

· 基础研究 ·

清瘟败毒饮抑制 TLR4/NF- κ B 通路调控小鼠肺泡巨噬细胞自噬减轻脓毒症肺损伤的实验研究易 琼^{1,2} 戴飞跃¹ 王建湘¹ 丁 灿¹ 廖 杨² 张彬彬² 蔡 鹏²

摘要 目的 探讨清瘟败毒饮调控小鼠肺泡巨噬细胞自噬减轻脓毒症肺损伤的机制。方法 将 60 只 C57BL/6 小鼠按随机数字表法分为空白组、模型组、清瘟败毒饮低、中、高剂量组及地塞米松组, 每组 10 只。采用腹腔注射脂多糖 (LPS) 建立脓毒症肺损伤动物模型。清瘟败毒饮各剂量组每天分别予 607.75、1 215.5、2 431 mg/kg 灌胃, 每日 1 次; 地塞米松组予尾静脉注射地塞米松 1.3 mg/kg, 每日 1 次; 空白组予以等量生理盐水腹腔注射, 模型组予以腹腔注射生理盐水, 干预时间均为 1 周。实验结束时, 用 HE 染色观察小鼠肺组织的病理学改变, 计算肺组织病理学评分, 取肺组织称重测定湿重/干重比, 蛋白免疫印迹法 (Western Blot) 检测小鼠肺组织中 Toll 样受体 4 (TLR4)、核因子- κ B (NF- κ B)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3)、微管相关蛋白 1 轻链 3-II (LC3-II)、自噬相关蛋白 beclin-1 的蛋白表达水平, 电子显微镜观察肺泡巨噬细胞超微结构。结果 光镜示空白组小鼠肺组织肺泡壁光滑, 结构清晰完整, 肺泡腔无渗出。模型组小鼠肺泡腔内大量红细胞和炎性细胞浸润, 肺泡间隔及肺泡壁增厚, 部分肺泡腔塌陷, 肺组织病理学评分和肺组织湿重/干重比较空白组明显升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 清瘟败毒饮各剂量组及地塞米松组小鼠肺组织水肿和炎性浸润均减轻, 肺组织结构破坏改善, 肺组织病理学评分和肺组织湿重/干重比明显降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与清瘟败毒饮低剂量组比较, 清瘟败毒饮中、高剂量组和地塞米松组的小鼠肺组织水肿和炎性浸润进一步减轻, 肺组织结构破坏改善, 肺组织病理学评分和肺组织湿重/干重比明显降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。透射电镜示空白组肺泡巨噬细胞超微结构正常, 模型组肺泡巨噬细胞皱缩、胞质饱满度降低, 游离面微绒毛变短、稀疏、排列不整齐, 胞质内很少有自噬小体形成, 线粒体嵴消失, 板层小体破溃, 可见细胞核固缩、核碎裂及核溶解。与模型组比较, 清瘟败毒饮各剂量组和地塞米松组的肺泡巨噬细胞形态及细胞内超微结构均明显改善。与空白组比较, 模型组 TLR4、NF- κ B、NLRP3 蛋白表达显著增加 ($P<0.01$), LC3-II、beclin-1 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 清瘟败毒饮各剂量组及地塞米松组 TLR4、NF- κ B、NLRP3 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), LC3-II、beclin-1 蛋白表达显著增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与清瘟败毒饮低剂量组比较, 清瘟败毒饮中、高剂量组及地塞米松组 TLR4、NF- κ B、NLRP3 的蛋白表达显著降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), LC3-II、beclin-1 的蛋白表达显著增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 清瘟败毒饮对脓毒症小鼠肺损伤有保护作用, 其机制可能是通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路, 增加小鼠肺泡巨噬细胞自噬来实现的。

关键词 清瘟败毒饮; 脓毒症肺损伤; 肺泡巨噬细胞; Toll 样受体 4; 核因子- κ B; 自噬

Qingwen Baidu Decoction Regulated Mouse Alveolar Macrophages Autophagy to Reduce Sepsis Induced Lung Injury via Inhibiting TLR4/NF- κ B Signaling Pathway: an Experimental Study

YI Qiong^{1,2}, DAI Fei-yue¹, WANG Jian-xiang¹, DING Can¹, LIAO Yang², ZHANG Bin-bin², and CAI Peng²
1 Department of ICU, First Hospital, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha (410007); 2 School of Integrated Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha (410208)

基金项目: 湖南省中医药科研计划项目青年基金 (No.2021175); 湖南省卫健委一般项目 (No.202117011236); 湖南中医药大学校级科研联合基金一般项目 (No.2020XJJJ041)

作者单位: 1. 湖南中医药大学第一附属医院重症医学科 (长沙 410007); 2. 湖南中医药大学中西医结合学院 (长沙 410208)

通讯作者: 戴飞跃, Tel: 0731-89669389, E-mail: daifeiyue0406@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20220815.320

ABSTRACT Objective To study the mechanism of Qingwen Baidu Decoction (QWBDD) in regulating autophagy of mouse alveolar macrophages and alleviating sepsis induced lung injury. **Methods** A total of 60 C57BL/6 mice were divided into blank group, model group, low, medium, high dose QWBDD groups, and dexamethasone group (DXM) by random digit table, 10 mice in each group. The animal model of sepsis induced lung injury was established by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS). QWBDD at 607.75, 1215.5, 2431.0 mg/(kg·d) was respectively administered to mice in corresponding groups by gastrogavage, once per day. DXM at 1.3 mg/(kg·d) was injected to mice in DXM group from the tail vein, once per day. Mice in the blank group were administered with the same amount of normal saline by gastrogavage. Mice in the model group were intraperitoneally injected with normal saline. All intervention course was 1 week. By the end of the experiment, HE staining was used to observe the pathological changes of lung tissues. The pathological scores of lung tissues were calculated. The wet weight/dry weight (W/D) ratio of the lung tissue was weighed. Western Blot was used to detect protein expressions of Toll-like receptor 4 (TLR4), nuclear factor- κ B (NF- κ B), nucleotide binding oligomerization domain like receptor protein 3 (NLRP3), microtubule-associated protein 1 light chain3 - II (LC3-II), and beclin-1 in mouse lung tissues. The ultrastructure of alveolar macrophage was observed under electron microscope. **Results** The alveolar wall of the lung tissue in the blank group was smooth, the structure was clear and complete, with no exudation in the alveolar cavity. In the model group, numerous erythrocytes and inflammatory cells infiltrated in the alveolar cavity, the alveolar septum and alveolar wall were thickened, parts of the alveolar cavity were collapsed, and the lung pathological score and W/D significantly increased than those in blank group ($P<0.01$). Compared with the model group, the alveolar tissue edema and inflammatory infiltration were attenuated, the destruction of alveolar tissue structure was alleviated, and the lung pathological score and W/D significantly decreased in each dose QWBDD group and DXM group ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with low dose QWBDD group, edema and inflammatory infiltration of the alveolar tissue were further attenuated in medium and high dose QWBDD groups, the destruction of alveolar tissue structure was alleviated, and the lung pathological score and W/D were significantly lowered ($P<0.05$, $P<0.01$). The ultrastructure of alveolar macrophage in the blank group was normal. The alveolar macrophage in the model group shrank, the plumpness of cytoplasm decreased, the microvilli on the free surface became shorter and sparser, and were irregularly arranged. There were few autophagy bodies in the cytoplasm, the mitochondrial cristae disappeared, the lamellar bodies collapsed. Cell nuclear pyknosis, nuclear fragmentation, and nucleolysis were observed. Compared with the model group, the morphology and intracellular ultrastructure of alveolar macrophages in each dose QWBDD group and DXM group were significantly improved. Compared with the blank group, the protein expressions of TLR4, NF- κ B, NLRP3 significantly increased ($P<0.01$), protein expressions of LC3-II and beclin-1 significantly decreased ($P<0.01$) in the model group. Compared with the model group, protein expressions of TLR4, NF- κ B, NLRP3 decreased significantly in each dose QWBDD group and DXM group ($P<0.05$, $P<0.01$), protein expressions of LC3-II and beclin-1 significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with low dose QWBDD group, the protein expressions of TLR4, NF- κ B, NLRP3 significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), and protein expressions of LC3-II and beclin-1 significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$) in medium/high dose QWBDD and DXM group. **Conclusion** QWBDD had protective effect on sepsis induced lung injury mice, and its mechanism might increase autophagy of mouse alveolar macrophages via inhibiting TLR4/NF- κ B signaling pathway.

KEYWORDS Qingwen Baidu Decoction; sepsis induced lung injury; alveolar macrophage; Toll-like receptor 4; nuclear factor- κ B; autophagy

脓毒症是指因感染引起的宿主反应失调导致的危及生命的器官功能障碍^[1]。脓毒症肺损伤是脓毒症器官衰竭中最主要的致死性并发症,病死率高达30%~50%^[2],目前尚无有效的治疗药物,探索防治脓

毒症肺损伤的药物具有重要意义。脓毒症属于中医学中的“温疫热毒”,证型以热毒内盛、气血两燔为主,清瘟败毒饮具有气血两清、清热解毒、凉血泻火之功效。课题组前期研究证实,清瘟败毒饮可改善脓毒症

患者的呼吸衰竭^[3],可降低脓毒症兔的 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) / 核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路及炎症因子白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的表达^[4, 5]。TLR4/NF- κ B 信号通路是经典的炎症识别通路,细胞自噬是 TLR4 受体激活后产生的一种效应^[6],自噬是巨噬细胞吞噬和清除体内病原微生物的重要机制,自噬的标志性蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3- II, LC3- II) 和自噬相关蛋白 beclin-1 是 TLR4/NF- κ B 通路的作用靶点之一^[7]。肺泡巨噬细胞的自噬在脓毒症肺损伤中具有清除炎症、提高免疫等作用^[8],提高细胞自噬可抑制炎症反应,减轻脓毒症肺损伤^[9]。清瘟败毒饮抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路的抗炎作用与肺泡巨噬细胞自噬是否相关,值得探索。

本实验通过脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 腹腔注射构建脓毒症小鼠急性肺损伤实验模型,通过肺组织 HE 染色、蛋白质印迹法 (Western Blot)、电子显微镜等方法,探讨清瘟败毒饮通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路调控肺泡巨噬细胞自噬来减轻脓毒症肺损伤的潜在机制。

材料与方法

1 动物 60 只 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,6~8 周龄,体重 (20 ± 2) g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SYXK (湘) 2020-0010,合格证号:430727211101438538。动物实验均遵照《中华人民共和国实验动物管理条例》,并通过湖南中医药大学第一附属医院伦理委员会审查批准 (No.20201010-10)。

2 药物 清瘟败毒饮组成 (按照课题组前期研究^[4, 5]的给药组成和剂量制备):生石膏 30 g 知母 10 g 黄连 6 g 黄芩 10 g 栀子 10 g 生地黄 15 g 水牛角 30 g 牡丹皮 10 g 赤芍 10 g 淡竹叶 10 g 连翘 10 g 玄参 10 g 桔梗 10 g 白参 10 g 甘草 6 g。上述中药饮片按照标准流程煎煮、浓缩、纯化制成药粉,每克药粉相当于生药 20 g。由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供,批号:20210705,所有中药饮片均由湖南中医药大学第一附属医院主任药师张志国鉴定,均符合 2020 年版《中国药典》要求。

3 主要试剂及仪器 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS, 北京索莱宝科技有限公司,批号:04163579);

苏木素染液 (北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:ZLI-9610);伊红染色液 (北京索莱宝,批号:G1100);超净高级封片胶 (BASO,批号:YZB);放射免疫沉淀 (radio-immunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA) 细胞裂解液 (北京普利莱基因技术有限公司,批号:C1053);蛋白定量 (protein quantification kit, BCA) 试剂盒 (Elabscience,批号:E-BC-K318-M);聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜 (Millipore,批号:IPVH00010);牛血清白蛋白 (北京索莱宝,批号:A8020);超敏发光液 (赛默飞,批号:RJ239676);目的一抗:抗鼠 TLR4 抗体和抗鼠 NF- κ B 抗体 (美国 Proteintech 公司,批号分别是 19811-1-AP、14220-1-AP);抗鼠 NLRP3 抗体、抗鼠 beclin-1 抗体、抗鼠 LC3- II 抗体 (英国 Abcam 公司,批号分别是 ab263899、ab289864、ab192890);抗鼠 GAPDH 抗体、辣根酶标山羊抗鼠 IgG (H+L) 和辣根酶标山羊抗兔 IgG (H+L) (北京中杉金桥,批号分别是 TA-08、ZB-2305、ZB-2301)。主要仪器:光学显微镜 (Olympus,型号:BX43);切片机 (Leica,型号:2235);低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司,型号:5424R);电热恒温水浴锅 (上海助蓝仪器科技有限公司,型号:HH-11-2);全自动酶标仪 (北京市六一仪器厂,型号:WD-2102B);蛋白垂直电泳仪 (北京市六一仪器厂,型号:DYY-6C);全自动样品快速研磨仪 (上海净信实业发展有限公司,型号:Tiss-12);超高灵敏度化学发光成像系统 (伯乐生命医学产品上海有限公司,型号:Chemi Doc™ XRS+);全自动化学发光图像分析系统 (上海天能科技有限公司,型号:Tanon-5200);透射电镜 (日本 JEOL 公司,型号:JEM-1230)。

4 动物分组及给药方法 C57BL/6 小鼠 60 只,随机数字表法随机抽取 10 只做为空白组,参照文献 [10] 的方法,其余 50 只予以 LPS 10 mg/kg 腹腔注射进行造模,空白组给予等量生理盐水腹腔注射。采用 HE 染色评价模型的成功与否,造模成功的标准是在 HE 染色下肺泡结构破坏,肺间隔增厚、水肿,局部有透明膜形成,肺泡腔内可见大量炎性细胞浸润和红细胞渗出^[11]。将其余大鼠随机分为 5 组,模型组、清瘟败毒饮低、中、高剂量组、地塞米松组,每组 10 只。空白组用等体积生理盐水灌胃,按照人-小鼠体表面积给药剂量换算表^[12]对小鼠给药剂量进行换算,清瘟败毒饮的 70 kg 成人用药剂量为 187 g/d

生药, 相当于 9.35 g/d 药粉, 70 kg 人与 20 g 小鼠的换算系数为 0.0026, 换算成小鼠 (中剂量组) 每日给药剂量为 1 215.5 mg/kg, 因此, 换算成清瘟败毒饮组低、中、高剂量组每天给药 (成品药粉) 分别为 607.75、1 215.5、2 431 mg/kg, 灌胃容积为每只小鼠 2 mL, 每天灌胃 1 次, 灌胃 7 天。地塞米松成人给药剂量 10 mg/d, 按体表面积折算公式^[12] 计算后, 小鼠每天给予地塞米松 1.3 mg/kg 尾静脉注射, 每天 1 次, 连续 7 天。末次给药后 1 h, 戊巴比妥麻醉动物, 颈椎脱臼法予以安乐死, 取肺组织备用。

5 检测指标与方法

5.1 组织病理学形态观察 分离并取出左肺下叶组织, 流水下冲洗数小时, 经 70%、80%、90% 各级乙醇溶液脱水, 纯酒精、二甲苯等量混合液 15 min, 二甲苯 I、II 各 15 min (至透明为止)。放入二甲苯和石蜡各半的混合液 15 min, 再放入石蜡 I、石蜡 II 透蜡各 50~60 min。石蜡包埋, 切片 (厚度 4~5 μ m)。将石蜡切片进行烤片, 然后脱蜡, 水化。将已入蒸馏水后的切片放入苏木精水溶液中染色 3 min, 盐酸乙醇分化液分化 15 s, 稍水洗, 返蓝液返蓝 15 s, 流水冲洗, 伊红染色 3 min, 流水冲洗, 脱水, 透明, 封片, 镜检。

5.2 肺组织湿重/干重比 实验结束时, 剪断小鼠气管、取右肺组织, 称湿重, 然后将右肺置于 65 $^{\circ}$ C 恒温箱重干燥, 24 h 后取出, 称干重, 计算肺湿重/干重比值。肺湿重/干重比值 = 湿重/干重。

5.3 Western Blot 测定肺泡组织 TLR4、NF- κ B、NLRP3、LC3-II、beclin-1 蛋白表达 分离肺组织, 将组织样品用镊子取出, 剪取 50 mg 样品置于离心管内, 加入 1 mL 的裂解液。将离心管放入研磨仪内, 设置 65 Hz、60 s 条件, 可增加研磨次数, 直至研磨充分。4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 高速离心机离心 10 min, 取上清液, 加入缓冲液, 沸水煮 5 min, 测定蛋白含量。根据配方配制 SDS-PAGE 凝胶。在样本蛋白中加入 5 $\times$ Loading buffer, 100 $^{\circ}$ C 水浴加热煮沸 10 min 使蛋白变性。加入已经架好的制胶板中, 缓慢加入至板的 2/3 的位置, 加入无水乙醇压胶。待分离胶凝固后, 加入浓缩胶, 并插上齿梳, 等到浓缩胶完全凝固后, 配置 1 $\times$ 电泳液, 将架子放入到电泳液里拔去齿梳, 加入一定体积的蛋白样品和 Marker。配制 1 $\times$ 电泳液, 用 1 $\times$ 电泳液浸没胶板, 开始电泳, 60 V 压缩蛋白, 80 V 分离蛋白 (120 min), 当条带跑至胶板一半的时候配置 1 $\times$ 转膜液, 并预冷, 根据预计条带的位置裁剪好 PVDF 膜 (约 1~2 cm), 甲醇激

活 15 s, 切好大小合适含有内参或目的条带的胶, 放好“三明治” (海绵-滤纸-胶-膜-滤纸-海绵), 用 1 $\times$ 转膜液将“三明治”浸没, 用 300 mA 恒流转膜, 依据不同蛋白相对分子质量设定转膜时间。转膜成功后, 取出 PVDF 膜, 用 1 $\times$ Tris-HCl 缓冲盐溶液 (Tris-buffered saline and tween, TBST) 配置 3% 的脱脂牛奶封闭液, 封闭 1 h。配置 1 抗稀释液 (根据抗体说明书推荐浓度), 将 PVDF 膜孵育一抗 (抗鼠 TLR4 抗体、抗鼠 NF- κ B 抗体、抗鼠 NLRP3 抗体、抗鼠 beclin-1 抗体、抗鼠 LC3-II 抗体) 过夜, 洗膜, 用 1 $\times$ TBST 浸泡 10 min 后弃掉 1 $\times$ TBST, 重复 3 次。配置二抗稀释液 (根据抗体说明书推荐浓度, 1:2 000 稀释), 将 PVDF 膜孵育二抗 (抗鼠 GAPDH 抗体、辣根酶标山羊抗鼠 IgG、辣根酶标山羊抗兔 IgG) 2 h。洗膜, 用 1 $\times$ TBST 浸泡 10 min 后弃掉 1 $\times$ TBST, 重复 3 次。配置超敏增强型化学发光试剂 (enhanced chemiluminescence, ECL) 显影液, 与 PVDF 膜反应 5 min 后, 放置于超高灵敏度化学发光成像系统显影成像, 测定蛋白条带并拍照记录。

5.4 透射电镜观察肺泡巨噬细胞的超微结构 取右肺下叶, 2.5% 戊二醛, 磷酸缓冲液配制固定 2 h, 磷酸漂洗液漂洗 3 次, 1% 锇酸固定液固定 2~3 h, 再次磷酸漂洗液漂洗, 乙醇脱水、丙酮脱水, 包埋过夜, 超薄切片机切片, 7.3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色, 透射电镜观察肺泡巨噬细胞的超微结构并拍片、记录。

6 统计学方法 使用统计学软件 SPSS 23.0 进行数据分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据进行正态分布和方差齐性分析, 若符合正态分布, 多组比较采用单因素方差分析。两两比较时, 方差齐采用 LSD 法, 方差不齐采用 Dunnett's T3 法。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 实验小鼠死亡情况 60 只小鼠实验过程中, 死亡 8 只。模型组 3 只, 其中 1 只造模后因气道内出血死亡, 1 只造模后出现严重的腹泻脱水死亡, 1 只造模后迅速出现多脏器功能衰竭死亡; 清瘟败毒饮低剂量组死亡 1 只, 由于造模后迅速出现多脏器功能衰竭死亡; 清瘟败毒饮中剂量组死亡 2 只, 1 只灌胃后返流窒息死亡, 1 只灌胃时药物进入气道造成窒息死亡; 清瘟败毒饮高剂量组死亡 1 只, 由于灌胃时药物进入气道造成窒息死亡; 地塞米松组死亡 1 只, 造模后迅速出现难以控制的感染性休克死亡。

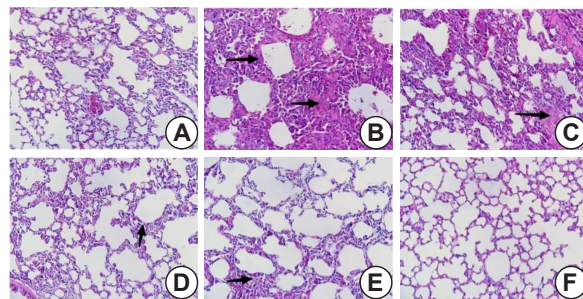
2 各组小鼠肺组织湿重/干重比及肺泡组织病理评分比较(表1,图1) 空白组小鼠肺泡壁光滑,肺泡腔无渗出且结构清晰完整。模型组小鼠肺泡腔出现大量红细胞、炎性细胞及血浆样物质渗出,肺泡间隔及肺泡壁明显增厚,部分肺泡腔塌陷。与模型组比较,清瘟败毒饮各剂量组及地塞米松组的肺组织水肿及炎性浸润均减轻,肺泡间隔及肺泡壁增厚程度明显改善;与清瘟败毒饮低剂量组比较,清瘟败毒饮中、高剂量组及地塞米松组小鼠肺组织的炎症程度进一步减轻,肺泡间隔及肺泡壁增厚程度明显改善。与空白组比较,模型组小鼠肺病理学评分明显升高($P<0.01$);与模型组比较,清瘟败毒饮各剂量组及地塞米松组的小鼠肺病理学评分均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);与清瘟败毒饮低剂量组比较,清瘟败毒饮中、高剂量组及地塞米松组的小鼠肺病理学评分均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与空白组比较,模型组小鼠肺组织湿/干比明显升高($P<0.01$);与模型组比较,清瘟败毒饮各剂量组及地塞米松组的小鼠肺组织湿/干比均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);与清瘟败毒饮低剂量组比较,清瘟败毒饮中、高剂量组及地塞米松组的小鼠肺组织湿/干比均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。

表1 各组小鼠肺组织湿/干比及组织病理评分的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肺组织湿/干比	肺组织病理评分(分)
空白	10	3.282 ± 0.523	0.667 ± 0.095
模型	7	5.531 ± 0.675*	3.524 ± 0.131*
清瘟败毒饮低剂量	9	4.924 ± 0.551 [△]	2.185 ± 0.106 [△]
清瘟败毒饮中剂量	8	4.165 ± 0.524 ^{△△}	1.061 ± 0.098 ^{△△}
清瘟败毒饮高剂量	9	4.168 ± 0.517 ^{△△△}	0.856 ± 0.125 ^{△△△}
地塞米松	9	3.863 ± 0.512 ^{△△△}	0.842 ± 0.063 ^{△△△}

注:与空白组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$;与低剂量组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$

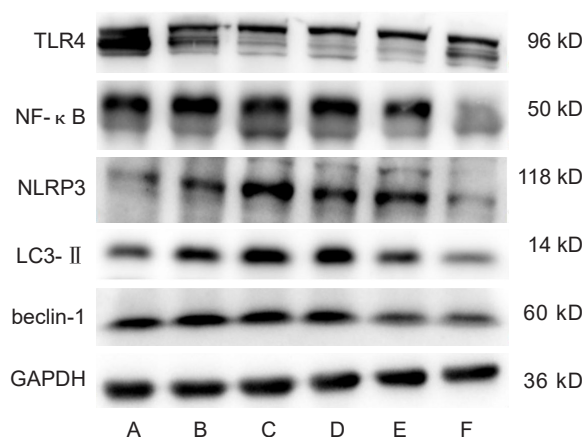
3 各组小鼠肺泡组织中TLR4、NF- κ B、NLRP3、LC3-II、beclin-1蛋白表达比较(表2,图2)与模型组比较,清瘟败毒饮各剂量组及地塞米松组小鼠肺泡组织中TLR4、NF- κ B、NLRP3蛋白



注:A为空白组;B为模型组;C为清瘟败毒饮低剂量组;D为清瘟败毒饮中剂量组;E为清瘟败毒饮高剂量组;F为地塞米松组;箭头所示为典型病变处

图1 各组小鼠肺泡组织病理学变化(HE, ×400)

表达显著降低,LC3-II、beclin-1蛋白表达显著增加($P<0.05$, $P<0.01$);与清瘟败毒饮低剂量组比较,清瘟败毒饮中、高剂量组及地塞米松组小鼠肺泡组织中TLR4、NF- κ B、NLRP3蛋白表达显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),LC3-II、beclin-1蛋白表达显著增加($P<0.05$, $P<0.01$)。



注:A为空白组;B为模型组;C为清瘟败毒饮低剂量组;D为清瘟败毒饮中剂量组;E为清瘟败毒饮高剂量组;F为地塞米松组

图2 各组小鼠肺泡组织TLR4、NF- κ B、NLRP3、LC3-II、beclin-1蛋白电泳图

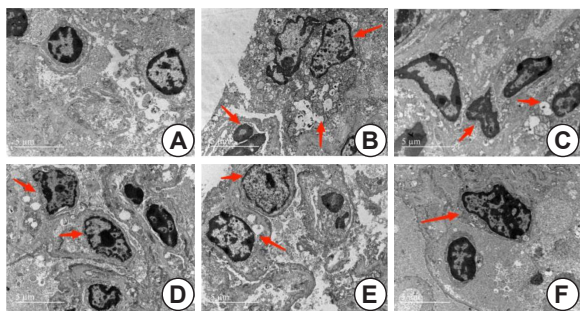
4 各组小鼠肺泡巨噬细胞超微结构比较(图3)模型组的肺泡巨噬细胞形态不规则,游离面微绒毛变短、稀疏、排列不整齐;细胞皱缩、胞质饱满度降低,

表2 各组小鼠肺泡组织中TLR4、NF- κ B、NLRP3、LC3-II、beclin-1蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TLR4	NF- κ B	NLRP3	LC3-II	beclin-1
空白	10	0.574 ± 0.192	0.618 ± 0.214	0.425 ± 0.158	1.163 ± 0.325	1.053 ± 0.287
模型	7	0.843 ± 0.175*	0.989 ± 0.256*	1.562 ± 0.243*	0.654 ± 0.219*	0.503 ± 0.125*
清瘟败毒饮低剂量	9	0.603 ± 0.142 [△]	0.693 ± 0.197 [△]	0.721 ± 0.182 [△]	1.068 ± 0.275 [△]	0.732 ± 0.187 [△]
清瘟败毒饮中剂量	8	0.541 ± 0.153 ^{△△}	0.564 ± 0.165 ^{△△}	0.597 ± 0.145 ^{△△}	1.201 ± 0.264 ^{△△}	0.896 ± 0.184 ^{△△}
清瘟败毒饮高剂量	9	0.538 ± 0.149 ^{△△△}	0.445 ± 0.173 ^{△△△}	0.401 ± 0.152 ^{△△△}	1.173 ± 0.281 ^{△△△}	0.872 ± 0.193 ^{△△△}
地塞米松	9	0.515 ± 0.126 ^{△△△}	0.369 ± 0.162 ^{△△△}	0.298 ± 0.113 ^{△△△}	1.048 ± 0.312 ^{△△△}	0.902 ± 0.165 ^{△△△}

注:与空白组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$;与低剂量组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$

胞质内很少有自噬小体形成；内质网和高尔基体显著扩张；线粒体嵴大部分消失，呈空泡化改变；板层小体破溃、脱颗粒较严重；可见细胞核固缩、核碎裂及核溶解。与模型组比较，清瘟败毒饮各剂量组及地塞米松组的肺泡巨噬细胞形态明显改善，游离面微绒毛排列较为规则，脱落较少，细胞质的饱满度增加，胞质内可见较多自噬小体形成；内质网和高尔基体扩张不明显；线粒体轻微肿胀，线粒体嵴较清晰，空泡化不明显；板层小体边界较为清楚，脱颗粒较少；细胞核固缩的情况显著改善。与低剂量组比，清瘟败毒饮中、高剂量组及地塞米松组的改善情况均优于清瘟败毒饮低剂量组。



注：A 为空白组；B 为模型组；C 为清瘟败毒饮低剂量组；D 为清瘟败毒饮中剂量组；E 为清瘟败毒饮高剂量组；F 为地塞米松组；箭头所示为典型病变处

图 3 各组小鼠肺泡巨噬细胞超微结构的改变 (× 5 000)

讨 论

脓毒症肺损伤是急危重症医学面临的重要临床问题，全球每年脓毒症患者数超 1 900 万，其中有 600 万患者死亡，病死率超过 1/4，存活的患者中约有 300 万人存在认知功能障碍^[13]。肺脏是最常见和最早受损的器官，重症监护室高达 50% 的脓毒症患者会出现急性肺损伤^[14]。脓毒症肺损伤是一种弥漫性的、非均质性的肺部炎症，以肺毛细血管通透性增高和肺泡肺间质水肿为特征性病理改变，临床表现为肺顺应性下降和进行性低氧血症，其发病机制包括细胞内的炎症反应、细胞凋亡、细胞焦亡、氧化应激损伤等^[15-17]。肺泡巨噬细胞是肺组织的免疫细胞，维持巨噬细胞正常自噬，对脓毒症肺损伤具有重要的治疗价值^[18]。脓毒症属中医学的“病毒内陷”“温疫热毒”，治当以清热凉血、解毒化瘀为主。张仲景在《金匮要略·肺痿肺病咳嗽上气病脉证治》中所言“上气”即是指气喘、肩息、不能平卧的证候，可归属于中医学的“喘脱”“暴喘”范畴^[19]。本研究采用的清瘟败毒饮由生石膏、知母、黄连、黄芩、栀子、生地、水牛角、牡丹皮、赤芍、淡竹叶、连翘、玄参、桔梗、白参、

甘草等饮片组成。方中重用生石膏、知母以清气分实热、益胃生津；栀子、黄芩、黄连能清泻上焦和中焦实火；犀角、牡丹皮、生地、赤芍为犀角地黄汤组方，有凉血化瘀解毒之功效；连翘、玄参清散上焦浮游之火；桔梗、竹叶载药上行，竹叶导热下行；白参补气生津，宁神益智。诸药配伍，共奏清热凉血、解毒化瘀之功。近年来较多的研究表明，清瘟败毒饮对于脓毒症合并急性呼吸窘迫综合征、脓毒症肺损伤具有显著疗效，清瘟败毒饮可通过 TLR4 通路调节炎症反应^[20-22]，但清瘟败毒饮可否通过降低 TLR4 表达增加巨噬细胞自噬，从而减轻脓毒症肺损伤，尚缺乏研究，因此本研究具有重要意义。

目前，针对 TLR4/NF- κ B 信号通路与感染相关的研究较多。TLR4 在感染的诱因下，识别脂多糖，启动病原体相关损伤模式，诱导炎症反应。吴华兵^[23]等的研究表明，脓毒症小鼠肺组织 TLR4 和 NF- κ B 的蛋白表达显著上调，抑制 TLR4/NF- κ B 通路的活化，可以改善炎症反应，减轻肺损伤。自噬是依赖溶酶体途径对胞质蛋白和细胞器进行降解的一种过程，治疗性的自噬对细胞具有保护作用^[24]。肺泡巨噬细胞是维持肺泡结构和防御功能的重要细胞，脓毒症肺损伤过程中，肺泡巨噬细胞的结构和功能遭受破坏，均可加重肺损伤程度^[25]。脓毒症诱导的自噬是以病原体相关分子模式与模式识别受体的结合开始启动，TLR4 是细胞自噬最常见的模式识别受体，细菌的脂多糖与 TLR4 结合后通过促进 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinases, p38MAPK) 信号通路的激活自噬^[26]。在实验研究中，自噬的检查方法有直接和间接两种方法，电镜下观察自噬小体的形成是直接观察方式，自噬发生时，细胞内会形成一种吞噬泡的小囊泡结构，首先与需要降解的细胞质成分结合、包裹，形成双层膜结构的“自噬小体”，自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体^[27]。间接法是通过免疫组化、免疫荧光、Western Blot 法对自噬体表面标记蛋白 beclin-1、LC3-II 进行检测。本研究采用电镜下直接观察和 Western Blot 检测自噬体表面蛋白 LC3-II、beclin-1，共同评价肺泡巨噬细胞自噬的情况。聂成的实验研究表明，上调肺泡巨噬细胞自噬可减轻大鼠的脓毒症肺损伤^[28]。可见，TLR4/NF- κ B 和细胞自噬与脓毒症肺损伤密切相关，但是目前对于清瘟败毒饮抑制 TLR4/NF- κ B 通路来上调自噬的研究较少，因此本课题选用 TLR4/NF- κ B 信号通路作为脓毒症肺损伤的治疗靶点，巨噬细胞自噬作为治疗途径，

来进一步探索清瘟败毒饮减轻脓毒症肺损伤的具体机制。

本研究发现,通过 LPS 腹腔注射联合气管内滴入可造成脓毒症肺损伤的动物模型。清瘟败毒饮可以减少肺泡内炎性渗出、肺泡间隔水肿和肺泡腔塌陷,降低小鼠肺泡组织 TLR4、NF- κ B、NLRP3 的蛋白表达,增加自噬蛋白 LC3-II 和 beclin-1 的表达,减轻脓毒症小鼠肺泡组织的炎症反应。清瘟败毒饮治疗后,小鼠肺泡巨噬细胞的结构改善,自噬小体增加。说明清瘟败毒饮可通过下调 TLR4/NF- κ B 信号通路的表达,减轻肺泡组织炎症反应,增加肺泡巨噬细胞自噬,从而减轻脓毒症肺损伤。课题组后续的研究中,将进一步探索清瘟败毒饮对肺泡巨噬细胞生物学特征和分子过程的影响,从体外研究进一步阐释清瘟败毒饮的作用机制,为清瘟败毒饮减轻脓毒症肺损伤提供更多的研究线索。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, et al. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315 (8): 775-787.
- [2] Prescott HC, Angus DC. Post sepsis morbidity[J]. JAMA, 2018, 319 (1): 91.
- [3] 易琼,戴飞跃,郭志华,等.清瘟败毒饮对毒瘀互结型脓毒血症患者炎症反应和脏器功能的影响[J].中国中西医结合杂志,2020,30(7):778-784.
- [4] 易琼,戴飞跃,郭志华,等.清瘟败毒饮对脓毒血症兔不同时相 TLR4/NF- κ B 信号通路及炎症因子的影响[J].中医药导报,2019,25(19):29-32,59.
- [5] 易琼,戴飞跃,郭志华,等.清瘟败毒饮对脓毒血症合并 MODS 兔模型 PCT、HMGB1、sTREM-1、器官功能和凝血功能的影响[J].时珍国医国药,2020,31(12):33-36.
- [6] 薛才华,武强,王梦杰,等.黑枸杞花青素对巨噬细胞 RAW264.7 炎性与自噬交互作用的影响[J].中国畜牧杂志,2021,57(12):244-249.
- [7] 陈利佳,毛楠. SGLT2 抑制剂通过调控 TLR 通路诱导糖尿病肾病大鼠足细胞自噬的机制研究[J].免疫学杂志,2021,37(10):868-874.
- [8] 肖潇,周莉,徐艳,等.脓毒症时巨噬细胞代谢变化与其代谢调节研究进展[J].中华危重病急救医学,2020,32(2):249-252.
- [9] 李涛,王香.虎杖苷通过沉默信息调节因子 2 相关酶 3 上调 PINK1-Parkin 线粒体自噬减轻脓毒症小鼠急性肺损伤机制研究[J].创伤与急危重病医学,2021,9(4):272-276.
- [10] 何荷,梁龙斌,刘杨,等.绿原酸通过 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路介导的细胞焦亡途径减轻脓毒症小鼠急性肺损伤[J].中国病理生理杂志,2021,37(8):1445-1461.
- [11] 魏强,朱美意,张杰,等.红景天苷调节 CLP 诱导的脓毒症小鼠肺纤维化及 JAK2/STAT3 的活化[J].中国免疫学杂志,2022,38(10):1196-1200.
- [12] 徐叔云,卞如濂,陈修主编.药理学实验方法[M].北京:人民卫生出版社,1991:178-179.
- [13] Reinhart K, Daniels R, Kissoon N, et al. Recognizing sepsis as a global health priority- a WHO resolution[J]. N Engl J Med, 2017, 377(5):414-417.
- [14] 中国医师协会急诊医师分会,中国研究型医院学会休克与脓毒症专业委员会.中国脓毒症/脓毒性休克急诊治疗指南(2018)[J].感染·炎症·修复,2019,20(1):3-22.
- [15] 陈祝桂,彭志勇,张智豪,等.不同浓度脂多糖对脓毒症急性肺损伤肺上皮细胞坏死性凋亡和线粒体自噬的影响[J].中华实用诊断与治疗杂志,2020,34(4):330-333.
- [16] 牛毓茜,李桂云,杨丽秋,等.细胞焦亡在急性肺损伤小鼠肺巨噬细胞中的调控机制研究[J].中国免疫学杂志,2021,37(12):1439-1442.
- [17] 任辉邦,张斌,尹启超,等.山姜素通过 PI3K/Nrf2/HO-1 通路减少炎症和氧化应激反应改善盲肠结扎和穿孔诱导的脓毒症大鼠的急性肺损伤[J].免疫学杂志,2021,37(7):575-583.
- [18] 亢胜男. CHR 调控肺泡巨噬细胞自噬对脓毒症急性肺损伤影响及机制研究[D].重庆:重庆医科大学,2021.
- [19] 孙德阳,杨洋,梁群.中医药治疗脓毒症急性肺损伤的研究进展[J].辽宁中医杂志,2019,46(5):1108-1110.
- [20] 张丰荣,祝娜,李志勇,等.基于网络药理学角度探讨清瘟败毒饮对细胞因子风暴的干预机制[J].中国中药杂志,2020,45(7):1499-1508.
- [21] 廖杨,聂莎,肖春燕,等.清瘟败毒饮加减联合血液

- 净化治疗脓毒症合并 ARDS 痰毒蕴肺证临床观察 [J]. 亚太传统医药, 2022, 18 (3): 85-89.
- [22] 阚诗云, 邓兆岩, 邱占军. 中药调节 TLR4 信号通路治疗脓毒症肺损伤的研究进展 [J]. 中国中医急症, 2018, 27 (10): 1866-1869.
- [23] 吴华兵, 肖秀英, 詹玮玮, 等. 基于 MGB1-TLR4-NF- κ B 信号通路分析右美托咪定对脓毒症小鼠急性肺损伤的保护作用 [J]. 疑难病杂志, 2021, 20 (12): 1205-1209.
- [24] 王振霞, 袁聪俐, 李岩. 自噬抑制细胞焦亡对脓毒症肺损伤的保护作用 [J]. 上海交通大学学报 (农业科学版), 2019, 37 (2): 1-5.
- [25] 陈兴, 史明, 李丁. miR-203 对 LPS 诱导的肺泡巨噬细胞释放炎症因子和氧化应激的影响 [J]. 热带医学杂志, 2022, 22 (1): 65-69.
- [26] 张文凯, 吕洁萍, 强准, 等. 肺泡巨噬细胞在脓毒症急性肺损伤中的作用 [J]. 中国药物与临床, 2013, 13 (7): 876-878.
- [27] 王佳, 高恒波, 林雪容, 等. 血必净注射液减轻脓毒症诱导的小鼠急性肺损伤的作用及机制 [J]. 华西医学, 2021, 36 (11): 1533-1538.
- [28] 聂成. miR-155 上调自噬对脓毒症大鼠肺保护作用的实验研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2014.
- (收稿: 2022-05-06 在线: 2022-09-14)
- 责任编辑: 段碧芳
英文责编: 张晶晶

《中国中西医结合杂志》第九届编委会名单

总 编 辑 陈可冀

副总编辑 王文健 史大卓 吕爱平 肖培根 吴伟康 雷 燕

顾 问 王永炎 吴咸中 辛育龄 张伯礼 陈香美 陈凯先 陈维养 唐由之 黄璐琦
曹洪欣 屠呦呦 韩济生

编辑委员

于德泉 王一涛 王卫霞 王 伟 王 阶 王拥军 (上海) 王拥军 (北京) 王 舒 毛 威
卞兆祥 方邦江 方敬爱 邓跃毅 叶文才 田金洲 史载祥 白彦萍 吕志平 朱立国 朱 兵
朱明军 危北海 刘瓦利 刘龙涛 刘 平 刘 良 刘建平 刘建勋 刘保延 刘鲁明 齐清会
安冬青 阮新民 孙汉董 孙 燕 阳 晓 花宝金 苏 励 李大金 李军祥 李国栋 李国勤
李 恩 李焕荣 杨任民 杨宇飞 连 方 吴大嵘 吴万垠 吴正治 吴泰相 吴根诚 吴 烈
张大钊 张卫东 张允岭 张永贤 张永祥 张荣华 张俊华 张亭栋 张敏州 张敏建 陆付耳
陈士林 陈士奎 陈小野 陈立典 林志彬 林 谦 林瑞超 郁仁存 果德安 季 光 郑国庆
赵一鸣 赵伟康 赵芳芳 胡义扬 胡晓梅 胡镜清 段金廛 侯凡凡 饶向荣 洪传岳 夏城东
栗原博 (日本) 徐凤芹 徐 浩 凌昌全 高瑞兰 郭 军 郭 姣 郭 艳 郭赛珊 唐旭东
黄光英 梅之南 崔 红 麻 柔 梁 春 梁挺雄 梁晓春 梁繁荣 董竞成 董福慧 谢竹藩
谢明村 谢 恬 蔡定芳 蔡 晶 裴正学 廖福龙 衡先培 魏 玮 Ye-meng CHEN (意大利)
Yung-chi CHENG (美国) Jia-lang HE (美国) Yong-ming LI (美国) Sheng-xing MA (美国)
Qun-hao ZHANG (美国) Joseph ZHOU (美国) Mian-sheng ZHU (法国)

(以上名单按姓氏笔画为序, 编委工作单位信息在本刊网站首页“下载专区”公布, 网址: <http://www.cjim.cn/zxyjhcn/zxyjhcn/ch/index.aspx>)