

网络出版时间: 2023-12-28 11:24:37 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20231227.0753.004>

褪黑素通过调控 Nrf2 通路对甲醛暴露致大鼠急性肺损伤的保护作用

王碧红¹, 聂潇雨², 丁威杰², 周佳婷², 徐贝琪², 张颖², 吕建国³, 孙燕玲²

摘要 目的 探讨褪黑素(MT)通过调控核因子E2相关因子2(Nrf2)信号通路对甲醛(FA)吸入致大鼠急性肺损伤(ALI)的保护作用及其机制。方法 50只雌性Wistar大鼠随机分为Control组、FA组、FA+MT 5 mg/kg组、FA+MT 10 mg/kg组和FA+MT 20 mg/kg组,每组10只。除Control组外,其他各组连续21 d每天吸入3 mg/m³ FA以构建染毒模型,然后用不同MT剂量治疗14 d,MT治疗期间继续染毒。苏木精-伊红(HE)染色观察肺组织病理学变化,称重测肺水含量和肺系数,吸光光度法测肺组织谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)和8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)水平,酶联免疫吸附实验(ELISA)测肺泡灌洗液肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6和IL-1 β 的浓度,Western blot检测肺组织Nrf2、血红素氧合酶-1(HO-1)、核因子- κ B(NF- κ B)和磷酸化核因子- κ B(p-NF- κ B)的蛋白表达水平,定量聚合酶链反应(qPCR)检测肺组织Nrf2、HO-1及Kelch样ECH相关蛋白1(Keap1)的mRNA表达水平。结果 与Control组相比,FA组大鼠出现明显肺损伤;肺组织GSH、SOD水平下降,8-OHdG水平升高($P < 0.05$);肺泡灌洗液TNF- α 、IL-6和IL-1 β 水平升高($P < 0.05$);肺组织Nrf2、HO-1蛋白表达水平降低($P < 0.05$),p-NF- κ B蛋白表达水平升高($P < 0.05$);肺组织Nrf2、HO-1的mRNA相对表达量降低,Keap1的mRNA相对表达量升高($P < 0.05$)。与FA组相比,MT组大鼠肺损伤有好转;肺组织GSH、SOD水平升高($P < 0.05$),8-OHdG水平下降($P < 0.05$);肺泡灌洗液TNF- α 、IL-6和IL-1 β 水平下降($P < 0.05$);肺组织Nrf2、HO-1蛋白表达水平升高($P < 0.05$),p-NF- κ B蛋白表达水平降低($P < 0.05$);肺组织Nrf2、HO-1的mRNA相对表达量升高($P < 0.05$),Keap1的mRNA相对表达量降低($P < 0.05$),且均呈剂量依赖性。结论 MT可以通过调控Nrf2/Keap1/HO-1信号通路减轻氧化应激和炎症反应,缓解FA暴露诱导的急性肺损伤。

关键词 褪黑素;核因子E2相关因子2;急性肺损伤;甲醛
中图分类号 R 363.2+7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)01-0023-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.004

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)常由直接或间接因素造成弥漫性肺水肿,导致急性低氧性呼吸衰竭,发病率和病死率高^[1]。随着我国人口老龄化不断加深,ALI的发病率预计将上升。据报道^[2],欧盟有170万工人暴露于高浓度甲醛(formaldehyde, FA)之中,所有已知的FA污染对人体健康影响中,肺损伤是最严重的损害之一,FA通过增加氧化失衡和炎症反应来促进气道与肺组织的损伤^[3]。褪黑素(melatonin, MT)是一种具有抗氧化功能的吲哚胺,由松果体分泌,可以防止细胞产生氧化损伤。MT不仅可以调节氧化失衡,还可以抑制炎症反应,其作用与核因子E2相关因子2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)信号通路有关^[4]。研究^[5]表明,在急慢性肺损伤、慢性阻塞性肺疾病等多种呼吸系统疾病中,Nrf2通道发挥着重要的保护作用。但人们对MT在FA暴露引起的肺损伤进展中的影响知之甚少。该研究旨在探索FA暴露对肺组织的损伤性影响和MT的治疗作用及其相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 使用SPF级健康Wistar大鼠50只,雌性,5~6周龄,体质量130~150 g。在温度24~28℃、湿度40%~50%的清洁环境中饲养,昼夜节律为12 h/12 h。本研究实验动物购自辽宁长生生物技术股份有限公司,许可证号: XSCXK(辽)2020-0001。

1.1.2 主要试剂与仪器 FA溶液($\geq 37\%$ 分析纯)购自武汉中天化工公司;Nrf2、血红素氧合酶1(heme oxygenase 1, HO-1)、核因子- κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)抗体(货号分别为: 16396-1-AP、10701-1-AP、10745-1-AP)均购自美国proteintech公司;MT、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒(货号: M18674、S0101S)

2023-11-18 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81902937);湖北省大学生创新训练项目(编号: S202210927035)

作者单位: 湖北科技学院¹医学部药学院、²基础医学院、³临床医学院,咸宁 437100

作者简介: 王碧红,男,硕士研究生;

孙燕玲,女,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: sunstonesyl@163.com

均购自上海碧云天生物技术有限公司; 磷酸化核因子-κB (p-nuclear factor kappa B , p-NF-κB) 抗体、山羊抗兔二抗(IgG) (货号: ABP0043、A21020) 均购自美国 Abbkine 公司; β-actin 购自美国 ImmunoWay 公司(货号: YM3028) ; 谷胱甘肽(glutathione , GSH) 、8-羟基脱氧鸟苷 (8-hydroxydeoxyguanosine , 8-OHdG) 检测试剂盒(货号: A061-1、H165-1-1) 均购自南京建成生物工程研究所; 肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α , TNF-α) 、白细胞介素(interleukin , IL) -6 和 IL-1β ELISA 试剂盒(货号: RK00029、RK00020、RK00009) 均购自美国 ABclonal 公司; 动物组织 RNA 提取试剂盒(货号: 8034111) 购自深圳达科为生物技术公司; PerfectStart® Green qPCR SuperMix 试剂盒(货号: AQ601-02) 购自北京全式金生物技术公司。吸入暴露系统(型号: IES-NI) 购于上海瑞曼信息科技有限公司; 石蜡切片机(型号: RM2245) 购于德国 Leica 仪器有限公司; 生物显微镜(型号: U-RFL-T) 购于日本 Olympus 株式会社; 酶标仪(型号: SYNERGY HTX) 购于美国 BioTek 仪器有限公司; 蛋白垂直电泳仪(型号: 1658033) 、荧光定量 PCR 仪(型号: CFX-Connect) 购于美国 Bio-Rad 有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型及分组 将 50 只雌性 Wistar 大鼠通过随机数字表法分为 Control 组、FA 组、FA + MT 5 mg/kg 组、FA + MT 10 mg/kg 组和 FA + MT 20 mg/kg 组, 每组 10 只。除 Control 组外, 其余组均经口鼻吸入 3 mg/m³ FA, 每天 4 h, 连续 21 d, 然后腹腔注射不同剂量 MT(5、10、20 mg/kg) 进行治疗, 连续 14 d, 治疗间继续 FA 暴露, Control 组腹腔注射等体积 0.9% 氯化钠溶液。

1.2.2 肺组织形态学观察 取右肺中叶 4% 多聚甲醛固定 24 h 后, 梯度乙醇组织脱水、二甲苯透明, 石蜡包埋后切片, 行苏木精 - 伊红(Hematoxylin-Eosin , HE) 染色, 观察肺组织的形态学变化。分别以肺泡水肿、肺泡内充血、肺间质水肿程度评分: 无改变或非常轻微为 0 分, 轻度改变为 1 分, 中度改变为 2 分, 重度改变为 3 分, 极重度改变为 4 分, 累计上述 4 项的平均分值即为肺损伤评分。

1.2.3 肺水含量湿重/干重(wet weight/dry weight , W/D) 与肺系数测定 称量体质量, 取右肺前叶, 计算肺系数(肺质量/体质量) ; 滤纸蘸干肺组织表面水分, 称量后记为湿重, 70 °C 恒温干燥箱中干燥 48 h 后再次称量, 记为干重, 计算 W/D。

1.2.4 肺组织氧化应激水平测定 取右肺副叶, 严格按照试剂盒说明书制备组织匀浆并对样本进行操作, 酶标仪测定吸光度值后计算 GSH、SOD、8-OHdG 的浓度。

1.2.5 ELISA 法检测各组大鼠肺泡灌洗液中炎症因子水平 取肺泡灌洗液, 于 4 °C、12 000 r/min, 离心 10 min, 提取上清液, 按对应的 ELISA 检测试剂盒说明书进行测定。

1.2.6 Western blot 检测肺组织相关蛋白表达水平测定 取右肺后叶, RIPA 裂解液提取组织蛋白并测蛋白浓度; 加 5 × SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 沸水中煮 10 min; 以 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶电泳分离蛋白; 转移到 PVDF 膜上; 5% 脱脂奶粉封闭 60 min; 一抗(1 : 1 000) 于 4 °C 孵育过夜; 洗膜后加入二抗(1 : 10 000) 室温下摇床孵育 60 min; 洗膜后采用增强化学发光法显色, 以 β-actin 为内参。

1.2.7 肺组织 Nrf2、Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-related protein1 , Keap1) 及 HO-1 的 mRNA 表达量检测 取右肺后叶, 采用组织提取试剂盒提取肺组织中的 RNA, 纯化后用 All-in-one First Strand cDNA Synthesis Kit (SEVEN) 试剂盒进行逆转录得到 cDNA。以逆转录后的 cDNA 为模板, 用 PerfectStart® Green qPCR SuperMix (TRAN) 试剂盒进行检测。基因的引物设计如表 1。

表 1 实时定量 PCR 目的基因

目的基因	引物序列(5'-3')
<i>β-actin</i>	F: CGTTGACATCCGTAAAGACC R: GGAGCCAGGGCAGTAATCT
<i>Nrf2</i>	F: TTCAAGCCGATTAGAGG R: TTGCTCCTTGGACATCA
<i>HO-1</i>	F: GGTCCTGAAGAAGATTGCC R: GATGCTCGGAAGGTGAA
<i>Keap1</i>	F: CGCCCTGTGCCTCTATG R: AGGTGCCACTCGTCTCG

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析。所有数据资料用平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用 Shapiro-Wilk test 来评估正态分布, 组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA) , 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肺组织病理学变化 Control 组大鼠肺组织结构正常, 肺泡腔结构规则完整, 肺泡壁清晰可见, 肺间质内未见炎性细胞浸润; FA 组大鼠肺泡

腔不规则且增大,肺泡壁明显增厚,炎细胞浸润显著性增加;MT组大鼠肺组织肺泡腔、肺泡壁、肺间质内炎性细胞浸润均有好转,且高剂量最为显著。见图1和表2。

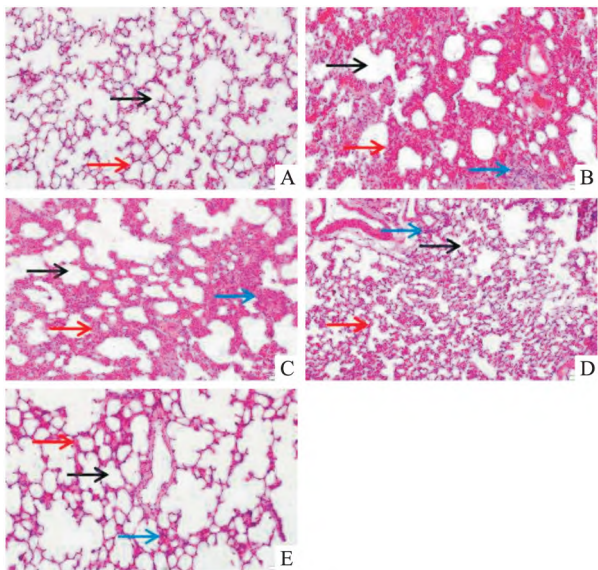


图1 各组大鼠肺组织 HE 染色图 ×20

A: Control 组; B: FA 组; C: FA + MT 5 mg/kg 组; D: FA + MT 10 mg/kg; E: FA + MT 20 mg/kg; 黑色箭头: 指示肺泡腔; 红色箭头: 指示肺泡间隔; 蓝色箭头: 指示炎性细胞浸润

2.2 各组大鼠肺 W/D、肺系数及肺组织切片评分比较 与 Control 组相比,FA 组大鼠肺 W/D 上升,肺系数升高($P < 0.05$); MT 组大鼠肺 W/D 均低于 FA 组,肺系数也有所降低,且呈剂量依赖性($P < 0.05$)。见表 2。

表2 各组大鼠肺 W/D、肺系数及肺组织切片评分比较($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	W/D	肺系数	肺组织评分
Control	0.92 ± 0.10	0.44 ± 0.04	1.25 ± 0.25
FA	2.10 ± 0.09*	0.82 ± 0.02*	4.00 ± 0.25*
FA + MT 5 mg/kg	1.83 ± 0.15 [#]	0.66 ± 0.03 [#]	3.50 ± 0.25
FA + MT 10 mg/kg	1.51 ± 0.05 [#]	0.60 ± 0.01 [#]	2.50 ± 0.25 [#]
FA + MT 20 mg/kg	1.10 ± 0.01 [#]	0.50 ± 0.03 [#]	1.50 ± 0.25 [#]
P 值	<0.05	<0.05	<0.05

与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 FA 组比较: [#] $P < 0.05$

2.3 各组大鼠肺组织氧化应激水平比较 与 Control 组相比,FA 组大鼠肺组织的 GSH、SOD 含量降低,8-OHdG 含量上升($P < 0.05$); 与 FA 组相比,MT 组大鼠肺组织的 GSH、SOD 含量均不同程度升高,8-OHdG 降低且均呈剂量依赖性($P < 0.05$)。见表 3。

表3 各组氧化应激水平比较($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	GSH(μmol/L)	SOD(U/mg prot)	8-OHdG(ng/ml)
Control	2 211.33 ± 41.00	0.70 ± 0.01	24.17 ± 1.68
FA	1 660.67 ± 29.01*	0.45 ± 0.03*	40.37 ± 1.27*
FA + MT 5 mg/kg	1 864.67 ± 143.68	0.56 ± 0.01 [#]	34.69 ± 0.43 [#]
FA + MT 10 mg/kg	1 991.33 ± 79.86 [#]	0.60 ± 0.01 [#]	32.34 ± 0.56 [#]
FA + MT 20 mg/kg	2 054.00 ± 75.29 [#]	0.65 ± 0.01 [#]	28.03 ± 0.80 [#]
P 值	<0.05	<0.05	<0.05

与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 FA 组比较: [#] $P < 0.05$

2.4 各组大鼠肺泡灌洗液炎症因子水平比较 与 Control 组相比,FA 组大鼠肺泡灌洗液中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的含量上升($P < 0.05$); 与 FA 组相比,MT 组大鼠肺泡灌洗液中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的含量均有不同程度降低,且均呈剂量依赖性($P < 0.05$)。见表 4。

表4 各组炎症因子指标比较(pg/ml, $\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	TNF-α	IL-6	IL-1β
Control	61.00 ± 10.00	211.00 ± 20.00	150.00 ± 10.00
FA	152.00 ± 10.00*	411.00 ± 25.46*	210.00 ± 10.00*
FA + MT 5 mg/kg	111.00 ± 10.00 [#]	337.67 ± 15.28 [#]	190.00 ± 10.00
FA + MT 10 mg/kg	91.00 ± 10.00 [#]	291.00 ± 10.00 [#]	170.00 ± 10.00 [#]
FA + MT 20 mg/kg	81.00 ± 10.00 [#]	237.67 ± 15.28 [#]	153.33 ± 15.28 [#]
P 值	<0.05	<0.05	<0.05

与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 FA 组比较: [#] $P < 0.05$

2.5 各组大鼠肺组织相关蛋白表达水平的变化 与 Control 组相比,FA 组大鼠肺组织 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平降低; 与 FA 组相比,MT 组大鼠肺组织 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平随剂量依次升高($P < 0.05$)。各组大鼠肺组织 NF-κB 蛋白表达水平无明显变化。与 Control 组相比,FA 组大鼠肺组织 p-NF-κB 蛋白表达水平升高($P < 0.05$); 与 FA 组相比,MT 组大鼠肺组织 p-NF-κB 蛋白表达水平随剂量依次降低($P < 0.05$)。如图 2 和表 5。

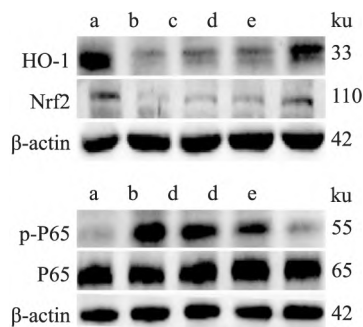


图2 Western blot 检测各组大鼠肺组织相关蛋白表达水平

a: Control 组; b: FA 组; c: FA + MT 5 mg/kg 组; d: FA + MT 10 mg/kg; e: FA + MT 20 mg/kg

表5 各组大鼠肺组织相关蛋白指标比较($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

组别	Nrf2/ β -actin	HO-1/ β -actin	p-NF- κ B/NF- κ B
Control	1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.03
FA	0.38 \pm 0.01*	0.57 \pm 0.01*	3.37 \pm 0.05*
FA + MT 5 mg/kg	0.43 \pm 0.01#	0.70 \pm 0.01#	2.51 \pm 0.03#
FA + MT 10 mg/kg	0.48 \pm 0.01#	0.84 \pm 0.02#	1.93 \pm 0.03#
FA + MT 20 mg/kg	0.73 \pm 0.02#	0.89 \pm 0.03#	1.64 \pm 0.05#
P 值	<0.05	<0.05	<0.05

与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 FA 组比较: # $P < 0.05$

2.6 各组大鼠肺组织 *Nrf2*、*HO-1* 和 *Keap1* 的 mRNA 表达水平的变化 与 Control 组相比,FA 组大鼠肺组织 *Nrf2*、*HO-1* 的 mRNA 相对表达量降低;与 FA 组相比,MT 组大鼠肺组织 *Nrf2*、*HO-1* 的 mRNA 相对表达量随剂量依次升高 ($P < 0.05$)。与 Control 组相比,FA 组大鼠肺组织 *Keap1* 的 mRNA 相对表达量升高;与 FA 组相比,MT 组大鼠肺组织 *Keap1* 的 mRNA 相对表达量随剂量依次降低 ($P < 0.05$)。见表 6。

表6 各组大鼠肺组织 mRNA 表达水平指标比较($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

组别	<i>Nrf2</i>	<i>Keap1</i>	<i>HO-1</i>
Control	1.00 \pm 0.04	1.00 \pm 0.06	1.00 \pm 0.04
FA	0.52 \pm 0.05*	1.39 \pm 0.05*	0.55 \pm 0.02*
FA + MT 5 mg/kg	0.62 \pm 0.03	1.31 \pm 0.01	0.68 \pm 0.01#
FA + MT 10 mg/kg	0.73 \pm 0.02#	1.23 \pm 0.03#	0.73 \pm 0.02#
FA + MT 20 mg/kg	0.87 \pm 0.04#	1.10 \pm 0.04#	0.94 \pm 0.04#
P 值	<0.05	<0.05	<0.05

与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 FA 组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

ALI 是一种高发病率和病死率的临床综合征,也是危重症患者的发病率和病死率的一个重要来源^[6]。尽管对 ALI 的研究取得了一些进展,但其病因复杂,发病机制尚不明确。FA 是环境中普遍存在的室内污染现象,研究^[7]表明,FA 通过减少经肺泡 Na^+ 运输、降低人类上皮钠通道活性和增强膜去极化,以及增加的 ROS 产生,导致 ALI。本研究显示,FA 组大鼠肺组织肺泡壁明显增厚,腔内可见渗出物,肺泡腔增大,肺泡隔水肿变宽,肺间质内有大量炎性细胞浸润,W/D 上升,肺系数升高,说明 FA 暴露可诱导大鼠 ALI。

研究^[8]表明,FA 可与蛋白质、核酸和氨基酸等分子发生反应,其反应与炎症过程和氧化应激有关。肺组织由于其独特的先天结构,容易受到氧化损伤,FA 暴露可加快肺部炎性细胞的募集,肥大细胞和白细胞被招募到损伤部位后吸氧量增加,从而导致

“呼吸爆发”,进而增加损伤部位 ROS 的释放和积累^[9]。本研究显示,FA 暴露后大鼠肺组织抗氧化物质 GSH、SOD 的含量降低,DNA 氧化损伤标志物 8-OHdG 含量上升,炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的含量上升,说明 FA 暴露可导致大鼠肺组织氧化失衡和炎症反应,进而诱导 ALI。

MT 在维持机体正常生理活动中起着关键作用,包括调节昼夜节律、免疫反应、氧化过程、凋亡或线粒体稳态^[10],其最突出的药理作用是清除自由基和抑制炎症反应^[11]。MT 主要由松果体细胞合成和分泌,通过激活高亲和力 MT1 和低亲和力 MT2 膜特异性受体发挥作用。另外,MT 还通过与细胞质钙调素结合在细胞内起作用。本研究显示,应用不同剂量的 MT 对 FA 暴露诱导的急性肺损伤大鼠进行治疗后,肺组织肺泡腔、肺泡壁、肺间质内炎性细胞浸润均有好转,W/D 下降,肺系数也降低,肺组织 GSH、SOD 含量升高,8-OHdG 含量下降,肺泡灌洗液 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 含量下降,且呈剂量依赖性。此结果提示 MT 改善了 FA 暴露诱发的大鼠肺组织氧化失衡状态,且对 FA 暴露后肺组织的炎症反应有抑制作用,从而减轻肺组织的炎性浸润,缓解 FA 暴露诱导的 ALI。

Nrf2 是一种对氧化还原敏感的转录因子,能激活抗氧化基因的转录,也参与调节细胞增殖和炎症基因的表达。当机体处于氧化应激状态时,Nrf2 与其负调节剂细胞骨架相关蛋白 Keap1 分离,并向细胞核转移,入核后进一步促进下游抗氧化基因如 *HO-1* 的转录^[12-13]。NF- κ B 是一种核转录因子,可调节多个基因在炎症反应中的表达^[14]。Nrf2/Keap1/HO-1 信号传导在氧化应激和炎症反应中对 NF- κ B 传递进行负调节,启动 NF- κ B 依赖性转录通路,快速诱导炎症因子的分泌^[15]。本研究显示,FA 组大鼠肺组织 p-NF- κ B、*Keap1* 的表达升高,*Nrf2*、*HO-1* 的表达降低;各治疗组大鼠 p-NF- κ B、*Keap1* 的表达随剂量依次降低,*Nrf2*、*HO-1* 的表达随剂量依次升高,表明 MT 可以通过调控 Nrf2/Keap1/HO-1 信号通路调节肺组织氧化失衡和减少炎症因子表达,改善 FA 暴露所致的 ALI。

研究表明,吸入 3 mg/m³ FA 可导致大鼠 ALI,MT 可以通过 Nrf2/Keap1/HO-1 信号通路调节氧化应激水平,抑制炎症反应,减轻肺组织的炎性浸润,缓解 FA 暴露诱导的大鼠 ALI。研究揭示了 MT 对环境污染造成的肺部损伤的治疗潜力。

参考文献

- [1] Li Y, Yu H, Lv M, et al. Combination therapy with budesonide and N-acetylcysteine ameliorates LPS-induced ALI by attenuating neutrophil recruitment through the miR-196b-5p/Socs3 molecular axis[J]. *BMC Pulm Med*, 2022, 22(1): 388.
- [2] Khoshakhlagh A H, Mohammadzadeh M, Manafi S S, et al. Inhalational exposure to formaldehyde, carcinogenic, and non-carcinogenic risk assessment: a systematic review [J]. *Environ Pollut*, 2023, 331(Pt 1): 121854.
- [3] Oztan O, Tutkun L, Turksoy V A, et al. The relationship between impaired lung functions and cytokine levels in formaldehyde exposure[J]. *Arch Environ Occup Health*, 2021, 76(5): 248–54.
- [4] Huang Y, Jiang L, Liu X, et al. Melatonin alleviates acute kidney injury by inhibiting Nrf2/Slc7a11 axis-mediated ferroptosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 4776243.
- [5] Zhang Z, Fu C, Liu J, et al. Hypermethylation of the Nrf2 promoter induces ferroptosis by inhibiting the Nrf2-GPX4 axis in COPD[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2021, 16: 3347–62.
- [6] Mowery N T, Terzian W T H, Nelson A C. Acute lung injury [J]. *Curr Probl Surg*, 2020, 57(5): 100777.
- [7] Ding Y, Cui Y, Zhou Z, et al. Lipopolysaccharide inhibits alpha epithelial sodium channel expression *via* miR-124-5p in alveolar type 2 epithelial cells [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 8150780.
- [8] Nadalutti C A, Prasad R, Wilson S H. Perspectives on formaldehyde dysregulation: mitochondrial DNA damage and repair in mammalian cells [J]. *DNA repair (Amst)*, 2021, 105: 103134.
- [9] Liu Q P, Ge P, Wang Q N, et al. Circular RNA-CDR1as is involved in lung injury induced by long-term formaldehyde inhalation [J]. *Inhal Toxicol* 2021, 33(9–14): 325–33.
- [10] Vasey C, McBride J, Penta K. Circadian rhythm dysregulation and restoration: the role of melatonin [J]. *Nutrients*, 2021, 13(10): 3480.
- [11] Wang W, Gao J. Effects of melatonin on protecting against lung injury (Review) [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(3): 228.
- [12] Baird L, Yamamoto M. The molecular mechanisms regulating the KEAP1-NRF2 pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2020, 40(13): e00099–20.
- [13] 纪新博, 顾申红, 麦华德, 等. Prdx1 过表达通过 Nrf2/HO-1 信号通路抑制氧化应激减轻自发性高血压大鼠心肌肥厚和纤维化 [J]. *安徽医科大学学报* 2023, 58(2): 196–201.
- [14] Poma P. NF- κ B and Disease [J]. *Int J Mol Sci* 2020, 21(23): 9181.
- [15] Zhang Q, Liu J, Duan H, et al. Activation of Nrf2/HO-1 signaling: an important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis *via* the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress [J]. *J Adv Res*, 2021, 34: 43–63.

Protective effect of melatonin on formaldehyde exposure-induced acute lung injury in rats through modulation of the Nrf2 pathway

Wang Bihong¹, Nie Xiaoyu², Ding Weijie², Zhou Jiating², Xu Beiqi², Zhang Ying², Lv Jianguo³, Sun Yanling²

(¹School of Pharmacy, Dept of Medicine, ²School of Basic Medical Sciences,

³School of Clinical Medical Sciences, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100)

Abstract Objective To investigate the protective effect of melatonin (MT) on formaldehyde (FA) inhalation-induced acute lung injury (ALI) in rats and its mechanism through the regulation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) signaling pathway. **Methods** Fifty female Wistar rats were randomly divided into Control group, FA group, FA + MT 5 mg/kg group, FA + MT 10 mg/kg group and FA + MT 20 mg/kg group, with 10 rats in each group. Except for the Control group, all other groups inhaled 3 mg/m³ FA daily for 21 d consecutively to construct the tainted model, and then treated with different MT doses for 14 d. The tainting was continued during the MT treatment. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the histopathological changes in lung tissue, lung water content and lung coefficient were weighed and measured, glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) and 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) levels were measured by absorbance photometric method, and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6, and IL-1 β concentrations, Western blot to detect the protein expression levels of Nrf2, heme oxygenase-1 (HO-1), nuclear factor- κ B (NF- κ B), and phosphorylated nuclear factor- κ B (p-NF- κ B) in lung tissues, and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) to detect the *Nrf2*, *HO-1*, and Kelch-like ECH-associated protein 1 (*Keap1*) mRNA expression levels. **Results** Compared with the control group, lung injury was obvious in rats in the FA group; lung tissue GSH and SOD levels were reduced, and 8-OHdG levels were elevated ($P < 0.05$); alveolar lavage fluid TNF- α , IL-6, and IL-1 β levels were elevated ($P < 0.05$); Nrf2 and HO-1 protein

弓形虫感染与脑炎因果关系的双样本孟德尔随机化分析

李伊凡¹ 盛书颜² 吴梦云¹ 计永胜³ 姚 湧¹

摘要 目的 利用孟德尔随机化(MR)分析探究弓形虫感染与脑炎的因果关系,并通过免疫组化观察脑组织中的弓形虫包囊分布和炎症情况。方法 获取弓形虫感染和脑炎的全基因组关联分析数据,筛选出单核苷酸多态性(SNPs)位点,以逆方差加权法为主进行MR分析,以OR值及95%CI评价弓形虫感染与脑炎之间的因果关系。利用异质性检验、水平多效性检验、留一法进行质量控制。利用Wh6弓形虫包囊感染的小鼠脑组织切片进行免疫组化染色,使用Image J软件进行图片分析。结果 筛选出29个弓形虫感染与脑炎存在相关性的SNP,IVW方法结果提示弓形虫感染使得脑炎的患病分险为原来的0.98倍($OR=0.98$, 95%CI为0.76~1.27),显示两者无因果关系。质量控制结果提示筛选出的SNPs具有稳定可靠性。弓形虫包囊在脑组织各部位分布不同。结论 弓形虫感染与脑炎具有相关性,但未有充分证据证明二者之间存在因果关系。

关键词 孟德尔随机化; 弓形虫; 脑炎

中图分类号 R 382.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)01-0028-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.005

2023-10-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81802026); 安徽高校自然科学基金项目(编号: KJ2019A0264、2023AH040077)

作者单位: 安徽医科大学¹ 基础医学院病原生物学教研室、² 第一临床医学院, 合肥 230032

³ 中国科学技术大学生命科学与医学部, 合肥 230027

作者简介: 李伊凡, 女, 硕士研究生;

姚 湧, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yaoyong@ahmu.edu.cn

刚地弓形虫是一种细胞内寄生原虫,可感染包括人类在内的多种动物。孕妇急性感染会导致胎儿先天性感染,引起胎儿的死产和自然流产^[1]。弓形虫具有机会致病性,所致损伤主要发生在胎儿或免疫受损人群;在免疫功能正常的个体,弓形虫感染通常无明显临床症状,而是在宿主中枢神经系统以组织包囊形式呈慢性感染状态^[2]。有研究^[3]表明,慢性弓形虫感染可能会改变人类行为和认知功能,甚至可能增加患神经系统疾病的风险。在免疫功能低下个体中,例如患有获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的个体,隐性的弓形虫感染可能会活化,诱发弓形虫脑炎^[4]。

对于观察性流行病学的研究,因为从来不能确定关联的所有混杂因素是否已被识别,传统分析中因果结论很少是合理的,即使在测量暴露和结果之间的强大统计关联时也是如此。孟德尔随机化(Mendelian randomization, MR)提供了一种在流行病学研究中探索因果关系问题的替代方法,通过使用假设满足工具变量(instrumental variable, IV)假设的额外遗传变异,即以单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)作为工具变量,模拟随机对照试验设计的方法,推断两者之间是否存在因果关系^[5]。目前,大规模全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)数据的公开

expression levels were reduced in the lung tissue ($P < 0.05$), and p-NF- κ B protein expression levels were elevated ($P < 0.05$); the relative mRNA expression of *Nrf2* and *HO-1* in lung tissue was decreased, and the relative mRNA expression of *Keap1* was elevated ($P < 0.05$). Compared with the FA group, the lung injury of rats in the MT group was improved; the levels of GSH and SOD in the lung tissue were increased ($P < 0.05$), and the level of 8-OHdG was decreased ($P < 0.05$); the levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β in the alveolar lavage fluid were decreased ($P < 0.05$); and the expression levels of the *Nrf2* and *HO-1* proteins in the lung tissue were increased ($P < 0.05$). p-NF- κ B protein expression level was decreased ($P < 0.05$); the relative mRNA expression levels of *Nrf2* and *HO-1* in lung tissues were increased ($P < 0.05$), and the relative mRNA expression level of *Keap1* was decreased ($P < 0.05$) in lung tissues, and all of them were in a dose-dependent manner. **Conclusion** MT can alleviate oxidative stress and inflammatory responses and mitigate FA exposure-induced acute lung injury by regulating the *Nrf2/Keap1/HO-1* signaling pathway.

Key words melatonin; nuclear factor E2-related factor 2; acute lung injury; formaldehyde