

喘可治对小鼠急性肺损伤 TLR4/NF- κ B/NLRP3 通路的影响

王凯, 刘小虹*

(广州中医药大学, 广州 510405)

[摘要] **目的:**研究喘可治注射液对脂多糖(LPS)诱导的小鼠急性肺损伤(ALI)的防治效果及作用机制。**方法:**SPF级雌性C57BL/6J小鼠48只,随机分为正常组、模型组、地塞米松组、喘可治组,每组12只。喘可治组每只小鼠腹腔注射0.2 mL·d⁻¹,1次/d,连续7d;地塞米松组造模前3d按1 mg·kg⁻¹腹腔注射,1次/d,连续3d;模型组注射等剂量的生理盐水,正常组不作处理。除正常组外,第8天腹腔注射LPS 0.1 mL (0.5 g·L⁻¹),乙醚吸入麻醉后,各小鼠滴鼻LPS 25 μ L (0.5 g·L⁻¹),制作ALI模型。24 h后取材检测。酶联免疫吸附法(ELISA)检测小鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β),IL-18的含量;免疫组织化学染色检测核转录因子- κ B (NF- κ B)p65的蛋白表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺组织p65,Toll样受体4(TLR4),Nod样受体蛋白3 (NLRP3),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (Caspase)-1蛋白表达;实时荧光定量PCR(Real-time PCR)检测肺组织p65和TLR4的mRNA表达。**结果:**与正常组比较,模型组小鼠血清TNF- α ,IL-1 β ,IL-18含量升高($P < 0.01$),肺组织p65,TLR4,NLRP3,Caspase-1蛋白表达升高,p65和TLR4 mRNA的表达升高($P < 0.05$);与模型组比较,喘可治组小鼠血清TNF- α ,IL-1 β ,IL-18含量降低($P < 0.01$),肺组织p65,TLR4,NLRP3,Caspase-1蛋白表达降低,p65和TLR4 mRNA的表达降低($P < 0.05$)。**结论:**喘可治注射液能有效改善LPS诱导的急性肺损伤小鼠肺组织的损伤程度,其机制可能通过抑制TLR4/NF- κ B/NLRP3信号通路进而对肺组织起到保护作用。

[关键词] 喘可治;急性肺损伤;核转录因子- κ B;Toll样受体4;Nod样受体蛋白3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)22-0143-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017220143

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170906.1345.024.html>

[网络出版时间] 2017-09-06 13:45

Effect of Chuankezhi Injection on TLR4/NF- κ B/NLRP3 Pathway in Mice with Acute Lung Injury

WANG Kai, LIU Xiao-hong*

(Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Chuankezhi injection on lipopolysaccharide (LPS) -induced acute lung injury (ALI) in mice and its mechanism. **Method:** The 48 SPF grade female C57BL/6J mice were randomly divided into normal group, model group, dexamethasone group, and Chuankezhi group, a total of 4 groups, 12 mice in each group. Each mouse was intraperitoneally injected with 0.2 mL·d⁻¹ in Chuankezhi group, once a day for 7 days. The mice in the dexamethasone group were injected intraperitoneally at 1 mg·kg⁻¹ per day for 3 days before modeling. The mice in model group were injected with equal dose of normal saline while the normal group had no treatment. Except in the normal group, LPS 0.1 mL (0.5 g·L⁻¹) was injected intraperitoneally on the 8 day, and the mice received 25 μ L (0.5 g·L⁻¹) by nasal drops after ether inhalation for anesthesia to establish ALI models. Detection was conducted after 24 h. The expression levels of tumor necrosis factor (TNF) - α , interleukin (IL) -1 β and IL-18 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay

[收稿日期] 20170703(017)

[基金项目] 广东省中医药局项目(粤中医函[2016]238号)

[第一作者] 王凯,在读博士,从事中医药治疗呼吸疾病研究,Tel:18898537182,E-mail:827108317@qq.com

[通讯作者] *刘小虹,教授,博士生导师,从事中医内科呼吸方向的研究,Tel:020-39358233,E-mail:wk880621@163.com

(ELISA). The expression level of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) p65 protein was detected by immunohistochemistry. Western blot was used to detect the expression levels of p65, Toll-like receptor4 (TLR4), Nod-like receptor protein 3 (NLRP3) and cysteine aspartate protease-1 (Caspase-1) protein in lung tissues, and Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the expression of p65 and TLR4 mRNA in lung tissues. **Result:** As compared with the normal group, the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-18 in serum in the model group were increased ($P < 0.01$); the expression of p65, TLR4, NLRP3 and Caspase-1 were increased; p65 and TLR4 mRNA were increased ($P < 0.05$). As compared with the model group, the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-18 in serum in Chuankezhi group were significantly decreased ($P < 0.01$), and the levels of p65, TLR4, NLRP3 and Caspase-1 protein and expression levels of p65 and TLR4 mRNA were also decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Chuankezhi injection can effectively improve the injury of lung tissues induced by LPS in mice with acute lung injury. The mechanism may be associated with inhibiting TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway to protect the lung tissues.

[Key words] Chuankezhi; acute lung injury; nuclear factor-kappa B (NF- κ B); Toll-like receptor4 (TLR4); nod-like receptor protein 3

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)及其慢性呼吸道疾病是全世界威胁人类健康的疾病之一。炎性介质调控的失衡在 ALI 的发病机制中发挥着重要作用,多种炎性因子和信号通路构成了复杂的网络通路^[1]。Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 是脂多糖(lipopo-lysaccharide, LPS)的重要受体,通过刺激细胞内信号转导通路,进而激活核转录因子- κ B(nuclear factor, NF- κ B),最终使炎症因子和前体分泌增加^[2],造成肺组织损伤^[3]。炎症因子是 ALI 发病过程中的重要组成部分,多种研究表明白细胞介素(interleukin, IL)-1 β , IL-18 的分泌需要 Nod 样受体蛋白 3(Nod-like receptor protein 3, NLRP3)炎性小体的激活^[4-5]。喘可治注射液是国家二类新药,主要由淫羊藿、巴戟天构成,具有温阳补肾、止咳平喘之功效。临床上主要用于支气管炎、哮喘、慢性阻塞性肺病等呼吸系统疾病,临床疗效显著^[6-7],亦有喘可治注射液治疗呼吸急症的临床报道^[8]。笔者在动物模型实验中发现喘可治注射液可以减轻炎症因子 IL-6 等的分泌^[9];有研究报道喘可治注射液对急性肺损伤大鼠有预防作用^[10];相关文献证实喘可治注射液中淫羊藿主要单体淫羊藿苷可以通过磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)和 NF- κ B 信号通路减轻 LPS 诱导的肺部炎症^[11],但喘可治注射液对 ALI 的治疗效果和作用机制尚不明确。因此,本研究通过建立 ALI 小鼠模型,观察喘可治注射液对 ALI 的治疗作用,并探讨其是否通过抑制 NF- κ B 信号通路和 NLRP3 炎症小体激活而发挥治疗作用,为临床上喘可治注射液治疗 ALI 提供实验基础。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠 48 只,18 ~ 20 g,由广东省医学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2013-0002。实验动物的开展通过了广州中医药大学实验动物伦理委员会的批准。专用标准饲料、水喂养。

1.2 试剂 LPS(美国 Sigma 公司,批号 L2630);肿瘤坏死因子- α (TNF- α), IL-1 β , IL-18 试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号分别为 EPX01A-30622-901, KMC0011, BMS618-3); TLR4, p65, NLRP3, Caspase-1, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗(鼠多克隆抗体)(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab13867, ab16502, ab214185, ab14367, ab8245)。引物序列 GAPDH (112 bp): 上游 5'-CCTGGATACC GCAGCTAGGA-3', 下游 5'-GCGGCGGAATGCCCC-3'; p65 (150 bp): 上游 5'-GACGATCTGTTTCC CCTCA-3', 下游 5'-GCTTCTCTCCCCAGGAATAC-3'; TLR-F (140 bp): 上游 5'-GGTGAGAAACGAG CTGGTAA-3', 下游 5'-ATAACTTTCCGGCTCTTG-3', 由广州莱德德生物科技公司合成。Trizol 总 RNA 提取试剂, M-MLV 逆转录酶, SYBR 试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号分别为 15596026, 18057018, 4472903); BCA 蛋白浓度试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 P0010); RIPA 裂解液(美国 Thermo 公司,批号 89901); 苏木素-伊红(HE)染色液(上海榕柏生物技术有限公司,批号 rbr00057)。

1.3 药品 地塞米松(湖北天药药业股份有限公司,批号 51411032);喘可治注射液(广州中医药大学第一附属医院,批号 16041801), 4 °C 冰箱备用。

1.4 仪器 ZMQS50F01 型超纯水器(美国 Millipore 公司);DMI 6000B 型倒置光学显微镜(德国 Leica 公司);Centrifuge 5702 型台式低速离心机(德国 Eppendorf 公司);BT124S 型分析天平(德国 Sartorius 公司);Victor X3 型多功能酶标仪(美国 PerkinElmer 公司);Fluor ChemE 型 ECL 化学发光仪(美国 CB 公司);Q32871 型核酸定量仪(广州源起生物科技有限公司);7500RT-PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);各种规格移液枪(德国 Eppendorf 公司),PowerPac Universl 型小型垂直电泳系统, GelDoc 型凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司);XW-80A 型涡旋混合仪(上海精实实业有限公司)。

2 方法

2.1 模型制备 经腹腔注射和滴鼻 LPS 制作小鼠肺损伤模型^[12-13],实验开始后第 8 天小鼠腹腔注射 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 0.1 mL,乙醚吸入麻醉后,各小鼠滴鼻 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 25 μL ,制作 ALI 模型。

2.2 动物分组与给药 检疫合格的小鼠适应性饲养 1 周,按照随机分组法分为正常组、模型组、地塞米松组、喘可治组,每组 12 只。根据前期预实验,喘可治组小鼠腹腔注射 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$ (相当于 $0.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),1 次/d,连续 7 d;地塞米松组造模前 3 d 按 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射,1 次/d,连续 3 d;正常组与模型组注射等剂量的生理盐水。各组动物用药量按人与动物之间计量换算关系换算^[14]。

2.3 标本采集 造模后 24 h,各组小鼠摘眼球取血约 0.4 mL 至 1.5 mL 离心管中,放置 1 h 后, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,吸取上层血清分装于两个离心管中并标记, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存,备用。剪取右肺上叶,4% 多聚甲醛固定,待做石蜡包埋。右肺下叶和左肺分装冻存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$,用于蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量 PCR 法(Real-time PCR)检测。

2.4 指标检测

2.4.1 酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清 TNF- α , IL-1 β ,IL-18 小鼠摘眼球取血后,室温静置 2 h, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上层血清,于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。取冻存的血清,严格按照说明书步骤进行。配制包被液,加一定稀释的待检样品 0.1 mL 于上述已包被的反应孔中,置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h。洗涤后于各反应孔中,加入新鲜稀释的酶标抗体(经滴定后的稀释度)0.1 mL; $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h 后洗涤,加底物液显色后孵育 30 min,加入终止液。检测 450 nm 及 570 nm 条件下的吸光度 A,通过标准曲线计算各样

本的含量。

2.4.2 肺组织病理观察 右肺组织 4% 多聚甲醛固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋,切成 4 μm 的薄片,脱蜡复水后 HE 染色。光学显微镜下观察肺组织病理学变化。

2.4.3 免疫组织化学检测肺组织 NF- κB 蛋白表达 采用抗生物素-生物素-过氧化物酶复合物(ABC)法,检测肺组织中 NF- κB 表达。按试剂盒提供的方法操作,DAB 显色。采用 IPP6.0 图像分析软件对免疫组织化学结果进行图像采集和定量分析。图片视野中细胞核为蓝色,NF- κB p65 阳性细胞为棕黄色。计算 3 个不同视野样本染色阳性率平均值,蛋白染色阳性细胞面积率 = 阳性细胞面积/总面积 $\times 100\%$ 。

2.4.4 Western blot 检测 NF- κB p65, TLR4, NLRP3, Caspase-1 蛋白的表达 取 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冻存的部分样品,检测 NF- κB p65, TLR4, NLRP3, Caspase-1 蛋白的表达。将肺组织匀浆,加入 RIPA 裂解液提取蛋白,BCA 法蛋白定量,上样后 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,敷抗体曝光,使用 Image J 软件进行半定量分析。

2.4.5 Real-time PCR 检测 NF- κB p65 和 TLR4 mRNA 的表达 取 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冻存的样品,按美国 Invitrogen 公司 trizol 试剂提取总 RNA 后,逆转录合成 cDNA。逆转录合成 cDNA 12 μL 反应体系中, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP 1 μL ,随机引物 1 μL ,样品 RNA 2 μL ,混匀后于 $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min,置入冰水中,离心,冰上加入: $5 \times$ buffer 4 μL , DTT ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2 μL , RNAsin($40 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 1 μL , M-MLVRT ($200 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 1 μL , $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 50 min; $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 min, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。按照说明书配制 PCR 反应体系:SYBR 10 μL ,上游引物 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2 μL ,下游引物 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2 μL ,反转录产物 2 μL ,扩增条件① $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 s;② $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 s;③ $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 20 s;④ 40 个循环。

2.5 统计学分析 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,采用单因素方差分析,组间比较用 LSD 法检验, $P < 0.05$ 表明有统计学意义。

3 结果

3.1 喘可治注射液对小鼠血清炎症因子 TNF- α , IL-1 β ,IL-18 含量的影响 与正常组比较,模型组中 TNF- α ,IL-1 β ,IL-18 显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,地塞米松组和喘可治组 TNF- α ,IL-1 β ,IL-18 显著降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

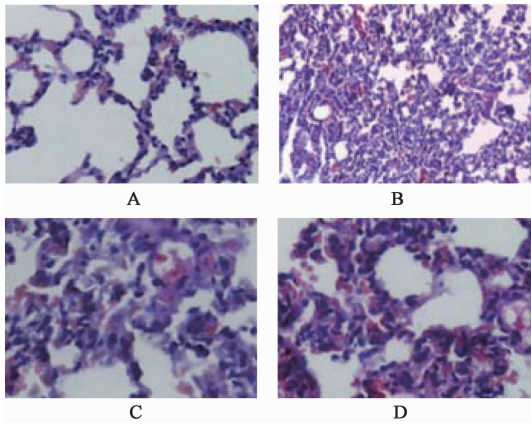
表 1 喘可治对小鼠血清中 TNF- α , IL-1 β , IL-18 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 1 Effect of Chuankezhi on TNF- α , IL-1 β and IL-18 in serum of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TNF- α	IL-1 β	IL-18
正常	-	3.06 ± 0.41	26.32 ± 0.87	363.37 ± 43.35
模型	-	5.34 ± 0.37 ¹⁾	39.69 ± 0.94 ¹⁾	590.63 ± 57.68 ¹⁾
地塞米松	0.001	3.62 ± 0.46 ²⁾	29.40 ± 0.74 ²⁾	401.30 ± 61.57 ²⁾
喘可治	0.75	3.98 ± 0.34 ²⁾	32.96 ± 0.79 ²⁾	454.36 ± 124.31 ²⁾

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

3.2 对肺组织病理变化的影响 正常组肺泡结构清晰,肺泡内未见渗出物,无出血、炎性细胞浸润及水肿,肺泡间隔未出现增厚现象;模型组可见肺泡结构被严重破坏,同时出现大面积肺泡融合,并且可见大量的炎性细胞浸润,肺泡间隔明显增宽;与模型组相比,地塞米松组和喘可治组肺泡结构恢复完整,炎性细胞较模型组浸润明显减少,肺泡壁未见明显增厚。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 地塞米松组;D. 喘可治组(图 2~3 同)

图 1 喘可治对小鼠肺组织病理变化的影响(HE, $\times 400$)

Fig.1 Effect of Chuankezhi on pathological changes of lung tissue in mice(HE, $\times 400$)

表 2 喘可治对小鼠 NF- κ B p65, TLR4, NLRP3, Caspase-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Effect of Chuankezhi on expression of NF- κ B p65, TLR4, NLRP3 and Caspase-1 of mice($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p65/GAPDH	TLR4/GAPDH	NLRP3/GAPDH	Caspase-1/GAPDH
正常	-	0.24 ± 0.05	0.33 ± 0.04	0.43 ± 0.05	0.36 ± 0.11
模型	-	0.43 ± 0.08 ¹⁾	0.71 ± 0.03 ¹⁾	0.74 ± 0.10 ¹⁾	0.63 ± 0.10 ¹⁾
地塞米松	0.001	0.31 ± 0.06 ²⁾	0.42 ± 0.03 ²⁾	0.53 ± 0.07 ²⁾	0.44 ± 0.08 ²⁾
喘可治	0.75	0.35 ± 0.05 ²⁾	0.54 ± 0.08 ²⁾	0.62 ± 0.06 ²⁾	0.47 ± 0.11 ²⁾

p65 和 TLR4 mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.3 对小鼠肺组织 NF- κ B p65 蛋白表达的影响 正常组小鼠肺组织部分细胞质呈浅染色(棕黄色),偶见肺巨噬细胞核着色(棕黄色);模型组可见肺组织 NF- κ B p65 呈强阳性免疫反应,分布于支气管黏膜上皮、巨噬细胞和肺泡上皮细胞,明显多于正常组,阳性反应产物不仅分布在阳性细胞的胞质中,胞核中也呈现阳性反应。即出现了核移位,阳性细胞主要为支气管黏膜上皮、巨噬细胞、肺泡上皮细胞;与模型组比较,地塞米松组和喘可治组细胞核阳性表达数明显减少。见图 2。

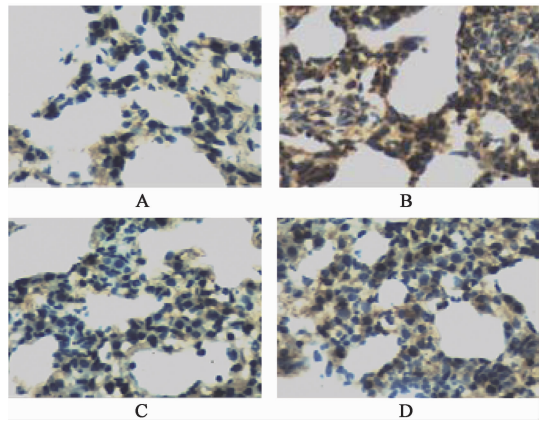


图 2 喘可治对小鼠肺组织 p65 蛋白表达的影响(IHC, $\times 400$)

Fig.2 Effect of Chuankezhi on expression of p65 protein in lung tissue of mice(IHC, $\times 400$)

3.4 对小鼠肺组织 NF- κ B p65, TLR4, NLRP3, Caspase-1 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组 NF- κ B p65, TLR4, NLRP3, Caspase-1 表达显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,地塞米松组和喘可治组的 NF- κ B p65, TLR4, NLRP3, Caspase-1 表达均降低 ($P < 0.05$)。见表 2,图 3。

3.5 各组小鼠肺组织 NF- κ B p65 和 TLR4 mRNA 表达比较 与正常组比较,模型组 NF- κ B p65 和 TLR4 mRNA 的相对表达量显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,地塞米松组和喘可治组的 NF- κ B

4 讨论

急性肺损伤是由肺炎等呼吸疾病引起的综合

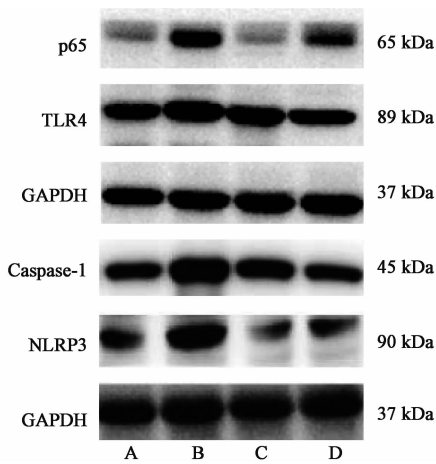


图 3 喘可治对小鼠肺组织 NF- κ B p65, TLR4, NLRP3, Caspase-1 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of Chuanketzi on expression of NF- κ B p65, TLR4, NLRP3, Caspase-1 in Lung tissue of mice

表 3 喘可治对小鼠 NF- κ B p65 和 TLR4 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 Effect of Chuanketzi on expression of NF- κ B p65 and TLR4 mRNA in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	NF- κ B 阳性率 /%	NF- κ B p65	TLR4
正常	-	16.52 ± 3.41	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型	-	48.73 ± 2.39 ¹⁾	1.78 ± 0.14 ¹⁾	1.71 ± 0.12 ¹⁾
地塞米松	0.001	21.52 ± 1.89 ²⁾	1.23 ± 0.09 ²⁾	1.18 ± 0.07 ²⁾
喘可治	0.75	29.68 ± 3.61 ²⁾	1.29 ± 0.18 ²⁾	1.32 ± 0.11 ²⁾

征,其特征表现为中性粒细胞性肺炎、内皮损伤和水肿,大量的实验和临床证据表明炎症在急性肺损伤中发挥着重要的作用^[15]。LPS 可以与 TLR4 蛋白结合诱导肺部炎症细胞因子的释放,肺损伤引起的炎症因子介导的毒性已经数次被证明。ALI 属于中医范畴的“暴喘”“喘脱”^[16],其病位在肺,与肾密切相关,病因病机为邪毒侵体导致肺肾出纳失常,进而累及全身脏器。目前,现代研究比较认可 ALI 的发病机制与 NF- κ B 信号通路相关;近年来,NLRP3 炎性小体作为机体免疫炎症反应和疾病发生过程中具有重要的作用。作为机体炎症反应的核心,NLRP3 炎性小体能够调节 Caspase-1 的活化,促进各种炎症因子 IL-1 β , IL-18 的分泌^[17-18]。因此,NLRP3 炎性小体为各种炎症性疾病提供了新的治疗靶点。有研究报道,穿心莲内酯可以减轻 LPS 与 TLR4 结合后诱导的小鼠肺损伤炎症反应,并揭示了其机制可能通过抑制 ROS 的产生,进而抑制 IKK α , IKK β 和 NLRP3 的活性,从而阻断 NF- κ B 信号通路

产生 pro-IL-1 β , pro-IL-18 和 NLRP3 通路 IL-1 β , IL-18 的分泌^[4]。

喘可治注射液由巴戟天、淫羊藿等中药提取有效成分而成,其主要功效是温阳补肾、止咳平喘;现代医学认为具有抗炎、平喘、调节免疫的作用^[19]。现代多项药理实验证明喘可治可能通过下丘脑-内分泌-免疫平衡网络调节 Th1/Th2 平衡,并可以抑制 IL-6, IL-17 等因子的释放^[20];喘可治还可以上调 COPD 大鼠肺组织中 STAT6 蛋白,下调 STAT4 蛋白的表达^[21]。以上研究都证实了喘可治对肺部疾病具有抗炎、提高免疫的作用。

本研究通过 LPS 诱导 ALI 小鼠模型,证明了喘可治注射液可以改善 LPS 诱导的小鼠肺损伤。实验结果表明喘可治注射液可以减少肺损伤小鼠炎症因子 TNF- α 的分泌,抑制 NF- κ B 和 TLR4 蛋白的表达并下调其 mRNA 的水平;同时对 NLRP3 和 Caspase-1 的蛋白表达具有下调作用,进而减少 NLRP3 介导的 IL-1 β , IL-18 的分泌,从而使小鼠肺损伤减轻。此外,国内外的多项实验表明 NF- κ B 和 NLRP3 炎性小体是产生炎症细胞因子的 2 个重要信号^[22-23]。一方面, IL-1 β , IL-18 前体的产生依赖于 NF- κ B 信号通路的激活,而 LPS 与 TLR4 的结合可以激活 NF- κ B;另一方面 NLRP3 炎性小体的激活可以调节和促分泌促炎细胞因子 IL-1 β 和 IL-18。一旦被激活,NLRP3 与 ASC 结合并导致 Caspase-1 激活,Caspase-1 可以诱导 IL-1 β 和 IL-18 分泌和成熟^[24-25]。

综上所述,喘可治注射液可以减少细胞炎症因子 IL-1 β , IL-18, TNF- α 的分泌;同时可以下调小鼠肺损伤相关蛋白 p65, TLR4, NLRP3, Caspase-1 等的表达,并下调 p65 和 TLR4 的 mRNA 的表达水平。这提示笔者喘可治注射液可能通过抑制 NF- κ B 信号通路和 NLRP3 炎性小体的激活对小鼠肺损伤起到保护作用,TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号轴可能会成为临床上治疗急性肺损伤的新靶点;但 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号轴中 NF- κ B 和 NLRP3 联系桥梁尚未完全清楚,关于两者之间的联系靶点需要进一步研究探讨。

[参考文献]

[1] ZHANG A, PAN W, LV J, et al. Protective effect of amygdalin on LPS-induced acute lung injury by inhibiting NF- κ B and NLRP3 signaling pathways [J]. Inflammation, 2017, 40(3): 745-751.
[2] 唐辉英,余定平,马颐娇. 喘可治注射液联合细辛脑

- 注射液治疗小儿毛细支气管炎的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2016, 31(5): 599-603.
- [3] Koch K N, Hartung M L, Urban S, et al. Helicobacter urease-induced activation of the TLR2/NLRP3/IL-18 axis protects against asthma[J]. J Clin Invest, 2015, 125(8): 3297-3302.
- [4] PENG S, GAO J, LIU W, et al. Andrographolide ameliorates OVA-induced lung injury in mice by suppressing ROS-mediated NF- κ B signaling and NLRP3 inflammasome activation [J]. Oncotarget, 2016, 7 (49): 80262-80274.
- [5] Nurmi K, Kareinen I, Virkanen J, et al. Hemin and cobalt protoporphyrin inhibit NLRP3 inflammasome activation by enhancing autophagy: a novel mechanism of inflammasome regulation[J]. J Innate Immun, 2017, 9(1): 65-82.
- [6] 陈诗琪, 杨欣宇, 唐潇旖, 等. 喘可治注射液治疗慢性阻塞性疾病急性加重期的系统评价[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(14): 2789-2795.
- [7] 刘雅文, 曾琴, 许萍. 喘可治注射液治疗支气管哮喘的系统评价[J]. 中国药业, 2017, 26(1): 49-53.
- [8] 向薇. 喘可治注射液治疗呼吸系统急症[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 252-254.
- [9] 黄东晖, 王慧贤, 吴少丽, 等. 喘可治注射液对小鼠气道炎症 Th17 与 Treg 的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(5): 333-336.
- [10] 肖光华, 吴敏, 宓越群, 等. 喘可治对急性肺损伤大鼠预防作用的研究[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2008, 28(10): 1245-1249.
- [11] XU C, LIU B, WU J, et al. Icaritin attenuates LPS-induced acute inflammatory responses: involvement of PI3K/Akt and NF- κ B signaling pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 642(1/3): 146-153.
- [12] 李新甫, 汪建新. 急性肺损伤动物模型研究进展[J]. 国外医学·呼吸系统分册, 2005, 25(7): 506-508, 511.
- [13] 黄建华, 李理, 袁伟锋, 等. 脂多糖经不同给药方式致急性肺损伤小鼠模型比较研究[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2013, 12(3): 264-268.
- [14] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [15] WANG R, LU B, Gerard C, et al. C5L2, the second C5a anaphylatoxin receptor, suppresses LPS-induced acute lung injury[J]. Am J Resp Cell Mol, 2016, 55(5): 657-666.
- [16] 梁栋, 聂时南, 刘红梅, 等. NLRP3 炎症体在肺损伤中的研究进展[J]. 临床急诊杂志, 2014, 15(11): 698-701.
- [17] Im H. The NLRP3 inflammasome: role in airway inflammation [J]. Clin Exp Allergy, 2014, 44 (2): 160-172.
- [18] Simpson J L, Phipps S, Baines K J, et al. Elevated expression of the NLRP3 inflammasome in neutrophilic asthma[J]. Eur Respir J, 2014, 43(4): 1067-1076.
- [19] 胡正波, 陈路佳, 卢海波, 等. 喘可治注射液治疗慢性阻塞性肺疾病的系统评价[J]. 中国药业, 2013, 22(23): 9-12.
- [20] 黄东晖, 吴少丽, 王慧贤, 等. 喘可治注射液通过调节 Th17/Treg 平衡抑制哮喘模型小鼠气道炎症的实验研究[J]. 中药材, 2014, 37(3): 478-481.
- [21] 黄纯美, 张蓓, 许仕杰, 等. 喘可治注射液对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺组织 STAT4、STAT6 蛋白表达的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2014, 31(4): 587-591.
- [22] HE Y, Hara H, N  n  ez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation [J]. Trends Biochem Sci, 2016, 41(12): 1012-1021.
- [23] ZHONG Z, Umemura A, Sanchez-Lopez E, et al. NF- κ B restricts inflammasome activation *via* elimination of damaged mitochondria [J]. Cell, 2016, 164 (5): 896-910.
- [24] 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.
- [25] XU B, HUANG S, WANG C, et al. Antiinflammatory effects of dihydromyricetin in a mouse model of asthma [J]. Mol Med Rep, 2017, 15(6): 3674-3680.

[责任编辑 邹晓翠]