

• 论著 •

银杏叶提取物对小鼠脓毒症急性肺损伤的作用及机制研究

韦小要 韦雅婷 肖欢 李超乾

广西医科大学第一附属医院急诊科,广西壮族自治区南宁 530021

通信作者:李超乾, Email: 2534776680@qq.com

【摘要】目的 探讨银杏叶提取物(EGB761)对小鼠脓毒症急性肺损伤(ALI)的作用及其机制。**方法** 选择 50 只雄性昆明小鼠,按随机数字表法分为假手术组(术后腹腔注射等量生理盐水)、模型组(术后腹腔注射等量生理盐水)、低剂量 EGB761 组(术后立即腹腔注射 20 mg/kg EGB761)、高剂量 EGB761 组(术后立即腹腔注射 50 mg/kg EGB761)和高剂量 EGB761+核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)抑制剂 ML385 组(于制模前 1 h 腹腔注射 ML385 30 mg/kg,术后立即腹腔注射 50 mg/kg EGB761),每组 10 只。采用盲肠结扎穿孔术(CLP)复制脓毒症 ALI 模型,假手术组只进行开关腹手术。术后 12 h 取血清及肺组织,苏木素 - 伊红(HE)染色后光镜下观察肺组织病理学变化,并进行肺损伤评分;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组小鼠血清中白细胞介素(IL-6、IL-1 β)和肿瘤坏死因子 - α (TNF- α)水平;采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)和实时荧光定量反转录 - 聚合酶链反应(qRT-PCR)检测各组小鼠肺组织中谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)、Nrf2、溶质载体家族 7 成员 11(SLC7A11)的蛋白表达和 Nrf2、GPX4 mRNA 表达水平;采用硫代巴比妥酸法检测各组小鼠肺组织中丙二醛(MDA)含量;采用黄嘌呤氧化酶法检测各组小鼠肺组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性。**结果** 与假手术组比较,模型组肺组织中有大量炎症细胞浸润、肺泡结构破坏,肺损伤评分明显升高(分: 3.71 ± 0.29 比 0.33 ± 0.10),血清促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和肺组织中氧化指标 MDA 含量均明显升高[IL-1 β (ng/L): 0.410 ± 0.002 比 0.351 ± 0.007 , IL-6 (ng/L): 0.650 ± 0.010 比 0.560 ± 0.010 , TNF- α (ng/L): 0.320 ± 0.010 比 0.290 ± 0.002 , MDA (nmol/mg): 2.49 ± 0.31 比 1.77 ± 0.02 , 均 $P < 0.05$],而肺组织中抗氧化指标 SOD 活性明显下降(U/mg: 20.20 ± 4.61 比 61.47 ± 8.10 , $P < 0.05$),Nrf2、GPX4、SLC7A11 蛋白和 GPX4、Nrf2 mRNA 表达水平亦均明显下降[Nrf2 蛋白表达(Nrf2/ β -actin): 0.33 ± 0.11 比 0.63 ± 0.17 , GPX4 蛋白表达(GPX4/ β -actin): 1.19 ± 0.08 比 2.50 ± 0.17 , SLC7A11 蛋白表达(SLC7A11/ β -actin): 0.41 ± 0.03 比 0.67 ± 0.08 ; GPX4 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 0.32 ± 0.00 比 1.02 ± 0.21 , Nrf2 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 0.44 ± 0.04 比 1.01 ± 0.20 , 均 $P < 0.05$]。与模型组比较,低剂量 EGB761 组和高剂量 EGB761 组肺损伤程度均有不同程度减轻,高剂量 EGB761 组肺损伤评分明显降低(分: 0.96 ± 0.40 比 3.71 ± 0.29 , $P < 0.05$),肺组织中 MDA 含量和血清促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量均明显降低[MDA(nmol/mg): 1.53 ± 0.09 比 2.49 ± 0.31 , IL-1 β (ng/L): 0.350 ± 0.004 比 0.410 ± 0.002 , IL-6 (ng/L): 0.570 ± 0.020 比 0.650 ± 0.010 , TNF- α (ng/L): 0.280 ± 0.003 比 0.320 ± 0.010 , 均 $P < 0.05$],SOD 活性、Nrf2、GPX4、SLC7A11 的蛋白表达和 GPX4、Nrf2 mRNA 表达水平均明显升高[SOD 活性(U/mg): 63.78 ± 8.74 比 20.20 ± 4.61 , Nrf2 蛋白表达(Nrf2/ β -actin): 0.71 ± 0.06 比 0.33 ± 0.11 , GPX4 蛋白表达(GPX4/ β -actin): 2.03 ± 0.10 比 1.19 ± 0.08 , SLC7A11 蛋白表达(SLC7A11/ β -actin): 0.65 ± 0.07 比 0.41 ± 0.03 ; GPX4 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 0.80 ± 0.10 比 0.32 ± 0.00 , Nrf2 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 0.84 ± 0.07 比 0.44 ± 0.04 , 均 $P < 0.05$]。与高剂量 EGB761 组比较,用 Nrf2 抑制剂 ML385 干预后可明显逆转高剂量 EGB761 的上述作用。**结论** 银杏叶提取物 EGB761 可改善 CLP 诱导的小鼠脓毒症 ALI,并可能是通过激活 Nrf2 上调 SLC7A11 抑制铁死亡从而发挥保护作用。

【关键词】 银杏叶提取物; 核因子 E2 相关因子 2; 铁死亡; 急性肺损伤

基金项目: 国家自然科学基金(82360024)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2025.04.004

Effect and mechanism of Ginkgo biloba extract on acute lung injury induced by sepsis in mice

Wei Xiaoshua, Wei Yating, Xiao Hua, Li Chaoqian

Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author: Li Chaoqian, Email: 2534776680@qq.com

【Abstract】Objective To investigate the effect and mechanism of Ginkgo biloba extract (EGB761) on acute lung injury (ALI) induced by sepsis in mice. **Methods** Fifty male Kunming mice were selected, they were randomly divided into sham operation group (intraperitoneal injection of equal amount of normal saline after operation), model group (intraperitoneal injection of equal amount of normal saline after operation), low-dose EGB761 group (intraperitoneal injection of 20 mg/kg EGB761 immediately after operation) and high-dose EGB761 group (intraperitoneal injection of 50 mg/kg EGB761 immediately after operation) and high-dose EGB761+nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)

inhibitor ML385 group (intraperitoneal injection of ML385 30 mg/kg 1 hour before modeling and 50 mg/kg EGB761 immediately after operation), with 10 mice in each group. ALI model of sepsis was established by cecal ligation and puncture (CLP), and the sham operation group only underwent open-closed abdominal surgery. Serum and lung tissue were taken at 12 hours after operation, and the pathological changes of lung tissue were observed under light microscope after hematoxylin-eosin (HE) staining, and the lung injury score was made. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of interleukin (IL-6, IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum of mice in each group. Western blotting test and real-time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) were used to detect the protein expression levels of glutathione peroxidase 4 (GPX4), Nrf2, member 11 of solute carrier family 7 (SLC7A11) and the mRNA expression levels of Nrf2 and GPX4 mRNA in the lung tissues of mice in each group. The content of malondialdehyde (MDA) in the lung tissues of mice in each group was detected by the thiobarbituric acid method. The activity of superoxide dismutase (SOD) in the lung tissues of mice in each group was detected by xanthine oxidase method. **Results** Compared with the sham operation group, in the model group, a large number of inflammatory cells infiltrated in the lung tissue, the alveolar structure was destroyed, the lung injury score was significantly increased (3.71 ± 0.29 vs. 0.33 ± 0.10), and serum pro-inflammatory factors IL-1 β , IL-6, TNF- α and the content of oxidation index MDA in lung tissue all increased significantly [IL-1 β (ng/L): 0.410 ± 0.002 vs. 0.351 ± 0.007 , IL-6 (ng/L): 0.650 ± 0.010 vs. 0.560 ± 0.010 , TNF- α (ng/L): 0.320 ± 0.010 vs. 0.290 ± 0.002 , MDA (nmol/mg): 2.49 ± 0.31 vs. 1.77 ± 0.02 , all $P < 0.05$], while SOD activity in lung tissue decreased significantly (U/mg: 20.20 ± 4.61 vs. 61.47 ± 8.10 , $P < 0.05$), the expression levels of Nrf2, GPX4, SLC7A11 protein, GPX4, and Nrf2 mRNA all decreased [NRF2 protein expression (Nrf2/ β -actin): 0.33 ± 0.11 vs. 0.63 ± 0.17 , GPX4 protein expression (GPX4/ β -actin): 1.19 ± 0.08 vs. 2.50 ± 0.17 , SLC7A11 protein expression (SLC7A11/ β -actin): 0.41 ± 0.03 vs. 0.67 ± 0.08 ; GPX4 mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$): 0.32 ± 0.00 vs. 1.02 ± 0.21 , NRF2 mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$): 0.44 ± 0.04 vs. 1.01 ± 0.20 , all $P < 0.05$]. Compared with the model group, the degree of lung injury in the low-dose EGB761 group and the high-dose EGB761 group was reduced to varying degrees, and the lung injury score in the high-dose EGB761 group was significantly reduced (0.96 ± 0.40 vs. 3.71 ± 0.29 , $P < 0.05$). The contents of MDA in lung tissue and serum proinflammatory factors IL-1 β , IL-6 and TNF- α were significantly decreased [MDA (nmol/mg): 1.53 ± 0.09 vs. 2.49 ± 0.31 , IL-1 β (ng/L): 0.350 ± 0.004 vs. 0.410 ± 0.002 , TNF- α (ng/L): 0.280 ± 0.003 vs. 0.320 ± 0.010 , all $P < 0.05$], SOD activity, proteins of Nrf2, GPX4 and SLC7A11, and expression levels of GPX4 and Nrf2 mRNA all increased significantly [SOD activity (U/mg): 63.78 ± 8.74 vs. 20.20 ± 4.61 , the expression of Nrf2 protein (NRF2/ β -actin): 0.71 ± 0.06 vs. 0.33 ± 0.11 , the expression of GPX4 protein (GPX4/ β -actin): 2.03 ± 0.10 vs. 1.19 ± 0.08 , and the expression of SLC7A11 protein (SLC7A11/ β -actin): 0.65 ± 0.07 vs. 0.41 ± 0.03 ; GPX4 mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$): 0.80 ± 0.10 vs. 0.32 ± 0.00 , NRF2 mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$): 0.84 ± 0.07 vs. 0.44 ± 0.04 , all $P < 0.05$]. Compared with high-dose EGB761 group, Nrf2 inhibitor ML385 can obviously reverse the above-mentioned effects of high-dose EGB761 after intervention. **Conclusion** Ginkgo biloba extract EGB761 can improve the sepsis ALI induced by CLP in mice, and it may play a protective role by activating Nrf2 and up-regulating SLC7A11 to inhibit ferroptosis.

【Key words】 Ginkgo biloba extract; Nuclear factor E2-related factor 2; Ferroptosis; Acute lung injury

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82360024)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2025.04.004

脓毒症是临幊上一种常见的急危重症,是宿主因感染所致的免疫反应调节失衡,从而导致的器官功能障碍^[1]。脓毒症是全球范围内常见危重疾病和死亡的主要原因,同时也是造成患者住院死亡的主要原因^[2]。脓毒症常易累及肺脏,可发展为急性肺损伤(acute lung injury, ALI)^[3],且脓毒症导致ALI使患者的病死率增高^[4]。

虽然已有研究阐明 ALI 的病理生理学机制及新的治疗策略,但病死率仍可高达 30%~40%,且生存质量受到严重影响^[5]。因此,探寻治疗 ALI 的新药对临幊有极为重要的价值。从银杏叶中所提取出的金纳多(Ginkgo biloba extract 761, EGB761)由银杏黄酮苷、萜类化合物和有机酸等成分组成^[6-7],具有扩张血管、清除自由基、调节血脂、抗炎、抗肿瘤等作用^[8-10]。有研究显示, EGB761 对脂多糖诱

导的 ALI 大鼠具有抗炎作用,可能与提高抗氧化能力有关^[11]。本课题组前期的研究显示, EGB761 对百草枯中毒患者的疗效显著^[12],而百草枯中毒死亡的原因主要是 ALI,但其机制尚未明确。因此,本研究采用盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP)复制脓毒症 ALI 小鼠模型,旨在探讨 EGB761 对脓毒症 ALI 小鼠肺组织的保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物: 选择 5 周龄雄性无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级昆明小鼠,质量(25 ± 3)g,购于广西医科大学动物实验中心。

1.2 主要试剂: 兔抗谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)、核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)、溶质载体家族 7 成员 11(memeber 11 of solute carrier family 7,

SLC7A11) 抗体均购于成都正能生物技术有限公司, 兔抗 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体购于美国 CST 生物科技公司; Nrf2 特异性抑制剂 ML385 购于美国 MCE 公司; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 测定试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒均购于南京建成生物工程研究所有限公司; 白细胞介素 (interleukins, IL-6、IL-1 β)、肿瘤坏死因子 - α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒购自江苏酶免实业有限公司; 银杏叶提取物 EGB761 购自悦康药业集团有限公司。

1.3 脓毒症 ALI 小鼠模型构建及实验分组: 采用 CLP 构建脓毒症诱导的 ALI 模型。将 50 只小鼠按随机数字表法分为 5 组, 每组 10 只。模型组、低剂量 EGB761 治疗组 (给予 20 mg/kg EGB761)、高剂量 EGB761 治疗组 (给予 50 mg/kg EGB761)、高剂量 EGB761+Nrf2 抑制剂组 (给予 50 mg/kg EGB761+30 mg/kg ML385)、假手术组 (仅单纯将盲肠暴露)。ML385 于术前 1 h 腹腔注射 1 次, EGB761 于术后立即腹腔注射 1 次, 模型组和假手术组给予等量的生理盐水。术后 12 h 用戊巴比妥钠麻醉处死小鼠, 收集标本。

1.4 伦理学: 本研究中动物的处置方法符合动物伦理学标准, 并经本院动物伦理委员会批准 (审批号: 202404042)。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 肺组织病理学变化观察: 取各组小鼠肺组织, 行苏木素 - 伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色后, 于光镜下观察肺组织的病理学变化, 同时对肺组织损伤程度进行评分, 根据文献 [13] 中的评分系统对肺炎症细胞浸润、肺泡充血、肺水肿、肺泡壁厚度及透明膜形成进行半定量评分, 评分范围 0~4 分, 评分标准: 0 分为无损伤或大致正常肺组织, 1 分为病变范围 < 25%, 2 分为病变范围 25%~50%, 3 分为病变范围 > 50%~75%, 4 分为病变范围 > 75%。

1.5.2 采用蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测各组小鼠肺组织中 GPX4、Nrf2 及 SLC7A11 的蛋白表达水平: 处死小鼠后取肺组织, 用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法测定蛋白浓度。将制备好的肺组织蛋白样品进行电泳分离, 转膜, 封闭, 然后加入一抗 [GPX4、Nrf2、SLC7A11、 β -actin 内参抗体 (1:1000)] 经 4 °C 恒温孵育过夜后, 用洗涤液充分洗涤膜, 接着将配好的二抗滴加在膜上, 并

在室温条件下孵育 1 h。采用 Odyssey system 扫膜, Image J 软件检测蛋白质条带灰度值, 以目的蛋白与 β -actin 的比值表示各个目标蛋白的表达水平。

1.5.3 采用 ELISA 检测各组小鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平: 术后 12 h 将小鼠麻醉后摘除眼球取血, 离心后取血清, 采用 ELISA 检测各组小鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平, 操作严格按试剂盒说明书进行, 并绘制标准曲线。

1.5.4 采用硫代巴比妥酸法、黄嘌呤氧化酶法分别检测小鼠肺组织中 MDA、SOD 水平: 取适量的肺组织进行研磨、离心, 取上清液, 采用硫代巴比妥酸法、黄嘌呤氧化酶法分别检测小鼠肺组织中 MDA 和 SOD 含量, 操作严格按试剂盒说明书进行。

1.5.5 采用实时荧光定量反转录 - 聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测各组小鼠肺组织中 GPX4、Nrf2 的 mRNA 表达水平: 取各组小鼠一定量的肺组织, 使用 TRIzol 试剂提取法提取肺组织总 RNA, 再将提取到的 RNA 按照反转录试剂盒说明书进行操作, 获得 cDNA 并对目标片段进行 PCR 扩增。然后以 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 作为内参照, 采用 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 相对定量法计算所得到的 Ct 值, 最后得出每组目标 mRNA 的相对表达水平。

1.6 统计学方法: 使用 GraphPad Prism 9.0.0 处理数据, 符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间的比较则采用单因素方差分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

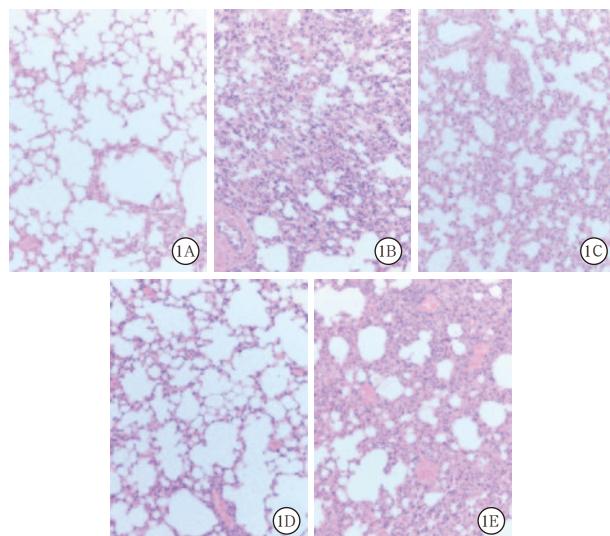
2 结果

2.1 各组小鼠肺组织病理学观察及肺损伤评分比较 (图 1; 表 1): 光镜下可见, 假手术组小鼠肺泡结构呈现清晰、完整, 模型组肺组织被大量炎症细胞所浸润、肺泡结构破坏、肺泡间隔增厚, 肺损伤评分明显高于假手术组组 ($P < 0.01$) ; 与模型组比较, 低剂量 EGB761 和高剂量 EGB761 组肺组织病理学改变有不同程度缓解, 炎症细胞浸润程度减轻, 肺损伤评分明显降低 (均 $P < 0.05$) ; 与高剂量 EGB761 组比较, 低剂量 EGB761 组和高剂量 EGB761+ML385 组肺损伤评分均明显升高 (均 $P < 0.05$)。

2.2 银杏叶提取物对脓毒症 ALI 小鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量的影响 (表 1): 与假手术组比较, 模型组小鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平均显

著升高(均 $P < 0.05$)；与模型组比较,低剂量和高剂量 EGB761 组小鼠血清 IL-6、IL-1 β 水平均明显降低(均 $P < 0.05$),TNF- α 差异无统计学意义($P > 0.05$),以高剂量 EGB761 组小鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平降低效果更明显(均 $P < 0.05$)；与高剂量 EGB761 组比较,低剂量 EGB761 组小鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平均升高明显,高剂量 EGB761+ML385 组小鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平亦均明显升高(均 $P < 0.05$)。

2.3 银杏叶提取物对脓毒症 ALI 小鼠肺组织中 GPX4、SLC7A11、Nrf2 蛋白表达水平的影响(图 2; 表 2):与假手术组比较,模型组 GPX4、SLC7A11、



注:A为假手术组,B为模型组,C为低剂量EGB761治疗组,D为高剂量EGB761治疗组,E为高剂量EGB761+ML385组

图1 各组小鼠肺组织病理学观察 HE 染色 中倍放大

表1 各组小鼠肺损伤评分以及血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 动物数 (只) | 肺损伤评分 (分) | IL-1 β (ng/L) |
|--------------------|------------|--------------------------|---------------------------|
| 假手术组 | 10 | 0.33±0.10 | 0.351±0.007 |
| 模型组 | 10 | 3.71±0.29 ^a | 0.410±0.002 ^a |
| 低剂量 EGB761 组 | 10 | 3.12±0.26 ^{ab} | 0.400±0.002 ^{ab} |
| 高剂量 EGB761 组 | 10 | 0.96±0.40 ^{abc} | 0.350±0.004 ^b |
| 高剂量 EGB761+ML385 组 | 10 | 3.67±0.30 ^{ad} | 0.410±0.001 ^{ad} |

| 组别 | 动物数 (只) | IL-6 (ng/L) | TNF- α (ng/L) |
|--------------------|------------|---------------------------|---------------------------|
| 假手术组 | 10 | 0.560±0.010 | 0.290±0.002 |
| 模型组 | 10 | 0.650±0.010 ^a | 0.320±0.010 ^a |
| 低剂量 EGB761 组 | 10 | 0.620±0.010 ^{ab} | 0.310±0.002 ^{ab} |
| 高剂量 EGB761 组 | 10 | 0.570±0.020 ^{bc} | 0.280±0.003 ^{bc} |
| 高剂量 EGB761+ML385 组 | 10 | 0.640±0.003 ^{ad} | 0.310±0.001 ^{ad} |

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与低剂量 EGB761 组比较,^c $P < 0.05$;与高剂量 EGB761 组比较,^d $P < 0.05$

Nrf2 的蛋白表达水平均明显降低(均 $P < 0.05$)；与模型组比较,低剂量 EGB761 组 GPX4 的蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$),Nrf2、SLC7A11 蛋白表达水平差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),高剂量 EGB761 组 GPX4、SLC7A11、Nrf2 的蛋白表达均明显升高($P < 0.01$)；与高剂量 EGB761 组比较,低剂量 EGB761 组 Nrf2、GPX4 的蛋白表达水平均明显降低(均 $P < 0.05$),SLC7A11 蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$),高剂量 EGB761+ML385 组 GPX4、SLC7A11、Nrf2 的蛋白表达水平均明显降低(均 $P < 0.05$)。

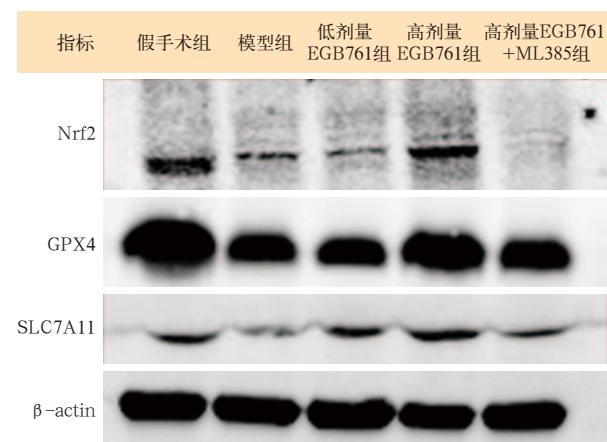


图2 Western blotting 检测各组小鼠肺组织中 GPX4、Nrf2、SLC7A11 的蛋白表达水平

表2 各组小鼠肺组织中 Nrf2、GPX4、SLC7A11 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 动物数 (只) | 蛋白表达 | | |
|--------------------|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | Nrf2/ β -actin | GPX4/ β -actin | SLC7A11/ β -actin |
| 假手术组 | 10 | 0.63±0.17 | 2.50±0.17 | 0.67±0.08 |
| 模型组 | 10 | 0.33±0.11 ^a | 1.19±0.08 ^a | 0.41±0.03 ^a |
| 低剂量 EGB761 组 | 10 | 0.29±0.02 ^a | 1.66±0.17 ^{ab} | 0.51±0.00 ^a |
| 高剂量 EGB761 组 | 10 | 0.71±0.06 ^{bc} | 2.03±0.10 ^{ab} | 0.65±0.07 ^b |
| 高剂量 EGB761+ML385 组 | 10 | 0.20±0.04 ^{ad} | 1.45±0.25 ^{ad} | 0.36±0.03 ^{ad} |

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,与低剂量 EGB761 组比较,^c $P < 0.05$;与高剂量 EGB761 组比较,^d $P < 0.05$

2.4 银杏叶提取物对脓毒症 ALI 小鼠肺组织氧化应激水平的影响(表 3):与假手术组比较,模型组 MDA 含量明显升高,SOD 活性明显下降(均 $P < 0.05$)；与模型组比较,低剂量 EGB761 组小鼠 MDA 含量和 SOD 活性比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),高剂量 EGB761 组 MDA 含量明显降低,SOD 活性明显升高(均 $P < 0.05$),说明小鼠抗氧化能力显著增强；与高剂量 EGB761 组比较,低剂量 EGB761

组小鼠 MDA 水平明显升高, SOD 活性明显下降, 高剂量 EGB761+ML385 组 MDA 含量明显升高, SOD 活性明显降低(均 $P < 0.05$)。

表 3 各组小鼠肺组织中 SOD、MDA 的比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 动物数 (只) | SOD 活性 (U/mg) | MDA 含量 (nmol/mg) |
|--------------------|------------|-----------------------------|---------------------------|
| 假手术组 | 10 | 61.47 ± 8.10 | 1.77 ± 0.02 |
| 模型组 | 10 | 20.20 ± 4.61 ^a | 2.49 ± 0.31 ^b |
| 低剂量 EGB761 组 | 10 | 36.47 ± 7.02 ^a | 2.83 ± 0.19 ^a |
| 高剂量 EGB761 组 | 10 | 63.78 ± 8.74 ^{bc} | 1.53 ± 0.09 ^{bc} |
| 高剂量 EGB761+ML385 组 | 10 | 35.55 ± 14.55 ^{ad} | 2.37 ± 0.32 ^{ad} |

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与低剂量 EGB761 组比较,^c $P < 0.05$;与高剂量 EGB761 组比较,^d $P < 0.05$

2.5 银杏叶提取物对脓毒症 ALI 小鼠肺组织中 GPX4 和 Nrf2 mRNA 表达水平的影响(表 4):与假手术组比较,模型组小鼠肺组织中 GPX4 和 Nrf2 的 mRNA 表达水平平均明显降低(均 $P < 0.05$);与模型组比较,低剂量 EGB761 组小鼠肺组织中 GPX4 和 Nrf2 的 mRNA 表达水平差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),高剂量 EGB761 组小鼠肺组织中 GPX4 和 Nrf2 的 mRNA 表达水平平均明显升高(均 $P < 0.05$);与高剂量 EGB761 组比较,低剂量 EGB761 组和高剂量 EGB761+ML385 组小鼠肺组织中 GPX4 和 Nrf2 的 mRNA 表达水平平均明显降低(均 $P < 0.05$)。

表 4 各组小鼠肺组织中 GPX4 和 Nrf2 mRNA 表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 动物数 (只) | GPX4 mRNA ($2^{-\Delta Ct}$) | Nrf2 mRNA ($2^{-\Delta Ct}$) |
|--------------------|------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 假手术组 | 10 | 1.02 ± 0.21 | 1.01 ± 0.20 |
| 模型组 | 10 | 0.32 ± 0.00 ^a | 0.44 ± 0.04 ^a |
| 低剂量 EGB761 组 | 10 | 0.31 ± 0.03 ^a | 0.40 ± 0.08 ^a |
| 高剂量 EGB761 组 | 10 | 0.80 ± 0.10 ^{bc} | 0.84 ± 0.07 ^{bc} |
| 高剂量 EGB761+ML385 组 | 10 | 0.19 ± 0.04 ^{ad} | 0.36 ± 0.06 ^{ad} |

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与低剂量 EGB761 组比较,^c $P < 0.05$;与高剂量 EGB761 组比较,^d $P < 0.05$

3 讨 论

ALI 是机体在脓毒症、创伤、重症急性胰腺炎和误吸等常见肺损伤致病因素刺激下诱发^[14],肺血管内皮细胞和肺泡上皮细胞损伤,随之造成的急性低氧性呼吸功能不全甚至是呼吸衰竭。已有研究表明,在 ALI 的发展过程铁死亡也参与其中并占据一定的地位^[15-16]。在 ALI 的病理生理改变中,肺泡上皮细胞会被各种过多释放出的活性氧及产生的自由基所

损伤。在芬顿反应中,作为亚铁离子而存在于氧化还原循环中的铁能够与过氧化氢反应产生自由基,所以铁超载就会促进更多自由基的产生^[17],对细胞的毒性和破坏性也会增加,ALI 的发生发展也因而被进一步推进。铁死亡是铁依赖性脂质过氧化物所诱导的一种细胞死亡方式^[18],不同于发生凋亡和其他形式的细胞死亡。细胞在发生铁死亡的过程中相互作用的酶和蛋白质,如 GPX4、SLC7A11 受一些基因的调节,这些基因与脂质代谢、铁稳定和抗氧化有关,如 Nrf2 因子。GPX4 通常会去除与铁诱导相关的脂质过氧化产物,保护细胞膜不被这类产物损伤。当 GPX4 被抑制、降解或失活时,使得需要通过 GPX4 催化的谷胱甘肽还原酶反应不能有效代谢脂质过氧化物,造成细胞内过氧化物逐渐积累,从而诱发细胞铁死亡^[19]。故 GPX4 可作为铁死亡的核心调控因子及判断细胞铁死亡发生的指标之一^[20]。在调节抗氧化反应中被视为一个关键因子的 Nrf2,其下游的许多靶标如 SLC7A11、GPX4 都参与预防或纠正细胞中的氧化还原失衡,在脂质代谢和铁死亡等途径中起到非常重要的作用^[21]。很多关键的抗铁死亡途径部分都受 Nrf2 的转录控制。Nrf2 和 GPX4 是 ALI 中铁死亡发生发展的关键位点, Nrf2 激活能使 GPX4 及 SLC7A11 的表达水平升高^[22]。

在对 ALI 的研究中,中药相关的研究也占据了相当的比重,发现多种中草药对 ALI 有较好的疗效^[23-25]。有悠久历史的中药银杏叶,其提取物 EGB761 在脓毒症相关性器官损伤、铁死亡中也被广泛研究。本实验的目的是为了探讨在脓毒症所致 ALI 中 EGB761 如何起到保护作用。

MDA 是脂质过氧化物的产物,SOD 是机体重要的抗氧化酶^[26]。本研究结果显示,模型组小鼠肺组织 SOD 活性下降,同时 Nrf2、GPX4、SLC7A11 的蛋白表达均降低,MDA、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平均明显升高,提示小鼠肺组织出现了炎症反应和铁死亡。而与模型组比较,高剂量 EGB761 组肺损伤评分降低,肺组织中 SOD 活性、Nrf2、GPX4、SLC7A11 的蛋白及 Nrf2、GPX4 mRNA 表达均显著上调,MDA、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平均明显下降,提示 EGB761 可通过逆转 SOD 抗氧化酶活性的降低和 MDA 生成量的减少,调节氧化应激水平、抑制铁死亡并缓解炎症反应以保护脓毒症 ALI。而与高剂量 EGB761 组比较,用 ML385 抑制 Nrf2 表达后,逆转了上述 EGB761 对小鼠脓毒症 ALI 的改善作用。提

示 EGB761 可能是通过激活 Nrf2、上调 SLC7A11、抑制铁死亡进而对脓毒症引起的 ALI 起到一定程度保护作用,减轻其损伤程度。

综上所述,本研究显示,银杏叶提取物 EGB761 可改善 CLP 诱导的小鼠脓毒症 ALI,并可能是通过激活 Nrf2、上调 SLC7A11、抑制铁死亡从而发挥保护作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lelubre C, Vincent JL. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis [J]. Nat Rev Nephrol, 2018, 14 (7): 417–427. DOI: 10.1038/s41581-018-0005-7.
- [2] Hall MJ, Levant S, DeFrances CJ. Trends in inpatient hospital deaths: national hospital discharge survey, 2000–2010 [J]. NCHS Data Brief, 2013 (118): 1–8.
- [3] Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021 [J]. Crit Care Med, 2021, 49 (11): e1063–e1143. DOI: 10.1097/CCM.0000000000005337.
- [4] 彭佐州,石晓卉.脓毒症并发 ARDS 的研究进展 [J].临床医学进展,2023,13(11):17720–17727. DOI: 10.12677/ACM.2023.13112485.
- [5] Meyer NJ, Gattinoni L, Calfee CS. Acute respiratory distress syndrome [J]. Lancet, 2021, 398 (10300): 622–637. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00439-6.
- [6] Ude C, Schubert-Zsilavecz M, Wurglies M. Ginkgo biloba extracts: a review of the pharmacokinetics of the active ingredients [J]. Clin Pharmacokinet, 2013, 52 (9): 727–749. DOI: 10.1007/s40262-013-0074-5.
- [7] Weber M, Dietrich D, Gräsel I, et al. 6-Hydroxykynurenic acid and kynurenic acid differently antagonise AMPA and NMDA receptors in hippocampal neurones [J]. J Neurochem, 2001, 77 (4): 1108–1115. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2001.00340.x.
- [8] 王淑静,袁天宇,张家宁.银杏叶提取物及其活性成分改善认知功能作用的研究进展 [J].天然产物研究与开发,2018,30(10):1819–1824. DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.10.027.
- [9] 夏江,姜京京,王晓玲,等.银杏叶提取物抗炎活性成分及作用机制研究进展 [J].药学研究,2024,43(5):473–479. DOI: 10.13506/j.cnki.jpr.2024.05.011.
- [10] Chan PC, Xia QS, Fu PP. Ginkgo biloba leave extract: biological, medicinal, and toxicological effects [J]. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev, 2007, 25 (3): 211–244. DOI: 10.1080/10590500701569414.
- [11] 刘子宸,刘静,吴棣,等.银杏叶提取物注射液对脂多糖致大鼠急性肺损伤肺组织的保护作用 [J].安徽医学,2016,37(12):1474–1476. DOI: 10.3969/j.issn.1000-0399.2016.12.004.
- [12] 封广艺,梁小溪,李超乾,等.银杏叶提取物治疗百草枯中毒小鼠的初步观察 [J].临床急诊杂志,2015,16(5):369–372. DOI: 10.13201/j.issn.1009-5918.2015.05.012.
- [13] Mikawa K, Nishina K, Takao Y, et al. ONO-1714, a nitric oxide synthase inhibitor, attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rabbits [J]. Anesth Analg, 2003, 97 (6): 1751–1755. DOI: 10.1213/01.ANE.0000086896.90343.13.
- [14] Scozzi D, Liao FY, Krupnick AS, et al. The role of neutrophil extracellular traps in acute lung injury [J]. Front Immunol, 2022, 13: 953195. DOI: 10.3389/fimmu.2022.953195.
- [15] Liu X, Zhang JQ, Xie W. The role of ferroptosis in acute lung injury [J]. Mol Cell Biochem, 2022, 477 (5): 1453–1461. DOI: 10.1007/s11010-021-04327-7.
- [16] 顾艳利. STING 通过调控铁死亡参与 LPS 诱导的急性肺损伤 [D].南京:南京医科大学,2023.
- [17] Kajarabille N, Latunde-Dada GO. Programmed cell-death by ferroptosis: antioxidants as mitigators [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20 (19): 4968. DOI: 10.3390/ijms20194968.
- [18] 林艳凤,郑志远,陈滢,等.NRF2 核易位激活 SLC7A11 并抑制 SAS 诱导的 AML 细胞铁死亡 [J].中国病理生理杂志,2025,41(7):1289–1299. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2025.07.005.
- [19] Yu HT, Guo PY, Xie XZ, et al. Ferroptosis, a new form of cell death, and its relationships with tumourous diseases [J]. J Cell Mol Med, 2017, 21 (4): 648–657. DOI: 10.1111/jcmm.13008.
- [20] Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830 (5): 3289–3303. DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.11.020.
- [21] Dodson M, Castro-Portuguez R, Zhang DD. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis [J]. Redox Biol, 2019, 23: 101107. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101107.
- [22] Ma HD, Wang XD, Zhang WL, et al. Melatonin suppresses ferroptosis induced by high glucose via activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway in type 2 diabetic osteoporosis [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 906710. DOI: 10.1155/2020/906710.
- [23] 陆莎莎,王璐瑶,张新宇,等.血必净注射液抑制肺泡巨噬细胞焦亡改善脓毒症诱导的小鼠急性肺损伤 [J].中国中西医结合急救杂志,2023,30(4):418–423. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2023.04.007.
- [24] 马明明,李岩,朱委委,等.芹菜素对脂多糖致小鼠急性肺损伤的作用机制研究 [J].中国中西医结合急救杂志,2014,21(3):170–174. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.03.003.
- [25] 周莹,吴爽,柯慧娟,等.灯盏花素对脓毒症急性肺损伤患者的保护作用及机制研究 [J].中国中西医结合急救杂志,2022,29(3):288–291. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2022.03.007.
- [26] Huang CH, Yang ML, Tsai CH, et al. Ginkgo biloba leaves extract (EGB 761) attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibition of oxidative stress and NF-κB-dependent matrix metalloproteinase-9 pathway [J]. Phytomedicine, 2013, 20 (3–4): 303–309. DOI: 10.1016/j.phymed.2012.11.004.

(收稿日期:2024-08-15)

(责任编辑:邸美仙)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《中国中西医结合急救杂志》关于法定计量单位的写作要求

执行 GB 3100–1993《国际单位制及其应用》及 GB/T 3101/3102《有关量、单位和符号的一般原则 / (所有部分)量和单位》的有关规定,具体执行可参照中华医学会杂志社编写的《法定计量单位在医学上的应用》第3版(人民军医出版社 2001 年出版)。量的名称应根据 GB/T 3102.8–1993《物理化学和分子物理学的量和单位》规定使用,如分子量应为相对分子质量。计量单位使用正体。注意单位名称与单位符号不可混用,如: $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 应改为 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 组合单位符号中表示相除的斜线多于 1 条时应采用负数幂的形式表示,如: ng/kg/min 应采用 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式; 组合单位中斜线和负数幂亦不可混用,如前例不宜采用 $\text{ng/kg} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式。量的符号一律采用斜体字,如体积的符号 V 应为斜体。血压及人体压力计量单位使用毫米汞柱 (mmHg),在文中第一次出现时须注明 mmHg 与 kPa 的换算系数。