



18 β -甘草次酸可缓解 D-半乳糖诱导断奶仔猪 氧化应激肺损伤

王伏羲^{1,2}, 马 翠², 黄 康^{1,2}, 李蕊彤², 赵青余², 张军民², 闫益波^{1*}, 司 玮^{2*}

(1. 山西农业大学动物科学学院, 太谷 030801;

2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 畜禽营养与饲养全国重点实验室, 北京 100193)

摘 要: 旨在研究 18 β -甘草次酸(18 β -glycyrrhetic acid, 18 β -GA)对 D-半乳糖(D-galactose, D-gal)诱导断奶仔猪氧化应激肺损伤的影响。将 24 头体重相近的 28 日龄断奶仔猪随机分 3 组, 每组 8 个重复, 每个重复 1 头猪, 试验分组为: 对照组(CK)饲喂基础日粮, 模型组(D-gal)饲喂基础日粮添加 10 g·kg⁻¹ D-gal, 试验组(GA+gal)饲喂基础日粮添加 10 g·kg⁻¹ D-gal 和 100 mg·kg⁻¹ 18 β -GA。预试期 7 d, 正试期 28 d。结果表明: 与 CK 组相比, D-gal 组断奶仔猪肺组织丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量、8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 8-OHdG)含量、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性有上升趋势(0.05≤P<0.10), 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性显著上升(P<0.05); *Nrf2*、*CAT*、*SOD1* 基因表达量显著上升(P<0.05); 炎症因子白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)含量显著升高(P<0.05), 肺泡平均内衬间隔(mean linear intercept, MLI)、肺组织细胞凋亡率显著升高(P<0.05); 与 D-gal 组相比, GA+gal 组肺组织中 CAT 和 SOD 活性、MDA 和 8-OHdG 含量及抗氧化相关基因 *Nrf2*、*CAT*、*SOD1* 表达量显著降低(P<0.05), 炎症因子 IL-8、白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)、TGF- β 含量显著降低(P<0.05), 细胞凋亡率显著降低(P<0.05)。转录组学分析表明氧化应激对仔猪肺脏细胞周期、PI3K/AKT 信号通路、P53 信号通路有影响, 18 β -GA 可以通过调节 PI3K/AKT 信号通路、视黄醇代谢等通路缓解肺损伤。利用荧光定量 PCR 和 Western blot 技术进一步验证发现, 仔猪氧化应激后通路关键基因 *PI3K*、*AKT*、*TP53* 和蛋白 P53 表达水平升高(P<0.05); 添加 18 β -GA 后能使通路基因 *PI3K*、*TP53* 表达量降低(P<0.05), *AKT* 基因表达水平、P53 蛋白表达水平有降低的趋势(0.05≤P<0.1)。综上所述, 添加 18 β -GA 可以缓解 D-gal 诱导的断奶仔猪肺脂质过氧化、DNA 氧化损伤, 炎症因子增多、细胞凋亡发生等损伤, 其机制可能是通过调节 P53 信号通路缓解肺损伤。

关键词: 氧化应激; 肺损伤; 甘草次酸; 断奶仔猪; 转录组

中图分类号: S828.5

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)01-0305-12

18 β -glycyrrhetic Acid can Alleviate Oxidative Stress Induced Lung Injury in Weaned Piglets Induced by D-galactose

WANG Fuxi^{1,2}, MA Cui², HUANG Kang^{1,2}, LI Ruitong², ZHAO Qingyu², ZHANG Junmin²,
YAN Yibo^{1*}, SI Wei^{2*}

(1. College of Animal Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;

收稿日期: 2025-01-14

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFD1300301); 国家自然科学基金(32402808); 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所基本业务费(2024-YWF-ZYSQ-03); 中国农业科学院科技创新工程(ASTIP-IAS-12)

作者简介: 王伏羲, 硕士生, 主要从事饲料安全评价与检测研究, E-mail: wangfuxi0514@163.com

* 通信作者: 司 玮, 主要从事饲用植物提取物的生物学作用机制及营养调控研究, E-mail: siwei01@caas.cn; 闫益波, 主要从事动物营养、环境与繁殖调控技术研究, E-mail: yibo10679@163.com

2. State Key Laboratory of Animal Nutrition and Feeding, Institute of Animal Sciences,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: The aim of this experiment is to investigate the effect of 18β -glycyrrhetic acid (18β -GA) on oxidative stress induced lung injury in weaned piglets induced by D-galactose (D-gal). In total, 24 weaned piglets of similar body weight at 28 days old were randomly divided into 3 groups, with 8 replicates in each group and 1 piglet in each replicate. The experimental groups were as follows: the control group (CK) was fed with basal diet, the model group (D-gal) was fed with basal diet supplemented with $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ D-gal, and the experimental group (GA+gal) was fed with basal diet supplemented with $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ D-gal and $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 18β -GA. The pre trial period is 7 days, and the main trial period is 28 days. The results showed that compared with the CK group, the D-gal group showed an increase trend in malondialdehyde (MDA) content, 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) content, and catalase (CAT) activity in the lung tissue of weaned piglets ($0.05\leq P<0.10$), and a significant increase in superoxide dismutase (SOD) activity ($P<0.05$); The expression levels of *Nrf2*, *CAT*, and *SOD1* genes significantly increased ($P<0.05$); The levels of inflammatory factors interleukin-8 (IL-8) and transforming growth factor- β (TGF- β) increased significantly ($P<0.05$), and the mean linear intercept (MLI) and apoptosis rate of lung tissue cells increased significantly ($P<0.05$); Compared with the D-gal group, the GA+gal group showed a significant decrease in the activities of CAT and SOD, content of MDA and 8-OHdG, as well as the expression levels of antioxidant related genes *Nrf2*, *CAT*, and *SOD1* in the lungs ($P<0.05$). The levels of inflammatory factors IL-8, interleukin-18 (IL-18), and TGF- β were also reduced significantly ($P<0.05$), and the apoptosis rate was also reduced significantly ($P<0.05$). Transcriptomic analysis showed that oxidative stress has an impact on the cell cycle, PI3K/AKT signaling pathway, and P53 signaling pathway in piglet lung cells. 18β -GA can alleviate lung injury by regulating pathways such as PI3K/AKT signaling pathway and retinol metabolism. Further verification using fluorescence quantitative PCR and Western blot techniques revealed that the expression levels of key genes *PI3K*, *AKT*, *TP53*, as well as proteins P53 in the oxidative stress pathway of piglets increased significantly ($P<0.05$). After adding 18β -GA, the expression levels of pathway genes *PI3K* and *TP53* decreased significantly ($P<0.05$), while the expression levels of gene *AKT* and protein P53 showed a downward trend ($0.05\leq P<0.1$). In summary, the addition of 18β -GA can alleviate D-gal induced lipid peroxidation, DNA oxidative damage, increased inflammatory factors, and cell apoptosis in weaned piglet lungs. The underlying mechanism might involve the alleviation of lung injury through the modulation of the P53 signaling pathways.

Keywords: oxidative stress; lung injury; glycyrrhetic acid; weaned piglets; transcriptome

* **Corresponding authors:** SI Wei, E-mail: siwei01@caas.cn; YAN Yibo, E-mail: yibo10679@163.com

仔猪断奶阶段由于环境、饲喂方式、饲料组成的改变,极易发生氧化应激。研究表明,断奶阶段的氧化应激能够使仔猪肺免疫功能下降^[1],使仔猪抵御病原的能力降低。这使得仔猪遭受多种病原侵袭风险增加,进而可能导致呼吸性系统综合征(PRDC)的发生率上升,同时也提高了肺损伤发生

的可能性。据统计,断奶仔猪发生间质性肺损伤的概率比育肥期猪肺损伤概率高5.8%^[2]。研究显示,在猪生产密度高的波兰地区,有肺组织病变的猪的胴体重量平均比肺组织正常的猪轻1.24 kg^[3],这表明肺损伤也会造成养猪业经济损失。在动物饲料禁抗的背景下,寻找替代抗生素的植物提取物以缓

解氧化应激损伤成为提高畜禽生产质量的重要方法。甘草次酸(glycyrrhetic acid, GA)是草本植物甘草(licorice)的主要活性成分之一^[4],具有抗氧化、抗炎、抗凋亡^[5]等的作用。研究表明,GA可通过调节炎症和氧化应激缓解肺上皮细胞损伤^[6],并对氧化应激下的肺组织具有保护作用^[7]。

D-半乳糖(D-galactose, D-gal)是一种还原糖,较高浓度下可在半乳糖氧化酶作用下转化为过氧化氢和醛糖,导致超氧阴离子、氧衍生自由基的异常增加和细胞损伤^[8]。D-gal还可通过非酶糖化与蛋白质中氨基酸的游离胺反应,形成晚期糖基化终产物。长期服用D-gal会通过其氧化代谢和糖基化终产物促进活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生^[9],造成全身氧化应激^[10],故D-gal常被用来诱导慢性氧化应激模型。因此,本研究通过饲喂D-gal建立断奶仔猪氧化应激模型,结合转录组测序分析,探究18 β -甘草次酸(18 β -glycyrrhetic acid, 18 β -GA)对D-gal诱导仔猪氧化应激肺损伤的缓解作用及机制,为18 β -GA缓解氧化应激损伤提供试验依据和数据支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

18 β -GA:纯度 $\geq 98\%$,甘肃泛植制药有限公司产品。D-gal:纯度 $\geq 99\%$,湖北裕盈生物科技有限公司产品。

1.2 动物试验设计及样品采集

选择28日龄、体重为(7.50 $\pm$ 0.10) kg的24头健康纯种大白阉割公断奶仔猪,随机分为3组,每组8个重复,每个重复1头仔猪。分组为:对照组(CK组)饲喂基础日粮,模型组(D-gal组)饲喂基础日粮添加10 g $\cdot$ kg⁻¹ D-gal,试验组(GA+gal组)饲喂基础日粮添加100 mg $\cdot$ kg⁻¹ 18 β -GA和10 g $\cdot$ kg⁻¹ D-gal。预试期7 d,正式试验期28 d。基础饲粮参照NRC(2012)标准配制,其组成及营养水平见表1。

1.3 肺组织样品采集

试验结束时,采集仔猪肺并称重,每头仔猪收集两份左肺组织,一份-80 $^{\circ}$ C冻存待测,一份放入4%多聚甲醛固定液中固定处理。每组选择5头仔猪肺组织样品进行后续测定($n=5$)。

1.4 测定指标及方法

1.4.1 肺脏指数 肺脏指数=肺重量/断奶仔猪体重 $\times 100\%$ 。

表1 基础日粮组成及营养成分(干物质基础)

Table 1 Composition and nutritional components of basic diets (Dry matter basis) %

项目 Item	含量 Content
原料组成 Raw material composition	
玉米 Corn	42.83
膨化玉米 Puffed corn	12.00
46%豆粕 46% Soybean meal	11.00
膨化大豆 Extruded full-fat soybean	8.80
大豆浓缩蛋白 Soybean protein concentrate	4.50
乳清粉 Whey powder	10.00
鱼粉 Fish meal	3.10
豆油 Soybean oil	0.60
石粉 Limestone	0.65
磷酸氢钙 Calcium monophosphate	1.20
氯化钠 Sodium chloride	0.30
葡萄糖 Glucose	3.00
98.5%赖氨酸 98.5% Lysine	0.54
98.5%蛋氨酸 98.5% Methionine	0.22
苏氨酸 Threonine	0.21
色氨酸 Tryptophan	0.05
预混料 ^① Premix	1.00
合计 Total	100.00
营养成分 ^② Nutrient level	
净能/(MJ $\cdot$ kg ⁻¹) Net energy	10.58
粗蛋白质 Crude protein	18.92
钙 Calcium	1.21
赖氨酸 Lysine	1.41
蛋氨酸 Methionine	0.54
苏氨酸 Threonine	0.85
色氨酸 Tryptophan	0.25
蛋氨酸+半胱氨酸 Methionine+Cysteine	0.85

①. 每千克预混料中含:维生素A 12 000 IU, 硫胺素B₁ 4.3 mg, 核黄素B₂ 12 mg, 维生素B₆ 4.86 mg, 维生素B₁₂ 30 μ g, 泛酸钙15 mg, 叶酸1.5 mg, 生物素0.48 mg, 氯化胆碱400 mg, 维生素D₃ 3 000 IU, 维生素E 16 IU, 维生素K₃ 4.5 mg, 铜5 mg, 铁140 mg, 锌100 mg, 锰40 mg, 碘0.15 mg, 硒0.30 mg。②. 除粗蛋白质和钙为实际测量值外, 营养水平均为计算值

①. Each kilogram of premix contains: 12 000 IU of vitamin A, 4.3 mg of thiamine B₁, 12 mg of riboflavin B₂, 4.86 mg of vitamin B₆, 30 μ g of vitamin B₁₂, 15 mg of calcium pantothenate B₅, 1.5 mg of folate B₉, 0.48 mg of biotin B₇, 400 mg of choline chloride, 3 000 IU of vitamin D₃, 16 IU of vitamin E, 4.5 mg of vitamin K₃, 5 mg of copper, 140 mg of iron, 100 mg of zinc, 40 mg of manganese, 0.15 mg of iodine, and 0.30 mg of selenium. ②. Except for crude protein and calcium, which are actual measured values, nutritional levels are calculated values

1.4.2 肺组织形态学评估 肺组织在4%多聚甲醛中固定24~48 h,经过脱水、透明、浸蜡、包埋、切片后制成石蜡切片,按HE染色试剂盒说明书(索莱宝股份有限公司提供)进行染色。在荧光正置显微镜200倍镜下计数,参考郭欣等^[11]的方法计算肺泡平均内衬间隔(MLI)和平均肺泡数(MAN)。切片采用双盲法读片。

1.4.3 细胞凋亡定量分析 对“1.4.2”制好的石蜡切片按照CY3 TUNEL细胞凋亡染色试剂盒说明书(索莱宝股份有限公司提供)进行TUNEL染色。在荧光正置显微镜200倍镜下计数,参考Zhang等^[12]的方法计算细胞凋亡率。切片采用双盲法读片。

1.4.4 组织炎症指标、抗氧化指标测定 采用双抗夹心法,按试剂盒说明书测定炎症指标白细胞介素-8(IL-8)、白细胞介素-18(IL-18)、转化因子- β (TGF- β)含量;抗氧化指标丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、8-羟基鸟苷(8-OHdG)

含量(江苏雨桐生物科技有限公司提供);采用微板法,按试剂盒说明书进行过氧化氢酶(CAT)活性检测(江苏艾迪生生物科技有限公司提供),用酶标仪(德国 Tecan 公司提供)对吸光度进行测定。

1.4.5 qRT-PCR测定 mRNA 表达量 使用总RNA提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司提供)提取总RNA。并进行RNA浓度测定(柏精,超微量核酸/蛋白分析仪)。使用反转录试剂盒(宝日医生物技术(北京)有限公司提供)逆转录cDNA,用TB Green Premix Ex TaqTM II(宝日医生物技术(北京)有限公司提供)进行实时荧光定量PCR反应。扩增条件:95℃预变性3 min,循环扩增阶段95℃变性5 s、60℃退火、延伸40 s,40个循环。设置3个复孔。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行基因mRNA的相对定量分析。在NCBI网站上查找引物相关基因序列并送至北京新时代公司进行引物合成,具体序列见表2。

表2 基因引物序列

Table 2 Gene primer sequence

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequences(5'→3')	产物长度/bp Product length	退火温度/℃ Annealing temperature
<i>Nrf2</i>	AAGGGGTTGCGAAGGGAGT TTGGGAATGTGGGCTACCTG	821	60
<i>CAT</i>	CCTGCAACGTTCTGTAAAGGC GCTTCATCTGGTCACTGGCT	72	60
<i>SOD1</i>	GCGAGTCATGGCGACGAA CACAGTGGCCACACCATCTT	298	60
<i>PI3K</i>	GTGGTGAGAAGCATTGGGGA GCTAGGATCCAAGATCTGTTACAT	85	60
<i>AKT</i>	TCGCCCCTCAACAACCTTCTC AGGGACACCTCCATCTCCTC	266	60
<i>TP53</i>	TCCTCGCCAGTGCAAAAGAA CTCGGAACATCTCGAAGCGT	68	60

1.4.6 转录组测序 取-80℃保存的肺组织样品送至北京诺禾致源科技股份有限公司检测,经数据处理、拆分、质控、过滤,构建普通转录组类型文库,文库质检合格后,通过Illumina NovaSeq 6000对有效数据进行测序。绘制每千碱基百万转录序列片段(FPKM)以计算基因差异表达(DEGs),并用DESeq2分析程序以 $P\text{-value} \leq 0.05$; $|\log_2 \text{FoldChange}| \geq 1$ 作为差异基因的阈值筛选各组间差异表达基因。使用诺和云平台对差异表达基因进行GO功能富集分析和KEGG信号通路分析。

1.4.7 Western blot检测关键通路蛋白表达水平

通过添加蛋白质裂解缓冲液(Beyotime生物技术研究所提供)组织匀浆肺脏后,将匀浆在4℃下以12 000 r·min⁻¹离心10 min,并吸出上清液,使用BCA蛋白质测定试剂盒(Thermo Fisher Scientific股份有限公司提供)来测定蛋白质浓度。通过凝胶电泳(Bio-Rad Laboratories股份有限公司提供)分离蛋白质,并转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国密理博公司提供)上。将PVDF膜与GADPH、P53、PI3K、P-PI3K、AKT、P-AKT抗体在4℃下孵育过

夜后,与辣根过氧化物酶偶联的第二抗体孵育,并使用分子成像仪(美国Bio-Rad公司提供)检测抗体结合(抗体均由Cell Signaling Techn提供,所有抗体的滴度均为1:1 000)。使用ImageJ软件进行蛋白质表达水平的定量分析。

1.5 统计学方法

数据分析采用IBM SPSS Statistics 27统计软件进行单因素方差分析和Duncan's法多重比较。

表3 18 β -GA对断奶仔猪肺脏指数的影响

Table 3 Effect of 18 β -GA on lung coefficient of weaned piglets

项目 Item	CK组 CK group	D-gal组 D-gal group	GA+gal组 GA+gal group	P值 P-value
断奶仔猪肺脏指数/% Weaned piglet lung coefficient	1.08 $\pm$ 0.09	0.98 $\pm$ 0.04	0.94 $\pm$ 0.08	0.378

2.1.2 18 β -GA对肺组织抗氧化指标的影响 由表4可知,与CK组相比,D-gal组断奶仔猪肺组织MDA含量、8-OHdG含量、CAT活性有上升趋势($0.05 \leq P < 0.10$),SOD活性显著上升($P < 0.05$)。添加18 β -GA后,肺组织MDA含量、8-OHdG含量、SOD活性、CAT活性较D-gal组均显著下降($P < 0.05$)。

表4 18 β -GA对肺脏的抗氧化水平的影响

Table 4 The effect of 18 β -GA on antioxidant levels in the lungs

项目 Item	CK组 CK group	D-gal组 D-gal group	GA+gal组 GA+gal group	P值 P-value
CAT/($\mu\text{mol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$)	588.08 $\pm$ 60.28 ^{ab}	747.22 $\pm$ 63.91 ^a	428.93 $\pm$ 40.06 ^b	0.010
SOD/($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	0.15 $\pm$ 0.01 ^b	0.21 $\pm$ 0.02 ^a	0.13 $\pm$ 0.01 ^b	0.015
MDA/($\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$)	1.45 $\pm$ 0.08 ^{ab}	1.66 $\pm$ 0.14 ^a	1.04 $\pm$ 0.16 ^b	0.004
8-OHdG/($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)	55.32 $\pm$ 5.98 ^{ab}	84.17 $\pm$ 12.88 ^a	34.90 $\pm$ 7.54 ^b	0.014

同行肩标相同小写字母表示差异不显著($P > 0.05$),不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下表同

Same lowercase letters on the shoulder of peers indicate no significant difference ($P > 0.05$), while different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$). The same as below

表5 18 β -GA对抗氧化相关基因表达的影响

Table 5 Effects of 18 β -GA on the expression of antioxidant related genes

项目 Item	CK组 CK group	D-gal组 D-gal group	GA+gal组 GA+gal group	P值 P-value
<i>Nrf2</i>	0.58 $\pm$ 0.11 ^b	2.53 $\pm$ 0.47 ^a	0.88 $\pm$ 0.21 ^b	0.003
<i>CAT</i>	1.14 $\pm$ 0.12 ^b	1.81 $\pm$ 0.31 ^a	0.66 $\pm$ 0.06 ^b	0.006
<i>SOD1</i>	0.91 $\pm$ 0.21 ^b	1.82 $\pm$ 0.29 ^a	0.96 $\pm$ 0.19 ^b	0.030

2.1.3 18 β -GA对肺组织炎症因子含量的影响 由表6可知与CK组相比,D-gal组仔猪肺组织

统计结果用平均值和SEM表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, $0.05 \leq P < 0.10$ 为有升高/降低的趋势。

2 结 果

2.1 18 β -GA对断奶仔猪肺脏氧化应激的影响

2.1.1 18 β -GA对断奶仔猪肺脏指数的影响

对各组仔猪的肺脏指数进行统计如表3所示,各组间无显著差异($P > 0.05$)。

由表5可知,与CK组相比,D-gal组断奶仔猪肺组织*Nrf2*、*CAT*、*SOD1*基因表达量显著上升($P < 0.05$);GA+gal组断奶仔猪肺脏组织*Nrf2*、*CAT*、*SOD1*基因表达量较D-gal组显著下调($P < 0.05$)。表明添加18 β -GA能够使D-gal导致的氧化还原系统紊乱恢复平衡。

炎症因子IL-8、TGF- β 含量显著升高($P < 0.05$),IL-18含量无显著差异($P > 0.05$);与D-gal相比,添

加 18β -GA 显著降低了 IL-8、IL-18、TGF- β 含量 ($P<0.05$)。表明添加 18β -GA 能够缓解 D-gal 造成的肺脏炎症因子显著上升。

表 6 18β -GA 对肺组织炎症因子含量的影响

Table 6 The effect of 18β -GA on the content of inflammatory cytokines in the lungs

项目 Item	CK 组 CK group	D-gal 组 D-gal group	GA+gal 组 GA+gal group	P 值 P-value
IL-8/($\text{g}\cdot\text{ng}^{-1}$)	55.54 ± 5.50^b	91.07 ± 10.21^a	43.85 ± 14.16^b	0.019
IL-18/($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	23.29 ± 2.36^a	24.94 ± 1.47^a	16.23 ± 1.76^b	0.016
TGF- β /($\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$)	43.37 ± 2.22^b	55.80 ± 2.77^a	38.21 ± 5.31^b	0.016

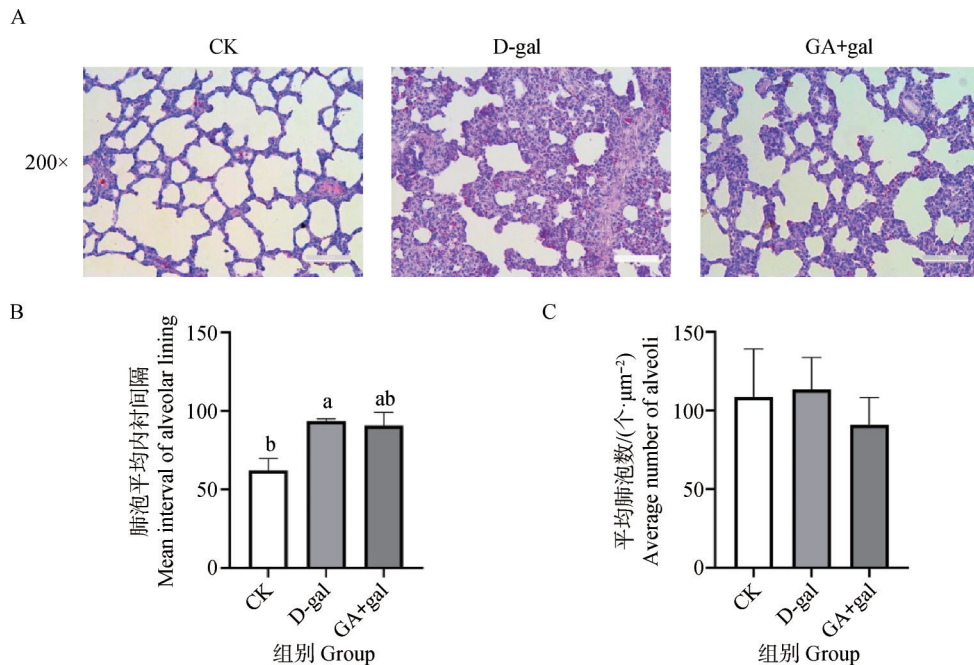
2.1.4 18β -GA 对断奶仔猪肺的病理组织学影响

由图 1A 可知,CK 组肺泡壁宽度正常,肺泡结构完整。与 CK 组相比,饲喂 D-gal 后肺组织结构发生损伤,具体表现为炎性细胞大量浸润、肺泡壁明显增宽、肺泡结构遭到破坏。添加 18β -GA 后缓解了饲喂 D-gal 导致的仔猪肺形态结构损伤,表现为肺泡壁趋于正常,肺泡内有少量炎性细胞浸润、肺泡结构相对完整。

由图 1B 可知,与 CK 组相比,D-gal 组 MLI 显著升

高($P<0.05$),与 D-gal 组相比,GA+gal 组有下降趋势($P>0.05$)。MAN 各组间无显著差异($P>0.05$)。表明添加 18β -GA 对缓解 D-gal 造成的肺泡平均内衬间隔显著增加,小肺泡破裂成大肺泡具有恢复作用。

2.1.5 18β -GA 对肺组织细胞凋亡的影响 由图 2 所示,与 CK 组相比,D-gal 组细胞凋亡率显著升高($P<0.05$);与 D-gal 组相比,GA+gal 组细胞凋亡率极显著下降($P<0.05$)。表明添加 18β -GA 对断奶仔猪氧化应激造成的肺组织凋亡缓解作用显著。

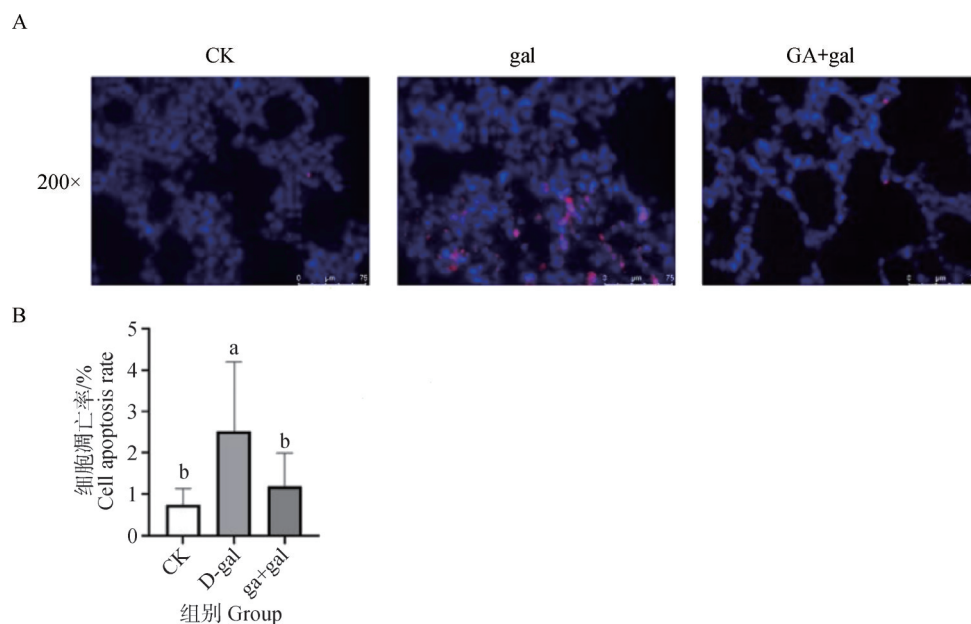


A. 肺组织病理切片图; B. 肺泡平均内衬间隔; C. 平均肺泡数。B、C 上方相同小写字母表示差异不显著 ($P>0.05$), 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下图同

A. Pathological section image of lung tissue; B. Mean alveolar lining interval; C. Mean number of alveoli. The same lowercase letters above bar charts B and C indicate no significant difference ($P>0.05$), while different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$). The same as the figure below

图 1 18β -GA 对断奶仔猪肺病理组织学影响 (比例尺=50 μm)

Fig. 1 The effect of 18β -GA on the histopathology of weaned piglets' lungs (Scale bar=50 μm)



A. 荧光图:蓝色代表细胞核,红色代表阳性细胞,比例尺=50 μ m;B. 灰度图

A. Fluorescence image: Blue represents the nucleus, red represents positive cells, Scale bar=50 μ m; B. Grayscale image

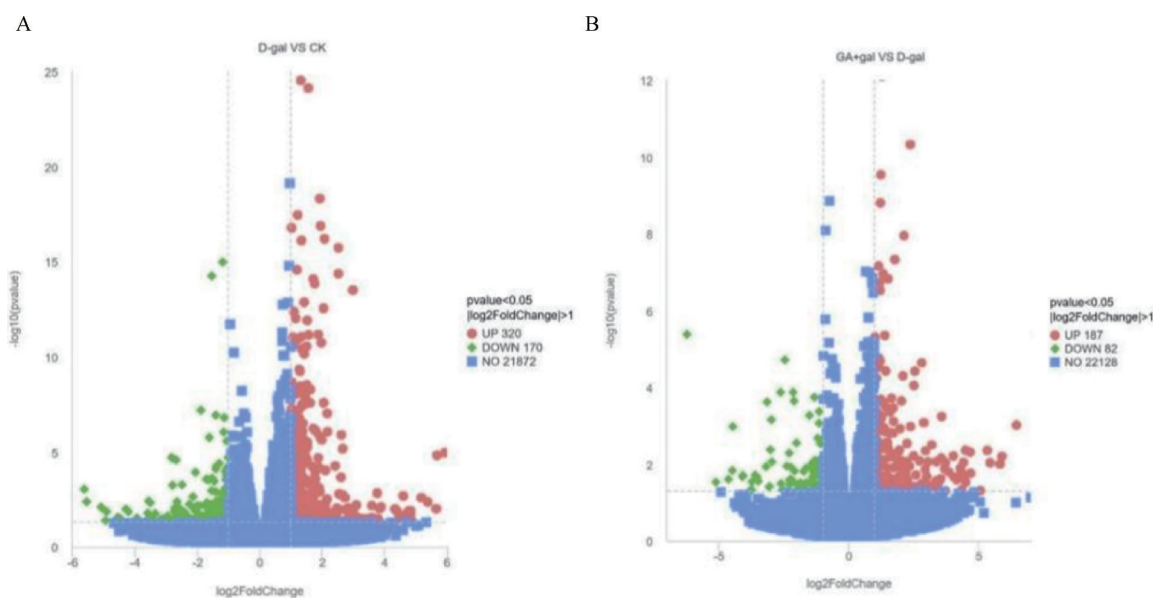
图2 18 β -GA对肺组织细胞凋亡的影响

Fig. 2 The effect of 18 β -GA on apoptosis of lung tissue cells

2.2 断奶仔猪肺组织转录组测序结果和分析

2.2.1 肺组织转录组差异表达基因分析 对D-gal组与CK组肺组织进行转录组分析结果如图3A所示,共筛选出490个差异表达基因,其中上

调基因170个,下调基因320个;对GA+gal组和D-gal组肺进行转录组分析结果如图3B所示,共筛选出269个差异表达基因,其中上调基因187个,下调基因82个。



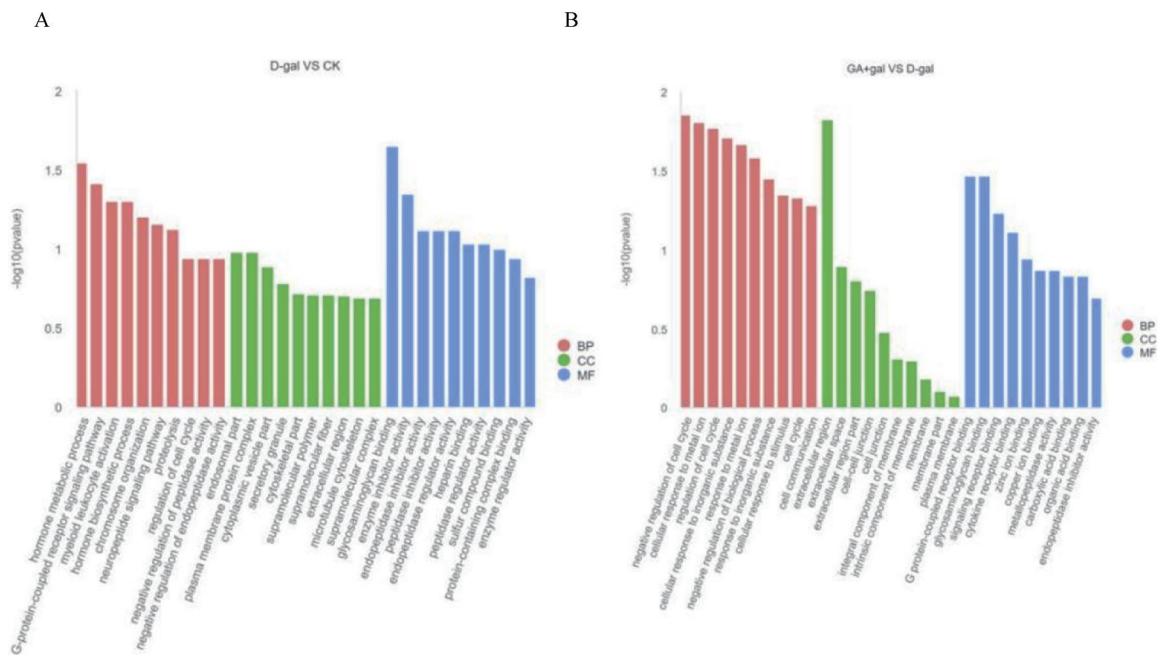
A. D-gal与CK组差异表达基因分析;B. GA+gal与D-gal组差异表达基因分析

A. Analysis of differentially expressed genes between D-gal and CK groups; B. Analysis of differentially expressed genes between GA+gal and D-gal groups

图3 各组间差异表达基因分析

Fig. 3 Analysis of differentially expressed genes among groups

2.2.2 肺组织转录组差异表达基因功能富集分析 对D-gal组与CK组肺490个差异表达基因进行GO富集,根据 P 值排序,每个条目选取前十条结果进行可视化,绘制条形图,结果如图4A所示。差异表达基因在生物过程(BP)中主要富集在激素代谢过程、细胞周期的调节、肽酶活性的负调节等过程;细胞成分(CC)主要富集在内体部分、质膜蛋白复合物、细胞质囊泡部分等;分子功能(MF)主要富集糖胺聚糖结合、内肽酶调节剂活性、肽酶调节因子活性等。



A. D-gal组 vs. CK组GO功能富集分析;B. GA+gal组 vs. D-gal组GO功能富集分析

A. GO functional enrichment analysis between D-gal group and CK group ; B. GO functional enrichment analysis between GA+gal group and D-gal group

图4 GO功能富集分析

Fig. 4 GO functional enrichment analysis

2.2.3 肺组织转录组差异表达基因KEGG通路富集分析 对D-gal组与CK组肺490个差异表达基因进行KEGG通路富集分析共获得174条信号通路,根据GeneRatio排名,除疾病外排行前20的信号通路如图5A所示:主要涉及细胞因子-细胞因子受体相互作用、细胞周期、神经活性配体-受体相互作用、PI3K-AKT信号通路、钙信号通路、P53信号通路等通路。

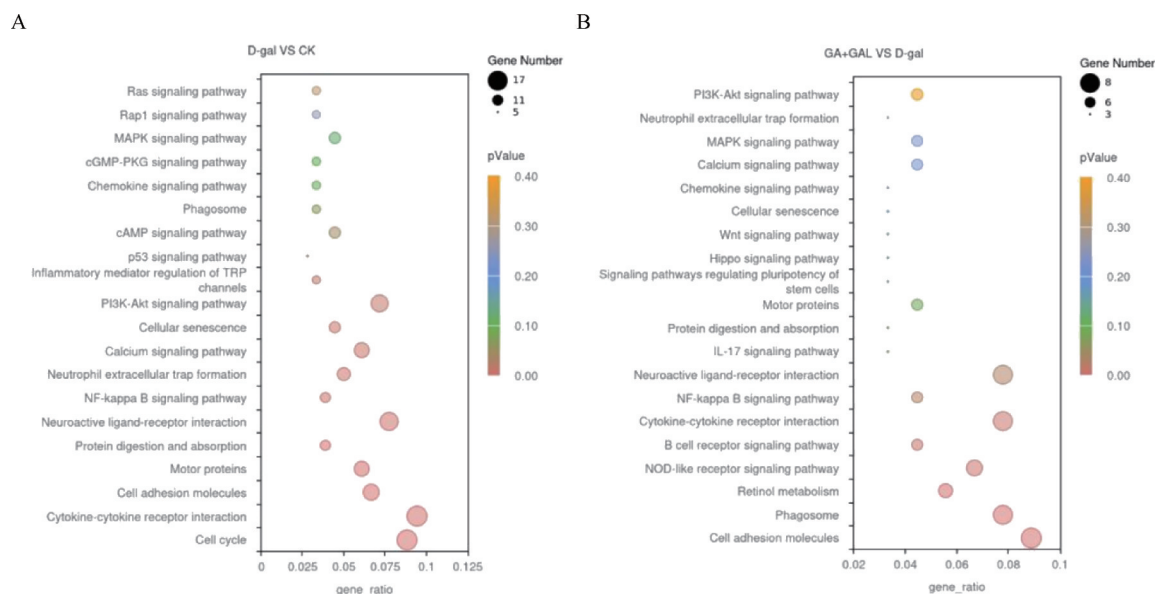
对GA+gal组和D-gal组肺269个差异表达基因进行KEGG通路富集分析共获得240条信号通路,根据GeneRatio排名,除疾病外排行前20的信号通路如图5B所示:主要涉及细胞黏附分子、吞噬体、

对GA+gal组与D-gal组肺组织的269个差异表达基因进行GO富集,根据 P 值排序,每个条目选取前十条结果进行可视化,绘制条形图,结果如图4B所示。差异表达基因在生物过程(BP)中主要富集在细胞周期的负调节、细胞对金属离子的反应、细胞周期的调节等;细胞成分(CC)主要富集在细胞外区域、细胞外间隙、细胞外区域部分等;分子功能(MF)主要富集在G蛋白偶联受体结合、糖胺聚糖结合、信号受体结合等。

视黄醇代谢、PI3K-AKT信号通路等通路。

2.3 18 β -GA通过PI3K/AKT和P53信号通路对肺组织氧化损伤的影响

为观察18 β -GA对断奶仔猪氧化损伤肺组织PI3K/AKT和P53信号通路的影响,进行了荧光定量PCR和Western blot试验检测。如表7显示,与CK组相比,肺组织氧化损伤造成PI3K、AKT基因表达水平显著升高($P < 0.05$),TP53基因表达水平极显著升高($P < 0.001$);添加18 β -GA能够使AKT基因表达水平有降低的趋势($0.05 \leq P < 0.1$),PI3K基因表达水平显著降低($P < 0.05$),TP53基因表达水平极显著升高($P < 0.001$)。



A. D-gal组 vs. CK组 KEGG 信号通路分析; B. GA+gal组 vs. D-gal组 KEGG 信号通路分析

A. KEGG signaling pathway analysis between D-gal group and CK group; B. KEGG signaling pathway analysis between GA+gal group and D-gal group

图5 KEGG 信号通路分析

Fig. 5 KEGG signaling pathway analysis

表7 18 β -GA对PI3K、AKT基因表达的影响

Table 7 Effects of 18 β -GA on PI3K and AKT gene expression

项目 Item	CK组 CK group	D-gal组 D-gal group	GA+gal组 GA+gal group	P值 P-value
PI3K	1.13 $\pm$ 0.23 ^b	2.32 $\pm$ 0.31 ^a	1.28 $\pm$ 0.17 ^b	0.009
AKT	1.01 $\pm$ 0.18 ^b	2.34 $\pm$ 0.49 ^a	1.45 $\pm$ 0.16 ^{ab}	0.031
TP53	0.78 $\pm$ 0.09 ^b	2.46 $\pm$ 0.40 ^a	1.10 $\pm$ 0.11 ^b	<0.001

图6显示,各组间PI3K、AKT、P-AKT蛋白表达水平无显著差异($P>0.05$);与CK组相比,D-gal组肺组织蛋白P53、P-PI3K表达水平显著上升($P<0.05$);添加18 β -GA后,P53蛋白表达水平有下降的趋势($0.05\leq P<0.1$),P-PI3K蛋白表达水平无显著差异($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 18 β -GA对断奶仔猪肺脏氧化还原系统的影响

丙二醛(MDA)是氧自由基发生脂质过氧化反应的终产物之一,可在一定程度反映氧自由基对机体的脂质过氧化损伤程度^[13]。车丽涛等^[14]研究表明,18 β -GA可降低血清MDA含量。8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)是一种由活性氧产生的DNA碱基修饰产物,是氧化性DNA损伤的标志物^[15]。Khumsri等^[16]的研究发现D-gal可诱导DNA损伤的发生。

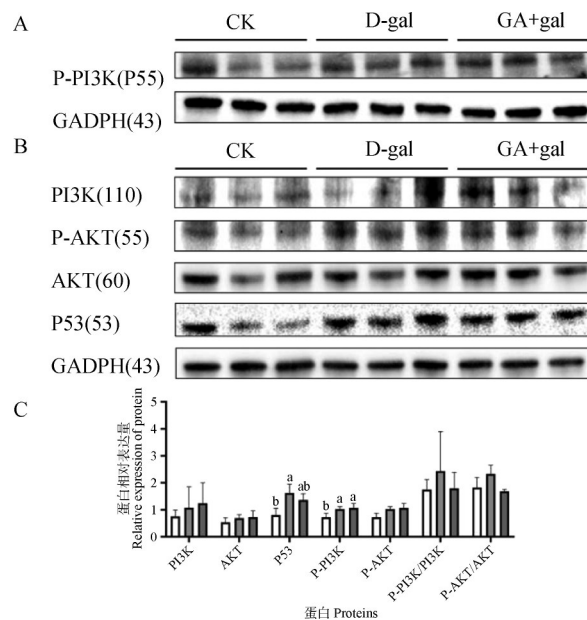


图6 18 β -GA对肺组织蛋白相对表达量的影响

Fig. 6 The effect of 18 β -GA on relative proteins expression in lung tissue

本研究显示,氧化应激条件下断奶仔猪肺中的MDA和8-OHdG含量有上升的趋势;饲料中添加 18β -GA可显著降低MDA和8-OHdG含量,表明添加 18β -GA可有效缓解D-gal诱导的断奶仔猪肺的脂质损伤和DNA损伤。核因子-E2相关因子2(Nrf2)可转录控制多个抗氧化相关基因^[17],CAT、SOD1都是Nrf2调控的抗氧化因子,它们可通过催化细胞内氧自由基(O^{2-})转化为过氧化氢(H_2O_2)和分子氧(O_2),随后转换为 H_2O 和 O^{2-} 缓解氧化应激^[18]。据Sun等^[19]报道,降低MDA水平和恢复抗氧化酶SOD、CAT的正常水平可以改善顺铂诱导的氧化应激。Huo等^[20]研究表明在铜暴露下导致线粒体应激中,Nrf2,SOD的表达量显著上升。在Zhang等^[21]研究中,缺硒条件下猪的肝组织发生氧化应激,CAT活性增加。本研究显示,氧化应激条件下仔猪肺组织CAT活性呈现上升趋势,SOD活性显著上升,Nrf2、CAT、SOD1的基因表达量呈现上升趋势,表明在D-gal诱导的氧化应激中SOD、CAT作为氧化系统中的重要防御发挥作用。Zhu等^[22]的研究表明与 18β -GA同为三萜皂苷的甘草酸可以通过降低MDA含量、SOD活性,下调Nrf2基因表达量,减轻大鼠肺组织氧化应激。本研究中,饲料中添加 18β -GA后,仔猪肺组织SOD活性、CAT活性和Nrf2、SOD1、CAT的基因表达量恢复至和对照组相同水平,表明 18β -GA能通过调节仔猪肺抗氧化相关酶活性和基因表达量缓解D-gal诱导的断奶仔猪肺脏氧化还原系统紊乱。

3.2 18β -GA对断奶仔猪肺组织损伤的影响

D-gal进入体内后通常由酶代谢为葡萄糖。然而,在高水平下,它会导致活性氧(ROS)和晚期糖基化终产物(AGEs)的积累,进而发生促炎反应^[23]。MLI能够反映肺泡平均直径,MAN能够反映肺泡密度。它们是肺损伤的重要衡量指标。Ji等^[24]研究表明,每天皮下注射D-gal $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 90 d后会造成比格犬肺泡壁的破坏和炎性浸润形式的肺损伤。本研究对断奶仔猪的肺组织切片进行了形态学观察,结果表明D-gal造模导致断奶仔猪的肺小泡发生破裂变成肺大泡,肺泡间隔变宽,炎性细胞大量浸润,MLI显著增加。有研究表明,当肺发生氧化应激时,炎症因子IL-8^[25]、IL-18^[26]、TGF- β ^[27]大量释放。本研究显示,饲喂 18β -GA缓解了D-gal造模后断奶仔猪肺泡结构损伤和炎性浸润程度,降低了炎症因子IL-8、IL-18、TGF- β 的水平,这与Yoshida

等^[28]、Chen等^[29]的研究结果一致。

3.3 18β -GA对断奶仔猪肺组织损伤的转录组学分析

转录组数据表明,D-gal显著影响细胞周期、PI3K/AKT、P53信号通路等; 18β -GA可通过影响细胞周期进程调节细胞黏附分子、吞噬体、PI3K/AKT信号通路、视黄醇代谢、细胞因子-细胞因子受体相互作用等信号通路缓解肺损伤。

PI3K/Akt信号通路在调节细胞周期、细胞凋亡发挥重要作用。当细胞DNA发生损伤时,细胞会开启自我修复,当损伤超过其修复能力时,细胞就会退出细胞周期并进入细胞周期停滞状态^[27],为修复提供时间,但如果DNA损伤过度严重无法修复时,就会发生细胞凋亡。本试验结果表明,氧化应激影响了肺细胞周期,可能通过PI3K/AKT信号通路,诱导了细胞凋亡的发生,使肺组织凋亡细胞率显著上升。这与Shang等^[30]在II型肺上皮细胞诱导的氧化应激造成细胞周期停滞,并且激活PI3K/AKT信号通路结果一致。本研究中,添加饲喂 18β -GA使氧化应激状态下显著上升的PI3K/AKT通路关键基因PI3K、AKT表达量有下降趋势。这一结果初步表明, 18β -GA可能对PI3K/AKT信号通路存在潜在调控作用,发挥对氧化应激肺损伤的缓解作用。然而,该结论尚需开展更多深入研究予以进一步证实。

P53信号通路可协调多种反应,包括细胞周期停滞、DNA修复、细胞凋亡等。有研究表明,细胞DNA损伤引起的肺损伤会迅速激活P53信号通路,促进肺泡上皮细胞的凋亡^[31]。Luo等^[32]的研究表明,当细胞周期停滞时,TP53基因表达量显著升高,P53蛋白表达量增加。在本研究中,饲喂D-gal显著影响了断奶仔猪肺细胞周期,使P53通路关键基因TP53、关键蛋白P53表达水平显著升高,激活了P53信号通路,这和Shen等^[33]的研究结果一致。有研究表明,和 18β -GA同为三萜类化合物的积雪草苷可抑制P53信号通路的激活来缓解氧化应激和细胞凋亡^[34]。Guo^[35]研究发现,甘草酸能显著降低蛋白P53表达水平,抑制P53信号通路缓解大鼠肝细胞凋亡。本研究中,与D-gal组相比较,饲喂 18β -GA后,TP53基因表达水平显著下降,P53蛋白表达水平呈现下降趋势,表明 18β -GA能够通过抑制P53信号通路激活,缓解D-gal诱导的断奶仔猪肺组织的细胞周期停滞和细胞凋亡。

4 结 论

4.1 18 β -GA有效缓解了D-gal诱导的断奶仔猪肺组织DNA和脂质氧化损伤,降低了仔猪肺组织炎症水平增加和细胞凋亡的发生。

4.2 18 β -GA能够通过抑制P53信号通路的激活,来调节细胞周期缓解肺的氧化损伤。

参考文献(References):

- [1] BALAM-MAY A J, RAMIREZ-ESTUDILLO C, LAZO-VÁZQUEZ G, VEGA-LÓPEZ M A. Postnatal development of lung T lymphocytes in a porcine model[J]. *Lung*, 2014, 192: 793-802.
- [2] RUGGERI J, SALOGNI C, GIOVANNINI S, et al. Association between infectious agents and lesions in post-weaned piglets and fattening heavy pigs with porcine respiratory disease complex (PRDC) [J]. *Front Vet Sci*, 2020, 7: 636.
- [3] KUBERKA Z, MEE J F, WALASZEK-KAYA OGLU A, et al. Relationships between pig farm management and facilities and lung lesions' scores and between lung lesions scores and carcass characteristics[J]. *BMC Vet Res*, 2024, 20(1): 124.
- [4] 黄凯勇, 王其龙, 杨景森, 等. 甘草主要活性成分及其在动物生产中的应用研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2022, 58(6): 48-52.
- HUANG K Y, WANG Q Y, YANG J S, et al. Research progress on application of main active components of liquorice in animal production [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2022, 58(6): 48-52. (in Chinese)
- [5] 郭柳彤, 宿树兰, 季浩, 等. 甘草次酸制备工艺及其抗氧化、酪氨酸酶抑制活性研究[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2022, 24(10): 46-50.
- GUO L T, SU S L, JI H, et al. Preparation technology of glycyrrhetic acid and its antioxidant and tyrosinase inhibitory activities[J]. *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, 2022, 24(10): 46-50. (in Chinese)
- [6] GUO P, JIN L, ZHOU H, et al. Glycyrrhetic acid protects against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*-induced lung epithelial cells injury by regulating inflammation and oxidative stress[J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2023, 24(1): 5.
- [7] QING C, ZIYUN L, XUEFEI Y, et al. Protective effects of 18 β -glycyrrhetic acid on neonatal rats with hyperoxia exposure [J]. *Inflammation*, 2022, 45(3): 1224-1238.
- [8] AHMAD S, KHAN A, ALI W, et al. Fisetin rescues the mice brains against D-galactose-induced oxidative stress, neuroinflammation and memory impairment[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 612078.
- [9] EL-FAR A H, ELGHAITY M M, MOHAMED S A, et al. Diosgenin alleviates D-galactose-induced oxidative stress in rats' brain and liver targeting aging and apoptotic marker genes [J]. *Front Mol Biosci*, 2024, 11: 1303379.
- [10] PINTANA H, SAENGMEARNUPARP T, APAIJAI N, et al. Chronic exposure with 5-alpha reductase inhibitor ameliorates anxiety and depression-like behaviors by reducing systemic oxidative stress in D-galactose-induced aging male rats [J]. *Alzheimer's & Dementia*, 2023, 19(S13): 074018.
- [11] 郭欣, 胡代菊, 梅晓冬. 烟雾暴露小鼠肺部氧化应激与炎症的变化及戒烟的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(6): 757-60.
- GUO X, HU D J, MEI X D. Oxidative stress and inflammatory changes in the lung caused by cigarette smoking exposure in mice and the effect of smoking cessation [J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2015, 50(6): 757-760. (in Chinese)
- [12] ZHANG X Y, ZHANG C, SUN Q Y, et al. Infliximab protects against pulmonary emphysema in smoking rats [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(16): 2502-2506.
- [13] WANG G, XIONG D, WU M, et al. Induction of time- and dose-dependent oxidative stress of triazophos to brain and liver in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2019, 228: 108640.
- [14] 车丽涛, 张春勇, 韩佃刚, 等. 甘草次酸对青年母猪生长性能、抗氧化能力及生殖激素浓度的影响[J]. *动物营养学报*, 2020, 32(4): 1586-1594.
- CHE L T, ZHANG C Y, HAN D G, et al. Effects of glycyrrhetic acid on growth performance, antioxidant capacity and reproductive hormone concentrations of prepubertal gilts [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(4): 1586-1594. (in Chinese)
- [15] CHEN C-M, HWANG J, CHOU H-C. Immunization with anti-Tn immunogen in maternal rats protects against hyperoxia-induced kidney injury in newborn offspring [J]. *Pediatr Res*, 2021, 89(3): 476-482.
- [16] KHUMSRI W, PAYUHAKRIT W, KONGKAEW A, et al. Box a of HMGB1 maintains the DNA gap and

- prevents DDR-induced kidney injury in D-galactose induction rats[J]. *In Vivo*, 2024, 38(3):1170.
- [17] MA Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013, 53(1):401-426.
- [18] WANG J, WANG S, GUO H, et al. Rosmarinic acid protects rats against post-stroke depression after transient focal cerebral ischemic injury through enhancing antioxidant response [J]. *Brain Res*, 2021, 1757: 147336.
- [19] SUN Y, YANG J, WANG L, et al. Crocin attenuates cisplatin-induced liver injury in the mice[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2014, 33(8):855-862.
- [20] HUO H, WANG S, BAI Y, et al. Copper exposure induces mitochondrial dynamic disorder and oxidative stress via mitochondrial unfolded protein response in pig fundic gland [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 223:112587.
- [21] ZHANG Y, YU D, ZHANG J, et al. The role of necroptosis and apoptosis through the oxidative stress pathway in the liver of selenium-deficient swine [J]. *Metallomics*, 2020, 12(4):607-616.
- [22] ZHU L, WEI M, YANG N, et al. Glycyrrhizic acid alleviates the meconium-induced acute lung injury in neonatal rats by inhibiting oxidative stress through mediating the Keap1/Nrf2/HO-1 signal pathway [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1):2616-2626.
- [23] MALLIDIS C, AGBAJE I, ROGERS D, et al. Distribution of the receptor for advanced glycation end products in the human male reproductive tract: prevalence in men with diabetes mellitus [J]. *Hum Reprod*, 2007, 22(8):2169-2177.
- [24] JI M, SU X, LIU J, et al. Comparison of naturally aging and D-galactose induced aging model in beagle dogs [J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2017, 14(6):5881-5888.
- [25] BONCOEUR E, CRIQ V S, BONVIN E, et al. Oxidative stress induces extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase in cystic fibrosis lung epithelial cells: Potential mechanism for excessive IL-8 expression [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2008, 40(3): 432-446.
- [26] AN X, SUN X, YANG X, et al. Oxidative stress promotes ventilator-induced lung injury through activating NLRP3 inflammasome and TRPM2 channel [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 3448-3455.
- [27] OMMATI M M, SABOURI S, NIKNAHAD H, et al. Pulmonary inflammation, oxidative stress, and fibrosis in a mouse model of cholestasis: the potential protective properties of the dipeptide carnosine [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2023, 396(6):1129-1142.
- [28] YOSHIDA T, ABE K, IKEDA T, et al. Inhibitory effect of glycyrrhizin on lipopolysaccharide and D-galactosamine-induced mouse liver injury [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2007, 576(1): 136-142.
- [29] CHEN J, WANG C, PAN X, et al. Glycyrrhetic acid mitigates radiation-induced pulmonary fibrosis via inhibiting the secretion of TGF- β 1 by treg cells[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2024, 118(1):218-230.
- [30] SHANG Y, ZHOU Q, WANG T, et al. Airborne nitro-PAHs induce Nrf2/ARE defense system against oxidative stress and promote inflammatory process by activating PI3K/Akt pathway in A549 cells [J]. *Toxicology in Vitro*, 2017, 44:66-73.
- [31] SHETTY S K, TIWARI N, MARUDAMUTHU A S, et al. p53 and miR-34a feedback promotes lung epithelial injury and pulmonary fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(5):1016-1034.
- [32] LUO D, TANG X, WANG Y, et al. Selenium deficiency exacerbated Bisphenol A-induced intestinal toxicity in chickens: Apoptosis and cell cycle arrest mediated by ROS/P53[J]. *Sci Total Environ*, 2024, 913:169730.
- [33] SHEN L, FAN L, LUO H, et al. Cow placenta extract ameliorates d-galactose-induced liver damage by regulating BAX/CASP3 and p53/p21/p16 pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 323:117685.
- [34] ZHENWEN L, YU C, RIFANG G, et al. Asiaticoside prevents oxidative stress and apoptosis in endothelial cells by activating ROS-dependent p53/Bcl-2/Caspase-3 signaling pathway [J]. *Curr Mol Med*, 2023, 23(10): 1116-1129.
- [35] GUO X L. Glycyrrhizic acid attenuates CCl4-induced hepatocyte apoptosis in rats via p53-mediated pathway [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(24): 3781-3791.

(编辑 范子娟)