

黄芪甲苷通过调控 Wnt- β -catenin/JAK-STAT 通路对输血相关性急性肺损伤大鼠的改善作用

唐龙泉¹, 傅梅¹, 龚晓玲², 王文俊², 肖昆^{2*}

(1. 江西省抚州市第一人民医院, 江西 抚州 344000; 2. 南昌大学第一附属医院, 江西 南昌 330006)

摘要: **目的** 探讨黄芪甲苷通过调控 Wnt- β -catenin/JAK-STAT 通路对输血相关性急性肺损伤大鼠的改善作用。**方法** 48 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、黄芪甲苷组、阳性药组, 每组 12 只, 除正常组外, 其余各组均建立输血相关性急性肺损伤模型。免疫组化染色及蛋白免疫印迹法检测 Wnt- β -catenin/JAK-STAT 通路相关蛋白表达, RT-qPCR 法检测 Wnt- β -catenin/JAK-STAT 通路靶基因 mRNA 表达。**结果** 与模型组比较, 黄芪甲苷能降低大鼠动脉氧分压 (PaO₂), 肺组织湿干质量比, 肺组织 Wnt5a、 β -catenin 蛋白表达, GSK-3 β 、JAK、STAT3 蛋白磷酸化水平, *VEGF*、*Axin2*、*KLF4* mRNA 表达, 升高 *Cyclin D1* mRNA 表达。**结论** 黄芪甲苷对急性肺损伤的改善作用可能是通过降低 Wnt5a、 β -catenin 蛋白表达, GSK-3 β 、JAK、STAT3 蛋白磷酸化水平, 以及提高 Wnt- β -catenin/JAK-STAT 通路靶基因 mRNA 表达发挥的, Wnt- β -catenin/JAK-STAT 信号通路参与了黄芪甲苷改善急性肺损伤的过程。

关键词: 黄芪甲苷; 输血相关性急性肺损伤; Wnt- β -catenin/JAK-STAT

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)10-3329-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.10.050

急性肺损伤及其重症形式急性呼吸窘迫综合征是发生在肺部的一种重症炎症反应, 严重者可因呼吸功能受到抑制而危及生命, 患者的肺泡会出现损坏, 肺部没有足够的气流进入, 进一步导致血液中氧含量严重不足, 与此同时, 患者肺部还会出现炎症导致的水肿^[1-2]。许多因素可以引起急性肺损伤, 例如脓毒症、脂多糖刺激及输血相关的外伤等^[3]。其中输血相关性急性肺损伤 (transfusion-related acute lung injury, TRALI) 是指使用与血液有关制品后引起的肺组织急性损伤, 发病迅速, 致死率高, 但临床尚无可靠的治疗方法^[4-5]。黄芪具有抗氧化、消炎以及扩张血管等作用, 其有效成分对肺损伤有一定的治疗作用。黄芪甲苷是黄芪的有效成分^[6-8], 其对输血相关性急性肺损伤的作用机制尚未有相关文献报道。Wnt/ β -catenin 通路在受损的组织复原、伤口愈合、组织纤维化等中起着重要作用^[9-10]; JAK2/STAT3 通路是细胞中不可缺少的信号转导通路, 它能够调控细胞分裂、凋亡和炎症因子等表达^[11-12]。本研究基于 Wnt- β -catenin/JAK2-STAT3 信号通路, 探讨黄芪甲苷对输血相关性急性肺损伤大鼠的保护作用, 以期对输血相关性急性肺损伤的治疗提供参考。

1 材料

1.1 动物 48 只 6 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 180~220 g, 购自广东省医学动物实验中心, 实验动物生产许可证号 SCXK (粤) 2018-0002, 实验动物使用许可证号 SYXK

(粤) 2018-0002, 饲养于标准动物饲养间。

1.2 试剂与药物 黄芪甲苷对照品 (纯度 $\geq 98\%$, 批号 MUST-09102301) 购自上海源叶生物科技有限公司; 地塞米松 (批号 100129-200303) 购自湖北纽兰药业有限公司; LPS (批号 L4391-IMG) 购自上海源叶生物科技有限公司; Wnt5a、p-GSK-3 β 、GSK-3 β 、 β -catenin、p-JAK2、JAK2、p-STAT3、STAT3 抗体 (批号 bs-1948R、AG763、AG751、71-2700、3776、74987、9145、9139) 购自美国 Proteintech 公司; 蛋白、mRNA 裂解液 (批号 G1120、C1053) 购自上海泛思生物科技有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒、化学发光底物、HE 染色液 (批号 23227、BL520B-1、WH1144) 购自美国 OriGene 公司。其他试剂均为分析纯。

1.3 血浆 2019 年 2 月随机选择无偿献血者 AB 型全血 10 U (1 U 含全血 200 mL 及 CPDA 保存液 30 mL), 无菌条件下分别留取血样 10 份 (10 mL/份), 存储 21 d, 830 \times g 离心 5 min, 获得血浆约 6 mL/份, 分装 6 份 (1 mL/份), 于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。输注前将血浆于 56 $^{\circ}$ C 水浴 30 min。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 大鼠随机分为正常组、模型组、黄芪甲苷组和阳性药组, 每组 12 只。除正常组外, 其余各组大鼠均建立输血相关性急性肺损伤模型^[13], 腹腔注射 2 mg/kg LPS, 2 h 后麻醉, 在股血管处插管, 用注射器抽出 1 mL 血液, 再输注 1 mL AB 型人血浆, 正常组大鼠抽出

收稿日期: 2021-03-03

基金项目: 江西省卫生健康委员会科技计划项目 (202130240)

作者简介: 唐龙泉 (1969—), 男, 副主任技师, 研究方向输血技术。Tel: 13707949617, E-mail: 459849886@qq.com

* 通信作者: 肖昆, 男, 硕士, 中级技师, 研究方向输血技术。Tel: 13979169920

血液后输注 1 mL 0.9% NaCl。模型建立后，黄芪甲苷组腹腔注射黄芪甲苷（50 mg/kg，用 0.9% NaCl 溶液配置成 1 mL 黄芪甲苷注射液），阳性药组腹腔注射地塞米松（50 mg/kg），正常组和模型组腹腔注射等体积 0.9% NaCl，24 h 后处死大鼠，取血和肺组织用于各指标检测。

2.2 肺组织湿干质量比检测 将分离的肺组织用 PBS 洗涤后称定质量，记作湿质量 W_A ；随后将肺组织放入 80 °C 烤箱烘烤至恒重再次称定质量，记作干质量 W_B ，肺组织湿干质量比 = $(W_A/W_B) \times 100\%$ 。

2.3 部分动脉氧分压 (PaO_2) 检测 通过一次性注射器采集大鼠动脉血 0.2 mL，采用血气分析仪 ABL90，按照产品说明书进行检测。

2.4 HE 染色观察肺组织病理形态 各组大鼠肺组织用 10% 中性甲醛固定后石蜡包埋切片，经 HE 染色后光镜下 ($\times 200$) 观察拍照。HE 染色病理评分标准为 1 分，无肺炎；2 分，小于 20% 的视野呈现肺炎；3 分，21% ~ 50% 视野呈现肺炎；4 分，超过半数视野呈现弥漫性肺炎。

2.5 免疫组织化学染色分析 Wnt5a 蛋白表达 大鼠肺组织石蜡切片经脱蜡后进行抗原修复，3% H_2O_2 孵育 10 min，滴加血清室温封闭 1 h，滴加一抗 (1:50) 4 °C 孵育过夜，PBS 冲洗，滴加辣根酶标记二抗室温孵育 1 h，PBS 冲洗，DAB 显色，显微镜拍摄肺泡上皮细胞，每张切片选择 5 个视野 ($\times 200$)，空白对照采用抗体稀释液代替一抗。

2.6 Western blot 法检测 β -catenin、GSK-3 β 、JAK2、STAT3 蛋白表达 蛋白裂解液裂解肺组织，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液即得总蛋白，BCA 法进行蛋白定量，将蛋白与上样缓冲液混合后于 100 °C 煮沸 5 min，蛋白样品采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行分离，随后转移到 PVDF 膜上，5% 脱脂奶粉封闭 1 h，加入一抗 (β -catenin、GSK-3 β 、JAK2、STAT3) 4 °C 孵育过夜，PBS 洗涤，加入带有辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h，PBS 洗涤，使用化学发光液进行显色，成像系统上进行曝光，分析条带灰度值，以 GAPDH 作为内参，计算目的蛋白相对表达。

2.7 RT-qPCR 法检测 *Axin2*、*Cyclin D1*、*KLF4*、*VEGF* mRNA 表达 取出大鼠肺组织，按 TRIzol 试剂盒说明书进行裂解并提取总 RNA，并按说明书将其反转录成 cDNA。在冰上配置 50 μ L PCR 扩增反应体系，即 2 \times SYBR 25 μ L、正反向引物各 1 μ L、cDNA 2 μ L、双蒸水 20.7 μ L、Taq DNA Polymerase 0.3 μ L，于在 PCR 仪上反应，条件为预孵育 95 °C 120 s；扩增 95 °C 20 s，59 °C 25 s，72 °C 30 s，共 45 个循环。以 *GAPDH* 作为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因 mRNA 相对表达。引物序列见表 1。

2.8 统计学分析 通过 GraphPad Prism 5、SPSS 22.0 软件进行处理，数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，2 组间比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芪甲苷对输血相关性急性肺损伤大鼠肺组织湿干质

表 1 引物序列

引物	序列	长度/bp
<i>Axin2</i>	正向 5'-ACGACGAGGACTGGAAAT-3'	201
	反向 5'-TCCCGTGTGACATAGTAAGG-3'	
<i>KLF4</i>	正向 5'-AAAGAACAGCCACCCACACT-3'	109
	反向 5'-TGTAAGGTTTCTCGCCTGT-3'	
<i>Cyclin D1</i>	正向 5'-TTCTTCTGCTGACACTCTGGGATA-3'	251
	反向 5'-GCTCAAGTCGAGGACACTGGTTA-3'	
<i>VEGF</i>	正向 5'-AGAAGGAGGAGGCAGAATCA-3'	326
	反向 5'-CAAATGCTTTCTCGCTCTGA-3'	
<i>GAPDH</i>	正向 5'-CAAGTTCACGGCAG-3'	138
	反向 5'-CCAGTAGACTCCACGACAT-3'	

量比的影响 如表 2 所示，模型组大鼠肺组织湿干质量比高于正常组 ($P < 0.05$)；黄芪甲苷组及阳性药组大鼠肺组织湿干质量比低于模型组 ($P < 0.05$)。

表 2 黄芪甲苷对大鼠肺组织湿干质量比的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/($mg \cdot kg^{-1}$)	肺湿干比/%
正常组	—	4.50 \pm 0.18
模型组	—	5.79 \pm 0.19 [#]
黄芪甲苷组	50	5.44 \pm 0.17 [*]
阳性药组	50	5.21 \pm 0.18 [*]

注：与正常组比较，[#] $P < 0.05$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ 。

3.2 黄芪甲苷对输血相关性急性肺损伤大鼠动脉氧分压的影响 如表 3 所示，模型组大鼠动脉氧分压低于正常组 ($P < 0.05$)；黄芪甲苷组及阳性药组大鼠动脉氧分压高于模型组 ($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠动脉氧分压比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$, 1 mmHg = 0.133 kPa)

组别	剂量/($mg \cdot kg^{-1}$)	动脉氧分压/mmHg
正常组	—	96.45 \pm 5.63
模型组	—	67.14 \pm 5.34 [#]
黄芪甲苷组	50	77.21 \pm 4.68 [*]
阳性药组	50	75.31 \pm 5.83 [*]

注：与正常组比较，[#] $P < 0.05$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ 。

3.3 黄芪甲苷对输血相关性急性肺损伤大鼠肺组织病理形态的影响 如图 1、表 4 所示，正常组大鼠肺组织肺泡结构比较清晰，未发现充血、炎症细胞浸润、水肿等病理现象；与正常组比较，模型组大鼠肺组织有较大幅度的出血，肺泡腔里有大量炎性细胞浸润，出现了明显的肺水肿，肺泡间隔也有所加宽，病理评分升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，黄芪甲苷组大鼠肺泡壁增厚程度较轻，有少量充血，阳性药组病变程度有所改善，病理评分降低 ($P < 0.05$)。

3.4 黄芪甲苷对输血相关性急性肺损伤大鼠肺组织 Wnt5a 蛋白表达的影响 如图 2、表 5 所示，正常组大鼠肺组织 Wnt5a 蛋白阳性表达较低；与正常组比较，模型组 Wnt5a 蛋白阳性表达增加 ($P < 0.05$)；与模型组比较，黄芪甲苷组及阳性药组 Wnt5a 蛋白阳性表达降低 ($P < 0.05$)。

3.5 黄芪甲苷对输血相关性急性肺损伤大鼠肺组织 Wnt- β -catenin/JAK-STAT 通路相关蛋白表达的影响 如图 3 所

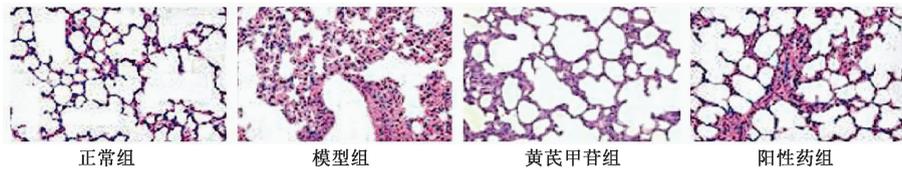


图1 各组肺组织 HE 染色结果 (×200)

表4 各组大鼠肺组织病理评分比较 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	评分/分
正常组	—	1.00±0
模型组	—	3.58±0.52 [#]
黄芪甲苷组	50	2.67±0.49 [*]
阳性药组	50	2.75±0.45 [*]

注:与正常组比较,[#]*P*<0.05,与模型组比较,^{*}*P*<0.05。

表5 各组大鼠肺组织 Wnt5a 蛋白阳性表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Wnt5a 蛋白相对表达
正常组	—	1.00±0
模型组	—	4.03±0.52 [#]
黄芪甲苷组	50	2.86±0.42 [*]
阳性药组	50	2.92±0.45 [*]

注:与正常组比较,[#]*P*<0.05;与模型组比较,^{*}*P*<0.05。

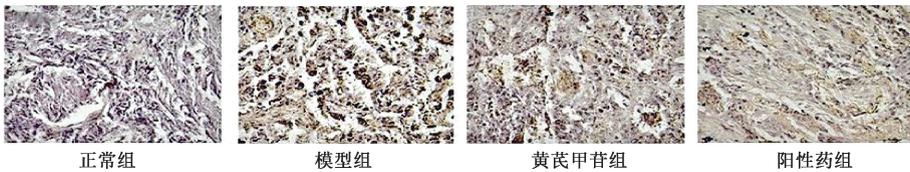
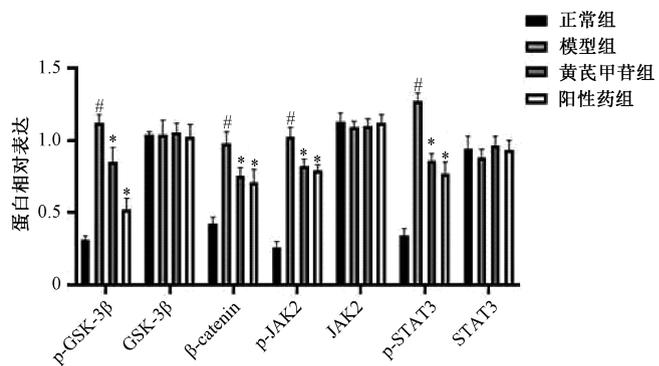
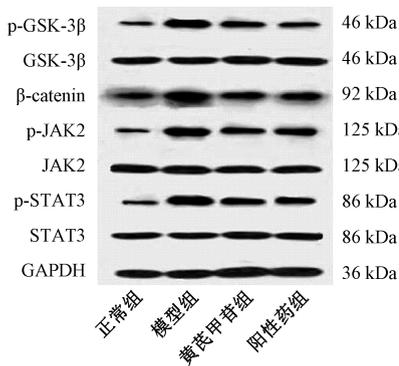


图2 Wnt5a 在各组大鼠肺组织中的表达 (×200)

示,与正常组比较,模型组大鼠肺组织 p-GSK-3β、p-JAK2、p-STAT3、β-catenin 表达均升高 (*P*<0.05);与模型

组比较,黄芪甲苷组和阳性药组大鼠肺组织 p-GSK-3β、p-JAK2、p-STAT3、β-catenin 表达均降低 (*P*<0.05)。



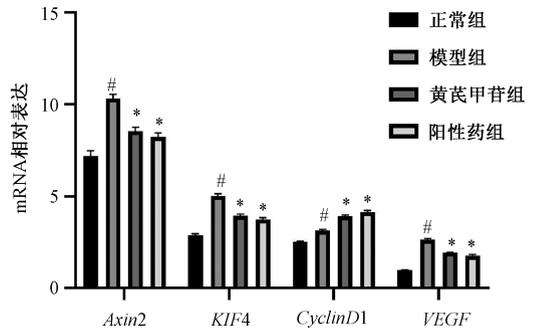
注:与正常组比较,[#]*P*<0.05;与模型组比较,^{*}*P*<0.05。

图3 各组大鼠肺组织 Wnt-β-catenin/JAK-STAT 通路相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

3.6 黄芪甲苷对输血相关性急性肺损伤大鼠肺组织 Wnt-β-catenin/JAK-STAT 通路相关靶基因 mRNA 表达的影响 如图4所示,与正常组比较,模型组大鼠肺组织 *Axin2*、*KLF4*、*Cyclin D1*、*VEGF* mRNA 表达均升高 (*P*<0.05);与模型组比较,黄芪甲苷组及阳性药组大鼠肺组织 *Axin2*、*KLF4*、*VEGF* mRNA 表达降低 (*P*<0.05), *Cyclin D1* mRNA 表达升高 (*P*<0.05)。

4 讨论

在当今学说中,“二次打击”被认为是造成输血相关性急性肺损伤的重要原因,第一次打击是患者伴有重大感染等情形可以导致中性粒细胞的活化,从而使其能躲藏在肺里;第二次打击是将含白细胞抗体的血液输注到患者体内,其中的白细胞抗体和患者体内的白细胞产生了抗原-抗体免疫反应,使患者的补体和肺微血管内皮细胞 Fcγ 受体被激



注:与正常组比较,[#]*P*<0.05;与模型组比较,^{*}*P*<0.05。

图4 各组大鼠肺组织 Wnt-β-catenin/JAK-STAT 通路相关靶基因 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

发,导致中性粒细胞的进一步活化,给肺血管内皮细胞造成沉重打击,改变其通透性,使得血管中的物质更容易进

入肺泡及肺泡间质,导致肺水肿,呼吸膜加厚,引起各时间点氧气进入血液中的含量不一致,最终的结果便是导致输血相关性急性肺损伤^[14-15]。在上述理论的指导下,大鼠腹腔注射低剂量 LPS,营造一种中性粒细胞在肺循环中激活的状态,模拟患者输血后肺部损伤的情况,建立输血相关性急性肺损伤大鼠模型,建模后 24 h 检测大鼠肺部病理特征、肺组织湿干质量比和 PaO₂。结果,模型组大鼠肺组织湿干质量比增加,PaO₂降低,肺组织有不同程度的肺泡结构被破坏、肺间质变宽、肺水肿及炎症细胞浸润等表现;给予黄芪甲苷后,大鼠肺水肿及损伤情况有所缓解。

研究表明,Wnt-β-catenin/JAK-STAT 信号通路对机体不同生理过程都有一定的影响^[16-19]。当发生了肺损伤时,Wnt 信号的过度激活或许会引起胞外物质的大量释放,导致肺组织的纤维化,也可以促进肺上皮细胞的过度增殖^[20]。JAK-STAT 通路可以参与目的基因的转录以及炎症因子的表达^[21]。本研究发现,Wnt-β-catenin 通路的配体 Wnt5a 参与到了黄芪甲苷治疗输血相关性急性肺损伤的过程中,与此同时,Wnt-β-catenin/JAK-STAT 通路胞内分子 GSK-3β、JAK2 以及 STAT3 的磷酸化和 β-catenin 表达也参与到该过程中。本研究还发现,黄芪甲苷组 Wnt-β-catenin/JAK-STAT 通路的靶基因 *Axin2*、*KLF4* 及 *VEGF* mRNA 表达均降低,*Cyclin D1* mRNA 表达升高。

综上所述,本研究初步解释了黄芪甲苷对输血相关性急性肺损伤的改善作用是通过抑制 Wnt5a 表达,降低 GSK-3β、β-catenin、JAK2、STAT3 蛋白磷酸化及提高 Wnt-β-catenin/JAK-STAT 信号靶基因的表达得以发挥的,提示促进 Wnt-β-catenin/JAK-STAT 通路的活化或许能够成为治疗输血相关性急性肺损伤的新手段。

参考文献:

[1] 郑东,董菲,庞萌,等. 含利妥昔单抗化疗方案治疗弥漫大 B 细胞淋巴瘤致急性肺损伤患者 26 例临床分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2020, 28(6): 1919-1922.

[2] Su X, Liu K, Xie Y, et al. Mushroom *Inonotus sanghuang* alleviates experimental pulmonary fibrosis: Implications for therapy of pulmonary fibrosis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 110909.

[3] 路建,周红梅,朱志鹏,等. 远隔缺血预处理联合右美托咪定对肺功能不全老年患者开胸围术期肺损伤和术后肺部并发症的影响[J]. 中华老年医学杂志, 2016, 35(4): 381-386.

[4] Roubinian N H, Triulzi D J. Transfusion-associated circulatory overload and transfusion-related acute lung injury: Etiology and prevention[J]. *Hematology*, 2019, 33(5): 767-779.

[5] 胡媛,陈唯韞,黄宇光. 输血相关性急性肺损伤发病机制及防治措施研究进展[J]. 中国医学科学院学报, 2020, 42(5): 674-680.

[6] Lu R R, Chen J Q, Liu B H, et al. Protective role of astragaloside IV in chronic glomerulonephritis by activating autophagy through PI3K/AKT/AS160 pathway [J]. *Phytother Res*, 2020, 34(12): 3236-3248.

[7] Huang R Q, Li M. Protective effect of astragaloside IV against

sepsis-induced acute lung injury in rats [J]. *Saudi Pharm J*, 2016, 24(3): 341-347.

[8] Liu B W, Zhao H, Wang Y H, et al. Astragaloside IV attenuates lipopolysaccharides-induced pulmonary epithelial cell injury through inhibiting autophagy [J]. *Pharmacology*, 2020, 105(1-2): 90-101.

[9] 张春阳,祝艳,冯华松. 间充质干细胞对放射性肺损伤小鼠肺组织中 Wnt/β-catenin 通路的影响[J]. 国际呼吸杂志, 2018, 38(14): 1061-1066.

[10] 严隆丽,全裕凤,张华,等. SOX9 及 WNT 信号通路分子在高氧暴露致早产大鼠肺损伤中的表达及意义[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(4): 552-557.

[11] Luo J, Lu S, Yu M, et al. The potential involvement of JAK-STAT signaling pathway in the COVID-19 infection assisted by ACE2 [J]. *Gene*, 2020, 768: 145325.

[12] Luo W, Li Y X, Jiang L J, et al. Targeting JAK-STAT signaling to control cytokine release syndrome in COVID-19 [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2020, 41(8): 531-543.

[13] 顾培红. 痰热清联合人羊膜间充质干细胞移植对输血相关性急性肺损伤的保护 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(21): 3358-3363.

[14] McVey M J, Kapur R, Cserti-Gazdewich C, et al. Transfusion-related acute lung injury in the perioperative patient [J]. *Anesthesiology*, 2019, 131(3): 693-715.

[15] Rebetz J, Semple J W, Kapur R. The pathogenic involvement of neutrophils in acute respiratory distress syndrome and transfusion-related acute lung injury [J]. *Transfus Med Hemother*, 2018, 45(5): 290-298.

[16] Pan Y H, Lu T, Peng L, et al. Vacuolar protein sorting 4B regulates the proliferation and odontoblastic differentiation of human dental pulp stem cells through the Wnt-β-catenin signalling pathway [J]. *Artif Cell Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 2575-2584.

[17] Wu S Y, Yu Q, Lai A L, et al. Pulsed electromagnetic field induces Ca²⁺-dependent osteoblastogenesis in C3H10T1/2 mesenchymal cells through the Wnt-Ca²⁺/Wnt-β-catenin signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(2): 715-721.

[18] Pu J H, Chen D J, Chu S F, et al. miR-122 regulates the JAK-STAT signalling pathway by down-regulating *EPO* in the mammary gland during *Streptococcus agalactiae*-induced mastitis [J]. *Ital J Anim Sci*, 2020, 19(1): 1236-1243.

[19] Li M, Zheng R, Yuan F L. MiR-410 affects the proliferation and apoptosis of lung cancer A549 cells through regulation of SOCS3/JAK-STAT signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(22): 11462.

[20] 宋玲莉,李海,陶晓根,等. 信号转导通路与肺纤维化关系的研究进展 [J]. 中华卫生应急电子杂志, 2017, 3(4): 242-252.

[21] 王国全,李莎,晁旭,等. 清瘟败毒饮对脓毒症急性肺损伤大鼠 p38MAPK 和 JAK2/STAT3 信号通路的干预作用 [J]. 中医学报, 2018, 33(11): 2076-2082.