

甘草酸调控PRDX6表达与铁死亡减轻小鼠脓毒症急性肺损伤

王俊梅¹ 任春秀² 金玲玲¹ 于广海¹ 巴图乌力吉^{2*}

(¹内蒙古民族大学基础医学院, 通辽 028000; ²内蒙古民族大学附属医院, 通辽 028000)

摘要 该文旨在探讨甘草酸(GL)对脓毒症急性肺损伤的保护作用及机制。将50只、8周龄、SPF级的雄性BALB/C小鼠随机分为5组(每组10只): 假手术组(SHAM)、模型组(CLP)、模型+阳性药组(CLP+DEX)(地塞美松)、模型+甘草酸低剂量(CLP+GLL)组及模型+甘草酸高剂量(CLP+GLH)组。采用盲肠结扎穿孔术建立脓毒症肺损伤小鼠模型。为探索铁死亡与GL治疗CLP的作用, 小鼠CLP手术前16 h腹腔注射0.8 mg/kg Lip-1(lipoxstatin-1)后进行CLP手术, 术后小鼠腹腔注射100 mg/kg甘草酸, 每天2次, 共7天。测定肺组织湿/干重(W/D)值; HE染色检查肺组织病理性变化; 对各组小鼠肺泡灌洗液细胞计数; 试剂盒测定肺组织中氧化应激指标及Fe²⁺含量; qRT-PCR检测肺组织中IL-6和TNF α 的表达情况; Western blot检测各组小鼠肺组织中PRDX6和GPX4的表达情况。与CLP组相较, GL有效缓解了CLP小鼠中肺泡结构破裂、变形、融合及炎性细胞浸润, 降低了W/D值, 减少了BALF中总细胞数、中性粒细胞数及巨噬细胞数, 降低了IL-6、TNF α 表达水平, MDA和Fe²⁺降低, 而GSH水平以及GPX4、PRDX6蛋白表达水平升高, ACSL4表达下调, 且具有剂量依赖性。甘草酸可以有效减轻脓毒症肺损伤, 发挥保护性抗铁死亡作用, 并上调PRDX6的表达。

关键词 甘草酸; 脓毒症急性肺损伤; PRDX6; 铁死亡

Glycyrrhizic Acid Attenuates Acute Lung Injury in Mice with Sepsis through PRDX6 Regulation of Cellular Iron Death

WANG Junmei¹, REN Chunxiu², JIN Lingling¹, YU Guanghai¹, BATU Wuliji^{2*}

(¹School of Basic Medical Sciences, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, China;

²Hospital Affiliated to Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, China)

Abstract The aim of this paper was to investigate the protective effect and mechanism of GL (glycyrrhizic acid) on acute lung injury in sepsis. Fifty, 8-week-old, SPF-grade male BALB/C mice were randomly divided into 5 groups (10 mice in each group): SHAM-operated group (SHAM), model group (CLP), model+positive drug group (CLP+DEX) (dexamethasone), model+glycyrrhetinic acid low-dose (CLP+GLL) and model+glycyrrhetinic acid high-dose (CLP+GLH) groups. A mouse model of septic lung injury was established using cecum ligation and perforation. To investigate the role of ferroptosis in GL-mediated treatment of CLP, mice were intraperitoneally administered Lip-1 (lipoxstatin-1, 0.8 mg/kg) 16 h prior to CLP surgery, followed by twice-daily intraperitoneal injections of 100 mg/kg glycyrrhizin for 7 days post-operation. The W/D (wet/dry weight) ratio of lung tissues was

收稿日期: 2025-02-25

接受日期: 2025-05-26

内蒙古自治区直属高校基本科研业务费项目(批准号: GXKY25Z032)资助的课题

*通信作者。Tel: 15047559779, E-mail: btwlj15047559779@163.com

Received: February 25, 2025

Accepted: May 26, 2025

This work was supported by the Basic Research Operating Costs of Colleges and Universities Directly Under the Inner Mongolia Autonomous Region Project (Grant No. GXKY25Z032)

*Corresponding author. Tel: +86-15047559779, E-mail: btwlj15047559779@163.com

determined. HE staining was performed to check the pathological changes of lung tissues; cell counting of alveolar lavage fluid was performed in each group of mice; oxidative stress indexes in lung tissues were determined by kit and Fe^{2+} content was measured. qRT-PCR was performed to detect the expression of *IL-6* and *TNFA* in lung tissues. Western blot was performed to detect the expression of PRDX6 and GPX4 expression in the lung tissues of mice in each group. Compared with the CLP group, GL effectively alleviated the rupture, deformation, fusion and inflammatory cell infiltration of alveolar structures in CLP mice, decreased the W/D ratio, reduced the total cell number, neutrophil number and macrophage number in BALF, decreased the expression of *IL-6* and *TNFA*, lowered the expression of MDA and Fe^{2+} , while GSH increased, the expression of GPX4 and PRDX6 proteins increased, and the expression of ACSL4 was down-regulated in a dose-dependent manner. Glycyrrhizic acid can effectively improve septic lung injury, reduce lung injury symptoms, and exert a protective anti-iron death effect, and increase PRDX6 expression.

Keywords glycyrrhizic acid; sepsis acute lung injury; PRDX6; iron death

在脓毒症发生过程中, 其会导致机体多个器官系统发生功能障碍, 最后引起炎症反应的发生, 而其中肺脏是最容易受到影响的器官之一。急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是脓毒症引起的炎症性疾病, 其特征是顽固性低氧血症、气体交换受损、严重炎症反应和急性呼吸衰竭^[1]。现如今, 脓毒症肺损伤患者死亡率很高, 但是缺乏行之有效的治疗方法, 如何有效减轻脓毒症肺损伤症状仍然是当下临床降低脓毒症死亡率的重要难题。因此, 寻找改善脓毒症肺损伤症状的药物, 深入研究脓毒症肺损伤, 具有重要的临床意义。

中草药治疗呼吸系统疾病是现如今研究的热点, 甘草味甘性平, 具有清热解毒、缓急止痛等特点, 因常出现在多类方剂中, 也被称为“国老”。甘草酸(glycyrrhizic acid, GL)是甘草根部提取的成分之一, 研究发现其具有抗凋亡、抗炎和抗病毒等作用。前期研究发现, GL能有效抑制脂多糖诱导的ALI小鼠中炎症因子表达, 抑制炎症细胞浸润, 并发现其抗炎作用与NLRP3炎性小体相关^[2], 但具体的作用机制尚不明确。

研究发现, PRDX6(peroxiredoxin 6)属于抗氧化蛋白超家族, 与铁死亡中心调控蛋白GPX4功能相似^[3]。此外, PRDX6同时具有过氧化物酶和磷脂酶A2(phospholipase A2, PLA2)活性, 能清除 H_2O_2 和磷脂氢过氧化物。在生理还原剂以及底物选择和酶活功能上, PRDX6与谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)呈现出极大的相似性, 而GPX4又是铁死亡调控网络中最为核心的蛋白, 已有文献报道, PRDX6的缺失会降低硒蛋白的表达水平, 并通过减少GPX4表达进而诱导铁死亡^[4], RDX6的敲

低会显著促进铁死亡诱导剂触发的脂质过氧化和铁死亡^[5]。在ALI发生发展过程中, 铁死亡发挥着重要作用。本研究拟采用盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP)构建小鼠脓毒症肺损伤模型, 采用HE染色、Western blot、qRT-PCR及ELISA实验研究甘草酸对肺损伤的保护作用及与铁死亡的关系, 并为该疾病找到新的治疗途径。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器包括酶标仪购自日本SANYO公司; Mini-Protean3电源、垂直电泳槽购自美国Bio-Rad公司; UB-7酸度计购自美国Denver Instrument公司; CKX53倒置显微镜购自日本OLYMPUS公司。

1.2 主要试剂

甘草酸($\geq 99.8\%$)购自Selleck Chemicals公司。丙二醛(malondialdehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)、 Fe^{2+} 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。地塞米松磷酸钠注射液购自辰欣药业股份有限公司。PRDX6、GPX4、ACSL4和GAPDH抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 动物分组及模型建立

50只, 8周龄, 雄性的SPF级BALB/C小鼠, 体重18~22 g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司。小鼠饲养条件: 温度 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 相对湿度45%~65%, 12 h自动明暗室, 不限制进食进水, 进行适应性饲养1周后开始实验。BALB/C小鼠被随机分为5组(每组10只): 假手术组(SHAM)、模

型组 (CLP)、模型+阳性药组 (CLP+DEX)(地塞美松)、模型+甘草酸低剂量 (CLP+GLL)组及模型+甘草酸高剂量 (CLP+GLH)组。采用盲肠结扎穿孔术建立脓毒症肺损伤小鼠模型。假手术组不进行结扎和穿孔,其余小鼠进行盲肠结扎穿孔术。术后各组小鼠腹腔注射给药,其中CLP+DEX组小鼠腹腔注射5 mg/kg地塞美松,每天两次,共7天;CLP+GLL组小鼠腹腔注射50 mg/kg甘草酸,每天2次,共7天;CLP+GLH组小鼠腹腔注射100 mg/kg甘草酸,每天2次,共7天。

为探索铁死亡、脂质过氧化与GL治疗CLP的作用,雄性的SPF级BALB/C小鼠,被随机分成4组(每组8只):假手术组 (SHAM)、模型组 (CLP)、模型+liproxstatin-1给药组 (CLP+Lip-1)、模型+liproxstatin-1+甘草酸高剂量 (CLP+Lip-1+GLH)。CLP手术前16 h腹腔注射0.8 mg/kg Lip-1后进行CLP手术,术后小鼠腹腔注射100 mg/kg甘草酸,每天2次,共7天。

1.4 肺组织湿/干重(W/D)测定

未进行肺泡灌洗液实验的各组小鼠进行以下实验,取各组小鼠的右肺组织,生理盐水润洗后用滤纸轻轻吸去肺表面生理盐水,称重并做好记录,在阴凉通风的地方风干后再次称重记录,通过两次重量比较,计算湿重/干重(W/D)值。本动物实验经内蒙古民族大学附属医院医学伦理委员会审核并批准(伦理审批号:NM-LL-2024-12-06-01)。

1.5 肺组织病理检测

取各组小鼠左肺,采用4%多聚甲醛常温固定20 min后,进行组织脱水后石蜡包埋左肺组织,采用组织切片机将小鼠左肺组织切成3 μ m厚切片置于37 $^{\circ}$ C温水中捞起,烤片机65 $^{\circ}$ C,烤片45 min,并用自动染色机进行脱蜡染色,行HE染色后,显微镜观察肺组织病理性变化。

1.6 肺泡灌洗液细胞检测

注射器吸取预热的生理盐水,注入小鼠肺部并灌洗,30 s后缓慢抽回灌洗液再缓慢注入,重复此步骤至液体呈现乳白色泡沫状,收集肺泡灌洗液并置于冰上,使用无菌纱布过滤灌洗液,去除黏液和杂质。过滤后的灌洗液以4 $^{\circ}$ C、500 $\times$ g离心10 min,收集细胞沉淀,沉淀细胞加入0.5 mL 0.9%氯化钠溶液将细胞重悬至适当浓度(5×10^6 /mL)。将细胞悬液涂片后,用瑞氏-吉姆萨染液染色,对炎性细胞进行分

类并计数。

1.7 肺组织中氧化应激指标测定

取各组小鼠右肺组织,在液氮中快速研磨后,采用4 000 r/min离心20 min后,弃掉沉淀,保留上清液,依据试剂盒说明书检测肺组中MDA、GSH的表达情况。

1.8 肺组织中Fe²⁺含量测定

各组小鼠右肺在液氮中快速研磨裂解后,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心10 min保留上清液,按照Fe²⁺检测试剂盒说明检测肺组织中Fe²⁺含量。

1.9 qRT-PCR检测肺组织中炎症因子的表达情况

采用RNA提取试剂盒(TIANGEN)提取肺组织中总RNA,采用NanoDrop 2000分光光度计分析RNA的纯度和浓度($D_{260}/D_{280} > 1.8$)。总RNA转录为cDNA,应用SYBR Green法进行扩增,扩增条件:95 $^{\circ}$ C预变性10 min;95 $^{\circ}$ C变性30 s,60 $^{\circ}$ C退火/延伸30 s,共30个循环。GAPDH作为内参,用2^{- $\Delta\Delta$ CT}法计算IL-6、TNF α 的相对表达量。

TNF α -F, 5'-CCC TCA CAC TCA GAT CAT CTT CT-3'; TNF α -R, 5'-GCT ACG ACG TGG GCT ACA G-3'; IL-6-F, 5'-ATG AAG TTC CTC TCT GCA AGA GAC T-3'; IL-6-R, 5'-CAC TAG GTT TGC CGA GTA GAT CTC-3'; GAPDH-F, 5'-CGA CTT CAA CAG CGA CAC TCA C-3'; GAPDH-R, 5'-CCC TGT TGC TGT AGC CAA ATT C-3'。

1.10 免疫印迹实验

免疫印迹实验广泛应用于检测蛋白表达水平。将小鼠肺组织切成小块并置于研钵中,在研钵中加入液氮,不断研磨,使肺组织研磨成冻干粉状,每50 mg肺组织中加入1 mL裂解液裂解30 min,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心10 min取上清液进行BCA检测。确定蛋白浓度后加入上样缓冲液100 $^{\circ}$ C水浴作用5 min。配胶,加样并跑胶,转膜,选择5%脱脂牛奶进行室温封闭2 h;一抗PRDX6(1:1 000)、GPX4(1:1 000)和ACSL4(1:1 000)4 $^{\circ}$ C孵育过夜后回收;二抗(1:5 000)室温孵育1 h,显影,拍照。其中选择GAPDH作为内参。

1.11 统计学分析

本实验相关的数据选择GraphPad Prism 9进行分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。不同组别之间采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 时认定组别之间有显著性差异,数据具有统计学意义。

2 结果

2.1 甘草酸对肺损伤小鼠中肺脏病理损伤的影响

如图1所示, SHAM小鼠肺组织排列有序, 肺泡结构明晰, 大小均一, 间隔正常, 肺泡壁完整, 无明显的炎性细胞浸润现象。CLP组小鼠肺组织排列无序, 肺泡结构破裂、变形、融合, 伴有大量炎性细胞浸润。与CLP组相比较, 甘草酸低(腹腔注射 50 mg/kg 甘草酸, 每天2次, 共7天)、高剂量(腹腔注射 100 mg/kg 甘草酸, 每天2次, 共7天)及阳性药治疗组(腹腔注射 5 mg/kg地塞美松, 每天2次, 共7天)有效缓解了CLP肺泡结构破裂、变形、融合及炎性细胞浸润(图1)。

2.2 甘草酸对肺组织湿/干重(W/D)的影响

与SHAM小鼠相比, CLP组小鼠W/D值增高; 较CLP组小鼠, 甘草酸低、高剂量及阳性药治疗组W/D值明显降低(表1)。

2.3 甘草酸对小鼠炎症的影响

如表2所示, 较SHAM组, CLP组小鼠肺泡灌洗液(BALF)中总细胞数、中性粒细胞数及巨噬细胞数均明显增多($P<0.05$); 与CLP组相比, 甘草酸低、高剂量及阳性药治疗组小鼠BALF中总细胞数、中性粒细胞数及巨噬细胞数均明显减少, 差异有统计学意义($P<0.05$, 表2)。

qRT-PCR法检测结果显示, 较SHAM组, CLP组小鼠肺组织中 $IL-6$ 、 $TNFA$ 表达水平明显上升, 与CLP组相较, 甘草酸低、高剂量及阳性药治疗组小鼠BALF中 $IL-6$ 、 $TNFA$ 表达水平下降, 差异具有统计

学意义($P<0.05$, 表3)。

2.4 甘草酸对氧化应激相关指标及 Fe^{2+} 含量的影响

如表4所示, 较SHAM组, CLP组小鼠肺组织中MDA和 Fe^{2+} 含量升高, GSH含量下降; 与CLP组相较, 甘草酸低、高剂量及阳性药治疗组小鼠肺组织中MDA和 Fe^{2+} 含量下降, GSH含量上升, 差异具有统计学意义($P<0.05$, 表4)。

2.5 甘草酸对PRDX6及铁死亡相关蛋白表达的影响

如图2和表5所示, 采用Western blot检测小鼠肺组织中PRDX6及铁死亡的关键蛋白GPX4、ACSL4蛋白的表达情况, 较SHAM组小鼠肺组织, CLP组小鼠肺组织中PRDX6和GPX4蛋白的表达水平下降, ACSL4蛋白表达水平上升。与CLP组小鼠比较, 甘草酸低、高剂量及阳性药治疗组小鼠肺组织中PRDX6及GPX4蛋白表达水平升高, ACSL4蛋白表达水平下降。分子对接技术研究结果发现, 甘草酸与PRDX6具有较强的结合能力, 自由结合能 $-9.4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (图3)。

2.6 甘草酸及Lip-1对小鼠肺脏病理损伤的影响

给药结束后, 各组小鼠检测W/D值, 发现Lip-1可降低W/D值, GLH+Lip-1降低W/D值的作用与Lip-1作用相当(表6), HE染色发现, 较CLP组, CLP+Lip-1组治疗效果显著, 可见少量肺泡壁充血, 而CLP+GLH+LIP-1组治疗效果与CLP+Lip-1组治疗效果相当(图4), 检测血清中MDA、GSH和 Fe^{2+} 含量,

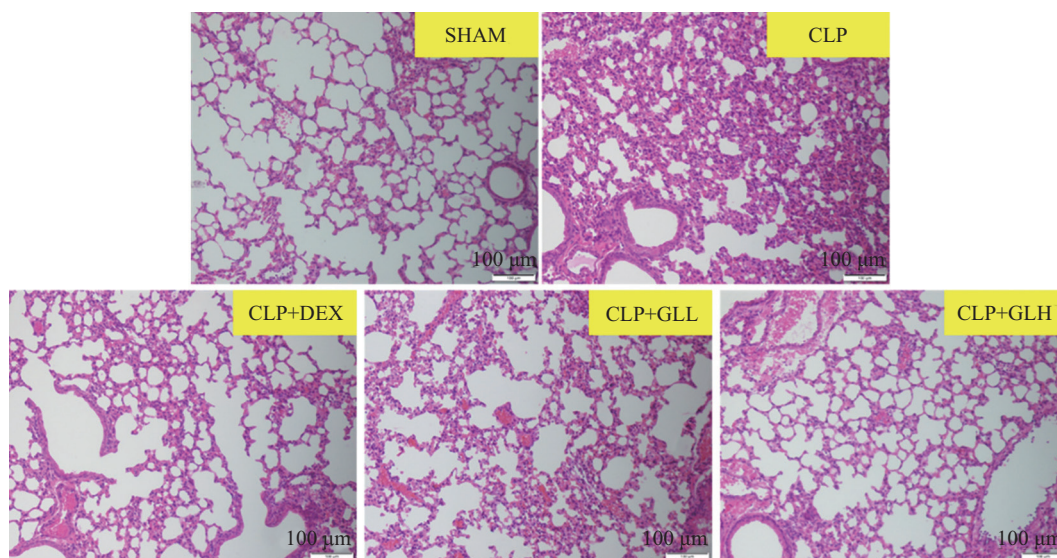


图1 各组小鼠肺组织病理改变(HE染色)

Fig.1 Histopathological changes in the lungs of mice in each group (HE staining)

表1 各组小鼠肺W/D值
Table 1 W/D ratios in the lungs of mice in each group

分组 Group	W/D值 W/D ratios
SHAM	4.12±0.61
CLP	6.74±0.58 [#]
CLP+GLL	5.20±0.12*
CLP+GLH	4.96±0.21*
CLP+DEX	5.19±0.13*

$n=6$ 。[#] $P<0.05$ vs 假手术组, * $P<0.05$ vs 模型组。

$n=6$ 。[#] $P<0.05$ vs SHAM group; * $P<0.05$ vs CLP group.

表2 各组小鼠BALF中总细胞数、中性粒细胞数及巨噬细胞数
Table 2 Total cell counts, neutrophil counts and macrophage counts in BALF of mice in each group

分组 Group	总细胞数 Total cell counts	中性粒细胞数 Neutrophil counts	巨噬细胞数 Macrophage counts
SHAM	4.30±0.09	1.64±0.27	1.08±0.12
CLP	10.90±0.87 [#]	4.15±0.10 [#]	4.11±0.08 [#]
CLP+GLL	8.36±0.44*	1.95±0.34*	3.12±0.14*
CLP+GLH	7.47±0.27*	1.99±0.07*	2.72±0.13*
CLP+DEX	8.50±0.55*	2.62±0.22*	3.12±0.08*

$n=6$ 。[#] $P<0.05$ vs 假手术组, * $P<0.05$ vs 模型组。

$n=6$ 。[#] $P<0.05$ vs SHAM group; * $P<0.05$ vs CLP group.

表3 各组小鼠肺组织中IL-6和TNF α mRNA的表达
Table 3 Expression of IL-6 and TNF α in lung tissues of mice in each group

分组 Group	IL-6/GAPDH	TNF α /GAPDH
SHAM	1.01±0.04	1.01±0.03
CLP	4.09±0.59 [#]	4.45±0.20 [#]
CLP+GLL	3.07±0.07*	3.06±0.12*
CLP+GLH	2.88±0.11*	2.80±0.08*
CLP+DEX	3.00±0.16*	3.24±0.04*

$n=6$ 。[#] $P<0.05$ vs 假手术组, * $P<0.05$ vs 模型组。

$n=6$ 。[#] $P<0.05$ vs SHAM group; * $P<0.05$ vs CLP group.

表4 各组小鼠肺组织中MDA, GSH和Fe²⁺的表达水平
Table 4 Levels of MDA, GSH and Fe²⁺ in lung tissues of mice from each group

分组 Group	MDA /nmol·L ⁻¹	GSH / μ mol·L ⁻¹	Fe ²⁺ /nmol·L ⁻¹
SHAM	3.33±0.16	13.58±0.07	6.19±0.16
CLP	5.82±0.31 [#]	7.59±0.14*	7.94±0.20 [#]
CLP+GLL	3.72±0.26*	9.8±0.08*	7.50±0.36*
CLP+GLH	3.93±0.12*	10.3±0.43*	7.07±0.07*
CLP+DEX	4.76±0.11*	9.13±0.13	7.13±0.07*

$n=6$ 。[#] $P<0.05$ vs 假手术组, * $P<0.05$ vs 模型组。

$n=6$ 。[#] $P<0.05$ vs SHAM group; * $P<0.05$ vs CLP group.

与CLP组相较, CLP+Lip-1组和GLP+CLP+Lip-1组小鼠肺组织中MDA和Fe²⁺含量下降, GSH含量上升, 具有统计学意义(表7)。

3 讨论

ALI是由创伤、输血、感染等多种因素所引起的, 其特征是顽固性低氧血症、气体交换受损、严重炎

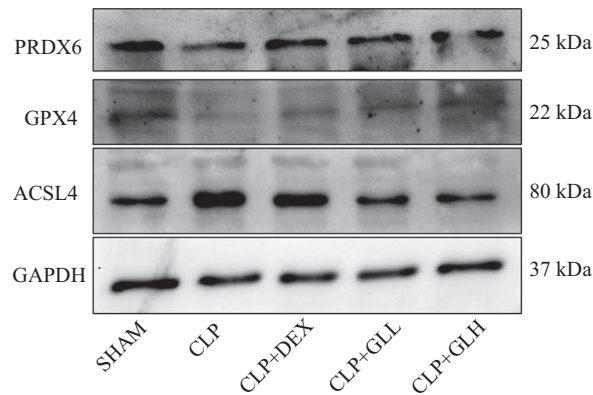


图2 各组小鼠肺组织中PRDX6和铁死亡相关蛋白的表达
Fig.2 Expression of PRDX6 and iron death-related proteins in lung tissues of mice in each group

表5 各组小鼠肺组织中PRDX6和铁死亡相关蛋白表达水平的比较

Table 5 Comparison of the expression levels of PRDX6 and iron death-related proteins in the lung tissues of mice in each group

分组 Group	PRDX6/GAPDH	GPX4/GAPDH	ACSL4/GAPDH
SHAM	0.82±0.03	1.55±0.07	0.23±0.03
CLP	0.43±0.02 [#]	0.69±0.02 [#]	0.48±0.06 [#]
CLP+GLL	0.86±0.16 [*]	1.26±0.09 [*]	0.32±0.01 [*]
CLP+GLH	0.73±0.07 [*]	1.37±0.10 [*]	0.28±0.01 [*]
CLP+DEX	0.82±0.20 [*]	0.90±0.01	0.33±0.02 [*]

n = 3. [#]*P* < 0.05 vs 假手术组, ^{*}*P* < 0.05 vs 模型组。
n = 3. [#]*P* < 0.05 vs SHAM group; ^{*}*P* < 0.05 vs CLP group.

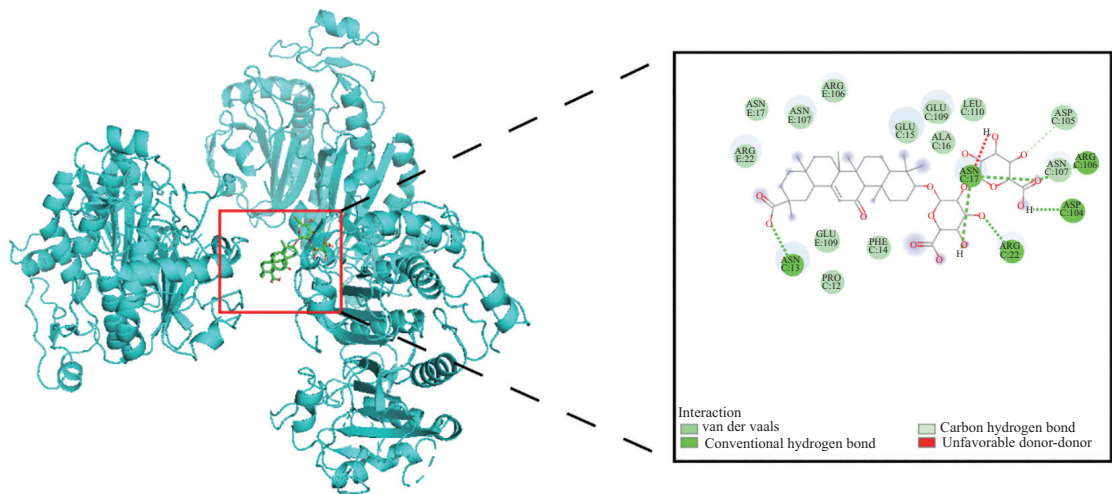


图3 甘草酸与 PRDX6分子的对接图
Fig.3 Docking diagram of glycyrrhizin and PRDX6 molecules

症反应和急性呼吸衰竭，脓毒症患者的并发症中包括肺损伤，严重者甚至会死亡。现如今，尽管脓毒症肺损伤的治疗已经报道，但每年因脓毒症肺损伤导致死亡的患者数仍居高不下。据报道，一些患者的死亡率高达60%，总体约40%^[6]。统计发现每年约有79 000人因肺损伤导致死亡，这严重影响了人们的生产生

活，目前迫切需要探讨 ALI的潜在相关机制，并为该疾病找到新的干预手段。
《神农本草经》中记载的甘草药用已有 2 000多年的历史。由于其具有抗病毒和抗菌作用，是治疗 COVID-19的所有推荐中药配方中的常用中药^[7]。甘草 (*Glycyrrhiza glabra* L.)是传统中药中常用的豆科

植物, 具有解热、解毒、抗菌等功效, 甘草酸(GL)是甘草中最重要的活性成分之一, 而且含量丰富、价格低廉。GL具有良好的药理作用和多种生物功能, 包括广泛的抗病毒活性和抗炎活性^[8]。研究表明, 在LPS诱导的巨噬细胞损伤模型中, GL可以通过抑制NF-κB通路中关键蛋白的表达进而抑制炎症反应^[9]。

同时, GL可降低过表达炎症因子小鼠海马神经元细胞中COX-2、TNFα和iNOS的表达水平^[10]。但GL减轻脓毒症肺损伤的作用及具体的作用机制仍然有待深入研究。本研究采用CLP建立脓毒症肺损伤小鼠模型, 并用GL进行干预。实验结果发现GL有效缓解了CLP小鼠中肺泡结构破裂、变形、融合及炎性

表6 各组小鼠肺W/D值
Table 6 W/D ratios in the lungs of mice in each group

分组 Group	W/D值 W/D ratios
SHAM	3.95±0.21
CLP	5.92±0.33 [#]
CLP+Lip-1	4.14±0.14*
CLP+GLH+Lip-1	4.17±0.07*

n=6。 [#]*P*<0.05 vs 假手术组, **P*<0.05 vs 模型组。
n=6。 [#]*P*<0.05 vs SHAM group; **P*<0.05 vs CLP group.

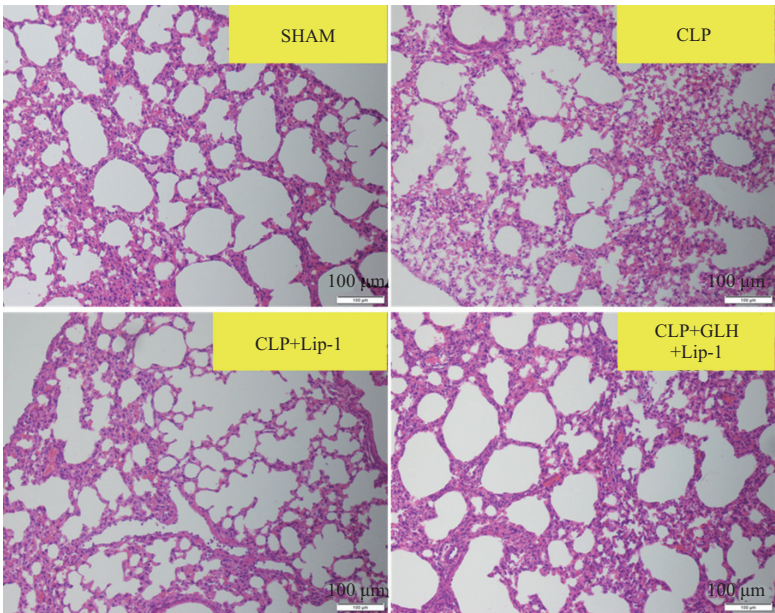


图4 各组小鼠肺组织病理改变(HE染色)
Fig.4 Histopathological changes in the lungs of mice in each group (HE staining)

表7 各组小鼠肺组织中MDA, GSH和Fe²⁺的表达水平
Table 7 Levels of MDA, GSH and Fe²⁺ in lung tissues of mice from each group

分组 Group	MDA /nmol·L ⁻¹	GSH /μmol·L ⁻¹	Fe ²⁺ /nmol·L ⁻¹
SHAM	2.95±0.07	17.07±0.34	5.02±0.03
CLP	6.11±0.17 [#]	6.88±0.11*	8.47±0.15 [#]
CLP+Lip-1	3.41±0.17*	10.2±0.17*	6.72±0.17*
CLP+GLH+Lip-1	3.37±0.07*	11.6±0.19*	6.21±0.24*

n=6。 [#]*P*<0.05 vs 假手术组, **P*<0.05 vs 模型组。
n=6。 [#]*P*<0.05 vs SHAM group; **P*<0.05 vs CLP group.

细胞浸润,降低了W/D值,减少了BALF中总细胞数、中性粒细胞数及巨噬细胞数,降低了BALF中IL-6、TNF α 表达水平。以上研究表明GL可通过抑制炎症而缓解脓毒症小鼠肺损伤,证实GL在脓毒症肺损伤治疗中的应用潜力。

作为高度保守的过氧化物酶家族成员,PRDX6具有保守的半胱氨酸残基,在细胞质中广泛存在并参与各种生物过程^[11]。临床研究发现,稳定期慢性阻塞性肺疾病患者外周血PRDX6水平降低与肺功能减退、临床症状加重及频繁急性加重相关^[12],研究发现GL具有抗氧化作用,能够激活Nrf2信号通路,而Nrf2是一个重要的转录因子,可以上调多种抗氧化相关基因的表达^[13],PRDX6可能也是其调控的靶点之一。GL具有抗炎作用,能够调节NF- κ B和MAPK等炎症信号通路,这些通路与氧化应激和细胞凋亡密切相关^[14]。PRDX6在调节细胞凋亡和氧化应激中发挥重要作用,因此甘草酸可能通过调控NF- κ B和MAPK信号通路影响PRDX6的功能,进而发挥其抗炎和抗氧化等生物学效应。本研究发现,GL能够显著增加肺组织中PRDX6的表达水平,GL和PRDX6之间存在较强的相互作用,可能是GL对脓毒症肺损伤的保护作用的一个重要机制。文献调研发现,PRDX6是铁死亡的负调控因子,铁死亡是一种铁依赖性的细胞死亡形式,主要由多不饱和脂肪酸介导,其特征是脂质活性氧(reactive oxygen species, ROS)的堆积^[15-16]。多种化合物和信号通路都可以诱导铁死亡,但最终都是通过直接或间接地影响谷胱甘肽过氧化物酶的活性,来降低细胞的抗氧化能力,致使脂质过氧化反应增加,引起铁死亡的发生^[17-18]。临床研究发现,在急性肺损伤患者呼吸道支气管灌洗液中铁的含量增加^[19],采用铁死亡抑制剂可减轻LPS诱导的肺组织损伤,缓解肺水肿并降低肺血管通透性^[20]。在脓毒症中,脂质过氧化通过破坏细胞膜的完整性,导致细胞损伤和炎症反应,研究表明,抑制脂质过氧化可以显著减轻脓毒症引起的急性肺损伤^[21]。铁死亡在脓毒症急性肺损伤中起着重要作用,抑制铁死亡可以显著改善肺组织的病理变化^[22]。GPX4是铁死亡标志物,其活性受到抑制会导致细胞对铁死亡的敏感性上升,而作为可以将脂肪酸转化为脂肪酰辅酶A酯的酶,ACSL4在铁死亡中发挥重要作用,是铁死亡激活的标志物^[23]。本研究发现甘草酸能够显著增加肺组织中GPX4表达水

平,降低ACSL4的表达水平。这表明甘草酸通过抑制铁死亡减轻肺损伤。

综上所述,甘草酸可以有效减轻脓毒症损伤,发挥保护性抗铁死亡作用,该作用机制可能与调控PRDX6有关。然而,本研究存在一定的局限性,缺少炎症因子和铁死亡的关系以及PRDX6调控细胞铁死亡具体分子机制的探讨,在今后的工作中有待进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] PARK I, KIM M, CHOE K, et al. Neutrophils disturb pulmonary microcirculation in sepsis-induced acute lung injury [J]. *Eur Respir J*, 2019, 53(3): 1800786.
- [2] WANG J M, REN C X, BI W H, et al. Glycyrrhizin mitigates acute lung injury by inhibiting the NLRP3 inflammasome *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 303: 115948.
- [3] FISHER A B, VASQUEZ-MEDINA J P, DODIA C, et al. Peroxiredoxin 6 phospholipid hydroperoxidase activity in the repair of peroxidized cell membranes [J]. *Redox Biol*, 2018, 14: 41-6.
- [4] FUJITA H, TANAKA Y K, OGATA S, et al. PRDX6 augments selenium utilization to limit iron toxicity and ferroptosis [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2024, 31(8): 1277-85.
- [5] LU B, CHEN X B, HONG Y C, et al. Identification of PRDX6 as a regulator of ferroptosis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40(10): 1334-42.
- [6] BELLANI G, LAFFEY J G, PHAM T, et al. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries [J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 788-800.
- [7] 王金鹏, 李显林, 王玲, 等. 复方甘草片治疗感染后咳嗽的meta分析[J]. 临床药物治疗杂志(WANG J P, LI X L, WANG L, et al. Meta-analysis on treatment of post-infectious cough by compound liquorice tablets [J]. *Journal of Clinical Pharmacotherapy*), 2018, 8(5): 31-6.
- [8] FOULADI S, MASJEDI M, GHASEMI R, et al. The *in vitro* impact of glycyrrhizic acid on CD4⁺ T lymphocytes through OX40 receptor in the patients with allergic rhinitis [J]. *Inflammation*, 2018, 41(5): 1690-701.
- [9] QIU M, HUANG K, LIU Y, et al. Modulation of intestinal microbiota by glycyrrhizic acid prevents high-fat diet-enhanced pre-metastatic niche formation and metastasis [J]. *Mucos Immunol*, 2019, 42(2): 67-75.
- [10] YA J, LIN L. Glycyrrhizin, an HMGB1 inhibitor, exhibits neuro-protective effects in rats after lithium-pilocarpine-induced status epilepticus [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2018, 12(4): 21-30.
- [11] SHAHNAJ S, POTSHANGBAM A M, CHOWHAN R K, et al. The anti-oxidant enzyme, Prdx6 might have *cis*-acting regulatory sequence(s) [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 149: 1139-50.
- [12] 孙江, 高骏飞, 杨培草. 外周血PRDX6与稳定期COPD患者临床特征及频繁急性加重的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, (SUN J, GAO J F, YANG P C. The relationship between peripheral blood PRDX6 and clinical characteristics and frequent acute exacerbation in patients with stable COPD [J]. *Journal of Molecular Diagnosis and Therapy*), 2024, 3: 407-11.

- [13] 刘勇攀, 郑东元, 徐勤科. 甘草酸苷调控Nrf2/HO-1信号通路治疗溃疡性结肠炎的机制探究[J]. 浙江医学(LIU Y P, ZHENG D Y, XU Q K. Glycyrrhizin suppresses oxidative stress injury in ulcerative colitis through Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. Zhejiang Medicine), 2024, 46: 2469-74,577.
- [14] KONG J, XIANG Q, GE W, et al. Network pharmacology mechanisms and experimental verification of licorice in the treatment of ulcerative colitis [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 324: 117691.
- [15] YANG W S, KIM K J, GASCHLER M M, et al. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(34): E4966-75.
- [16] STOCKWELL B R, FRIEDMANN ANGELI J P, BAYIR H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. Cell, 2017, 171(2): 273-85.
- [17] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. Cell, 2012, 149(5): 1060-72.
- [18] SEHM T, RAUH M, WIENDIECH K, et al. Temozolomide toxicity operates in a xCT/SLC7a11 dependent manner and is fostered by ferroptosis [J]. Oncotarget, 2016, 7(46): 74630-47.
- [19] WANG Y M, GONG F C, QI X, et al. Mucin 1 inhibits ferroptosis and sensitize vitamin E to alleviate sepsis-induced acute lung injury through GSK3 β /keap1-Nrf2-GPX4 pathway [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 2405943.
- [20] MIOTTO G, ROSSETTO M, PAOLO M L D, et al. insight into the mechanism of ferroptosis inhibition by ferrostatin-1 [J]. Redox Biol, 2020, 28: 101328.
- [21] ZHANG H, WANG Y, WANG S H, et al. Tangeretin alleviates sepsis-induced acute lung injury by inhibiting ferroptosis of macrophage via Nrf2 signaling pathway [J]. Chin Med, 2025, 20: 11.
- [22] ZOU F, ZOU J, DU Q, et al. XueBiJing injection improves the symptoms of sepsis-induced acute lung injury by mitigating oxidative stress and ferroptosis [J]. J Ethnopharmacol, 2025, 337(Pt1): 118732.
- [23] XU S, HE Y, LIN L, et al. The emerging role of ferroptosis in intestinal disease [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(4): 289.