

牡荆素调控 Sirt1/FoxO1 通路介导的铁死亡对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜损伤的保护作用

李艳峰, 卢振民*

新乡医学院第一附属医院 耳鼻咽喉科, 河南 新乡 453100

摘要: **目的** 探究牡荆素对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜损伤的保护作用及其调控机制。**方法** 将 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、牡荆素 (3、6、12 mg/kg), 及牡荆素 (12 mg/kg) + EX527 (5 mg/kg) 组, 每组各 10 只。除对照组外, 其余各组大鼠均采用卵清白蛋白诱导建立变应性鼻炎大鼠模型, 模型构建成功后, 各组大鼠 ip 相应剂量药物, 对照组和模型组大鼠 ip 等量的生理盐水, 1 次/d, 连续 14 d。末次给药结束后 30 min, 记录各组大鼠行为学评分, 观察鼻黏膜组织病理形态学变化; 检测鼻黏膜组织超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH)、丙二醛 (MDA)、活性氧簇 (ROS)、铁离子 (Fe^{2+}) 水平, 铁死亡相关蛋白溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4)、酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (ACSL4) 以及沉默信息调节因子 1 (Sirt1)、叉头框蛋白 O1 (FoxO1)、p-FoxO1、Ac-FoxO1 蛋白表达。**结果** 与模型组相比, 牡荆素各剂量组大鼠行为学评分均显著降低, 鼻黏膜损伤显著改善 ($P < 0.05$); 大鼠鼻黏膜组织匀浆 SOD、GSH 活性显著升高, MDA、ROS、 Fe^{2+} 含量均显著降低 ($P < 0.05$); 大鼠鼻黏膜组织 SLC7A11、GPX4、Sirt1、FoxO1 蛋白表达显著升高, p-FoxO1、Ac-FoxO1、ACSL4 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性。**结论** 牡荆素能够改善变应性鼻炎大鼠鼻黏膜损伤, 其机制与激活鼻黏膜组织 Sirt1/FoxO1 通路, 抑制细胞铁死亡有关。

关键词: 牡荆素; 变应性鼻炎; 铁死亡; 沉默信息调节因子 1/叉头框蛋白 O1 通路; 溶质载体家族 7 成员 11

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2024)01 - 0014 - 09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.01.003

Protective effect of vitexin on ferroptosis mediated by the Sirt1/FoxO1 pathway on nasal mucosal damage with allergic rhinitis in rats

LI Yanfeng, LU Zhenmin

Department of Otolaryngology, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453100, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect and regulatory mechanism of vitexin on nasal mucosal damage with allergic rhinitis in rats. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, model group, vitexin (3, 6, and 12 mg/kg) group, and vitexin (12 mg/kg) + EX527 (5 mg/kg) with 10 rats in each group. Except for the control group, all other groups of rats were induced with ovalbumin to establish a rat model of allergic rhinitis. After the successful establishment of the model, the rats in each group were ip administered with the corresponding dose of drugs, and the rats in the control group and the model group were ip administered with the same amount of normal saline once daily for 14 consecutive days. 30 Minutes after the end of the last administration, record the behavioral scores of rats in each group and observe the pathological and morphological changes of nasal mucosa tissue. Detect the levels of SOD, GSH, MDA, ROS, and Fe^{2+} in nasal mucosa tissue, as well as the expression of ferroptosis related proteins SLC7A11, GPX4, ACSL4, Sirt1, FoxO1, p-FoxO1, and Ac-FoxO1 proteins. **Results** Compared with model group, the behavioral scores of rats in vitexin groups were significantly decreased, and the nasal mucosa injury was significantly improved ($P < 0.05$). The activities of SOD and GSH in rat nasal mucosa homogenate were significantly increased, while the contents of MDA, ROS and Fe^{2+} were significantly decreased ($P < 0.05$). The protein expressions of SLC7A11, GPX4, Sirt1, and FoxO1 in rat nasal mucosa were significantly increased, while the protein expressions of p-FoxO1, Ac-FoxO1, and ACSL4 were significantly decreased ($P < 0.05$), and were dose-dependent. **Conclusion** Vitexin can improve nasal mucosal damage in allergic rhinitis rats, and its mechanism is related

收稿日期: 2023-11-10

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目 (20B320117)

作者简介: 李艳峰, 男, 主治医师, 硕士, 研究方向为耳鼻咽喉科中医治疗。E-mail: liyangfeng198201@163.com

*通信作者: 卢振民, 男, 主任医师, 研究方向为耳鼻咽喉科中医治疗。E-mail: lzhmin@126.com

to activating the Sirt1/FoxO1 pathway and inhibiting ferroptosis in nasal mucosal tissue.

Key words: vitexin; allergic rhinitis; ferroptosis; Sirt1/FoxO1 pathway; SLC7A11

变应性鼻炎是一种以鼻塞、流鼻涕、打喷嚏及鼻痒等为主要特征且病因较为复杂的鼻黏膜变应性炎症性的疾病,也被称为过敏性鼻炎^[1]。近年来,变应性鼻炎的发病率呈逐年上升态势,全球有 10%~40% 的人口患有变应性鼻炎,严重影响了患者的生活质量,已经成为耳鼻咽喉科临床医生和患者共同关注的重要医疗疾病^[2]。目前,关于变应性鼻炎的治疗药物主要包含抗组胺药、抗白三烯和皮质类固醇等。然而,上述药物在长期治疗变应性鼻炎中可能会有一定的不良反应,且在治疗患者中疗效并不理想。此外,变应性鼻炎的发病机制也较为复杂,与氧化应激反应、炎症及免疫调控失衡等密切相关。但是有关其发病的具体机制至今尚未完全阐明。因此,积极探寻变应性鼻炎的发病机制并开发新型治疗药物对于改善变应性鼻炎患者临床症状具有重大意义。

铁死亡是由脂质过氧化引起的一种铁依赖性、非凋亡形式的调节性细胞死亡,是机体抗氧化和氧化系统失衡的结果^[3]。铁死亡与呼吸道炎症性疾病密切相关。研究显示,白细胞介素-6 (IL-6) 能够通过诱导活性氧簇 (ROS) 依赖性的脂质过氧化以及铁离子稳态,诱导上皮细胞铁死亡^[4]。采用铁死亡抑制剂处理能够明显减轻氧化损伤、影响铁代谢进而抑制卵清白蛋白诱导的小鼠哮喘以及白细胞介素-13 (IL-13) 诱导的支气管上皮细胞铁死亡发生^[5]。此外,在脂多糖 (LPS) 诱导的人支气管上皮细胞系 BEAS-2B 体外急性呼吸窘迫综合征模型中,细胞铁死亡标志蛋白溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 表达明显降低,丙二醛 (MDA) 和铁离子水平显著升高,而铁死亡抑制剂 ferrostatin-1 处理后能够改善 LPS 诱导的损伤,减轻肺部炎症^[6]。新近研究证实,膳食碘能够通过调控活化 B 细胞铁死亡改善变应性鼻炎症状^[7]。此外,PM_{2.5} 能够通过激活腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 介导的细胞自噬促进人鼻黏膜上皮细胞铁死亡,从而引起鼻黏膜上皮损伤,加重变应性鼻炎,而采用铁死亡抑制剂去铁胺和 ferrostatin-1 能够显著逆转 PM_{2.5} 诱导的人鼻黏膜上皮细胞铁死亡,改善 PM_{2.5} 诱导的鼻黏膜损伤^[8]。以上研究表明铁死亡可能是变应性鼻炎鼻黏膜损伤的治疗的潜在靶点。沉默信息调节因子 1 (Sirt1) /叉头

框蛋白 O1 (FoxO1) 信号通路参与了氧化应激^[9]、细胞凋亡^[10]以及铁死亡^[11]等过程。研究证实, Sirt1 能够促使 FoxO1 去乙酰化进而影响下游基因表达,从而抑制机体氧化应激反应^[12]。Yuan 等^[13]研究证实, Sirt1 能够通过抑制变应性鼻炎小鼠中 Th2 细胞介导的促炎症细胞因子的释放,减轻小鼠过敏性症状。此外,白藜芦醇能够通过激活鼻黏膜组织中 Sirt1 蛋白表达,抑制炎症细胞因子释放,进而改善卵清白蛋白诱导的小鼠变应性鼻炎^[14],表明通过调节 Sirt1/FoxO1 通路可能是改善变应性鼻炎的重要机制。

牡荆素是一种天然生物活性黄酮类化合物,具有抗炎^[15]、抗氧化^[16]以及抗肿瘤^[17]等多种生物学活性,且对疾病的治疗效果较为显著,不良反应小、安全性较高等优势,被认为是一种极具开发潜力的活性天然化合物。本课题组前期研究显示,牡荆素能够通过抑制 AMPK/Nod 样受体蛋白 3 (NLRP3) 通路介导的细胞焦亡,降低中耳黏膜组织炎症反应,减轻分泌性中耳炎大鼠中耳黏膜组织病理性损伤^[18]。但是,有关牡荆素对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜损伤的影响及其调控机制尚不清楚。为此,本研究拟通过卵清白蛋白诱导变应性鼻炎大鼠模型,以 Sirt1/FoxO1 信号通路介导的细胞铁死亡为机制靶标,探究牡荆素对变应性鼻炎模型大鼠鼻黏膜损伤的保护作用,以期阐明牡荆素对变应性鼻炎的治疗作用及为变应性鼻炎疾病的防治提供一定的理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性, SPF 级, SD 大鼠 90 只, 6~8 周龄, 体质量 180~200 g, 购买于上海斯莱克实验动物有限责任公司 [SCXK (沪) 2021-0026]。动物饲养条件为温度: (25±2) °C, 相对湿度 50%~65%, 12 h/12 h 昼夜交替光照, 自由饮食、饮水, 适应性喂养 1 周。动物实验符合 3R 原则, 且本实验研究通过医院医学伦理委员会审查 (批准号 LLSC2021-08-015)。

1.1.2 试剂 牡荆素 (质量分数 >98%, 成都植化纯生物技术有限公司, 批号 20220312); Sirt1 抑制剂 EX527 (美国 ApexBio 公司, 货号 A4181); 卵清白蛋白、氢氧化铝粉末 [西格玛奥德里奇 (上海)]

贸易有限公司, 货号 M0228A、MKCM1237]; 超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH)、丙二醛 (MDA)、Fe²⁺检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 货号 A001-3-2、A005-1-2、A003-1-2、A039-2-1); ROS 检测试剂盒 (北京百奥莱博科技有限公司, 货号 SY0802); 苏木素 - 伊红 (HE) 染色试剂盒、蛋白质浓度测定试剂盒、ECL 发光液、山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠二抗、GPX4 抗体、SLC7A11 抗体及 β -actin 抗体 (上海碧云天生物技术公司, 批号 C0105S、P0011、P0018FS、A0409、A0413、AF7020、AF7992、AF0003); ACSL4 抗体 (Abcam 公司, 货号 ab155282); Sirt1 抗体、FoxO1 抗体、磷酸化 FoxO1 (p-FoxO1, 美国 Cell Signaling Technology, 货号 9475、2880、9461); 乙酰化-FoxO1 抗体 (Ac-FoxO1, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 货号 PA5104560)。

1.1.3 仪器 BX53 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司); H-2050R-1 型离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); LD-96A 型酶标仪 (山东莱恩德智能科技有限公司); Gel dox XR⁺型凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组、造模及给药 将 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、牡荆素 (3、6、12 mg/kg) 组^[18], 每组各 10 只。除对照组外, 其余各组大鼠均采用卵清白蛋白诱导建立变应性鼻炎大鼠模型。依据参考文献报道^[1]复制变应性鼻炎大鼠模型: 以 0.3 mg 卵清白蛋白为抗原 + 30 mg 氢氧化铝为佐剂混合后溶解于 1 mL 生理盐水中制备混悬液, 予以大鼠 ip 进行基础致敏, 隔天 1 次, 连续 8 次, 共计 15 d。第 16 天时经鼻腔滴入 2% 的卵清白蛋白溶液 (每侧 50 μ L), 连续 7 d, 强化致敏。在末次滴鼻结束后 30 min, 观察大鼠在 5 min 内的行为, 并按照变应性鼻炎行为学指标进行评分, 若总分 ≥ 5 分则视为变应性鼻炎大鼠模型构建成功^[19]。待变应性鼻炎模型构建成功后, 牡荆素各剂量组大鼠 ip 相应药物浓度。对照组和模型组大鼠 ip 等量的生理盐水, 1 次/d, 连续 14 d。

1.2.2 大鼠行为学评分 末次给药结束 30 min 后, 观察并记录在 5 min 内各组大鼠的行为并进行行为学评分。喷嚏次数: 1~3 个计 1 分, 4~10 个计 2 分, ≥ 11 个计 3 分; 鼻涕流: 鼻涕流至前鼻孔计 1 分, 超出前鼻孔计 2 分, 鼻涕流至满面计 3 分; 鼻

痒程度: 轻度的瘙痒、抓挠 1~2 次计 1 分, 剧烈瘙痒、抓挠 > 2 次计 2 分; 将上述每项评分相加得到其行为学评分, 若行为学评分 ≥ 5 分视为模型构建成功^[1]。

1.2.3 大鼠鼻黏膜组织形态学观察 末次给药结束后, ip 戊巴比妥钠麻醉大鼠, 进行鼻腔开缝, 剥离鼻黏膜组织, 放置于 4% 的多聚甲醛中固定 2 d, 梯度乙醇脱水、二甲苯透明、组织石蜡包埋、切片 3~5 μ m, 行 HE 染色, 显微镜下观察鼻黏膜组织形态学变化。

1.2.4 大鼠鼻黏膜组织中氧化应激指标及 Fe²⁺水平检测 取各组大鼠鼻黏膜组织, 加入预冷的生理盐水充分碾磨, 4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液, 采用生化法检测鼻黏膜组织匀浆中 SOD、GSH、MDA 含量, 比色法测定 Fe²⁺含量。

1.2.5 ROS 水平检测 取鼻黏膜组织 50 mg, 加入适量的缓冲溶液进行充分碾磨, 于 4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液, 按照 ROS 检测试剂盒进行 ROS 含量测定, 使用荧光酶标仪测定荧光强度, BCA 法测定蛋白质浓度。

1.2.6 Western blotting 检测铁死亡相关蛋白及 Sirt1/FoxO1 通路蛋白表达 末次给药结束后, 即将大鼠处死, 取适量的鼻黏膜组织并提取总蛋白, 按照 1:5 质量与体积比加入细胞裂解液, 于 4 $^{\circ}$ C 条件下裂解 40 min; BCA 法测定各组大鼠鼻黏膜组织蛋白质浓度; 蛋白上样 (按照每孔上样量 30 μ g 计算得出上样体积); 凝胶电泳; 湿转法转膜; 5% BSA 室温封闭 2 h; 分别加 Sirt1 抗体 (1:500)、Ac-FoxO1 抗体 (1:500)、p-FoxO1 抗体 (1:500)、FoxO1 抗体 (1:1000)、ACSL4 抗体 (1:1000)、SLC7A11 (1:500)、GPX4 (1:1000) 以及 β -actin 抗体 (1:2 000), 4 $^{\circ}$ C 条件下孵育 16 h; 37 $^{\circ}$ C 条件下二抗孵育 60 min; 去除二抗后 TBST 洗膜 15 min; 滴加显影液于 Gel Doc XR⁺成像系统中显影拍照, 并采用 Image Pro Plus 6.0 软件进行蛋白质条带灰度值半定量分析。

1.2.7 Sirt1 抑制剂对牡荆素改善大鼠鼻黏膜损伤的影响

将 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、牡荆素 (12 mg/kg) 组、牡荆素 + Sirt1 抑制剂 (EX527, 5 mg/kg) 组, 每组各 10 只。除对照组外, 其余各组大鼠均采用卵清白蛋白诱导建立变应性鼻炎大鼠模型。待模型构建成功后, 牡荆素组大鼠 ip 12 mg/kg

牡荆素; 牡荆素+Sirt1 抑制剂组大鼠 ip 12 mg/kg 牡荆素后, 即刻注射 5 mg/kg EX527; 对照组和模型组大鼠 ip 等量的生理盐水。各组大鼠给药 1 次/d, 连续 14 d。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。

2 结果

2.1 牡荆素对大鼠行为学评分的影响

如表 1 所示, 与模型组相比, 牡荆素各剂量组大鼠行为学评分均显著降低 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性。

表 1 各组大鼠行为学评分比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1 Comparison of behavioral scores of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	行为学评分
对照	—	1.90 ± 0.58
模型	—	7.30 ± 0.67*
牡荆素	3	4.90 ± 0.57#
	6	3.50 ± 0.53#&
	12	2.80 ± 0.63#&△

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与牡荆素 3 mg kg⁻¹ 组比较: & $P < 0.05$; 与牡荆素 6 mg kg⁻¹ 组比较: △ $P < 0.05$ 。
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; & $P < 0.05$ vs vitexin 3 mg kg⁻¹ group; △ $P < 0.05$ vs vitexin 6 mg kg⁻¹ group.

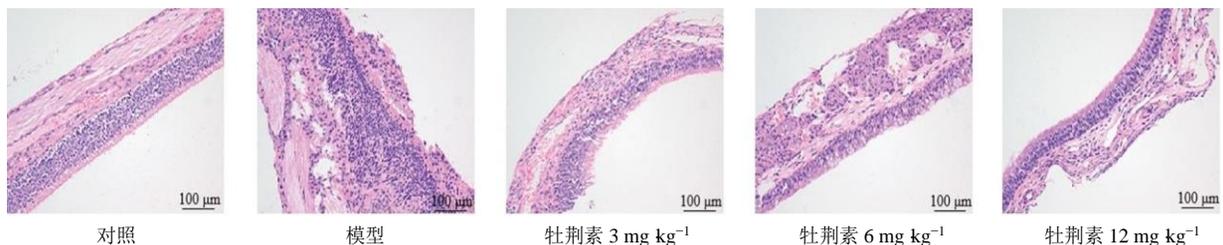


图 1 各组大鼠鼻黏膜组织病理学 (HE, ×200)

Fig. 1 Histopathology of nasal mucosa of rats in each group (HE, ×200)

($P < 0.05$), 且呈剂量相关性。

2.6 Sirt1 抑制剂对牡荆素改善大鼠鼻黏膜损伤的影响

如表 5、图 4 所示, 与模型组相比, 牡荆素组大鼠行为学评分显著降低 ($P < 0.05$), 鼻黏膜上皮损伤明显减轻。与牡荆素组相比, 牡荆素+EX527 组大鼠行为学评分显著升高 ($P < 0.05$), 鼻黏膜上皮损伤程度加重。

2.2 牡荆素对大鼠鼻黏膜组织损伤的影响

对照组大鼠鼻黏膜组织形态、结构正常。模型组大鼠鼻黏膜组织结构损伤严重, 纤毛出现大片脱落, 且伴有大量的炎症性细胞浸润, 固有层血管扩张明显。与模型组相比, 牡荆素各剂量组大鼠鼻黏膜组织上皮排列相对整齐, 纤毛完整、排列方向一致, 炎症性细胞浸润程度明显减轻, 固有层血管扩张降低, 且呈剂量相关性改善鼻黏膜损伤, 见图 1。

2.3 牡荆素对大鼠鼻黏膜组织氧化应激水平及 Fe²⁺水平的影响

如表 2 所示, 与模型组相比, 牡荆素各剂量组大鼠鼻黏膜组织匀浆 SOD、GSH 活性显著升高, MDA、ROS、Fe²⁺ 含量均显著降低 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性。

2.4 牡荆素对大鼠鼻黏膜组织铁死亡相关蛋白表达的影响

如图 2、表 3 所示, 与模型组相比, 牡荆素各剂量组大鼠鼻黏膜组织 SLC7A11、GPX4 蛋白表达显著升高, ACSL4 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性。

2.5 牡荆素对大鼠鼻黏膜组织 Sirt1/FoxO1 通路的影响

如图 3、表 4 所示, 与模型组相比, 牡荆素各剂量组大鼠鼻黏膜组织 Sirt1、FoxO1 蛋白表达均显著升高, p-FoxO1、Ac-FoxO1 蛋白表达显著降低

2.7 Sirt1 抑制剂对大鼠鼻黏膜氧化应激及 Fe²⁺水平的影响

如表 6 所示, 与模型组相比, 牡荆素组大鼠鼻黏膜组织匀浆 SOD、GSH 活性显著升高, MDA、ROS、Fe²⁺ 含量均显著降低 ($P < 0.05$)。与牡荆素组相比, 牡荆素+EX527 组大鼠鼻黏膜组织匀浆 SOD、GSH 活性显著降低, MDA、ROS、Fe²⁺ 含量均显著升高 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠鼻黏膜组织 SOD、GSH、MDA、ROS、Fe²⁺水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Comparison of SOD, GSH, MDA, ROS, and Fe²⁺ levels in nasal mucosa tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	SOD/(U mg ⁻¹)	GSH/(U mg ⁻¹)	MDA/(nmol mg ⁻¹)	ROS/(RFU mg ⁻¹)	Fe ²⁺ /(μmol g ⁻¹)
对照	—	197.55 ± 14.98	105.61 ± 16.10	3.89 ± 0.47	0.78 ± 0.06	0.37 ± 0.05
模型	—	127.14 ± 16.69*	51.89 ± 12.21*	7.68 ± 0.88*	3.66 ± 0.31*	0.89 ± 0.08*
牡荆素	3	147.77 ± 13.33 [#]	68.81 ± 14.03 [#]	6.67 ± 0.59 [#]	2.31 ± 0.14 [#]	0.69 ± 0.07 [#]
	6	162.17 ± 15.59 ^{#&}	83.78 ± 13.66 ^{#&}	5.45 ± 0.61 ^{#&}	1.68 ± 0.21 ^{#&}	0.54 ± 0.07 ^{#&}
	12	179.98 ± 18.82 ^{#&Δ}	98.46 ± 15.29 ^{#&Δ}	4.49 ± 0.72 ^{#&Δ}	0.97 ± 0.10 ^{#&Δ}	0.43 ± 0.05 ^{#&Δ}

与对照组比较: *P<0.05; 与模型组比较: [#]P<0.05; 与牡荆素 3 mg kg⁻¹组比较: [&]P<0.05; 与牡荆素 6 mg kg⁻¹组比较: ^ΔP<0.05。
*P < 0.05 vs control group; [#]P < 0.05 vs model group; [&]P < 0.05 vs vitexin 3 mg kg⁻¹ group; ^ΔP < 0.05 vs vitexin 6 mg kg⁻¹ group.

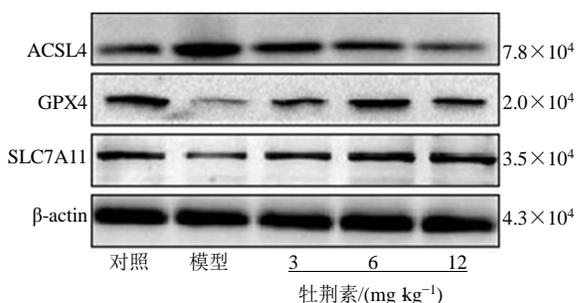


图 2 各组大鼠鼻黏膜组织 SLC7A11、GPX4、ACSL4 蛋白表达条带图

Fig. 2 Expression bands of SLC7A11, GPX4, and ACSL4 proteins in the nasal mucosa of rats in each group

表 3 各组大鼠鼻黏膜组织 SLC7A11、GPX4、ACSL4 蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Relative expression of SLC7A11, GPX4, and ACSL4 proteins in nasal mucosa tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	蛋白相对表达量		
		ACSL4	GPX4	SLC7A11
对照	—	1.03 ± 0.15	1.06 ± 0.11	1.01 ± 0.14
模型	—	2.41 ± 0.28*	0.42 ± 0.06*	0.46 ± 0.06*
牡荆素	3	1.83 ± 0.19 [#]	0.61 ± 0.07 [#]	0.59 ± 0.05 [#]
	6	1.52 ± 0.16 ^{#&}	0.72 ± 0.06 ^{#&}	0.72 ± 0.08 ^{#&}
	12	1.20 ± 0.17 ^{#&Δ}	0.81 ± 0.08 ^{#&Δ}	0.89 ± 0.10 ^{#&Δ}

与对照组比较: *P<0.05; 与模型组比较: [#]P<0.05; 与牡荆素 3 mg kg⁻¹组比较: [&]P<0.05; 与牡荆素 6 mg kg⁻¹组比较: ^ΔP<0.05。
*P < 0.05 vs control group; [#]P < 0.05 vs model group; [&]P < 0.05 vs vitexin 3 mg kg⁻¹ group; ^ΔP < 0.05 vs vitexin 6 mg kg⁻¹ group.

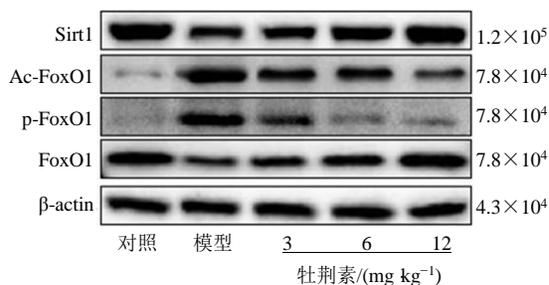


图 3 各组大鼠 Sirt1、FoxO1、p-FoxO1、Ac-FoxO1 蛋白表达条带图

Fig. 3 Protein expression bands of Sirt1, FoxO1, and Ac-FoxO1 in each group of rats

2.8 Sirt1 抑制剂对大鼠鼻黏膜组织 Sirt1/FoxO1 通路及铁死亡的影响

如图 5、表 7 所示,与模型组相比,牡荆素组大鼠鼻黏膜组织中 Sirt1、FoxO1、GPX4、SLC7A11 蛋白表达均显著升高, p-FoxO1、Ac-FoxO1、ACSL4 蛋白表达均显著降低 (P<0.05)。与牡荆素组相比,牡荆素+EX527 组大鼠鼻黏膜组织中 Sirt1、FoxO1、GPX4、SLC7A11 蛋白表达均显著降低, p-FoxO1、Ac-FoxO1、ACSL4 蛋白表达均显著升高 (P<0.05)。

3 讨论

变应性鼻炎具有发病率、复发率高等特点,但

是目前有关其防治手段较为有限,加之变应性鼻炎临床症状与分泌性中耳炎、过敏性结膜炎及鼻窦炎等疾病的发生密切相关,已严重影响患者的生活质量,增加了社会及家庭的经济负担。现如今,变应性鼻炎患者的临床治疗药物多以糖皮质激素及抗组胺类药物为主,能够明显减轻患者症状,但是长时间的使用会诱发患者鼻出血、嗜睡等不良反应^[1]。伴随中医药在防治变应性鼻炎中的不断发展,其在变应性鼻炎防治中的优势已逐渐显现,可以显著弥补糖皮质激素及抗组胺类药物的不足之处。

牡荆素是从干燥的山楂叶中提取并分离得到

表 4 各组大鼠鼻黏膜组织 Sirt1、FoxO1、p-FoxO1、Ac-FoxO1 蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 Relative expression of Sirt1, FoxO1, p-FoxO1, and Ac-FoxO1 proteins in nasal mucosa tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	Sirt1	Ac-FoxO1	FoxO1	p-FoxO1
对照	—	1.06 ± 0.16	1.05 ± 0.18	1.02 ± 0.19	1.02 ± 0.11
模型	—	0.52 ± 0.07*	3.21 ± 0.42*	0.43 ± 0.08*	3.02 ± 0.47*
牡荆素	3	0.64 ± 0.06 [#]	2.35 ± 0.31 [#]	0.56 ± 0.07 [#]	1.92 ± 0.32 [#]
	6	0.75 ± 0.08 ^{#&}	2.10 ± 0.29 ^{#&}	0.76 ± 0.10 ^{#&}	1.43 ± 0.12 ^{#&}
	12	0.95 ± 0.12 ^{#&Δ}	1.73 ± 0.28 ^{#&Δ}	0.97 ± 0.12 ^{#&Δ}	1.12 ± 0.10 ^{#&Δ}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与牡荆素 3 mg kg⁻¹ 组比较: [&] $P < 0.05$; 与牡荆素 6 mg kg⁻¹ 组比较: ^Δ $P < 0.05$ 。
* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs vitexin 3 mg kg⁻¹ group; ^Δ $P < 0.05$ vs vitexin 6 mg kg⁻¹ group.

表 5 各组大鼠行为学评分比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 5 Comparison of behavioral scores of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	行为学评分
对照	—	2.00 ± 0.47
模型	—	7.50 ± 0.53*
牡荆素	12	2.90 ± 0.57 [#]
牡荆素+EX527	12+5	6.50 ± 0.53 ^{&}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与牡荆素组比较: [&] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs vitexin group.

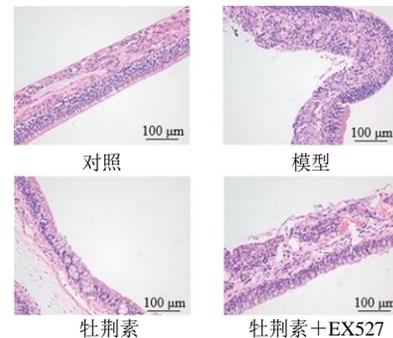


图 4 Sirt1 抑制剂对大鼠鼻黏膜组织病理形态学的影响 (HE, ×200)

Fig. 4 Effect of Sirt1 inhibitor on the pathological morphology of rat nasal mucosa tissue (HE, ×200)

表 6 各组大鼠鼻黏膜组织 SOD、GSH、MDA、ROS、Fe²⁺水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 6 Comparison of SOD, GSH, MDA, ROS and, Fe²⁺ levels in nasal mucosa tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	SOD/(U mg ⁻¹)	GSH/(U mg ⁻¹)	MDA/(nmol mg ⁻¹)	ROS/(RFU mg ⁻¹)	Fe ²⁺ /(μmol g ⁻¹)
对照	—	202.11 ± 18.86	110.34 ± 18.19	4.01 ± 0.50	0.85 ± 0.10	0.41 ± 0.07
模型	—	136.69 ± 17.73*	60.12 ± 10.23*	8.13 ± 0.95*	3.79 ± 0.37*	1.01 ± 0.10*
牡荆素	12	186.55 ± 19.03 [#]	102.12 ± 14.43 [#]	4.82 ± 0.74 [#]	1.18 ± 0.16 [#]	0.57 ± 0.08 [#]
牡荆素+EX527	12+5	148.10 ± 16.66 ^{&}	71.12 ± 13.06 ^{&}	7.16 ± 0.10 ^{&}	2.87 ± 0.34 ^{&}	0.89 ± 0.11 ^{&}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与牡荆素组比较: [&] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs vitexin group.

的一种黄酮类单体, 具有抗炎、抗氧化等生物学作用。研究显示, 牡荆素能够降低 LPS 诱导的支气管上皮细胞凋亡及炎症因子的释放^[20]。另外, 牡荆素能够通过调控自噬、炎症以及氧化应激等途径改善过敏性哮喘诱发的肺部损伤^[21]。以上研究提示, 牡荆素能够改善呼吸道炎症性疾病, 但是有关其对上呼吸道炎症性疾病变应性鼻炎的作用尚不清楚。为此, 本研究首先通过构建变应性鼻炎大鼠模型, 观察牡荆素对其治疗效果。结果显示, 牡荆素能够以剂量相关性降低变应性鼻炎大鼠行为学评分, 改善鼻黏膜组织病理性损伤, 表明牡荆素具有治疗变应

性鼻炎作用。铁死亡是一种新型的细胞调节性死亡, 被认为是铁依赖性的脂质过氧化反应的异常代谢, 导致 ROS 产生增加, 进而诱发机体脂质过氧化反应, 从而触发细胞死亡^[22-24]。SOD 和 GSH 作为细胞内抗氧化损伤的关键调节酶, 其活性的降低可导致细胞内 ROS 的积累增加, 诱导细胞损伤^[25]。MDA 作为细胞膜脂质过氧化的终产物, 其含量的高低是反映细胞损伤的重要指标^[26]。此外, 铁离子可通过 Fenton 反应诱导 ROS 产生增加以及脂质过氧化反应, 并最终导致细胞产生氧化应激损伤^[27]。本研究结果显示, 牡荆素能够呈剂量相关性增强

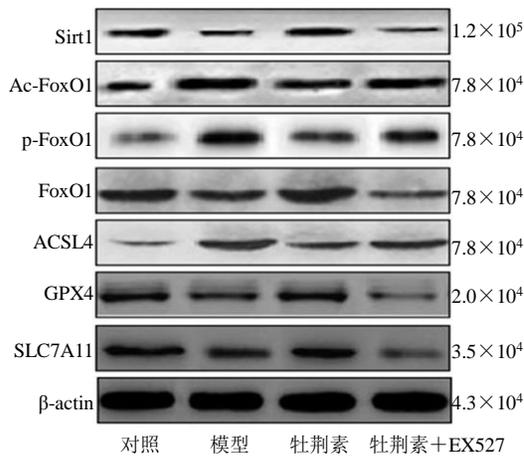


图 5 各组大鼠鼻黏膜组织 Sirt1、FoxO1、p-FoxO1、Ac-FoxO1、SLC7A11、GPX4、ACSL4 蛋白表达条带图

Fig. 5 Expression bands of Sirt1, FoxO1, p-FoxO1, Ac-FoxO1, SLC7A11, GPX4, and ACSL4 proteins in the nasal mucosa of rats in each group

表 7 各组大鼠鼻黏膜组织 Sirt1、FoxO1、p-FoxO1、Ac-FoxO1、SLC7A11、GPX4、ACSL4 蛋白相对表达 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 Relative expression of Sirt1, FoxO1, p-FoxO1, Ac-FoxO1, SLC7A11, GPX4, and ACSL4 proteins in nasal mucosa tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	Sirt1	Ac-FoxO1	p-FoxO1	FoxO1	ACSL4	GPX4	SLC7A11
对照	—	1.01 ± 0.17	1.00 ± 0.11	1.04 ± 0.13	1.07 ± 0.18	1.02 ± 0.13	1.08 ± 0.14	1.05 ± 0.19
模型	—	0.47 ± 0.08*	2.28 ± 0.24*	2.57 ± 0.27*	0.55 ± 0.08*	2.57 ± 0.30*	0.51 ± 0.07*	0.56 ± 0.08*
牡荆素	12	0.97 ± 0.18 [#]	1.38 ± 0.17 [#]	1.69 ± 0.20 [#]	1.05 ± 0.20 [#]	1.43 ± 0.19 [#]	1.03 ± 0.11 [#]	1.08 ± 0.14 [#]
牡荆素+EX527	12+5	0.53 ± 0.10 ^{&}	1.87 ± 0.20 ^{&}	2.26 ± 0.24 ^{&}	0.41 ± 0.07 ^{&}	2.11 ± 0.23 ^{&}	0.40 ± 0.08 ^{&}	0.58 ± 0.10 ^{&}

与对照组比较: **P* < 0.05; 与模型组比较: [#]*P* < 0.05; 与牡荆素组比较: [&]*P* < 0.05。

^{*}*P* < 0.05 vs control group; [#]*P* < 0.05 vs model group; [&]*P* < 0.05 vs vitexin group.

升高,提示变应性鼻炎大鼠鼻黏膜组织存在细胞铁死亡。牡荆素能够以剂量相关性地上调 SLC7A11、GPX4,下调 ACSL4,抑制细胞铁死亡发生。以上研究表明,牡荆素能够通过抑制细胞铁死亡的发生,进而改善变应性鼻炎大鼠鼻黏膜损伤。

Sirt1/FoxO1 信号通路是与细胞的氧化应激反应、炎症及凋亡等密切相关。研究显示,Sirt1 相关蛋白 FoxO1 能够促进 SOD 合成,而 Sirt1 为 NAD⁺ 依赖性脱乙酰酶能够直接去乙酰化 FoxO1,可明显促进细胞保护基因的表达^[30]。本研究结果显示,牡荆素能够以剂量相关性激活 Sirt1/FoxO1 信号通路,改善变应性鼻炎大鼠症状。既往研究显示,天麻素能够通过激活 SIRT1/FOXO3A/GPX4 信号通路抑制肾小管上皮细胞铁死亡,从而改善顺铂诱导的小鼠急性肾损伤^[31]。Zeng 等^[32] 研究显示,白藜芦醇能够通过激活 Sirt1/Nrf2 通路介导的心肌细胞铁死亡改

SOD、GSH 活性,降低 MDA、ROS 和 Fe²⁺ 含量,表明牡荆素能够抑制变应性鼻炎鼻黏膜组织氧化应激性损伤。

GPX4、SLC7A11、ACSL4 被认为是铁死亡发生的关键调控基因,其中 GPX4 是细胞中催化还原脂质过氧化产物关键性调控酶,能够降解脂质过氧化产物诱发的细胞毒性。SLC7A11 介导的胱氨酸/谷氨酸转运系统是合成 GSH 所需胱氨酸的主要途径,抑制 SLC7A11 后会降低 GSH 生物合成,导致 GPX4 抗氧化能力减低,诱导 MDA 产生增多,从而导致细胞铁死亡发生。ACSL4 被证实是铁死亡的标志物,ACSL4 表达上调时脂质过氧化产物产生会明显增多,且 GPX4 表达被显著抑制,从而导致 ROS 清除不及时,进而诱导铁死亡的发生^[28-29]。Gu 等^[8] 研究发现,铁死亡参与了 PM_{2.5} 诱导的急性鼻黏膜上皮细胞损伤。本研究结果显示,模型组大鼠鼻黏膜组织中 SLC7A11、GPX4 表达降低,ACSL4 表达

善脓毒症诱导的大鼠心肌病,而采用 Sirt1 抑制剂 EX527 处理能够诱导心肌细胞铁死亡,从而逆转白藜芦醇对脓毒症诱导的大鼠心肌病的保护作用。为进一步明确 Sirt1/FoxO1 信号通路在牡荆素抑制细胞铁死亡,改善变应性鼻炎大鼠鼻黏膜损伤中的作用。本研究通过对牡荆素处理组大鼠 ip Sirt1 抑制剂 EX527,观察其对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜损伤的作用。结果显示,EX527 能够抑制 Sirt1/FoxO1 信号通路活化,诱导鼻黏膜上皮细胞铁死亡,逆转牡荆素对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜损伤的保护作用。

综上所述,本研究通过探究牡荆素对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜损伤的保护作用及其调控机制。结果显示,牡荆素能够改善变应性鼻炎大鼠鼻黏膜损伤,其机制与激活鼻黏膜组织 Sirt1/FoxO1 通路,抑制细胞铁死亡有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 习媛, 贺心宁, 刘玉崑, 等. 玉屏风加味鼻喷剂对 AR 模型大鼠鼻黏膜损伤的保护作用及机制研究 [J]. 中国药房, 2023, 34(10): 1204-1210.
- [2] Zhang Y, Zhang L. Increasing prevalence of allergic rhinitis in China [J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2019, 11(2): 156-169.
- [3] Sun Y, Chen P, Zhai B, *et al.* The emerging role of ferroptosis in inflammation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127: 110108.
- [4] Han F, Li S, Yang Y, *et al.* Interleukin-6 promotes ferroptosis in bronchial epithelial cells by inducing reactive oxygen species-dependent lipid peroxidation and disrupting iron homeostasis [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 5279-5288.
- [5] Yang N, Shang Y. Ferrostatin-1 and 3-methyladenine ameliorate ferroptosis in OVA-induced asthma model and in IL-13-challenged BEAS-2B cells [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 9657933.
- [6] Liu P, Feng Y, Li H, *et al.* Ferrostatin-1 alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibiting ferroptosis [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2020, 25: 10.
- [7] Nakamura Y, Fuse Y, Komiyama S, *et al.* Dietary iodine attenuates allergic rhinitis by inducing ferroptosis in activated B cells [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 5398.
- [8] Gu W, Hou T, Zhou H, *et al.* Ferroptosis is involved in PM2.5-induced acute nasal epithelial injury via AMPK-mediated autophagy [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 115: 109658.
- [9] Chen X, Han D, Liu T, *et al.* Asiatic acid improves high-fat-diet-induced osteoporosis in mice via regulating SIRT1/FOXO1 signaling and inhibiting oxidative stress [J]. *Histol Histopathol*, 2022, 37(8): 769-777.
- [10] Ren B C, Zhang Y F, Liu S S, *et al.* Curcumin alleviates oxidative stress and inhibits apoptosis in diabetic cardiomyopathy via Sirt1-Foxo1 and PI3K-Akt signalling pathways [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(21): 12355-12367.
- [11] Ju J, Li X M, Zhao X M, *et al.* Circular RNA FEACR inhibits ferroptosis and alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by interacting with NAMPT [J]. *J Biomed Sci*, 2023, 30(1): 45.
- [12] Wang K J, Zhang W Q, Liu J J, *et al.* Piceatannol protects against cerebral ischemia/reperfusion induced apoptosis and oxidative stress via the Sirt1/FoxO1 signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(6): 5399-5411.
- [13] Yuan Y, Liu Q, Zhao J, *et al.* SIRT1 attenuates murine allergic rhinitis by downregulated HMGB1/TLR4 pathway [J]. *Scand J Immunol*, 2018, 87(6): e12667.
- [14] Li J, Wang B, Luo Y, *et al.* Resveratrol-mediated SIRT1 activation attenuates ovalbumin-induced allergic rhinitis in mice [J]. *Mol Immunol*, 2020, 122: 156-162.
- [15] Li X S, Tang X Y, Su W, *et al.* Vitexin protects melanocytes from oxidative stress via activating MAPK-Nrf2/ARE pathway [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2020, 42(6): 594-603.
- [16] Zhang D, Ning T, Wang H. Vitexin alleviates inflammation and enhances apoptosis through the regulation of the JAK/STAT/SOCS signaling pathway in the arthritis rat model [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2022, 36(12): e23201.
- [17] Liang C, Jiang Y, Sun L. Vitexin suppresses the proliferation, angiogenesis and stemness of endometrial cancer through the PI3K/AKT pathway [J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1): 581-589.
- [18] 李艳峰, 卢振民. 基于 AMPK/NLRP3 通路介导的细胞焦亡探究牡荆素对大鼠分泌性中耳炎的抑制作用 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(10): 2397-2404.
- [19] 李佳锋, 徐佳俊, 高翔, 等. 变应性鼻炎大鼠动物模型的建立及评价 [J]. 四川解剖学杂志, 2016, 24(1): 4-6.
- [20] 王伟平, 王君, 邓飞, 等. 牡荆素调控 miR-219a-5p 表达对 LPS 诱导的支气管上皮细胞凋亡和炎症反应的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(3): 324-327.
- [21] Tirpude N V, Sharma A, Kumari M, *et al.* Vitexin restores lung homeostasis by targeting vicious loop between inflammatory aggravation and autophagy mediated via multiple redox cascade and myeloid cells alteration in experimental allergic asthma [J]. *Phytomedicine*, 2022, 96: 153902.
- [22] Jiang X, Stockwell B R, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-282.
- [23] 丁虹, 吴紫陆, 蔡纪堂, 等. 基于 PERK/Nrf2 信号通路研究山豆根提取物诱导鼻咽癌细胞铁死亡作用机制 [J]. 中草药, 2023, 54(8): 2471-2479.
- [24] 窦婷, 杨静雯, 杨昊, 等. 冬虫夏草介导 SLC7A11/GPX4/ACSL4 轴抑制铁死亡抵抗放射性直肠炎研究 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(9): 1882-1888.
- [25] Zhao L, Tao X, Qi Y, *et al.* Protective effect of dioscin against doxorubicin-induced cardiotoxicity via adjusting microRNA-140-5p-mediated myocardial oxidative stress [J]. *Redox Biol*, 2018, 16: 189-198.
- [26] Djordjević A, Kotnik P, Horvat D, *et al.* Pharmacodynamics of malondialdehyde as indirect oxidative stress marker after arrested-heart cardiopulmonary bypass surgery [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132: 110877.
- [27] Qin H, Cui T, Liu Z, *et al.* Engineering amyloid aggregation as a new way to eliminate cancer stem cells by

- the disruption of iron homeostasis [J]. *Nano Lett*, 2021, 21(17): 7379-7387.
- [28] Wang J, Zhu Q, Wang Y, *et al.* Irisin protects against sepsis-associated encephalopathy by suppressing ferroptosis via activation of the Nrf2/GPX4 signal axis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 187: 171-184.
- [29] Dong H, Xia Y, Jin S, *et al.* Nrf2 attenuates ferroptosis-mediated IIR-ALI by modulating TERT and SLC7A11 [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(11): 1027.
- [30] 郭小丽, 杨昌明, 王婵, 等. 基于 Sirt1/FoxO1 通路探讨瑞马唑仑减轻脓毒症小鼠脑损伤的机制研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(1): 82-90.
- [31] Qiu C W, Chen B, Zhu H F, *et al.* Gastrodin alleviates cisplatin nephrotoxicity by inhibiting ferroptosis via the SIRT1/FOXO3A/GPX4 signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 319(Pt 3): 117282.
- [32] Zeng Y, Cao G, Lin L, *et al.* Resveratrol attenuates sepsis-induced cardiomyopathy in rats through anti-ferroptosis via the Sirt1/Nrf2 pathway [J]. *J Invest Surg*, 2023, 36(1): 2157521.

[责任编辑 高源]