

- 8113细胞的增殖、凋亡作用影响的初步探究[J]. 医学理论与实践, 2018, 31(12):1717-1718, 1734.
- [8] 何鹏娟, 颜磊, 范明君, 等. 辛伐他汀对 TGF- β 诱导的卵巢癌上皮间质转化的影响[J]. 山东大学学报(医学版), 2018, 56(5): 46-51.
- [9] KLOTZ DM, WIMBERGER P. Overcoming PARP inhibitor resistance in ovarian cancer: what are the most promising strategies? [J]. Arch gynecol Obstet, 2020, 302(5): 1087-1102.
- [10] BOUSSIOS S, KARIHTALA P, MOSCHETTA M, et al. Veliparib in ovarian cancer: a new synthetically lethal therapeutic approach[J]. Invest New Drugs, 2020, 38(1): 181-193.
- [11] LI Y, ZHANG T, QIN S, et al. Effects of UPF1 expression on EMT process by targeting E-cadherin, N-cadherin, vimentin and twist in a hepatocellular carcinoma cell line [J]. Mol Med Rep, 2019, 19(3): 2137-2143.
- [12] LIU L, WU N, WANG Y, et al. TRPM7 promotes the epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer through the calcium-related PI3K / AKT oncogenic signaling [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1):106.
- [13] YU Y, LUO W, YANG ZJ, et al. miR-190 suppresses breast cancer metastasis by regulation of TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1):70.
- [14] 姬欢欢, 董晓雷, 朱峰, 等. C-藻蓝蛋白抑制 TGF- β 1 诱导的宫颈鳞癌 Caski 细胞上皮-间充质转化[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2020, 27(2):129-134.
- [15] YIKUN P, GUANGCHUN H, DA T, et al. Lovastatin inhibits cancer stem cells and sensitizes to chemo- and photodynamic therapy in nasopharyngeal carcinoma[J]. J Cancer, 2017, 8(9):1655-1664.
- [16] YANG T, YAO H, HE G, et al. Effects of lovastatin on MDA-MB-231 breast cancer cells: an antibody microarray analysis [J]. J Cancer, 2016, 7(2): 192-199.
- [17] WALTHER U, EMMRICH K, RAMER R, et al. Lovastatin lactone elicits human lung cancer cell apoptosis via a COX-2/PPAR γ -dependent pathway[J]. Oncotarget, 2016, 7(9): 10345-10362.
- [18] LIU PC, LU G, DENG Y, et al. Inhibition of NF- κ B pathway and modulation of MAPK signaling pathways in glioblastoma and implications for lovastatin and tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) combination therapy [J/OL]. Plos One, 2017, 12 (1) : e0171157. DOI: 10.1371/journal.pone.0171157.
- [19] 张晓霞, 杨建村, 魏任雄, 等. TGF- β 1 通过 p38MAPK 信号通路调节大鼠睾丸支持细胞闭锁蛋白表达的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(16):1921-1924.

(收稿日期:2020-10-10,修回日期:2020-12-07)

引用本文:简宇,范婷,代凌云,等.基于NOD样受体热蛋白结构域3/胱天蛋白酶-1通路探讨鱼腥草注射液缓解脂多糖诱导的小鼠急性肺炎肺损伤的作用机制[J].安徽医药,2023,27(1):73-78.DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2023.01.016.

◇ 药学研究 ◇



基于NOD样受体热蛋白结构域3/胱天蛋白酶-1通路探讨鱼腥草注射液缓解脂多糖诱导的小鼠急性肺炎肺损伤的作用机制

简宇,范婷,代凌云,赵春虎

作者单位:荆州市中心医院急诊科,湖北 荆州 434000

摘要: **目的** 探究鱼腥草注射液(HHI)对急性肺炎小鼠的保护作用及对NOD样受体热蛋白结构域3(NLRP3)/胱天蛋白酶-1(caspase-1)通路的调控作用。**方法** 2019年7月至2020年6月,将购自广东省医学实验动物中心的90只BALB/c雄性小鼠分为正常对照组、模型组、HHI低(10 mL/kg)及高(30 mL/kg)剂量组、NLRP3激动剂(DDC)组(300 mg/kg)、HHI+DDC组(30 mL/kg+300 mg/kg),每组15只。除正常对照组外,其余各组均通过雾化吸入脂多糖(LPS)2.5 g/L建立急性肺炎模型。末次给药后检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF- α)水平、中性粒细胞数目;取右肺,检测右肺湿重/干重(W/D);左肺组织病理损伤情况,肺组织凋亡相关斑点样蛋白(ASC)mRNA及蛋白、NLRP3 mRNA及蛋白、TNF- α 、IL-6、caspase-1蛋白表达水平。**结果** 与正常对照组比较,模型组小鼠出现肺泡破坏及炎性细胞浸润等病理损伤现象,W/D、IL-6[(1 692.06 $\pm$ 95.26) μ g/L比(569.91 $\pm$ 50.89) μ g/L]、TNF- α [(1 846.24 $\pm$ 99.26) μ g/L比(506.99 $\pm$ 55.48) μ g/L]水平及中性粒细胞数目[(66.24 $\pm$ 2.56) $\times 10^6$ 个/毫升比(5.09 $\pm$ 1.98) $\times 10^6$ 个/毫升]、肺组织NLRP3 mRNA及蛋白(1.01 $\pm$ 0.13比0.22 $\pm$ 0.12)、ASC mRNA及蛋白(1.03 $\pm$ 0.13比0.29 $\pm$ 0.11)、caspase-1(1.06 $\pm$ 0.14比0.25 $\pm$ 0.12)、TNF- α 、IL-6蛋白表达升高($P < 0.05$);与模型组相比,HHI低、高剂量组肺泡破坏及炎性细胞浸润等现象缓解,W/D、小鼠BALF中炎性因子IL-6[(1 069.13 $\pm$ 75.12) μ g/L、(889.02 $\pm$ 65.13) μ g/L比(1 692.06 $\pm$ 95.26) μ g/L]、TNF- α [(1 225.33 $\pm$ 84.02) μ g/L、(806.63 $\pm$ 69.12) μ g/L比(1 846.24 $\pm$ 99.26) μ g/L]含量及中性粒细胞数目[(45.33 $\pm$ 2.22) $\times 10^6$ 个/毫升、(22.63 $\pm$ 2.02) $\times 10^6$ 个/毫升比(66.24 $\pm$ 2.56) $\times 10^6$ 个/毫升]、肺组织中NLRP3 mRNA及蛋白(0.83 $\pm$ 0.11、

0.52±0.12 比 1.01±0.13)、ASC mRNA 及蛋白(0.82±0.12、0.54±0.11 比 1.03±0.13)、caspase-1(0.80±0.15、0.59±0.12 比 1.06±0.14)、TNF- α 、IL-6 蛋白表达降低($P<0.05$);DDC 组小鼠上述指标与 HHI 低、高剂量组相反($P<0.05$)。结论 HHI 可通过抑制 NLRP3/caspase-1 通路激活,改善肺炎小鼠炎症反应,缓解肺损伤。

关键词: 鱼腥草属; 肺炎; NOD 样受体热蛋白结构域 3; 胱天蛋白酶 1; 白细胞介素 6; 肿瘤坏死因子 α ; 小鼠,近交 BALB C

The mechanism of houttuynia cordata injection in alleviating acute lipopolysaccharide-induced lung injury in mice based on NLRP3/caspase-1 pathway

JIAN Yu, FAN Ting, DAI Lingyun, ZHAO Chunhu

Author Affiliation: Emergency Department, Jingzhou Central Hospital, Jingzhou, Hubei 434000, China

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect of Herba Houttuyniae injection (HHI) on acute pneumonia in mice and the regulatory effect of HHI on the pathway of NOD-like receptor thermal protein domain 3 (NLRP3)/caspase-1 pathway (caspase-1). **Methods** From July 2019 to June 2020, male BALB/c mice purchased from Guangdong Medical Laboratory Animal Center were randomly assigned into normal control group, model group, HHI low (10 mL/kg) and high (30 mL/kg) dose groups, NLRP3 agonist (diethyldithiocarbamate, DDC) group (300 mg/kg), and HHI + DDC (30 mL/kg + 300 mg/kg) group, with 15 mice in each group. Except for the control group, the other groups all established an acute pneumonia model by aerosol inhalation of LPS (2.5 g/L). The levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF- α), and the number of neutrophils in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected after the last administration. The right lung was taken and the wet/dry weight (W/D) of the right lung was detected. Left lung tissue pathological damage, lung tissue apoptosis-associated speck-like protein (ASC) mRNA and protein, NLRP3 mRNA and protein, TNF- α , IL-6, and caspase-1 protein expression levels were detected. **Results** Compared with the normal control group, mice in the model group showed pathological damage such as alveolar destruction and inflammatory cell infiltration, W/D, IL-6 [(1 692.06±95.26) μ g/L vs. (569.91±50.89) μ g/L], TNF- α [(1 846.24±99.26) μ g/L vs. (506.99±55.48) μ g/L] levels and the number of neutrophils [(66.24±2.56)×10⁶/mL vs. (5.09±1.98)×10⁶/mL], lung tissue NLRP3 mRNA and protein [(1.01±0.13) vs. (0.22±0.12)], ASC mRNA and protein [(1.03±0.13) vs. (0.29±0.11)], caspase-1 [(1.06±0.14) vs. (0.25±0.12)], TNF- α , and IL-6 protein expressions increased ($P<0.05$). Compared with the model group, alveolar destruction and inflammatory cell infiltration in the low-dose and high-dose HHI groups were relieved, W/D, the content of inflammatory factors IL-6 [(1 069.13±75.12) μ g/L, (889.02±65.13) μ g/L vs. (1 692.06±95.26) μ g/L], TNF- α [(1 225.33±84.02) μ g/L, (806.63±69.12) μ g/L vs. (1 846.24±99.26) μ g/L] and the number of neutrophils [(45.33±2.22)×10⁶/mL, (22.63±2.02)×10⁶/mL vs. (66.24±2.56)×10⁶/mL] in mouse BALF, the expressions of NLRP3 mRNA and protein [(0.83±0.11), (0.52±0.12) vs. (1.01±0.13)], ASC mRNA and protein [(0.82±0.12), (0.54±0.11) vs. (1.03±0.13)], caspase-1 [(0.80±0.15), (0.59±0.12) vs. (1.06±0.14)], TNF- α , and IL-6 protein in lung tissue decreased ($P<0.05$). The levels of the above indicators of the DDC group were opposite to those in the HHI low and high dose groups ($P<0.05$). **Conclusion** HHI can inhibit the activation of NLRP3/caspase-1 pathway, improve the inflammatory response of pneumonia mice and alleviate lung injury.

Key words: Houttuynia; Pneumonia; NLRP3; Caspase 1; Interleukin-6; Tumor necrosis factor- α ; Mice, inbred BALB C

肺炎是一种常见的呼吸系统疾病,多发病于儿童及年老体弱人群,其发病机制复杂,具有发病迅速、发展速度快、不易治疗等特点,严重者可诱发心血管系统疾病,甚至危及生命^[1]。近年来,肺炎发生率逐渐升高,给人们的生活和生命健康带来严重威胁^[2]。肺部持续炎性反应和感染是肺炎的主要病理形式之一^[3],而 NOD 样受体热蛋白结构域 3(NLRP3)/胱天蛋白酶-1(caspase-1)通路可促进炎性因子释放,介导炎症反应,并参与肺组织损伤过程^[4-5],因此 NLRP3/caspase-1 通路分子在组织炎症损伤过程的调控作用,也受到广大学者的关注。中医药在治疗肺炎方面有其独特的优势,鱼腥草注射液(HHI)具有清热、解毒、利湿作用,临床上常用于治

疗肺脓疡、痰热咳嗽、尿路感染等症,近来研究发现,其在治疗急性肺炎方面,具有较好的疗效^[6],但 HHI 治疗肺炎的具体分子生物学机制还不甚明确。本研究于 2019 年 7 月至 2020 年 6 月,用脂多糖(LPS)诱导建立小鼠肺炎模型,探究 HHI 对肺炎小鼠 NLRP3/caspase-1 通路的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 同遗传背景 BALB/c 雄性小鼠,清洁级,4~6 周龄,体质量 20~25 g,购自广东省医学实验动物中心[许可证号 SCXK(粤)2018-0002]。本研究符合一般动物实验伦理学原则。

1.1.2 主要试剂、仪器 鱼腥草注射液(河南利欣

制药股份有限公司,批号 B201658,规格 2 毫升/支);苏木精-伊红染色(HE)染色试剂盒(上海联迈生物工程有限公司,货号 LMO105);白细胞介素-6(IL-6)ELISA 试剂盒(上海康朗生物科技有限公司,货号 LS-F37731);肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒(上海笃玛生物科技有限公司,货号 DM-M57136);NLRP3 激动剂二乙基二硫代氨基甲酸酯(DDC)试剂(美国 Sigma 公司,货号 S-0319);NLRP3 抗体(货号 ab264468)、caspase-1 抗体(货号 ab138483)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)抗体(货号 ab155970)、TNF- α 抗体(货号 ab109322)、IL-6 抗体(货号 ab229381),均购自美国 abcam 公司;总 RNA 轴提取(Trizol)试剂盒(货号 T6126)、反转录试剂盒(货号 T1597),均购自日本 TAKARA;BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Pierce 公司,货号 P0768)。光学显微镜(货号 SMZ745,日本尼康公司);凝胶成像仪(Miulab 公司,型号 GIS-500);流式细胞分选仪(碧迪医疗器械有限公司,型号 ACS Aria II);实时荧光定量 PCR 仪(德国 Eppendorf 艾本德,型号 Mastercycler nexus X2)等。

1.2 方法

1.2.1 动物分组、肺炎模型构建及给药 90 只小鼠分为正常对照组、模型组、HHI 低(10 mL/kg)及高(30 mL/kg)剂量组、NLRP3 激动剂(二乙基二硫代氨基甲酸酯,DDC)组(300 mg/kg)、HHI+DDC 组(30 mL/kg+300 mg/kg),每组 15 只。除正常对照组外的各组小鼠均依据文献[7]用雾化吸入 LPS 法构建肺炎模型:将小鼠装入密闭盒中,用空气压缩机将压缩后的空气送到装有 LPS 浓度为 2.5 g/L 的塑料管中,启动雾化器,将 LPS 雾化成为雾状液体,并将雾化液体送入密闭盒中,持续雾化 30 min 即可。正常对照组小鼠仅雾化吸入 0.9% 的生理盐水。造模后 5 h,HHI 低、高剂量组静脉注射 10 mL/kg、30 mL/kg 的 HHI^[8];DDC 组灌胃给予 10 mL/kg DDC(用生理盐水稀释成 30 g/L 的溶液)^[9];HHI+DDC 组静脉注射和灌胃给予 30 mL/kg 的 HHI 和 300 mg/kg 的 DDC;模型组、正常对照组分别灌胃和静脉注射等量生理盐水。各组每天给药 1 次,连续 4 d。给药期间观察小鼠饮食、饮水、活动量等一般行为状况。

1.2.2 标本采集 末次给药 24 h 后,每组按随机数字表法选取 5 只小鼠,3% 戊巴比妥钠麻醉后开胸,对左主支气管进行结扎,取左肺,于颈部分离气管进行插管后,用磷酸盐缓冲液(PBS)灌洗右肺 3 次,每次 1 mL,获得支气管肺泡灌洗液(BALF),将 BALF 离心分离后得上清液及细胞,备用,处死小鼠。剩余小鼠,麻醉后处死,取完整左右两肺,右肺

称重后,置于 80 °C 烘箱内烘烤 72 h 后,称量干质量,计算湿/干质量比值。剪取左肺 0.5 g 组织冻存备用,剩余组织立即于 4% 多聚甲醛中固定 24 h。

1.2.3 BALF 中 IL-6、TNF- α 含量及中性粒细胞数目检测 取“1.2.2”中的 BALF 上清液,按 IL-6、TNF- α 试剂盒说明书检测 IL-6、TNF- α 含量。取“1.2.2”中 BALF 离心后的细胞,参照文献[9]进行混合流式抗体(CD45/CD11b/F4/80/Gr-1/CD48)避光染色 15 min。用 2 mL PBS 溶液重悬绝对计数管(内含有已知数目的荧光微球)后,向每个样本管内加入 200 μ L 重悬液体,用流式细胞分选仪检测 BALF 中中性粒细胞(CD45⁺CD11b^{high}Gr-1^{high})及荧光微球百分比进行检测。按公式:中性粒细胞数目=荧光微球数目/荧光微球百分比 $\times$ 中性粒细胞百分比/10,计算中性粒细胞数目。

1.2.4 肺组织 HE 染色 对“1.2.2”中固定的肺组织进行常规透明、浸蜡、包埋后,切成 5 μ m 厚的切片,依据 HE 染色试剂盒说明书处理组织,在光学显微镜下观察组织病理变化。

1.2.5 qRT-PCR 检测肺组织 NLRP3 mRNA、ASC mRNA 表达 于 4 °C 冰箱中解冻“1.2.2”中冻存的肺组织后,用 Trizol 试剂盒抽提取总 RNA,按逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录互补 DNA(cDNA)。然后使用 RT-qPCR 试剂盒(SYBR Green)和 PCR 仪进行扩增,共进行 40 个循环终止反应。NLRP3 mRNA、ASC mRNA 以 β -actin 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 PNLRP3 mRNA、ASC mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 q-RT-PCR 引物序列

引物名称	序列(5'-3')	引物长度/bp
NLRP3 mRNA	正向 AAAGCCAAGAATCCACAGTGTAAAC	175
	反向 TTGCCTCGCAGGTAAAGGA	
ASC mRNA	正向 GGATGCTCTGTACGGGAAGG	206
	反向 CGCATCTTGCTTGGGTTG	
β -actin	正向 TCAGGTCATCACTATCGGCAAT	423
	反向 AAAGAAAGGGTGTAAACGCA	

注: NLRP3 为 NOD 样受体热蛋白结构域 3, ASC 为凋亡相关斑点样蛋白, β -actin 为 β 肌动蛋白。

1.2.6 蛋白质印迹法检测肺组织 NLRP3、ASCIL-6、caspase-1、IL-6、TNF- α 蛋白相对表达水平 用蛋白提取试剂盒提取“1.2.5”中剩余肺组织总蛋白,定量后,取 50 μ g 蛋白上样,进行电泳和转膜,室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,加入 NLRP3(1:1 000)、ASCIL-6(1:1 000)、caspase-1(1:1 000)、TNF- α (1:1 000)、IL-6(1:1 000)、 β -actin(1:2 000)一抗,4 °C

孵育过夜,加入HRP羊抗兔二抗(1:2 000),37℃孵育1 h,采用增强化学发光法显色,以凝胶成像仪观察条带并拍照,并以Image J软件分析蛋白表达。

1.3 统计学方法 以SPSS 22.0软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较行单因素方差分析,多组间两两比较行SNK- q 检验, $P < 0.05$,表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般行为变化 正常组小鼠毛色、饮食活动均正常。模型组小鼠毛色失去光泽,饮食活动量均减少,活动后小鼠有喘息声,且小鼠有2只死亡。HHI低、高剂量组小鼠饮食活动量均较模型组有所增加,活动后喘息声有所减少,且试验过程中均无死亡。DDC组小鼠死亡4只,毛色枯槁,饮食活动减少及活动后喘息声最严重。

2.2 各组小鼠肺组织病理损伤检测结果 正常对照组小鼠肺组织结构完整;模型组小鼠肺泡壁及间隔水肿、破坏、充血、炎症细胞浸润明显,肺泡腔有红细胞渗出;HHI低、高剂量组小鼠肺泡破坏、充血、炎症细胞浸润等病理损伤减轻,且HH高剂量组缓

解效果优于低剂量组;DDC组肺泡破坏、充血、炎症浸润等病理现象最严重;HHI+DDC组肺泡病理损伤与模型组相近,见图1。

2.3 各组小鼠W/D、NLRP3 mRNA、ASCmRNA相对表达水平检测结果 模型组与正常对照组相比,右肺组织W/D、NLRP3 mRNA、ASCmRNA升高($P < 0.05$);HHI低、高剂量组与模型组相比,W/D、NLRP3 mRNA、ASCmRNA降低($P < 0.05$),且有剂量依赖性;DDC组W/D、NLRP3 mRNA、ASCmRNA升高($P < 0.05$);模型组与HHI+DDC组相比,W/D、NLRP3 mRNA、ASCmRNA水平差异无统计学意义($P > 0.05$),见表2。

2.4 各组小鼠BALF中IL-6、TNF- α 水平及中性粒细胞数目检测结果 模型组与正常对照组相比,IL-6、TNF- α 水平及中性粒细胞数目增高($P < 0.05$);HHI低、高剂量组与模型组相比,IL-6、TNF- α 水平及中性粒细胞数目下降($P < 0.05$),且有剂量依赖性;DDC组IL-6、TNF- α 水平及中性粒细胞数目升高($P < 0.05$);HHI+DDC组与模型组相比,IL-6、TNF- α 水平及中性粒细胞数目差异无统计学意义($P > 0.05$),见表3。

表2 各组小鼠W/D、NLRP3 mRNA、ASCmRNA相对表达水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	W/D	NLRP3 mRNA/ β -actin	ASC mRNA/ β -actin
正常对照组	10	4.01 $\pm$ 0.22	1.01 $\pm$ 0.12	1.02 $\pm$ 0.14
模型组	8	6.06 $\pm$ 0.26 ^①	2.06 $\pm$ 0.15 ^①	2.04 $\pm$ 0.16 ^①
HHI+DDC组	10	6.05 $\pm$ 0.25 ^①	2.03 $\pm$ 0.15 ^①	2.02 $\pm$ 0.16 ^①
HHI低剂量组	10	5.58 $\pm$ 0.24 ^{①②③}	1.81 $\pm$ 0.14 ^{①②③}	1.79 $\pm$ 0.15 ^{①②③}
HHI高剂量组	10	5.03 $\pm$ 0.23 ^{①②③④}	1.42 $\pm$ 0.13 ^{①②③}	1.41 $\pm$ 0.14 ^{①②③}
DDC组	6	6.69 $\pm$ 0.26 ^{①②③④⑤}	2.61 $\pm$ 0.16 ^{①②③④⑤}	2.69 $\pm$ 0.17 ^{①②③④⑤}
F值		149.75	152.29	139.96
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:HHI为鱼腥草注射液,DDC为二巯代氨基甲酸酯,W/D为右肺湿重/干重,NLRP3为NOD样受体热蛋白结构域3,ASC为凋亡相关斑点样蛋白, β -actin为 β 肌动蛋白。

①与正常对照组比较, $P < 0.05$ 。②与模型组比较, $P < 0.05$ 。③与HHI+DDC组比较, $P < 0.05$ 。④与HHI低剂量组比较, $P < 0.05$ 。⑤与HHI高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

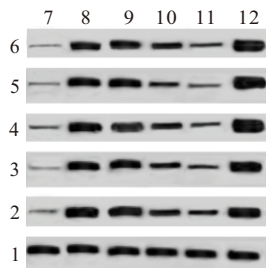
表3 各组小鼠BALF中IL-6、TNF- α 含量及中性粒细胞数目比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	IL-6/(μ g/L)	TNF- α /(μ g/L)	中性粒细胞数目/($\times 10^6$ 个/毫升)
正常对照组	5	569.91 $\pm$ 50.89	506.99 $\pm$ 55.48	5.09 $\pm$ 1.98
模型组	5	1 692.06 $\pm$ 95.26 ^①	1 846.24 $\pm$ 99.26 ^①	66.24 $\pm$ 2.56 ^①
HHI+DDC组	5	1 690.58 $\pm$ 95.04 ^①	1 840.18 $\pm$ 98.98 ^①	65.18 $\pm$ 2.48 ^①
HHI低剂量组	5	1 069.13 $\pm$ 75.12 ^{①②③}	1 225.33 $\pm$ 84.02 ^{①②③}	45.33 $\pm$ 2.22 ^{①②③}
HHI高剂量组	5	889.02 $\pm$ 65.13 ^{①②③}	806.63 $\pm$ 69.12 ^{①②③}	22.63 $\pm$ 2.02 ^{①②③}
DDC组	5	1 896.69 $\pm$ 99.26 ^{①②③④⑤}	2 296.69 $\pm$ 99.26 ^{①②③④⑤}	80.69 $\pm$ 2.56 ^{①②③④⑤}
F值		420.69	641.52	1 561.08
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:HHI为鱼腥草注射液,DDC为二巯代氨基甲酸酯,IL-6为白细胞介素-6,TNF- α 为肿瘤坏死因子- α 。

①与正常对照组比较, $P < 0.05$ 。②与模型组比较, $P < 0.05$ 。③与HHI+DDC组比较, $P < 0.05$ 。④与HHI低剂量组比较, $P < 0.05$ 。⑤与HHI高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

2.5 各组小鼠肺组织 NLRP3、ASC、caspase-1、TNF- α 、IL-6 蛋白表达结果 与正常对照组相比,模型组小鼠肺组织 NLRP3、ASC、caspase-1、TNF- α 、IL-6 蛋白表达升高($P<0.05$);与模型组相比,HHI 低、高剂量组 NLRP3、ASC、caspase-1、TNF- α 、IL-6 蛋白表达降低($P<0.05$),且有剂量依赖性;DDC 组小鼠肺组织 NLRP3、ASC、caspase-1、TNF- α 、IL-6 蛋白表达增高($P<0.05$);HHI+DDC 组与模型组相比,NLRP3、ASC、caspase-1、TNF- α 、IL-6 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$),见表 4,图 2。



注:1— β 肌动蛋白(β -actin);2—NOD 样受体热蛋白结构域 3 (NLRP3);3—凋亡相关斑点样蛋白(ASC);4—胱天蛋白酶-1(caspase-1);5—肿瘤坏死因子- α (TNF- α);6—白细胞介素-6(IL-6);7—正常对照组;8—模型组;9—HHI+DDC 组;10—HHI 低剂量组;11—HHI 高剂量组;12—DDC 组。

图 2 各组小鼠肺组织中 NLRP3、ASC、caspase-1、TNF- α 、IL-6 蛋白表达免疫印迹图

3 讨论

肺炎发病率和死亡率较高,其病原体繁多且以细菌感染最为常见,而 LPS 是革兰阴性菌主要致病物质,可引起肺部细菌感染,使肺内中性粒细胞聚集和激活并产生炎症级联反应导致肺损伤^[10]。雾化吸入 LPS 所致的动物肺部损伤及病理变化表现稳定,接近于临床急性肺炎发展情况^[11]。本研究采用雾化吸入 LPS 方法建立小鼠急性肺炎模型,发现模型组小鼠毛色失去光泽,活动后喘息声明显且有死

亡,肺组织 W/D、BALF 中炎性细胞因子 IL-6、TNF- α 含量及中性粒细胞数目均明显高于正常对照组,HE 染色可见肺泡破坏、充血、炎性细胞浸润等病理现象严重,与文献[7]研究模型小鼠吸入 LPS 5 h 后肺组织病理症状结果一致,提示小鼠急性肺炎模型造模成功。

近年来,由于抗生素、糖皮质激素以及免疫抑制剂的滥用、菌种变异和耐药性的出现,使西医抗生素治疗肺炎疗效变差,肺炎病人病死率逐渐升高^[12]。中医认为细菌为“风热之邪”、侵袭人体并首先犯肺,使机体虚邪相合、痰瘀互阻、肺脏宣降功能异常而发病,且认为肺炎病性属热、病位在肺,属“风温”“肺热”“咳嗽”等范畴,且用清热入肺药物来清热肃肺、豁痰止咳,达到良好的治疗效果^[13-14]。鱼腥草味辛、性寒凉,归经为肺,能清热解毒、消肿疗疮,用治实热、热毒、湿邪、疾热为患的肺病且为治肺癰要药,现代药理研究发现其具有较好的抗炎效果,有“中药抗生素”之称^[15]。近来研究发现,鱼腥草可治疗肺热咳嗽、尿路感染等症,如杨宏志^[16]发现鱼腥草为治热痰妙方-复方鲜竹沥的主要成分,能清热解毒,可助鲜竹沥清热,生半夏、枇杷叶化痰,证实鱼腥草清热化痰之功,然而其具体分子机制还不明确;岑凯莹、王海颖^[17]发现鱼腥草中药提取物可降低肺炎支原体感染小鼠血清干扰素及炎性因子 IL-6 表达水平,证实鱼腥草具有较好的抗炎、抗菌效果;陈彤等^[18]发现鱼腥草液对大肠埃希菌引起的尿路感染有较好的治疗作用,且对膀胱无过敏性损害,证实鱼腥草具较好的抑菌效果,但其抑菌作用的具体机制仍不明确。基于鱼腥草抗炎、抗菌、清肺热作用,本研究推测其注射液 HHI 对急性肺炎有较好的保护作用,并给予 LPS 诱导的急性肺炎小鼠 HHI 进行干预治疗,发现 HHI 低、高剂量组小鼠无死亡,活动后喘息声减少,肺泡壁破坏、充血、炎

表 4 各组小鼠肺组织 NLRP3、ASC、caspase-1、TNF- α 、IL-6 蛋白表达比较 $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	NLRP3/ β -actin	ASC/ β -actin	caspase-1/ β -actin	TNF- α / β -actin	IL-6/ β -actin
正常对照组	10	0.22 $\pm$ 0.12	0.29 $\pm$ 0.11	0.25 $\pm$ 0.12	0.31 $\pm$ 0.13	0.32 $\pm$ 0.13
模型组	8	1.01 $\pm$ 0.13 ^①	1.03 $\pm$ 0.13 ^①	1.06 $\pm$ 0.14 ^①	1.13 $\pm$ 0.17 ^①	1.16 $\pm$ 0.17 ^①
HHI+DDC 组	10	1.02 $\pm$ 0.13 ^①	1.04 $\pm$ 0.12 ^①	1.05 $\pm$ 0.14 ^①	1.14 $\pm$ 0.16 ^①	1.15 $\pm$ 0.16 ^①
HHI 低剂量组	10	0.83 $\pm$ 0.11 ^{①②③}	0.82 $\pm$ 0.12 ^{①②③}	0.80 $\pm$ 0.15 ^{①②③}	0.86 $\pm$ 0.15 ^{①②③}	0.85 $\pm$ 0.15 ^{①②③}
HHI 高剂量组	10	0.52 $\pm$ 0.12 ^{①②③④}	0.54 $\pm$ 0.11 ^{①②③④}	0.59 $\pm$ 0.12 ^{①②③④}	0.61 $\pm$ 0.15 ^{①②③④}	0.62 $\pm$ 0.14 ^{①②③④}
DDC 组	6	1.31 $\pm$ 0.13 ^{①②③④}	1.39 $\pm$ 0.13 ^{①②③④}	1.37 $\pm$ 0.12 ^{①②③④}	1.43 $\pm$ 0.13 ^{①②③④}	1.46 $\pm$ 0.12 ^{①②③④}
F 值		100.39	106.55	89.75	74.19	80.38
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:HHI 为鱼腥草注射液,DDC 为二硫化氨基甲酸酯,NLRP3 为 NOD 样受体热蛋白结构域 3,ASC 为凋亡相关斑点样蛋白,caspase-1 为胱天蛋白酶-1,IL-6 为白细胞介素-6,TNF- α 为肿瘤坏死因子- α , β -actin 为 β 肌动蛋白。

①与正常对照组比较, $P<0.05$ 。②与模型组比较, $P<0.05$ 。③与 HHI+DDC 组比较, $P<0.05$ 。④与 HHI 低剂量组比较, $P<0.05$ 。⑤与 HHI 高剂量组比较, $P<0.05$ 。

性浸润等病理损伤缓解, W/D、IL-6、TNF- α 含量、中性粒细胞数目均明显低于模型组, 且 HHI 高剂量组上述肺组织炎症损伤指标改善效果优于低剂量组, 提示 HHI 可改善 LPS 导致的急性肺炎小鼠肺组织炎症损伤, 表明 HHI 对急性肺炎有一定治疗作用。但 HHI 治疗急性肺炎的具体分子生物学机制还不明确, 本研究建立 NLRP3 炎症通路激动剂进行探究, 具有一定的临床意义。

炎症反应是急性肺炎的病理基础, NLRP3、ASC、caspase-1 共同组成炎症复合体, ASC 可连接 NLRP3 与 caspase-1, 并能与 NLRP3 相互激活, NLRP3 活化后可激活效应蛋白 caspase-1, 影响 IL-6、IL-8 等炎症因子表达, 从而诱发一系列炎症反应, 加速疾病的发展^[19]。Madouri 等^[20]发现体内外激活 caspase-1, NLRP3 和 ASC 的表达, 可有助于过敏性肺部炎症因子的上调, 证实 NLRP3/caspase-1 通路参与肺组织炎症反应过程。本研究发现模型组小鼠肺组织 NLRP3 mRNA 及蛋白、ASC mRNA 及蛋白、caspase-1、IL-6、TNF- α 蛋白表达均高于正常对照组, 给予小鼠 NLRP3 通路激动剂 DDC 后, 小鼠肺组织随着 NLRP3、ASC 基因及相关蛋白表达进一步增高后, 小鼠喘息声加重, 死亡只数进一步增加, 肺泡破坏、充血、炎性细胞浸润最严重, 肺组织炎症损伤相关指标也进一步加重, 提示激活 NLRP3/caspase-1 通路, 可加重肺炎小鼠炎症反应和肺组织损伤。而随着 HHI 剂量升高, 小鼠肺组织 NLRP3/caspase-1 炎症通路及相关蛋白表达降低越明显, 且 HHI 与 DDC 联用后, 小鼠肺组织 NLRP3/caspase-1 炎症通路及相关蛋白表达与 HHI 高剂量组相反, 肺组炎症损伤增加, 提示 DDC 可激活 NLRP3/caspase-1 通路逆转 HHI 缓解肺炎小鼠肺组织炎症损伤, 表明 HHI 可能通过抑制 NLRP3/caspase-1 通路激活改善肺炎小鼠炎症反应, 缓解肺损伤。

综上所述, HHI 可通过抑制 NLRP3/caspase-1 通路激活, 改善肺炎小鼠炎症反应, 缓解肺损伤, 为急性肺炎的临床治疗提供理论依据。然而, NLRP3 调控机制复杂, 且中医药对肺炎的治疗具有多靶点的作用, HHI 治疗急性肺炎的其他分子生物学机制待后续深入研究。

(本文图 1 见插图 1-4)

参考文献

- [1] BAKER D, QUINN B. Hospital acquired pneumonia prevention initiative-2: incidence of nonventilator hospital-acquired pneumonia in the United States[J]. Am J Infect Control, 2018, 46(1): 2-7.
- [2] RUSSELL FM, REYBURN R, CHAN J, et al. Impact of the

change in WHO's severe pneumonia case definition on hospitalized pneumonia epidemiology: case studies from six countries[J]. Bull World Health Organ, 2019, 97(6):386-393.

- [3] DE LEON J, RUAN CJ, VERDOUX H, et al. Clozapine is strongly associated with the risk of pneumonia and inflammation[J]. Gen Psychiatr, 2020, 33(2):183-184.
- [4] 何岱昆, 邵义如, 申捷, 等. NLRP3 炎症小体参与光气致急性肺损伤的炎症反应[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2017, 35(7):491-496.
- [5] 张本旺, 李秋杰, 王强, 等. 大鼠呼吸机相关性肺损伤时 NLRP3 表达的变化[J]. 中华麻醉学杂志, 2019, 39(11):1387-1390.
- [6] 岑维芳. 炎琥宁注射液与鱼腥草注射液治疗小儿肺炎疗效对比分析[J]. 大家健康, 2016, 10(1):113-114.
- [7] 苑少欣, 孔雅娴, 李蕊, 等. 气管滴注法与雾化吸入法建立小鼠急性肺损伤模型及其效果比较[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2014, 8(2):163-167. DOI: 10.3969/cma.j.issn.1674-1358.2014.02.003.
- [8] 曾明辉, 谭正怀. 5 种中药制剂对急性肺损伤小鼠的保护作用[J]. 华西药理学杂志, 2015, 30(3):305-307.
- [9] 朱四民, 王会芳, 林凤平, 等. 葛根提取物通过调控 NOD 样受体蛋白 3/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 通路减轻糖尿病大鼠肾损伤的研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2019, 27(11):852-857.
- [10] 孔路科, 刘婷婷. 肺炎支原体感染与高密度脂蛋白代谢的研究进展[J]. 中国基层医药, 2020, 27(7):892-896.
- [11] 刘子宸, 吴棣, 王刚, 等. 金纳多注射液对脂多糖致急性肺损伤大鼠肺组织中核因子- κ B 表达的影响[J]. 安徽医药, 2015, 19(12):2288-2291.
- [12] 杨丽平, 江宇云, 梁阳娣, 等. 综合护理对 ICU 重症患者呼吸机相关性肺炎发生率及患者病死率的影响观察[J]. 中医临床研究, 2018, 10(17):124-125.
- [13] 李娜, 张葆青, 于光志. 基于中医传承辅助平台的中医药治疗小儿重症肺炎用药规律分析[J]. 长春中医药大学学报, 2019, 35(5):895-898.
- [14] 任宏娜, 孙惠敏, 吕志超, 等. 芩连翘皮方对老年铜绿假单胞菌性肺炎的疗效观察[J]. 安徽医药, 2020, 24(7):1461-1464.
- [15] 表明朗, 余林中, 刘俊珊. "中药抗生素"鱼腥草抗炎作用研究及临床应用进展[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(5):172-176.
- [16] 杨宏志. 热痰妙方--复方鲜竹沥液[J]. 中医健康养生(中英文版), 2019, 5(7):31-32.
- [17] 岑凯莹, 王海颖. 鱼腥草、地龙、桑白皮提取物对肺炎支原体感染小鼠模型 IL-6 和 IFN- γ 表达的影响[J]. 中国中医急症, 2018, 27(7):1140-1143.
- [18] 陈彤, 闫桂虹, 邢国胜, 等. 鱼腥草液膀胱冲洗治疗兔尿路感染的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2015, 22(6):611-614.
- [19] ZHANG T, DU H, FENG S, et al. NLRP3/ASC/caspase-1 axis and serine protease activity are involved in neutrophil IL-1 β processing during Streptococcus pneumoniae infection[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 513(3):675-680.
- [20] MADOURI F, GUILLOU N, FAUCONNIER L, et al. Caspase-1 activation by NLRP3 inflammasome dampens IL-33-dependent house dust mite-induced allergic lung inflammation[J]. J Mol Cell Biol, 2015, 7(4):351-365.

(收稿日期:2020-10-15, 修回日期:2020-10-30)