

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241231004

引用格式: 丁宛婷, 乌里盼·托乎达阿里, 孙媛, 等. 睡莲花总多酚对脂多糖诱导 A549 细胞炎性损伤的保护作用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(7): 190–198.

DING WT, WULIPAN THDAL, SUN Y, *et al.* Protective effects of total polyphenols from *Nymphaea candida* on lipopolysaccharide induced inflammatory injury in A549 cells [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(7): 190–198. (in Chinese with English abstract).

睡莲花总多酚对脂多糖诱导 A549 细胞炎性损伤的保护作用研究

丁宛婷¹, 乌里盼·托乎达阿里¹, 孙媛¹, 姚雨含², 李晨阳², 赵军^{1,2*}

(1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆药物研究所维吾尔药重点实验室, 乌鲁木齐 830004)

摘要: **目的** 研究睡莲花总多酚(total polyphenols from *Nymphaea candida*, NCTP)对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导肺泡上皮细胞 A549 炎性损伤的保护作用。**方法** 采用福林酚法测定 NCTP 中的多酚含量, 高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)法测定其特征性成分含量。以 1.0 $\mu\text{g/mL}$ LPS 干预 A549 细胞 12 h 造成炎性损伤模型, CCK-8 (cell counting kit-8)法检测细胞毒性, 以筛选出合适的 NCTP 干预浓度; 进一步将细胞分为空白组、脂多糖模型组、阳性对照地塞米松(0.039 $\mu\text{g/mL}$ dexamethasone, DXM)组、NCTP 低中高剂量(6.0、15.0、30.0 $\mu\text{g/mL}$)组。生化法检测一氧化氮(nitric oxide, NO)及前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)活性; 酶联免疫法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平; 蛋白免疫印迹(Western Blot)法检测核转录因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶-1 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2/heme oxygenase 1, Nrf2/HO-1)信号通路的相关蛋白[Kelch 样 ECH 结合蛋白 1 (Kelch-like ECH-associating protein 1, Keap1)、核因子(红细胞衍生 2)相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1)]表达。**结果** NCTP 中多酚含量为(90.15 \pm 0.17)%, 所含成分睡莲酚、鞣花酸和烟花苷含量分别为(28.05 \pm 0.02)%、(2.15 \pm 0.03)%和(3.50 \pm 0.01)%, CCK-8 法筛选出 NCTP 的干预质量浓度为 6.0、15.0、30.0 $\mu\text{g/mL}$ 。LPS 刺激 A549 细胞后, 细胞内炎症介质 NO、PGE2 和炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达显著升高($P<0.01$), 说明 A549 细胞炎性损伤模型成功构建。与模型组比较, NCTP 能显著抑制 LPS 诱导 A549 细胞上清中 NO、PGE2、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MDA 水平, 明显提高细胞中 SOD 和 GSH 活力。与模型组相比, NCTP 还能显著增加受损细胞中 Nrf2、HO-1 的蛋白表达, 降低 Keap1 蛋白表达水平。**结论** NCTP 对 LPS 诱导 A549 细胞炎性损伤具有显著的保护作用, 机制与其抗氧化、对 Nrf2/HO-1 信号通路的调控相关。研究结果可为该有效部位预防呼吸系统疾病的功能性食品研发提供依据。

关键词: 睡莲花; 多酚; A549 细胞; 急性肺损伤; 抗氧化作用; 核转录因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶-1 通路

收稿日期: 2024-12-31

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金重点项目(2021D01D14)

第一作者: 丁宛婷(1997—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为天然活性成分与功能。E-mail: 1789637181@qq.com

*通信作者: 赵军(1973—), 男, 博士, 研究员, 主要研究方向为食药两用植物的研究与开发。E-mail: zhaojun21cn@163.com

Protective effects of total polyphenols from *Nymphaea candida* on lipopolysaccharide induced inflammatory injury in A549 cells

DING Wan-Ting¹, WULIPAN Tuo-Hu-Da-A-Li¹, SUN Yuan¹, YAO Yu-Han²,
LI Chen-Yang², ZHAO Jun^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

2. Xinjiang Key Laboratory for Uighur Medicine, Institute of Materia Medica of Xinjiang, Urumqi 830004, China)

ABSTRACT: Objective To study protective effects of total polyphenols from *Nymphaea candida* (NCTP) on lipopolysaccharide (LPS) induced inflammatory injury in A549 cells. **Methods** Polyphenol content in NCTP was determined by Folin-Ciocalte method, and its characteristic components were detected by high performance liquid chromatography (HPLC). A549 cells were treated with 1.0 $\mu\text{g/mL}$ LPS for 12 h to induce inflammatory damage model, and cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to screen out the optimal intervention concentration of NCTP. The experiment was divided into control group, lipopolysaccharide model group, dexamethasone (DXM 0.039 $\mu\text{g/mL}$) group, and NCTP (6.0, 15.0, 30.0 $\mu\text{g/mL}$) groups. The levels of nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE2), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) were detected by biochemical method. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expression of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in A549 cells. The expression of related proteins [Kelch-like ECH-associating protein 1 (Keap1), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1)] in nuclear factor erythroid-2-related factor 2/heme oxygenase 1 (Nrf2/HO-1) signaling pathway was detected by Western Blot. **Results** The content of total polyphenols in NCTP was (90.15 \pm 0.17)%, and the content of isostrictiniin, ellagic acid and nicotiflorin was (28.05 \pm 0.02)%, (2.15 \pm 0.03)% and (3.50 \pm 0.01)%, respectively. The mass concentrations of NCTP screened by CCK-8 were 6.0, 15.0, 30.0 $\mu\text{g/mL}$. After LPS stimulation of A549 cells, the expressions of intracellular inflammatory mediators NO, PGE2 and inflammatory factors IL-1 β , IL-6 and TNF- α were significantly increased ($P < 0.01$), indicating that the inflammatory damage model of A549 cells was successfully constructed. Compared with the model group, NCTP significantly inhibited the expression of NO, PGE2, IL-1 β , IL-6, TNF- α and MDA and increased the activities of SOD and GSH in LPS-induced A549 cells. Compared with the model group, NCTP also significantly increased the expression of Nrf2 and HO-1 proteins in the damaged cells, and decreased the expression level of Keap1 proteins. **Conclusion** NCTP has the better protective effect on LPS-induced inflammatory injury in A549 cells, and its mechanism is relative to the regulation of the Nrf2/HO-1 signal pathway. The results of this study can provide a basis for the research and development of functional foods with this effective part to prevent respiratory diseases.

KEY WORDS: *Nymphaea candida*; polyphenol; A549 cells; acute lung injury; antioxidant effect; nuclear factor erythroid 2-related factor 2/heme oxygenase-1 signal pathway

0 引言

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是脓毒症、病毒感染等因素导致的肺泡上皮和肺泡毛细血管膜损伤、血管通透性增加、肺间质/肺泡水肿的急性炎症性过程,可造成弥漫性肺间质及肺泡水肿,严重危害人们的身体健康^[1-3]。弥漫性肺泡损伤是 ALI/急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)的组织学对应物,是 ALI 级联过程的最终结果,由上皮屏障功能障碍、内皮功能障碍和由此导致的肺水肿发展而来^[4]。肺泡上皮细胞是保护肺部免受吸入性损伤因素影响的屏障,其损伤与 ALI

的发生发展密切相关^[5]。A549 是人肺腺癌基底上皮细胞,同时也是 II 型肺泡上皮细胞,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)可诱导该细胞产生级联炎症反应、氧化应激失衡等^[6-7]。过度的炎症反应和氧化应激是 ALI 的主要发病机制之一^[8]。核转录因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶-1 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2/heme oxygenase 1, Nrf2/HO-1)途径可通过氧化还原稳态的调控,对 ALI 发挥重要的保护作用^[9-10]。核因子(红细胞衍生 2)相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)是细胞内抗炎、抗氧化、抗凋亡基因表达的调节因子,被激活后,调控下游血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1)、B 细胞淋巴瘤/白血病

-2 (B-cell lymphoma/leukemia 2, Bcl-2)等蛋白的表达, 抑制氧化应激的发生^[11]。

传统食药两用植物在 ALI 防治方面显示较为显著的功效, 如黄芪、甘草和丹参等^[12-13]。从中寻找具有 ALI 功效成分应用于相关健康产品受到人们的广泛关注。雪白睡莲 (*Nymphaea candida*) 为睡莲科睡莲属多年生水生草本植物, 主要分布于我国新疆博斯腾湖、伊犁、阿勒泰等地区^[14]。睡莲花不仅具有食用价值, 而且具有较好的药用价值, 具有清肺止咳、降热养肝之功效, 用于肝虚、肺燥干咳等疾病的防治。多酚是该植物所含主要特征性成分, 含量可达 15.0%^[15-17]。研究显示, 富含多酚类成分的睡莲花总多酚 (total polyphenols from *Nymphaea candida*, NCTP) 对 LPS 诱导的小鼠 ALI 具有较为显著的缓解作用^[18]。然而, 其功效机制还有待进一步深入探讨。因此, 本研究利用 LPS 诱导 II 型肺泡上皮细胞 A549 建立炎症损伤模型, 通过研究 NCTP 调控 Nrf2/HO-1 通路改善 ALI 的作用机制, 以期为缓解 ALI 健康产品的研发提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

睡莲花购自新疆乌鲁木齐二道桥药材市场, 品种由新疆药物研究所何江研究员鉴定。

人非小细胞肺癌上皮细胞 A549 (CL-0016, 武汉普诺赛生命科技有限公司); LPS (美国 Sigma 公司); Na_2CO_3 (分析纯, 天津市大茂化学试剂厂); 特超敏 ECL 化学发光底物 (北京兰杰柯科技有限公司); 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS)、DMEM 高糖培养基 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); *GAPDH*、*TNF- α* 、*IL-1 β* [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]; FreeZol RNA 提取试剂盒 (南京诺唯赞公司); DNA 第一链合成试剂盒、实时荧光定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 试剂盒 (日本 Takara 有限公司); 人白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 酶联免疫法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司); 一氧化氮 (NO) 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 地塞米松 (dexamethasone, DXM)、BCA 蛋白定量试剂盒、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); Kelch 样 ECH 结合蛋白 1 (Kelch-like ECH-associating protein 1, Keap1)、HO-1 抗体和山羊抗兔 IgG/辣根酶标记 (美国 Abcam 公司); Nrf2- β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (美国 CST 公司)。

1.2 仪器与设备

Agilent-1260 DAD 高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技公

司); 色谱柱 Phenomenex Gemini NX-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) (美国 Phenomenex 公司); YP3002N 电子天平 (精度 0.01 g, 上海菁海仪器有限公司); AS10200ADT 超声玻璃清洗器 (天津奥特赛思仪器有限公司); DZKW 电热恒温水浴锅 (北京市永光明医疗仪器有限公司); SW-CJ-2FD 超净工作台 (苏州净化设备公司); Multiskan GO 全波长酶标仪、C1000 Touch PCR 基因扩增仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Evos XL 倒置生物显微镜 (深圳 Evos 公司); HF240CO₂ 恒温细胞培养箱 (日本东京理化器械株式会社); XS205 专业型分析天平 (精度 0.0001 g, 瑞士 Mettler-Toledo 公司); MIKRO200R 高速冷冻离心机 (德国 Hettich 公司); AE2000 光学显实时荧光定量 PCR 仪 (四川杰莱美科技有限公司); 552BR 垂直电泳-转膜装置、ChemiDoc MP 全自动全能型显影仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 NCTP 的制备及成分分析

按前期报道方法制备^[19], 睡莲花药材 2.0 kg 以 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1 h, 合并提取液, 减压浓缩至浸膏; 浸膏进一步用 D101 大孔吸附树脂和聚酰胺树脂富集纯化得到睡莲总多酚 (112.27 g, 产率 5.61%) 按 Folin-Ciocalteu 测定 NCTP 中总多酚含量。将 1.0 mL 样品溶液放入 10 mL 量筒中并避光后, 加入 5.0 mL 20% Folin-Ciocalteu 苯酚试剂, 混合反应 5 min, 然后加入 5.0 mL 7.5% Na_2CO_3 溶液。摇匀后, 静置 1 h, 于 765 nm 处测定吸光度。以对照品浓度为横坐标 (X , mg/mL), 以吸光度为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线为: $Y=8.3333X+0.0239$, $r=0.9998$, 线性范围为 0.017~0.086 mg/mL。采用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 法测定标识性成分睡莲酚、鞣花酸和烟花苷的含量。色谱条件: Phenomenex Gemini NX C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈 (流动相 A) 和 0.2% 磷酸 (流动相 B) 梯度洗脱 (0~35 min, 5%~15% A; 35~65 min, 5%~18% A; 65~70 min, 18%~20% A; 70~75 min, 20%~5% A), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长为 266 nm。

1.3.2 LPS 诱导 A549 细胞炎症模型的构建

为了观察 LPS 对 A549 细胞活性和增殖的影响, 按照所述方法^[20], 细胞常规培养接种至 6 孔板中, 随机分为正常组、LPS 组 (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 刺激 6、12、24 h, 共 4 组。正常组细胞用 A549 细胞专用培养基培养; 模型组细胞用终质量浓度含 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS+A549 细胞专用培养基培养。取对数生长期的细胞, 将 A549 细胞按每孔 7×10^5 个细胞接种在 6 孔细胞培养板。按照上述分组进行处理。干预结束后, 裂解细胞, 提取 RNA。实时荧光定量 PCR 法检测 A549 炎症细胞指标 TNF- α 、IL-1 β 表达水平, 引物: *GAPDH* (上游 CACCCACTCC TCCACCTTTGAC, 下游 GTCCACCAC CCGTGTGCTGTAG)、*TNF- α* (上游 GGCGTGGAGCTGAGAGATAACC, 下游 ACGGCGATGCGGCTGATG) 和 *IL-1 β* (上游 CAGTGGCA ATGAGGATGACTTGTC, 下游 CTGTAGTGGTGGTTCG

GAGATTCG); 以确定 A549 炎症细胞最佳的诱导时间。

1.3.3 细胞活力测定

取对数生长期 A549 细胞以 7×10^3 cells/mL 接种于 96 孔板中, 置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下的培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁后, 弃去旧培养基, 分为 NCTP 组、LPS+NCTP 组。NCTP 组加入含 NCTP (0、3.0、6.0、15.0、30.0、45.0、60.0、120.0 $\mu\text{g/mL}$) 的细胞培养液, 继续培养 12 h。干预结束后, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂检测 A549 细胞存活率, 筛选出最佳给药剂量。

1.3.4 实验分组及处理

参考 1.3.3 的实验结果, 将 A549 细胞分为对照组、脂多糖模型组(1.0 $\mu\text{g/mL}$ LPS)、阳性对照(0.039 $\mu\text{g/mL}$, DXM) 组、睡莲花总多酚低(6.0 $\mu\text{g/mL}$, NCTP-L)、中(15.0 $\mu\text{g/mL}$, NCTP-M)、高(30.0 $\mu\text{g/mL}$, NCTP-H)剂量组。当 A549 细胞密度达 90% 时, 轻轻吹打细胞, 离心, 并收集细胞沉淀, 接种于 6 孔板(5×10^5 cells/mL), 培养 24 h。以 LPS (1.0 $\mu\text{g/mL}$) 干预 12 h 后, 按设定剂量加入不同浓度的 NCTP 和 DXM 干预 12 h, 空白对照组不做处理。

1.3.5 NCTP 对 LPS 致 A549 细胞炎症模型中炎症介质 NO 及 PGE2 表达水平的影响

按照 1.3.4 进行分组处理。干预结束后收集细胞, 超声裂解, 2000 r/min 室温离心 5 min, 沉淀取上清液。根据试剂盒说明书测定 NO 及 PGE2 含量。

1.3.6 NCTP 对 LPS 致 A549 细胞炎症模型中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 表达水平的影响

按照 1.3.4 进行分组处理, 干预结束收集细胞, 2000 r/min 室温离心 5 min, 取上清液, ELISA 法测定细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平。

1.3.7 NCTP 对 LPS 致 A549 细胞炎症模型中 MDA、SOD 及 GSH 水平的影响

按照 1.3.4 进行分组处理, 干预结束后收集细胞, 取上清液, 生化法测定 MDA、SOD 和 GSH 活性。

1.3.8 Keap-1-Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白的测定

按照 1.3.4 进行分组处理。提取蛋白, 根据 BCA 蛋白

定量试剂盒说明书测定各组蛋白浓度, 进行蛋白定量。各组蛋白加入相应体积的 $5 \times$ Loading Buffer 及 PBS 后 100°C 变性 10 min, -20°C 保存。按照 10 μg /孔上样, 进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 电转, 将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride membrane, PVDF)膜上。使用 $1 \times$ 含吐温 20 的 Tris 缓冲盐水(Tris buffered saline with Tween 20, TBST)洗涤 PVDF 膜 5 min \times 4 次后, 将 PVDF 膜放置在 5% 脱脂奶粉中室温封闭 2 h。一抗(HO-1、Keap1、Nrf2、 β -actin, 稀释比例 1:1000) 4°C 摇床上过夜孵育。第 2 d PVDF 膜用 $1 \times$ TBST 洗涤 5 min 4 次后, 室温避光孵育山羊抗兔 IgG 二抗 1.5 h (稀释比例 1:10000), 用 ECL 发光试剂盒进行显影。使用 Image J 1.8.0 软件, 以 β -actin 作为内参对目的蛋白(HO-1、Keap1、Nrf2)条带进行对比分析。

1.4 数据处理

采用 GraphPad Prism 9.5.1 软件对数据进行统计分析。实验结果均以均数 \pm 标准偏差表示。 $P < 0.05$ 认为有显著性差异, 实验重复 3 次。

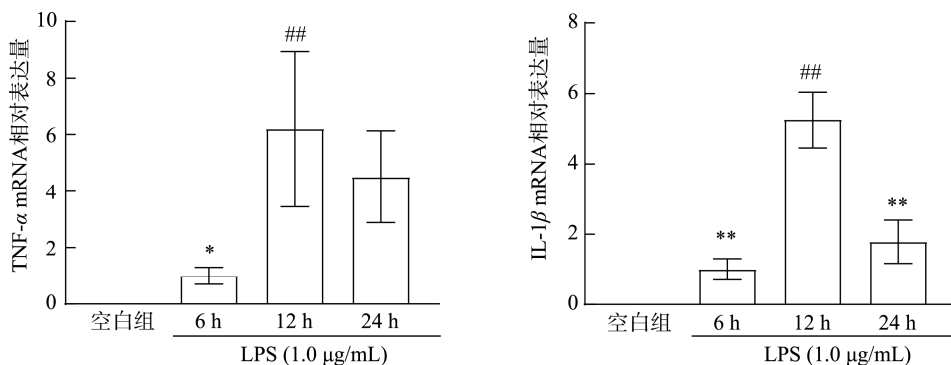
2 结果与分析

2.1 NCTP 的成分分析

NCTP 富含多酚类成分, 含量可达(90.15 \pm 0.17)%。睡莲酚、鞣花酸和烟花苷的标准曲线分别为: $Y=15063X+76.725$, $r=0.9998$, 线性范围 9.6~960.0 $\mu\text{g/mL}$; $Y=94443X-144.38$, $r=0.9999$, 线性范围 6.7~670.0 $\mu\text{g/mL}$; $Y=12646X+17.111$, $r=0.9999$, 线性范围 2.4~237.2 $\mu\text{g/mL}$ 。NCTP 中 3 个特征性成分含量测定结果显示, 睡莲酚的含量最高, 可达(28.05 \pm 0.02)%; 鞣花酸和烟花苷含量较低, 分别为(2.15 \pm 0.03)%和(3.50 \pm 0.01)%。上述实验结果显示了睡莲酚可能是 NCTP 中发挥药效的重要成分。

2.2 LPS 诱导 A549 细胞炎症模型的构建

如图 1 所示, 1.0 $\mu\text{g/mL}$ LPS 刺激 12 h 后, IL-1 β 、TNF- α



注: 与空白组比较, ##代表差异极显著($P < 0.01$), 下同; 与 LPS 干预 12 h 组比较, *代表差异显著($P < 0.05$); **代表差异极显著($P < 0.01$)。

图 1 LPS 诱导后不同时间段对 A549 细胞炎症因子的影响

Fig.1 Effects of LPS on inflammatory factors in A549 cells at different time points after induction

mRNA 表达水平较空白对照(Control)组显著增加($P<0.01$)。24 h 时两者表达较 12 h 组显著降低,说明 LPS 干预 A549 细胞 12 h 是模型建立最佳时间。因此,选择 1.0 $\mu\text{g/mL}$ LPS 刺激 A549 细胞 12 h 建立 ALI 炎症模型,进行后续实验。

2.3 NCTP 对细胞活力的影响

进一步考察了 NCTP (0、3.0、6.0、15.0、30.0、45.0、60.0、120.0 $\mu\text{g/mL}$)对 A549 细胞及 LPS 刺激 A549 细胞活力的影响。结果如图 2 所示,NCTP 质量浓度在 30.0 $\mu\text{g/mL}$ 以下与空白对照组相比无统计学差异,30.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上,随着药物质量浓度的增大,A549 细胞的存活率逐渐降低,呈现较好的剂量效应。NCTP 质量浓度在 45.0 $\mu\text{g/mL}$ 及以下的浓度存活率大于 90%,说明此剂量范围内对细胞无毒性作用。且药物质量浓度在 3.0~30.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞存活率大于等于 100%。并且 NCTP 质量浓度在 6.0 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞活力最高,且没有明显细胞毒性。因此在后续实验中,NCTP 的低、中、高剂量选择分别为 6.0、15.0、30.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

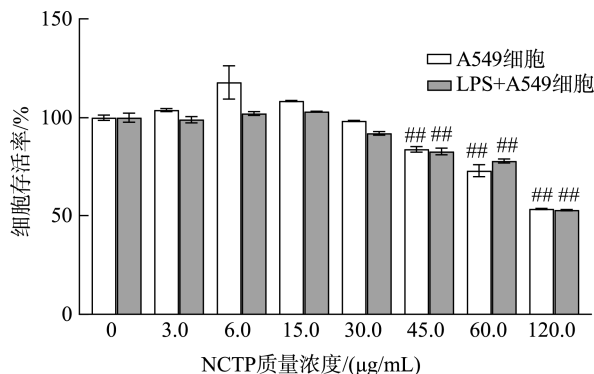
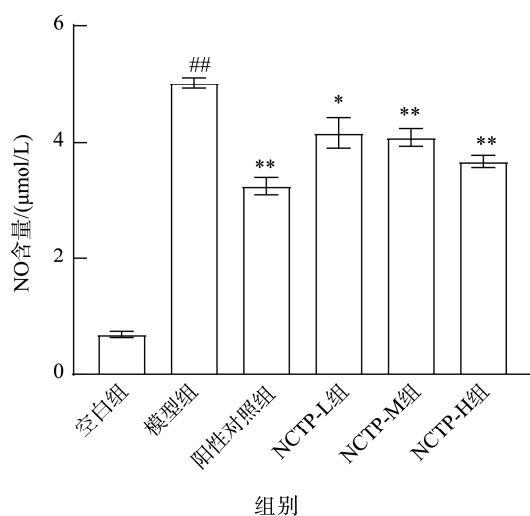


图 2 不同 NCTP 质量浓度对 A549 细胞活力的影响
Fig.2 Effects of different NCTP mass concentration on A549 cell viability



2.4 NCTP 对 LPS 诱导 A549 细胞炎症模型中炎症介质 NO 及 PGE2 表达水平的影响

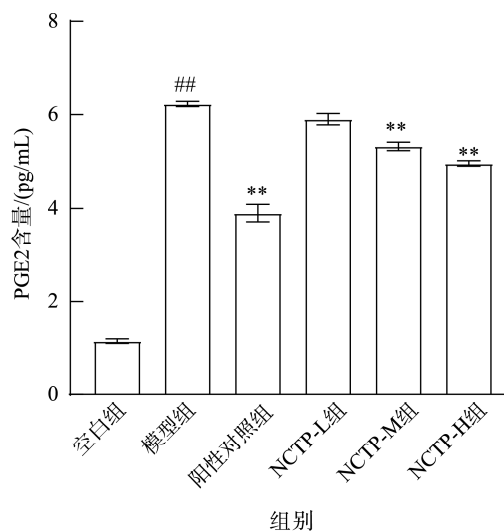
为了确定 NCTP 的抗炎能力,本研究评估了其是否能够抑制 LPS 诱导的 A549 细胞炎症模型中炎症介质 NO 和 PGE2 产生。结果如图 3 所示,与空白对照组相比,LPS 组炎症介质 NO 及 PGE2 表达水平均明显升高($P<0.01$);与模型组相比,NCTP 中、高剂量组(15.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 30.0 $\mu\text{g/mL}$)可有效抑制 ALI 细胞炎症模型中 NO 及 PGE2 的过量产生($P<0.01$),说明 NCTP 可以抑制 LPS 致 A549 细胞炎症损伤模型中炎症介质的释放,对炎症细胞具有一定的保护作用。

2.5 NCTP 对 LPS 诱导 A549 细胞炎症模型中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 表达水平的影响

如图 4 所示,与空白对照组相比,模型组细胞炎症因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平明显升高($P<0.01$)。与模型组比较,NCTP 中、高剂量(15.0、30.0 $\mu\text{g/mL}$)干预组细胞炎症因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 表达均显著降低($P<0.01$)。结果表明 NCTP 可通过抑制 LPS 诱导 A549 细胞炎症因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的产生而发挥抗炎作用。

2.6 NCTP 对 LPS 诱导 A549 细胞炎症模型中 MDA、SOD 及 GSH 水平的影响

如图 5 所示,模型组细胞 MDA 含量显著高于空白对照组($P<0.01$),而 SOD 活力和 GSH 含量明显低于空白对照组($P<0.01$)。此外,与模型组相比,NCTP 中、高剂量组(15.0 $\mu\text{g/mL}$ 、30.0 $\mu\text{g/mL}$)显著降低了炎症细胞内 MDA 含量($P<0.01$),并提高 SOD 活力,NCTP 质量浓度在 30.0 $\mu\text{g/mL}$ 时提高炎症模型细胞中的 GSH 水平($P<0.05$)。总体来看,NCTP 可以通过影响炎症细胞内氧化应激指标的水平,发挥保护急性肺损伤作用,促进肺泡毛细血管屏障的修复。



注:与模型组比较,*代表差异显著($P<0.05$),**代表差异极显著($P<0.01$),下同。

图 3 NCTP 对 LPS 诱导 A549 细胞炎症模型中 NO 及 PGE2 含量的影响

Fig.3 Effects of NCTP on the NO and PGE2 content in LPS-induced inflammation model of A549 cells

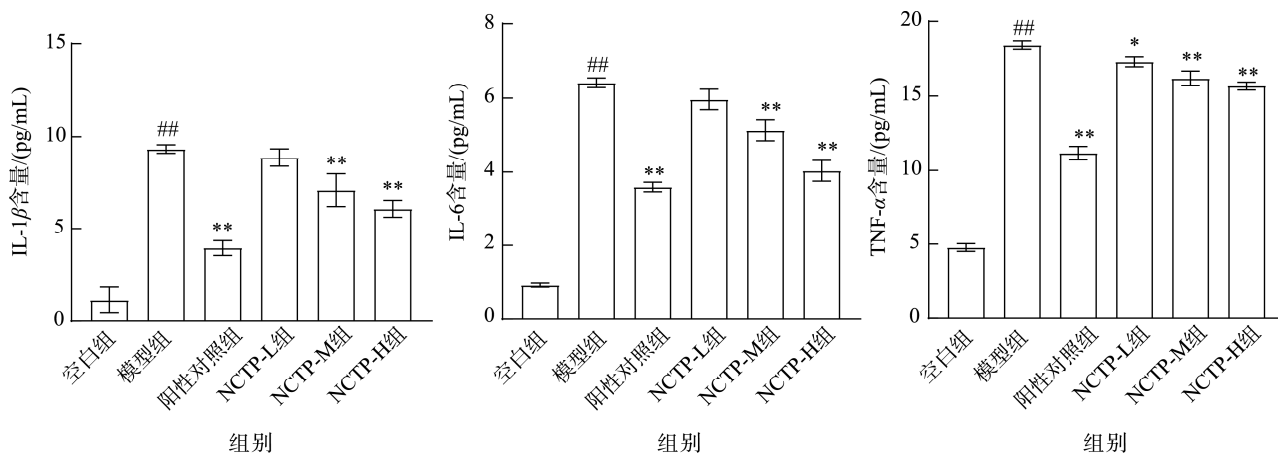


图 4 NCTP 对 LPS 诱导 A549 细胞炎症模型上清液 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 含量的影响

Fig.4 Effects of NCTP on the supernatant IL-1β, IL-6 and TNF-α content in LPS-induced inflammation model of A549 cells

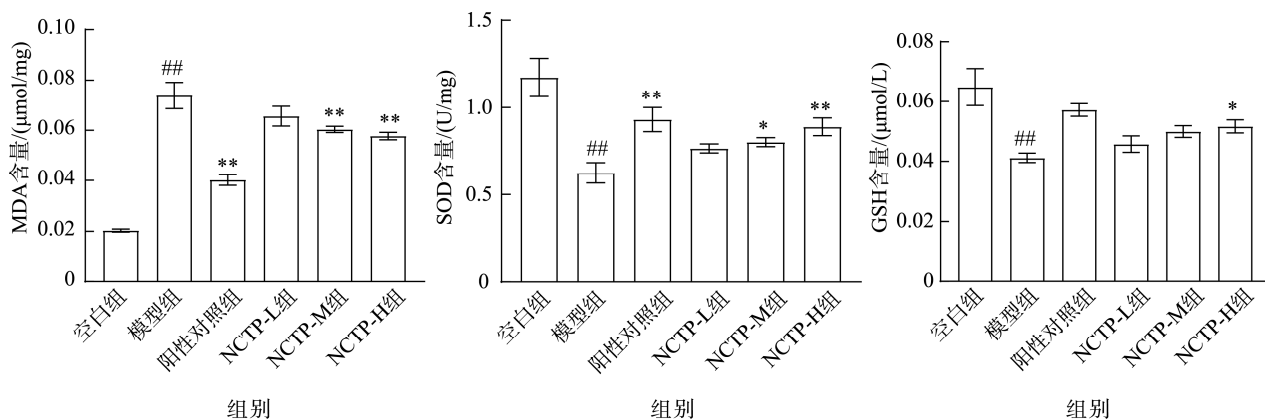


图 5 NCTP 对 LPS 诱导 A549 细胞炎症模型内 MDA、SOD、GSH 含量的影响

Fig.5 Effects of NCTP on MDA, SOD and GSH content in LPS-induced inflammation model of A549 cells

2.7 NCTP 对 LPS 诱导 A549 细胞炎症模型中 Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白表达的影响

为了探究 NCTP 对 LPS 诱导 A549 细胞急性肺损伤模

型的抗氧化机制, 采用 Western blot 法测定细胞模型中 HO-1、Keap1 及 Nrf2 蛋白的表达情况。结果如图 6 所示, 相比较于空白对照组, 模型组细胞的 HO-1 和 Nrf2 蛋白表

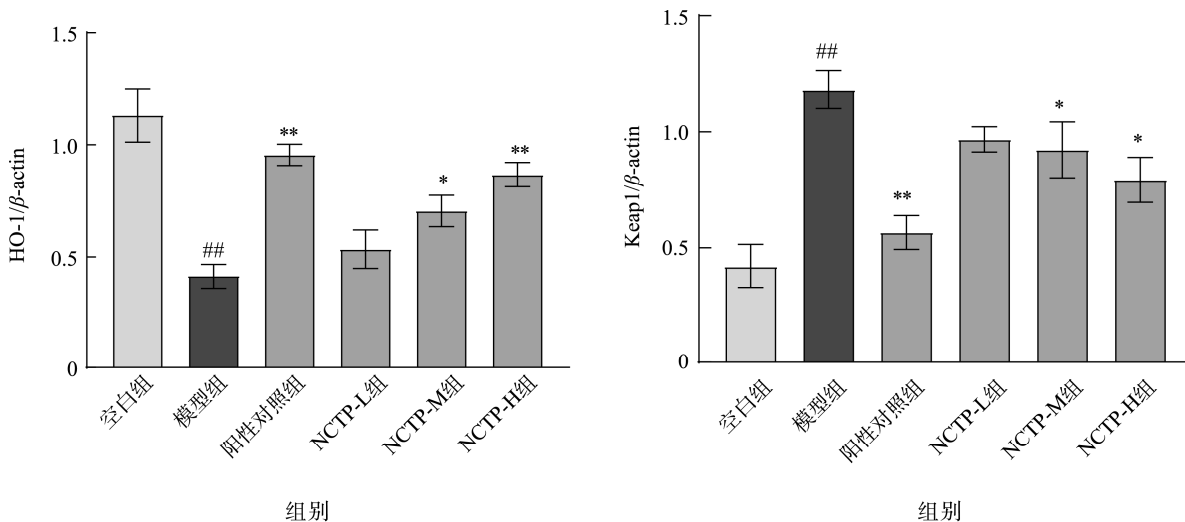


图 6 NCTP 对 LPS 诱导 A549 细胞炎症模型中 Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白表达的影响

Fig.6 Effects of NCTP on expression of Keap1, Nrf2 and HO-1 proteins in LPS-induced inflammation model of A549 cells

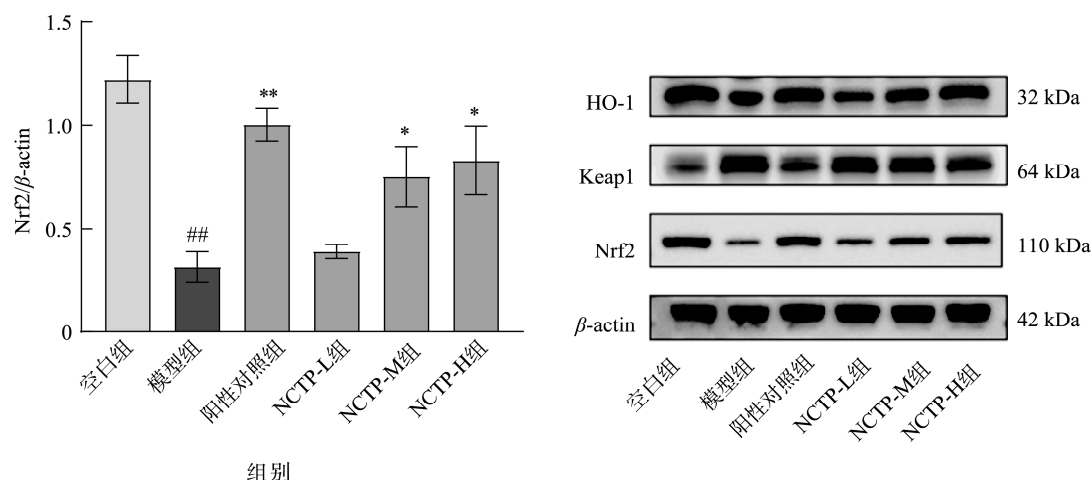


图 6(续) NCTP 对 LPS 诱导 A549 细胞炎症模型中 Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白表达的影响

Fig.6 Effects of NCTP on expression of Keap1, Nrf2 and HO-1 proteins in LPS-induced inflammation model of A549 cells

达有明显的下降趋势($P < 0.01$), 而细胞 Keap1 蛋白表达则明显上升($P < 0.01$)。经过 NCTP (15.0、30.0 $\mu\text{g/mL}$)处理后, LPS 诱导的 A549 细胞中 HO-1 和 Nrf2 蛋白表达显著增加, Keap1 蛋白表达明显所减少($P < 0.05$)。实验结果说明了对 Nrf2/HO-1 信号通路的调控是 NCTP 发挥抗 ALI 的重要机制之一。

3 讨论与结论

ALI 是临床常见的危重症, 其严重阶段即为急性呼吸窘迫综合征, 死亡率高达 30%~50%^[21]。ALI 的病理生理特点是破坏肺泡毛细血管膜屏障, 导致过度炎症反应和肺功能障碍^[22]。炎症反应在 ALI 的病理过程中起着重要作用, 其可通过信号转导途径激活炎症细胞, 释放大炎症细胞因子, 如 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6^[23]。因此, 抑制炎症对预防 ALI 具有重要意义。LPS 是革兰阴性菌细胞壁的主要成分, 可刺激肺组织产生一系列炎症反应, 诱发 ALI, 严重时可发展为 ARDS^[24]。II型肺泡上皮细胞的炎症损伤是 ALI 发病过程中的主要病理生理变化, LPS 暴露可导致这一变化^[25]。人肺泡上皮细胞株 A549 与 II型肺泡上皮细胞特征最为相似, 能够响应炎症刺激因子 LPS, 表现出典型的炎症反应特征, 包括促炎细胞因子(IL-1 β 、TNF- α 等)的分泌增加、氧化应激标志物(MDA 等)的升高、细胞凋亡的增加等。这些反应与 ALI 的病理生理过程高度一致, 这使其成为研究 ALI 防治药物筛选及机制研究的理想模型^[26-27]。本研究中, A549 细胞经 LPS 刺激后, TNF- α 、IL-1 β mRNA 表达水平显著升高, 说明 ALI 细胞模型成功建立。肺部或全身失控性炎症是 ALI/ARDS 的主要发病机制^[28], 当机体受到内毒素等因素刺激时, 巨噬细胞等释放出 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等促

炎因子, 这些因子又可介导炎症, 使得大量炎症细胞向肺组织聚集和浸润, 进一步激活细胞内相关信号通路, 释放更多的炎症因子, 形成细胞因子风暴, 导致 ALI^[29]。DXM 抗炎作用强大而持久, 相关研究显示其可能通过调节 Keap1-Nrf2 通路, 影响下游抗氧化反应元件的表达, 从而抑制哮喘小鼠肺部氧化应激水平^[30]。因此将 DXM 选为阳性对照药。NCTP 干预 LPS 诱导 A549 细胞炎症损伤后, 细胞上清中的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及 PGE2 水平显著降低, 说明 NCTP 可通过抗炎活性发挥防治 ALI 作用。

氧化应激在 ALI/ARDS 的发展中起着重要作用, 当机体受到 ALI/ARDS 危险因素的刺激时, 会产生过量的 ROS, 刺激肺组织, 使血液中诱导型一氧化氮合酶活性升高, 产生过量的 NO。过量的 NO 会破坏肺微血管内皮细胞和肺上皮细胞, 导致肺水肿^[31]。此外, IL-1 β 等促炎因子还引起细胞膜上多不饱和脂肪酸的脂质过氧化, 导致脂质过氧化产物 MDA 过表达、SOD 和 GSH 水平降低, 进一步导致细胞受损^[32-33]。NCTP 干预可使 A549 损伤细胞中 NO、MDA 水平下降, SOD、GSH 水平升高。Nrf2/HO-1 信号通路是内源性抗氧化应激通路之一, 也是炎症相关疾病的重要靶标。Nrf2 是机体应对氧化应激的关键防御机制, Keap1 是 Nrf2 的阻遏蛋白, Nrf2 的下游基因 HO-1 及其产物可通过干预氧化性损伤、调控细胞凋亡、调节炎症反应以及促进血管生成而发挥有益的作用^[34-35]。LPS 刺激 A549 细胞损伤后, 细胞中 Keap1 蛋白表达水平升高, HO-1、Nrf2 蛋白表达水平下降。NCTP 能通过逆转这些蛋白的表达而发挥对细胞的保护作用。综上所述, NCTP 可明显改善 LPS 诱导的 A549 细胞炎症损伤, 其作用机制可能与对 Nrf2/HO-1 信号通路的调控相关, 本研究结果可为睡莲花在健康领域的应用提供理论依据。

参考文献

- [1] 张宇, 卢笑晖, 连新宝. 脓毒症急性肺损伤的发生机制及治疗研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2021, 46(11): 1159–1164.
ZHANG Y, LU XH, LIAN XB. Progress in the pathogenesis and treatment of sepsis-induced acute lung injury [J]. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2021, 46(11): 1159–1164.
- [2] 何悦, 陈红利, 孙雅焯, 等. 壳寡糖通过调控 SOCS3/STAT3 信号通路改善脂多糖诱导的小鼠神经炎症[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(10): 90–98.
HE Y, CHEN HL, SUN YX, *et al.* Chitosan oligosaccharide ameliorates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in mice by modulating the SOCS3/STAT3 signaling pathway [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(10): 90–98.
- [3] 杨思豪, 聂洪鑫, 孟辉. 急性肺损伤发病机制相关信号通路及其药物干预的研究进展[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2024, 31(9): 1356–1362.
YANG SH, NIE HX, MENG H. Research progress on signaling pathways related to the pathogenesis of acute lung injury and drug intervention [J]. Chinese Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2024, 31(9): 1356–1362.
- [4] BUTT Y, KURDOWSK A, ALLEN TC. Acute lung injury: A clinical and molecular review [J]. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2016, 140(4): 345–350.
- [5] ZHANG X, DING M, ZHU P, *et al.* New insights into the Nrf2/HO-1 signaling axis and its application in pediatric respiratory diseases [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019, 2019: 1–9.
- [6] 郭静, 张启云, 靳翔, 等. 连翘脂素对脂多糖联合正常人血浆诱导的 A549 细胞炎症损伤的作用[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(3): 503–511.
GUO J, ZHANG QY, JIN X, *et al.* Effect of phillygenin on inflammatory response of A549 cells induced by lipopolysaccharide and normal human plasma [J]. Chinese Pharmaceutical Bulletin, 2023, 39(3): 503–511.
- [7] ZHANG JZ, LIU ZL, ZHANG YX, *et al.* Lipoxin A4 ameliorates lipopolysaccharide-induced A549 cell injury through upregulation of N-myc downstream-regulated gene-1 [J]. Chinese Medical Journal, 2018, 131(11): 1342–1348.
- [8] KATZENSTEIN ALA. Diagnostic atlas of non-neoplastic lung disease: A practical guide for surgical pathologists [M]. New York: Springer Publishing Company, 2016.
- [9] NITURE SK, JAISWAL AK. Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis [J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(13): 9873–9886.
- [10] GHAREGHOMI S, MOOSAVI-MOVAHEDI F, SASO L, *et al.* Modulation of Nrf2/HO-1 by natural compounds in lung cancer [J]. Antioxidants, 2023, 12(3): 735.
- [11] 谢建林, 林明宝, 侯琦. 核转录因子 Nrf2 与肺部炎症疾病研究进展[J]. 药科学报, 2015, 50(9): 1080–1087.
XIE JL, LIN MB, HOU Q. Recent advances in the study of Nrf2 and inflammatory respiratory diseases [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2015, 50(9): 1080–1087.
- [12] 秦丽, 栾振先, 李敏, 等. 黄芪-丹参通过 PI3K/Akt/mTOR 通路调控自噬改善大鼠急性肺损伤[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(12): 3295–3301.
QIN L, LUAN ZX, LI M, *et al.* Astragalus-Salvia miltiorrhiza modulates autophagy via the PI3K/Akt/mTOR pathway to improve acute lung injury in rats [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2024, 49(12): 3295–3301.
- [13] 张佳莹, 魏苗苗, 初晓, 等. 甘草黄酮对小鼠急性肺损伤保护机制的研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(8): 56–62.
ZHANG JY, WEI MM, CHU X, *et al.* Research on the protective mechanism of glycyrrhiza flavonoids on acute lung injury in mice [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(8): 56–62.
- [14] 郭子雨, 李晨阳, 左进军, 等. 睡莲花总黄酮对小鼠酒精肝损伤的防治作用研究[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(4): 205–211.
GUO ZY, LI CY, ZUO DJ, *et al.* Protective effect of total flavonoids from *Nymphaea alba* on acute liver injury in mice induced by alcohol [J]. China Food Additives, 2023, 34(4): 205–211.
- [15] 艾铁民. 中国药用植物志. 第 12 卷[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2013.
AI TM. Medicinal Flora of China. Volume 12 [M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2013.
- [16] 李时珍, 王育杰. 本草纲目: 中册[J]. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
LI SZ, WANG YJ. Compendium of materia medica: Middle volume [J]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004.
- [17] 宋杰, 郭子雨, 姚雨含, 等. 睡莲多酚提取工艺优化及其抗油脂氧化作用[J]. 中国粮油学报, 2021, 36(10): 149–153
SONG J, GUO ZY, YAO YH, *et al.* Extraction optimization of total polyphenols from *Nymphaea candida* and its antioxidant activity on oil [J]. Chinese Journal of Cereals and Oils, 2021, 36(10): 149–153.
- [18] LI CY, QI X, XU L, *et al.* Preventive effect of the total polyphenols from *Nymphaea candida* on sepsis-induced acute lung injury in mice via gut microbiota and NLRP3, TLR-4/NF- κ B pathway [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(8): 4276.
- [19] SUN Y, QI Z, XU Y, *et al.* Anti-inflammatory, analgesic, antitussive and antipyretic activities of polyphenol-enriched fraction from *Nymphaea candida* [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2024, 324: 117789.
- [20] DUAN X, SUN Y, ZHAO Z, *et al.* Baicalin attenuates LPS-induced alveolar type II epithelial cell A549 injury by attenuation of the FSTL1 signaling pathway via increasing miR-200b-3p expression [J]. Innate Immunity, 2021, 27(4): 294–312.
- [21] 沈陶冶, 郭剑浩, 王小娟, 等. 急性肺损伤治疗的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(3): 366–370.
SHEN TY, GUO JH, WANG XJ, *et al.* Research progress in the treatment of acute lung injury [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2021, 38(3): 366–370.
- [22] 李旭璐, 吴斐华. 血管内皮屏障功能损伤在疾病中的研究进展[J]. 药物资讯, 2024, 13(3): 141–148.
LI XL, WU FH. Research progress on vascular endothelial barrier dysfunction in diseases [J]. Pharmacy Information, 2024, 13(3): 141–148.
- [23] 王静, 李雪, 朱庆林, 等. 老鹳草素对 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤的影响及机制研究[J]. 陆军军医大学学报, 2022, 44(22): 2300–2306.

- WANG J, LI X, ZHU QL, *et al.* Effect of geranin on LPS-induced acute lung injury in mice and its mechanism [J]. *Journal of Army Medical University*, 2022, 44(22): 2300–2306.
- [24] 刘瑞吉, 徐淑凤, 陈良安, 等. 脂多糖诱导肺泡上皮细胞炎症损伤及损伤机制[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2011, 34(5): 367–370.
- LIU RJ, XU SF, CHEN LAN, *et al.* Lipopolysaccharide-induced alveolar epithelial cell inflammatory damage and mechanisms [J]. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 2011, 34(5): 367–370.
- [25] 冀晓丽, 盛云华, 李银霞, 等. 气液界面培养人肺泡II型上皮细胞系 A549 在脂多糖诱导肺炎性损伤模型中的应用[J]. *中国医药工业杂志*, 2022, 53(3): 367–372.
- JI XL, SHENG YH, LI YX, *et al.* Application of air-liquid interface culture of human alveolar type II epithelial cell line A549 in lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammatory injury model [J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2022, 53(3): 367–372.
- [26] REN H, BIRCH NP, SURESH V. An optimised human cell culture model for alveolar epithelial transport [J]. *Public Library of Science ONE*, 2016, 11(10): e0165225.
- [27] 吴炜景, 张家敏, 李立平. 以 TNF- α 刺激 A549 细胞构建急性肺损伤细胞模型[J]. *中国医药科学*, 2017, 7(17): 30–32.
- WU WJ, ZHANG JM, LI LP. Construction of an acute lung injury cell model by stimulating A549 cells with TNF- α [J]. *China Medical Science Journal*, 2017, 7(17): 30–32.
- [28] DECHERT RE, HAAS CF, OSTWANI W. Current knowledge of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome [J]. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 2012, 24(3): 377–401.
- [29] ZHANG X, ZHANG Y, QIAO W, *et al.* Baricitinib, a drug with potential effect to prevent SARS-COV-2 from entering target cells and control cytokine storm induced by COVID-19 [J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 86: 106749.
- [30] 薛坤娇, 阮玲瑛, 胡婕, 等. 糖皮质激素调控 Keap1-Nrf2 通路减轻哮喘小鼠肺氧化应激反应的作用研究[J]. *第三军医大学学报*, 2020, 42(8): 807–814.
- XUE KJ, RUAN LY, HU J, *et al.* Glucocorticoid regulates Keap1-Nrf2 pathway to relieve pulmonary oxidative stress in asthmatic mice [J]. *Journal of Third Military Medical University*, 2020, 42(8): 807–814.
- [31] ZHOU J, PENG Z, WANG J. Trelagliptin alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and oxidative stress in acute lung injury mice [J]. *Inflammation*, 2021, 44(4): 1507–1517.
- [32] ESSAFI-BENKHADIR K, REFAI A, RIAHI I, *et al.* Quince (*Cydonia oblonga* Miller) peel polyphenols modulate LPS-induced inflammation in human THP-1-derived macrophages through NF- κ B, p38MAPK and Akt inhibition [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2012, 418(1): 180–185.
- [33] 黄平, 洪静霞, 米杰, 等. 羊栖菜多酚通过核转录因子- κ B/丝裂原活化蛋白激酶通路缓解脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应[J]. *食品科学*, 2022, 43(23): 141–148.
- HUANG P, HONG JX, MI J, *et al.* Hizikia fusiformis polyphenols alleviate lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW264.7 cells through the nuclear factor- κ B/mitogen-activated protein kinases pathway [J]. *Food Science*, 2022, 43(23): 141–148.
- [34] LU MC, ZHAO J, LIU YT, *et al.* CPHY192018, a potent inhibitor of the Keap1-Nrf2 protein-protein interaction, alleviates renal inflammation in mice by restricting oxidative stress and NF- κ B activation [J]. *Redox Biology*, 2019, 26: 101266.
- [35] ALI T, KIM T, REHMAN SU, *et al.* Natural dietary supplementation of anthocyanins via PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 pathways mitigate oxidative stress, neurodegeneration, and memory impairment in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Molecular Neurobiology*, 2018, 55: 6076–6093.

(责任编辑: 安香玉 韩晓红)