

УУШГИНЫ ХУРЦ ГЭМТЛИЙН ҮЕД KEAP1/NRF2-HO-1 БОЛОН NLRP3 ИНФЛАММАСОМ ДОХИОНЫ ЗАМД ИЗООРИЕНТИНЫ ҮЗҮҮЛЭХ НӨЛӨӨ

Бадамжав Рэнцэн¹, Энхжаргал Наранчимэг¹, Мягмар Наранхүү¹, Батчулуун Цолмон¹, Fang Li²

¹Эм Зүйн Шинжлэх Ухааны Их Сургууль, Монгол улс, Сонгинохайрхан дүүрэг, 18130

²Хятадын Эм зүйн Их Сургууль, Хятад улс, Жянсу мужийн Нанжин хот, 211198,

E-mail: rentsen@monos.mn, Умас: 99021519

THE EFFECTS OF ISOORIENTIN ON MODULATING KEAP1/NRF2-HO-1 AND NLRP3 INFLAMMASOME PATHWAYS IN ACUTE LUNG INJURY

Badamjav Rentsen¹, Enkhjargal Naranchimeg¹, Myagmar Narankhuu¹,

Batchuluun Tsolmon¹, Fang Li²

¹Mongolian University of Pharmaceutical Sciences, Songinokhairkhan district, 18130

²China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu, 211198,

E-mail: rentsen@monos.mn, Phone: 99021519

Abstract

The process of ALI is associated with excessive pulmonary inflammation as undue activation of immune cells including macrophages and neutrophil granulocytes and subsequently increased cytokines such as interleukin 6 (IL-6) contribute to severe tissue damage and irreversible pulmonary pathological changes. NOD-, LRR- and pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome is a cytosolic receptor consisting of upstream sensor protein NLRP3, adaptor protein apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) and the effector protein caspase-1. Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) is a transcription factor that neutralizes oxidative stress via initiating antioxidant response element-driven gene transcription. Nrf2 is suppressed by kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) under physiological conditions, while Nrf2 dissociates from Keap1, stabilizes and accumulates in the nucleus with stimulation of oxidative stress. Thereafter, heme oxygenase 1 (HO-1) a downstream target gene of Nrf2 is activated to catalyze various detoxification reactions and exert anti-oxidative capacity.

ISO significantly promoted the expression of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase 1 (HO-1) and down-regulated kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1). Simultaneously, it suppressed the over-expression of NOD-, LRR- and pyrin domain-containing 3 (NLRP3), caspase-1, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) and pro-inflammatory cytokines interleukin IL-1 β (pro-IL-1 β), and inhibited the expression of apoptotic related proteins induced by LPS challenge. Meanwhile, the results of molecular docking indicated the potential ability of ISO as a ligand binding with proteins Keap1, NLRP3 and cleaved-caspase-3 as well.

Keywords: Isoorientin, Acute lung injury Inflammation, Signaling pathways

Үндэслэл

Уушгины хурц гэмтэлийн үед макрофаг, нейтрофил зэрэг дархлааны эсүүд идэвхжиж, улмаар интерлейкин 6 (IL-6) цитокины экспресс нэмэгдэж үрэвслийн процесс, эд, эс гэмтэж уушгийг эмгэг өөрчлөлтөд хүргэдэг.¹⁻³ Грам сөрөг бактерийн эсийн мембраны нэг хэсэг болох липополисахарид (ЛПС) нь төрөлхийн дархлааг өдөөж, улмаар үрэвсэл, эсийн хордлого үүсгэдэг.⁴ Тиймээс ЛПС-г амьтны загвар дээр уушгины хурц гэмтлийг үүсгэхэд өргөнөөр хэрэглэж байна.

NOD-, LRR- ба пирин домэйн агуулсан 3 (NLRP3) үрэвсэл нь дээд талын мэдрэгчийн уураг NLRP3, CARD (ASC) агуулсан адаптер уураг, апоптозтой холбоотой толбо хэлбэртэй уураг, эффектор уураг каспаз-1 зэргээс бүрдсэн цитозол рецептор юм. Идэвхгүй про-каспаз-1 нь бичил биетний халдвар, стрессийн дохионы хариуд биологийн идэвхт каспаза-1-д хуваагдаж, улмаар интерлейкин 1 β (IL-1 β) бүлгийн цитокиныг үүсгэдэг. Үүний дараа төрөлхийн дархлааны эсүүд халдварын голомт руу дайчлагдаж, үрэвслийг өдөөдөг.⁵⁻⁸ Уушгины

хурц гэмтэлд исэлдэлт болон антиоксидант системийн хоорондын тэнцвэргүй байдал, исэлдэлтийн стресс чухал үүрэг гүйцэтгэдэг. Исэлдүүлэгч бодисын хуримтлал нь эсийн липид, уураг, ДНХ-д өөрчлөлт оруулаад зогсохгүй дархлаа зохицуулалт, үрэвслийн хариу урвалд оролцдог.⁹ Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) уураг нь антиоксидант хариу урвалыг удирддаг генийн транскрипцийг эхлүүлэх замаар исэлдэлтийн стрессийг саармагжуулдаг транскрипцийн хүчин зүйл юм. Nrf2 нь физиологийн хэвийн нөхцөлд ECH-тэй холбоотой 1-р уураг (Keap1) дарангуйлдаг бол Nrf2 нь Keap1-ээс салж, тогтворжиж, исэлдэлтийн стрессийг өдөөж цөмд хуримтлагддаг.¹⁰ Үүний дараа Nrf2 heme oxygenase-1 (HO-1) уургийн экспрессыг идэвхжүүлж хоргүйжүүлэх урвалыг хурдасгаж, исэлдэлтийн эсрэг үйлчилгээ үзүүлдэг.¹¹

Бага буржгар (*Thalictrum minus* L. TML) Монгол орны Хөвсгөл, Хэнтий, Хангайн нутгаар тархаж ургадаг. Монголын уламжлалт анагаах ухаанд бактери, мөөгөнцрийн халдвар, сүрьеэ өвчнийг анагаах ардын ургамал болгон хэрэглэдэг.¹² Бидний сүүлийн үеийн судалгаагаар TML-ийн ханд нь **липополисахарид** болон тоосонцороор үүсгэгдсэн уушгины хурц үрэвслийг бууруулж байсан.¹³ Бага буржгараас өндөр идэвхит шингэний хроматографийн (HPLC-QTOF) аргаар биоидэвхтэй нэгдэлийг тодорхойлоход Изоориентин хамгийн өндөр байсан. Изоориентин үрэвслийн эсрэг, исэлдэлтийн эсрэг маш сайн үйлдэл үзүүлдэг байна.¹⁴ Тиймээс Бага буржгард агуулагдаж байгаа Изоориентин нь уушгины хурц гэмтлийн үед биоидэвхтэй үйлдэл үзүүлдэг эсэхийг батлах зорилгоор үрэвслийн зарим дохионы замд үзүүлэх нөлөөг судлах шаардлагатай байна.

Зорилго: Изоориентин уушгины хурц гэмтлийн үед KEAP1/NRF2-HO-1 болон NLRP3 инфламмасом дохионы замд үзүүлэх нөлөөг тогтоох

Зорилт:

1. Изоориентин уушгины хурц гэмтлийн үед KEAP1/NRF2-HO-1 дохионы замд үзүүлэх нөлөөг хулганы загвар дээр судлах

2. Изоориентин уушгины хурц гэмтлийн үед NLRP3 инфламмасом дохионы замд үзүүлэх нөлөөг хулганы загвар дээр судлах

Материал, арга зүй:

Судалгааны ажлын хэрэглэгдэхүүн:

Липополисахарид (from *Escherichia coli* O55:B5) Sigma (St. Louis, MO, USA), Дексаметазоныг (DEX) Shenyang Guangda Pharmaceutical, RIPA буферын уусмал, Vazyme Biotech (Nanjing, China), BCA-г Beyotime биотехнологийн хүрээлэнгээс (Shanghai, China), NLRP3, Nrf2, Keap1, HO-1, ASC, caspase-1, IL-1 β -ийн анхдагч эсрэг биеийг Proteintech группээс (Wuhan, China) худалдаж авсан. Bax, Bcl-2 уургийн анхдагч эсрэг биеийг Santa Cruz биотехнологи (Dallas, TX, USA), Cleaved-caspase-3-ын анхдагч эсрэг биеийг Zen-Bioscience Biological Technology (Chengdu, China)-с тус тус худалдаж авсан.

Туршилтын амьтад, судалгааны

бүлгүүд: ICR шугамын эр хулганыг (8 долоо хоногтой, 22-25 гр) Henan Sikebas Biotechnology Co., Ltd (Henan, China). -аас худалдаж авсан. Туршилтыг Хятадын Эм Зүйн Их Сургуулийн амьтны ёс зүйн хорооноос гаргасан “Амьтанд туршилт хийх биоанагаахын судалгааны ёс зүйн удирдамж”-ийн дагуу ёс зүйн хэм хэмжээг баримтлан ажилласан (SYXK 2016-0011). Уушгины хурц гэмтэл үүсгэхийн тулд хулганы гуурсан хоолойгоор ЛПС уусмалаас 40 мкл (5 мг/кг) тарьж оруулсан. Эрүүл хяналтын бүлэгт PBS уусмалыг тарьсан. Эмчилгээний бүлгийн хулгануудад эмгэг загвар үүсгэснээс хойш 1 цагийн дараа TML (40 мг/кг), Изоориентин (10, 20, 40 мг/кг), харьцуулах бүлэгт Dex (5 мг/кг) тунгаар 3 өдрийн турш амаар хэрэглэсэн.^{13,14}

Western blot шинжилгээ: Гурван хоногийн дараа хулганаа золиослоод уушгины эдийг авч 1 mM PMSF лизисын буфер уусмалтай хольж нэгэн төрлийн болгосон. Дээжүүдийг ялгах зорилгоор SDS-PAGE-д ачаалж, PDVF мембран руу шилжүүлсэн. Дараа нь 3% BSA-г уусмалаа блоклож, мембран цаасыг анхдагч эсрэг биетээр 4° C-т 24 цагийн турш байлгасан. 24 цагийн дараа мембран цаасыг TBST уусмалаар 3 удаа угааж тохирох HRP-конъюгат хоёрдогч эсрэг биетэд байлгасан. Үүний дараа мембран цаасанд шилжсэн уургийн нягтыг electrochemiluminescence

immunoassay аргаар Bio-Rad Laboratories багажаар хэмжсэн.

Иммунофлюоресцент будалт: Гурван хоногийн дараа хулганаа золиослоод уушгиний эдийг 40% сахароз РВС-н уусмалд байлгана. Дараань ОСТ гелд уушгиний эдүүдийг бэхлээд -20°C градусд $5\text{ }\mu\text{m}$ зузаантайгаар нимгэн зүссэн. Зүссэн эдийг Triton X-100 уусмалаар 10 минутын турш нэвчүүлж, анхдагч эсрэг биет нэмж 4°C градуст 24 цаг тавьсан. Дараа нь дээж тус бүрийг тохирох хоёрдогч флюоресцент эсрэг биетээр өсгөвөрлөж, тасалгааны температурт 1 цагийн турш байлгаж, DAPI болон тодруулах уусмалыг нэмсэн. Уушгины эдийн дүрслэлийг Лазер сканнерийн төвлөрсөн микроскопоор (Carl Zeiss, Jena, Germany) хийсэн ба флюоресценцийн эрчмийг Фижи¹⁵ (Schindelin et al., 2012) аппаратаар хэмжсэн.

Статистикийн дүн шинжилгээ: Статистикийн боловсруулалтыг SPSS-26.0 программыг (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) ашиглан дундаж $\pm$ стандарт хазайлтыг тодорхойлж, дундажын ялгааг тодорхойлохдоо стьюдент t-тестийг үнэлж P утга 0,05-аас

($p < 0.05$) бага тохиолдолд статистикийн ач холбогдолтой гэж тодорхойлов.

Үр дүн:

1. Изоориентин уушгины хурц гэмтлийн үед KEAP1/NRF2-HO-1 дохионы замд үзүүлэх нөлөө

Keap1/Nrf2-HO1-ийн дохионы замыг бие махбодийн исэлдэлтийн эсрэг системийн үндсэн хэсэг гэж үздэг. Тиймээс Keap1, Nrf2, HO-1-ийн уургуудийн экспрессийн өөрчлөлтийг тодорхойлсон. Судалгааны үр дүнгээс харахад ЛПС бүлгийг эрүүл хяналтын бүлэгтэй харьцуулахад Nrf2-ийн экспресс мэдэгдэхүйц буурч, Keap1 ба HO-1 нь экспресс мэдэгдэхүйц нэмэгдсэн байна. Үүний эсрэгээр Изоориентин (20 mg/kg) болон дексаметазоноор эмчилсэн бүлгийг ЛПС бүлэгтэй харьцуулахад Nrf2 уургийн экспресс нэмэгдэж, Keap1-ийн экспресс дарангуйлагдсан. Түүнчлэн эдгээр эмчилгээний бүлгүүдэд нь HO-1 генийн экспресс ЛПС бүлэгтэй харьцуулахад мэдэгдэхүйц сайжирсан болох нь харагдаж байна. (Зураг 1. A,B,C,D)

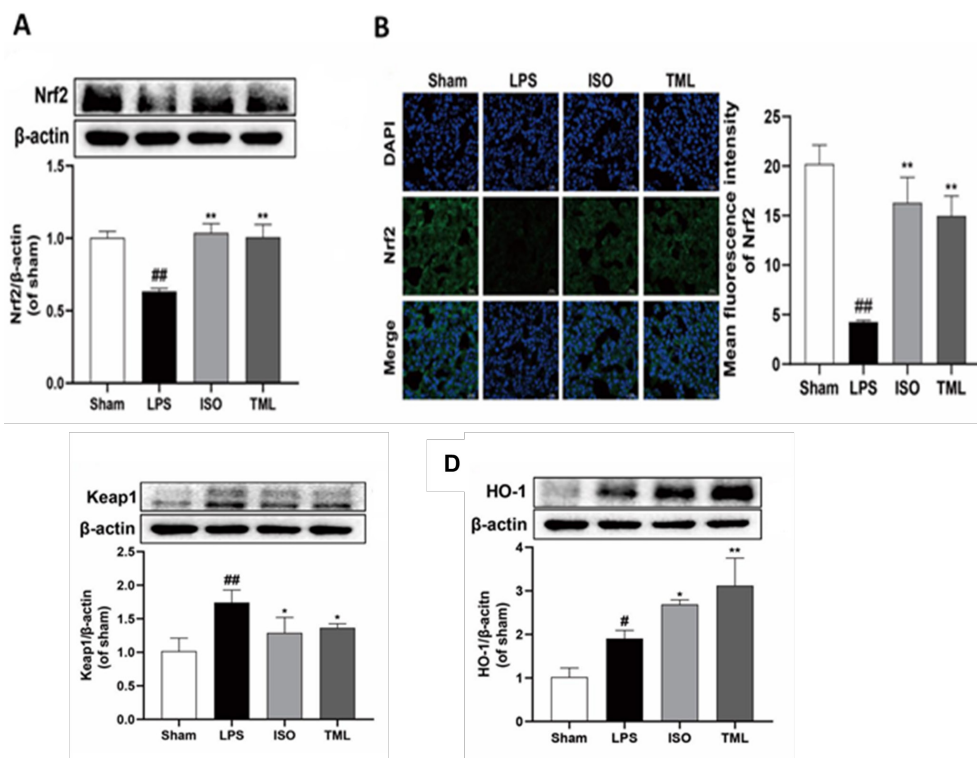


Fig. 1. ISO and TML activated Keap1/Nrf2-HO-1 signaling pathway. The expression of Nrf2 was measured via western blot (a) and immunofluorescence analysis (b). The changes of protein expression of Keap1(c) and HO-1 (d) were detected via western blot. Results were presented as mean $\pm$ SD. [#] $p < 0.05$, ^{##} $p < 0.01$ vs. Sham group, ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ vs. LPS group. n = 3.

2. Изоориентин уушгины хурц гэмтлийн үед NLRP3 инфламмасом дохионы замд үзүүлэх нөлөөг хулганы загвар дээр судлах

ЛПС үүсгэгдсэн уушгины хурц гэмтлийн үед NLRP3 үрэвслийн дохионы зам идэвхжиж үрэвслийн хариу урвалыг өдөөж NLRP3 болон холбогдох бусад уургуудын экспрессыг эхлүүлдэг. Бид энэ дохионы замын уургуудыг

Western blot-н аргаар тодорхойлсон. Судалгааны дүнгээс харахад ЛПС бүлгийг эрүүл хяналтын бүлэгтэй харьцуулахад NLRP3, ASC, каспаза-1 болон pro-IL-1 β уургийн экспресс нэмэгдэж харин Изоориентин (20 mg/kg) болон дексаметазоноор эмчилсэн бүлгийг ЛПС бүлэгтэй харьцуулахад NLRP3, ASC, каспаза-1 ба pro-IL-1 β Nrf2 уургийн экспресс буурсан харагдаж байна. (Зураг 2 A, B, C, D, E)

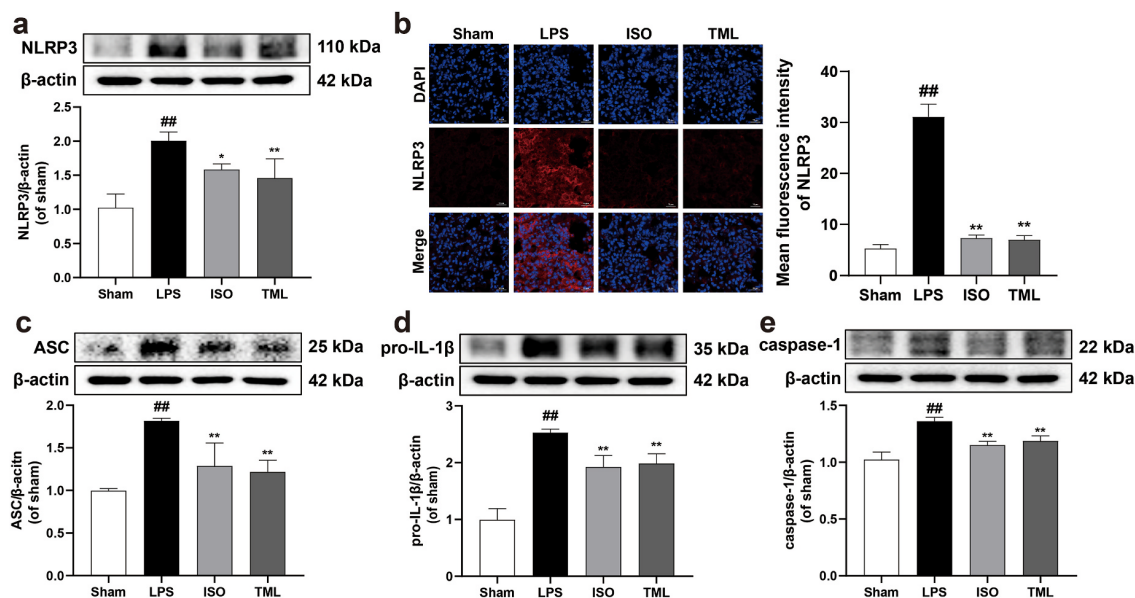


Fig. 2. ISO and TML inhibited NLRP3 inflammasome pathway. The effect of ISO on NLRP3 expression was determined via Western Blot (a) and immunofluorescence (b) experiments. Besides, the expression changes of ASC (c), pro-IL-1 β (d), caspase-1 (e) were also analyzed using western blot. Results were presented as mean $\pm$ SD. ## p < 0.01 vs. Sham group, * p < 0.05, ** p < 0.01 vs. LPS group. n = 3.

Дүгнэлт: ЛПС үүсгэгдсэн уушгины хурц гэмтлийн үед Изоориентин Keap1/Nrf2-HO-1 дохионы замд нөлөөлж антиоксидант, NLRP3 инфламмасом дохионы замд нөлөөлж үрэвслийн эрсэг үйлдэл үзүүлдэг болох нь батлагдаж байна.

Хэлцэмж:

Keap1-Nrf2 дохионы зам нь исэлдэлтийн стрессээс хамгаалах үндсэн механизм гэж үздэг. Янз бүрийн үрэвслийн үед бие махбодид Nrf2 экспресс буурч, Keap1 экспресс нэмэгдэж антиоксидант баланс алдагдаж эд эсийг гэмтээдэг.^{16,10} Мөн Nrf2-ээр зохицуулагддаг ген болох HO-1 төмрийн ион, биливердины задрах урвалыг хурдасгадаг. Биливердин нь исэлдэлтийн эсрэг тул HO-1-ийн транскрипци нь исэлдэлтийн гэмтлээс эд эсийг хамгаалах системийг эхлүүлдэг

гэж үздэг.¹⁷ ЛПС нөлөөгөөр Keap1/Nrf2 дохионы замыг дарангуйлагддаг тиймээс ЛПС өдөөгдсөн уушгины хурц гэмтлийн үед энэ дохионы замыг дэмжих нь эдэсийг исэлдэлтийн гэмтлээс хамгаалж байдаг. Бидний судалгаагаар Изоориентин энэ дохионы замыг идэвхжүүлж байна.

NLRP3 инфламмасом дохионы зам бактери, нян болон хүрээлэн буй орчны халдварын үед үрэвслийн хариу урвалыг эхлүүлж, үрэвслийг эрчимжүүлэх цитокинуудын ялгаралтыг хурдасгадаг төрөлхийн дархлаа тогтолцоо юм.¹⁸

ЛПС нөлөөгөөр NLRP3 инфламмасом дохионы зам идэвхжиж үрэвслийн процессыг эхлүүлдэг. Бидний судалгаагаар ЛПС өдөөгдсөн уушгины хурц гэмтлийн үед Изоориентин энэ дохионы замын уургийн экспрессыг дарангуйлж байсан.

Ном зүй:

1. Domscheit, H., Hegeman, M.A., Carvalho, N., Spieth, P.M., 2020. Molecular dynamics of lipopolysaccharide-induced lung injury in rodents. *Front. Physiol.* 11, 36. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00036>.
2. Kumar, V., 2020. Pulmonary innate immune response determines the outcome of inflammation during pneumonia and sepsis-associated acute lung injury. *Front. Immunol.* 11, 1722. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01722>.
3. Lin, S., Wu, H., Wang, C., Xiao, Z., Xu, F., 2018. Regulatory T cells and acute lung injury: cytokines, uncontrolled inflammation, and therapeutic implications. *Front. Immunol.* 9, 1545. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01545>.
4. Nova, Z., Skovierova, H., Calkovska, A., 2019. Alveolar-capillary membrane-related pulmonary cells as a target in endotoxin-induced acute lung injury. *Int. J. Mol. Sci.* 20 <https://doi.org/10.3390/ijms20040831>.
5. He, Y., Hara, H., Nunez, G., 2016. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends Biochem. Sci.* 41, 1012–1021. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.002>
6. Jo, E.K., Kim, J.K., Shin, D.M., Sasakawa, C., 2016. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell. Mol. Immunol.* 13, 148–159. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.95>.
7. Mangan, M.S.J., Olhava, E.J., Roush, W.R., Seidel, H.M., Glick, G.D., Latz, E., 2018. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 17, 588–606. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.97>.
8. Wang, L., Hauenstein, A.V., 2020. The NLRP3 inflammasome: mechanism of action, role in disease and therapies. *Mol. Aspect. Med.* 76, 100889. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100889>.
9. Sarma, J.V., Ward, P.A., 2011. Oxidants and redox signaling in acute lung injury. *Compr. Physiol.* 1, 1365–1381. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100068>.
10. Bellezza, I., Giambanco, I., Minelli, A., Donato, R., 2018. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1865, 721–733. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.02.010>
11. Liu, Q., Gao, Y., Ci, X., 2019. Role of Nrf2 and its activators in respiratory diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 7090534. <https://doi.org/10.1155/2019/7090534>
12. Mushtaq, S., Rather, M.A., Qazi, P.H., Aga, M.A., Shah, A.M., Shah, A., Ali, M.N., 2016. Isolation and characterization of three benzyloisoquinoline alkaloids from *Thalictrum minus* L. and their antibacterial activity against bovine mastitis. *J. Ethnopharmacol.* 193, 221–226. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.040>
13. Badamjav, R., Zhang, L., Sonom, D., Wu, Y.H., Kou, J.P., Yu, B.Y., Li, F., 2021. *Thalictrum minus* L. ameliorates particulate matter-induced acute lung injury in mice. *J. Ethnopharmacol.* 264, 113379. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113379>
14. Ziqubu, K., Dlodla, P.V., Joubert, E., Muller, C.J.F., Louw, J., Tiano, L., Nkambule, B.B., Kappo, A.P., Mazibuko-Mbeje, S.E., 2020. Isoorientin: a dietary flavone with the potential to ameliorate diverse metabolic complications. *Pharmacol. Res.* 158, 104867. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104867>
15. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
16. Baird, L., Yamamoto, M., 2020. The molecular mechanisms regulating the KEAP1-NRF2 pathway. *Mol. Cell Biol.* 40 <https://doi.org/10.1128/MCB.00099-20>.
17. Ryter, S.W., 2019. Heme oxygenase-1/carbon monoxide as modulators of autophagy and inflammation. *Arch. Biochem. Biophys.* 678, 108186. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.108186>.
18. Swanson, K.V., Deng, M., Ting, J.P., 2019. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* 19, 477–489. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>.

УНШИН ТАНИЛЦАЖ, НИЙТЛЭХ САНАЛ ӨГСӨН:
АУ-Ы ДОКТОР, ДЭД ПРОФЕССОР П.БАТХУЯА