

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.10.004

◇ 药学研究 ◇

黄芪多糖对高氧致新生大鼠支气管肺发育不良 mir-34a/sirt1 轴的影响

丁波, 李智敏, 黄建玲

作者单位: 三二〇一医院儿科, 陕西 汉中 723000

通信作者: 黄建玲, 女, 主任医师, 研究方向为小儿心脏内科, E-mail: 167166763@qq.com

摘要:目的 探讨黄芪多糖(APS)对高氧诱导支气管肺发育不良(BPD)新生大鼠微小RNA-34a(mir-34a)/沉默信息调节因子1(sirt1)轴的影响。方法 将2018年1月至2019年1月参加实验的64只大鼠按照随机数字表法分为空白对照组(NC组)、APS对照组(APS组)、高氧诱导BPD模型组(BPD组)、APS治疗BPD组(BPD+APS组),每组16只。NC组、APS组暴露在空气中;BPD组、BPD+APS组大鼠暴露在氧浓度(70±5)%环境中。24 h后APS组和BPD+APS组腹腔注射100 mg·kg⁻¹·d⁻¹ APS, NC组和BPD组腹腔注射同体积生理盐水,每天1次直至大鼠处死。建模10、17 d,称量大鼠体质量变化;苏木素-伊红(HE)染色观察肺组织形态学变化;酶联免疫吸附试验法(ELISA)检测肺组织中白介素-6(IL-6)、白介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、丙二醛(MDA)水平及超氧化物歧化酶(SOD)活性变化;实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测肺组织中mir-34a水平变化;免疫组化、蛋白质印迹法(Western blot)检测肺组织中sirt1水平变化。结果 NC组与APS组建模10、17 d体质量,肺组织形态,IL-6、IL-10、TNF-α、MDA、mir-34a、sirt1水平,SOD活性均无明显变化($P>0.05$)。与NC组、APS组相比,BPD组建模10、17 d体质量下降,肺组织结构不完整、肺泡数量减少、体积增大、结构简单化,IL-6、TNF-α、MDA、mir-34a表达升高[(211.32±47.68)比(218.66±48.04)ng/L;(496.52±81.91)比(537.88±64.06)ng/L;(4.17±1.05)比(4.32±0.95)μmol/g;(2.38±0.47)比(2.28±0.55)],IL-10、sirt1表达降低[(3.71±0.67)比(3.42±0.53)ng/L;(0.11±0.06)比(0.15±0.05)],SOD活性降低[(11.64±1.94)比(8.96±1.95)U/mg]($P<0.05$)。与BPD组相比,BPD+APS组建模10 d肺组织肺泡发育良好、大小均匀、结构逐渐恢复,IL-6、TNF-α、mir-34a表达降低[(159.66±39.17)ng/L,(357.77±65.31)ng/L,(1.62±0.38)],IL-10、sirt1表达升高[(6.67±1.17)ng/L,(0.94±0.14)];建模17 d体质量增加,肺组织肺泡发育更好、大小均匀、结构逐渐接近NC组和APS组,IL-6、TNF-α、MDA、mir-34a表达降低[(152.22±31.08)ng/L,(317.66±73.22)ng/L,(2.86±0.71)μmol/g,(1.49±0.29)],IL-10、sirt1表达升高[(8.17±1.2)ng/L,(1.02±0.18)],SOD活性升高(16.95±3.4)U/mg($P<0.05$)。结论 APS可能通过调控mir-34a/sirt1轴抑制炎症反应和氧化应激反应,实现对BPD新生大鼠的保护作用。

关键词: 支气管肺发育不良; 黄芪多糖; 高氧; 超氧化物歧化酶; 微小RNA-34a; 沉默信息调节因子1

Effect of astragalus polysaccharide on mir-34a/sirt1 axis in hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia in neonatal rats

DING Bo, LI Zhimin, HUANG Jianling

Author Affiliation: Department of Pediatrics, Shaanxi Hanzhong 3201 Hospital, Shaanxi, Hanzhong 723000, China

Abstract: Objective To investigate the effects of Astragalus Polysaccharide (APS) on microRNA-34a (mir-34a)/silent information regulator-1 (sirt1) axis in neonatal rats with hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia (BPD). **Methods** Sixty-four rats from January 2018 to January 2019 were selected and randomly assigned into air control group (NC group), APS control group (APS group), hyperoxia-induced BPD model group (BPD group), and APS treatment BPD group (BPD + APS group) according to the random number table, with 16 rats in each group. NC group and APS group were exposed to air, rats in BPD group and BPD+APS group were exposed to oxygen concentration (70±5)%. After 24 hours, APS group and BPD+APS group were intraperitoneally injected with 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹ APS, while NC group and BPD group were intraperitoneally injected with the same volume of saline, once a day until the rats were executed. After 10 and 17 days of modeling, the weight of rats was weighed, lung histomorphological changes were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining; the levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor-α (TNF-α), malondialdehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD) in lung tissues were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the level of miR-34a in lung tissue; the levels of sirt1 in lung tissues were detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results** At 10th and 17th days, there was no significant change in the weight, lung tissue morphology, IL-6, IL-10, TNF-α, MDA, miR-34a and sirt1 levels, SOD activity of NC group and APS group ($P>0.05$). Compared with NC group and APS group, at 10th and 17th days, the weight lost in BPD group, the lung tissue structure was incomplete, the number of alveoli decreased, the volume increased, the structure was sim-

plified, the expressions of IL-6 $[(211.32\pm 47.68)\text{ng/L vs.}(218.66\pm 48.04)\text{ng/L}]$, TNF- $\alpha[(496.52\pm 81.91)\text{ng/L vs.}(537.88\pm 64.06)\text{ng/L}]$, MDA $[(4.17\pm 1.05)\mu\text{mol/g vs.}(4.32\pm 0.95)\mu\text{mol/g}]$ and miR-34a $[(2.38\pm 0.47)\text{vs.}(2.28\pm 0.55)]$ increased, the expressions of IL-10 $[(3.71\pm 0.67)\text{ng/L vs.}(3.42\pm 0.53)\text{ng/L}]$ and sirt1 $[(0.11\pm 0.06)\text{vs.}(0.15\pm 0.05)]$ and SOD activity $[(11.64\pm 1.94)\text{U/mg vs.}(8.96\pm 1.95)\text{U/mg}]$ decreased ($P < 0.05$). Compared with BPD group, at 10th days of modeling, the alveoli of lung tissue of BPD + APS group developed well, the size of alveoli was uniform, and the structure of alveoli gradually recovered, the expressions of IL-6 $[(159.66\pm 39.17)\text{ng/L}]$, TNF- $\alpha[(357.77\pm 65.31)\text{ng/L}]$ and miR-34a $[(1.62\pm 0.38)]$ decreased, the expressions of IL-10 $[(6.67\pm 1.17)\text{ng/L}]$ and sirt1 $[(0.94\pm 0.14)]$ increased, at 17th days of modeling, the weight increased, the alveolar development of lung tissue was better, the size was uniform, and the structure was gradually close to that of NC group and APS group, the expressions of IL-6 $[(152.22\pm 31.08)\text{ng/L}]$, TNF- $\alpha[(317.66\pm 73.22)\text{ng/L}]$, MDA $[(2.86\pm 0.71)\mu\text{mol/g}]$ and miR-34a $[(1.49\pm 0.29)]$ decreased, and the expressions of IL-10 $[(8.17\pm 1.2)\text{ng/L}]$, sirt1 $[(1.02\pm 0.18)]$, and SOD activity $[(16.95\pm 3.4)]$ increased ($P < 0.05$). **Conclusion** APS may protect newborn rats with BPD by regulating mir-34a/sirt1 axis to inhibit inflammation and oxidative stress.

Key words: Bronchopulmonary dysplasia; Astragalus polysaccharide; Hyperoxia; Superoxide dismutase; MicroRNA-34a; Silence information regulator 1

支气管肺发育不良(Bronchopulmonary Dysplasia, BPD)是早产儿的一种慢性肺部疾病,肺发育不成熟是该病主要原因之一,肺功能受阻早产儿一般会置于氧环境中一定时间,但置于高氧环境中氧产生的毒素会直接损伤肺部^[1]。研究发现,微小RNA-34a(microRNA-34a, mir-34a)/沉默信息调节因子1(silent information regulator 1, sirt1)轴中 mir-34a 上调可抑制 sirt1 蛋白的表达从而加快脑内炎症反应^[2],上调 mir-34a 可促进过氧化氢引起的细胞氧化应激损伤,下调 mir-34a 可减缓氧化应激损伤^[3]。黄芪多糖(Astragalus Polysaccharide, APS)是中药黄芪主要活性成分之一,具有抗炎、抗氧化药理作用,可降低溃烂性结肠炎中炎症因子水平从而治疗溃烂性结肠炎^[4],还可提高仔猪抗氧化能力改善疾病状况^[5],但其对 BPD 大鼠肺损伤的作用尚未发现报道。本研究通过构建 BPD 模型,观察 APS 对 BPD 大鼠肺组织中炎症反应、氧化应激反应的影响并探讨其作用机制,旨在揭示其保护 BPD 大鼠肺损伤的分子机制。

1 材料与方法

1.1 一般材料

1.1.1 实验动物 将 2018 年 1 月至 2019 年 1 月参加实验的健康 SD 大鼠由广州医科大学实验动物中心提供,许可证号:SYXK(粤)-2016-0143,清洁级,出生 3 d 体质量 $(9.45\pm 0.25)\text{g}$ 。实验动物中心温度 $(25\pm 1)^\circ\text{C}$ 、湿度 $(60\pm 10)\%$ 、12 h 黑暗 12 h 光照常规饲养大鼠。所有实验均经本院动物实验伦理委员会批准。

1.1.2 试剂与仪器 APS 由天津华隆医药保健品有限公司提供,批准文号:Z20040085。苏木素-伊红(HE)染色试剂盒由武汉百浩天生物科技有限公司提供,货号:C0490。大鼠白介素-6(IL-6)、白介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附

(ELISA)试剂盒由碧云天生物科技有限公司提供,货号分别为:PI326、PI522、PT516。超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)ELISA 检测试剂盒由上海纪宁实业有限公司提供,货号分别为:N01762、N06457。一抗 sirt1(抗鼠)、内参 GAPDH(抗鼠)、二抗羊抗鼠由英国 abcam 公司提供,货号分别为:ab110304、ab8245、ab150117。RNAisoPlus、cDNA 逆转录试剂盒、2 $\times$ HiSYBR Green QPCR Mix 由日本 TaKaRa 公司提供,货号分别为:9108、DRR037A、ARR041A。蛋白裂解液由北京索莱宝科技有限公司提供,货号:R0010。脱脂奶粉由美国 BD 公司提供,货号:232100。DAB 显色试剂由上海生工生物工程有限公司提供,货号:PW017。氧箱由美国 Shellab 公司提供,切片机由德国 Leica 公司提供,光学显微镜由日本 Olympus 公司提供,实时荧光定量 PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)仪由美国 ABI 公司提供,蛋白凝胶成像仪由上海 Tanon 公司提供。

1.2 方法

1.2.1 动物造模 参照文献中方法建模^[6]。将 64 只出生后 3 d SD 大鼠按照随机数字表法分为空白对照组(NC 组)、APS 对照组(APS 组)、高氧诱导 BPD 模型组(BPD 组)、APS 治疗 BPD 组(BPD+APS 组),每组 16 只。NC 组、APS 组大鼠暴露在空气中常规饲养;BPD 组、BPD+APS 组大鼠置于氧箱中,氧浓度维持在 $(70\pm 5)\%$,同时吸收氧箱二氧化碳和水蒸气保持氧箱中压力恒定,其余条件与 NC 组、APS 组相同。24 h 后 APS 组和 BPD+APS 组腹腔注射 $100\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ APS,注射体积 $100\mu\text{L}$,剂量参考文献^[7],NC 组和 BPD 组腹腔注射同体积生理盐水,直至大鼠处死。

1.2.2 大鼠体质量变化 建模 10 d 每组大鼠随机

抽取8只,腹腔注射麻醉大鼠称量体质量。建模17 d再次称量。

1.2.3 HE染色观察肺组织形态学变化 大鼠称完体质量后立即处死大鼠,打开胸腔,部分肺组织置于4%多聚甲醛中做HE染色和免疫组化实验,部分肺组织置于4℃冰箱做ELISA实验,部分置于-80℃冰箱做qRT-PCR和蛋白免疫印迹(Western blot)实验。固定于4%多聚甲醛中的肺组织过夜后,转至不同浓度乙醇中脱水,二甲苯中透明,石蜡中包埋、冷冻凝固后在切片机上切片。切片制作完成后经脱蜡、复水、染色,再脱水、透明、封片完成HE染色,光学显微镜拍照。

1.2.4 ELISA检测 大鼠肺组织中IL-6、IL-10、TNF- α 、MDA水平和SOD活性置于4℃冰箱肺组织在收样6 h内冰上组织匀浆,5 000 r/min离心5 min,收集上清液分装置于-20℃中待测。严格按照大鼠IL-6、IL-10、TNF- α 、SOD、MDA ELISA试剂盒说明书步骤操作。

1.2.5 qRT-PCR检测 大鼠肺组织中mir-34a水平-80℃超低温冰箱中每个样品取50 mg组织,RNAisoPlus提取肺组织总RNA,cDNA逆转录试剂盒反转录cDNA,qRT-PCR仪对mir-34a、内参U6扩增。引物序列:mir-34a-F:5'-TGCGAGTGTCT-TAGCTGGTTGT-3',mir-34a-R:5'-GTCGTATC-CAGTGCCTGTCGTG-3';U6-F:5'-GCTTCGGCAG-CACATATACTA-3',U6-R:5'-CGCTTCACGAATTT-GCGTGTC-3'。上样体系:cDNA 1 μ L(50 ng/ μ L),F/R(10 μ M)各0.5 μ L,2×Mix 10 μ L,双蒸水(ddH₂O)8.0 μ L。反应条件:95℃、10 min;95℃、15 s,60℃、60 s,45个循环。2^{- $\Delta\Delta$ CT}法计算肺组织中mir-34a表达水平。

1.2.6 免疫组化检测 大鼠肺组织中sirt1表达水平变化制作好的切片按1.2.3中HE染色相同方法脱蜡、复水,滴加过氧化氢灭活内源性过氧化氢酶,热修复抗原并加磷酸缓冲液冲洗,5%脱脂奶粉封片20 min,滴加一抗sirt1(1:1 000)[阴性对照用同型同种鼠免疫球蛋白G(IgG)代替一抗]2 h,滴加二抗20 min后二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染核,盐酸酒精分色,脱水、透明、封片。光学显微镜拍照。免疫组化结果鉴定:胞质中出现黄色或棕色颗粒为阳性。阳性评分由两位病理科医师协商判断。阳性率0%~5%为阴性,6%~10%为弱阳性,11%~25%为阳性,>26%为强阳性。

1.2.7 蛋白质印迹法检测 大鼠肺组织中sirt1蛋白水平-80℃超低温冰箱中每个样品取30 mg肺组织,使用高压灭菌过的手术剪剪碎后,在冰上研磨,

每管加1 mL蛋白裂解液冰上裂解30 min,组织匀浆液10 000 g离心5 min,上清液即为肺组织总蛋白。蛋白定量后聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离蛋白质,聚偏二氟乙烯(PVDF)膜280 mA 60 min转膜;5%脱脂奶粉室温封闭2 h;对应加入一抗sirt1(1:10 000)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GADPH)(1:5 000)4℃孵育过夜;对应加入二抗,室温孵育1 h。DAB显色试剂显色,蛋白凝胶成像仪拍照和定量分析。

1.3 统计学方法 SPSS 22.0软件进行统计学分析,计量数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK-q法。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体质量变化 NC组与APS组建模10、17 d体质量差异无统计学意义($P > 0.05$)。与NC组、APS组对比,BPD组建模10、17 d体质量降低($P < 0.05$)。与BPD组相比,BPD+APS组建模17 d体质量增加($P < 0.05$)。见表1。

表1 SD大鼠64只建模10、17 d体质量变化/(g, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体质量	
		建模10 d	建模17 d
NC组	16	22.17 $\pm$ 3.41	50.27 $\pm$ 4.65
APS组	16	22.21 $\pm$ 3.19	48.79 $\pm$ 4.99
BPD组	16	17.46 $\pm$ 2.66 ^{ab}	35.75 $\pm$ 2.85 ^{ab}
BPD+APS组	16	20.17 $\pm$ 4.32	42.66 $\pm$ 3.71 ^c
F值		3.380	20.516
P值		0.032	0.000

注:NC组为空白对照组,APS组为黄芪多糖对照组,BPD组为高氧诱导支气管肺发育不良模型组,BPD+APS组为黄芪多糖治疗支气管肺发育不良组。与NC组相比,^a $P < 0.05$;与APS组相比,^b $P < 0.05$;与BPD组相比,^c $P < 0.05$

2.2 大鼠肺组织形态学变化 建模10、14 d,NC组与APS组大鼠肺组织气管和各级支气管结构完整,肺泡排列整齐,无间隔破坏,无炎症细胞浸润现象。BPD组肺组织结构不完整,肺泡数量减少、体积增大,结构简单化,炎症现象明显。BPD+APS组肺组织结构较完整,肺泡发育较好,大小均匀,间隔较均匀,炎症细胞浸润现象减少,肺泡结构接近NC组和APS组。见图1。

2.3 大鼠肺组织中IL-6、IL-10、TNF- α 水平变化 建模10、17 d,NC组和APS组肺组织中IL-6、IL-10、TNF- α 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。与NC组、APS组相比,BPD组建模10、17 d肺组织中IL-6、TNF- α 表达升高,IL-10表达降低($P < 0.05$);BPD+APS组建模10 d肺组织中IL-10表达降低,TNF- α 表

表2 SD大鼠64只建模后肺组织中IL-6、IL-10、TNF- α 水平比较/(ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IL-6		IL-10		TNF- α	
		建模10 d	建模17 d	建模10 d	建模17 d	建模10 d	建模17 d
NC组	16	143.62 $\pm$ 44.62	137.82 $\pm$ 39.21	9.66 $\pm$ 2.17	9.17 $\pm$ 1.75	276.65 $\pm$ 66.05	274.69 $\pm$ 62.17
APS组	16	144.37 $\pm$ 48.31	143.66 $\pm$ 42.02	9.43 $\pm$ 1.89	9.19 $\pm$ 1.66	274.18 $\pm$ 57.15	285.66 $\pm$ 56.85
BPD组	16	211.32 $\pm$ 47.68 ^{ab}	218.66 $\pm$ 48.04 ^{ab}	3.71 $\pm$ 0.67 ^{ab}	3.42 $\pm$ 0.53 ^{ab}	496.52 $\pm$ 81.91 ^{ab}	537.88 $\pm$ 64.06 ^{ab}
BPD+APS组	16	159.66 $\pm$ 39.17 ^c	152.22 $\pm$ 31.08 ^c	6.67 $\pm$ 1.17 ^{abc}	8.17 $\pm$ 1.25 ^c	357.77 $\pm$ 65.31 ^{abc}	317.66 $\pm$ 73.22 ^c
F值		4.009	6.848	24.688	31.659	18.721	29.686
P值		0.017	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000

注:NC组为空白对照组,APS组为黄芪多糖对照组,BPD组为高氧诱导支气管肺发育不良模型组,BPD+APS组为黄芪多糖治疗支气管肺发育不良组,IL-6为白介素-6,IL-10为白介素-10,TNF- α 为肿瘤坏死因子- α 。与NC组相比,^a $P < 0.05$;与APS组相比,^b $P < 0.05$;与BPD组相比,^c $P < 0.05$

达升高($P < 0.05$)。与BPD组相比,BPD+APS组建模10、17 d肺组织中IL-6、TNF- α 表达降低,IL-10表达升高($P < 0.05$)。见表2。

2.4 大鼠肺组织中SOD活性和MDA水平 建模10、17 d,NC组和APS组肺组织中SOD活性和MDA水平表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。与NC组、APS组相比,BPD组建模10、17 d肺组织中SOD活性降低,MDA表达升高($P < 0.05$);BPD+APS组建模10 d肺组织中SOD活性降低,MDA表达升高,建模17 d肺组织中SOD活性降低($P < 0.05$)。与BPD组相比,BPD+APS组建模10 d肺组织中SOD活性升高,建模17 d肺组织中SOD活性升高,MDA表达降低($P < 0.05$)。见表3。

表3 SD大鼠64只建模肺组织中SOD活性和MDA水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	SOD/(U/mg)		MDA/(μ mol/g)	
		建模10 d	建模17 d	建模10 d	建模17 d
NC组	16	21.25 $\pm$ 3.79	23.66 $\pm$ 4.05	2.32 $\pm$ 0.76	2.39 $\pm$ 0.81
APS组	16	20.96 $\pm$ 3.50	22.18 $\pm$ 4.18	2.28 $\pm$ 0.64	2.47 $\pm$ 0.56
BPD组	16	11.64 $\pm$ 1.94 ^{ab}	8.96 $\pm$ 1.95 ^{ab}	4.17 $\pm$ 1.05 ^{ab}	4.32 $\pm$ 0.95 ^{ab}
BPD+APS组	16	14.32 $\pm$ 2.54 ^{abc}	16.95 $\pm$ 3.45 ^{abc}	3.57 $\pm$ 0.59 ^{ab}	2.86 $\pm$ 0.71 ^c
F值		20.172	28.467	11.576	10.839
P值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:NC组为空白对照组,APS组为黄芪多糖对照组,BPD组为高氧诱导支气管肺发育不良模型组,BPD+APS组为黄芪多糖治疗支气管肺发育不良组,SOD为超氧化物歧化酶,MDA为丙二醛。与NC组相比,^a $P < 0.05$;与APS组相比,^b $P < 0.05$;与BPD组相比,^c $P < 0.05$

2.5 大鼠肺组织中mir-34a表达水平 变化建模10、17 d,NC组与APS组肺组织中mir-34a差异无统计学意义($P > 0.05$)。与NC组、APS组相比,BPD组、BPD+APS组肺组织中mir-34a表达升高($P < 0.05$);与BPD组相比,BPD+APS组肺组织中mir-34a表达降低($P < 0.05$)。见表4。

表4 SD大鼠64只建模10、17 d肺组织中mir-34a表达水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	mir-34a	
		建模10 d	建模17 d
NC组	16	1.00 $\pm$ 0.12	1.08 $\pm$ 0.11
APS组	16	1.01 $\pm$ 0.15	1.11 $\pm$ 0.13
BPD组	16	2.38 $\pm$ 0.47 ^{ab}	2.28 $\pm$ 0.55 ^{ab}
BPD+APS组	16	1.62 $\pm$ 0.38 ^{abc}	1.49 $\pm$ 0.29 ^{abc}
F值		33.917	24.038
P值		0.000	0.000

注:NC组为空白对照组,APS组为黄芪多糖对照组,BPD组为高氧诱导支气管肺发育不良模型组,BPD+APS组为黄芪多糖治疗支气管肺发育不良组,mir-34a为微小RNA-34a。与NC组相比,^a $P < 0.05$;与APS组相比,^b $P < 0.05$;与BPD组相比,^c $P < 0.05$

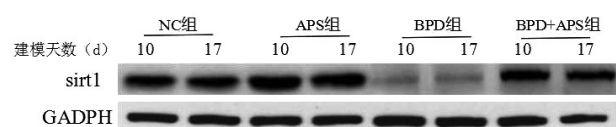
2.6 免疫组化法检测 大鼠肺组织中sirt1表达水平变化棕色代表sirt1阳性,蛋白定位于细胞质。NC组与APS组在建模10、14 d sirt1蛋白阳性表达率差异无统计学意义($P > 0.05$)。与NC组、APS组相比,建模10、14 d BPD组sirt1蛋白阳性表达率降低,BPD+APS组sirt1蛋白阳性表达率升高($P < 0.05$)。与BPD组相比,BPD+APS组建模10、14 d sirt1蛋白阳性表达率升高($P < 0.05$)。见图2、表5。

表5 SD大鼠64只建模10、17 d肺组织中sirt1阳性表达率比较/(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	sirt1阳性表达率	
		建模10 d	建模17 d
NC组	16	8.32 $\pm$ 1.96	28.59 $\pm$ 2.66
APS组	16	9.17 $\pm$ 2.09	28.37 $\pm$ 2.52
BPD组	16	4.33 $\pm$ 0.31 ^{ab}	3.68 $\pm$ 1.03 ^{ab}
BPD+APS组	16	12.51 $\pm$ 2.06 ^{abc}	31.67 $\pm$ 2.15 ^{abc}
F值		28.834	283.835
P值		0.000	0.000

注:NC组为空白对照组,APS组为黄芪多糖对照组,BPD组为高氧诱导支气管肺发育不良模型组,BPD+APS组为黄芪多糖治疗支气管肺发育不良组,sirt1为沉默信息调节因子1。与NC组相比,^a $P < 0.05$;与APS组相比,^b $P < 0.05$;与BPD组相比,^c $P < 0.05$

2.7 蛋白质印迹法检测 大鼠肺组织中 sirt1 表达水平变化 NC 组和 APS 组建模 10、14 d 肺组织中 sirt1 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 NC 组、APS 组相比, BPD 组建模 10、14 d sirt1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。与 BPD 组相比, BPD+APS 组建模 10、14 d sirt1 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。见图 3、表 6。



注: NC 组为空白对照组, APS 组为黄芪多糖对照组, BPD 组为高氧诱导支气管肺发育不良模型组, BPD+APS 组为黄芪多糖治疗支气管肺发育不良组, sirt1 为沉默信息调节因子 1, GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶

图3 蛋白质印迹法检测大鼠建模后肺组织中沉默信息调节因子1 (sirt1) 蛋白表达水平比较

表6 SD 大鼠 64 只建模后肺组织中 sirt1 蛋白表达水平比较 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	sirt1	
		建模10 d	建模17 d
NC 组	16	1.01±0.25	0.98±0.24
APS 组	16	1.09±0.26	1.11±0.23
BPD 组	16	0.11±0.06 ^{ab}	0.15±0.05 ^{ab}
BPD+APS 组	16	0.94±0.14 ^c	1.02±0.18 ^c
F 值		43.368	43.906
P 值		0.000	0.000

注: NC 组为空白对照组, APS 组为黄芪多糖对照组, BPD 组为高氧诱导支气管肺发育不良模型组, BPD+APS 组为黄芪多糖治疗支气管肺发育不良组, sirt1 为沉默信息调节因子 1。与 NC 组相比, ^a $P < 0.05$; 与 APS 组相比, ^b $P < 0.05$; 与 BPD 组相比, ^c $P < 0.05$

3 讨论

BPD 多发生于早产儿, 早产儿出生时体质量低、对氧的依赖性强, 目前炎症反应、氧化应激、宫内感染、气压伤等均会导致肺组织损伤和修复异常^[8]。研究发现早产儿吸入高浓度氧时会增强肺组织炎症, 同时肺组织中出现大量的氧自由基, 最终形成 BPD^[9], 目前尚无确切有效的治疗方法。APS 是豆科多年生草本植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根中经提炼、浓缩制成的, 是黄芪的主要活性成分之一, 具有抗氧化、抗应激、抗衰老、抗肿瘤等作用, 在 BPD 大鼠中可减缓炎症水平从而改善 BPD 病理状态^[10]。本研究发现, 建模 10、17 d, APS 组与 NC 组结果类似, 体质量并未减轻, 肺组织气管和各级支气管结构完整, 肺泡排列整齐, 无间隔破坏, 无炎症细胞浸润现象, 提示 APS 对大鼠安全。建模 10、17 d, 与 APS 组与 NC 组比较, BPD 组大鼠体质量减

轻, 肺组织肺泡数量减少、体积增大, 结构简单化, 炎症现象明显, 提示高氧可导致新生大鼠体质量减轻、肺组织结构破坏, 表明 BPD 大鼠造模成功。与 BPD 组比较, BPD+APS 组大鼠体质量增加, 肺组织肺泡发育较好, 大小均匀, 间隔较均匀, 炎症细胞浸润现象减少, 与 NC 组和 APS 组类似, 提示 APS 可缓解 BPD 造成的大鼠体质量减轻、肺组织结构损伤症状, 但具体作用机制尚不清楚。

炎症因子是参与炎症反应的细胞因子, 其水平反映机体炎症水平。在炎症反应中, IL-6 能诱导急性炎症反应、IL-10 有抗炎作用、TNF- α 是出现最早、最重要的炎症介质^[11]。研究显示, 机械通气可致小鼠肺损伤支气管肺泡灌洗液中 IL-6、TNF- α 水平升高、IL-10 水平降低, 加快肺损伤^[12]。本研究发现建模 10、17 d, NC 组和 APS 组肺组织中 IL-6、IL-10、TNF- α 表达差异无统计学意义, 提示 APS 本身不会增强正常大鼠肺组织炎症反应。与 NC 组、APS 组相比, BPD 组建模 10、17 d 肺组织中 IL-6、TNF- α 表达升高, IL-10 表达降低, 提示高氧诱导 BPD 可提高大鼠肺组织中促炎因子、炎症介质水平, 降低抗炎因子水平从而增强机体炎症反应。与 BPD 组相比, BPD+APS 组建模 10、17 d 肺组织中 IL-6、TNF- α 表达降低, IL-10 表达升高, 提示 APS 治疗可减缓 BPD 诱导的大鼠肺组织炎症反应增强现象, 减缓疾病进程。

SOD 活性和 MDA 水平是最常见的两种氧化应激指标, 其水平反映机体氧化应激水平, 氧化应激指体内氧化与抗氧化作用失衡, 倾向于氧化, 导致中性粒细胞炎性浸润, 蛋白酶分泌增加, 产生大量氧化中间产物, 是导致疾病的一个重要因素^[13]。SOD 是自由基清除酶, 反映抗氧化水平, 具有抗炎能力; MDA 是过氧化反应产物, 可反应过氧化水平^[14]。机械通气致小鼠肺损伤支气管肺泡灌洗液中 SOD 活性下降、MDA 水平升高增强肺损伤^[15]。本研究发现建模 10、17 d, NC 组和 APS 组肺组织中 SOD 活性和 MDA 水平表达差异无统计学意义, 提示 APS 不影响正常大鼠肺组织中氧化应激反应。与 NC 组、APS 组相比, BPD 组建模 10、17 d 肺组织中 SOD 活性降低, MDA 表达升高, 提示 BPD 会使机体抗氧化能力降低, 氧化水平升高, 机体氧化应激反应增强。与 BPD 组相比, BPD+APS 组建模 10 d 肺组织中 SOD 活性升高, 建模 17 d 肺组织中 SOD 活性升高, MDA 表达降低, 提示 APS 可缓解 BPD 诱导的氧化应激反应增强现象, 缓解疾病进程。

miRNA 是一种小分子非编码 RNA, 活性与其靶

基因结合性关系紧密,根据靶基因序列不同,其功能亦差别很大^[16]。miR-34a在各种真核生物中广泛存在,被认为是一种抑癌基因,可作用多个靶基因^[17];sirt1是一种去乙酰化酶,是miR-34a的直接靶基因^[18],研究发现sirt1可作为独立影响机制减弱炎症反应、改善氧化应激及线粒体等功能障碍水平^[19]。缺氧引起心肌细胞损伤会导致miR-34a上调、sirt1下调,从而加速心肌损伤;复氧后miR-34a下调、sirt1上调可保护心肌细胞^[20]。本研究发现,建模10、17 d,NC组与APS组肺组织中miR-34a、sirt1差异无统计学意义,提示APS不影响正常大鼠肺组织中miR-34a/sirt1轴水平。与NC组、APS组相比,BPD组miR-34a表达升高、sirt1表达降低,提示BPD可诱导miR-34a表达升高作用靶基因sirt1降低表达水平,促使炎症反应加剧、氧化应激水平升高。与BPD组相比,BPD+APS组肺组织中miR-34a表达降低、sirt1表达升高,提示APS可减缓BPD诱导的miR-34a升高、sirt1降低现象,降低miR-34a表达、升高sirt1表达,减弱炎症反应、改善氧化应激,实现对BPD大鼠肺损伤的保护作用。

综上所述,APS可能通过抑制miR-34a表达促使其靶基因sirt1上调,从而减缓炎症反应、改善氧化应激状态,减轻肺组织损伤,实现对BPD大鼠肺组织的保护作用。

(本文图1,2见插图10-1)

参考文献

- [1] HOU A, FU J, SHI Y, et al. Decreased ZONAB expression promotes excessive transdifferentiation of alveolar epithelial cells in hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(4): 2339-2349.
- [2] SILVIA C, GÉRALDINE F, ELIE S, et al. Melatonin modulates neonatal brain inflammation through ER stress, autophagy and miR-34a/SIRT1 pathway [J]. *J Pineal Res*, 2016, 61(3): 370-380.
- [3] 季青山, 俞茜, 孙思勤, 等. miR-34a/SIRT1在H₂O₂诱导人晶状体上皮细胞氧化应激中的表达 [J]. *眼科新进展*, 2017, 37(8): 728-731.
- [4] 臧凯宏, 吴建军, 秦红岩, 等. 黄芪多糖对溃疡性结肠炎大鼠肠道黏膜屏障的影响 [J]. *中药材*, 2017, 40(1): 208-211.
- [5] 郑新新, 李富宽, 潘章源, 等. 黄芪多糖的药理作用及其在仔猪疾病防治中应用的研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(10): 274-282.
- [6] HAN W, GUO C, LIU Q, et al. Aberrant elastin remodeling in the lungs of O₂-exposed newborn mice; primarily results from perturbed interaction between integrins and elastin [J]. *Cell Tissue*

- Res*, 2015, 359(2): 589-603.
- [7] 何柳芳, 王卫, 余珍珠, 等. 黄芪多糖对感染型脑室周围白质软化新生大鼠的脑保护作用 [J]. *安徽医学*, 2016, 37(1): 90-93.
- [8] COLLINS C T, MAKRIDES M, MCPHEE A J, et al. Docosahexaenoic acid and bronchopulmonary dysplasia in preterm infants [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(13): 1245-1255.
- [9] 尹玲玲, 叶贞志, 唐丽君, 等. 大黄对高氧致新生大鼠支气管肺发育不良的影响 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2018, 20(5): 410-415.
- [10] 李文, 谈珍, 刘成博, 等. 黄芪多糖APS-II-2对脂多糖所致绒毛膜羊膜炎诱发的肺泡化阻滞的改善作用 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2018, 38(4): 374-379.
- [11] WANG X M, MA Z Y, SONG N. Inflammatory cytokines IL-6, IL-10, IL-13, TNF- α and peritoneal fluid flora were associated with infertility in patients with endometriosis. [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(9): 2513-2518.
- [12] QIU J L, SONG B L, WANG Y J, et al. Role of glutamine in the mediation of E-cadherin, p120-catenin and inflammation in ventilator-induced lung injury [J]. *Chin Med J*, 2018, 131(7): 804-812.
- [13] 沈秀珍, 王凌, 方毅华. 银杏总黄酮通过调节自噬减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤的研究 [J]. *安徽医药*, 2016, 20(6): 1065-1067.
- [14] KARDEŞ S, KARAGÜLLE M, DURAK İ, et al. Association of oxidative stress with clinical characteristics in patients with rheumatoid arthritis [J/OL]. *Eur J Clin Invest*, 2018, 48(1). DOI: 10.1111/eci.12858.
- [15] WU N C, LIAO F T, CHENG H M, et al. Intravenous superoxide dismutase as a protective agent to prevent impairment of lung function induced by high tidal volume ventilation [J]. *BMC Pulm Med*, 2017, 17(1): 105.
- [16] DONG J, LI J, HUANG J, et al. Identification of suitable reference genes for miRNA quantitation in bumblebee (Hymenoptera: Apidae) response to reproduction [J]. *Apidologie*, 2019, 50(15): 40-50.
- [17] GIBORI H, ELIYAHU S, KRIVITSKY A, et al. Amphiphilic nano-carrier-induced modulation of PLK1 and miR-34a leads to improved therapeutic response in pancreatic cancer [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 16-25.
- [18] NATARAJAN S K, STRINGHAM B A, MOHR A M, et al. FoxO3 increases miR-34a to cause palmitate-induced cholangiocyte lipopapoptosis [J]. *J Lipid Res*, 2017, 58(5): 866-875.
- [19] SADEGHI A, SEYYED EBRAHIMI S S, GOLESTANI A, et al. Resveratrol Ameliorates Palmitate-Induced Inflammation in Skeletal Muscle Cells by Attenuating Oxidative Stress and JNK/NF-KB Pathway in a SIRT1-Independent Mechanism [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(9): 2654-2663.
- [20] YANG B, MA S, WANG Y B, et al. Resveratrol exerts protective effects on anoxia/reoxygenation injury in cardiomyocytes via miR-34a/Sirt1 signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(12): 2734-2741.

(收稿日期: 2019-04-12, 修回日期: 2019-10-03)