DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.01.021

慈姑多糖调控TLR4/MyD88/NF－κB抑制细胞炎症和氧化损伤对多种重金属诱导L02肝细胞凋亡的影响

周漫钰,刘红双,刘冰清,高鑫,梁垚,廖艳
(北京中医药大学中医学院,北京 102446)

摘要:目的 探索慈姑多糖(*Sagittaria Sagittifolia* polysaccharide,SSP)是否通过介导Toll样受体4(Toll－like receptors 4,TLR4)/髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88,MyD88)/核转录因子－κB(nuclear transcription factor－kappa B,NF－κB)信号通路对6种重金属联合所致L02肝细胞损伤发挥保护作用。方法 首先根据北京市售大米6种重金属膳食摄入比例,构建6种重金属混合染毒液所致L02细胞损伤体外模型。应用MTT法检测不同质量浓度慈姑多糖(0.25、0.5、1、2 mg/mL)提前作用24 h对L02细胞存活率的影响;Annexin V－FITC/碘化丙啶(PI)双染流式结合Hoechst 33342荧光检测细胞凋亡;DCFH－DA荧光探针检测细胞中活性氧(reactive oxygen species,ROS)含量变化;Western blot法检测细胞中多聚ADP核糖聚合酶1(poly－ADP ribose polymerase1,PARP1)、动力相关蛋白1(dynamin－related protein 1,Drp1)、肿瘤坏死因子－α(tumor necrosis factor－α,TNF－α)、白介素(interleukin,IL)－1β、IL－17、TLR4、MyD88、NF－κB p65蛋白表达情况。结果 MTT结果显示,SSP在1 mg/mL作用24 h保护效果最佳;与模型组相比,SSP治疗组中ROS含量及细胞凋亡率均明显下降($P<0.05$),Drp1、TNF－α、IL－1β、IL－17和TLR4、MyD88、NF－κB p65蛋白表达均显著降低($P<0.05$),PARP1蛋白表达显著升高($P<0.01$)。结论 SSP可有效改善6种重金属联用诱导的L02细胞凋亡,可能与调控TLR4/MyD88/NF－κB信号通路抑制氧化损伤和炎症反应相关。

关键词:慈姑多糖;多种重金属;TLR4/MyD88/NF－κB通路;氧化应激;炎症反应;L02细胞
中图分类号:R282.71 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)01-0117-07

Effect of *Sagittaria Sagittifolia* Polysaccharide on Regulating TLR4/MyD88/NF－κB to Inhibit Inflammation and Oxidative Damage in L02 Hepatocyte Apoptosis Injury by Multiple Heavy Metals

ZHOU Manyu,LIU Hongshuang,LIU Bingqing,GAO Xin,LIANG Yao,LIAO Yan
(School of Traditional Chinese Medicine,Beijing University of Chinese Medicine,Beijing 102446,China)

Abstract:*Objective* To explore whether *Sagittaria Sagittifolia* polysaccharide(SSP) plays a protective role in L02 hepatocyte injured by six heavy metals mixture by mediating the Toll－like receptors 4(TLR4)/myeloid differentiation factor 88(MyD88)/nuclear transcription factor－κB(NF－κB) signaling pathway. *Methods* Firstly,according to the dietary intake of six heavy metals in rice sold in Beijing,a heavy metal mixture was prepared for inducing L02 cell injury. MTT assay was used to detect the effect of SSP(0.25 mg/mL,0.5 mg/mL,1 mg/mL, 2 mg/mL) on the L02 cells survival rate with 24 h pre－treatment. Annexinv FITC/propidium iodide(PI) double staining combined with flow cytometry and Hoechst 33342 staining were used for detecting the cell apoptosis. The content of reactive oxygen species(ROS) in cells was detected by using DCFH－DA fluorescence probe. The protein expressions of poly－ADP ribose polymerase1(PARP1),dynamic related protein 1(Drp1),tumor necrosis factor－α(TNF－α),interleukin－1β(IL－1β),interleukin－17(IL－17),TLR4,MyD88 and NF－κB p65 were detected by Western blot. *Results* MTT assay showed that SSP(1 mg/mL,24 h) had the best protective effect. Compared with those of the model group,the ROS content and apoptosis rate in SSP treatment group were significantly decreased($P<0.05$),and the protein expressions of Drp1,TNF－α,IL－1β,IL－17,TLR4,MyD88 and NF－κB p65 decreased significantly($P<0.05$) and the protein expression of PARP1 increased significantly($P<0.01$). *Conclusion* SSP can effectively improve the apoptosis of L02 cells induced by six heavy metals mixture,which may be related to the regulation of TLR4/MyD88/NF－κB signaling pathway to inhibit the oxidative damage and inflammatory response.

Keywords:*Sagittaria Sagittifolia* polysaccharides(SSP);multiple heavy metals;TLR4/MyD88/NF－κB signaling pathway;oxidative stress;inflammation;L02 hepatocyte

随着农业生产现代化和工业化的快速发展,土壤重金属污染问题日益凸显,重金属可通过土壤蓄积污染农作物,经膳食摄入进而危害人体健康[1]。在实际暴露中,多种重金属通常以一定比例同时进入人体,产生复杂的毒性作用[2]。目前单一重金属的毒性研究已较为全面[3－5],但多种重金属膳食摄入的研究并不多见。近年来的研究发现,重金属的损伤机制与氧化损伤和炎症反应密切相关。其中,Toll样受体4(Toll－like receptors 4,TLR4)作为一种模式识别受体,是多种组织损伤的感受器,髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88,

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFC1706800)
作者简介:周漫钰(1995－),女,广东揭阳人,博士在读,研究方向:中医养生康复及预防营养。
通讯作者:廖艳(1975－),女,四川阆中人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中医养生康复及营养。E-mail:liaoyanaa@sohu.com。

MyD88)是 TLR4 的关键衔接蛋白,可激活下游的核转录因子-κB(nuclear transcription factor-kappa B,NF-κB)亚基向细胞核移位,激活诱导型一氧化氮合酶,同时也可促使炎症因子[如肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)]释放,加重氧化应激和炎症反应[6-8]。因此,TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路成为评价重金属损伤和药物筛选的重点考察路径之一[9]。

慈姑多糖(*Sagittaria Sagittifolia* polysaccharide,SSP)作为慈姑的主要活性成分,具有抗凋亡[10]、抗氧化和免疫调节[11]等作用,本课题组前期研究发现提前给予慈姑多糖可明显改善 6 种重金属所致损伤[12-14],可能与调节核转录因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid-2-related factor 2,Nrf2)信号通路减轻氧化应激所致细胞凋亡相关,但作用机制研究尚不深入。故本研究模拟北京市售大米 6 种重金属的膳食摄入比例[15],构建多种重金属混合染毒 L02 肝细胞损伤模型,探讨慈姑多糖是否通过调节 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路,对多种重金属肝损伤发挥预防性保护作用,为 SSP 解毒保肝作用的深入研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞 人正常肝细胞系 L02 细胞,由北京中医药大学生命科学学院惠赠。

1.2 药物与试剂 慈姑多糖,由云南产新鲜慈姑制备,制备工艺及方法同前期文献[16-17]。重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$)、四水氯化锰($MnCl_2\cdot 4H_2O$)、水合氯化镉($CdCl_2\cdot 2.5H_2O$)、七水硫酸锌($ZnSO_4\cdot 7H_2O$)、五水硫酸铜($CuSO_4\cdot 5H_2O$),均购买于上海源叶生物科技有限公司(批号分别为 P299156、s27140、s50703、s24313、s24260);三水乙酸铅[$(CH_3COO)_2Pb\cdot 3H_2O$],购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司(批号 s48936);所有化学试剂均为分析纯。胰蛋白酶(货号 25200056),购于 Invitrogen 公司;青霉素、链霉素(货号 PSL01),购于 Caisson 公司;DMEM 高糖培养基、胎牛血清、活性氧(reactive oxygen species,ROS)检测试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、Hoechst 33342 染色液,购于北京兰博利德生物技术有限公司(货号分别为 01-100-1ACS-1、04-001-1ACS、S0033S、C1062S、C1025);MTT 噻唑兰购于 Amresco 公司(货号 0793-1);磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline,PBS),购于北京雷根生物技术有限公司(货号 cc0004);TLR4、MyD88、NF-κB p65 抗体购于 Abcam 公司(货号分别为 ab13556、ab219413、ab32536);动力相关蛋白 1(dynamin-related protein 1,Drp1)购于 Abways 公司(货号 AY2001);IL-1β(11E5)、IL-17(G-4)抗体购于 Santa cruz 公司(货号为 sc-374218、sc-52012);多聚 ADP 核糖聚合酶 1(poly-ADP ribose polymerase1,PARP1)、TNF-α、β-actin 抗体及山羊抗兔、山羊抗鼠二抗均购于 proteintech 公司(货号分别为 13371-1-AP、17590-1-AP、60008-1-Ig、SA00001-2、SA00001-1)。

1.3 仪器 HERA·Cell 150i 型 CO_2 培养箱(赛默飞世尔科技有限公司);离心机(Eppendorf 5418R);酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司);A008 流式细胞仪(Beckman Coulter 公司);A010 共聚焦显微镜(日本奥林巴斯公司);电泳仪及电转仪、凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 慈姑多糖母液及重金属混合液配制 参考北京市居民通过大米途径摄入铬、锰、镉、锌、铜、铅 6 种常见重金属的含量比例[15]配制重金属染毒液(见表 1),DMEM 培养液配制 16 mg/mL 慈姑多糖母液,放于 4 ℃冰箱保存,不同药物浓度用 DMEM 培养液稀释,现配现用。

表 1 重金属混合染毒液的配制

重金属化合物	大米中重金属含量/(mg·人$^{-1}$·d^{-1})	元素质量分数	化合物质量/(mg)
$K_2Cr_2O_7$	0.167 4	0.353 741 478	23.946 10
$CdCl_2\cdot 2.5H_2O$	0.001 5	0.491 227 973	0.154 52
$(CH_3COO)_2Pb\cdot 3H_2O$	0.001 9	0.546 174 806	0.176 03
$CuSO_4\cdot 5H_2O$	0.194 4	0.255 999 942	38.425 70
$MnCl_2\cdot 4H_2O$	0.010 9	0.277 778 092	1.985 61
$ZnSO_4\cdot 7H_2O$	1.053 2	0.226 480 824	235.312 00
合计			300

注:以铬为单位 1,人体从谷物中摄入铬的最大含量每日不超过 1 mg。

1.5 MTT 法检测慈姑多糖及重金属混合染毒液对 L02 细胞存活率的影响 将对数生长期的 L02 细胞,以每孔 5×10^3 个的密度接种于 96 孔培养板上,待细胞生长至 80% 进行重金属混合染毒液毒性实验及慈姑多糖无毒浓度实验。慈姑多糖处理组终浓度分别为 0.25、0.5、1、2、4 mg/mL,重金属处理组终浓度分别为 25、50、100、200、400、800、1600 ng/mL,每组设置 4 个复孔,继续放置 5% CO_2、37 ℃的培养箱中培养 24 h,采用 MTT 法用全自动酶标仪在波长 570 nm 处测定其吸光度(A),并计算细胞存活率。细胞存活率 = $(A_{实验组}-A_{调零组})/(A_{对照组}-A_{调零组})\times100\%$。

1.6 MTT 法检测慈姑多糖对多种重金属损伤 L02 细胞存活率的影响 取对数生长期 L02 细胞,接种于 96 孔板,每孔 5×10^3 个细胞,待细胞生长至 80% 进行实验。将细胞分为:对照组、模型组(重金属染毒液 900 ng/mL)、慈姑多糖给药组(重金属染毒液 900 ng/mL + 慈姑多糖)。慈姑多糖给药组提前加入不同质量浓度慈姑多糖(0.25、0.5、1、2 mg/mL)培养 24 h 后,模型组与慈姑多糖给药组均加入重金属染毒液。每组 4 个复孔,继续培养 24 h 后,应用 MTT 法检测细胞存活率,应用全自动酶标仪在 570 nm 波长处测其吸光度,并计算出细胞活力。

1.7 DCFH-DA 荧光探针检测各组细胞 ROS 含量 取对数生长期 L02 细胞,以每孔 5×10^4 个细胞密度接种于 6 孔板中,待细胞长至 80% 进行实验。去除给药完成的细胞培养液,应用无血清细胞培养液洗涤细胞 2 次,加入 2 mL 稀释好的 DCFH-DA。将 6 孔板置于 37 ℃含 5% CO_2 培养箱内孵育 30 min 后,应用无血清培养液洗涤孔内细胞 3 次,置于荧光显微镜下观察各组 ROS 含量变化,并在 30 min 内完成检测,拍照。应用 Image J 图像分析软件记录每张图片的平均荧光强度,实验重复 3 次。

1.8 荧光染色结合流式细胞术检测各组细胞凋亡 将培养好的细胞吸弃培养液,应用 PBS 洗涤 1 次,加入 1 mL Hoechst 33342 工作液,置于 37 ℃培养箱内孵育 30 min 后,吸弃工作液,用无血清的培养液洗涤 3 次,每次 5 min,随后置于荧光显微镜下观察。此外,分组处理结束后收集细胞,计数后每组取 0.5 mL 单细胞悬液,加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL 碘化丙锭溶液(PI),混匀后室温避光反应 15 min,置于冰盒内,随即采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.9 Western blot 法检测相关蛋白表达 取对照组、模型组、1 mg/mL 慈姑多糖给药组处理结束后的 L02 细胞,离心收集细胞,用含有 PMSF、蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 液充分裂解,提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,制备蛋白样品。以 β-actin 为内参,SDS-PAGE 凝胶电泳蛋白,电转至 PVDF 膜后应用 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h,孵育一抗 4 ℃过夜,分别为 PARP1(1∶1000)、Drp1(1∶1000)、TNF-α(1∶1000)、IL-1β

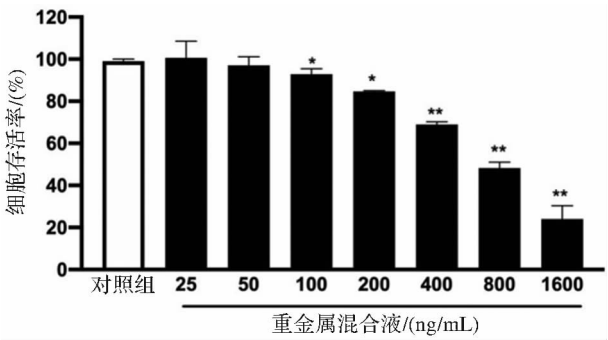
(1∶200)、IL-17(1∶200)、TLR4(1∶1000)、MyD88(1∶1000)、NF-κB p65(1∶1000)、β-actin(1∶5000)。第 2 天室温复温 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。随后室温孵育二抗 1 h(1∶5000),TBST 洗涤 3 次,使用 ECL 试剂进行显色,通过 Image J 软件对条带灰度进行定量分析。

1.10 统计学方法 实验结果采用 SPSS 25.0 统计软件进行统计学分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

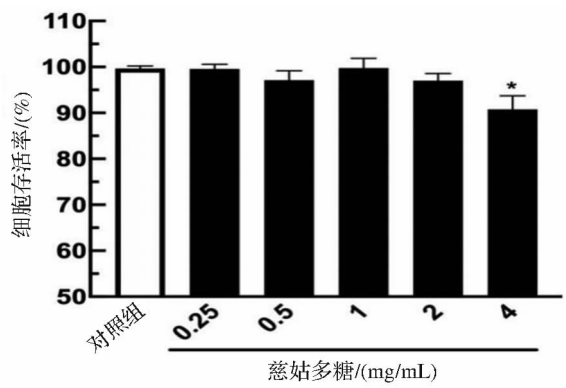
2.1 重金属混合液对 L02 细胞存活率的影响及慈姑多糖对 L02 细胞毒性的影响 见图 1。不同浓度重金属混合液作用 L02 细胞 24 h 后,L02 细胞存活率随着重金属混合液浓度升高而逐渐下降,计算得到 LC_{50} 浓度为 912.67 ng/mL,故后续取 900 ng/mL 作为 L02 细胞的重金属混合液造模浓度。

见图 2。不同浓度慈姑多糖处理 L02 细胞 24 h 后,在 0.25~2 mg/mL 浓度范围内 L02 细胞生存率在 95% 以上,提示此范围内慈姑多糖无明显细胞毒性;在 4 mg/mL 时细胞生存率降至 90% 以下,说明在此浓度产生细胞毒性,差异具有统计学意义($P<0.05$)。故后续选择 0.25~2 mg/mL 浓度范围进行实验。



注:* 与对照组比较,$P<0.05$;** 与对照组比较,$P<0.01$。

图 1 不同浓度重金属混合液对 L02 细胞存活率的影响($n=3$,$\bar{x} \pm s$)



注:* 与对照组比较,$P<0.05$。

图 2 不同浓度慈姑多糖对 L02 细胞存活率的影响($n=3$,$\bar{x} \pm s$)

2.2 慈姑多糖对重金属混合液处理 L02 细胞存活率的量效关系 见图 3。MTT 实验结果显示,提前给予慈姑多糖 24 h 后,不同浓度慈姑多糖(0.25、0.5、1、2 mg/mL)均能提高重金属混合液损伤 24 h 后的细胞存活率,且 1 mg/mL 浓度的慈姑多糖保护作用最强。后续选择慈姑多糖 1 mg/mL 作用 24 h 开展研究。

2.3 慈姑多糖对重金属混合液诱导的 L02 细胞凋亡的影响 见插页 XIV 图 4。与对照组相比,模型组中细胞早期凋亡率显著升高($P<0.01$);与模型组相比,慈姑多糖给药组能显著降低细胞凋亡率($P<0.01$)。相较于对照组,模型组中细胞的细胞核呈致密浓染,平均荧光强度高于对照组,差异具有显著统计学意义($P<0.01$);相对于模型组,慈姑多糖给药组中凋亡细胞显著减少($P<0.01$)。与对照组相比,模型组中 PARP1 蛋白表达显著降低($P<0.01$);与模型组相比,慈姑多糖给药组 PARP1 蛋白表达显著升高($P<0.01$)。

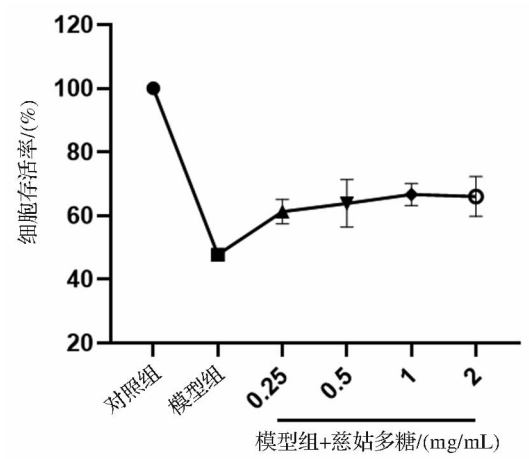


图 3 不同浓度慈姑多糖对重金属混合液诱导的 L02 细胞存活率的影响($n=3$,$\bar{x} \pm s$)

2.4 慈姑多糖对重金属混合液诱导的 L02 细胞中 ROS 释放及 Drp1 蛋白表达的影响 见插页 XV 图 5。与对照组相比,模型组细胞中平均荧光强度明显升高,即 ROS 含量升高($P<0.01$),且 Drp1 蛋白表达升高($P<0.05$);相对于模型组,慈姑多糖给药组能显著降低细胞中 ROS 含量及 Drp1 蛋白表达水平($P<0.05$)。

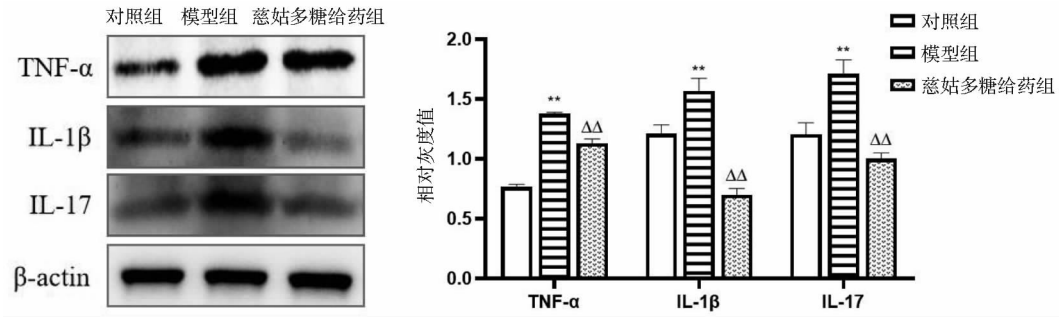
2.5 慈姑多糖对重金属混合液诱导的 L02 细胞中 TNF-α、IL-1β、IL-17 蛋白表达的影响 见图 6。与对照组比较,模型组中 TNF-α、IL-1β、IL-17 蛋白表达升高,差异具有显著统计学意义($P<0.01$);与模型组相比,慈姑多糖给药组中 TNF-α、IL-1β、IL-17 蛋白表达均降低($P<0.01$)。

2.6 慈姑多糖对重金属混合液诱导的 L02 细胞中 TLR4、MyD88、NF-κB p65 蛋白表达的影响 见图 7。与对照组比较,模型组中 TLR4、MyD88、NF-κB p65 蛋白表达升高,差异具有显著统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,慈姑多糖给药组中 TLR4、MyD88、NF-κB p65 蛋白表达均降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

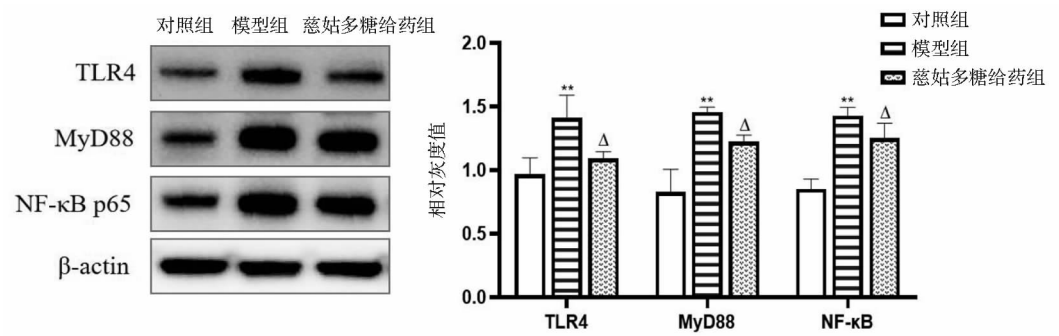
重金属污染目前仍是一个全球性的挑战问题,肝脏作为重要的代谢器官,是重金属积累和毒性损伤的主要靶器官。镉、铜和铬等重金属可产生 ROS 并导致氧化应激,被认为是重金属诱导肝损伤的主要机制之一[18-19]。相较于肝癌细胞系(HepG2),人正常肝细胞 L02 与人体内组织的生理生化条件更加吻合[20]。故本研究利用 L02 肝细胞损伤模型进行深入研究。

天然提取物如枸杞多糖[21]、葛根素[22]等可通过抗氧化、抗炎、调节自噬等途径拮抗单一重金属损伤,成为重金属解毒的研究热点。慈姑多糖作为慈姑的主要活性成分,具有显著抗脂质过氧化[23]、抗凋亡[10]、抗氧化和免疫调节[11]等作用,且前期实验已证实其可通过调节 Nrf2 信号通路减轻氧化应激和细胞凋亡、改善 6 种重金属所致小鼠和 HepG2 肝细胞损伤[10-12],但慈姑多糖对细胞的保护作用是否还涉及炎症反应,炎症反应、氧化应激和细胞凋亡之间是否存在着信号串扰,相



注：＊＊与对照组比较，$P<0.01$；ΔΔ 与模型组比较，$P<0.01$。

图 6 慈姑多糖对重金属混合液诱导的 L02 细胞 TNF－α、IL－1β、IL－17 蛋白表达的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）



注：＊＊与对照组比较，$P<0.01$；Δ 与模型组比较，$P<0.05$。

图 7 慈姑多糖对重金属混合液诱导的 L02 细胞 TLR4、MyD88、NF－κB p65 蛋白表达的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

互串扰的信号通路又可能是什么尚不清楚。

细胞凋亡是一种严格控制的程序性细胞死亡过程，对生物体维持内环境稳态及系统的生长发育有重要作用，但异常凋亡是一种病理过程。Caspase 家族是细胞凋亡的重要执行者，其中 Caspase－3 的活化可裂解 PARP，阻止 PARP 介导的 DNA 损伤修复，破坏细胞稳态，导致细胞凋亡[24]。研究表明，在重金属诱导的肝损伤中，细胞凋亡是造成肝毒性损伤的重要机制，氧化应激、线粒体损伤、炎症反应、内质网应激等均对细胞凋亡的发生发展具有调节作用[25－26]。在本研究中，重金属混合物增加了 L02 细胞凋亡率并降低 PARP1 蛋白表达，而慈姑多糖干预能显著降低细胞凋亡率并上调 PARP1，提示 6 种重金属混合物可能通过诱导细胞异常凋亡产生肝细胞毒性，而慈姑多糖可通过改善异常凋亡发挥肝保护作用。

为了探究慈姑多糖改善重金属混合物诱导肝细胞凋亡的相关分子机制，本研究进一步测定了 ROS 含量、Drp1 蛋白表达。在生理条件下，ROS 参与能量转换、氧平衡等生理环节，是一种重要的信号分子，其生成和清除的动态平衡对维持细胞氧化还原稳态尤为关键。但当机体受到重金属等外源性刺激时，氧化与抗氧化平衡失调，细胞中产生过量的 ROS，导致机体发生氧化损伤，进而可导致线粒体功能损伤、炎症反应、DNA 损伤、细胞凋亡及恶性转变等[27]。而线粒体作为产生 ROS 的主要场所，在 ROS 异常升高时成为 ROS 的直接损伤靶点。氧化损伤的发生会导致线粒体形态及正常生理功能遭到破坏，引起线粒体功能障碍[28]，表现为线粒体嵴的肿胀和消失、线粒体裂变异常增加、氧化磷酸化过程和能量产生受损、线粒体膜电位下降、代谢途径改变等。线粒体动力相关蛋白 Drp1 是介导线粒体分裂的主要蛋白，具有促进线粒体裂变及 ROS 蓄积的作用，其过度表达可使线粒体出现碎片化[29]。线粒体受氧化应激损伤后，线粒体外膜通透性改变，线粒体内的细胞色素 C 被释放到细胞质中，可同凋亡蛋白酶激活因子相结合，构成细胞色素 C/凋亡蛋白酶激活因子凋亡体，导致细胞的凋亡。本研究结果发现，模型组中 ROS 含量及 Drp1 蛋白表达显著升高；经慈姑多糖提前干预后，细胞中 ROS 的产生及 Drp1 蛋白表达显著减少，提示慈姑多糖可能通过减少 ROS 产生、缓解线粒体功能损伤，进而减轻细胞凋亡来发挥保护作用。

前期研究发现，重金属混合物可导致小鼠肝脏组织炎性细胞浸润，提示多种重金属可诱导炎症反应[12]。TNF－α 作为炎症反应中心，不仅可刺激中性粒细胞、单核细胞等进一步释放 IL－6、IL－1β、IL－17 等炎症因子，导致炎症反应的级联放大和过度激活，从而导致肝脏组织细胞的炎性坏死，还可以通过 Caspase－8 的大量活化来激活凋亡通路[30]。TNF－α 的生物效应主要由 TNFR1 和 TNFR2 两种受体介导，TNF－α 结合受体 TNFR1 后，与肿瘤坏死因子受体相关死亡结构域形成三联复合物，募集 RIP1 和 TRAF2，进而结合 FADD、RAIDD 等衔接蛋白，募集并激活 Caspase－8，继而激活外源性凋亡途径，是导致肝细胞凋亡的主要机制。本研究结果发现，模型组 TNF－α、IL－1β、IL－17 蛋白表达显著升高，经慈姑多糖提前干预后，上述蛋白表达显著下降，提示慈姑多糖通过减轻炎症反应诱导的细胞凋亡，发挥细胞保护作用。

为了进一步探究慈姑多糖改善氧化应激和炎症反应的调控机制，检测了 L02 细胞中 TLR4、MyD88、NF－κB p65 蛋白的表达量。Toll 样受体家族是重要的炎症识别受体，该类跨膜蛋白能识别受体及复合物的胞外区域，从而激发下游分子通路[31]。TLR4 作为机体中参与免疫调节的重要蛋白，是最早被发现的 I 型跨膜蛋白受体，其胞内区的 TIR 结构域可与接头蛋白 MyD88 死亡结构域和中间域相结合，激活下游的 NF－κB 易转位为核磷酸化，调节 TNF－α、IL－6 等免疫炎症因子表达。此外，上调 TLR4/MyD88/NF－κB 还可激活一氧化氮合酶，造成大量 NO、MDA、ROS 生成，引起严重的氧化应激，导致组织氧化损伤[7]。研究表明，下调 TLR4/MyD88/NF－κB 信号通路可减轻金属 Cd 诱导的肝损伤[9]。本研究结果发现，经慈姑多糖干预后，TLR4、MyD88、NF－κB p65 蛋白表达均较模型

组显著下降,提示慈姑多糖可能通过下调 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路来发挥保护作用。

综上,慈姑多糖可能通过下调 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路关键蛋白表达来减少 ROS、Drp1、TNF-α、IL-1β 和 IL-17 的生成,进而减轻氧化应激损伤和炎症反应导致的细胞凋亡,以此拮抗 6 种重金属的联合毒性,发挥 L02 肝细胞保护作用。本研究丰富了慈姑多糖发挥解毒保肝作用的实验依据,也提示慈姑多糖可能成为潜在的解毒保肝健康产品的重点研发对象,值得进一步深入研究。

参考文献

[1] WANG P, CHEN H, KOPITTKE P M, et al. Cadmium contamination in agricultural soils of China and the impact on food safety[J]. Environ Pollut, 2019, 249: 1038-1048.

[2] LIN X, GU Y, ZHOU Q, et al. Combined toxicity of heavy metal mixtures in liver cells[J]. J Appl Toxicol, 2016, 36(9): 1163-1172.

[3] LIANG Y H, LIANG N J, MA Y, et al. Role of Clusterin/NF-κB in the secretion of senescence-associated secretory phenotype in Cr(VI)-induced premature senescent L-02 hepatocytes[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2021, 219: 112343.

[4] HIRAO-SUZUKI M, TAKEDA S, SAKAI G, et al. Cadmium-stimulated invasion of rat liver cells during malignant transformation: evidence of the involvement of oxidative stress/TET1-sensitive machinery[J]. Toxicology, 2021, 447: 152631.

[5] PADRILAH S N, AHMAD S A, YASID N A, et al. Toxic effects of copper on liver and cholinesterase of *Clarias gariepinus*[J]. Environ Sci Pollut Res, 2017, 24(28): 22510-22523.

[6] ISHIDA K, KAJI K, SATO S, et al. Sulforaphane ameliorates ethanol plus carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice through the Nrf2-mediated antioxidant response and acetaldehyde metabolization with inhibition of the LPS/TLR4 signaling pathway[J]. J Nutr Biochem, 2021, 89: 108573.

[7] 窦博,马重阳,侯伟欣,等. 基于 TLR4/NF-κB/iNOS 通路的截断逆挽方药物血清对 L02 细胞氧化应激损伤的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2022,29(4):87-91

[8] QU H L, LIU R L, CHEN J Q, et al. Aerobic exercise inhibits CUMS-depressed mice hippocampal inflammatory response via activating hippocampal miR-223/TLR4/MyD88-NF-κB pathway[J]. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17(8): 2676.

[9] DING Y, LI X, LIU Y, et al. Protection mechanisms underlying oral administration of chlorogenic acid against cadmium-induced hepatorenal injury related to regulating intestinal flora balance[J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(5): 1675-1683.

[10] 韩悦, 王晶, 张园园, 等. 慈姑多糖对异烟肼和利福平联用致损伤小鼠肝细胞凋亡的保护作用[J]. 北京中医药大学学报, 2019, 42(2): 126-130.

[11] GU J Y, ZHANG H H, YAO H, et al. Comparison of characterization, antioxidant and immunological activities of three polysaccharides from *Sagittaria sagittifolia* L[J]. Carbohydr Polym, 2020, 235: 115939.

[12] 刘红双,李亚兰,孔靖玮,等. 慈姑多糖调节 Nrf2/HO-1 改善多种重金属所致肝损伤的体内外实验研究[J]. 中国中药杂志, 2022,47(7):1913-1920

[13] LIU H S, ZHOU M Y, ZHANG X, et al. *Sagittaria sagittifolia* polysaccharide protects against six-heavy-metal-induced hepatic injury associated with the activation of Nrf2 pathway to regulate oxidative stress and apoptosis[J]. J Inorg Biochem, 2022, 232: 111810.

[14] 周漫钰, 王萌, 刘红双, 等. 慈姑多糖调节内质网应激改善 6 种重金属联合诱导的小鼠肝损伤[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(10): 135-139.

[15] 魏军晓, 耿元波, 岑况. 北京市售大米重金属含量监测及膳食风险评估[J]. 现代食品科技, 2018, 34(6): 267-273.

[16] 王秀丽, 王晶, 王春国, 等. 慈姑多糖部位颗粒剂制备工艺研究[J]. 中国现代中药, 2017, 19(11): 1615-1619.

[17] 王晶, 王春国, 李冰, 等. 苯酚-硫酸法测定慈姑中多糖的含量[J]. 吉林中医药, 2017, 37(12): 1258-1260.

[18] LI X H, HE S W, ZHOU J, et al. Cr(VI) induces abnormalities in glucose and lipid metabolism through ROS/Nrf2 signaling[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2021, 219: 112320.

[19] VALKO M, MORRIS H, CRONIN M T. Metals, toxicity and oxidative stress[J]. Curr Med Chem, 2005, 12(10): 1161-1208.

[20] 马娇阳, 保欣晨, 张振宁, 等. 正常肝细胞和肝癌细胞对镉暴露毒性响应差异分析[J]. 环境科学研究, 2022, 35(1): 257-264.

[21] VARONI M V, PASCIU V, GADAU S D, et al. Possible antioxidant effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on hepatic cadmium-induced oxidative stress in rats[J]. Environ Sci Pollut Res, 2017, 24(3): 2946-2955.

[22] SONG X, LI Z, LIU F, et al. Restoration of autophagy by puerarin in lead-exposed primary rat proximal tubular cells via regulating AMPK-mTOR signaling[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2017, 31(3): 21869.

[23] KE X H, WANG C G, LUO W Z, et al. Metabolomic study to determine the mechanism underlying the effects of *Sagittaria sagittifolia* polysaccharide on isoniazid- and rifampicin-induced hepatotoxicity in mice[J]. Molecules, 2018, 23(12): 3087.

[24] 许阿磊, 薛杨央, 陶伟涛, 等. PARP-1 抑制剂 Olaparib 对 MCF-7 乳腺癌的放疗增敏作用及乏氧显像[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(9): 1668-1674.

[25] YANG Z J, HE Y Q, WANG H F, et al. Protective effect of melatonin against chronic cadmium-induced hepatotoxicity by suppressing oxidative stress, inflammation, and apoptosis in mice[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2021, 228: 112947.

[26] WANG G L, TANG J L, SONG Q, et al. *Malus micromalus* Makino phenolic extract preserves hepatorenal function by regulating PKC-α signaling pathway and attenuating endoplasmic reticulum stress in lead(Ⅱ) exposure mice[J]. J Inorg Biochem, 2020, 203: 110925.

[27] STRUBELT O, KREMER J, TILSE A, et al. Comparative studies on the toxicity of mercury, cadmium, and copper toward the isolated perfused rat liver[J]. J Toxicol Environ Health, 1996, 47(3): 267-283.

[28] YANG Y H, KARAKHANOVA S, HARTWIG W, et al. Mitochondria and mitochondrial ROS in cancer: novel targets for anticancer therapy[J]. J Cell Physiol, 2016, 231(12): 2570-2581.

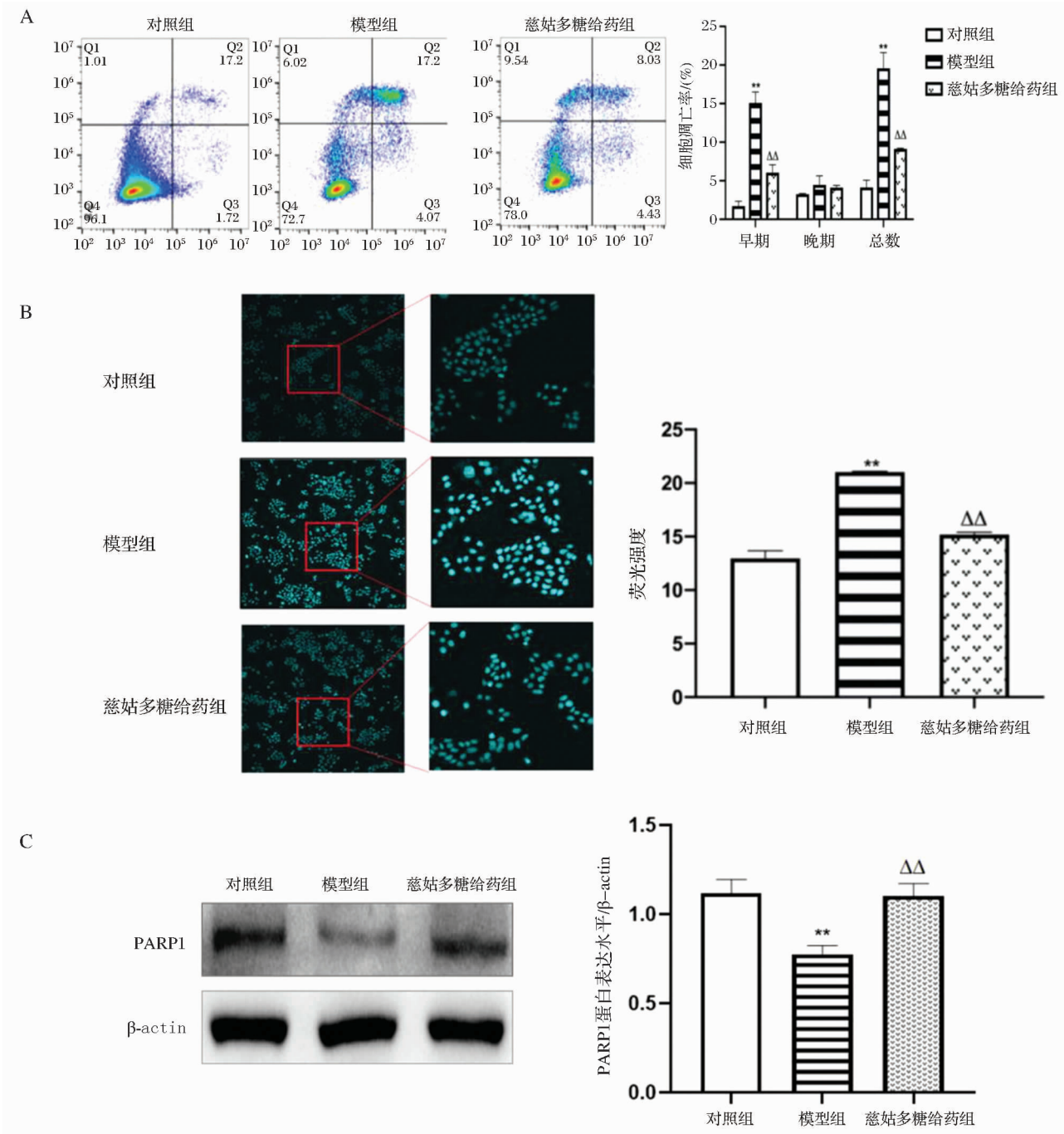
[29] YANG S H, HUANG C Y, HSIEH C Y, et al. CDK4 and CDK5 inhibition have comparable mild hypothermia effects in preventing Drp1-dependent mitochondrial fission and neuron death induced by MPP+[J]. Mol Neurobiol, 2020, 57(10): 4090-4105.

[30] MILLER D R, CRAMER S D, THORBURN A. The interplay of autophagy and non-apoptotic cell death pathways[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2020, 352: 159-187.

[31] 秦百君, 唐曦平, 杨昕, 等. 基于 TLR4/NF-κB/MyD88 通路探讨清解化攻方抑制雨蛙素诱导重症急性胰腺炎模型大鼠炎症反应的生信分析及实验验证[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(6): 935-944.

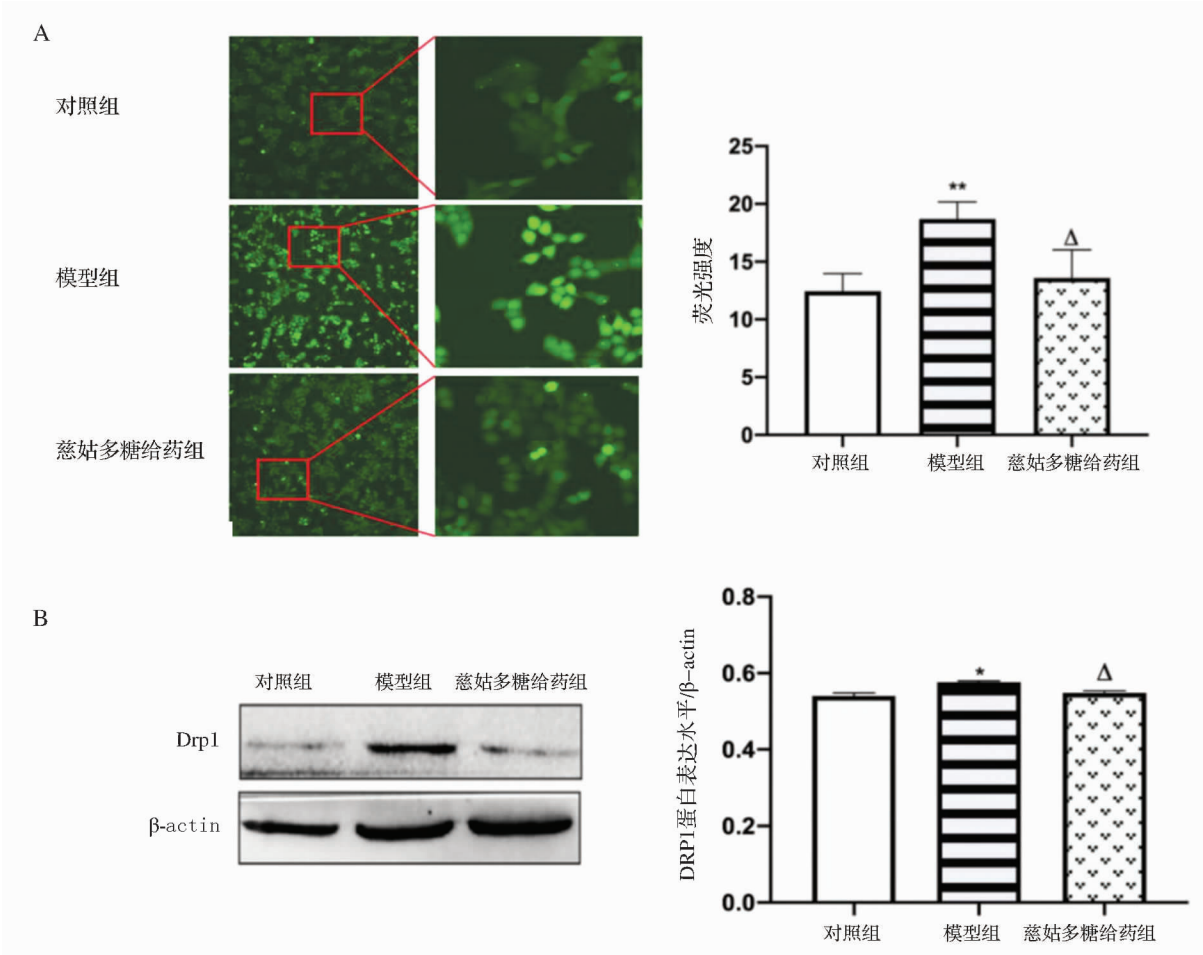
慈姑多糖调控 TLR4/MyD88/NF－κB 抑制细胞炎症和氧化损伤对多种重金属诱导 L02 肝细胞凋亡的影响

（正文见 117－121 页）



注：＊＊与对照组比较，$P<0.01$；ΔΔ 与模型组比较，$P<0.01$。

图 4 慈姑多糖对重金属混合液诱导的 L02 细胞凋亡的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

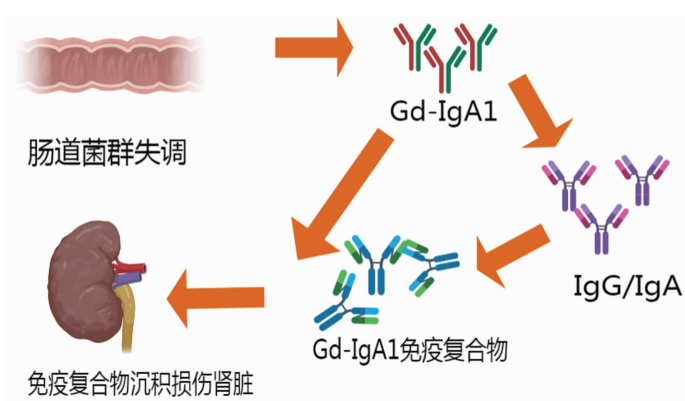


注：＊＊与对照组比较，$P<0.01$；＊与对照组比较，$P<0.05$；Δ 与模型组比较，$P<0.05$。

图 5　慈姑多糖对重金属混合液诱导的 L02 细胞 ROS 释放及 Drp1 蛋白表达的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

基于“肺与大肠相表里”探讨 IgA 肾病的机制与治疗

（正文见 77－80 页）



注：过量的 Gd－IgA1 作为自身抗原与自身抗体结合，形成免疫复合物沉积在肾小球系膜中损伤肾脏，并激活补体系统，导致炎症和肾小球损伤。

图 1　IgAN 的发病机制