



中国免疫学杂志
Chinese Journal of Immunology
ISSN 1000-484X, CN 22-1126/R

《中国免疫学杂志》网络首发论文

题目： 黄芪甲苷调节 LRP1-pPyk2-MMP9 信号通路对支气管肺发育不良新生大鼠肺损伤的作用及机制研究
作者： 顾雪娟，贾真，王镇
网络首发日期： 2025-08-15
引用格式： 顾雪娟，贾真，王镇. 黄芪甲苷调节 LRP1-pPyk2-MMP9 信号通路对支气管肺发育不良新生大鼠肺损伤的作用及机制研究[J/OL]. 中国免疫学杂志.
<https://link.cnki.net/urlid/22.1126.R.20250815.1102.002>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

黄芪甲苷调节 LRP1-pPyk2-MMP9 信号通路对支气管肺发育不良新生大鼠肺损伤的作用及机制研究

顾雪娟 贾真 王镇

苏州市中西医结合医院新生儿科，江苏苏州 215100

中图分类号 R722.19

【摘要】目的：研究黄芪甲苷（AS-IV）调节低密度脂蛋白受体相关蛋白 1（LRP1）-磷酸化酪氨酸激酶 2（pPyk2）-基质金属蛋白酶 9（MMP9）信号通路对支气管肺发育不良（BPD）新生大鼠肺损伤的作用及机制。**方法：**取 SD 大鼠随机分为对照组（C 组）、BPD 组、AS-IV 低剂量组（L-AS-IV 组）、AS-IV 高剂量组（H-AS-IV 组）、AS-IV 高剂量+空载组（H-AS-IV+pcDNA 组）、AS-IV 高剂量+pcDNA-LRP1 组（H-AS-IV+pcDNA-LRP1 组），采用高氧诱导法制备 BPD 模型，大鼠采用 AS-IV 和空载、LRP1 过表达质粒进行分组干预，然后检测大鼠肺组织 W/D 值与肺泡灌洗液（BALF）中白细胞计数；HE 染色检测大鼠肺组织病理形态，比较各组辐射状肺泡计数与肺泡平均截距；测定各组肺组织丙二醛（MDA）含量与超氧化物歧化酶（SOD）活化水平；ELASA 检测大鼠血清与 BALF 中炎症因子水平；实时荧光定量 PCR（qPCR）检测大鼠肺组织 LRP1 与 MMP9 mRNA 表达；Western blot 检测大鼠肺组织 LRP1-pPyk2-MMP9 信号通路相关蛋白表达。**结果：**与 C 组相比，BPD 组大鼠 W/D 值、白细胞计数、肺泡平均截距、MDA 含量、MCP-1 与 IL-6 水平、LRP1 与 MMP9 表达水平、pPyk2/Pyk2 升高（ $P<0.05$ ），SOD 活化水平、辐射状肺泡计数降低（ $P<0.05$ ）；与 BPD 组相比，L-AS-IV 组、H-AS-IV 组、H-AS-IV+pcDNA 组大鼠 W/D 值、白细胞计数、肺泡平均截距、MDA 含量、MCP-1 与 IL-6 水平、LRP1 与 MMP9 表达水平、pPyk2/Pyk2 降低（ $P<0.05$ ），SOD 活化水平、辐射状肺泡计数升高（ $P<0.05$ ），高剂量 AS-IV 对 BPD 模型大鼠以上各病理指标的改善作用更强；与 H-AS-IV+pcDNA 组相比，H-AS-IV+pcDNA-LRP1 组大鼠 W/D 值、白细胞计数、肺泡平均截距、MDA 含量、MCP-1 与 IL-6 水平、LRP1 与 MMP9 表达水平、pPyk2/Pyk2 升高（ $P<0.05$ ），SOD 活化水平、辐射状肺泡计数降低（ $P<0.05$ ）。**结论：**AS-IV 可通过抑制 LRP1-pPyk2-MMP9 信号通路激活减轻 BPD 新生大鼠肺损伤。

【关键词】黄芪甲苷；LRP1-pPyk2-MMP9；支气管肺发育不良；新生大鼠；肺损伤

Effect and mechanism of Astragaloside IV on lung injury in neonatal rats with bronchopulmonary dysplasia by regulating LRP1-ppyk2-MMP9 signaling pathway

Gu Xuejuan, Jia Zhen, Wang Zhen

Department of Neonatology, Suzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Suzhou, Jiangsu 215100, China

【Abstract】 Objective: To explore the effect and mechanism of Astragaloside IV (AS-IV) on lung injury in neonatal rats with bronchopulmonary dysplasia (BPD) by regulating low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) - proline-rich tyrosine kinase 2 phosphorylation (pPyk2)-matrix metalloproteinase 9 (MMP9) signaling pathway. **Methods:** SD rats were randomly assigned into control group (C group), BPD group, AS-IV low-dose group (L-AS-IV group),

基金项目：苏州市科技计划发展项目（SKYD2023074）。

作者简介：顾雪娟，女，本科，主治医师，主要从事新生儿危重症研究，E-mail：hx2513@sina.com。

通信作者：王镇，男，本科，副主任医师，主要从事新生儿危重症，E-mail：zhwong@petalmail.com。

AS-IV high-dose group (H-AS-IV group), AS-IV high-dose+empty load group (H-AS-IV+pcDNA group), and AS-IV high-dose+pcDNA-LRP1 group (H-AS-IV+pcDNA-LRP1 group). The BPD model was prepared using the high oxygen induction method, and rats were divided into groups for intervention using AS-IV and empty vector, LRP1 overexpression plasmids. Then, the W/D value of rat lung tissue and white blood cell count in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected. HE staining was used to test the pathological morphology of rat lung tissue, and the radial alveolar count and mean alveolar intercept were compared among the groups. The malondialdehyde (MDA) content and superoxide dismutase (SOD) activation in lung tissues were measured. ELISA was performed to detect inflammatory factors in rat serum and BALF. Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed to test the mRNA expression of LRP1 and MMP9 in rat lung tissue. Western blot was used to test LRP1-pPyk2-MMP9 signaling pathway related proteins in rat lung tissue. **Results:** For the C group, the BPD group showed an increase in W/D value, white blood cell count, mean alveolar intercept, MDA content, MCP-1 and IL-6 levels, LRP1 and MMP9 expression, pPyk2/Pyk2 ($P<0.05$), and a decrease in SOD activation and radial alveolar count ($P<0.05$) in rats. For the BPD group, the L-AS-IV group, H-AS-IV group, and H-AS-IV+pcDNA group showed a decrease in W/D value, white blood cell count, mean alveolar intercept, MDA content, MCP-1 and IL-6 levels, LRP1 and MMP9 expression, pPyk2/Pyk2 ($P<0.05$), and a raise in SOD activation and radial alveolar count ($P<0.05$). High dose AS-IV had a stronger improvement effect on the above pathological indicators in BPD model rats. For the H-AS-IV+pcDNA group, the H-AS-IV+pcDNA-LRP1 group showed an increase in W/D value, white blood cell count, mean alveolar intercept, MDA content, MCP-1 and IL-6 levels, LRP1 and MMP9 expression, pPyk2/Pyk2 ($P<0.05$), and a decrease in SOD activation and radial alveolar count ($P<0.05$). **Conclusion:** AS-IV can alleviate lung injury in neonatal rats with BPD by inhibiting the activation of LRP1-ppyk2-MMP9 signaling pathway.

[Key words] Astragaloside IV; LRP1-pPyk2-MMP9; Bronchopulmonary dysplasia; Neonatal rats; Lung injury

支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 是早产儿常见的一种慢性呼吸系统疾病, 由高氧、机械通气等因素引起, 可造成肺损伤与未成熟肺修复之间的不平衡, 最终导致肺发育受阻并伴肺功能不全, 极大危害患儿正常生长发育及身体健康^[1-2]。高氧或机械通气可诱发早产儿体内大量活性氧自由基和炎性因子释放, 触发高水平的氧化应激和炎症级联反应, 从而引起肺损伤和肺发育受阻, 最终进展为 BPD, 因而进行抗炎与抗氧化治疗是预防治疗 BPD 的关键^[3-4]。低密度脂蛋白受体相关蛋白 1 (low-density lipoprotein receptor-related protein 1, LRP1) 可与多配体结合, 能通过多种通路促进炎症因子的释放^[5], 研究显示, LRP1 可通过调控磷酸化酪氨酸激酶 2 (proline-rich tyrosine kinase 2 phosphorylation, pPyk2)-基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9) 信号通路介导 BPD 的发病过程, MMP9 在 BPD 患儿体内表达显著升高, LRP1-pPyk2-MMP9 信号通路在高氧诱导的新生大鼠肺损伤中活化增强, 并与新生大鼠 BPD 的产生密切相关^[6-7], 由此可知, 抑制 LRP1-pPyk2-MMP9 信号通路激活可能是 BPD 的有效治疗手段。黄芪甲苷 (astragaloside IV, AS-IV) 是传统中药黄芪的主要抗炎活性成分, 可通过调控 TLR4、IL-10、MMP9 等蛋白表达对炎性疾病发挥抗炎作用^[8], AS-IV 可抑制哮喘小鼠的肺部炎症和焦亡^[9], 还可通过调控肠道菌群减轻急性肺损伤肺组织水肿和炎性损伤^[10], 因而推测 AS-IV 可能通过下调 LRP1-pPyk2-MMP9 信号通路治疗 BPD。本研究通过制备 BPD 新生大鼠模型, 探究

AS-IV 调节 LRP1-pPyk2-MMP9 信号通路对其肺损伤的减轻作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级 SD 新生大鼠 60 只, 出生 24h 以内, 购自北京希诺谷生物科技有限公司[SCXK (京) 2021-0001]。所有新生鼠和其母鼠在 SPF 级动物实验房饲养, 自由饮水摄食, 室内温度设为 22~25℃, 同时相对湿度设为 40%~60%, 严格执行实验动物管理条例。

1.2 主要试剂与仪器

AS-IV (对照品, 批号 110781-201314), 购自信阳莱耀生物科技有限公司; 逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 试剂盒, 购自上海星启百代生物科技有限公司; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒、LRP1、pPyk2、MMP9 及 GAPDH 兔抗大鼠一抗、HE 染色试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性检测试剂盒、HRP-驴抗兔二抗、大鼠 MCP-1 与 IL-6 ELISA 试剂盒, 购自英国 Abcam 公司等。

全自动血液分析仪 (南京贝登医疗股份有限公司), 型号 BH-5160CRP; 实时荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司), 型号 Light Cycler480; 切片机、显微镜 (德国 Leica 公司), 型号 RM2125RTS、DM2700M; 多功能酶标仪 (德国 BMG Labtech 公司), 型号 PHERAstar® FSX; 垂直电泳与印迹系统 (美国 Cytiva 公司), 型号 VE; 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司), 型号 GELDOC2000 等。

1.3 造模与分组干预

参照文献^[1]采用高氧诱导法制备 BPD 模型: 选取状态良好的新生大鼠 60 只, 随机分为对照组 (C 组)、BPD 组、AS-IV 低剂量组 (L-AS-IV 组)、AS-IV 高剂量组 (H-AS-IV 组)、AS-IV 高剂量 + 空载组 (H-AS-IV+pcDNA 组)、AS-IV 高剂量 + pcDNA-LRP1 组 (H-AS-IV+pcDNA-LRP1 组), 每组 10 只, C 组在常压常氧 (氧气浓度 21%) 条件下喂养, 其余各组在常压高氧条件下喂养, 氧浓度为 80%, 利用测氧仪检测氧箱中氧气浓度, 新生鼠和母鼠一起喂养但高氧箱中母鼠每 24h 移出氧箱 2h, 新生鼠在氧箱内喂养 14d, 即完成 BPD 造模。

造模后对各组新生大鼠进行分组干预: L-AS-IV 组、H-AS-IV 组大鼠分别以 40、80mg/kg 的 AS-IV 干预^[10], H-AS-IV+pcDNA 组大鼠以 80mg/kg 的 AS-IV 干预的同时尾静脉注射空载质粒, H-AS-IV+pcDNA-LRP1 组大鼠以 80mg/kg 的 AS-IV 干预的同时尾静脉注射 LRP1 过表达质粒, AS-IV 和空载、LRP1 过表达质粒均溶于生理盐水, AS-IV 进行灌胃, 灌胃体积为 10mL/kg 且频率为 1 次/d, 质粒均注射 100μg 且频率为每 3 天 1 次, C 组、BPD 组大鼠以等量生理研碎进行灌胃及尾静脉注射, 大鼠共干预 14d。

1.4 肺组织 W/D 值与 BALF 中白细胞计数检测及标本采集

药物干预完成后 24h 使用乙醚对各组大鼠进行麻醉, 进行心脏穿刺后采集血液, 离心 (4℃、2000r/min、10min), 得到血清存在 -80℃; 切开颈部进行气管插管, 利用注射器向左肺内注入生理盐水进行灌洗, 回抽后再次灌洗, 重复 3 次后对最终灌洗液进行离心 (4℃、2000r/min、10min), 上清为肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF), 存在 -80℃, 底部剩余沉淀采用全自动血液分析仪检测其中白细胞计数。

颈椎脱臼处死大鼠, 剪开胸腔, 迅速取出双肺, 以 PBS 冲洗后取右上肺组织约 160mg 以放射免疫沉淀测定 (radio-immune precipitation assay, RIPA) 制成肺组织匀浆, 离心 (4℃、3000r/min、20min), 得到蛋白样品液, 测定其蛋白浓度后存在 -80℃; 再次取右上肺组织约 120mg 存在液氮; 剩余右肺组织固定在 4% 多聚甲醛内, 24h 后取出浸蜡包埋, 然后用切片机制成厚度约为 5μm 的连续切片备用。

1.5 HE 染色

将肺组织石蜡切片依次放入二甲苯与 100%、90%、80%、70%的梯度乙醇中脱蜡至水，进行 HE 染色后在 200 倍光镜视野下观察肺组织病理形态，定量辐射状肺泡计数和肺泡平均截距，以此评估肺泡发育程度。

1.6 氧化应激与炎症因子水平检测

取各组大鼠血清，采用 MDA 检测试剂盒测定其中 MDA 含量，采用 SOD 活性检测试剂盒测定其中 SOD 活性水平，采用 ELASA 试剂盒测定其中 MCP-1 与 IL-6 水平，检测方法均参照各自试剂盒说明书。

1.7 qPCR 检测

取各组新生大鼠肺组织，通过 TRIzol 法提取总 RNA，逆转录为 cDNA 后进行 qPCR 反应，结果以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法分析，并用 β -actin 作为内参进行校正，LRP1 上、下游引物序列分别为 5'-CCACTATGGATGCCCCCTAAAAC-3'、5'-GCAATCTCTTTCACCGTCACA-3'，MMP9 上、下游引物序列分别为 5'-CCCTGCGTATTTCCATTCAT-3'、5'-AAACCCCACTTCTTGTCAGC-3'， β -actin 上、下游引物序列分别为 5'-GGAAATCGTGCGTGACATTA-3'、5'-AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG-3'。

1.8 Western blot 检测

取各组新生大鼠肺组织蛋白样品液，每组取 30 μ g 总蛋白样本以此进行变性（沸水浴，5min）、电泳（110V，1.5h）及湿转（110V，1.5h），对膜上蛋白进行封闭（37 $^{\circ}$ C，2h）后依次孵育 LRP1、pPyk2、MMP9 及 GAPDH 兔抗大鼠一抗（4 $^{\circ}$ C，12h），然后加入 HRP-驴抗兔二抗（37 $^{\circ}$ C，2h）孵育，ECL 显色蛋白，凝胶成像后定量蛋白灰度值，各组 LRP1、pPyk2、MMP9 蛋白相对表达用 GAPDH 作为内参进行校正。

1.9 数据分析

本实验采用 GraphPad Prism 8.0 进行统计学分析，数据以平均数 $\pm$ 标准差表示，采用单因素方差分析进行多组间比较，事后两两进一步比较行 SNK-q 检验， $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AS-IV 对 BPD 大鼠肺水肿与白细胞浸润的影响

结果如表 1 所示：C 组、BPD 组、L-AS-IV 组、H-AS-IV 组、H-AS-IV+pcDNA 组、H-AS-IV+pcDNA-LRP1 组大鼠肺组织 W/D 值与 BALF 中白细胞计数差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）：BPD 组相比 C 组升高（ $P<0.05$ ），L-AS-IV 组、H-AS-IV 组、H-AS-IV+pcDNA 组相比 BPD 组均降低（ $P<0.05$ ），H-AS-IV 组低于 L-AS-IV 组（ $P<0.05$ ），H-AS-IV+pcDNA-LRP1 组相比 H-AS-IV 组升高（ $P<0.05$ ）。

表 1 各组大鼠肺组织 W/D 值与 BALF 中白细胞计数（n=10， $\bar{x}\pm s$ ）
Tab.1 W/D values of lung tissue and white blood cell count in BALF of rats in each group (n=10, $\bar{x}\pm s$)

Group	W/D 值	白细胞计数（10 ⁷ /L）
C group	4.63 $\pm$ 0.15	27.12 $\pm$ 4.30
BPD group	5.85 $\pm$ 0.22 ¹⁾	143.68 $\pm$ 6.15 ¹⁾
L-AS-IV group	5.29 $\pm$ 0.19 ²⁾	82.75 $\pm$ 5.42 ²⁾
H-AS-IV group	4.81 $\pm$ 0.17 ^{2) 3)}	30.36 $\pm$ 4.51 ^{2) 3)}

H-AS-IV+pcDNA group	4.85±0.14 ^{2) 3)}	32.50±4.26 ^{2) 3)}
H-AS-IV+pcDNA-LRP1 group	5.74±0.20 ⁴⁾	138.04±6.74 ⁴⁾

Note: Compared with the C group, ¹⁾ $P < 0.05$; Compared with the BPD group, ²⁾ $P < 0.05$; Compared with the L-AS-IV group, ³⁾ $P < 0.05$; Compared with the H-AS-IV+pcDNA group, ⁴⁾ $P < 0.05$.

2.2 AS-IV 对 BPD 大鼠肺组织病理形态的影响

结果如图 1 所示：C 组大鼠肺泡发育正常，大小均匀且结构规整，肺组织形态无病变。BPD 大鼠肺泡发育明显受阻，肺泡数量减少，肺泡增大、融合且大小不一，肺组织有明显炎性浸润，呈现明显的 BPD 症状。L-AS-IV 组、H-AS-IV 组、H-AS-IV+pcDNA 组大鼠 BPD 症状相比 BPD 组均减轻，H-AS-IV 组相比 L-AS-IV 组进一步减轻。H-AS-IV+pcDNA-LRP1 组大鼠 BPD 症状相比 H-AS-IV 组加重，其肺组织病理形态与 BPD 组相似。

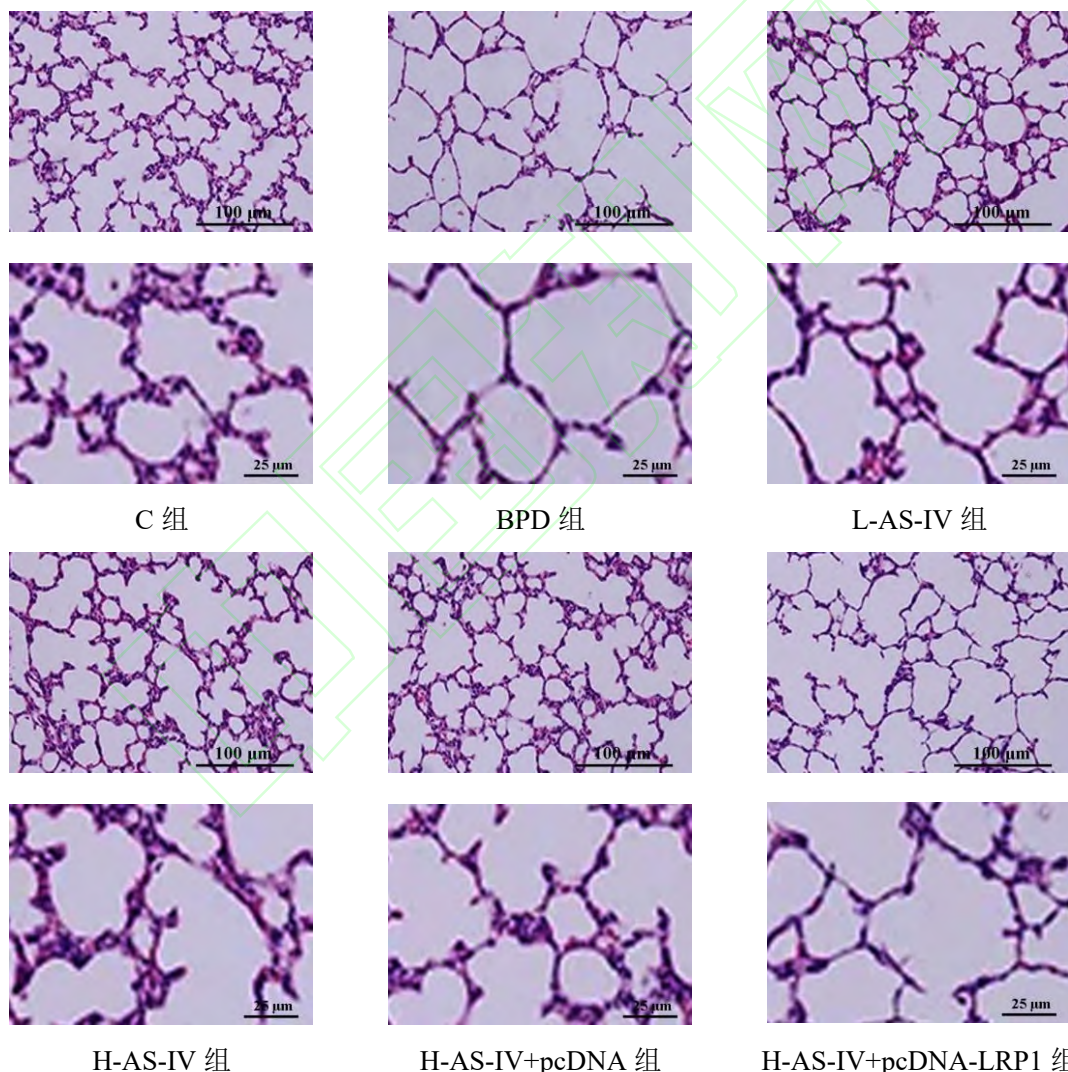


图 1 各组大鼠肺组织病理形态 (×100, ×400, HE 染色)

Fig.1 Pathological morphology of lung tissue in each group of rats (×100, ×400, HE staining)

结果如表 2 所示：C 组、BPD 组、L-AS-IV 组、H-AS-IV 组、H-AS-IV+pcDNA 组、H-AS-IV+pcDNA-LRP1 组大鼠辐射状肺泡计数与肺泡平均截距差异有统计学意义 ($P < 0.05$),

其中肺泡平均截距变化趋势为：BPD 组相比 C 组升高（ $P<0.05$ ），L-AS-IV 组、H-AS-IV 组、H-AS-IV+pcDNA 组相比 BPD 组均降低（ $P<0.05$ ），H-AS-IV 组低于 L-AS-IV 组，H-AS-IV+pcDNA-LRP1 组相比 H-AS-IV 组升高（ $P<0.05$ ）。辐射状肺泡计数在各组之间变化趋势与肺泡平均截距相反（ $P<0.05$ ）。

表 2 各组大鼠辐射状肺泡计数与肺泡平均截距（ $n=10$ ， $\bar{x} \pm s$ ）

Tab.2 Radial alveolar count and mean alveolar intercept of rats in each group ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Radial alveolar count (number)	Mean alveolar intercept (μm)
C group	11.20 $\pm$ 0.53	39.74 $\pm$ 1.63
BPD group	4.60 $\pm$ 0.39 ¹⁾	54.92 $\pm$ 2.54 ¹⁾
L-AS-IV group	7.50 $\pm$ 0.45 ²⁾	47.63 $\pm$ 2.13 ²⁾
H-AS-IV group	10.80 $\pm$ 0.60 ^{2) 3)}	40.85 $\pm$ 1.57 ^{2) 3)}
H-AS-IV+pcDNA group	10.60 $\pm$ 0.58 ^{2) 3)}	41.10 $\pm$ 1.96 ^{2) 3)}
H-AS-IV+pcDNA-LRP1 group	4.80 $\pm$ 0.35 ⁴⁾	52.02 $\pm$ 2.71 ⁴⁾

Note: Compared with the C group, ¹⁾ $P<0.05$; Compared with the BPD group, ²⁾ $P<0.05$; Compared with the L-AS-IV group, ³⁾ $P<0.05$; Compared with the H-AS-IV+pcDNA group, ⁴⁾ $P<0.05$.

2.3 AS-IV 对 BPD 大鼠肺组织氧化应激的影响

结果如表 3 所示：C 组、BPD 组、L-AS-IV 组、H-AS-IV 组、H-AS-IV+pcDNA 组、H-AS-IV+pcDNA-LRP1 组大鼠肺组织 MDA 含量与 SOD 活化水平差异有统计学意义（ $P<0.05$ ），其中 MDA 含量变化趋势为：BPD 组相比 C 组升高（ $P<0.05$ ），L-AS-IV 组、H-AS-IV 组、H-AS-IV+pcDNA 组相比 BPD 组均降低（ $P<0.05$ ），H-AS-IV 组低于 L-AS-IV 组（ $P<0.05$ ），H-AS-IV+pcDNA-LRP1 组相比 H-AS-IV 组升高（ $P<0.05$ ）。SOD 活化水平在各组之间变化趋势与 MDA 含量相反（ $P<0.05$ ）。

表 3 各组大鼠肺组织 MDA 含量与 SOD 活化水平（ $n=10$ ， $\bar{x} \pm s$ ）

Tab.3 The MCP-1 and IL-6 levels in serum and BALF of rats in each group ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Group	MDA (nmol/mg Pro)	SOD (U/mg Pro)
C group	1.26 $\pm$ 0.27	31.86 $\pm$ 2.61
BPD group	3.07 $\pm$ 0.36 ¹⁾	19.23 $\pm$ 1.78 ¹⁾
L-AS-IV group	2.19 $\pm$ 0.24 ²⁾	24.15 $\pm$ 2.14 ²⁾
H-AS-IV group	1.32 $\pm$ 0.20 ^{2) 3)}	29.47 $\pm$ 2.52 ^{2) 3)}
H-AS-IV+pcDNA group	1.37 $\pm$ 0.18 ^{2) 3)}	29.13 $\pm$ 2.21 ^{2) 3)}
H-AS-IV+pcDNA-LRP1 group	2.93 $\pm$ 0.22 ⁴⁾	20.21 $\pm$ 1.95 ⁴⁾

Note: Compared with the C group, ¹⁾ $P<0.05$; Compared with the BPD group, ²⁾ $P<0.05$; Compared with the L-AS-IV group, ³⁾ $P<0.05$; Compared with the H-AS-IV+pcDNA group, ⁴⁾ $P<0.05$.

<0.05.

2.4 AS-IV 对 BPD 大鼠血清与 BALF 中炎症因子水平的影响

结果如表 4 所示: C 组、BPD 组、L-AS-IV 组、H-AS-IV 组、H-AS-IV+pcDNA 组、H-AS-IV+pcDNA-LRP1 组大鼠血清与 BALF 中 MCP-1、IL-6 水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$): BPD 组相比 C 组升高 ($P < 0.05$), L-AS-IV 组、H-AS-IV 组、H-AS-IV+pcDNA 组相比 BPD 组均降低 ($P < 0.05$), H-AS-IV 组低于 L-AS-IV 组 ($P < 0.05$), H-AS-IV+pcDNA-LRP1 组相比 H-AS-IV 组升高 ($P < 0.05$)。

表 4 各组大鼠血清与 BALF 中 MCP-1、IL-6 水平 ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab.4 The MCP-1 and IL-6 levels in serum and BALF of rats in each group ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Serum		BALF	
	MCP-1 (ng/L)	IL-6 (ng/L)	MCP-1 (ng/L)	IL-6 (ng/L)
C group	255.84±41.23	14.81±2.42	286.51±45.52	18.03±3.12
BPD group	625.62±47.49 ¹⁾	86.52±4.13 ¹⁾	712.84±52.13 ¹⁾	109.25±5.43 ¹⁾
L-AS-IV group	443.71±50.16 ²⁾	51.73±3.65 ²⁾	507.36±42.95 ²⁾	66.72±4.81 ²⁾
H-AS-IV group	268.15±39.42 ^{2) 3)}	16.40±2.37 ^{2) 3)}	302.12±46.19 ^{2) 3)}	20.34±3.52 ^{2) 3)}
H-AS-IV+pcDNA group	276.93±40.57 ^{2) 3)}	17.91±3.25 ^{2) 3)}	313.57±50.26 ^{2) 3)}	21.06±4.36 ^{2) 3)}
H-AS-IV+pcDNA-LRP1 group	602.86±43.25 ⁴⁾	82.69±4.45 ⁴⁾	680.73±49.34 ⁴⁾	104.87±5.51 ⁴⁾

Note: Compared with the C group, ¹⁾ $P < 0.05$; Compared with the BPD group, ²⁾ $P < 0.05$; Compared with the L-AS-IV group, ³⁾ $P < 0.05$; Compared with the H-AS-IV+pcDNA group, ⁴⁾ $P < 0.05$.

2.5 AS-IV 对 BPD 大鼠肺组织 LRP1、MMP9 mRNA 表达水平的影响

结果如表 5 所示: C 组、BPD 组、L-AS-IV 组、H-AS-IV 组、H-AS-IV+pcDNA 组、H-AS-IV+pcDNA-LRP1 组大鼠肺组织 LRP1、MMP9 mRNA 表达水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$): BPD 组相比 C 组升高 ($P < 0.05$), L-AS-IV 组、H-AS-IV 组、H-AS-IV+pcDNA 组相比 BPD 组均降低 ($P < 0.05$), H-AS-IV 组低于 L-AS-IV 组 ($P < 0.05$), H-AS-IV+pcDNA-LRP1 组相比 H-AS-IV 组升高 ($P < 0.05$)。

表 5 各组大鼠肺组织 LRP1、MMP9 mRNA 水平 ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab.5 The mRNA levels of LRP1 and MMP9 in lung tissues of rats in each group ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Group	LRP1	MMP9
C group	0.96±0.14	0.98±0.09
BPD group	3.62±0.16 ¹⁾	2.93±0.13 ¹⁾
L-AS-IV group	2.34±0.17 ²⁾	1.96±0.14 ²⁾

H-AS-IV group	1.01±0.15 ^{2) 3)}	1.00±0.11 ^{2) 3)}
H-AS-IV+pcDNA group	1.05±0.19 ^{2) 3)}	1.03±0.12 ^{2) 3)}
H-AS-IV+pcDNA-LRP1 group	3.57±0.18 ⁴⁾	2.88±0.15 ⁴⁾

Note: Compared with the C group, ¹⁾ $P < 0.05$; Compared with the BPD group, ²⁾ $P < 0.05$; Compared with the L-AS-IV group, ³⁾ $P < 0.05$; Compared with the H-AS-IV+pcDNA group, ⁴⁾ $P < 0.05$.

2.6 AS-IV 对 BPD 大鼠肺组织 LRP1-pPyk2-MMP9 信号通路蛋白表达的影响

结果如图 2、表 6 所示：C 组、BPD 组、L-AS-IV 组、H-AS-IV 组、H-AS-IV+pcDNA 组、H-AS-IV+pcDNA-LRP1 组大鼠肺组织 LRP1 与 MMP9 蛋白表达、pPyk2/Pyk2 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)：BPD 组相比 C 组升高 ($P < 0.05$)，L-AS-IV 组、H-AS-IV 组、H-AS-IV+pcDNA 组相比 BPD 组均降低 ($P < 0.05$)，H-AS-IV 组低于 L-AS-IV 组 ($P < 0.05$)，H-AS-IV+pcDNA-LRP1 组相比 H-AS-IV 组升高 ($P < 0.05$)。

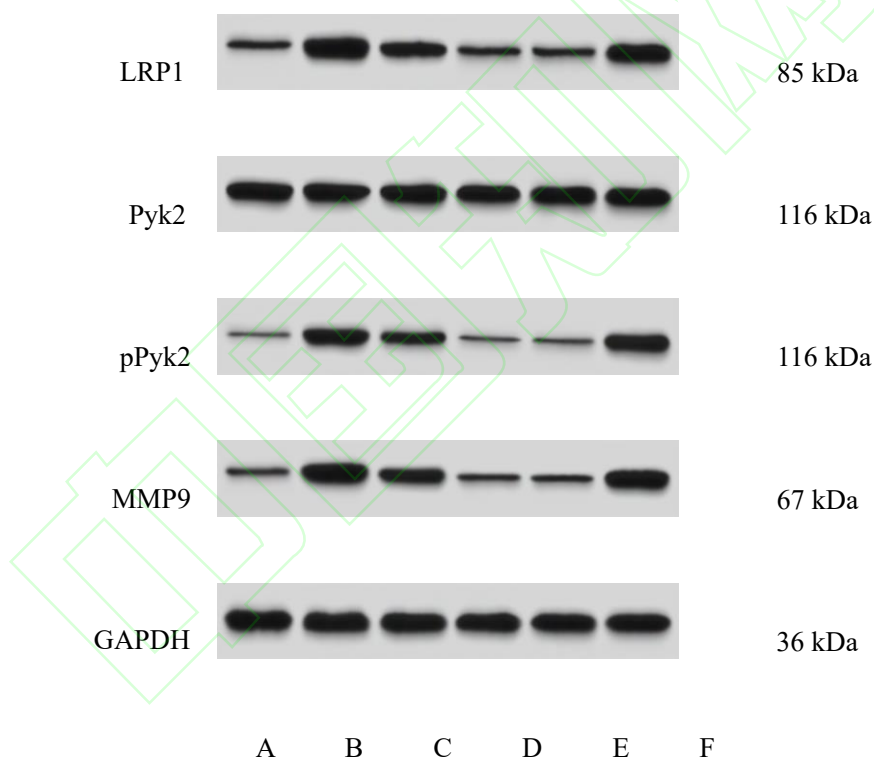


图 2 Western blot 检测各组大鼠肺组织 LRP1-pPyk2-MMP9 信号通路相关蛋白表达

Fig.2 Western blot detection of LRP1-Ppyk2-MMP9 signaling pathway related protein expression in lung tissues of rats in each group

Note: A: C group; B: BPD group; C: L-AS-IV group; D: H-AS-IV group; E: H-AS-IV+pcDNA group; F: H-AS-IV+pcDNA-LRP1 group.

表 6 各组大鼠肺组织 LRP1-pPyk2-MMP9 信号通路相关蛋白相对表达 ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab.6 Relative expression of LRP1-Ppyk2-MMP9 signaling pathway related proteins in lung tissues of rats in each group ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Group	LRP1	pPyk2/Pyk2	MMP9
C group	0.23±0.05	0.12±0.03	0.18±0.05
BPD group	1.14±0.12 ¹⁾	0.91±0.04 ¹⁾	1.13±0.10 ¹⁾
L-AS-IV group	0.69±0.08 ²⁾	0.52±0.06 ²⁾	0.67±0.07 ²⁾
H-AS-IV group	0.22±0.03 ^{2) 3)}	0.13±0.04 ^{2) 3)}	0.19±0.04 ^{2) 3)}
H-AS-IV+pcDNA group	0.24±0.05 ^{2) 3)}	0.14±0.02 ^{2) 3)}	0.21±0.06 ^{2) 3)}
H-AS-IV+pcDNA-LRP1 group	1.11±0.13 ⁴⁾	0.90±0.06 ⁴⁾	1.10±0.09 ⁴⁾

Note: Compared with the C group, ¹⁾ $P < 0.05$; Compared with the BPD group, ²⁾ $P < 0.05$; Compared with the L-AS-IV group, ³⁾ $P < 0.05$; Compared with the H-AS-IV+pcDNA group, ⁴⁾ $P < 0.05$.

3 讨论

过去 30 余年, 新生儿 BPD 发病率持续升高, 不仅影响了早产儿的生长发育, 还极大增加了哮喘、肺动脉高压、慢性阻塞性肺疾病、神经系统发育障碍等并发症的发生风险, 给患儿家庭与公共医疗系统均造成了极大的负担, 而目前临床还缺乏有效的 BPD 治疗方法, 因此探寻高效安全的 BPD 治疗手段具有重大临床和社会价值^[12-13]。本研究采用高氧诱导法制备 BPD 模型, 结果显示, 造模大鼠非法收明显水肿, 且 BALF 内白细胞明显增多, 大鼠肺泡数量减少, 肺泡增大、融合且大小不一, 肺组织有明显炎性浸润, 呈现明显的 BPD 症状, 肺泡平均截距增大且辐射状肺泡计数降低, 揭示 BPD 大鼠模型制备成功。

氧疗、感染或机械通气引起的氧化应激和炎症是 BPD 的主要病因, 可引发患儿肺发育停滞和肺损伤, 并导致肺修复受限, 因而预防治疗 BPD 的关键是抑制炎症并提升抗氧化能力^[14-15]。AS-IV 是中草药黄芪中活性最强的抗炎单体, 还可起到抗病毒、抗纤维化和抗氧化作用, 并可表现出明显的肺保护作用, 可减轻流感病毒诱导的炎症反应和肺损伤^[16], 还可通过抑制氧化应激和上皮细胞焦亡缓解香烟烟雾导致肺泡隔破裂和肺泡扩大^[17]。本研究结果显示, 以 AS-IV 干预 BPD 大鼠, 可降低大鼠血清与 BALF 中炎症因子 MCP-1 与 IL-6 水平, 减少 BALF 内白细胞数目, 增强抗氧化酶 SOD 活性, 明显抑制 BPD 大鼠氧化应激与炎症反应, 进而降低 BPD 大鼠 W/D 值、肺泡平均截距并升高辐射状肺泡计数, 缓解 BPD 大鼠肺水肿、肺泡发育受阻等肺损伤症状, 最终提示 AS-IV 可对 BPD 发挥潜在的治疗作用。

LRP1-pPyk2-MMP9 是重要的炎症调控信号通路, 可调控 BPD 的发生发展, 在高氧诱导的新生大鼠肺损伤过程中, LRP1、MMP9、pPyk2 表达明显上调^[6-7], LRP1 在地塞米松治疗后的 BPD 患儿体内降低, 可作为判断地塞米松疗效的生物标志物^[18], p-PYK2 表达升高可促使风湿性心脏病大鼠心脏瓣膜炎性细胞的浸润和纤维化因子水平的升高^[19], 使用柠檬酸咖啡因可有效降低 MMP9 和炎症因子表达, 进而降低早产儿 BPD 的发生率^[20]。本研究结果显示, BPD 大鼠肺组织 LRP1、MMP9 表达水平与 pPyk2/Pyk2 相比 C 组明显升高, 表明 LRP1-pPyk2-MMP9 信号通路在 BPD 发病过程中处于异常激活状态, 以 AS-IV 干预可抑制 BPD 大鼠 LRP1-pPyk2-MMP9 信号通路激活, 表明 LRP1-pPyk2-MMP9 信号通路与 AS-IV 对 BPD 大鼠肺损伤的减轻作用相关; 以 AS-IV 和 LRP1 过表达质粒联合干预 BPD 大鼠, 可减弱 AS-IV 单独干预对 BPD 大鼠氧化应激与炎症反应的抑制作用, 削弱其对 BPD 大鼠肺水肿、肺泡发育受阻等肺损伤症状的改善作用, 最终逆转其对 BPD 大鼠的治疗作用, 揭示 AS-IV 减轻 BPD 新生大鼠肺损伤时通过下调 LRP1 表达实现的。

综上所述, AS-IV 可降低炎性因子表达水平、增强抗氧化酶活性, 降低氧化应激与炎症反应水平, 进而缓解 BPD 大鼠肺水肿和肺泡发育受阻、结构损伤等肺损伤症状, 阻止 LRP1-pPyk2-MMP9 信号通路激活传导可能是 AS-IV 起到上述肺保护作用的药理机制, 本研究探讨了 AS-IV 对 BPD 新生大鼠的治疗作用及其作用机制, 为 AS-IV 应用于 BPD 的临床治疗提供了一定理论依据, 有利于高效的 BPD 预防及治疗技术研发。

参考文献

- [1]JENZER K G, BAKER C D, WISNIEWSKI B L. Bronchopulmonary Dysplasia[J]. Clin Chest Med, 2024, 45(3):639-650. DOI: 10.1016/j.ccm.2024.03.007.
- [2]MAIA P D, ABMAN S H, MANDELL E. Bronchopulmonary Dysplasia-Associated Pulmonary Hypertension: Basing Care on Physiology[J]. Neoreviews, 2024, 25(7):e415-e433. DOI: 10.1542/neo.25-7-e415.
- [3]GOATES M, SHRESTHA A, THAPA S, *et al.* Blocking IL-17a Signaling Decreases Lung Inflammation and Improves Alveolarization in Experimental Bronchopulmonary Dysplasia[J]. Am J Pathol, 2024, 194(11):2023-2035. DOI: 10.1016/j.ajpath.2024.07.011.
- [4]TENG M, WU T J, JING X, *et al.* Temporal Dynamics of Oxidative Stress and Inflammation in Bronchopulmonary Dysplasia[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(18):10145-10169. DOI: 10.3390/ijms251810145.
- [5]万振宇, 肖玲, 王高华. 低密度脂蛋白受体相关蛋白 1 参与抑郁症发生的可能机制[J]. 神经损伤与功能重建, 2023, 18(12):793-795. DOI: 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20220352.
- [6]郑亚斐, 朱海艳, 王维, 等. LRP1-pPyk2-MMP9 通路在高氧诱导新生大鼠肺损伤中的作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2021, 23(12):1289-1294. DOI: 10.7499/j.issn.1008-8830.2108125.
- [7]HOTI B, ÖZCAN G, ÇOBANOĞLU N, *et al.* Elevated visfatin levels illuminate the inflammatory path in bronchopulmonary dysplasia[J]. Turk J Pediatr, 2024, 66(6):673-680. DOI: 10.24953/turkjpediatr.2024.5150.
- [8]REN J, DING Y, LI S, *et al.* Predicting the anti-inflammatory mechanism of Radix Astragali using network pharmacology and molecular docking[J]. Medicine (Baltimore), 2023, 102(35):e34945-e34956. DOI: 10.1097/MD.00000000000034945.
- [9]ZHANG H, ZHANG J, PAN H, *et al.* Astragaloside IV promotes the pyroptosis of airway smooth muscle cells in childhood asthma by suppressing HMGB1/RAGE axis to inactivate NF- κ B pathway[J]. Autoimmunity, 2024, 57(1):2387100-2387108. DOI: 10.1080/08916934.2024.2387100.
- [10]LUO C, YE Y, LV A, *et al.* The impact of Astragaloside IV on the inflammatory response and gut microbiota in cases of acute lung injury is examined through the utilization of the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. PLoS One, 2024, 19(7):e0305058-e0305077. DOI: 10.1371/journal.pone.0305058.
- [11]王欣, 张敏, 丁圣刚. 咖啡因经 Nrf2 通路调节支气管肺发育不良新生大鼠肺氧化应激损伤[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(10):1731-1737. DOI: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.021.
- [12]Ó BRIAIN E, BYRNE A O, DOWLING J, *et al.* Diuretics use in the management of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants: A systematic review[J]. Acta Paediatr, 2024, 113(3):394-402. DOI: 10.1111/apa.17093.
- [13]OLUWOLE-OJO T, HARRIS C, GREENOUGH A. Advances in the pharmacological management of bronchopulmonary dysplasia: an update of the literature[J]. Expert Opin

Pharmacother, 2024, 25(10):1349-1358. DOI: 10.1080/14656566.2024.2383628.

[14]WU TJ, JING X, TENG M, *et al.* Role of Myeloperoxidase, Oxidative Stress, and Inflammation in Bronchopulmonary Dysplasia[J]. Antioxidants (Basel), 2024, 13(8):889-917. DOI: 10.3390/antiox13080889.

[15]SHEN X, YANG Z, WANG Q, *et al.* Lactobacillus plantarum L168 improves hyperoxia-induced pulmonary inflammation and hypoalveolarization in a rat model of bronchopulmonary dysplasia[J]. NPJ Biofilms Microbiomes, 2024, 10(1):32-46. DOI : 10.1038/s41522-024-00504-w.

[16]HUANG X, ZHOU Y, LI Y, *et al.* Astragaloside IV inhibits inflammation caused by influenza virus via reactive oxygen species/NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3/Caspase-1 signaling pathway[J]. Immun Inflamm Dis, 2024, 12(6):e1309-e1322. DOI : 10.1002/iid3.1309.

[17]WU K, LUAN G, HU J, *et al.* Astragaloside IV Reduces Lung Epithelial Cell Pyroptosis via TXNIP-NLRP3-GSDMD pathway[J]. Cell Biochem Biophys, 2024, 82(4):3695-3702. DOI: 10.1007/s12013-024-01457-9.

[18]ZHU H, TIAN Y, CHENG H, *et al.* A clinical study on plasma biomarkers for deciding the use of adjuvant corticosteroid therapy in bronchopulmonary dysplasia of premature infants[J]. Int J Med Sci, 2021, 18(12):2581-2588. DOI: 10.7150/ijms.58650.

[19]XIAN S, LI Y, BAI L, *et al.* Potential Involvement of M1 Macrophage and VLA4/VCAM-1 Pathway in the Valvular Damage Due to Rheumatic Heart Disease[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2024, 29(6):219-232. DOI: 10.31083/j.fbl2906219.

[20]JIANG Q, WU X. Effect of early preventive use of caffeine citrate on prevention together with treatment of BPD within premature infants and its influence on inflammatory factors[J]. Biotechnol Genet Eng Rev, 2024, 40(3):2730-2744. DOI: 10.1080/02648725.2023.2202517.