

螺旋藻多糖对脂多糖诱导小鼠急性肝损伤的保护作用

张 敬， 董 梁， 刘彦玲*
(衡水市人民医院，河北 衡水 053000)

摘要：目的 探讨螺旋藻多糖对脂多糖（LPS）诱导小鼠肝损伤的保护作用及其机制。方法 将雄性 C57BL/6 小鼠随机分为正常组、脂多糖组和螺旋藻多糖低、高剂量组（25、100 mg/kg），每组 8 只。采用 HE 染色法观察小鼠肝组织病理学改变，试剂盒检测肝组织相关蛋白酶水平，免疫组织化学法检测肝组织促炎因子肿瘤坏死因子 α （TNF- α ）和白细胞介素-6（IL-6）的表达和分布，酶联免疫吸附法（ELISA）检测肝组织 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 水平，蛋白质免疫印迹法（Western blot）检测核转录因子- κ B（NF- κ B）相关蛋白的表达。结果 螺旋藻多糖预处理改善了 LPS 诱导小鼠肝组织病理形态学损伤及氧化应激状态（ $P<0.01$ ），降低肝组织相关蛋白酶水平和促炎因子表达（ $P<0.01$ ），并剂量依赖性地降低 NF- κ B 相关蛋白表达（ $P<0.01$ ）。结论 螺旋藻多糖预处理可以减轻 LPS 诱导的小鼠肝损伤，其机制可能与抑制炎症和抗氧化应激有关。

关键词：螺旋藻多糖；急性肝损伤；炎症；氧化应激

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**B **文章编号：**1001-1528(2022)10-3333-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.10.051

脓毒血症是全身性炎症的指征，与内毒素、真菌、局部缺血或再灌注或组织损伤引起的感染性侵袭有关，并与病原体成分和 Toll 样受体相互作用引发的炎症反应相关^[1]，脓毒症患者会出现肝损伤^[1]。脂多糖（LPS）刺激库普弗细胞释放促炎性细胞因子^[2]，调节氧化状态并最终导致肝损伤^[3]。TNF- α 是内毒素休克的主要介质，并且还激活活天蛋白酶依赖性凋亡信号转导^[4]，其介导的肝细胞凋亡与 LPS 诱导的肝损伤有关^[5]。由于 LPS 刺激一氧化氮合酶（iNOS）和环氧合酶-2（COX-2）的合成^[6]，还能激活并诱导转录因子核因子- κ B（NF- κ B），这在肝细胞炎症和凋亡中起关键作用^[7]。

螺旋藻蓝藻是一种蓝绿色藻类，从中提取的多糖为螺旋藻多糖，由鼠李糖、木糖、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯吡喃糖葡萄糖醛酸组成^[8-9]。螺旋藻多糖参与多种生物学功能，包括抗衰老，降低高胆固醇血症，促进蛋白质合成，增强免疫功能和抗辐射等，其在生物体中发挥抑制炎症和抗氧化应激的作用^[10]。因此，本研究将探索螺旋藻多糖对 LPS 诱导小鼠肝损伤的作用及机制。

1 材料

1.1 试剂与药物 螺旋藻多糖购自三亚海王海洋生物科技有限公司。衍生自大肠杆菌（O26：B6）的脂多糖购自美国 Sigma 公司；蛋白质测定试剂盒、兔抗 IL-6、兔 TNF- α 、小鼠抗 β -actin、兔和小鼠二抗体均购自美国 Santa Cruz 公司；兔抗 NF- κ B p65、iNOS、COX-2 购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 动物 雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠，6~8 周龄，体重 22~25 g，购自广州医科大学实验动物中心，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，经广州医科大学动物保护委员会批准。小鼠饲养在温度 22℃ 条件下，提供正常饮食，适应 1 周后开始实验。

2 方法

2.1 造模、分组及给药 参考文献 [10] 报道方法，小鼠随机分为正常组、脂多糖组和螺旋藻多糖低、高剂量组，每组 8 只。螺旋藻多糖低、高剂量组灌胃给予螺旋藻多糖 25、100 mg/kg，正常组和脂多糖组灌胃给予等量蒸馏水，连续给药 2 d 后进行造模，脂多糖组和螺旋藻多糖组腹腔注射 1 mg/kg LPS，正常组腹腔注射等剂量磷酸盐缓冲液（PBS），12 h 后处死小鼠，收集血液和肝组织。

2.2 苏木素-伊红染色 肝组织用 10% 中性福尔马林缓冲液固定，包埋在石蜡中，并依次切成 5 μ m 厚的切片，进行苏木精-伊红（HE）染色，并于显微镜下观察组织病理学变化并拍照。

2.3 肝组织相关蛋白酶水平检测 使用 ALT/AST 检测试剂盒检测血清 ALT、AST 活性来评估肝损伤，使用 CytoTox96 非放射性细胞毒性测定法检测血清 LDH 活性。在等渗盐水中清洗肝组织，吸去多余盐水，在 5% 偏磷酸（20 mL/g）中匀浆，4℃、14 000 r/min 离心 15 min，使用相应试剂盒检测丙二醛（MDA）、活性氧族（ROS）、总谷胱甘肽（GSH）水平。

收稿日期：2021-06-07

基金项目：衡水市科技计划（2018014013Z）

作者简介：张 敬（1984—），主管护师，研究方向为生殖医学。Tel：13722817166，E-mail：yangting177246@163.com

* 通信作者：刘彦玲（1965—），女，副主任医师，研究方向为感染性疾病。Tel：（0318）2181234

2.4 免疫组织化学染色检测 TNF- α 、IL-6 表达 将石蜡切片在 65 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱中烘烤 24 h, 脱蜡后用 PBS 冲洗, 置于 EDTA 缓冲液中进行微波抗原修复, PBS 洗涤后放入 3% 过氧化氢溶液中, 室温放置 10 min, 以阻断内源性过氧化物酶活性, PBS 洗涤后, 用 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 室温封闭 20 min, 每个切片加 50 μL 稀释后的 TNF- α 、IL-6 一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 洗涤后, 加 50~100 μL 山羊抗兔辣根过氧化物酶偶联的二抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 50 min, PBS 洗涤后 DAB 显色, 终止显色后用苏木精复染 5 min, 自来水冲洗, 脱水, 封片, 于显微镜下观察, 黄色或棕色沉积即为阳性表达。

2.5 ELISA 法检测 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 水平 收集肝组织匀浆后取上清液, 根据试剂盒说明书检测 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 水平。

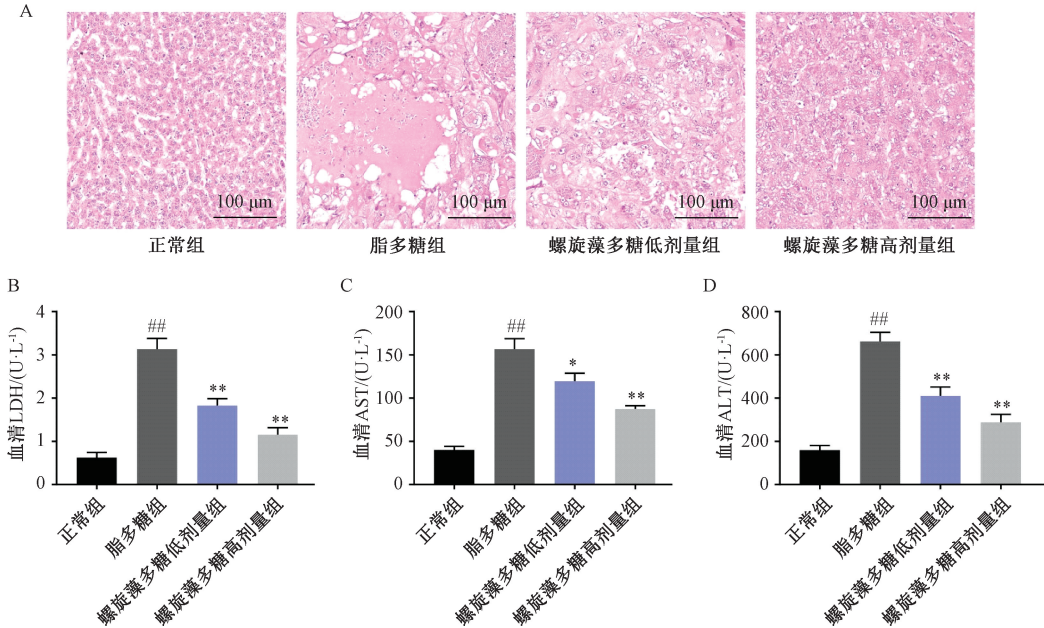
2.6 Western blot 法检测 NF- κB 相关蛋白表达 将冷冻的肝组织用 RIPA 缓冲液裂解 40 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 20 min, 提

取总蛋白质。用 SDS-PAGE 电泳, 然后转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 将膜与一抗稀释液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜, TBST 洗涤 4 次, 与结合 HRP 的二抗孵育 45 min, TBST 洗涤 4 次, 然后使用增强的化学发光检测试剂盒进行发光, 并用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.7 统计学分析 通过 GraphPad Prism 5.0 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 螺旋藻多糖对 LPS 诱导小鼠肝功能及病理形态的影响 正常组小鼠肝组织结构正常; 脂多糖组小鼠肝结构丧失, 部分细胞核消失, 大量炎性细胞浸润; 螺旋藻多糖各剂量组均能改善肝脏结构, 见图 1A。脂多糖组小鼠血清 LDH、ALT、AST 活性均高于正常组 ($P<0.01$); 与脂多糖组比较, 螺旋藻多糖组剂量依赖性地降低血清 LDH、ALT、AST 活性 ($P<0.05$), 见图 1B~1D。



注: 与正常组比较, ## $P<0.01$; 与脂多糖组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 1 螺旋藻多糖对 LPS 诱导小鼠肝损伤的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

3.2 螺旋藻多糖对 LPS 诱导小鼠肝组织氧化应激水平的影响 如图 2 所示, 与正常组比较, 脂多糖组小鼠肝组织 MDA、ROS 水平升高 ($P<0.01$), GSH 水平降低 ($P<0.01$); 与脂多糖组比较, 螺旋藻多糖组剂量依赖性地降低了小鼠肝组织 MDA、ROS 水平 ($P<0.05$, $P<0.01$), 升高了 GSH 水平 ($P<0.05$, $P<0.01$), 提示螺旋藻多糖有效改善 LPS 诱导的小鼠肝组织氧化应激状态。

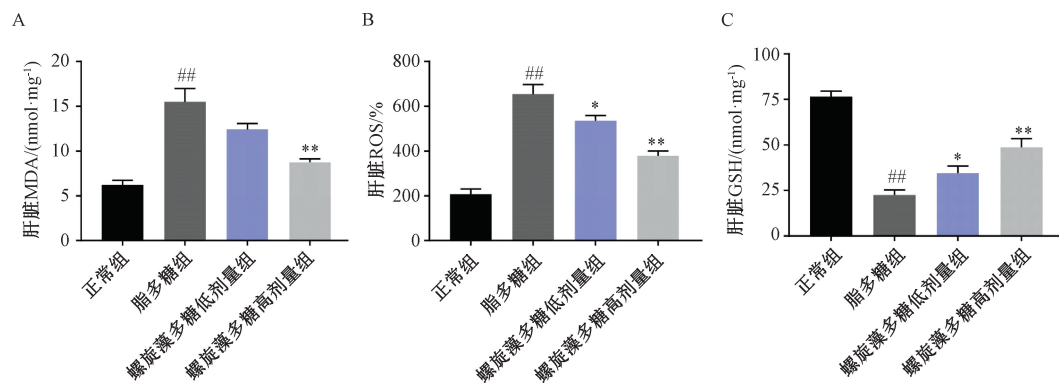
3.3 螺旋藻多糖对 LPS 诱导小鼠肝组织 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 水平的影响 如图 3A~3B 所示, 与正常组比较, 脂多糖组小鼠肝组织 TNF- α 、IL-6 阳性表达增加; 与脂多糖组比较, 螺旋藻多糖组 TNF- α 、IL-6 阳性表达降低。如图 3C~3F 所示, 与正常组比较, 脂多糖组小鼠肝组织促炎因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 水平升高 ($P<0.01$);

与脂多糖组比较, 螺旋藻多糖组剂量依赖性地降低 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 水平 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

3.4 螺旋藻多糖对 LPS 诱导小鼠肝组织 NF- κB p65、iNOS、COX-2 蛋白表达的影响 如图 4 所示, 与正常组比较, 脂多糖组小鼠肝组织 NF- κB p65、iNOS、COX-2 蛋白表达升高 ($P<0.01$); 与脂多糖组比较, 螺旋藻多糖组剂量依赖性地降低小鼠肝组织 NF- κB p65、iNOS、COX-2 蛋白表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

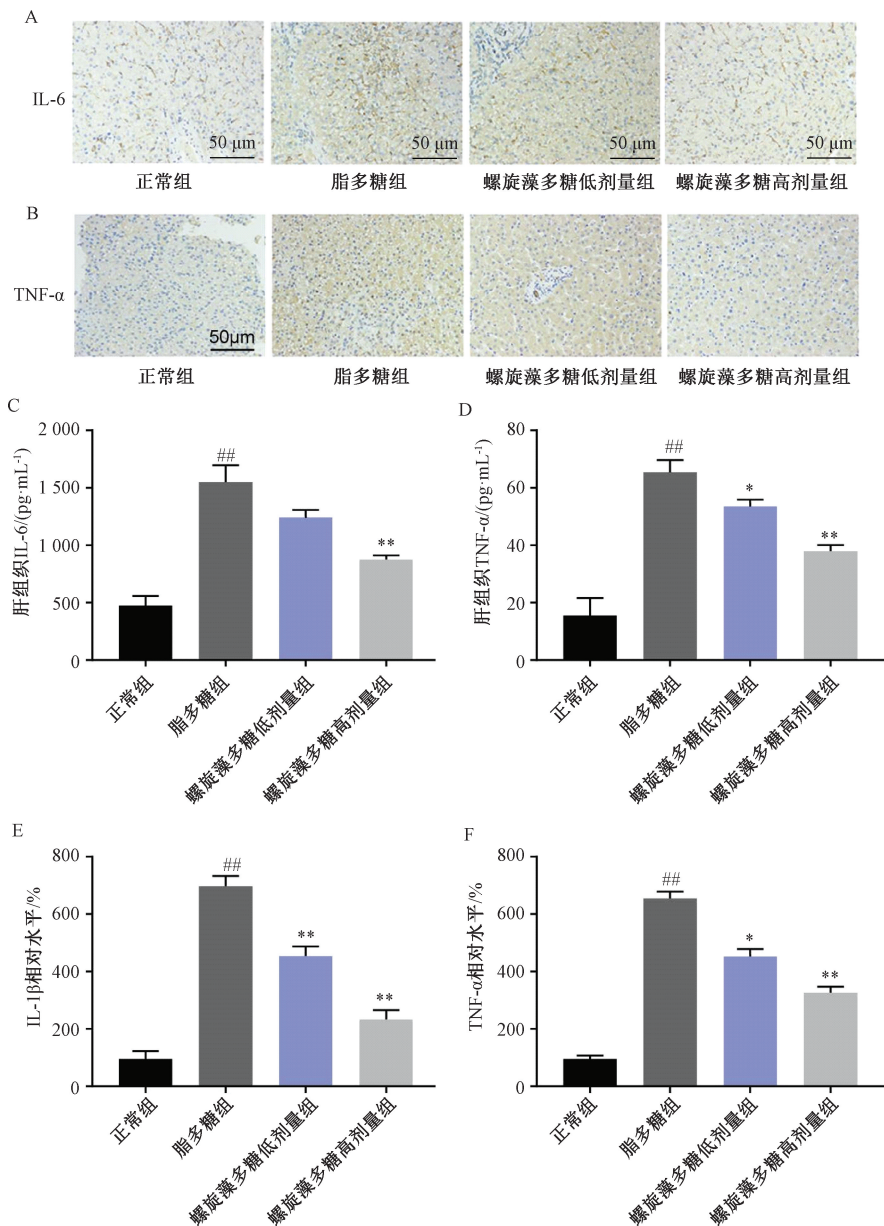
4 讨论

螺旋藻多糖的抗氧化和抗炎特性是由于抑制 NF- κB 活化而引起的^[11-12]。脂多糖破坏小鼠的肝脏形态并增加肝脏酶^[13]。AST、ALT、LDH 通常位于细胞质中, 其活性增加是肝结构损伤的标志^[14]。由于休克或坏死, 厌氧条件下肝



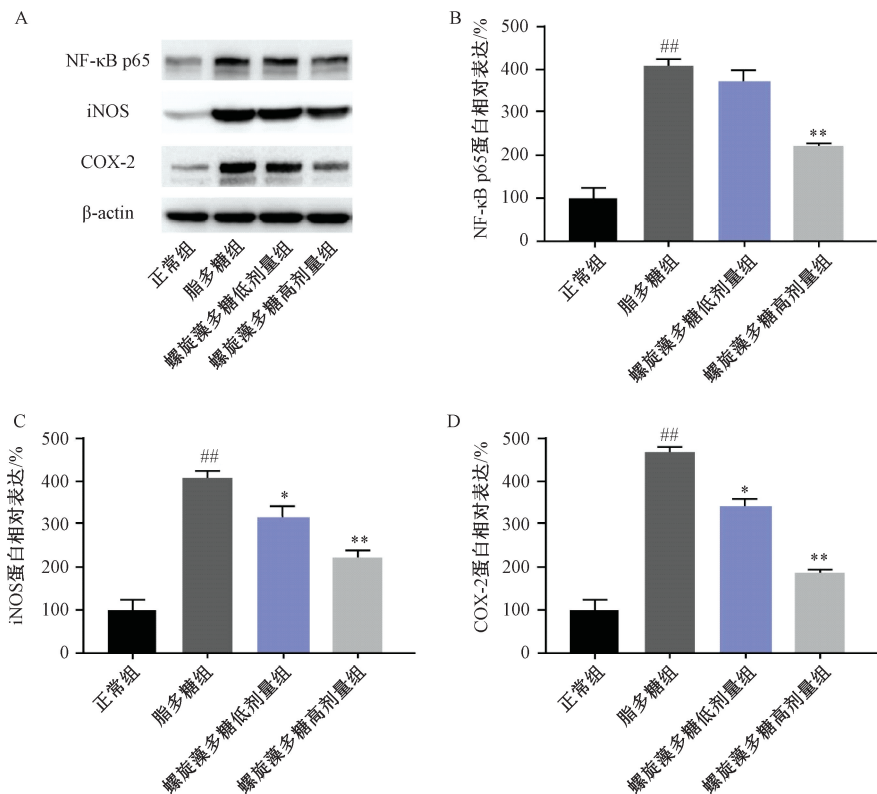
注：与正常组比较，^{##}*P*<0.01；与脂多糖组比较，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01。

图 2 螺旋藻多糖对小鼠肝组织 MDA、ROS、GSH 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=8)



注：与正常组比较，^{##}*P*<0.01；与脂多糖组比较，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01。

图 3 螺旋藻多糖对小鼠肝组织 TNF-α、IL-6、IL-1β、IFN-γ 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=8)



注：与正常组比较，##*P* < 0.01；与脂多糖组比较，**P* < 0.05，***P* < 0.01。

图 4 螺旋藻多糖对小鼠肝组织 NF-κB p65、iNOS、COX-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n* = 8)

细胞会产生过量的 LDH，血清 AST、ALT、LDH 活性升高，肝组织产生空泡、肝结构丧失、细胞坏死^[15]。本研究发现，螺旋藻多糖预处理可减少 LPS 诱导的肝组织形态异常和肝酶升高。LPS 可以降低肝脏的抗氧化能力，并导致氧化应激和肝损伤^[16]。本研究发现，LPS 耗尽了具有过氧化氢和过氧化物酶清除活性的 GSH 等抗氧化剂。超氧化物歧化酶与 ROS 增加有关，并防止氧化应激引起的细胞损伤^[17]。此外，螺旋藻多糖预处理增加了小鼠肝组织 GSH 水平。败血症与全身性炎症反应和抗炎失衡有关，这种失衡引起不可逆器官损伤^[14]。LPS 可增强炎症介质如 TNF-α、IL-6、IL-1β、iNOS 的产生。本研究发现，螺旋藻多糖减弱了这些炎症介质的产生和释放，通过减少氧化应激和抗炎反应来保护 LPS 诱导的肝损伤。由此推测，螺旋藻多糖可能会是促炎基因的调节剂。NF-κB 的下调抑制败血症期间的炎症和肝损伤。本研究发现，螺旋藻多糖抑制了小鼠肝组织 NF-κB 及相关蛋白的表达。

综上所述，螺旋藻多糖在 LPS 诱导的小鼠肝损伤模型中起到保护肝脏的作用，可能是由其下调炎症、氧化、凋亡信号的能力介导的，可以为螺旋藻多糖作为 LPS 诱导的肝损伤的预防性用药提供参考。

参考文献：

[1] Wang H E, Shapiro N I, Angus D C, *et al.* National estimates of severe sepsis in United States emergency departments[J]. *Crit*

Care Med, 2007, 35(9): 1443-1449.

[2] Yang F, Li X, Wang L K, *et al.* Inhibitions of NF-κB and TNF-α result in differential effects in rats with acute on chronic liver failure induced by D-gal and LPS[J]. *Inflammation*, 2014, 37(3): 361-601.

[3] Bhondave P D, Devarshi P P, Manhadik K R, *et al.* ‘Ashvagandharishta’ prepared using yeast consortium from *Woodfordia fruticosa* flowers exhibit hepatoprotective effect on CCl₄ induced liver damage in Wistar rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 12(5): 1457-1482.

[4] Yang L, Wang Y, Pan Z, *et al.* Tetraspanin 1 inhibits TNF α-induced apoptosis *via* NF-κB signaling pathway in alveolar epithelial cells. [J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(11): 951-964.

[5] Streetz K, Leifeld L, Grundmann D, *et al.* Tumor necrosis factor α in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure[J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(2): 446-460.

[6] Shiva D, Matsumoto T, Kremenik M J, *et al.* High dose of lipopolysaccharide pre-treatment prevents OVA-induced anaphylactic decreases in rectal temperature in the immunized mice[J]. *Immunol Lett*, 2008, 118(1): 59-64.

[7] Das M, Garlick D S, Greiner D L, *et al.* The role of JNK in the development of hepatocellular carcinoma[J]. *Genes Dev*, 2011, 25(6): 634-645.

[8] Chen H W, Yang T S, Chen M J, *et al.* Application of power plant flue gas in a photobioreactor to grow *Spirulina* algae, and a bioactivity analysis of the algal water-soluble polysaccharides [J]. *Bioresour Technol*, 2012, 120: 256-263.

[9] Kata F S, Athbi A M, Manwar E Q, *et al.* Therapeutic effect of the alkaloid extract of the cyanobacterium *Spirulina platensis* on the lipid profile of hypercholesterolemic male rabbits [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2018, 25(20) : 19635-19642.

[10] Nepali S, Ki H H, Lee J H, *et al.* Wheatgrass-derived polysaccharide has antiinflammatory, anti-oxidative and anti-apoptotic effects on LPS-induced hepatic injury in mice [J]. *Phytother Res*, 2017, 31(7) : 1107-1116.

[11] El-Sheekh M M, Daboor S M, Swelim M A, *et al.* Production and characterization of antimicrobial active substance from *Spirulina platensis* [J]. *Iran J Microbiol*, 2014, 6 (2) : 112-119.

[12] 吴朝晖, 刘清行, 金惠铭. 抗氧化剂和 NFκB 对大鼠肺微血管内皮细胞 iNOS 表达的影响[J]. 微循环学杂志, 2000, 16 (3) : 20-23.

[13] Xia X, Su C, Fu J, *et al.* Role of alpha-lipoic acid in LPS/D-GalN induced fulminant hepatic failure in mice; Studies on oxidative stress, inflammation and apoptosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 22(2) : 293-302.

[14] Xu D, Hu L, Su C, *et al.* Tetrachloro-*p*-benzoquinone induces hepatic oxidative damage and inflammatory response, but not apoptosis in mouse; The prevention of curcumin [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 280(2) : 305-313.

[15] Zhao Y, Zhou P, Liu B, *et al.* Protective effect of suberoylanilide hydroxamic acid against lipopolysaccharide-induced liver damage in rodents [J]. *J Surg Res*, 2015, 194 (2) : 544-550.

[16] Singh M, Jakhar R, Kang S. Morin hydrate attenuates the acrylamide-induced imbalance in antioxidant enzymes in a murine model [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(4) : 992-1000.

[17] An D L, Wen J W, Hao S F, *et al.* Baicalein protects against polymicrobial sepsis-induced liver injury *via* inhibition of inflammation and apoptosis in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 7(1) : 135-168.

川芎嗪对非小细胞肺癌细胞增殖的抑制作用及其机制

沈加熙, 詹小兰, 孙张弛
(浙江省荣军医院药剂科, 浙江 嘉兴 314000)

摘要: **目的** 研究川芎嗪对非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞的抑制作用及机制。**方法** 使用不同浓度 (0、6.25、12.5、25、50、100 μmol/L) 川芎嗪处理人肺上皮细胞 Beas-2B、人支气管上皮细胞 HBE 和 NSCLC 细胞系 A549、H460、HCC827、H1650、PC-9、H1975 细胞后, 采用四甲基噻唑蓝 (MTT) 法检测所有细胞增殖率, 通过平板克隆形成实验检测川芎嗪对 HCC827、H1650 细胞生长的影响, 通过流式细胞仪分析检测细胞凋亡和细胞周期, 蛋白质印迹法检测细胞周期调节蛋白 (cyclin D1、CDK4 和 CDK6)、凋亡相关蛋白 (PARP、Bax 和 Bcl-2) 和磷酸化 STAT3 (p-STAT3) 表达。**结果** 川芎嗪对 HCC827 和 H1650 细胞增殖有抑制作用, 但对 Beas-2B 和 HBE 细胞无明显影响。川芎嗪对 HCC827 和 H1650 细胞的克隆生长具有抑制作用, 能下调 cyclin D1、CDK4、CDK6、Bcl-2 蛋白表达和 STAT3 蛋白磷酸化, 上调 Bax、PARP 蛋白表达, 并诱导细胞 G₀/G₁ 期停滞, 促进细胞凋亡。**结论** 川芎嗪可能通过抑制 STAT3 蛋白磷酸化阻滞细胞周期进程并诱导 NSCLC 细胞凋亡, 从而导致细胞活力降低和集落形成能力受损。

关键词: 川芎嗪; 非小细胞肺癌; STAT3; 细胞周期; 凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2022)10-3337-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.10.052

肺癌是癌症相关死亡的常见原因, 非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 约占所有肺癌病例的 80%~85%, 其 5 年生存率差^[1-2]。晚期 NSCLC 患者的主要治疗方法是铂类双线化疗, 但这些药物通常会有肾毒性、神经毒性和骨髓抑制等副作用^[3]。因此, 临床上迫切需要具有良好抗肿瘤活性、毒性较小的新型药物, 而中药因其较化疗药物具体更少的副作用引起了越来越多的关注^[4-5]。川芎嗪是中药川芎的有效成分, 主要用于治疗各种脑血管

和心血管疾病^[6-7]。此外, 已有研究证明, 川芎嗪对包括肺癌、卵巢癌和肝癌癌在内的多种上皮恶性肿瘤有着一定的疗效^[5,8]。川芎嗪可能是一种潜在的预防和治疗肺癌的化学药物^[8], 但其在肺癌治疗中的具体作用及机制仍然未知。因此, 本研究探索了川芎嗪对 NSCLC 细胞系细胞活力、细胞凋亡和细胞周期的作用和机制。

1 材料

1.1 细胞 人肺上皮细胞 Beas-2B、人支气管上皮细胞