B 细胞上清液 TNF- α 、IL-6 比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	TNF- α (ng/L)	IL-6(ng/L)
ctrl 组	57.36 $\pm$ 5.54	13.78 $\pm$ 2.12
LPS 组	187.43 $\pm$ 15.32 ^a	52.36 $\pm$ 4.14 ^a
BCA 低剂量组	156.54 $\pm$ 12.34 ^b	45.63 $\pm$ 4.23 ^b
BCA 中剂量组	96.47 $\pm$ 11.26 ^{bc}	34.48 $\pm$ 3.24 ^{bc}
BCA 高剂量组	84.75 $\pm$ 8.42 ^{bcd}	19.76 $\pm$ 2.16 ^{bcd}
抑制剂组	123.48 $\pm$ 13.54 ^e	31.56 $\pm$ 3.21 ^e

注:与 ctrl 组比较,^a $P < 0.05$;与 LPS 组比较,^b $P < 0.05$;与 BCA 低剂量组比较,^c $P < 0.05$;与 BCA 中剂量组比较,^d $P < 0.05$;与 BCA 高剂量组比较,^e $P < 0.05$ 。

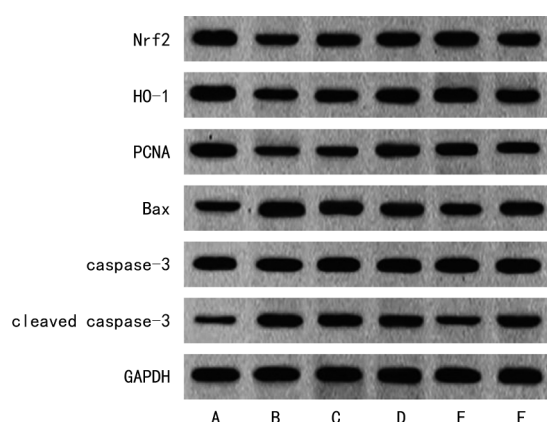
2.5 各组细胞蛋白表达水平比较 与 ctrl 组比较,LPS 组 BEAS-2B 细胞的 Nrf2、HO-1、PCNA 表达水平明显降低($P < 0.05$),Bax、cleaved caspase-3/caspase-3 表达明显升高($P < 0.05$);与 LPS 组比较,BCA 低、中、高剂量组 BEAS-2B 细胞的 Nrf2、HO-1、PCNA 表达水平显著升高($P < 0.05$),Bax、cleaved caspase-3/caspase-3 表达水平明显降低($P < 0.05$);与 BCA 高剂量组比较,抑制剂组 BEAS-2B 细胞的

Nrf2、HO-1、PCNA 表达水平降低 ($P < 0.05$), Bax、cleaved caspase-3/caspase-3 表达水平升高 ($P < 0.05$)。见图 1 和表 5。

表 5 各组 BEAS-2B 细胞蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Nrf2	HO-1	PCNA	Bax	cleaved caspase-3/caspase-3
ctrl 组	1.37 $\pm$ 0.14	1.54 $\pm$ 0.13	1.21 $\pm$ 0.11	0.52 $\pm$ 0.07	0.27 $\pm$ 0.05
LPS 组	0.48 $\pm$ 0.06 ^a	0.56 $\pm$ 0.08 ^a	0.42 $\pm$ 0.03 ^a	1.43 $\pm$ 0.12 ^a	0.93 $\pm$ 0.08 ^a
BCA 低剂量组	0.67 $\pm$ 0.04 ^b	0.74 $\pm$ 0.05 ^b	0.58 $\pm$ 0.05 ^b	1.18 $\pm$ 0.11 ^b	0.78 $\pm$ 0.06 ^b
BCA 中剂量组	0.89 $\pm$ 0.05 ^{bc}	0.95 $\pm$ 0.07 ^{bc}	0.76 $\pm$ 0.04 ^{bc}	0.84 $\pm$ 0.05 ^{bc}	0.64 $\pm$ 0.05 ^{bc}
BCA 高剂量组	1.14 $\pm$ 0.12 ^{bcd}	1.23 $\pm$ 0.14 ^{bcd}	0.93 $\pm$ 0.06 ^{bcd}	0.67 $\pm$ 0.03 ^{bcd}	0.42 $\pm$ 0.04 ^{bcd}
抑制剂组	0.73 $\pm$ 0.03 ^e	0.81 $\pm$ 0.06 ^e	0.64 $\pm$ 0.05 ^e	0.91 $\pm$ 0.04 ^e	0.59 $\pm$ 0.07 ^e

注:与 ctrl 组比较,^a $P < 0.05$;与 LPS 组比较,^b $P < 0.05$;与 BCA 低剂量组比较,^c $P < 0.05$;与 BCA 中剂量组比较,^d $P < 0.05$;与 BCA 高剂量组比较,^e $P < 0.05$ 。



注:A 为 ctrl 组;B 为 LPS 组;C 为 BCA 低剂量组;D 为 BCA 中剂量组;E 为 BCA 高剂量组;F 为抑制剂组。

图 1 Western blotting 检测 BEAS-2B 细胞蛋白表达水平

3 讨论

ALI/ARDS 是由非心源性的因素引起的弥漫性的肺损伤,其是导致重症监护室中急性呼吸衰竭的主要原因^[10]。虽然近年来在呼吸生理学方面的研究进展较快,但治疗带来的过敏反应、呼吸机相关性肺损伤等不良反应和局限性,使患者的生存率和生活质量仍得不到显著提高^[11]。因此,探寻新方法治疗 ALI/ARDS 具有重要的临床意义。肺泡上皮细胞在发生肺组织损伤时,能够参与到肺组织修复过程中,具有屏障保护作用^[12],LPS 是革兰阴性细菌细胞外壁的成分之一,内毒素所引起的 ALI 较难以控制,其所导致的 ARDS 是常见的肺部炎症综合征^[13]。本研究通过 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 刺激 BEAS-2B 细胞,结果发现,与 ctrl 组比较,LPS 组 BEAS-2B 细胞的 A_{450} 、PCNA 表达明显降低,细胞凋亡率、TNF- α 、IL-6、Bax、cleaved caspase-3/caspase-3 表达明显上升,提示 LPS 诱导可抑制肺泡上皮细胞增殖,促进其凋亡和炎症反应。氧化应激是在机体受到有害刺激时,体内高活性分子如 ROS 等产生过多,引起脂质过氧化,氧化系统和抗氧

化系统失衡,从而导致细胞损伤,引起呼吸系统疾病^[14]。SOD 是细胞内的抗氧化酶,可反映机体抗氧化损伤能力,而 MDA 是脂质过氧化产物,反映了 ROS 引起的破坏^[15]。本研究发现,与 ctrl 组比较,LPS 组 BEAS-2B 细胞的 SOD 活性明显降低,ROS 和 MDA 水平显著上升,提示 LPS 诱导可引起肺泡上皮细胞的氧化应激损伤。

BCA 别名鸡豆黄素 A,主要是从鹰嘴豆中提取出来的一种植物雌激素,属黄酮类化合物,其具有抗炎、抗肿瘤、抗病毒等活性,还是天然的抗氧化剂^[16]。有研究表明,BCA 可逆转异氟醚诱导的人神经母细胞瘤细胞 SOD 活性降低和 MDA 水平升高,增强细胞活力,抑制细胞凋亡,保护细胞免受异氟醚诱导的神经毒性^[17]。本研究发现,与 LPS 组比较,BCA 低、中、高剂量组 BEAS-2B 细胞的 A_{450} 、SOD 活性、PCNA 表达明显升高,细胞凋亡率、ROS 和 MDA 水平、TNF- α 、IL-6、Bax、cleaved caspase-3/caspase-3 表达明显降低,提示 BCA 可增强 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞增殖能力,抑制其凋亡能力、炎症反应和氧化应激。

Nrf2/HO-1 信号通路存在于哺乳动物细胞中,并参与调节细胞增殖、凋亡等,其还能调控炎症反应和氧化应激^[18-19]。相关研究表明,丙内酯可通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路抑制人支气管上皮细胞炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 表达,抑制细胞凋亡和氧化应激^[20]。本研究发现,与 ctrl 组比较,LPS 组 Nrf2、HO-1 表达明显降低,提示 Nrf2/HO-1 信号通路可能参与了 LPS 诱导的肺泡上皮细胞的氧化应激损伤。与 LPS 组比较,BCA 低、中、高剂量组 Nrf2、HO-1 表达升高,推测 BCA 可能通过激活 Nrf2/HO-1 途径抑制氧化应激损伤。为了验证该推测,本研究利用 Nrf2 的抑制剂 ML385 进行干预,结果发现,与 BCA 高剂量组比较,抑制剂组 BEAS-2B 细胞 A_{450} 、SOD 活性、Nrf2、HO-1、PCNA 表达明显降低,细胞凋亡率、ROS

和 MDA 水平、TNF- α 、IL-6、Bax、cleaved caspase-3/caspase-3 表达明显上升,表明 Nrf2 的抑制剂 ML385 减弱了 BCA 对 BEAS-2B 细胞增殖的促进作用,增强了细胞凋亡能力、炎症反应和氧化应激,提示 BCA 可以通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路抑制 BEAS-2B 细胞氧化应激损伤。

综上所述,BCA 可通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路抑制 LPS 诱导的肺泡上皮细胞的氧化应激损伤。该研究为开发新的治疗 ALI 的药物提供了理论基础。然而,本研究尚存在一定不足之处,仅仅在细胞水平上验证了 BCA 调控 Nrf2/HO-1 途径对 BEAS-2B 细胞增殖、凋亡、炎症和氧化应激反应的影响,后续将考虑在体内水平上进行进一步探索。

参考文献

- [1] XIAO K, HE W X, GUAN W, et al. Mesenchymal stem cells reverse EMT process through blocking the activation of NF- κ B and Hedgehog pathways in LPS-induced acute lung injury[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(10):863.
- [2] GUO Y X, LIU Y R, ZHAO S H, et al. Oxidative stress-induced FABP5 S-glutathionylation protects against acute lung injury by suppressing inflammation in macrophages[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1):7094.
- [3] BIAN S, CAI H F, CUI Y B, et al. Nanomedicine-based therapeutics to combat acute lung injury [J]. *Int J Nanomed*, 2021, 16(3):2247-2269.
- [4] ANDUGULAPATI S B, GOURISHETTI K, TIRUNAVALLI S K, et al. Biochanin-A ameliorates pulmonary fibrosis by suppressing the TGF- β mediated EMT, myofibroblasts differentiation and collagen deposition in in vitro and in vivo systems[J]. *Phytomedicine*, 2020, 78(11):153289.
- [5] HU X S, QIN H Y, LI Y P, et al. Biochanin A protect against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by regulating TLR4/NF- κ B and PPAR- γ pathway[J]. *Microb Pathog*, 2020, 138(7):103846.
- [6] 任辉邦, 张斌, 尹启超, 等. 山姜素通过 PI3K/Nrf2/HO-1 通路减少炎症和氧化应激反应改善盲肠结扎和穿刺诱导的脓毒症大鼠的急性肺损伤[J]. *免疫学杂志*, 2021, 37(7):575-583.
- [7] 亓水芹, 冯向功, 王慧琴. miR-194 靶向 FoxA1 基因对 LPS 诱导的肺泡上皮细胞损伤影响[J]. *免疫学杂志*, 2020, 36(3):193-200.
- [8] XUE Z H, WANG J Y, YU W C, et al. Biochanin A protects against PM_{2.5}-induced acute pulmonary cell injury by interacting with the target protein MEK5[J]. *Food Func*, 2019, 10(11):7188-7203.
- [9] HUANG C C, ZHANG C T, YANG P P, et al. Eldecalcitol inhibits lps-induced NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis in human gingival fibroblasts by activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14(11):4901-4913.
- [10] WEI X X, YI X M, LV H J, et al. MicroRNA-377-3p released by mesenchymal stem cell exosomes ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by targeting RPTOR to induce autophagy[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(8):657.
- [11] SHAH D, DAS P, ACHARYA S, et al. Small immunomodulatory molecules as potential therapeutics in experimental murine models of acute lung injury (ALI)/acute respiratory distress syndrome (ARDS)[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5):2573.
- [12] LIBERTI D C, KREMP M M, LIBERTI W A, et al. Alveolar epithelial cell fate is maintained in a spatially restricted manner to promote lung regeneration after acute injury[J]. *Cell Rep*, 2021, 35(6):109092.
- [13] LEE E H, MI H S, GI M, et al. Inhibition of Pendrin by a small molecule reduces lipopolysaccharide-induced acute lung injury[J]. *Theranostics*, 2020, 10(22):9913-9922.
- [14] GUAN R J, YAO H W, LI Z Y, et al. Sodium tanshinone II A sulfonate attenuates cigarette smoke extract-induced mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis in alveolar epithelial cells by enhancing SIRT1 pathway[J]. *Toxicol Sci*, 2021, 183(2):352-362.
- [15] WANG Z H, GU D M, SHENG L Z, et al. Protective effect of anthocyanin on paraquat-induced apoptosis and epithelial-mesenchymal transition in alveolar type II cells[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24(7):7980-7987.
- [16] 付龙生, 邹勇慧, 邵峰, 等. 鹰嘴豆芽素 A 干预 TXNIP-Wnt 通路改善 ox-LDL 诱导脑血管内皮细胞凋亡的机制研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2021, 41(18):1842-1846.
- [17] WU Q L, SHANG Y, SHEN T, et al. Biochanin A protects SH-SY5Y cells against isoflurane-induced neurotoxicity by suppressing oxidative stress and apoptosis[J]. *Neurotoxicology*, 2021, 86(9):10-18.
- [18] 刘建秋, 马莹, 王雪慧. 淫羊藿苷对慢性哮喘大鼠氧化应激及肺组织 Nrf2、HO-1 表达的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(12):2823-2826.
- [19] GAO Z M, SUI J D, FAN R, et al. Emodin protects against acute pancreatitis-associated lung injury by inhibiting NLRP3 inflammasome activation via Nrf2/HO-1 signaling[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14(5):1971-1982.
- [20] DANG X M, HE B B, NING Q, et al. Alantolactone suppresses inflammation, apoptosis and oxidative stress in cigarette smoke-induced human bronchial epithelial cells through activation of Nrf2/HO-1 and inhibition of the NF- κ B pathways[J]. *Respir Res*, 2020, 21(1):95.