

· 药理 ·

黄芩苷通过 p38 MAPK/NLRP3 通路对脂多糖诱导大鼠急性肺损伤的影响

夏金婵^{1*}, 从人愿¹, 袁静¹, 郭晓琦¹, 冯龙¹, 孙颖¹, 陈佳乐², 张佳佳¹

(1. 河南中医药大学医学院, 郑州 450046; 2. 河南中医药大学第一临床医学院, 郑州 450046)

[摘要] 目的:观察黄芩苷对脂多糖(LPS)诱导急性肺损伤模型大鼠的疗效及相关作用机制。方法:采用将80只健康雄性SD大鼠随机分为正常组,模型组,黄芩苷低、中、高剂量组,地塞米松组(DEX),SB203580组和黄芩苷+SB203580组(BA+SB203580),每组10只。黄芩苷低、中、高剂量组分别腹腔注射不同剂量(10, 50, 100 mg·kg⁻¹)的BA溶液;DEX组腹腔注射5 mg·kg⁻¹的DEX溶液;SB203580组腹腔注射0.5 mg·kg⁻¹的SB203580溶液;黄芩苷+SB203580组腹腔注射100 mg·kg⁻¹的BA溶液和0.5 mg·kg⁻¹的SB203580溶液;正常组和模型组均注射等体积的生理盐水,每天给药1次,连续7 d,末次给药1 h后,除正常组,其余大鼠均给予气管滴注5 mg·kg⁻¹ LPS构建急性肺损伤模型,正常组大鼠气管滴注等体积的生理盐水溶液,12 h后结束实验,取材。苏木素-伊红(HE)染色观察肺组织病理学改变,进行支气管肺泡灌洗液(BALF)中细胞总数和中性粒细胞计数;测定肺组织湿/干重比、血清中超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)的水平;免疫荧光法检测肺组织中活性氧(ROS)的含量,酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定BALF中细胞因子白细胞介素-1β(IL-1β),白细胞介素-18(IL-18),白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的含量;免疫组化(IHC)检测p-p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)的表达的定位表达及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺组织中p-p38 MAPK,硫氧还蛋白互作蛋白(TXNIP),NOD样受体蛋白3(NLRP3),半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)蛋白表达情况。结果:与正常组比较,模型组大鼠肺组织出现炎性病理变化,肺湿/干质量,BALF中细胞总数及中性粒细胞数目增高($P<0.01$),SOD活性下降($P<0.01$),ROS和MDA含量升高($P<0.01$),细胞因子IL-1β,IL-18,IL-6,TNF-α和p-p38 MAPK,NLRP3,Caspase-1的表达量均上调($P<0.01$)。与模型组比较,黄芩苷组,SB203580组和黄芩苷+SB203580组可有效减轻LPS所致肺组织病理变化,降低肺湿/干质量,BALF中细胞总数及中性粒细胞数目($P<0.05$, $P<0.01$),升高SOD活性($P<0.05$, $P<0.01$),并降低ROS和MDA水平($P<0.05$, $P<0.01$),细胞因子IL-1β,IL-18,IL-6,TNF-α和p-p38 MAPK,NLRP3,Caspase-1的表达量均明显下降($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:黄芩苷可有效保护LPS所致急性肺损伤,其作用机制可能与抑制p38 MAPK/NLRP3信号通路减轻炎症反应有关。

[关键词] 黄芩苷; 脂多糖; 急性肺损伤; p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/NOD样受体蛋白3(NLRP3)信号通路

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)02-0079-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220104

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211112.1236.002.html>

[网络出版日期] 2021-11-15 9:01

Baicalin Alleviates LPS-Induced Acute Lung Injury in Rats Through p38 MAPK/NLRP3 Pathway

XIA Jin-chan^{1*}, CONG Ren-yuan¹, YUAN Jing¹, GUO Xiao-qi¹, FENG Long¹, SUN Ying¹,
CHEN Jia-le², ZHANG Jia-jia¹

(1. Medicine College of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;
2. The First Clinical Medical College of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects and mechanism of baicalin (BA) on

[收稿日期] 20210727(016)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81803863);河南省科技厅科技研发专项(192102310163);河南省高等学校青年骨干教师培养计划项目(2017GGJS080);河南中医药大学2019年研究生科研创新类项目(2019KYCX018)

[通信作者] *夏金婵,博士,副教授,从事感染与免疫研究,E-mail:epsalon@163.com

lipopolysaccharide (LPS) -induced acute lung injury in rats. **Method:** Eighty healthy male SD rats were randomly divided into the control group, model group, low-dose BA (BA-L) group, medium-dose BA (BA-M) group, high-dose BA (BA-H) group, dexamethasone (DEX) group, SB203580 group, and BA + SB203580 group, with 10 rats in each group. The rats in the BA-L, BA-M, and BA-H groups were injected intraperitoneally with different doses (10, 50, 100 mg·kg⁻¹) of BA solution, the ones in the DEX group with 5 mg·kg⁻¹ DEX solution, the ones in the SB203580 group with 0.5 mg·kg⁻¹ SB203580 solution, the ones in the BA + SB203580 group with 100 mg·kg⁻¹ BA solution and 0.5 mg·kg⁻¹ SB203580, and those in both the control group and model group with the same volume of normal saline, once per day, for seven successive days. One hour after the last administration, rats in all groups except for the control group were given 5 mg·kg⁻¹ LPS via intratracheal instillation for inducing the acute lung injury, whereas those in the control group received the same volume of normal saline solution. Twelve hours later, the lung tissues were sampled and stained with htoxylin-eosin (HE) for observing the pathological changes, followed by the counting of the total number of cells and neutrophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). The wet/dry weight ratio of the lung tissue and the contents of serum superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were measured. The activity of reactive oxygen species (ROS) in the lung tissue was detected by immunofluorescence and the levels of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-18 (IL-18), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in BALF by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunohistochemistry (IHC) was conducted to determine the relative expression of p-p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and Western blotting was carried out to detect the protein expression levels of p-p38 MAPK, thioredoxin interacting protein (TXNIP), NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), and cysteinyl aspartate specific protease-1 (Caspase-1) in the lung tissue. **Result:** Compared with the control group, the model group displayed inflammatory pathological changes in lung tissue, elevated wet/dry weight ratio, total number of cells and neutrophils in BALF, and ROS and MDA levels ($P < 0.01$), decreased SOD activity ($P < 0.01$), and up-regulated IL-1, IL-18, IL-6, TNF- α , p-p38 MAPK, NLRP3, and Caspase-1 expression ($P < 0.01$). Compared with the model group, BA at different doses, SB203580, and BA + SB203580 all effectively alleviated the pathological changes in lung tissue induced by LPS, reduce the lung wet/dry weight ratio, the total number of cells and neutrophils in BALF, and ROS and MDA levels ($P < 0.05$, $P < 0.01$), enhanced the activity of SOD ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and down-regulated the expression of IL-1 β , IL-18, IL-6, TNF- α , p-p38 MAPK, NLRP3, and Caspase-1 in lung tissue ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** BA has a protective effect against LPS-induced acute lung injury, which may be related to its inhibition of p38MAPK/NLRP3 signaling pathway and the improvement of inflammatory response.

[Keywords] baicalin (BA); lipopolysaccharide (LPS); acute lung injury; p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)/NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) signaling pathway

急性肺损伤(ALI)是以过度炎症反应、肺毛细血管通透性增加和严重低氧血症为特征的临床综合征,严重时可能引发急性呼吸窘迫综合征(ARDS),死亡率高达50%^[1-2]。ALI/ARDS病因复杂,例如严重感染、脓毒症、创伤、放化疗的医源性肺损伤等,其中感染是ALI/ARDS的常见原因,脂多糖(LPS)是革兰氏阴性菌的致病物质。尽管目前ALI/ARDS的治疗取得了显著进展,但与该综合征相关的死亡率仍居高不下^[3-4],因此寻找新的治疗手段非常必要。中药黄芩是唇形科草本植物黄芩的干燥根部,性质偏寒,味苦,具有清热燥湿、泻火解毒等功效,

临床广泛用于治疗各种感染和炎症性疾病。黄酮类化合物黄芩苷是其发挥生物活性的主要成分之一,具有明显的抗炎、抗氧化、抗菌、清除自由基和抗肿瘤等作用^[5-6]。研究表明黄芩苷具有较强的抗菌抗病毒作用,还可明显抑制致病性皮肤真菌^[7]。黄芩苷可通过抑制炎症反应对幽门螺旋杆菌诱导人胃黏膜上皮GES-1细胞损伤起到保护作用^[8]。黄芩苷能够抑制外周血白细胞介素-4受体(IL-4R), IL-6R, IL-23R, 孤儿核受体(RORC)基因的表达减轻溃疡性结肠炎的症状^[9]。黄芩苷能够显著降低流感病毒及脂多糖(LPS)所致小鼠ALI模型中炎症因

子水平^[10-12],抑制肺炎衣原体感染所致的炎症反应^[13],其抗炎作用可能与抑制趋化因子Fractalkine(CX3CL1)/CX3C趋化因子受体1(CX3CR1)及核转录因子- κ B(NF- κ B)通路的激活有关^[14-15]。p38丝裂原激活蛋白激酶(p38 MAPK)是MAPK通路家族调节炎症反应最重要的成员,参与多种生理及病理进程^[16],但是,黄芩苷是否通过调控p38MAPK/NOD样受体蛋白3(NLRP3)通路对LPS诱导的ALI起到保护作用的研究尚未见报道。为进一步探讨黄芩苷在ALI中的可能作用靶点,本研究采用气管滴注LPS构建大鼠ALI模型,探讨黄芩苷对ALI模型大鼠的保护作用及对p38MAPK/NLRP3信号通路的影响,从而为黄芩苷的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康雄性SD大鼠80只,体质量160~200 g,山东济南朋悦实验动物繁育有限公司,动物合格证号SCXK(鲁)20190003,实验室环境为温度22~25℃,相对湿度50%~60%,实验前动物饲养7 d以适应环境,本实验经过河南中医药大学实验动物伦理委员会批准同意,批号DWLL202004351。

1.2 药物和试剂 LPS(来源于大肠杆菌,美国Sigma公司,批号L2880);黄芩苷(纯度95%)和地塞米松(纯度98%)(上海麦克林生化科技有限公司,批号分别为B802696, D829854);SB203580(美国MCE公司,批号HY-10256);白细胞介素-6(IL-6),白细胞介素-1 β (IL-1 β),白细胞介素-18(IL-18),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA)检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号分别为E-EL-R0015c, E-EL-R0012c, E-EL-R0567c, E-EL-R2856c, E-BC-K020-M, E-BC-K025-S);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(碧云天生物技术研究,批号C0105S);OCT包埋剂(日本Sakura公司,批号4583);活性氧(ROS)染液,自发荧光淬灭剂,抗荧光淬灭封片剂,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G1045, G1221, G1401, GB12001, GB23303);抗体NLRP3(英国Abcam公司,批号ab214185);磷酸化(p)-p38 MAPK,半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为4511, 3866)。

1.3 仪器 Milli-Q型超纯水仪(美国Millipore公司);JXFSTPRP-48型全自动样品快速研磨仪(上海净信实验发展有限公司);IX73型倒置显微镜, CX31型光学显微镜, BX51型荧光显微镜(日本Olympus公司);BS210S型电子天平(德国Sartorius公司);D-37520型高速台式冷冻离心机(德国Kendro公司);LEICARM2145型全自动切片仪(德国Leica公司);Trans-Blot Turbo System蛋白转印系统, ChemiDoc MP型全能型凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司);mullS-KANMK3型多功能酶标仪(美国Thermo公司)。

2 方法

2.1 动物分组、给药及模型建立 将80只健康雄性SD大鼠随机分为8组,每组10只,分别为正常组,模型组,黄芩苷低、中、高剂量组,地塞米松组, SB203580组,黄芩苷+SB203580组。黄芩苷组分别腹腔注射不同剂量(10, 50, 100 mg·kg⁻¹)黄芩苷溶液^[9];地塞米松组腹腔注射5 mg·kg⁻¹地塞米松溶液;SB203580组腹腔注射0.5 mg·kg⁻¹SB203580溶液;黄芩苷+SB203580组腹腔注射100 mg·kg⁻¹的黄芩苷溶液和0.5 mg·kg⁻¹的SB203580溶液;正常组和模型组均注射等体积的生理盐水,每天腹腔给药1次,连续7 d,末次给药1 h后,除正常组,其余大鼠均给予气管滴注5 mg·kg⁻¹ LPS构建ALI模型^[17-20],正常组大鼠气管滴注等体积的生理盐水。12 h后结束实验,并收集支气管肺泡灌洗液(BALF),血清及双侧肺组织以备后续实验使用。

2.2 BALF的收集 经气管注射冰磷酸盐缓冲液(PBS)3 mL灌洗左肺,30 s后缓慢回抽,重复3次,将收集到的BALF,4℃,3 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径6 cm),收集上清液,贮存在-80℃条件下备用。

2.3 肺组织湿与干质量比值(W/D) 用4℃预冷的生理盐水洗净右肺,吸干水分,称取湿质量。然后将肺组织置于干燥箱中,65℃干燥48 h,称取干质量。根据前后称量结果计算肺组织的W/D。

2.4 BALF中总细胞及中性粒细胞检测 重悬BALF沉淀用于染色,镜下观察,并利用细胞计数板进行总细胞及中性粒细胞计数。

2.5 HE染色观察肺组织病理学变化 肺组织用4%多聚甲醛固定液固定,经乙醇梯度脱水后,二甲苯梯度透明,常规石蜡包埋切片,HE染色,光学显微镜下观察肺组织结构变化。

2.6 血清中SOD,MDA的测定 取各组大鼠血清,

严格按照试剂盒说明书操作,测定吸光度 A 并通过公式计算出待测样品的含量。

2.7 肺组织中 ROS 水平检测 肺组织包埋,以 8~10 μm 厚度为标准进行切片,取一个干净的载玻片,将组织切片紧贴到玻片上,加入自发荧光淬灭剂 5 min,冲洗 10 min 后滴加 ROS 荧光探针染液二氢乙锭 (DHE 1:200),避光 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,洗涤 3 次,每次 5 min。用抗荧光淬灭封片剂封片,于荧光显微镜下观察。用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析荧光强度变化。

2.8 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测 BALF 中 TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-18 的含量 严格按照试剂盒说明书执行操作,测定肺泡灌洗液中 TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-18 的含量。

2.9 免疫组化 (IHC) 检测肺组织中 p-p38MAPK 的表达 取肺组织石蜡切片,二甲苯脱蜡及乙醇水化,修复抗原后,用过氧化氢阻断内源性过氧化酶,分别滴加一抗 (1:500) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,二抗 (1:400) 室温孵育 50 min, DAB 显色液显色,苏木素液复染细胞核,返蓝夜返蓝,经梯度乙醇脱水,二甲苯透明后,中性树脂封片,显微镜下观察,用 Image-Pro Plus 6.0 分析蛋白的相对表达量。

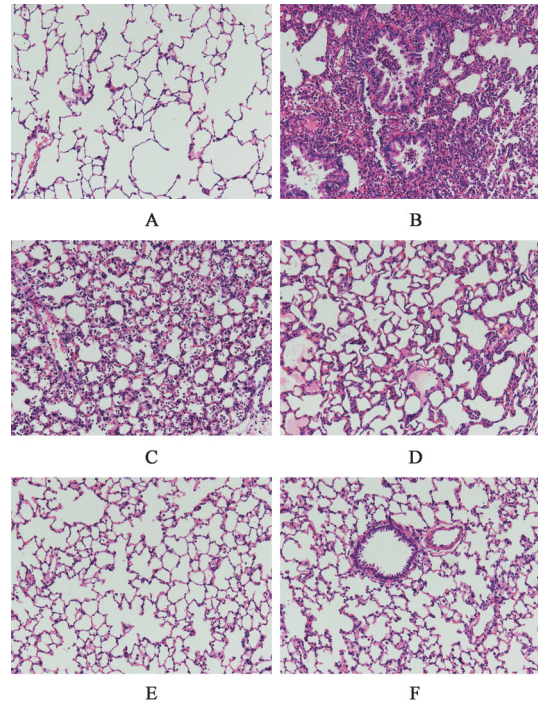
2.10 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测肺组织中 p-p38 MAPK, TXNIP, NLRP3, Caspase-1 蛋白表达量 肺组织剪切成细小的碎片,置于冰冷裂解液收集裂解物总蛋白,BCA 法检测组织蛋白浓度。制备聚丙烯酰胺凝胶,75 V/120 V 恒压电泳后转至 PVDF 膜,封闭液封闭 2 h,加入一抗 (1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min;加入 HRP 标记的二抗 (1:5 000) 常温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min;超敏发光液显影曝光显像, Image J 软件系统对蛋白条带灰度值进行分析。

2.11 统计学处理 本实验结果采用 SPSS 15.0 版软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用最小显著性差异法 (LSD) 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 ALI 大鼠肺组织病理学变化的影响 正常组大鼠肺组织保持正常组织结构;模型组大鼠肺泡毛细血管充血扩张,肺间质及肺泡间隔明显增宽,大量炎性细胞浸润;黄芩苷组和地塞米松组大鼠的肺组织病变较模型组明显改善,肺泡结构有所恢复,肺间质水肿减轻,炎症细胞浸润减少。见图 1。

3.2 对 ALI 大鼠大鼠 W/D 的影响 与正常组比较,



A. 正常组; B. 模型组; C. 黄芩苷 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; D. 黄芩苷 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; E. 黄芩苷 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; F. 地塞米松组 (图 2 同)

图 1 黄芩苷对 ALI 大鼠肺组织病理学影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of baicalin on lung pathological change in ALI rats (HE, $\times 200$)

模型组肺组织 W/D 明显升高 ($P<0.01$); 与模型组比较,黄芩苷组和地塞米松组肺组织 W/D 明显下降 ($P<0.05$, $P<0.01$), 且肺组织 W/D 的下降与黄芩苷呈剂量依赖性。见表 1。

表 1 黄芩苷对 ALI 大鼠大鼠肺 W/D 的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of baicalin on lung W/D of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	W/D
正常		4.92 \pm 0.27
模型		6.64 \pm 0.34 ¹⁾
黄芩苷	10	6.11 \pm 0.17 ²⁾
	50	5.83 \pm 0.27 ²⁾
	100	5.26 \pm 0.14 ³⁾
地塞米松	5	5.33 \pm 0.19 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表 2~7 同)。

3.3 对 ALI 大鼠 BALF 中细胞数的影响 与正常组比较,模型组 BALF 中细胞总数及中性粒细胞数显著增加 ($P<0.01$); 与模型组比较,各药物处理后均可明显降低 BALF 中细胞总数及中性粒细胞数 ($P<0.05$, $P<0.01$), 中性粒细胞浸润明显减轻。见表 2。

表2 黄芩苷对ALI大鼠BALF中细胞数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of baicalin on cell numbers in BALF of ALI rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	总细胞计数 /(×10 ⁵ 个)/mL	中性粒细胞计数 /(×10 ⁵ 个)/mL
正常		29.35±8.23	8.14±3.67
模型		351.27±30.57 ¹⁾	199.60±19.07 ¹⁾
黄芩苷	10	282.57±24.58 ²⁾	133.32±14.71 ³⁾
	50	210.36±9.11 ³⁾	80.63±7.15 ³⁾
	100	149.50±10.90 ³⁾	50.19±6.51 ³⁾
地塞米松	5	159.33±7.90 ³⁾	59.82±7.80 ³⁾

3.4 对ALI大鼠血清中SOD,MDA水平的影响
与正常组比较,模型组大鼠血清中MDA水平显著升高,SOD活性显著降低($P<0.01$);与模型组比较,黄芩苷组和地塞米松组均可明显降低大鼠血清中MDA水平,升高SOD活性($P<0.05, P<0.01$)。见表3。

表3 黄芩苷对ALI大鼠血清中SOD和MDA的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of baicalin on SOD and MDA in serum of ALI rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	SOD /U·mL ⁻¹	MDA /μmol·L ⁻¹
正常		238.55±8.49	11.22±1.53
模型		128.33±10.02 ¹⁾	60.41±2.47 ¹⁾
黄芩苷	10	169.78±12.27 ²⁾	48.58±3.38 ²⁾
	50	191.99±6.09 ³⁾	39.09±3.37 ³⁾
	100	210.42±13.51 ³⁾	25.00±4.88 ³⁾
地塞米松	5	206.16±7.77 ³⁾	28.98±2.45 ³⁾

3.5 对ALI大鼠肺组织中ROS的影响
与正常组比较,模型组大鼠肺组织中ROS表达量显著增加($P<0.01$);与模型组比较,黄芩苷和地塞米松预处理都能够明显降低肺组织中ROS的含量($P<0.05, P<0.01$)。见图2,表4。

3.6 对ALI大鼠BALF中炎症细胞因子的影响
与正常组比较,模型组大鼠BALF中炎症因子TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-18分泌量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,不同剂量的黄芩苷组,地塞米松组,SB203580组及黄芩苷+SB203580组可明显降低促炎因子TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-18的含量($P<0.05, P<0.01$)。见表5。

3.7 对ALI模型大鼠肺组织中p-p38 MAPK蛋白表达的影响
与正常组比较,模型组大鼠肺组织中阳性表达显著增强($P<0.01$);与模型组比较,黄芩苷

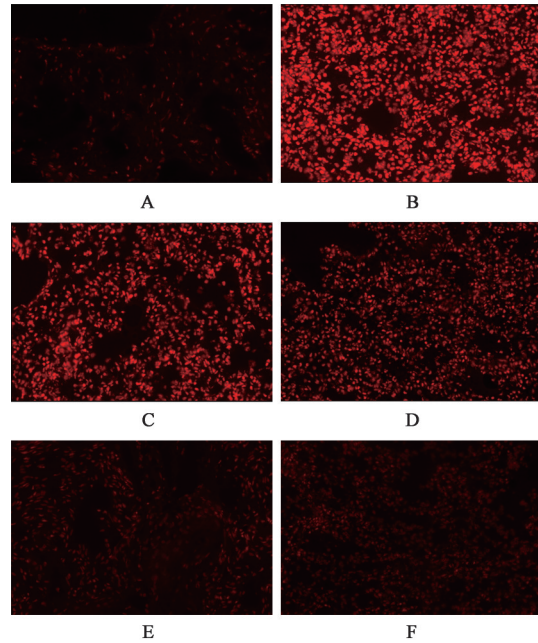


图2 黄芩苷对ALI大鼠肺组织中ROS的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 2 Effect of baicalin on ROS in lung tissue of ALI rats (IF, ×400)

表4 黄芩苷对ALI大鼠肺组织中ROS的相对荧光强度的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of baicalin on relative fluorescence intensity of ROS in lung tissue of ALI rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ROS的相对荧光强度
正常		100.00±0.00
模型		795.88±27.20 ¹⁾
黄芩苷	10	631.84±23.16 ²⁾
	50	452.62±16.15 ³⁾
	100	278.27±12.77 ³⁾
地塞米松	5	294.28±18.15 ³⁾
SB203580	0.5	321.22±6.58 ³⁾
黄芩苷+SB203580	100+0.5	250.98±14.64 ³⁾

组,地塞米松组,SB203580组和黄芩苷+SB203580组p-p38 MAPK的阳性表达均出现不同程度的下调($P<0.05, P<0.01$)。见图3,表6。

3.8 对ALI大鼠肺组织中p-p38 MAPK, NLRP3, Caspase-1蛋白表达的影响
与正常组比较,模型组大鼠肺组织中p-p38 MAPK, NLRP3, Caspase-1蛋白水平均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,黄芩苷各剂量组,地塞米松组,SB203580组和黄芩苷+SB203580组均可明显抑制p-p38 MAPK, NLRP3, Caspase-1蛋白的表达($P<0.05, P<0.01$)。见图4,表7。

表5 黄芩苷对ALI大鼠BALF中炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TNF- α	IL-6	IL-1 β	IL-18
正常		100.87 \pm 12.58	64.99 \pm 9.81	20.57 \pm 1.98	31.39 \pm 2.53
模型		650.52 \pm 28.76 ¹⁾	391.10 \pm 16.23 ¹⁾	85.51 \pm 4.49 ¹⁾	128.60 \pm 5.42 ¹⁾
黄芩苷	10	570.95 \pm 22.05 ²⁾	330.03 \pm 11.39 ²⁾	73.03 \pm 4.23 ²⁾	99.65 \pm 8.88 ²⁾
	50	430.63 \pm 14.94 ³⁾	252.06 \pm 14.55 ³⁾	61.05 \pm 3.21 ³⁾	75.07 \pm 7.54 ³⁾
	100	293.41 \pm 15.20 ³⁾	151.57 \pm 11.94 ³⁾	48.02 \pm 2.59 ³⁾	50.09 \pm 4.19 ³⁾
地塞米松	5	275.23 \pm 17.83 ³⁾	180.46 \pm 11.48 ³⁾	50.13 \pm 3.16 ³⁾	55.89 \pm 5.91 ³⁾
SB203580	0.5	318.08 \pm 24.11 ³⁾	198.22 \pm 16.86 ³⁾	58.13 \pm 4.57 ³⁾	60.75 \pm 5.30 ³⁾
黄芩苷+SB203580	100+0.5	204.72 \pm 13.52 ³⁾	129.54 \pm 13.19 ³⁾	40.63 \pm 2.71 ³⁾	43.90 \pm 2.81 ³⁾

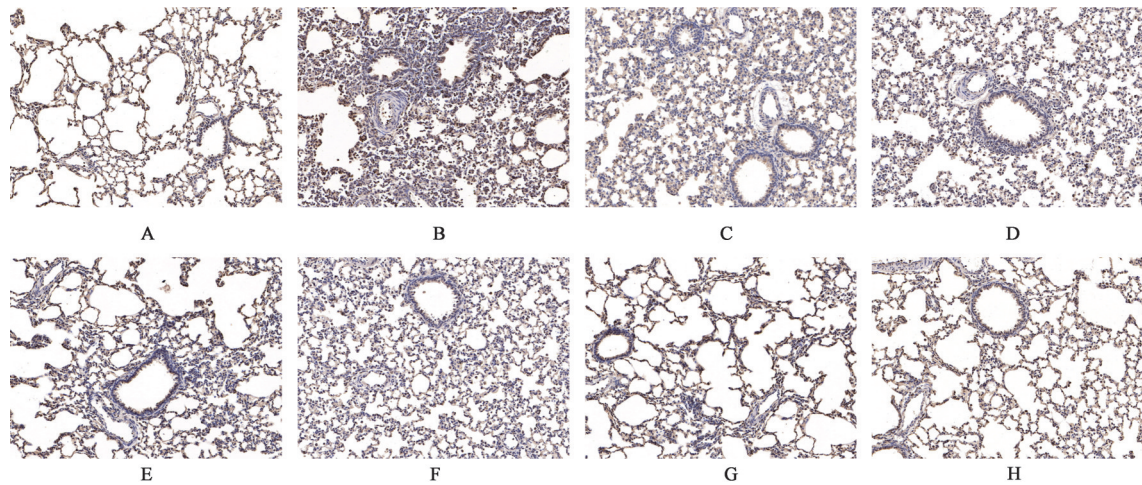


图3 黄芩苷对ALI大鼠肺组织p-p38 MAPK表达的影响(免疫组化, $\times 200$)

图3 Effect of baicalin on comparison of expression of p-p38 MAPK in ALI rats (IHC, $\times 200$)

表6 黄芩苷对ALI大鼠肺组织p-p38 MAPK蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Effect of baicalin on relative expression level of p-p38 MAPK in lung tissue of ALI rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	p-p38 MAPK
正常		31.09 \pm 3.16
模型		160.53 \pm 8.72 ¹⁾
黄芩苷	10	120.34 \pm 13.49 ²⁾
	50	90.92 \pm 9.27 ³⁾
	100	50.30 \pm 6.42 ³⁾
地塞米松	5	54.56 \pm 6.88 ³⁾
SB203580	0.5	48.03 \pm 8.34 ³⁾
黄芩苷+SB203580	100+0.5	41.59 \pm 4.44 ³⁾

4 讨论

黄芩苷是从中草药黄芩根中分离得到的主要有效成分,广泛用于肺炎、肝炎、动脉粥样硬化等病症^[21]。最近的研究表明,黄芩苷具有许多药理活

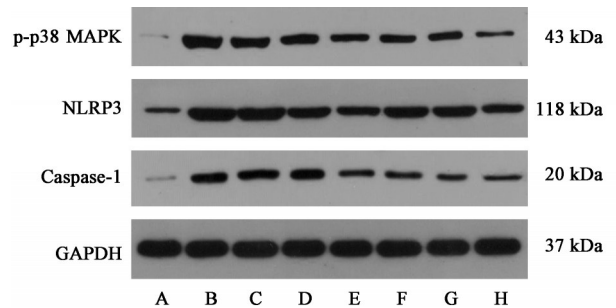


图4 各组大鼠肺组织中p-p38 MAPK, NLRP3和Caspase-1蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of p-p38 MAPK, NLRP3 and Caspase-1 protein expression in lung tissue of rats in each group

性,如抗炎^[22]、抗氧化应激^[23]、神经保护^[24]和抗菌^[25]。LPS是革兰氏阴性菌外膜的致病性内毒素,广泛用于制备ALI动物模型,LPS可以通过炎症细胞因子诱导一系列炎症反应。炎症的出现和消失是免疫系统清除致病物质的自然过程。可控的炎症反应有利于清除致病物质,失控的炎症反应可能

表7 黄芩苷对ALI大鼠肺组织中p-p38 MAPK, NLRP3和Caspase-1蛋白相对表达量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of baicalin on relative expression level of p-p38 MAPK, NLRP3 and caspase-1 protein in lung tissue of ALI ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	p-p38 MAPK /GAPDH	NLRP3 /GAPDH	Caspase-1 /GAPDH
正常		0.19±0.04	0.23±0.03	0.11±0.04
模型		0.92±0.07 ¹⁾	0.97±0.06 ¹⁾	0.64±0.04 ¹⁾
黄芩苷	10	0.75±0.03 ²⁾	0.82±0.07 ²⁾	0.54±0.03 ²⁾
	50	0.68±0.05 ³⁾	0.70±0.03 ³⁾	0.40±0.02 ³⁾
	100	0.43±0.08 ³⁾	0.41±0.03 ³⁾	0.27±0.03 ³⁾
地塞米松	5	0.50±0.05 ³⁾	0.61±0.05 ³⁾	0.34±0.04 ³⁾
SB203580	0.5	0.45±0.04 ³⁾	0.51±0.02 ³⁾	0.25±0.01 ³⁾
黄芩苷+SB203580	100+0.5	0.27±0.04 ³⁾	0.38±0.04 ³⁾	0.26±0.04 ³⁾

会对身体造成致命伤害,如ALI期间的过度炎症^[26-27]。在本研究中,采用气管滴注LPS建立ALI模型,模型组大鼠肺组织病理结果显示,肺泡毛细血管充血扩张,肺间质及肺泡间隔明显增宽,大量炎性细胞浸润,肺湿/干重比明显升高,肺泡灌洗液中炎症因子TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-18水平显著增加,中性粒细胞增多等,表明模型复制成功;黄芩苷预处理可显著降低大鼠肺泡灌洗液中炎症因子水平和中性粒细胞浸润,降低肺湿/干重比,减轻了肺部水肿,改善肺组织病理学改变,降低大鼠肺组织中MDA和ROS的水平,显著提高SOD的活性。证明黄芩苷对脂多糖诱导的肺部炎症损伤具有明显的保护作用。

近年研究发现,p38 MAPK和NLRP3信号通路与各种因素诱导的ALI中炎症反应密切相关^[28-30],LPS刺激产生的ROS会诱导p38 MAPK磷酸化和NLRP3活化,被激活的NLRP3又可进一步活化Caspase-1,促进成熟的IL-1 β 和IL-18的分泌,引发强烈的炎症反应^[31],从而加剧肺部损伤。而抑制p38 MAPK磷酸化或用NLRP3信号通路抑制剂均可显著改善ALI小鼠肺部炎症^[32-33]。本研究表明,与正常组比较,模型组大鼠肺组织中p-p38 MAPK, NLRP3和Caspase-1的蛋白表达量均明显升高,而黄芩苷处理可显著降低上述蛋白的表达,从而改善肺组织的损伤,利用p38 MAPK特异性阻断剂SB203580,进一步证明了上述结果,因此,黄芩苷可能通过抑制p38 MAPK/NLRP3通路发挥抗炎作用。

因此,黄芩苷对LPS诱导的ALI模型大鼠肺组织损伤具有保护作用,其抗炎机制与抑制p38

MAPK/NLRP3信号通路活化有关。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] MATTHAY M A, ZIMMERMAN G A, ESMON C, et al. Future research directions in acute lung injury: summary of a national heart, lung, and blood institute working group[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 167(7):1027-1035.
- [2] MOWERY N T, TERZIAN W T H, NELSON A C. Acute lung injury[J]. Curr Probl Surg, 2020, 57(5): 100777.
- [3] AGORRETA J, GARAYOA M, MONTUENGA L M, et al. Effects of acute hypoxia and lipopolysaccharide on nitric oxide synthase-2 expression in acute lung injury[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 168(3): 287-296.
- [4] HE Y Q, ZHOU C C, YU L Y, et al. Natural product derived phytochemicals in managing acute lung injury by multiple mechanisms [J]. Pharmacol Res, 2021, 163:105224.
- [5] FU S, XU L, LI S, et al. Baicalin suppresses NLRP3 inflammasome and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signaling during Haemophilus parasuis infection [J]. Vet Res, 2016, 47(1):80.
- [6] FU Y J, XU B, HUANG S W, et al. Baicalin prevents LPS-induced activation of TLR4/NF-kappaB p65 pathway and inflammation in mice via inhibiting the expression of CD14[J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(1):88-96.
- [7] 李津津. 中药黄芩药理作用的研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2018, 37(10):117-118.
- [8] 邓志燕, 万强. 黄芩苷对幽门螺杆菌诱导人胃黏膜上皮GES-1细胞损伤的保护作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(19):145-149.
- [9] 肖意川, 张许, 柯培雄, 等. 黄芩苷在心血管疾病中的药理作用研究新进展[J]. 广东中医, 2018, 39(24): 3587-3590.
- [10] ZHI H J, ZHU H Y, ZHANG Y Y, et al. *In vivo* effect of quantified flavonoids-enriched extract of Scutellaria baicalensis root on acute lung injury induced by influenza A virus [J]. Phytomedicine, 2019, 57: 105-116.
- [11] CHEN X B, SU H W, LIU H X, et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of Bi-yuan-ling granules[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2016, 36(3):456-462.
- [12] 潘永利. 黄芩苷对急性肺损伤大鼠的保护作用[J].

- 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(3):238-240.
- [13] WEN Y F, ZHAO J Q, BHARDAURIA M, et al. Baicalin prevents cadmium induced hepatic cytotoxicity, oxidative stress and histomorphometric alterations [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2013, 65 (1/2) : 189-196.
- [14] DING X M, PAN L, WANG Y, et al. Baicalin exerts protective effects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury by regulating the crosstalk between the CX3CL1-CX3CR1 axis and NF- κ B pathway in CX3CL1-knockout mice [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37 (3):703-715.
- [15] ZHANG X, SUN C Y, ZHANG Y B, et al. Kegan Liyan oral liquid ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury through inhibition of TLR4-mediated NF- κ B signaling pathway and MMP-9 expression [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 186:91-102.
- [16] BAI J, BAI Y, WANG X P, et al. Carbon monoxide-releasing molecule-3 ameliorates acute lung injury in a model of hemorrhagic shock and resuscitation: roles of p38 MAPK signaling pathway [J]. *Shock*, 2021, 55 (6):816-826.
- [17] 邓嘉, 王导新, 梁爱玲, 等. 黄芩苷对急性肺损伤大鼠肺泡液体清除作用的研究 [J]. *重庆医科大学学报*, 2019, 44(5):577-580.
- [18] ZHANG L, YANG L K, XIE X W, et al. Baicalin magnesium salt attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibiting of TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *J Immunol Res*, 2021:6629531.
- [19] WENG J, CHEN M, LIN Q, et al. Penethylidene hydrochloride defends against LPS-induced ALI in rats by mitigating endoplasmic reticulum stress and promoting the Hes1/Notch1 pathway [J]. *Gene*, 2019, 721:144095.
- [20] DI H T, WU X Z, WANG H Q, et al. Involvement of the p38 MAPK-pHsp27 pathway in vascular hyporeactivity induced by obstructive jaundice in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121:109304.
- [21] WU Y, WANG F, FAN L, et al. Baicalin alleviates atherosclerosis by relieving oxidative stress and inflammatory responses via inactivating the NF- κ B and p38 MAPK signaling pathways [J]. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 2018, 97:1673-1679.
- [22] LONG Y, YANG Q, XIANG Y, et al. Nose to brain drug delivery A promising strategy for active components from herbal medicine for treating cerebral ischemia reperfusion [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 159:104795.
- [23] CHEN H G, XU Y F, WANG L Z, et al. Baicalin ameliorates isoproterenol-induced acute myocardial infarction through iNOS, inflammation and oxidative stress in rat [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8 (9) : 10139-10147.
- [24] SOWNDHARARAJAN K, DEEPA P, KIM M, et al. Neuroprotective and cognitive enhancement potentials of baicalin: a review [J]. *Brain Sciences*, 2018, 8 (6):104.
- [25] GAO X, GUO M, ZHANG Z, et al. Baicalin promotes the bacteriostatic activity of lysozyme on *S. aureus* in mammary glands and neutrophilic granulocytes in mice [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(12):19894-19901.
- [26] NONAS S, MILLER I, KAWKITINARONG K, et al. Oxidized phospholipids reduce vascular leak and inflammation in rat model of acute lung injury [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 173(10):1130-1138.
- [27] WANG B, GONG X, WAN J Y, et al. Resolvin D₁ protects mice from LPS-induced acute lung injury [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2011, 24(4):434-441.
- [28] WANG Z Z, CHEN S C, ZOU X B, et al. Nesfatin-1 alleviates acute lung injury through reducing inflammation and oxidative stress via the regulation of HMGB1 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24 (9):5071-5081.
- [29] SHEN C H, LIN J Y, LU C Y, et al. SPAK-p38 MAPK signal pathway modulates claudin-18 and barrier function of alveolar epithelium after hyperoxic exposure [J]. *BMC Pulm Med*, 2021, 21(1):58.
- [30] ZHANG Z D, YANG Y J, LIU X W, et al. Aspirin eugenol ester ameliorates paraquat-induced oxidative damage through ROS/p38-MAPK-mediated mitochondrial apoptosis pathway [J]. *Toxicology*, 2021, 453:152721.
- [31] LI D, REN W, JIANG Z, et al. Regulation of the NLRP3 inflammasome and macrophage pyroptosis by the p38 MAPK signaling pathway in a mouse model of acute lung injury [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18 (5) : 4399-4409.
- [32] WANG L, LEI W, ZHANG S, et al. MCC950, a NLRP3 inhibitor, ameliorates lipopolysaccharide-induced lung inflammation in mice [J]. *Bioorg Med Chem*, 2021, 30:115954.
- [33] LI G, DAI Y, TAN J, et al. SB203580 protects against inflammatory response and lung injury in a mouse model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(2):1656-1662.

[责任编辑 周冰冰]