

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research6-姜酚通过 Nur77 调控 PI3K/Akt 信号通路
对幼年鼠急性呼吸窘迫综合征的保护作用

Protective effects of 6-gingerol on acute respiratory distress syndrome in juvenile mice by regulating the PI3K/Akt signaling pathway through Nur77

黄世勇, 郑 静

(电子科技大学 医学院 附属妇女儿童医院、成都
市妇女儿童中心医院 儿童重症医学科, 四川
成都 610091)

HUANG Shi-yong, ZHENG Jing

(Department of Pediatric Intensive Care,
Women and Children's Hospital affiliated
to the School of Medicine, University of
Electronic Science and Technology of
China, Chengdu Women and Children's
Central Hospital, Chengdu 610091,
Sichuan Province, China)基金项目:成都市医学科研课题立项基金资助
项目(2023107)作者简介:黄世勇(1975-),男,副主任医师,主
要从事儿童呼吸重症方面的工作

通信作者:郑静,主任医师

MP:18980682031

E-mail: zj365happy@163.com

摘要:目的 研究6-姜酚通过神经生长因子诱导基因B(Nur77)对急性呼吸窘迫综合征(ARDS)幼鼠的保护作用及其可能的机制。方法 用气管滴注脂多糖法建立ARDS幼鼠模型,将建模后的48只幼鼠随机分为模型组、6-姜酚组(腹腔注射 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 6-姜酚)、6-姜酚+sh-NC组(鼻滴sh-NC阴性对照腺病毒+腹腔注射 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 6-姜酚)和6-姜酚+sh-Nur77组(鼻滴sh-Nur77腺病毒+腹腔注射 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 6-姜酚),另取12只正常幼鼠气管滴注等量无菌0.9% NaCl为假手术组。检测各组幼鼠肺湿/干(W/D)比值,以免疫组化法检测肺组织Ⅲ型胶原蛋白(collagen Ⅲ)阳性表达情况,以试剂盒法检测幼鼠肺部组织细胞凋亡情况,以蛋白质印迹法检测通路相关蛋白表达情况。结果 假手术组、模型组、6-姜酚组、6-姜酚+sh-NC组和6-姜酚+sh-Nur77组的W/D比值分别为 2.20 ± 0.26 、 6.65 ± 0.92 、 3.89 ± 0.52 、 3.72 ± 0.44 和 5.55 ± 0.78 , collagen Ⅲ阳性水平分别为 1.00 ± 0.22 、 3.99 ± 0.54 、 1.85 ± 0.28 、 1.76 ± 0.29 和 2.79 ± 0.34 ,细胞凋亡率分别为 $(4.65\pm0.66)\%$ 、 $(39.62\pm5.03)\%$ 、 $(18.63\pm2.33)\%$ 、 $(17.82\pm2.12)\%$ 和 $(33.65\pm5.03)\%$,磷酸化磷脂酰肌醇3-激酶/磷脂酰肌醇3-激酶(p-PI3K/PI3K)水平分别为 1.00 ± 0.13 、 1.66 ± 0.22 、 1.23 ± 0.17 、 1.21 ± 0.14 和 1.58 ± 0.24 ,磷酸化蛋白激酶B/蛋白激酶B(p-Akt/Akt)水平分别为 1.00 ± 0.16 、 1.78 ± 0.26 、 1.33 ± 0.21 、 1.38 ± 0.19 和 1.60 ± 0.22 。模型组的上述指标与假手术组相比,6-姜酚组的上述指标与模型组相比,6-姜酚+sh-Nur77组的上述指标与6-姜酚+sh-NC组相比,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论 6-姜酚干预能够改善ARDS幼鼠肺损伤,通过上调Nur77表达,抑制肺组织炎症反应,减少肺组织细胞凋亡,并促进凝血/纤溶平衡,其作用机制可能与抑制PI3K/Akt通路有关。

关键词:6-姜酚;神经生长因子诱导基因B;急性呼吸窘迫综合征;炎症因子;细胞凋亡

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.09.010

中图分类号:R28

文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2025)09-1254-07

Abstract: Objective To investigate the protective effects and potential mechanisms of 6-gingerol against acute respiratory distress syndrome (ARDS) in juvenile mice through nerve growth factor-induced clone B (Nur77). **Methods** The juvenile mouse model of ARDS was established by tracheal instillation of lipopolysaccharide. After modeling, 48 juvenile mice were randomly divided into the model group, the 6-gingerol group (intraperitoneal injection of $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 6-gingerol), the 6-gingerol + sh-NC group (intranasal instillation of sh-NC negative control adenovirus + intraperitoneal injection of $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

6 - gingerol), and the 6 - gingerol + sh - Nur77 group (intranasal instillation of sh - Nur77 adenovirus + intraperitoneal injection of $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 6 - gingerol). Another 12 normal juvenile mice were given an equal volume of sterile 0.9% NaCl by tracheal instillation as the sham operation group. Detected the lung wet/dry (W/D) ratio of young mice in each group. The immunohistochemistry method was used to detect the positive expression of collagen III in lung tissues. The kit was used to detect apoptosis in the lung tissues of young mice. The expressions of pathway - related proteins were detected by Western blotting. **Results** The W/D ratios of the sham operation group, the model group, the 6 - gingerol group, the 6 - gingerol + sh - NC group and the 6 - gingerol + sh - Nur77 group were 2.20 ± 0.26 , 6.65 ± 0.92 , 3.89 ± 0.52 , 3.72 ± 0.44 and 5.55 ± 0.78 , respectively; the positive levels of collagen III were 1.00 ± 0.22 , 3.99 ± 0.54 , 1.85 ± 0.28 , 1.76 ± 0.29 and 2.79 ± 0.34 , respectively; the apoptosis rates were $(4.65 \pm 0.66)\%$, $(39.62 \pm 5.03)\%$, $(18.63 \pm 2.33)\%$, $(17.82 \pm 2.12)\%$ and $(33.65 \pm 5.03)\%$, respectively; the levels of phosphorylated phosphatidylinositol 3 - kinase/phosphatidylinositol 3 - kinase (p - PI3K/PI3K) were 1.00 ± 0.13 , 1.66 ± 0.22 , 1.23 ± 0.17 , 1.21 ± 0.14 and 1.58 ± 0.24 , respectively; the levels of phosphorylated protein kinase B/protein kinase B (p - Akt/Akt) were 1.00 ± 0.16 , 1.78 ± 0.26 , 1.33 ± 0.21 , 1.38 ± 0.19 and 1.60 ± 0.22 , respectively. Compared with the sham operation group, the differences in the above indicators of the model group were statistically significant (all $P < 0.05$); compared with the model group, the differences in the 6 - gingerol group were statistically significant (all $P < 0.05$); compared with the 6 - gingerol + sh - NC group, the differences in the 6 - gingerol + sh - Nur77 group were also statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** 6 - gingerol intervention can improve lung injury in young ARDS mice, up - regulate the expression of Nur77, inhibit lung tissue inflammatory response, reduce lung tissue apoptosis, and promote coagulation/fibrinolytic balance, and its mechanism of action may be related to the inhibition of PI3K/Akt pathway.

Key words: 6 - gingerol; nerve growth factor - induced clone B; acute respiratory distress syndrome; inflammatory factors; apoptosis

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 多由肺炎、创伤、严重感染、胃内容物误吸等引起,是由炎症介导的以顽固性低氧血症为典型表现的非心源性肺水肿^[1-2]。报道显示,ARDS 的死亡率高达 30% ~ 50%,全球重症监护病房的所有患者中约有 10% ~ 15% 发生 ARDS^[3]。近年来的研究表明,抑制肺部炎症反应是治疗 ARDS 的新型方法^[4]。6 - 姜酚是从生姜中分离出来的酚类化合物,具有抗炎、抗氧化等药理作用^[5]。神经生长因子诱导基因 B (nerve growth factor - induced gene B, Nur77) 属于孤儿核受体的 NR4A 亚家族的成员,参与细胞凋亡、代谢和炎症等过程,可作为炎症刺激的早期应答基因和临床防治哮喘气道重构的潜在靶点^[6-7]。本研究旨在探究 6 - 姜酚通过 Nur77 对 ARDS 幼鼠的保护作用及其可能的机制。

材料与方法

1 材料

动物 Sprague - Dawley 雄性幼鼠,鼠龄 5 周,体质量约 $(117.91 \pm 3.12) \text{ g}$,购自四川维通利华实验动物技

术有限公司。动物生产许可证号:SCXK(川)2023 - 0040。本实验经成都市妇女儿童中心医院动物伦理委员会批准[伦理批号:伦审科 2024 第(09)号]。

药品与试剂 6 - 姜酚,规格:每瓶 100 mg,纯度:99.25%,批号:149745,上海陶术生物科技有限公司生产。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS),美国 MedChem-Express 公司生产;苏木精 - 伊红 (hematoxylin - eosin, HE) 染色试剂盒、细胞凋亡试剂盒,均为北京索莱宝科技有限公司生产;TRIzol 试剂、逆转录试剂盒、荧光定量试剂盒,均为美国 Thermo Fisher 公司生产;髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO),爱必信 (上海) 科技有限公司生产;改良吉姆萨染色试剂盒,上海碧云天生物公司生产;肿瘤坏死因子 - α (tumor necrosis factor - α , TNF - α)、白细胞介素 - 1β (interleukin - 1β , IL - 1β)、IL - 6、IL - 8、组织因子 (tissue factor, TF)、纤溶酶原激活物抑制药 - 1 (plasminogen activator inhibitor - 1, PAI - 1)、凝血酶检测试剂盒,均为生工生物工程 (上海) 股份有限公司生产;Nur77、III 型胶原蛋白 (collagen III) 抗体,均为英国 Abcam 公司生产;兔源磷脂酰肌醇 3 - 激酶 (phosphatidylinositol 3 - kinase, PI3K)、磷酸化 PI3K (phosphorylated PI3K, p - PI3K)、

蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated AKT, p-Akt) 抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G 二抗,均为美国 CST 公司生产。

仪器 BX51 荧光显微镜,日本 Olympus 公司产品;Opticsmate U1 酶标仪,杭州优米仪器有限公司产品;QuantStudio 5 荧光定量聚合酶链反应仪,美国 Thermo Fisher 公司产品。

2 实验方法

2.1 模型构建^[8]

所有幼鼠均用 10% 水合氯醛经腹腔内注射麻醉,待其充分麻醉后,取仰卧位固定于实验台上,固定头部,充分暴露颈部,光源照在小鼠颈部,镊子夹住舌尖向左前方伸展,使其暴露出完整口腔,用棉球擦去口腔分泌物,可见声门开合,用 20 G 气管插管沿着舌根插入气管,拔出滤芯。插管后立刻通过气管滴注 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度为 0.1% LPS 溶液,滴注后竖直晃动幼鼠 1 min 建立 ARDS 幼鼠模型,假手术组气管滴注等量无菌 0.9% NaCl。

2.2 动物分组与给药方法

将幼鼠随机分为假手术组、模型组、6-姜酚组、6-姜酚 + sh-NC 组和 6-姜酚 + sh-Nur77 组,每组 12 只。6-姜酚组在吸入 LPS 前 12 h 通过腹腔注射 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 6-姜酚,随后进行造模处理。6-姜酚 + sh-NC 组在造模前 2 d,经麻醉幼鼠鼻滴入 sh-NC 阴性对照腺病毒 (1×10^9 PFUs) 悬液,在吸入 LPS 前 12 h 通过腹腔注射 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 6-姜酚。6-姜酚 + sh-Nur77 组:经鼻缓慢滴入 sh-Nur77 腺病毒 (1×10^9 PFUs) 悬液,在吸入 LPS 前 12 h 通过腹腔注射 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 6-姜酚。假手术组腹腔注射等量 0.9% NaCl。模型组按照“2.1”方法进行 ARDS 造模操作,腹腔注射等量 0.9% NaCl。

2.3 肺组织湿/干 (wet/dry, W/D) 比值^[9]

用吸入异氟烷法麻醉幼鼠,用颈椎脱臼法处死幼鼠,将其仰卧固定,暴露胸腔,迅速将肺组织完整取出。取新鲜左肺部分组织,用 0.9% NaCl 除去表面的血液和杂质,滤纸吸干表面水分后称取质量,记为湿质量 (wet, W),随后将肺组织置于 80 °C 干燥箱中进行 72 h 干燥处理直至达到恒质量,取出冷却后称取质量,记为干质量 (dry, D),最后通过公式计算肺组织 W/D 比值。

2.4 HE 染色法实验观察肺组织病理变化^[8]

用 4% 多聚甲醛固定各组幼鼠肺组织,乙醇梯度 (70%、80%、90%、95%、100%) 脱水后,常规石蜡包

埋切片 (厚度:5 μm)。将制备好的切片依次放入二甲苯和不同浓度的乙醇 (100%、95%、90%、80%、70%) 中脱蜡水化后,用 HE 试剂盒对切片进行苏木精和伊红染色处理,脱水透明后,滴加适量中性树胶封片,于光学显微镜下观察组织病理学变化。

2.5 实时荧光定量聚合酶链反应检测各组幼鼠肺组织中 Nur77 的表达情况

TRIzol 法提取各组幼鼠肺组织总 RNA,用超微量分光光度计评估 RNA 样品浓度,逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA 后,以 cDNA 为模板,按照荧光定量试剂盒说明书,用特定引物和荧光探针配制定量预混液进行扩增反应,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参基因,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算肺组织中 Nur77 相对表达水平。

2.6 免疫组化实验检测各组幼鼠肺组织中 Nur77 和 collagen III 的阳性表达情况^[7]

取“2.4”中已制备的肺组织切片,经二甲苯、梯度乙醇脱蜡水化处理后,用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的枸橼酸修复液进行抗原修复,3% 过氧化氢孵育 10 min,牛血清白蛋白封闭 30 min,滴加特异性一抗 Nur77 (1:100)、collagen III (1:400) 于 4 °C 孵育 16 h,洗涤后滴加辣根过氧化物酶标记二抗 (1:1000) 室温下孵育 1 h,用二氨基联苯胺染色,洗涤密封后,于光学显微镜下观察。

2.7 试剂盒检测支气管肺泡灌洗液 MPO、TF、PAI-1、凝血酶水平和中性粒细胞数量^[9]

幼鼠处死后,开胸暴露气管及肺,经气管注入 4 °C 预冷的无菌 0.9% NaCl,停留 30 s 后回吸,反复抽吸灌洗支气管和肺泡 3 次后,收集灌洗液 (回收率 > 80%),静置 1 h。取灌洗液 10 μL 于载玻片上,滴加改良吉姆萨染液,室温染色 1 min,进行中性粒细胞计数检查。在 4 °C 下,将支气管肺泡灌洗液以 $800 \times g$ 离心 10 min 后取上清液,用各相应试剂盒检测 MPO、TF、PAI-1 和凝血酶水平,操作严格按照各试剂盒说明书进行。

2.8 酶联免疫吸附分析法检测肺组织炎症因子水平^[10]

取各组幼鼠适量肺组织,加入预冷的磷酸缓冲盐溶液 (含 1% 蛋白酶抑制药),随后用组织匀浆仪充分匀浆,低温离心后,收集上清液。待试剂盒组分平衡至室温,严格按照试剂盒说明书,配制检测抗体溶液及梯度浓度的蛋白标准品,分别将样品、标准品依次加入微孔中,参照相应试剂盒说明书进行实验,最后于酶标仪下检测肺组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 的水平。

2.9 原位末端标记法检测细胞凋亡率^[9]

取“2.4”中已制备的各组幼鼠肺组织切片,脱蜡水化后,蛋白酶 K($20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)孵育 15 min,参照说明书配制检测液,在切片上加入工作液 $50\text{ }\mu\text{L}$ (覆盖圆形防蒸发膜)避光孵育 1 h,用磷酸缓冲盐溶液洗涤后,4',6-二脒基-2-苯基吲哚复染 10 min,洗涤后,滴加抗荧光淬灭封片液封片,于荧光显微镜下观察,每张切片选取 5 个视野进行拍照,用 Image J 软件计算细胞凋亡率。

2.10 蛋白质印迹法检测 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达^[11]

取各组幼鼠肺组织,用放射免疫沉淀法裂解缓冲液提取总蛋白,用二喹啉甲酸法测定样品组织蛋白原液浓度,取各组蛋白 $30\text{ }\mu\text{g}$ 加入上样缓冲液煮沸变性,用 10% 聚丙烯酰胺凝胶通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后,转至聚偏二氟乙烯膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入一抗 PI3K($1:1\text{ }000$)、p-PI3K($1:1\text{ }000$)、Akt($1:1\text{ }000$)、p-Akt($1:2\text{ }000$)于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,加入二抗 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,洗膜后化学发光显影,以 GAPDH 为内参,用凝胶成像系统进行曝光、拍照,用 Image J 软件计算各蛋白相对表达水平。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 进行数据分析。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用独立样本 t 检验。

结 果

1 6-姜酚对 ARDS 幼鼠肺组织中 Nur77 mRNA 水平的影响

6-姜酚组给予 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 6-姜酚;6-姜酚+sh-NC 组给予 sh-NC 阴性对照腺病毒+ $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

6-姜酚;6-姜酚+sh-Nur77 组给予 sh-Nur77 腺病毒+ $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 6-姜酚;模型组和假手术组均给予 0.9% NaCl。

假手术组、模型组和 6-姜酚组的 Nur77 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.14 、 1.48 ± 0.19 和 1.81 ± 0.21 , Nur77 阳性表达水平分别为 1.00 ± 0.18 、 1.36 ± 0.20 和 2.23 ± 0.32 。模型组的上述指标与假手术组比较,6-姜酚组的上述指标与模型组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.001$)。

2 6-姜酚通过 Nur77 改善 ARDS 幼鼠肺部损伤

假手术组幼鼠肺组织结构完整,肺泡间隔均一,无增宽,肺泡腔无明显出血、水肿及炎性细胞浸润;模型组幼鼠肺组织损伤明显,完整性缺失,肺泡间隔增厚明显,伴大量水肿液及炎性细胞浸润,部分可见透明膜形成;6-姜酚组与 6-姜酚+sh-NC 组肺组织损伤明显减轻,肺泡间隔增宽减少,水肿及出血减轻,伴少量炎症细胞浸润;6-姜酚+sh-Nur77 组幼鼠肺组织损伤程度较 6-姜酚+sh-NC 组增加。结果见图 1。

假手术组、模型组、6-姜酚组、6-姜酚+sh-NC 组和 6-姜酚+sh-Nur77 组的 W/D 比值分别为 2.20 ± 0.26 、 6.65 ± 0.92 、 3.89 ± 0.52 、 3.72 ± 0.44 和 5.55 ± 0.78 。模型组的 W/D 比值与假手术组比较,6-姜酚组的 W/D 比值与模型组比较,6-姜酚+sh-Nur77 组的 W/D 比值与 6-姜酚+sh-NC 组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.01$);6-姜酚+sh-NC 组的 W/D 比值与 6-姜酚组比较,在统计学上差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 6-姜酚通过 Nur77 改善 ARDS 幼鼠肺部炎症水平

模型组的 MPO、中性粒细胞数量、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 水平与假手术组比较,6-姜酚组的上述指标与模型组比较,6-姜酚+sh-Nur77

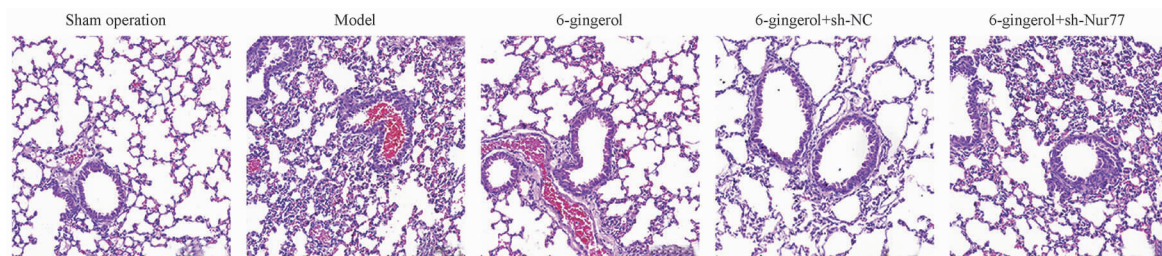


图 1 肺组织病理变化(苏木精-伊红染色, $\times 100$)

Figure 1 Pathological changes of lung tissues (hematoxylin-eosin staining, $\times 100$)

Model group: Acute respiratory distress syndrome (ARDS) model; Sham operation group: 0.9% NaCl; 6-gingerol group: Intraperitoneal injection of $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 6-gingerol; 6-gingerol+sh-NC group: Intranasal instillation of sh-NC negative control adenovirus + intraperitoneal injection of $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 6-gingerol; 6-gingerol+sh-Nur77 group: Intranasal instillation of sh-Nur77 adenovirus + intraperitoneal injection of $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 6-gingerol.

表1 各组幼鼠炎症水平的比较($\bar{x} \pm s$)Table 1 Comparison of the inflammation levels of young rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	MPO (ng · mL ⁻¹)	Neutrophil (1 × 10 ⁴ cell · mL ⁻¹)	TNF-α (pg · mL ⁻¹)	IL-1β (pg · mL ⁻¹)	IL-6 (pg · mL ⁻¹)	IL-8 (pg · mL ⁻¹)
Sham operation	12	96.32 ± 12.65	1.45 ± 0.19	40.32 ± 6.66	46.32 ± 7.77	23.15 ± 3.33	43.23 ± 6.66
Model	12	235.65 ± 201.33 ^{**}	15.38 ± 1.93 ^{**}	69.32 ± 9.62 ^{**}	78.32 ± 12.22 ^{**}	38.96 ± 5.88 ^{**}	60.36 ± 8.36 ^{**}
6-Gingerol	12	265.32 ± 33.23 ^{##}	5.68 ± 0.85 ^{##}	50.33 ± 5.96 ^{##}	58.12 ± 7.66 ^{##}	30.11 ± 4.62 ^{##}	52.66 ± 8.95 [#]
6-Gingerol + sh-NC	12	271.32 ± 36.23	5.55 ± 0.78	48.32 ± 6.33	60.02 ± 9.33	29.32 ± 4.88	51.55 ± 7.96
6-Gingerol + sh-Nur77	12	852.32 ± 102.32 ^{△△}	11.22 ± 1.55 ^{△△}	73.33 ± 10.33 ^{△△}	75.33 ± 13.18 [△]	35.96 ± 4.09 [△]	58.33 ± 6.99 [△]

Dose refer to figure 1; MPO: Myeloperoxidase; TNF-α: Tumor necrosis factor-α; IL-1β: Interleukin-1β; Compared with sham operation group,

^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; Compared with 6-gingerol + sh-NC group, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$.

表2 各组幼鼠肺组织中Ⅲ型胶原蛋白(collagen Ⅲ)相对阳性水平和组织因子(TF)、纤溶酶原激活物抑制药-1(PAI-1)及凝血酶水平的比较($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of the relative positive levels of type Ⅲ collagen (collagen Ⅲ) in the lung tissues and the levels of tissue factor (TF), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and thrombin in the tissues of young rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	Relative positive level of collagen Ⅲ	TF (pg · mL ⁻¹)	PAI-1 (pg · mL ⁻¹)	Thrombin (pg · mL ⁻¹)
Sham operation	1.00 ± 0.22	132.23 ± 18.95	43.65 ± 7.77	148.66 ± 16.33
Model	3.99 ± 0.54 ^{**}	173.99 ± 20.54 ^{**}	76.33 ± 9.12 ^{**}	277.33 ± 32.22 ^{**}
6-Gingerol	1.85 ± 0.28 ^{##}	144.32 ± 17.28 ^{##}	49.23 ± 7.02 ^{##}	180.33 ± 23.62 ^{##}
6-Gingerol + sh-NC	1.76 ± 0.29	140.76 ± 16.29	47.33 ± 6.66	182.66 ± 25.03
6-Gingerol + sh-Nur77	2.79 ± 0.34 ^{△△}	162.79 ± 20.34 ^{△△}	70.33 ± 8.63 ^{△△}	245.33 ± 30.32 ^{△△}

Dose and *n* refer to table 1; Compared with sham operation group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; Compared with 6-gingerol + sh-NC group, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$.

组的上述指标与6-姜酚+sh-NC组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);6-姜酚+sh-NC组的上述指标与6-姜酚组比较,在统计学上差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表1。

4 6-姜酚通过 Nur77 改善 ARDS 幼鼠高凝状态及纤溶抑制

模型组的 collagen Ⅲ 相对阳性表达水平和 TF、PAI-1、凝血酶水平与假手术组比较,6-姜酚组的上述指标与模型组比较,6-姜酚+sh-Nur77 组的上述指标与6-姜酚+sh-NC组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);6-姜酚+sh-NC组的上述指标与6-姜酚组比较,在统计学上差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表2。

5 6-姜酚通过 Nur77 对 PI3K/Akt 信号通路影响

如表3和图2所示:模型组的 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 水平与假手术组比较,6-姜酚组的上述指标与模型组比较,6-姜酚+sh-Nur77 组的上述指标与6-姜酚+sh-NC组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);6-姜酚+sh-NC组的上述指标与6-姜酚组比较,在统计学上差异无统计学意义($P > 0.05$)。

6 6-姜酚通过 Nur77 改善 ARDS 幼鼠肺部组织细胞凋亡

假手术组、模型组、6-姜酚组、6-姜酚+sh-NC组和6-姜酚+sh-Nur77 组的细胞凋亡率分别为

表3 各组幼鼠肺组织中磷酸化磷脂酰肌醇3-激酶/磷脂酰肌醇3-激酶(p-PI3K/PI3K)和磷酸化蛋白激酶B/蛋白激酶B(p-Akt/Akt)相对水平比较($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of the relative levels of phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase/phosphatidylinositol 3-kinase (p-PI3K/PI3K) and phosphorylated protein kinase B/protein kinase B (p-Akt/Akt) in the lung tissues of young rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
Sham operation	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.16
Model	1.66 ± 0.22 ^{**}	1.78 ± 0.26 ^{**}
6-Gingerol	1.23 ± 0.17 ^{##}	1.33 ± 0.21 ^{##}
6-Gingerol + sh-NC	1.21 ± 0.14	1.38 ± 0.19
6-Gingerol + sh-Nur77	1.58 ± 0.24 ^{△△}	1.60 ± 0.22 [△]

Dose and *n* refer to table 1; Compared with sham operation group,

^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$,

^{##} $P < 0.01$; Compared with 6-gingerol + sh-NC group, [△] $P < 0.05$,

^{△△} $P < 0.01$.

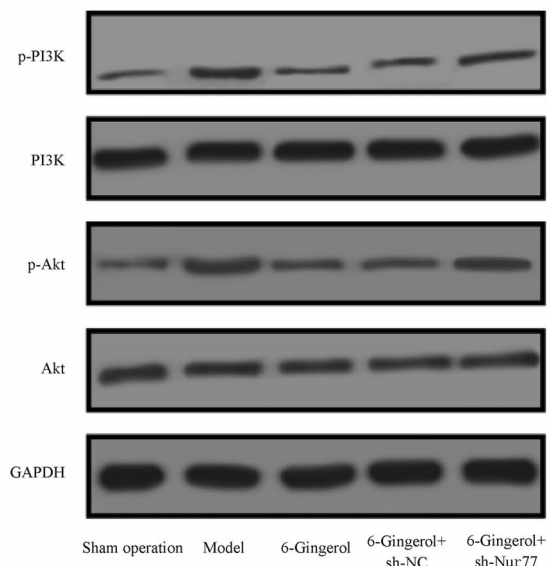


图2 用蛋白质印迹法检测磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B (PI3K/Akt)信号通路蛋白相对表达水平

Figure 2 Western blot was used to detect the relative expression levels of phosphatidylinositol 3-kinase / protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway proteins

(4.65 ± 0.66)%、(39.62 ± 5.03)%、(18.63 ± 2.33)%、(17.82 ± 2.12)%和(33.65 ± 5.03)%。模型组的细胞凋亡率与假手术组比较,6-姜酚组的细胞凋亡率与模型组比较,6-姜酚+sh-Nur77组的细胞凋亡率与6-姜酚+sh-NC组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);6-姜酚+sh-NC组的细胞凋亡率与6-姜酚组比较,在统计学上差异无统计学意义($P > 0.05$)。

讨 论

ARDS是一种危及生命的呼吸衰竭形式,是呼吸道感染最严重的并发症,致死率较高。LPS滴注刺激是制备实验性ARDS的标准模型,此模型可产生肺泡间隙增厚、炎症细胞因子增加、低氧血症等方面的病理特征^[12]。本实验用幼鼠LPS模型模拟ARDS,但人类ARDS存在年龄相关的免疫应答差异。幼鼠的肺泡发育尚未完全成熟,其炎症反应程度与凝血系统激活模式可能异于成年个体。临床ARDS常由病毒或细菌复合感染引发,而LPS单因素刺激模型难以完全模拟复杂的病理生理过程。未来需结合类器官或大动物模型进一步验证结果的临床转化潜力。HONG等^[13]研究发现,6-姜酚通过抑制炎症和氧化应激来减轻呼吸机诱发的肺损伤。YU等^[14]研究发现,6-姜酚通过调节双特

异性磷酸酶5介导的p38丝裂原活化蛋白激酶/应激活蛋白激酶信号通路对肝缺血再灌注损伤模型小鼠起到保护作用。本研究,6-姜酚干预后ARDS幼鼠肺组织损伤、肺水肿和炎症浸润均明显减轻,肺W/D比值下降,肺部组织细胞凋亡率降低,与孙立燕等^[8]研究结果相似,表明6-姜酚可在一定程度上改善ARDS幼鼠肺损伤情况。

既往研究表明,Nur77在肺中高水平表达,且其表达在LPS刺激后显著上调,过表达Nur77能够限制LPS对小鼠肺内皮屏障的破坏^[15]。这与本研究结果一致,提示上调Nur77水平可能成为有效治疗多种肺部炎症血管疾病的新策略。在ARDS期间,中性粒细胞延迟凋亡和巨噬细胞吞噬作用受损作为2个关键的限制环节,会导致继发性炎症风暴,促进ARDS的发生和发展^[16]。本研究发现,经6-姜酚治疗后,模型组幼鼠炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8)、MPO水平及中性粒细胞数量明显降低,进一步在6-姜酚组基础上敲低Nur77表达后,则出现相反的结果,表明6-姜酚可能通过提高Nur77表达来抑制ARDS幼鼠肺部的炎症反应,与王丽艳等^[17]的研究结果相似,青蒿琥酯通过降低哮喘幼鼠血清炎症因子IL-17、IL-6、INF- γ 的表达及支气管肺泡灌洗液中炎性细胞量,抑制气道炎症。临床研究表明,ARDS发病过程中,炎症介质的大量释放可以激活凝血系统,打破凝血/纤溶平衡,致使肺部微血管内血栓广泛形成,进一步恶化患者的病情^[18]。有研究表明,用加味凌霄花散改善血栓闭塞性脉管炎气滞血瘀证术后患者的凝血功能,有助于缓解脉管血栓状态^[19]。本研究发现,6-姜酚可以通过Nur77抑制collagen III、TF、PAI-1和凝血酶表达,有效改善LPS诱导的ARDS肺泡过度促凝和纤溶抑制状态,促进凝血/纤溶恢复平衡。

PI3K/Akt信号通路在肺损伤中起关键作用,可以通过激活下游信号分子或靶蛋白,介导肺泡细胞的生长、凋亡、炎症、坏死、自噬等多种生物学效应^[17]。PI3K/Akt通路的激活通过解除对mTOR的抑制,进而促进促炎因子合成并抑制自噬。相关研究显示,丙酸钠通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路的活化,促进自噬,降低炎症标志物的产生和释放,从而对ARDS大鼠的肺损伤发挥保护作用^[20-21]。上述结果与本研究结果基本一致,6-姜酚可以通过Nur77显著降低p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt水平,提示6-姜酚可能通过Nur77抑制PI3K/Akt通路的激活,改善ARDS幼鼠肺损伤。核因子- κ B(nuclear factor kappa-B,

NF- κ B)作为经典炎症调控枢纽,既往研究提示 Nur77 可以通过上调 p65 表达,抑制 IL-6 水平^[22]。这与本研究观察到的炎症因子下降趋势相呼应,未来需明确 6-姜酚是否通过 Nur77 调控 NF- κ B 磷酸化水平,从而完善 Nur77 对炎症因子的调控机制。有报道指出,大黄素等天然产物同样通过上调 Nur77,降低炎症细胞的分泌^[23]。大黄素作用靶点与 6-姜酚高度重叠,未来需通过与现有激动药进行药效比较,为 Nur77 作为 ARDS 治疗靶点提供理论依据。

本研究提示:6-姜酚干预能改善 LPS 诱导的 ARDS 幼鼠肺损伤,通过上调 Nur77 表达,抑制肺组织炎症反应,减少肺组织细胞凋亡,并促进凝血/纤溶平衡,其作用机制可能与抑制 PI3K/Akt 通路有关。

参考文献:

- [1] 白冰,刘欣,安霞,等.丁香苷通过调节 miR-124-3p/MAPK14 轴对急性呼吸窘迫综合征大鼠肺组织损伤的影响[J]. 中国免疫学杂志,2024,40(12):2591—2597.
- [2] 刘士琛,王美菊,刘刚,等.肺炎合并低氧血症患者进展为 ARDS 危险因素分析[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版),2021,14(2):164—168.
- [3] WICK K D, WARE L B, MATTHAY M A. Acute respiratory distress syndrome [J/OL]. *BMJ*, 2024, 387: e76612. 2024-10-28 [2024-12-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39467606/>.
- [4] FUKATSU M, OHKAWARA H, WANG X, et al. The suppressive effects of Mer inhibition on inflammatory responses in the pathogenesis of LPS-induced ALI/ARDS[J]. *Sci Signal*, 2022, 15(724): eabd2533.
- [5] 李宇,欧阳芳欣,张贺,等.6-姜酚与 6-姜烯酚改善肠道紧密连接损伤作用研究进展[J]. 食品科学, 2024, 45(24): 282—292.
- [6] XIE P, YAN L J, ZHOU H L, et al. Emodin protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury via the JNK/Nur77/c-Jun signaling pathway [J/OL]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: e717271. 2022-03-17 [2024-12-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35370650/>.
- [7] 冯丹,霍炎.孤儿核受体 Nur77 对哮喘小鼠气道重构的作用研究[J]. 中国临床药理学杂志,2019,35(15):1621—1624.
- [8] 孙立燕,张海燕,刘泽茹,等.栀子苷调节 AMPK/SIRT1/NF- κ B 信号通路对急性呼吸窘迫综合征大鼠肺损伤的影响[J]. 中国免疫学杂志,2024,40(6):1142—1146.
- [9] 王睿,李彦坤,王睿之,等.舒芬太尼在脂多糖诱导的急性呼吸窘迫综合征大鼠模型中的作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(20): 2806—2808.
- [10] 刘玉婷,王浩艺,麦静怡,等.外感清热解毒方对脂多糖诱导大鼠急性肺损伤的影响[J]. 世界中医药,2023,18(23): 3328—3333.
- [11] 袁超,孔思琪,梁建庆,等.基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路探讨归芪益元膏联合顺铂治疗 Lewis 肺癌的作用[J]. 中国临床药理学杂志,2024,40(10):1424—1428.
- [12] WANG X, ZHANG C, ZOU N, et al. Lipocalin-2 silencing suppresses inflammation and oxidative stress of acute respiratory distress syndrome by ferroptosis via inhibition of MAPK/ERK pathway in neonatal mice [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(1): 508—520.
- [13] HONG W, ZHI F X, KUN T H, et al. 6-Gingerol attenuates ventilator-induced lung injury via anti-inflammation and antioxidative stress by modulating the PPAR γ /NF- κ B signalling pathway in rats[J/OL]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 92: e107367. 2021-01-15 [2024-12-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33461160/>.
- [14] YU Q, LI J, CUI M, et al. 6-Gingerol attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury through regulating MKP5-mediated P38/JNK pathway[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 7747.
- [15] ZHU N, ZHANG G X, YI B, et al. Nur77 limits endothelial barrier disruption to LPS in the mouse lung [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 317(5): L615—L624.
- [16] WANG Y, ZHANG L F, ZHANG J J, et al. Spontaneous inflammation resolution inspired nanoparticles promote neutrophil apoptosis and macrophage efferocytosis for acute respiratory distress syndrome treatment[J/OL]. *Adv Healthc Mater*, 2024: e2402421. 2024-12-26 [2024-12-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39723664/>.
- [17] 王丽艳,鲍星星,边俊梅.青蒿琥酯改善哮喘幼鼠气道重塑的作用[J]. 中国临床药理学杂志,2024,40(6):864—868.
- [18] 王娟,朱佳,许旻,等.基于“瘀热”理论探讨桃仁承气汤治疗脓毒症急性呼吸窘迫综合征有效性的临床研究[J]. 辽宁中医杂志,2024,51(11):55—59.
- [19] 袁向科,江瑞.加味凌霄花散对血栓闭塞性脉管炎术后患者的疗效及凝血功能的影响[J]. 中药药理与临床,2020,36(4): 196—200.
- [20] ZHOU Y, WANG H, LIU A, et al. Sivelestat improves acute lung injury by inhibiting PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J/OL]. *PLoS One*, 2024, 19(6): e302721. 2024-06-27 [2024-09-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38935660/>.
- [21] HE F, ZHONG J S, CHEN C L, et al. Sodium propionate ameliorates lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome in rats via the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *3 Biotech*, 2024, 14(11): 286.
- [22] SOOND S M, ZAMYATNIN JR A A. Helicobacter pylori and gastric cancer: A lysosomal protease perspective[J]. *Gastric Cancer*, 2022, 25(2): 306—324.
- [23] 宋宁,马培梁,杨娟,等.大黄素防治脓毒症肺损伤的研究进展[J]. 现代药物与临床,2025,40(3):807—810.

(收稿日期 2025-01-08)