

清热化痰解毒方对脑缺血再灌注大鼠肺组织 TXNIP/NLRP3 炎性通路的影响

王涛*, 刘宏祥, 王颖, 齐皎, 陈小静, 闫丽静, 史小盼, 罗金花
(河北大学附属医院, 河北保定 071000)

[摘要] 目的:探究清热化痰解毒方对脑缺血再灌注大鼠肺组织的影响,并初步探讨相关分子机制。方法:将SD大鼠分为假手术组、模型组、阳性药组(灌胃尼莫地平 $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、清热化痰解毒方低、高剂量组($100, 200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),每组10只,除假手术组外,采用改良4动脉阻断法制备大鼠全脑缺血再灌注损伤模型,造模后,给药3d。肺湿/干重(W/D)分析,采用苏木素-伊红(HE)染色进行组织病理学分析;酶联免疫吸附法检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 和IL-18水平;肺髓过氧化物酶试剂盒检测髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性;免疫组化分析核苷酸结合域样受体蛋白3(nucleotide-binding domain-like receptor 3, NLRP3)阳性细胞数;半胱氨酸天冬氨酸酶-1(Caspase-1)比色测定试剂盒检测Caspase-1活性;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA和蛋白表达,免疫共沉淀检测硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)-NLRP3蛋白表达。结果:与假手术组比较,模型组肺损伤评分,肺W/D, BALF中IL-1 β 和IL-18水平、总细胞和多形核白细胞数量, MPO活性均明显增加($P < 0.05$);与模型组比较,尼莫地平组、清热化痰解毒方低、高剂量组肺损伤评分,肺W/D, BALF中IL-1 β 和IL-18水平、总细胞和多形核白细胞数量及MPO活性均明显降低($P < 0.05$)。与假手术组比较,模型组肺组织中NLRP3阳性细胞数, Caspase-1活性, NLRP3, ASC, Caspase-1蛋白和mRNA相对表达明显增加($P < 0.05$);与模型组比较,尼莫地平组、清热化痰解毒方低、高剂量组肺组织中NLRP3阳性细胞数, Caspase-1活性, NLRP3, ASC, Caspase-1蛋白和mRNA相对表达均明显降低($P < 0.05$)。与假手术组比较,模型组肺组织中ROS产生, TXNIP蛋白表达均明显增加($P < 0.05$);与模型组比较,尼莫地平组、清热化痰解毒方低、高剂量组肺组织中ROS产生, TXNIP蛋白表达均明显降低($P < 0.05$)。与假手术组比较,模型组肺组织中TXNIP-NLRP3蛋白共沉淀增加。与模型组比较,尼莫地平组、清热化痰解毒方低、高剂量组肺组织中TXNIP-NLRP3蛋白共沉淀减少。结论:清热化痰解毒方对全脑缺血再灌注大鼠的炎症性肺损伤具有保护作用,且这种作用可能通过抑制ROS产生,从而抑制TXNIP-NLRP3炎症通路介导的促炎介质IL-1 β 和IL-18的分泌,最终抑制肺组织中炎性细胞浸润,缓解肺组织损伤。

[关键词] 脑缺血再灌注; 清热化痰解毒方; 肺损伤; 核苷酸结合域样受体蛋白3(NLRP3); 硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)

[中图分类号] R22; R24; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)12-0114-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181040

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180313.1019.006.html>

[网络出版时间] 2018-03-13 13:05

Effect of Qingre Huatan Jiedu Formula on TXNIP/NLRP3 Inflammatory Pathway in Lung Tissue of Rats with Cerebral Ischemia-reperfusion

WANG Tao*, LIU Hong-xiang, WANG Ying, QI Jiao, CHEN Xiao-jing,
YAN Li-jing, SHI Xiao-pan, LUO Jin-hua
(Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Qingre Huatan Jiedu formula on lung tissue in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury and explore the underlying molecular mechanisms. **Method:** SD rats were

[收稿日期] 20171225(009)

[基金项目] 河北省科技计划项目(132777203)

[通信作者] *王涛, 硕士, 副主任医师, 从事脑血管病的基础与临床研究, E-mail: wangtao8791@sina.com

divided into shame group, model group, positive control group (PC group, nimodipine 200 mg·kg⁻¹), low-dose Qingre Huatan Jiedu formula group (LT group, 100 mg·kg⁻¹) and high-dose Qingre Huatan Jiedu formula group (HT group, 200 mg·kg⁻¹), with 10 rats in each group. Except for sham group, modified 4 artery occlusion method was used to prepare the global cerebral ischemia reperfusion injury model in rats. After modeling, the drug was given for 3 d. Lung wet/dry weight (W/D) analysis was made. htoxylin easin (HE) staining was performed for histopathological analysis; the levels of interleukin (IL) -1 β and IL-18 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); pulmonary myeloperoxidase kit assay was used to detect myeloperoxidase (MPO) activity; immunohistochemical analysis was performed for nucleotide-binding domain-like receptor 3 (NLRP3) positive cells; Caspase-1 colorimetric assay kit was applied in detecting Caspase-1 activity; Real-time PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expressions of NLRP3, ASC and Caspase-1. Co-immunoprecipitation was used to detect thioredoxin interaction protein (TXNIP) -NLRP3 protein expression. **Result:** Compared with shame group, lung injury score, W/D ratio of lung, IL-1 β and IL-18 levels in BALF, total number of cells and polymorphonuclear leukocytes and MPO activity in model group were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with model group, lung injury score, W/D ratio of lung, IL-1 β and IL-18 levels in BALF, total cell and polymorphonuclear leukocyte and MPO activity in PC group, LT group and HT group were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with shame group, the relative expression of NLRP3 positive cells, Caspase-1 activity and NLRP3/Asc/Caspase-1 in model group lung tissue were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with model group, the expression of NLRP3 positive cells, Caspase-1 activity and NLRP3/Asc/Caspase-1 in PC group, LT group and HT group were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the shame group, the ROS production and TXNIP protein expression in model group were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with model group, ROS production and TXNIP protein expression in PC group, LT group and HT group were significantly decreased ($P < 0.05$). TXNIP-NLRP3 co-precipitation was increased in lungs of the model group compared with the shame group. Compared with model group, the TXNIP-NLRP3 co-precipitation in PC group, LT group and HT group decreased. **Conclusion:** Qingre Huatanjiedu formula can inhibit the production of ROS, block the TXNIP-NLRP3 inflammatory pathway, reduce the infiltration of inflammatory cells in lung tissue, and alleviate the inflammatory lung injury induced by global cerebral ischemia-reperfusion in rats.

[**Key words**] cerebral ischemia-reperfusion; Qingre Huatan Jiedu formula; lung injury; nucleotide-binding domain-like receptor 3 (NLRP3); thioredoxin-interacting protein (TXNIP)

急性全脑缺血作为最常见的心血管疾病之一,致死率和致残率极高,及时给予再灌注是治疗的关键。然而再灌注不仅引起脑组织的缺氧缺血损伤,还会进一步导致组织损伤和功能障碍,诱发远隔重要脏器(包括心脏和肺脏)的损伤,严重危及患者生命。研究证实,急性脑缺血再灌注可引起炎症反应失调,引起肺组织内炎性细胞募集、炎症介质过度产生,最终破坏血流屏障,导致肺水肿^[1]。因此,改善脑缺血再灌注后诱发的肺损伤关键在于控制肺组织炎症反应。

近来研究发现,核苷酸结合域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding domain-like receptor protein 3, NLRP3)炎性小体参与肺损伤的发生进展过程。据文献报道 NLRP3 和 ASC/半胱氨酸天冬氨酸酶-1 (Caspase-1)/白细胞介素-1 β (IL-1 β)信号通路激活

能够促进肺损伤中重要炎症介质高迁移率族蛋白 1 (high-mobility group box 1, HMGB1),从而介导肺损伤过程中的中性粒细胞浸润,参与肺损伤发生发展过程^[2]。全脑缺血再灌注引起肺组织中活性氧(reactive oxygen species, ROS)增加,诱导 NLRP3 与其介质硫氧还蛋白相互作用蛋白(thioredoxin-interaction protein, TXNIP)结合,从而激活 NLRP3 炎症小体^[3]。因此,抑制 NLRP3 炎症小体在全脑缺血再灌注引起肺损伤中的功能具有重要意义。清热化痰解毒方是河北大学附属医院课题组临床实践中筛选出治疗脑缺血的有效方式,方剂由石菖蒲、郁金、瓜蒌、蒲公英、丹参、桔梗、苦杏仁、射干、川贝母、黄芩组成,以清热解毒、利湿化痰法组方,具有清热解毒、活血通经、化痰散结的作用^[4],但是关于此方对脑缺血肺损伤的保护作用目前尚不明确,因

此本研究重点探讨清热化痰解毒方对脑缺血再灌注大鼠肺组织的改善作用,并探讨其对 TXNIP/NLRP3 炎症信号通路的影响。

1 材料

1.1 动物 SPF级成年雄性SD大鼠购自北京生命科学研究所,体质量280~320 g,8~10周龄,许可证号SYXK(京)2015-0002。所有实验程序均河北大学附属医院动物伦理委员会批准,并按照国家有关规定进行。

1.2 药物及试剂 石菖蒲10 g,郁金10 g,瓜蒌10 g,蒲公英10 g,丹参10 g,桔梗10 g,苦杏仁10 g,射干10 g,川贝母10 g,黄芩10 g均购自河南张仲景大药房股份有限公司,批号所有药材均由河北大学附属医院杨光富教授鉴定为正品且符合2015年版《中国药典》规定。清热化痰解毒方根据传统水煎法,加水200 mL煎煮0.5 h后,滤渣取液,经浸提、浓缩、干燥后制备成干浸膏,相当于原生药 $400 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。尼莫地平(上海曙灿实业有限公司,批号66085-59-4,纯度 $\geq 99\%$)溶于生理盐水中制备成质量浓度 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 混悬液,避光保存。总RNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号PA115-03);蛋白浓度测定试剂盒(美国Solarbio公司,批号PC0030);IP细胞裂解液(碧云天生物技术研究,批号P0013);水合氯醛,NLRP3,ASC,Caspase-1抗体(美国Sigma-Aldrich公司,批号分别为47335,HPA012878,A1601,PRS3459);IL-1 β 和IL-18酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海沪震实业有限公司,批号分别为hz-0011c,h-0253c);髓过氧化物酶(MPO)测试盒(武汉艾美捷科技有限公司,批号K744-100);Caspase-1比色测定试剂盒(北京博迈斯科科技发展有限公司,批号K111-25);PCR引物由生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 仪器 GH型分析天平(日本AND公司),TG16-WS型高速冷冻离心机(德国Hettich公司),JJF-300型干燥箱(上海恒跃医疗器械有限公司),XSP-63A型光学显微镜(上海光学仪器厂),MR-96T型酶标仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司),7500型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国ABI公司),ChemiDoc MP全能型全自动凝胶成像分析系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 模型制备 采用改良4动脉阻断法^[5]制备大鼠全脑缺血再灌注损伤模型,禁食12 h后,大鼠腹腔内注射10%水合氯醛溶液($3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉后俯

卧位固定于脑立体定位仪上,颈后正中切口暴露第1颈椎两侧横突翼小孔,使用1 mL注射器针尖破坏双侧椎体动脉,24 h后使用动脉夹夹闭双侧颈动脉,阻断30 min后松开动脉夹再灌注3 h。模型成功判定标准为夹闭30 s左右大鼠意识丧失、翻正反射和角膜消失,且在灌注期内意识未恢复,即为造模成功。假手术组(10只)仅暴露颈椎和椎体动脉,不阻断血管。将大鼠置于单个饲养笼中饲养,环境温度 $21 \sim 24 \text{ }^\circ\text{C}$,湿度 $40\% \sim 50\%$,自由饮水、进食。术后即刻腹腔注射青霉素8万U,1次/d,持续3~4 d。

2.2 药物处理 将全脑缺血再灌注损伤模型大鼠随机分为4组,每组10只,分别为模型组、阳性药组(尼莫地平组)、清热化痰解毒方低、高剂量组。尼莫地平组给药剂量参照参考文献[6],以尼莫地平作为阳性药,大鼠全脑缺血再灌注术后2 h起连续1~3 d,每日尼莫地平灌胃给药2次,每次 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,灌胃体积为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。清热化痰解毒方低、高剂量组大鼠全脑缺血再灌注术后2 h起连续1~3 d,每日清热化痰解毒方灌胃2次,给药剂量分别为干浸膏100,200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,灌胃体积为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。假手术组和模型组将等剂量生理盐水以同样方法进行灌胃。

2.3 标本采集 药物治疗未完成后,大鼠腹腔注射过量10%水合氯醛麻醉后,迅速于左肺进行支气管肺泡灌洗(bronchoalveolar lavage, BAL);迅速取右肺上叶进行组织病理学检查及免疫组织化学分析;迅速切除右肺中叶进行肺湿/干重比(W/D)分析;迅速取右肺下叶,冻存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

2.4 肺W/D分析 切除右肺中叶,记录湿重值(W)。然后将右肺中叶置于 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 烤箱中24 h后称得干重值(D)。计算肺W/D。

2.5 肺损伤的组织病理学检测 将右肺上叶经PBS洗涤后,于4%多聚甲醛中固定、脱钙、脱水、透明、浸蜡及包埋,将石蜡切片($3 \mu\text{m}$)用二甲苯脱蜡,梯度乙醇水合,行常规苏木素-伊红(HE)染色后,于显微镜下观察组织学变化,并进行定性分析。以放大 $\times 400$ 倍率收集图像。采用双盲法,根据参考文献[5]描述的半定量评分系统确定肺组织病理严重性反应,包括肺泡充血、出血、中性粒细胞聚集或白细胞浸润、肺泡壁厚度,每个评分系统的评分范围为0~4分,满分20分。

2.6 支气管肺泡灌洗(BAL)分析及白细胞计数 大鼠麻醉后,于正中胸骨切开暴露两肺及颈部气管,

去除胸腺及淋巴结后,暴露支气管。由颈部气管插入静脉输液针,以血管夹夹闭右肺门后,用预冷生理盐水 0.5 mL 将左肺灌注 5 次,回收约 10 mL 支气管肺泡灌洗液(BALF),于 4 °C 下以 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后沉淀细胞,取上清液保存于 -80 °C 进行细胞因子测定。采用血细胞计数器计数再悬浮细胞沉淀中总细胞数量和多形核白细胞数量。

2.7 BALF 中细胞因子检测 使用 ELISA 试剂盒测定 BALF 中 IL-1 β 和 IL-18 水平,所有操作均严格按照说明书进行。

2.8 肺 MPO 活性检测 取冻存的右肺下叶组织样本,置于 0.5% 十六烷基三甲基溴化铵 1 mL 中解冻后,采用 MPO 试剂盒,根据说明书制备肺组织匀浆。于 4 °C 下 12 000 \times g 离心 10 min 后,取上清。采用分光光度法,在 450 nm 处测量 H₂O₂ 的氧化还原反应中吸光度 A 变化。酶活力单位定义为每克组织在 37 °C 反应体系中 H₂O₂ 被分解为 1 μ mol 记作 1 个活力单位(U·g⁻¹)。

2.9 免疫组化检测 将右肺上叶组织石蜡组织切片(3 μ m)经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水合后,于 0.01 mol·L⁻¹ 柠檬酸钠(pH 6.0)中孵育 20 min,3% 过氧化氢中孵育 10 min,10% 正常山羊血清中孵育 30 min。将切片与 NLRP3 的一抗于 4 °C 孵育过夜。以 PBS 孵育的切片作为阴性对照。于室温下,将切片与碱性磷酸酶(AP)偶联的山羊抗兔免疫球蛋白

(Ig)G 孵育 1 h。PBS 洗涤 3 次后,加入 DAB 溶液 100 μ L,于显微镜下观察,直到显色。

2.10 免疫共沉淀检测 取 2.3 项中适量右肺下叶组织裂解物,加入 TXNIP 一抗(1:200)于 4 °C 下孵育过夜。免疫共沉淀反应后,于 4 °C 下以 3 000 \times g 离心 5 min,取上清,加入十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液进行洗脱,用 SDS 凝胶进行分离后,转移至聚偏二氟乙烯膜上,进行蛋白免疫印迹(Western blot)分析。

2.11 肺组织 Caspase-1 活性测定 采用 Caspase-1 比色测定试剂盒,根据说明书检测右肺下叶组织中 Caspase-1 酶活性,于 405 nm 波长下测定 Caspase-1 酶活性。

2.12 ROS 测定 根据参考文献[6]所述,检测肺组织中的相对 ROS 水平。于荧光显微镜(激发 488 nm,发射 610 nm)下测量氧化的二氢乙锭(DHE)活性。

2.13 Real-time PCR 测定 NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA 的表达 使用 UltrapureRNA 试剂盒从一部分右肺下叶组织中提取总 RNA,并使用 cDNA 试剂盒将其逆转录成第一链 cDNA。采用 SYBR Green 试剂盒和 Applied Biosystems 7500 快速实时 PCR 系统进行实时 PCR 反应。以 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 mRNA 相对表达水平。反应条件为 95 °C 30 s,95 °C 15 s,72 °C 15 s,共进行 40 个。引物序列设计见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称	上游引物 5'-3'	下游引物 5'-3'	长度/bp
NLRP3	CACCATGGGTTCTGCTCA	GGGGACTGGGATACAGCCTT	154
ASC	TGAGCAGCTGCAAACGACTA	CACGAACTGCCTGGTACTGT	220
Caspase-1	TGGCAGGAATTCTGGAGCTT	CTTGAGGGTCCCAGTCACTC	136
β -actin	TGTTTGAGACCTTGAACACCC	AGGAAGGCTGGAAGAGTGC	211

2.14 Western blot 检测 NLRP3, ASC, Caspase-1, TXNIP 蛋白的表达 取部分右肺下叶组织样品,使用苯甲基磺酰氟(PMSF)裂解组织,根据核和细胞质蛋白质提取试剂盒说明书提取总蛋白质。使用 BCA 蛋白质测定试剂盒测定蛋白质浓度。将蛋白质(80 μ g 或 120 μ g)在变性的 12% 聚丙烯酰胺凝胶上分离并转移到聚偏二氟乙烯膜上。使用一抗 NLRP3, ASC, Caspase-1 p10 (1:500), TXNIP (1:1 000) 和内参 β -actin(1:200) 与膜一起于 4 °C 孵育过夜。将膜用辣根过氧化物酶(HRP)缀合的

二抗于室温下孵育 1 h。使用 Quantity One 软件评估相对蛋白表达水平。

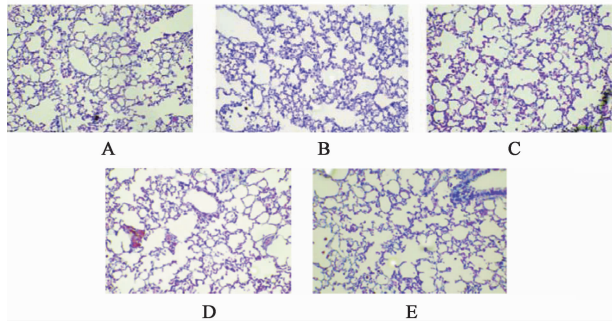
2.15 统计学分析 采用统计学软件 SPSS 21.0 进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 描述,两组间比较行 *t* 检验,多组间比较行方差分析,以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对脑缺血再灌注大鼠的肺损伤的影响

3.1.1 对脑缺血再灌注大鼠肺组织病理组织学的影响 假手术组大鼠观察到正常肺结构。模型组观

察到大鼠肺组织表现出明显的病理学改变,包括白细胞浸润、肺泡充血、肺泡壁增厚等。与模型组比较,尼莫地平组、清热化痰解毒方低、高剂量组大鼠肺组织病理学变化均明显改善。见图 1。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 尼莫地平组; D. 清热化痰解毒方 100 mg·kg⁻¹组; E. 清热化痰解毒方 200 mg·kg⁻¹组(图 2~4 同)

图 1 清热化痰解毒方对脑缺血再灌注大鼠肺组织病理学的影响(HE, ×100)

Fig. 1 Effect of Qingre Huatan Jiedu formula on lung histopathology in rats of cerebral ischemia and reperfusion (HE, ×100)

3.1.2 对脑缺血再灌注大鼠肺损伤半定量评分的影响 与假手术组比较,模型组大鼠肺损伤评分明显增加($P < 0.05$)。与模型组比较,尼莫地平组、清热化痰解毒方低、高剂量组大鼠肺损伤评分均明显降低($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 清热化痰解毒方对脑缺血再灌注大鼠肺损伤半定量评分的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Qingre Huatan Jiedu formula on semi-quantitative scores of in rats of cerebral ischemia and reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	肺损伤评分/分
假手术	-	2.52 ± 0.75
模型	-	15.23 ± 2.16 ¹⁾
尼莫地平	200	3.34 ± 1.05 ²⁾
清热化痰解毒方	100	9.58 ± 2.03 ²⁾
	200	4.01 ± 1.16 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 3~11 同)。

3.1.3 对脑缺血再灌注大鼠肺 W/D 的影响 与假手术组比较,模型组大鼠肺 W/D 明显增加($P < 0.05$)。与模型组比较,尼莫地平组、清热化痰解毒方低、高剂量组大鼠肺 W/D 均明显降低($P < 0.05$)。见表 3。

3.2 对脑缺血再灌注大鼠 BALF 中 IL-1 β 和 IL-18 的影响 与假手术组比较,模型组大鼠 BALF 中

表 3 清热化痰解毒方对脑缺血再灌注大鼠肺 W/D 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Qingre Huatan Jiedu formula on W/D of lung in rats of cerebral ischemia and reperfusion($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	W/D
假手术	-	4.03 ± 1.08
模型	-	7.82 ± 1.67 ¹⁾
尼莫地平	200	4.15 ± 0.98 ²⁾
清热化痰解毒方	100	6.32 ± 1.44 ²⁾
	200	5.10 ± 1.17 ²⁾

IL-1 β 和 IL-18 水平均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,尼莫地平组、清热化痰解毒方低、高剂量组大鼠 BALF 中 IL-1 β 和 IL-18 水平均明显降低($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 清热化痰解毒方对脑缺血再灌注大鼠肺组织 BALF 中 IL-1 β 和 IL-18 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of Qingre Huatan Jiedu formula on IL-1 β and IL-18 levels in rat BALF of cerebral ischemia and reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	IL-1 β	IL-18
假手术	-	6.03 ± 1.05	10.34 ± 2.11
模型	-	193.74 ± 28.46 ¹⁾	219.28 ± 30.65 ¹⁾
尼莫地平	200	76.25 ± 10.34 ²⁾	102.47 ± 18.32 ²⁾
清热化痰解毒方	100	136.53 ± 15.48 ²⁾	173.62 ± 25.44 ²⁾
	200	80.39 ± 11.65 ²⁾	118.56 ± 19.07 ²⁾

3.3 对脑缺血再灌注大鼠肺组织中的白细胞浸润的影响

3.3.1 对脑缺血再灌注大鼠肺 BALF 中总细胞和多形核白细胞数量的影响 与假手术组比较,模型组大鼠 BALF 中总细胞和多形核白细胞数量明显增加($P < 0.05$)。与模型组比较,尼莫地平组、清热化痰解毒方低、高剂量组大鼠 BALF 中总细胞和多形核白细胞数量明显降低($P < 0.05$)。见表 5。

3.3.2 对脑缺血再灌注大鼠大鼠肺组织 MPO 活性的影响 与假手术组比较,模型组大鼠肺组织中 MPO 活性明显增加($P < 0.05$)。与模型组比较,尼莫地平组、清热化痰解毒方低、高剂量组大鼠肺组织中 MPO 活性明显降低($P < 0.05$)。见表 6。

3.4 对脑缺血再灌注大鼠肺组织中 NLRP3 阳性细胞数的影响 NLRP3 蛋白主要在炎性细胞(巨噬细胞和嗜中性粒细胞)中表达。假手术组仅观察到少量 NLRP3 阳性细胞。模型组肺组织中观察到大量

表 5 清热化痰解毒方对脑缺血再灌注大鼠肺 BALF 中总细胞和多形核白细胞数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of Qingre Huatan Jiedu formula on total cells and polymorphonuclear leukocytes in rat BALF of cerebral ischemia and reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 10$) ($\times 10^5$) 个

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	总细胞数量	多形核白细胞数量
假手术	-	1.01 ± 0.01	0.06 ± 0.01
模型	-	14.73 ± 2.57 ¹⁾	12.35 ± 2.16 ¹⁾
尼莫地平	200	6.34 ± 1.06 ²⁾	4.73 ± 1.53 ²⁾
清热化痰解毒方	100	8.05 ± 1.41 ²⁾	7.26 ± 2.11 ²⁾
	200	6.57 ± 1.17 ²⁾	4.96 ± 1.68 ²⁾

表 6 清热化痰解毒方对脑缺血再灌注大鼠大鼠肺组织 MPO 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Effect of Qingre Huatan Jiedu formula on MPO activity in rat lung tissue cerebral ischemia and reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	MPO/U·g ⁻¹
假手术	-	2.47 ± 0.65
模型	-	20.54 ± 3.26 ¹⁾
尼莫地平	200	8.32 ± 1.95 ²⁾
清热化痰解毒方	100	13.46 ± 2.37 ²⁾
	200	9.11 ± 2.03 ²⁾

NLRP3 阳性细胞,提示 NLRP3 在肺组织炎性细胞中呈强阳性表达。见图 2。与假手术组比较,模型组大鼠肺组织中 NLRP3 阳性细胞数明显增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较,尼莫地平组、清热化痰解毒方低、高剂量组大鼠肺组织中 NLRP3 阳性细胞数均明显降低 ($P < 0.05$)。见表 7。

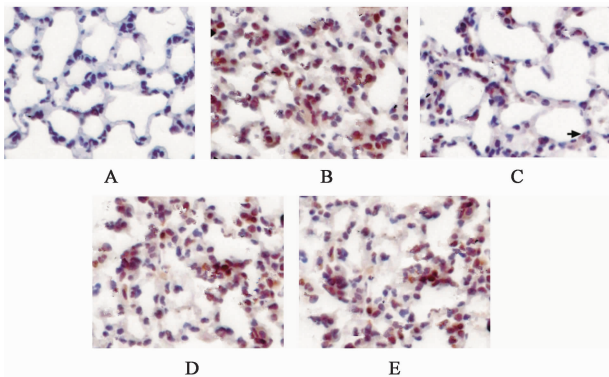


图 2 大鼠肺组织中 NLRP3 阳性细胞的表达 (免疫组化, $\times 200$)
Fig. 2 Expression of NLRP3-positive cells in rat lung tissue (IHC, $\times 200$)

3.5 对脑缺血再灌注大鼠肺组织中 Caspase-1 活性

表 7 清热化痰解毒方对脑缺血再灌注大鼠肺组织中 NLRP3 阳性细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 Effect of Qingre Huatan Jiedu formula on number of NLRP3-positive cells in rat lung tissue cerebral ischemia and reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	NLRP3 阳性细胞数量/个
假手术	-	10.32 ± 2.14
模型	-	65.79 ± 19.53 ¹⁾
尼莫地平	200	21.43 ± 3.75 ²⁾
清热化痰解毒方	100	41.52 ± 5.26 ²⁾
	200	23.06 ± 4.03 ²⁾

的影响 与假手术组比较,模型组大鼠肺组织中 Caspase-1 活性明显增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较,尼莫地平组、清热化痰解毒方低、高剂量组大鼠肺组织中 Caspase-1 活性明显降低 ($P < 0.05$)。见表 8。

表 8 清热化痰解毒方对脑缺血再灌注大鼠肺组织中 Caspase-1 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 8 Effect of Qingre Huatan Jiedu formula on Caspase-1 activity in rat lung tissue cerebral ischemia and reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Caspase-1 活性
假手术	-	1.00 ± 0
模型	-	8.03 ± 1.72 ¹⁾
尼莫地平	200	3.96 ± 1.03 ²⁾
清热化痰解毒方	100	5.94 ± 1.16 ²⁾
	200	4.06 ± 1.05 ²⁾

3.6 对脑缺血再灌注大鼠肺组织中 NLRP3, ASC 和 Caspase-1 表达的影响

3.6.1 对脑缺血再灌注大鼠肺组织中 NLRP3, ASC 和 Caspase-1 mRNA 表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠肺组织中 NLRP3, ASC 和 Caspase-1 mRNA 表达均明显增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较,尼莫地平组、清热化痰解毒方低、高剂量组大鼠肺组织中 NLRP3, ASC 和 Caspase-1 mRNA 表达均明显降低 ($P < 0.05$)。见表 9。

3.6.2 对脑缺血再灌注大鼠肺组织中 NLRP3, ASC, Caspase-1, TXNIP 蛋白相对表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠肺组织中 NLRP3, ASC, Caspase-1, TXNIP 蛋白相对表达均明显增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较,尼莫地平组、清热化痰解毒方低、高剂量组大鼠肺组织中 NLRP3, ASC,

表 9 清热化痰解毒方对脑缺血再灌注大鼠肺组织中 NLRP3,ASC 和 Caspase-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Effect of Qingre Huatan Jiedu formula on NLRP3,ASC and Caspase-1 mRNA expression in rat lung tissue cerebral ischemia and reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	NLRP3	ASC	Caspase-1
假手术	-	1.01 ± 0.08	0.65 ± 0.05	0.26 ± 0.04
模型	-	2.16 ± 0.15 ¹⁾	1.53 ± 0.17 ¹⁾	1.36 ± 0.09 ¹⁾
尼莫地平	200	1.18 ± 0.11 ²⁾	0.84 ± 0.09 ²⁾	0.63 ± 0.08 ²⁾
清热化痰解毒方	100	1.37 ± 0.19 ²⁾	1.23 ± 0.11 ²⁾	0.96 ± 0.09 ²⁾
	200	1.21 ± 0.11 ²⁾	0.91 ± 0.08 ²⁾	0.70 ± 0.09 ²⁾

Caspase-1 和 TXNIP 蛋白相对表达均明显降低 ($P < 0.05$)。见图 3 及表 10。

3.7 对脑缺血再灌注大鼠 TXNIP-NLRP3 相互作用的影响

3.7.1 对脑缺血再灌注大鼠肺组织中 ROS 的影响

与假手术组比较,模型组大鼠肺组织中 ROS 产生明显增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较,尼莫地平组、清热化痰解毒方低剂量组和清热化痰解毒方高剂量组大鼠肺组织中 ROS 产生明显降低 ($P < 0.05$)。见表 11。

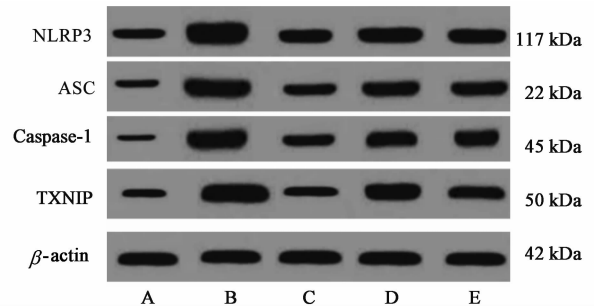


图 3 大鼠肺组织中 NLRP3,ASC,Caspase-1,TXNIP 蛋白的表达
Fig.3 Expression of NLRP3,ASC,Caspase-1,TXNIP protein in rat lung tissue

表 10 清热化痰解毒方对脑缺血再灌注大鼠肺组织中 NLRP3,ASC,Caspase-1,TXNIP 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Effect of Qingre Huatan Jiedu formula on NLRP3,ASC,Caspase-1,TXNIP protein expression in rat lung tissue cerebral ischemia and reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	NLRP3/ β -actin	ASC/ β -actin	Caspase-1/ β -actin	TXNIP/ β -actin
假手术	-	0.82 ± 0.11	0.41 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.65 ± 0.06
模型	-	2.03 ± 0.34 ¹⁾	1.32 ± 0.14 ¹⁾	1.13 ± 0.09 ¹⁾	1.93 ± 0.16 ¹⁾
尼莫地平	200	0.96 ± 0.08 ²⁾	0.61 ± 0.07 ²⁾	0.60 ± 0.08 ²⁾	0.86 ± 0.11 ²⁾
清热化痰解毒方	100	1.23 ± 0.09 ²⁾	0.94 ± 0.08 ²⁾	0.83 ± 0.10 ²⁾	1.05 ± 0.09 ²⁾
	200	1.01 ± 0.08 ²⁾	0.68 ± 0.09 ²⁾	0.64 ± 0.08 ²⁾	0.91 ± 0.12 ²⁾

表 11 清热化痰解毒方对脑缺血再灌注大鼠肺组织中 ROS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 11 Effect of Qingre Huatan Jiedu formula on ROS activity in rat lung tissue cerebral ischemia and reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ROS/U·mL ⁻¹
假手术	-	1.00 ± 0
模型	-	4.58 ± 1.16 ¹⁾
尼莫地平	200	2.06 ± 0.53 ²⁾
清热化痰解毒方	100	3.63 ± 0.68 ²⁾
	200	2.14 ± 0.61 ²⁾

3.7.2 对脑缺血再灌注大鼠肺组织中 TXNIP-NLRP3 的相互作用的影响

免疫共沉淀分析发现,

与假手术组比较,模型组大鼠肺组织中 TXNIP-NLRP3 共沉淀增加。而与模型组比较,尼莫地平组、清热化痰解毒方低剂量组和清热化痰解毒方高剂量组大鼠肺组织中 TXNIP-NLRP3 共沉淀均减少。见图 4。

4 讨论

本研究采用改良 4 动脉阻断法制备大鼠全脑缺血再灌注损伤模型发现,全脑缺血再灌注损伤大鼠肺组织表现出明显的病理学改变,表现出严重肺水肿,提示全脑缺血再灌注可诱发大鼠肺组织损伤。肺泡巨噬细胞是肺组织中最丰富的先天性免疫细胞,通过产生过量的 IL-1 β 和 IL-18,引起肺水肿及炎症反应^[7]。中性粒细胞浸润是与肺损伤有关的

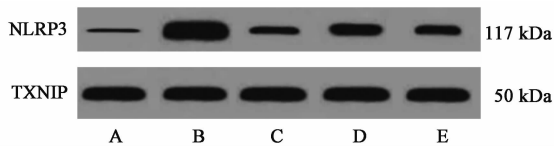


图 4 清热化痰解毒方对脑缺血再灌注大鼠肺组织中 TXNIP-NLRP3 的相互作用的影响

Fig. 4 Effect of Qingre Huatan Jiedu formula on TXNIP-NLRP3 coimmunoprecipitation in rat lung tissue cerebral ischemia and reperfusion

关键因素之一^[8]。MPO 是中性粒细胞浸润的标志物。中性粒细胞的消除能够明显降低动物模型中的肺损伤严重程度^[9]。研究发现,IL-1 β 能够上调细胞黏附因子-1 的表达,从而促进肺组织中嗜中性粒细胞的浸润^[10]。本研究中,大鼠 BALF 中 IL-1 β 和 IL-18 水平明显升高,且总细胞和多形核白细胞数量增加,MPO 活性明显增加。这提示,全脑缺血再灌注引起大鼠肺组织中巨噬细胞和中性粒细胞浸润,导致肺组织炎症性损伤,与过往研究一致。因此,改善脑缺血再灌注后诱发的肺损伤关键在于控制肺组织炎症反应。

目前,保护再灌注损伤所引起的继发性脏器损伤成为治疗脑缺血再灌注的重要环节之一,但尚缺乏具有明确疗效的靶向药物。中医药具有整体调整、多环节综合治疗的优势,在脑缺血再灌注的治疗中显示了较好疗效^[11]。清热化痰解毒方以清热解毒、利湿化痰法组方,具有清热解毒、活血通经、化痰散结的功效。本研究发现,清热化痰解毒方治疗能够改善全脑缺血再灌注大鼠肺水肿和肺组织病理学损伤。动物研究发现,IL-18 和 IL-1 β 中合抗体和 IL-1R 拮抗剂的应用能够减轻急性肺损伤动物模型中的肺损伤^[12]。本研究中,清热化痰解毒方治疗后大鼠肺组织中 IL-1 β 和 IL-18 水平明显降低,且 BALF 中白细胞数量减少,MPO 活性明显降低,提示,清热化痰解毒方可能通过抑制肺组织炎症反应,减轻肺组织巨噬细胞和中性粒细胞浸润,从而缓解肺组织损伤。

NLRP3 炎性小体主要定位于巨噬细胞和嗜中性粒细胞中,通过调节细胞因子的分泌,在急性肺损伤的发生和传播中起关键作用^[13]。已有研究证实,通过抑制 NLRP3 炎性小体激活可以防止败血症诱导的肺损伤^[14]。巨噬细胞中的 NLRP3 炎性小体活化能够影响这些促炎介质分泌以及肺泡通透性^[15]。NLRP3 或 Caspase-1 缺失能够减弱肺损伤中的中性粒细胞浸润^[16]。NLRP3 敲除或 Caspase-1 蛋白酶抑制

剂的应用能够抑制败血症诱导的急性肾损伤中的中性粒细胞浸润^[17]。然而,NLRP3 炎性小体在全脑缺血再灌注大鼠引起的肺组织损伤中的作用尚不清楚。本研究发现,模型组大鼠肺组织中 NLRP3 表达水平明显升高,且巨噬细胞和中性粒细胞中 NLRP3 阳性细胞数明显增加,提示全脑缺血再灌注引起大鼠肺组织炎症损伤可能与大鼠肺组织巨噬细胞和中性粒细胞中的 NLRP3 炎性小体激活有关。

NLRP3 炎性小体由核心传感蛋白,NLRP3,衔接蛋白 ASC 和 pro-Caspase-1 组成,能够被多种外源性和内源性危险信号激活。NLRP3 炎性小体的激活能够促进 pro-Caspase-1 向 Caspase-1 分裂,并促进促炎细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的成熟和释放,这些细胞因子能够进一步引起炎症反应,加重动物模型中的肺损伤^[18]。本研究发现,清热化痰解毒方能够抑制全脑缺血大鼠肺 BALF 中 IL-1 β 和 IL-18 水平的升高,同时抑制肺组织中的炎症细胞积聚、中性粒细胞浸润,并减少 NLRP3 炎性小体和 Caspase-1 的活化,降低 NLRP3,ASC,Caspase-1 的表达。提示,清热化痰解毒方的抗炎作用可能是通过抑制炎症细胞中 NLRP3 炎性小体活化,进而抑制 Caspase-1 的成熟及 IL-1 β ,IL-18 的分泌,从而改善肺组织损伤。

肺组织中 ROS 的产生能够介导 NLRP3 炎性小体的活化,因此,ROS 被认为是 NLRP3 炎性小体激活剂,参与调控 NLRP3 的表达^[19]。研究证实,ROS 与炎症过程的协同作用参与肺损伤的发病机制^[20]。另有研究证实,全脑缺血再灌注大鼠能够引起肺组织中 ROS 产生^[21]。TXNIP 是连接氧化应激与炎症的关键因子,是 NLRP3 炎性小体活化的重要介质。研究表明,TXNIP 是炎性小体活化的氧化还原敏感成分,ROS 能够诱导 TXNIP 从硫氧还蛋白(thioredoxin,TRX)中解离,与 NLRP3 结合形成 TXNIP-NLRP3,两者相互作用,导致 NLRP3 炎性小体活化^[22]。本研究中模型大鼠肺组织中 ROS 的产生明显增加,而经清热化痰解毒方治疗后,肺组织中 ROS 的产生明显降低,且 TXNIP 表达水平,TXNIP-NLRP3 免疫共沉淀均降低。结合过往研究推测,清热化痰解毒方可能通过抑制全脑缺血再灌注引起肺组织中的氧化应激,从而抑制 TXNIP 表达和 TXNIP-NLRP3 的相互作用,进而抑制 NLRP3 炎性小体的活化。

综上所述,清热化痰解毒方可以通过抑制 ROS 产生,下调 TXNIP 表达,阻断 TXNIP-NLRP3 炎症通路介导的促炎介质 IL-1 β 和 IL-18 的分泌,最终抑制

肺组织中炎性细胞浸润,从而对全脑缺血再灌注大鼠的炎症性肺损伤发挥保护作用。

[参考文献]

[1] 黄运林,叶俊宇,阮小贞. DADLE 对大鼠急性全脑缺血再灌注继发肺损伤的拮抗作用研究[J]. 深圳中西医结合杂志, 2016, 26(11): 17-18.

[2] LIU Z, ZHAO H, LIU W, et al. NLRP3 Inflammasome activation is essential for paraquat-induced acute lung injury[J]. *Inflammation*, 2015, 38(1): 433-444.

[3] Kamo N, Ke B, Ghaffari A A, et al. ASC/caspase-1/IL-1 β signaling triggers inflammatory responses by promoting HMGB1 induction in liver ischemia/reperfusion injury [J]. *Hepatology*, 2013, 58(1): 351-362.

[4] 刘祥树. 清热化痰方联合吸入剂治疗老年 COPD 急性加重期临床观察[J]. 陕西中医, 2017, 38(7): 893-894.

[5] 林旭,马福国,陈怀龙,等. PUN282987 对老龄大鼠全脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2017, 37(2): 243-246.

[6] 宋晓丽,李卫平,金钊,等. 茶多酚抗全脑缺血再灌注继发肺损伤的作用及机制研究[J]. 中国药房, 2010, 21(17): 1563-1565.

[7] 雷传江,焦艳,王关嵩,等. 受体相互作用蛋白 140 在脓毒症急性肺损伤大鼠肺泡巨噬细胞中的表达及其作用[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(9): 851-857.

[8] LIU S, SU X, PAN P, et al. Neutrophil extracellular traps are indirectly triggered by lipopolysaccharide and contribute to acute lung injury[J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep37252. .

[9] 方靖,杨雅婷,刘景云,等. 黄芪多糖通过抑制中性粒细胞活化减轻脂多糖诱导的大鼠肺损伤[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(8): 1020-1023, 1029.

[10] LIU Z, SUN C, TAO R, et al. Pyrroloquinoline quinone decelerates rheumatoid arthritis progression by inhibiting inflammatory responses and joint destruction via modulating NF- κ B and MAPK pathways [J]. *Inflammation*, 2016, 39(1): 248-256.

[11] 皮建彬,刘轲,张怀亮,等. 中医药对脑缺血再灌注损伤保护的实验研究进展[J]. 中医研究, 2016, 29(11): 77-78.

[12] Takahara M, Aoyama-Ishikawa M, Shuno K, et al. Role of endogenous IL-18 in the lung during endotoxin-induced systemic inflammation [J]. *Acute Med Surg*, 2014, 1(1): 23-30.

[13] JIANG L, ZHANG L, KANG K, et al. Resveratrol ameliorates LPS-induced acute lung injury via NLRP3 inflammasome modulation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84(11): 130-138.

[14] LUO Y P, JIANG L, KANG K, et al. Hemin inhibits NLRP3 inflammasome activation in sepsis-induced acute lung injury, involving heme oxygenase-1 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 20(1): 24-32.

[15] SONG C, HE L, ZHANG J, et al. Fluorofenidone attenuates pulmonary inflammation and fibrosis via inhibiting the activation of NALP3 inflammasome and IL-1 β /IL-1R1/MyD88/NF- κ B pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(11): 2064-2077.

[16] ZHANG Y, LI X, Grailer J J, et al. Melatonin alleviates acute lung injury through inhibiting the NLRP3 inflammasome [J]. *J Pineal Res*, 2016, 60(4): 405-414.

[17] CAO Y, FEI D, CHEN M, et al. Role of the nucleotide-binding domain-like receptor protein 3 inflammasome in acute kidney injury [J]. *FEBS J*, 2015, 282(19): 3799-3807.

[18] Howrylak J A, Nakahira K. Inflammasomes: Key mediators of lung immunity [J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79(1): 471-494.

[19] YU X, LAN P, HOU X, et al. HBV inhibits LPS-induced NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β production via suppressing the NF- κ B pathway and ROS production [J]. *J Hepatol*, 2017, 66(4): 693-702.

[20] 韩士超. ROS 介导的 NLRP3 炎症小体活化参与烧伤后肺损伤的机制研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2016.

[21] 杨冀萍,齐进冲,杨北,等. 活性氧在脑缺血-再灌注损伤后动态表达[J]. 脑与神经疾病杂志, 2016, 24(12): 731-734.

[22] GAO P, MENG X F, SU H, et al. Thioredoxin-interacting protein mediates NALP3 inflammasome activation in podocytes during diabetic nephropathy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(11): 2448-2460.

[责任编辑 周冰冰]