

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20211027

· 论 著 ·

虎杖苷对小鼠芥子气肺损伤的保护作用

王雨润¹, 岑金凤², 孟文琪², 裴志鹏², 肖 凯², 谢 颖^{1*}, 孙铭学^{2*}

1. 湖南师范大学医学院分子流行病学湖南省重点实验室, 长沙 410000

2. 海军军医大学(第二军医大学)海军医学系防化医学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 明确虎杖苷对芥子气所致肺损伤的改善作用, 并初步探索其作用机制。**方法** 在存活率实验中, 将雄性ICR小鼠随机分为6组($n=15$): 对照组, 芥子气(40 mg/kg)组, 虎杖苷低、中、高剂量(100、200、400 mg/kg, 每天1次, 持续7 d)组, 以及阳性对照药(*N*-乙酰半胱氨酸 200 mg/kg, 每天1次, 持续7 d)组; 在存活率以外的实验中, 将雄性ICR小鼠随机分为4组($n=15$): 对照组、芥子气(30 mg/kg)组、虎杖苷中剂量(200 mg/kg, 每天1次, 持续5 d)组、阳性对照药(*N*-乙酰半胱氨酸 200 mg/kg, 每天1次, 持续5 d)组。皮下注射芥子气溶液建立小鼠芥子气肺损伤模型, 虎杖苷处理组与阳性对照药组灌胃给药。通过存活率实验初步评价虎杖苷对芥子气致肺损伤的作用效果, 确定虎杖苷最佳给药剂量; 通过肺组织切片评价虎杖苷对芥子气致肺损伤的改善作用; 通过ELISA法检测超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、髓过氧化物酶(MPO)、丙二醛(MDA)和过氧化氢等氧化应激指标及IL-1 β 、IL-6和TNF- α 等炎症反应指标的变化; 通过蛋白质印迹法考察沉默信息调节因子1(SIRT1)、核因子E2相关因子2(Nrf2)、血红素加氧酶1(HO-1)和NAD(P)H: 醌氧化还原酶1(NQO1)等氧化应激关键蛋白及Toll样受体4(TLR4)、NF- κ B p65等炎症关键蛋白的表达水平。**结果** 与芥子气组相比, 虎杖苷中、高剂量组小鼠的存活率升高, 其中虎杖苷中剂量组效果更显著($P<0.01$)。虎杖苷中剂量干预可以升高染毒小鼠肺组织中SOD活性、GSH含量, 降低染毒小鼠肺组织中MPO活性、MDA含量、过氧化氢含量及IL-1 β 、IL-6和TNF- α 等炎症因子的水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 提升染毒小鼠肺组织中SIRT1蛋白的表达, 促进Nrf2的核转移, 提升HO-1、NQO1蛋白的表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 降低染毒小鼠肺组织中TLR4、NF- κ B p65总蛋白及磷酸化NF- κ B p65蛋白的表达($P<0.01$)。**结论** 虎杖苷可能通过调控SIRT1/Nrf2和TLR4/NF- κ B通路抑制芥子气诱导的氧化应激和炎症反应, 从而改善芥子气导致的小鼠肺损伤。

[关键词] 芥子气; 虎杖苷; 氧化性应激; 炎症反应; 沉默信息调节因子1; 核因子E2相关因子2; Toll样受体4; NF- κ B

[中图分类号] R 827.174**[文献标志码]** A**[文章编号]** 2097-1338(2022)04-0362-10

Protective effect of polydatin on sulfur mustard-induced lung injuries in mice

WANG Yu-run¹, CEN Jin-feng², MENG Wen-qi², PEI Zhi-peng², XIAO Kai², XIE Ying^{1*}, SUN Ming-xue^{2*}

1. Key Laboratory of Molecular Epidemiology of Hunan Province, Medical College of Hunan Normal University, Changsha 410000, Hunan, China

2. Department of Chemical Defense Medicine, Faculty of Naval Medicine, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the ameliorative effects and preliminary mechanism of polydatin on sulfur mustard (SM)-induced lung injuries. **Methods** In the survival experiment, male ICR mice were randomly divided into 6 groups ($n=15$): control group; SM group (40 mg/kg); low-, medium- and high-doses polydatin groups (100, 200 and 400 mg/kg daily for 7 d, respectively); and positive control group (200 mg/kg *N*-acetyl-*L*-cysteine daily for 7 d). In other experiments, mice were randomly divided into 4 groups ($n=15$): control group, SM group (30 mg/kg), medium-dose polydatin group (200 mg/kg daily for 5 d) and positive control group (200 mg/kg *N*-acetyl-*L*-cysteine daily for 5 d). The mouse model of SM-induced lung injuries was established by subcutaneous injection of SM solution. The polydatin group and positive control

[收稿日期] 2021-10-13 **[接受日期]** 2022-01-06

[基金项目] 国家自然科学基金(81871521, 81801869), 上海市公共卫生优秀青年人才项目(GWV-10.2-YQ18), 上海市自然科学基金(21ZR1477700), 上海市青年科技英才扬帆计划(21YF1457400), 海军军医大学(第二军医大学)未来战争项目(19WLMS-08)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81871521, 81801869), Public Health Excellent Youth Training Program of Shanghai (GWV-10.2-YQ18), Natural Science Foundation of Shanghai (21ZR1477700), Yangfan Plan of Young Science and Technology Talent of Shanghai (21YF1457400), and Future Warfare Project of Naval Medical University (Second Military Medical University) (19WLMS-08).

[作者简介] 王雨润, 硕士生。E-mail: wangyurun96@163.com

*通信作者(Corresponding authors). Tel: 0731-88912416, E-mail: xieying@hunnu.edu.cn; Tel: 021-81871772, E-mail: sunmx1985@163.com

group were given drugs by gavage. The survival experiment was used to preliminarily investigate the effects of polydatin on SM-induced lung injuries and to determine the best dose of polydatin. The ameliorative effect of polydatin on SM-induced lung injuries was evaluated by lung tissue sections. The levels of oxidative stress indexes such as superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), myeloperoxidase (MPO), malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide and inflammatory response indexes such as interleukin (IL)-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor α (TNF- α) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The expression levels of key proteins of oxidative stress such as silencing information regulator 1 (SIRT1), nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase 1 (HO-1), NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1), as well as the levels of key inflammatory proteins such as Toll-like receptor 4 (TLR4) and nuclear factor κ B (NF- κ B) p65 were detected by Western blotting. **Results** Compared with the SM group, the survival rates of mice were increased in the medium- and high-doses polydatin groups, and the effect of the medium-dose polydatin group was more significant ($P < 0.01$). Intervention with medium-dose polydatin could increase SOD activity and GSH content in the lung tissues of SM-exposed mice, and reduce MPO activity, contents of MDA and hydrogen peroxide, and the levels of inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); enhance the protein expression of SIRT1 in lung tissues of SM-exposed mice, promote nuclear metastasis of Nrf2, and enhance the protein expression of HO-1 and NQO1 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); and decrease the protein expression of TLR4, NF- κ B p65 and phosphorylated NF- κ B p65 in lung tissues ($P < 0.01$). **Conclusion** Polydatin may inhibit SM-induced oxidative stress and inflammatory response by regulating SIRT1/Nrf2 and TLR4/NF- κ B pathways, so as to ameliorate the SM-induced lung injuries in mice.

[**Key words**] sulfur mustard; polydatin; oxidative stress; inflammation; silencing information regulator 1; nuclear factor E2-related factor 2; Toll-like receptor 4; NF- κ B

[Acad J Naval Med Univ, 2022, 43(4): 362-371]

芥子气 (sulfur mustard, SM) 是难防难治化学战剂的典型代表, 自第一次世界大战期间被引入战场后, 又多次被用于各种冲突和恐怖袭击^[1-2]。尽管目前存在毒性更强的化学战剂, 但是 SM 具有易于工业化生产、难以预防和治疗的特点, 仍然具有较大的军事威胁。肺是 SM 损伤的主要靶器官之一, 急性肺损伤是导致 SM 中毒患者死亡的主要原因之一^[3-4]。研究者们认为氧化应激是 SM 中毒的关键环节^[5-6]。研究表明, 炎症因子如 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等与 SM 引起的肺损伤密切相关^[7-9]。SM 中毒的机制尚未完全阐明, 目前还没有特效治疗药物, 以对症治疗为主。基于 SM 的军事威胁和毒性特点, 推进 SM 中毒机制的研究、寻找新型有效的治疗药物具有重要意义。

虎杖苷 (polydatin, PD) 是一种白藜芦醇的苷类衍生物, 从传统中药虎杖 (*Polygonum cuspidatum* Sieb) 的根部分离得到。PD 分布广泛, 存在于许多常见的食品中, 如葡萄、葡萄酒及花生等。研究表明 PD 具有抗氧化和抗炎活性, 能发挥对肾脏、肝脏和肺功能的保护作用^[10-12], 可作用于多个系统且不良反应小, 具有巨大的应用潜力。Shu 等^[13]研究发现 PD 可阻断磷脂酶 A2 的活性, 下调分泌型磷脂酶 A2 II A mRNA 的表达, 改善内毒素休克大鼠的急性肺损伤。王方岩等^[14]观察到 PD 可通过降低超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性和丙二醛 (malondialdehyde,

MDA) 含量来减轻缺血/再灌注引起的肺损伤。现有文献中未见 PD 对 SM 所致肺损伤作用的相关报道。本研究以雄性 ICR 小鼠为研究对象, 建立 SM 肺损伤模型, 探究 PD 对 SM 肺损伤的改善作用, 并初步探索其作用机制。

1 材料和方法

1.1 动物分组与造模 ICR 小鼠 (雄性, 6~8 周龄, 体重 25~30 g) 由昭衍 (苏州) 新药研究中心有限公司 [生产许可证号: SCXK (苏) 2018-0006] 提供。小鼠在 12 h 光照/12 h 黑暗循环、室温 (20 \pm 2) $^{\circ}$ C、自由进食和饮水的条件下饲养 1 周后使用。在存活率实验中, 将小鼠随机分为 6 组 ($n=15$): 对照 (Ctrl) 组、SM 组、PD 低剂量 (SM+PD100) 组、PD 中剂量 (SM+PD200) 组、PD 高剂量 (SM+PD400) 组和阳性对照药 *N*-乙酰半胱氨酸 (*N*-acetyl-*L*-cysteine, NAC) 治疗 (SM+NAC) 组。SM 以 40 mg/kg 的剂量皮下注射给药。在 SM 暴露 30 min 后, SM+PD100、SM+PD200、SM+PD400 组分别以 100、200、400 mg/kg PD 每天灌胃给药 1 次, 持续给药 7 d。SM+NAC 组在 SM 暴露 30 min 后, 以 200 mg/kg 的剂量每天灌胃给药 1 次, 持续给药 7 d。连续观察 14 d, 每天按时记录小鼠的存活情况。

在除存活率外的其他实验中, 小鼠被随机分为 4 组 ($n=15$): Ctrl 组、SM 组、SM+PD200 组和

SM+NAC组。SM以30 mg/kg的剂量皮下注射给药。PD在SM暴露30 min后,以200 mg/kg(SM+PD200组)的剂量每天灌胃给药1次,持续给药5 d。SM+NAC组在SM暴露30 min后,以200 mg/kg的剂量每天灌胃给药1次,持续给药5 d。于第1、3、5、7、10天处死小鼠,取各组小鼠肺组织制作H-E切片进行组织病理学观察。另取一批小鼠随机分为上述4组($n=15$),处理同前,持续给药5 d后处死小鼠进行后续实验。

1.2 试剂 SM(纯品)由军事科学院防化研究院提供;PD(纯度为95%)和NAC(纯度为99%)购自美国Sigma-Aldrich公司,货号分别为15721-25G和A9165。

1.3 肺组织病理学观察 处死小鼠后,取左侧最大叶肺组织,在4%多聚甲醛组织固定液中固定24 h,按顺序放入梯度乙醇和二甲苯溶液中脱水(75%乙醇4 h→85%乙醇2 h→90%乙醇2 h→95%乙醇1 h→无水乙醇I 30 min→无水乙醇II 30 min→二甲苯I 10 min→二甲苯II 10 min),透明处理后将肺组织浸蜡包埋并切成5 μ m厚的切片,H-E染色。规避分组信息后邀请上海市肺科医院谢惠康副主任医师和高彩霞、张伟2位中级技师根据肺水肿、肺出血、肺组织炎症细胞浸润、肺泡壁结构、支气管结构和病变面积等情况对H-E切片进行评分:未见任何病变记为0分;病理改变轻微、病变面积 $\leq 25\%$ 记为1分;病理改变轻度、病变面积 $> 25\% \sim 50\%$ 记为2分;病理改变中度、病变面积 $> 50\% \sim 75\%$ 记为3分;病理改变重度、病变面积 $> 75\%$ 记为4分。

1.4 肺湿重/干重(W/D)比值检测 将小鼠的肺组织完整取出,用吸水纸擦掉肺表面残余的血渍后称量,记为湿重(W)。将肺组织在70 $^{\circ}$ C烘箱中干燥72 h后称量,记为干重(D),计算W/D比值。

1.5 肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)蛋白浓度检测 小鼠末次给药后,腹腔注射10%的水合氯醛进行麻醉,固定小鼠后打开腹腔,剪断两侧腹主动脉进行放血,钝性分离出小鼠气管,通过气管将1 mL预冷的生理盐水缓缓注入小鼠肺中,然后缓慢回抽,循环3次,最后回抽600 μ L生理盐水。将获得的BALF离心(4 $^{\circ}$ C, 400 \times g, 15 min),收集上清,于-80 $^{\circ}$ C保存备用。

1.6 氧化应激指标与炎症因子检测 采用SOD活性检测试剂盒(WST-8法)检测小鼠肺组织中

SOD活性,用脂质氧化检测试剂盒检测MDA含量,用过氧化氢(H_2O_2)检测试剂盒检测 H_2O_2 含量。以上试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司,货号分别为S0103、S0131S、S0038。还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量检测试剂盒与髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,货号分别为A006-2-1、A044-1-1。所有检测步骤均依据试剂盒说明书进行。

采用IL-1 β ELISA试剂盒检测小鼠肺组织中IL-1 β 水平,IL-6 ELISA试剂盒检测IL-6水平,TNF- α ELISA试剂盒检测TNF- α 水平,以上试剂盒均购自美国R&D公司,货号分别为SMLB00C、SM6000B、SMTA00B。所有检测步骤均依据试剂盒说明书进行。

1.7 氧化应激与炎症反应相关蛋白表达水平的检测 将组织放入含有蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司,货号P0013D)中剪碎,在预冷的组织研磨仪上匀浆至没有肉眼可见的组织块,离心(4 $^{\circ}$ C, 13 000 \times g, 20 min)后将上清小心转移到新的EP管中。依据哺乳动物细胞核和细胞质蛋白提取试剂盒(北京全式金生物技术有限公司,货号DE201-01)的说明书提取细胞核和细胞质蛋白。采用BCA蛋白浓度检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号P0012S)测定蛋白浓度。将蛋白(40 μ g)上样于12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上,电泳分离后转至PVDF膜(美国Millipore公司,货号ISEQ00010)。用5%脱脂牛奶封闭2 h, TBST(TBS购自武汉塞维尔生物科技有限公司,货号G0001-2L;吐温购自上海博光生物科技有限公司,货号BL-SJ-0763)洗膜后用相应一抗在4 $^{\circ}$ C孵育过夜,洗膜后放入HRP标记的二抗(1 : 3 000 TBST稀释)中在室温下孵育1 h, TBST清洗,经化学发光法得到条带。GAPDH、 β -微管蛋白(β -tubulin)、核因子E2相关因子2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)、NAD(P)H:醌氧化还原酶(NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, NQO1)、Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)、NF- κ B p65总蛋白抗体均购自Proteintech中国公司,货号分别为60004-1-Ig、11224-1-AP、16396-1-AP、11451-1-AP、19811-1-AP、10745-1-AP;TATA盒结合蛋白(TATA box binding protein, TBP)、沉默信

息调节因子1 (silencing information regulator 1, SIRT1)、血红素加氧酶1 (heme oxygenase 1, HO-1) 抗体均购自上海碧云天生物技术有限公司, 货号分别为AF5321、AF0282、AF1333; 磷酸化NF- κ B p65 抗体购自美国CST公司, 货号3039; HRP标记的山羊抗兔/鼠抗体购自上海碧云天生物技术有限公司, 货号为A0208、A0216。

1.8 统计学处理 应用GraphPad Prism 9软件进行分析和绘图。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 多样本均数两两之间比较采用SNK- q 检验。用Kaplan-Meier法绘制生存曲线, 存活率的比较采用log-rank检验。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 PD可以提高SM染毒小鼠的存活率, 改善SM所致肺损伤 如图1所示, Ctrl组无小鼠死亡, SM组小鼠存活率为11.33%(与Ctrl组比较, $P < 0.01$); 与SM组相比, SM+NAC组小鼠与SM+PD400组小鼠存活率均提升至26.84% (P 均 < 0.05); SM+PD200组小鼠存活率提高至48.62% (与SM组相比, $P < 0.01$; 与SM+NAC组相比, $P < 0.05$); SM+PD100组小鼠存活率与SM组相比无明显提升 ($P > 0.05$)。以上结果表明, PD可以提高SM染毒小鼠的存活率, 且PD最佳给药剂量为200 mg/kg, 选用此剂量进行后续PD作用评价实验。

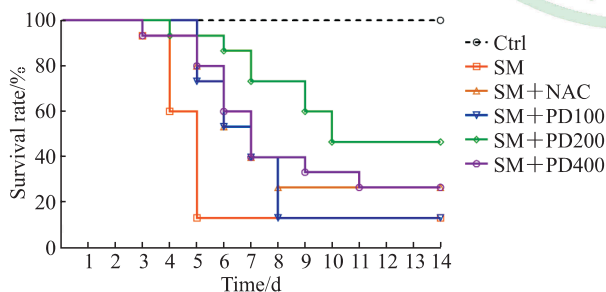


图1 PD处理对SM染毒小鼠存活率的影响

Fig 1 Effect of PD on survival rate of SM-exposed mice

$n = 15$. PD: Polydatin; SM: Sulfur mustard; Ctrl: Control; NAC: *N*-acetyl-*L*-cysteine; PD100, PD200, PD400: 100, 200 and 400 mg/kg PD, respectively.

H-E染色观察PD对SM所致肺损伤的影响, 结果如图2、3所示, Ctrl组小鼠肺组织形态正常, 肺泡和支气管结构完整; SM组小鼠肺损伤先加重后减轻, 在SM暴露后的第5天肺组织损伤最为严

重(评分与Ctrl组比较, $P < 0.01$), 可见明显的支气管结构破坏和肺间隔增厚, 炎症细胞浸润增加; 与SM组相比, SM+NAC组小鼠肺损伤程度有轻微改善, 肺泡腔内有部分炎症细胞浸润, 可见少量出血和肺间隔增厚, 支气管结构轻微破坏; SM+PD200组小鼠肺损伤有明显缓解(第5天评分与SM组比较, $P < 0.05$), 肺泡腔仅有少量的炎症细胞浸润和渗出物, 偶见支气管结构轻微破坏。结果表明PD和NAC对SM所致肺损伤均具有一定的保护作用, 且前者效果优于后者。

通过小鼠肺W/D比值和BALF蛋白浓度来评判肺损伤程度($n = 5$)。Ctrl组W/D比值为 4.22 ± 0.22 , BALF蛋白浓度为 $(349.90 \pm 110.14) \mu\text{g/mL}$ 。与Ctrl组相比, SM组小鼠W/D比值(4.91 ± 0.16)和BALF蛋白浓度 $[(869.23 \pm 73.85) \mu\text{g/mL}]$ 升高($P < 0.01$), 提示SM可引起肺组织损伤。采用PD200干预可降低W/D比值(4.44 ± 0.23)和BALF蛋白浓度 $[(545.67 \pm 64.28) \mu\text{g/mL}]$ (与SM组相比, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 采用NAC干预不能降低W/D比值(4.67 ± 0.26 ; 与SM组相比, $P > 0.05$)但可降低BALF蛋白浓度 $[(645.77 \pm 127.46) \mu\text{g/mL}]$, 与SM组相比, $P < 0.05$], 提示PD和NAC可降低SM染毒小鼠的肺水肿, 对SM所致肺损伤具有保护作用, 且PD的作用效果优于NAC。

2.2 PD可以降低SM染毒小鼠的氧化应激相关指标水平 如图4所示, 与Ctrl组相比, SM组小鼠肺组织中MDA含量、 H_2O_2 含量及MPO活性均升高(P 均 < 0.01), GSH含量、SOD活性均降低(P 均 < 0.01); NAC处理可提高GSH含量和SOD活性(与SM组相比, P 均 < 0.05); PD200处理后可降低MDA含量、 H_2O_2 含量及MPO活性(与SM组相比, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 提高GSH含量、SOD活性(与SM组相比, P 均 < 0.01)。结果表明PD和NAC可以不同程度地改善SM引起的氧化应激。

2.3 PD可上调SM染毒小鼠SIRT1蛋白的表达, 促进Nrf2的核转移, 上调HO-1和NQO1蛋白的表达 如图5A所示, 与Ctrl组相比, SM组SIRT1蛋白的表达水平下降($P < 0.01$)。与SM组相比, SM+PD200组和SM+NAC组SIRT1蛋白的表达水平均有所上升($P < 0.01$, $P < 0.05$), 证明PD和NAC都可能通过激活SIRT1蛋白来发挥其保护作用。如图5B、5C所示, 各组细胞胞质的Nrf2总蛋白水平没有明显变化, 但SM+PD200组和SM+

NAC组 Nrf2 蛋白的核转移与 SM 组相比增加 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。如图6所示,与 SM 组相比, SM+PD200 组 HO-1 和 NQO1 蛋白的表达水平增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), SM+NAC 组的 HO-1 蛋白

表达水平增加 ($P < 0.05$), 且 SM+PD200 组的变化均较 SM+NAC 组更为显著。结果表明 PD 可能通过激活 SIRT1 蛋白的表达来调控 Nrf2 及其下游蛋白发挥抗氧化作用。

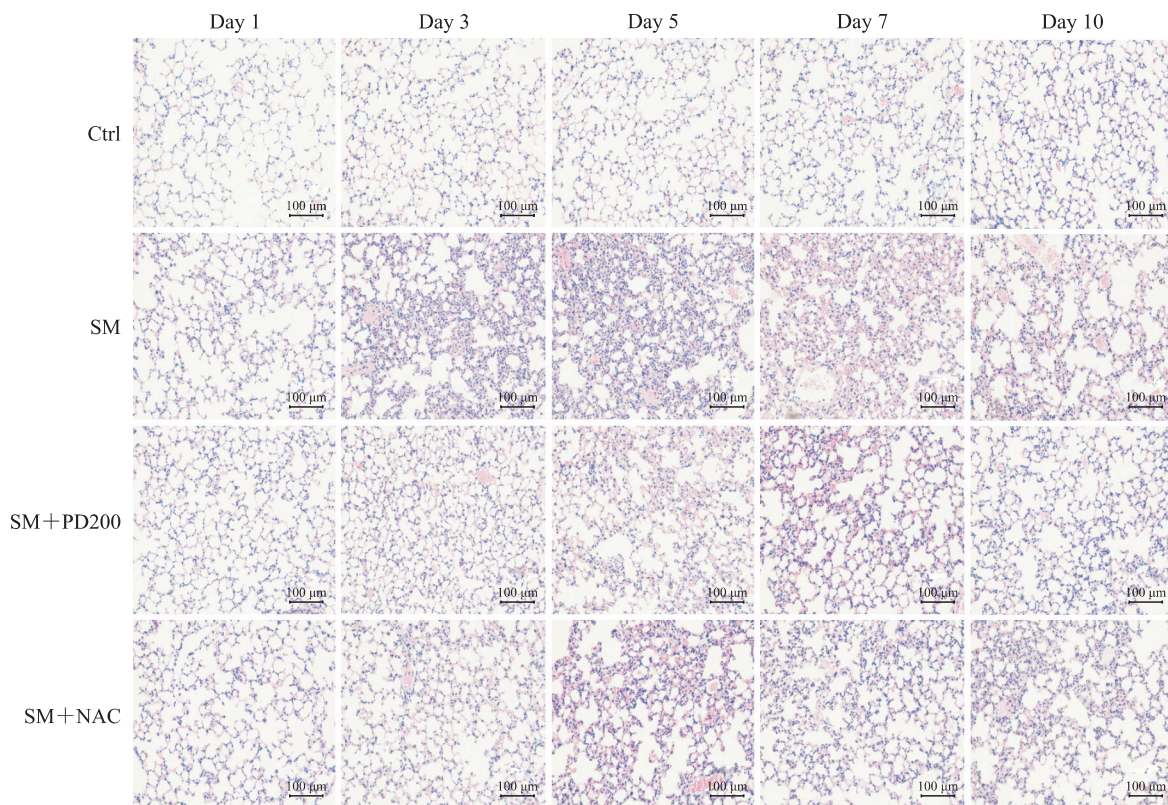


图2 各组小鼠肺组织病理变化

Fig 2 Histopathological changes of lung tissues in mice in each group

Hematoxylin-eosin staining. Ctrl: Control; SM: Sulfur mustard; PD200: 200 mg/kg polydatin; NAC: *N*-acetyl-*L*-cysteine.

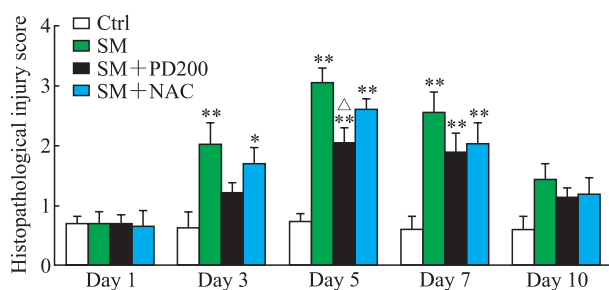


图3 各组小鼠肺组织病理损伤评分

Fig 3 Histopathological injury scores of lung tissues in mice in each group

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ctrl group; $\Delta P < 0.05$ vs SM group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. Ctrl: Control; SM: Sulfur mustard; PD200: 200 mg/kg polydatin; NAC: *N*-acetyl-*L*-cysteine.

2.4 PD可降低SM染毒小鼠炎症因子水平 通过ELISA试剂盒检测小鼠肺组织中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的水平变化,结果如图7所示。与 Ctrl

组相比, SM 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达水平均升高 (P 均 < 0.01), 提示 SM 作用后可引起肺组织的炎症反应; PD 或 NAC 处理降低了 TNF- α 、IL-1 β 的表达水平 (与 SM 组相比, P 均 < 0.05)。SM+PD200 组 IL-6 水平较 SM 组降低 ($P < 0.05$), SM+NAC 组 IL-6 水平降低不明显。结果说明 PD 可以降低 SM 染毒小鼠肺组织内的炎症水平,改善小鼠 SM 肺损伤。

2.5 PD可降低SM染毒小鼠TLR4蛋白、NF- κ B p65总蛋白表达及NF- κ B p65磷酸化水平 如图8所示,与 Ctrl 组相比, SM 组小鼠肺组织中 TLR4 蛋白和 NF- κ B p65 总蛋白表达及 NF- κ B 磷酸化水平升高 ($P < 0.01$); 与 SM 组相比, PD 或 NAC 处理后 NF- κ B p65 总蛋白及其磷酸化水平降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), SM+NAC 组 TLR4 蛋白水平下降不明显。结果表明 PD 可能通过 TLR4/NF- κ B 通路来抑制 SM 所致的炎症反应。

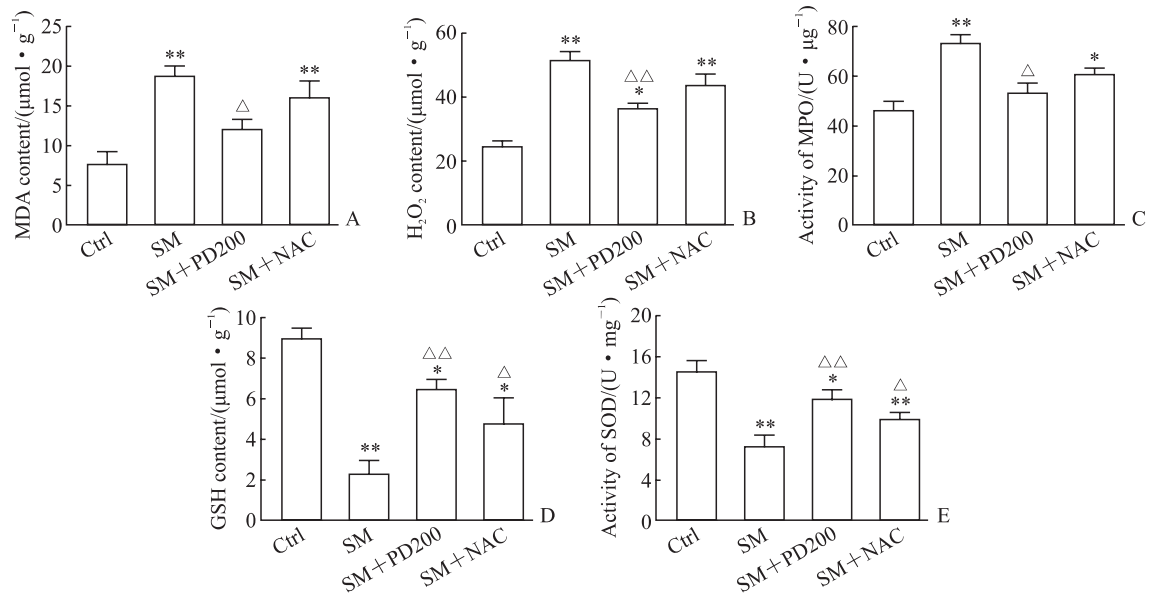


图4 各组小鼠肺组织中氧化应激相关指标检测结果

Fig 4 Results of oxidative stress indexes in lung tissues of mice in each group

Enzyme-linked immunosorbent assay results. A: MDA; B: H₂O₂; C: MPO; D: GSH; E: SOD. **P*<0.05, ***P*<0.01 vs Ctrl group; [△]*P*<0.05, ^{△△}*P*<0.01 vs SM group. *n*=3, $\bar{x} \pm s$. Ctrl: Control; SM: Sulfur mustard; PD200: 200 mg/kg polydatin; NAC: *N*-acetyl-*L*-cysteine; MDA: Malondialdehyde; H₂O₂: Hydrogen peroxide; MPO: Myeloperoxidase; GSH: Glutathione; SOD: Superoxide dismutase.

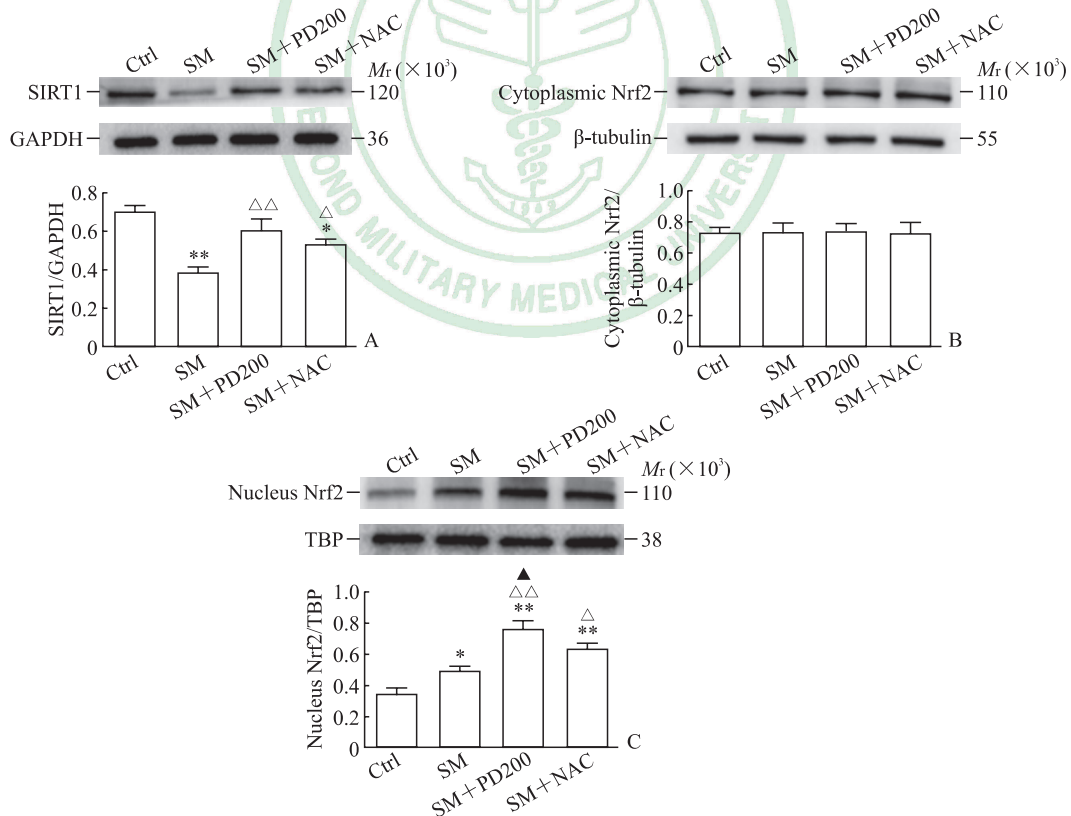


图5 各组小鼠肺组织中 SIRT1 与 Nrf2 蛋白的表达

Fig 5 Protein expression of SIRT1 and Nrf2 in lung tissues of mice in each group

Western blotting results. A: SIRT1; B: Cytoplasmic Nrf2; C: Nucleus Nrf2. **P*<0.05, ***P*<0.01 vs Ctrl group; [△]*P*<0.05, ^{△△}*P*<0.01 vs SM group; [▲]*P*<0.05 vs SM+NAC group. *n*=3, $\bar{x} \pm s$. Ctrl: Control; SIRT1: Silencing information regulator 1; Nrf2: Nuclear factor E2-related factor 2; SM: Sulfur mustard; PD200: 200 mg/kg polydatin; NAC: *N*-acetyl-*L*-cysteine; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; TBP: TATA box binding protein.

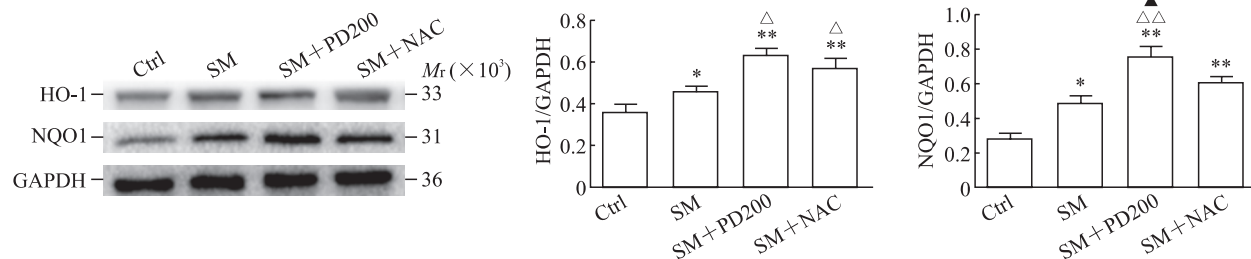


图6 各组小鼠肺组织中HO-1和NQO1蛋白的表达

Fig 6 Protein expression of HO-1 and NQO1 in lung tissues of mice in each group

Western blotting results. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ctrl group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs SM group; $\blacktriangle P < 0.05$ vs SM+NAC group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. Ctrl: Control; SM: Sulfur mustard; PD200: 200 mg/kg polydatin; NAC: *N*-acetyl-*L*-cysteine; HO-1: Heme oxygenase 1; NQO1: NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

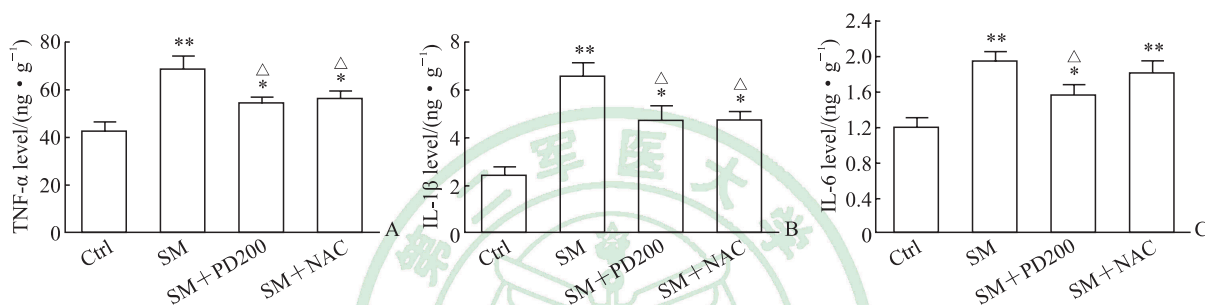


图7 各组小鼠肺组织中炎症因子的检测结果

Fig 7 Results of inflammatory factors in lung tissues of mice in each group

Enzyme-linked immunosorbent assay results. A: TNF- α ; B: IL-1 β ; C: IL-6. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ctrl group; $\Delta P < 0.05$ vs SM group. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. Ctrl: Control; SM: Sulfur mustard; PD200: 200 mg/kg polydatin; NAC: *N*-acetyl-*L*-cysteine; TNF- α : Tumor necrosis factor α ; IL-1 β : Interleukin 1 β ; IL-6: Interleukin 6.

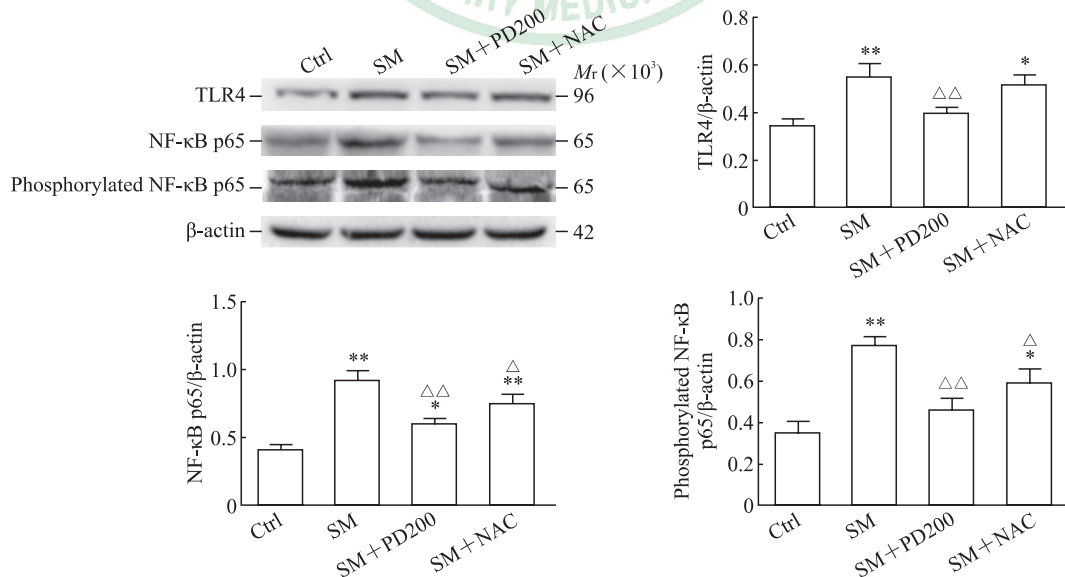


图8 各组小鼠肺组织中TLR4、NF-κB p65和磷酸化NF-κB p65蛋白的表达

Fig 8 Protein expression of TLR4, NF- κ B p65 and phosphorylated NF- κ B p65 in lung tissues of mice in each group

Western blotting results. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ctrl group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs SM group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. TLR4: Toll-like receptor 4; NF- κ B: Nuclear factor κ B; Ctrl: Control; SM: Sulfur mustard; PD200: 200 mg/kg polydatin; NAC: *N*-acetyl-*L*-cysteine.

3 讨论

在 SM 暴露模型选择上, 研究者们根据研究目的选择了不同的染毒方式^[15-20], 或将 SM 制成气溶胶对眼、皮肤和呼吸系统进行直接染毒, 或将液态 SM 直接滴注到气管进行染毒, 或通过皮下、腹腔或静脉注射的方式进行染毒, 或通过皮肤涂抹进行染毒, 以这些方式进行 SM 染毒均可引起肺损伤。本实验选择皮下注射 SM 为染毒模型, 主要原因是我们认为皮肤暴露可能是 SM 中毒更主要的威胁方式, 因为和佩戴防毒面具相比及时穿戴好全身防护服的难度更大、更难以实现。由于受实验条件限制, 仅能实现皮肤涂抹和皮下注射 2 种方式进行 SM 皮肤暴露, 我们认为皮下注射可以更好地保证动物染毒剂量的一致性。

目前还没有针对 SM 损伤的特效治疗药物, 减少 SM 所致损伤的最好方法是在 2 min 内对暴露部位进行去污处理, 否则 SM 被吸收将造成机体损伤。目前对于 SM 损伤主要采用支持性疗法, 如抗生素治疗和皮肤烧伤护理等^[21]。NAC 也可以通过多种机制减轻 SM 损伤, 具有较好的效果^[22-23], 因此本研究选用 NAC 作为阳性对照药物。本实验中首先观察了 PD 对于 SM 肺损伤的作用, 结果表明 PD 可以提高 SM 染毒小鼠的生存率、降低 SM 染毒小鼠肺 W/D 比值和 BALF 蛋白浓度, 这与其他 PD 对肺损伤保护作用的报道^[24-25]一致; NAC 也可缓解 SM 所致肺损伤, 但整体效果不及 PD。

氧化应激是 SM 肺损伤的起始和关键环节之一, SM 及其类似物能与各种细胞成分和低分子量代谢物反应, 形成单功能和双功能加合物, 最终导致活性氧过量产生、脂质过氧化、抗氧化体系失活等^[26-27]。MPO 可以将 H₂O₂ 转化为更高活性的次氯酸; MDA 含量高低用以评价细胞质膜的受损程度; GSH 和 SOD 是重要的抗氧化剂, 同时也是 SM 的靶标分子, SM 可以使它们耗损从而加重氧化应激水平, 导致毒性效应^[28-30]。Liu 等^[31]证明 PD 可以通过抑制 MPO 和 MDA 的水平提高 SOD 活性, 抑制大鼠特发性肺纤维化。Fu 等^[32]发现 PD 可以提高谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 和 SOD 的活性, 缓解百草枯对人胚胎肺成纤维细胞造成的损伤。在本研究中, SM 组小鼠肺组织 MDA 含量、H₂O₂ 含量和 MPO 活性均高于

Ctrl 组, 而 SOD 活性、GSH 含量均低于 Ctrl 组; 与 SM 组比较, PD 组 MDA 含量、H₂O₂ 含量和 MPO 活性降低, SOD 活性、GSH 含量升高。本研究结果表明 PD 可以通过降低氧化酶水平, 提高抗氧化酶活性来抑制 SM 所致肺损伤的氧化应激反应。

Sirtuin 家族是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺) 依赖的组蛋白去乙酰化酶家族, 其生物学功能多样。SIRT1 作为 Sirtuin 家族的重要成员之一, 主要负责调控机体氧化应激与能量代谢等多条信号通路^[33]。Nrf2 是抗氧化应激通路中发挥抗氧化作用的关键分子, 通常情况下与特异性抑制受体 Keap1 相结合, 大部分以无活性的形式存在于细胞质中; 当机体受到刺激时会导致 Nrf2 与 Keap1 解离, 解离的 Nrf2 向核转移并激活其下游通路蛋白的表达, 以此来调节机体的氧化应激^[6]。研究表明, PD 可以特异性激活 SIRT1 蛋白的表达, 调节 SIRT1/Nrf2 通路发挥抗氧化作用^[34-35]。Meng 等^[5]还发现 Nrf2 与其下游抗氧化蛋白 HO-1 和 NQO1 均参与了 SM 肺损伤的调节。本实验结果表明, SM 染毒小鼠肺组织的 SIRT1 蛋白下调, Nrf2 少量入核。PD 可提升 SM 染毒小鼠肺组织中 SIRT1 蛋白的表达, 促进 Nrf2 入核, 上调 HO-1 和 NQO1 蛋白的表达, 从而减轻 SM 的损伤作用, 提示 PD 在 SM 染毒后可能通过调节 SIRT1/Nrf2 通路改善 SM 引起的肺损伤。

炎症反应也是 SM 继发性损伤的重要标志之一。SM 引起的肺损伤会导致 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 等炎症因子大量释放和炎性细胞的浸润, 最终导致炎症反应^[36-37]。TLR4 是 Toll 样受体家族的成员之一, 主要在免疫和炎症反应中发挥作用^[38]。NF- κ B 是 TLR4 通路激活炎症反应的下游关键分子, 细胞应激可导致 TLR4 蛋白表达提高, 从而激活下游 NF- κ B 通路^[39]。NF- κ B p65 是 NF- κ B 家族的成员之一, 其表达和磷酸化可间接反映 NF- κ B 的活性^[40-41]。研究表明 SM 可以增加肺组织中 TLR4 的表达^[42], PD 可以通过 TLR4-MyD88-NF- κ B 通路保护脂多糖诱导的急性肺损伤^[24]。本实验结果表明 SM 暴露小鼠肺组织中 TLR4、NF- κ B p65 及磷酸化 NF- κ B 水平升高, PD 处理可逆转上述变化, 表明 PD 可能通过调节 TLR4/NF- κ B 通路对 SM 诱导的肺损伤产生抗炎作用。

综上所述,本研究首次明确了PD对SM肺损伤具有改善作用,初步阐明PD治疗SM肺损伤的机制主要与调节氧化应激、抑制炎症反应有关,为今后PD治疗SM肺损伤的临床研究提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] GHABILI K, AGUTTER P S, GHANEI M, ANSARIN K, PANAHI Y, SHOJA M M. Sulfur mustard toxicity: history, chemistry, pharmacokinetics, and pharmacodynamics[J]. *Crit Rev Toxicol*, 2011, 41: 384-403.
- [2] SAWYER T W. *N*-Acetylcysteine as a treatment for sulphur mustard poisoning[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 161: 305-320.
- [3] TANG F R, LOKE W K. Sulfur mustard and respiratory diseases[J]. *Crit Rev Toxicol*, 2012, 42: 688-702.
- [4] AMINI H, SOLAYMANI-DODARAN M, MOUSAVI B, ALAM BELADI S N, SOROUSH M R, ABOLGHA SEMI J, et al. Long-term health outcomes among survivors exposed to sulfur mustard in Iran[J/OL]. *JAMA Netw Open*, 2020, 3: e2028894. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2020.28894.
- [5] MENG W Q, PEI Z P, FENG Y W, ZHAO J, CHEN Y C, SHI W W, et al. Neglected role of hydrogen sulfide in sulfur mustard poisoning: Keap1 *S*-sulfhydration and subsequent Nrf2 pathway activation[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7: 9433. DOI: 10.1038/s41598-017-09648-6.
- [6] BEIGI HARCHEGANI A, TAHMASBPOUR E, BORNA H, IMAMY A, GHANEI M, SHAHRIARY A. Free radical production and oxidative stress in lung tissue of patients exposed to sulfur mustard: an overview of cellular and molecular mechanisms[J]. *Chem Res Toxicol*, 2018, 31: 211-222.
- [7] MARIAPPAN N, HUSAIN M, ZAFAR I, SINGH V, SMITHSON K G, CROWE D R, et al. Extracellular nucleic acid scavenging rescues rats from sulfur mustard analog-induced lung injury and mortality[J]. *Arch Toxicol*, 2020, 94: 1321-1334.
- [8] MAJD A M M, FAGHIHZADEH S, POURFARZAM S, EGHTE D ARDOOST M, JAMALI D, MIRSHARIF E S, et al. Serum and sputum levels of IL-17, IL-21, TNF α and mRNA expression of *IL-17* in sulfur mustard lung tissue with long term pulmonary complications (28 years after sulfur mustard exposure)[J/OL]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 76: 105828. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105828.
- [9] SMITH L C, VENOSA A, GOW A J, LASKIN J D, LASKIN D L. Transcriptional profiling of lung macrophages during pulmonary injury induced by nitrogen mustard[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2020, 1480: 146-154.
- [10] LI R, LI J Z, HUANG Y J, LI H, YAN S S, LIN J X, et al. Polydatin attenuates diet-induced nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in mice[J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14: 1411-1425.
- [11] ZHAO X J, YU H W, YANG Y Z, WU W Y, CHEN T Y, JIA K K, et al. Polydatin prevents fructose-induced liver inflammation and lipid deposition through increasing miR-200a to regulate Keap1/Nrf2 pathway[J]. *Redox Biol*, 2018, 18: 124-137.
- [12] MA Y, GONG X, MO Y L, WU S Z. Polydatin inhibits the oxidative stress-induced proliferation of vascular smooth muscle cells by activating the ENOS/SIRT1 pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37: 1652-1660.
- [13] SHU S Y, WANG X Y, LING Z Y, LU Z Y. Effect of polydatin on phospholipase A2 in lung tissues in rats with endotoxic shock[J]. *Chin J Traumatol*, 2004, 7: 239-243.
- [14] 王方岩,徐正祚,张晓隆,王万铁,郝卯林,汪洋.虎杖甙抗肺缺血/再灌注损伤作用及其机制初探[J].*中国应用生理学杂志*,2008,24:62-65.
- [15] TRIPATHI R, BALNE P K, SINHA N R, MARTIN L M, KAMIL S, LANDRENEAU J R, et al. A novel topical ophthalmic formulation to mitigate acute mustard gas keratopathy *in vivo*: a pilot study[J/OL]. *Transl Vis Sci Technol*, 2020, 9: 6. DOI: 10.1167/tvst.9.12.6.
- [16] BARILLO D J, CROUTCH C R, BARILLO A R, THOMPSON C K, ROSEMAN J, REID F. Debridement of sulfur mustard skin burns: a comparison of three methods[J]. *J Burn Care Res*, 2020, 41: 159-166.
- [17] MENG W Q, SUN M X, XU Q Q, CEN J F, CAO Y B, LI Z J, et al. Development of a series of fluorescent probes for the early diagnostic imaging of sulfur mustard poisoning[J]. *ACS Sens*, 2019, 4: 2794-2801.
- [18] MENG W Q, ZHANG H, XIAO L, CHEN X T, SUN M X, XU Q Q, et al. Visualization of sulfur mustard in living cells and whole animals with a selective and sensitive turn-on fluorescent probe[J/OL]. *Sens Actuat B Chem*, 2019, 296: 126678. DOI: 10.1016/j.snb.2019.126678.
- [19] MENG W Q, CHEN Y C, FENG Y W, ZHANG H, XU Q Q, SUN M X, et al. An off-on fluorescent probe for the detection of mitochondria-specific protein persulfidation[J]. *Org Biomol Chem*, 2018, 16: 6350-6357.
- [20] YU D, BEI Y Y, LI Y, HAN W, ZHONG Y X, LIU F, et al. *In vitro* the differences of inflammatory and oxidative reactions due to sulfur mustard induced acute pulmonary injury underlying intraperitoneal injection and intratracheal instillation in rats[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 47: 78-87.
- [21] BOBB A J, ARFSTEN D P, JEDERBERG W W. *N*-acetyl-*L*-cysteine as prophylaxis against sulfur

- mustard[J]. *Mil Med*, 2005, 170: 52-56.
- [22] BALSZUWEIT F, MENACHER G, SCHMIDT A, KAI K H, POPP T, WOREK F, et al. Protective effects of the thiol compounds GSH and NAC against sulfur mustard toxicity in a human keratinocyte cell line[J]. *Toxicol Lett*, 2016, 244: 35-43.
- [23] JUGG B, FAIRHALL S, SMITH A, RUTTER S, MANN T, PERROTT R, et al. *N*-acetyl-*L*-cysteine protects against inhaled sulfur mustard poisoning in the large swine[J]. *Clin Toxicol (Phila)*, 2013, 51: 216-224.
- [24] JIANG Q, YI M, GUO Q Q, WANG C M, WANG H M, MENG S S, et al. Protective effects of polydatin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury through TLR4-MyD88-NF- κ B pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29: 370-376.
- [25] LI T, LIU Y T, LI G C, WANG X, ZENG Z H, CAI S M, et al. Polydatin attenuates ipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7: 8401-8410.
- [26] KAI K H, SZINICZ L. Medical aspects of sulphur mustard poisoning[J]. *Toxicology*, 2005, 214: 198-209.
- [27] KEHE K, BALSZUWEIT F, STEINRITZ D, THIERMANN H. Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering[J]. *Toxicology*, 2009, 263: 12-19.
- [28] TSENG H W, TSENG H H, LIOU H H, TSAI K W, GER L P, SHIUE Y L. The association between immunoexpression levels of oxidant and antioxidant enzymes and lip squamous cell carcinoma[J]. *APMIS*, 2018, 126: 403-412.
- [29] RYMASZEWSKI A L, TATE E, YIMBESALU J P, GELMAN A E, JARZEMBOWSKI J A, ZHANG H, et al. The role of neutrophil myeloperoxidase in models of lung tumor development[J]. *Cancers*, 2014, 6: 1111-1127.
- [30] SONI A K, BHASKAR A S B, PATHAK U, NAGAR D P, GUPTA A K, KANNAN G M. Pulmonary protective efficacy of S-2[2-aminoethylamino]ethyl phenyl sulphide (DRDE-07) and its analogues against sulfur mustard induced toxicity in mice[J/OL]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2020, 76: 103333. DOI: 10.1016/j.etap.2020.103333.
- [31] LIU Y L, CHEN B Y, NIE J, ZHAO G H, ZHUO J Y, YUAN J, et al. Polydatin prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibiting the TGF- β /Smad/ERK signaling pathway[J/OL]. *Exp Ther Med*, 2020, 20: 62. DOI: 10.3892/etm.2020.9190.
- [32] FU Y, YAN M, XIE C M, HU J L, ZENG X X, HU Q H. Polydatin relieves paraquat-induced human MRC-5 fibroblast injury through inhibiting the activation of the NLRP3 inflammasome[J/OL]. *Ann Transl Med*, 2020, 8: 765. DOI: 10.21037/atm-20-4570.
- [33] SINGH V, UBAID S. Role of silent information regulator 1 (SIRT1) in regulating oxidative stress and inflammation[J]. *Inflammation*, 2020, 43: 1589-1598.
- [34] ZENG Z H, CHEN Z Q, XU S Q, SONG R, YANG H, ZHAO K S. Polydatin alleviates small intestine injury during hemorrhagic shock as a SIRT1 activator[J/OL]. *Oxidative Med Cell Longev*, 2015, 2015: 965961. DOI: 10.1155/2015/965961.
- [35] LI P Y, WANG X M, ZHAO M, SONG R, ZHAO K S. Polydatin protects hepatocytes against mitochondrial injury in acute severe hemorrhagic shock via SIRT1-SOD2 pathway[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2015, 19: 997-1010.
- [36] MALAVIYA R, SUNIL V R, VENOSA A, VAYAS K N, HECK D E, LASKIN J D, et al. Inflammatory mechanisms of pulmonary injury induced by mustards[J]. *Toxicol Lett*, 2016, 244: 2-7.
- [37] WAGNER S, LANG S, POPP T, SCHMIDT A, THIERMANN H, STEINRITZ D, et al. Evaluation of selective and non-selective cyclooxygenase inhibitors on sulfur mustard-induced pro-inflammatory cytokine formation in normal human epidermal keratinocytes[J]. *Toxicol Lett*, 2019, 312: 109-117.
- [38] VERSTREPEN L, BEKAERT T, CHAU T L, TAVERNIER J, CHARIOT A, BEYAERT R. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF- κ B: variations on a common theme[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65: 2964-2978.
- [39] ROCHA D M, CALDAS A P, OLIVEIRA L L, BRESSAN J, HERMSDORFF H H. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response[J]. *Atherosclerosis*, 2016, 244: 211-215.
- [40] VIATOUR P, MERVILLE M P, BOURS V, CHARIOT A. Phosphorylation of NF- κ B and I κ B proteins: implications in cancer and inflammation[J]. *Trends Biochem Sci*, 2005, 30: 43-52.
- [41] KARIN M, GRETEN F R. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression[J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5: 749-759.
- [42] FENG Y W, XU Q Q, YANG Y Y, SHI W W, MENG W Q, ZHANG H, et al. The therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the acute lung injury induced by sulfur mustard[J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10: 90. DOI: 10.1186/s13287-019-1189-x.