

## 基于 AMPK/NLRP3 通路介导的细胞焦亡探究牡荆素对大鼠分泌性中耳炎的抑制作用

李艳峰, 卢振民\*

新乡医学院第一附属医院 耳鼻咽喉科, 河南 新乡 453100

**摘要:** **目的** 探究牡荆素对分泌性中耳炎大鼠的影响及调控机制。**方法** 将 50 只雄性 SD 大鼠, 随机分为对照组、模型组、牡荆素 (3、12 mg/kg) 组、牡荆素高剂量 + AMPK 抑制剂 (Compound C) 组, 每组各 10 只。除对照组外, 其余各组大鼠均采取内毒素法复制分泌性中耳炎大鼠模型。造模成功后, 牡荆素 3、12 mg/kg 组分别 ip 相应剂量的牡荆素; 牡荆素 + Compound C 组 ip 12 mg/kg 的牡荆素后, 立即 ip 20 mg/kg Compound C; 对照组和模型组分别 ip 等量生理盐水。连续给药 21 d 后, 苏木素 - 伊红 (HE) 染色观察中耳黏膜组织病理学改变; 酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定血清肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-18 (IL-18) 水平; 听觉脑干诱发电位仪测定大鼠听力功能; Western blotting 检测中耳黏膜组织腺苷酸活化蛋白激酶/NOD 样受体蛋白 3 (AMPK/NLRP3) 通路及细胞焦亡相关蛋白表达。**结果** 与模型组相比, 牡荆素 3、12 mg/kg 组大鼠中耳黏膜组织病理损伤减轻, 中耳黏膜厚度、听力反应阈值、血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平均降低 ( $P < 0.05$ ), 细胞焦亡相关蛋白 [Caspase-1 p20、焦亡执行蛋白消皮素 D-N (GSDMD-N)、IL-1 $\beta$ 、IL-18] 及 NLRP3 蛋白表达下调, p-AMPK 蛋白表达上调 ( $P < 0.05$ ), 且呈剂量相关性。与牡荆素 12 mg/kg 组相比, Compound C 能够逆转牡荆素对上述指标的改变。**结论** 牡荆素能够抑制分泌性中耳炎大鼠炎症反应, 减轻中耳黏膜病理性损伤, 其机制与抑制 AMPK/NLRP3 通路介导的细胞焦亡相关。

**关键词:** 牡荆素; 分泌性中耳炎; 腺苷酸活化蛋白激酶/NOD 样受体蛋白 3 通路; 细胞焦亡; 炎症反应

**中图分类号:** R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2023)10 - 2397 - 08

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.10.003

## Exploring the inhibitory effect of vitexin on otitis media with effusion in rats based on AMPK/NLRP3 pathway mediated pyroptosis

LI Yan-feng, LU Zhen-min

Department of Otolaryngology, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453100, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect and regulatory mechanism of vitexin on otitis media with effusion rats. **Methods** Fifty male SD rats were randomly divided into control group, model group, vitexin (3 and 12 mg/kg) groups, and vitexin + AMPK inhibitor group (Compound C), with 10 rats in each group. Except for the control group, all other groups of rats were used to replicate a rat model of otitis media with effusion using the endotoxin method. After successful modeling, vitexin (3 and 12 mg/kg) groups of vitexin were injected intraperitoneally with different doses of 3 and 12 mg/kg of vitexin. After intraperitoneal injection 12 mg/kg of vitexin, immediately injection 20 mg/kg of Compound C into the vitexin + Compound C group. The control group and model group were injected with equal amounts of physiological saline intraperitoneally. After continuous administration for 21 days, hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in the middle ear mucosa tissue, Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of serum TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , and IL-18 levels. The auditory brainstem response instrument was used to measure the hearing function of rats, Western blotting was used to detect the expression of AMPK/NLRP3 pathway and pyroptosis related proteins in the middle ear mucosa tissue. **Results** Compared with the model group, the pathological damage of the middle ear mucosa tissue was reduced in the vitexin (3 and 12 mg/kg) groups, and the thickness of the middle ear mucosa, hearing response threshold, and serum TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-6, IL-18 levels were decreased ( $P < 0.05$ ), and pyroptosis related proteins (caspase-1 p20, GSDMD-N,

收稿日期: 2023-09-08

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目 (20B320117)

作者简介: 李艳峰, 男, 主治医师, 硕士, 研究方向为耳鼻咽喉科中医药治疗。E-mail: liyangfeng198201@163.com

\*通信作者: 卢振民, 男, 主任医师, 研究方向为耳鼻咽喉科中医药治疗。E-mail: lzhmin@126.com

IL-1 $\beta$ , IL-18) and NLRP3 protein expression were downregulated, while p-AMPK protein expression was upregulated ( $P < 0.05$ ), and there was a dose-dependent relationship. Compared with the vitexin 12 mg/kg group, Compound C can reverse the changes in the above indicators caused by vitexin. **Conclusion** Vitexin can inhibit the inflammatory response and alleviate pathological damage to the middle ear mucosa in rats with otitis media with effusion, and its mechanism is related to the inhibition of AMPK/NLRP3 pathway mediated pyroptosis.

**Key words:** vitexin; otitis media with effusion; AMPK/NLRP3 pathway; pyroptosis; inflammatory reaction

分泌性中耳炎为耳鼻喉科常见的疾病之一,是一种中耳非化脓性疾病,以中耳积液、听力损伤及鼓膜浑浊内陷为特征,常发病于儿童,且其发病率呈逐年增高态势,已经成为危害人类身体健康的突出问题<sup>[1]</sup>。目前,有关于分泌性中耳炎的发病机制尚未完全阐明,其病因机制仍然存在一定的争议。多项研究证实,炎症效应被认为是导致中耳黏膜损伤及听力受损的主要病因,通过改善机体免疫功能并予以抗炎处理是缓解分泌性中耳炎症状的重要方式<sup>[2-3]</sup>。细胞焦亡作为一种新型促炎性细胞死亡方式,能够通过诱发慢性炎症反应,加速疾病进展。研究证实,细胞焦亡是一种依赖于 Caspase-1 介导的细胞死亡形式,主要是以 pro-Caspase-1 活化形成 Caspase-1 p20,诱导焦亡执行蛋白消皮素 D (GSDMD) 发生剪切形成具有细胞毒性的 GSDMD-N,并募集至细胞膜上形成焦亡小孔,促进白细胞介素 (IL) -1 $\beta$ 、IL-18 释放,进而诱发炎症级联反应<sup>[4]</sup>。多项研究均已证实,在多种炎症相关性疾病中均存在细胞焦亡的发生,而通过药物/基因干预细胞焦亡能够抑制机体过度炎症反应,进而改善疾病症状<sup>[5-6]</sup>。结合分泌性中耳炎以炎症反应为核心的疾病主要病理机制,提示细胞焦亡很有可能是分泌性中耳炎中耳黏膜损伤的新机制。腺苷酸活化蛋白激酶/NOD 样受体蛋白 3 (AMPK/NLRP3) 是细胞焦亡发生的重要调控通路,抑制或降低 AMPK 活性能够明显激活 NLRP3 炎症小体,从而启动细胞焦亡<sup>[7]</sup>。此外,AMPK 和 NLRP3 炎症小体已被证实分泌性中耳炎体外和体内实验中发挥关键性调控作用<sup>[8-9]</sup>。以上研究共同提示,以 AMPK/NLRP3 通路介导的细胞焦亡为研究切入点可能是揭示分泌性中耳炎新的病理机制及以此探寻新型治疗药物的关键。

牡荆素是一种天然的生物活性黄酮类化合物,多存在山楂叶及其果实、山里红叶、金莲花等中药材中。研究证实,牡荆素具有抗氧化<sup>[10]</sup>、抗炎<sup>[11]</sup>、抗肿瘤<sup>[12]</sup>等多种生物学功能,且对疾病的防治效果显著,相比于临床药物具有不良反应小、安全性高

等优势,是一种极具开发潜力的天然活性物质。研究表明,牡荆素能够通过抑制炎症反应,改善关节炎大鼠症状<sup>[11]</sup>。此外,牡荆素亦能够通过抑制炎症反应,改善哮喘幼鼠肺部损伤<sup>[13]</sup>。但是,关于牡荆素对分泌性中耳炎炎症反应的影响及作用机制尚不清楚。为此,本研究拟通过内毒素法构建分泌性中耳炎大鼠模型,从 AMPK/NLRP3 通路介导的细胞焦亡途径,阐明牡荆素对分泌性中耳炎大鼠的保护作用,旨在为分泌性中耳炎临床候选治疗药物提供新的选择。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 动物** 雄性,SPF 级,周龄 6~8 周,SD 大鼠 50 只,体质量为 (200 $\pm$ 10) g,购买于上海斯莱克实验动物有限责任公司[生产许可证号 SCXK (沪) 2021-0026],动物适应性饲养 1 周,期间正常饮食、饮水。饲养条件: (25 $\pm$ 2)  $^{\circ}$ C,环境相对湿度 55%~65%,昼夜各 12 h 交替光照。本实验中涉及的动物研究经过新乡医学院第一附属医院医学伦理委员会审批 (批准号 LLSC2021-06-010)。

**1.1.2 主要试剂** 牡荆素 (质量分数 > 98%,批号 20220312,成都植标化纯生物技术有限公司);内毒素 (美国 Sigma-Aldrich 公司,批号 L6529); AMPK 抑制剂 6-[4-(2-哌啶-1-基乙氧基)苯基]-3-吡啶-4-基吡唑并[1,5-A]嘧啶 (Compound C) (美国 Selleck 公司,批号 S7306);免疫组化检测试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 SP-9001);肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-18 酶联免疫吸附检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司,批号 SEKR-0009、SEKR-0005、SEKR-0002、SEKR-0019);苏木素-伊红 (HE) 检测试剂盒、BCA 蛋白质浓度测定试剂盒、ECL 发光液、 $\beta$ -actin 一抗、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG、山羊抗兔 IgG (碧云天生物技术公司,批号 C0105S、P0009、P0018FS、AF0003、A0412、A0408); p-AMPK 一抗、AMPK 一抗、Caspase-1p20 一抗、GSDMD-N 一抗、IL-1 $\beta$  一抗、IL-18 一抗 (美国 Cell Signaling Technology,

批号 2537、2532、89332、37349、63124、57058)。

**1.1.3 主要仪器** LD-96A 型酶标仪 (山东莱恩德智能科技有限公司); BX53 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司); BX43 型荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); 580-NAVPR2 型 ABR 电位仪 (上海沐锦医疗器械有限公司); Gel dox XR<sup>+</sup>型凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 分泌性中耳炎大鼠模型的构建以及分组给药** 将 50 只 SD 大鼠随机性分为对照组、模型组、牡荆素 (3、12 mg/kg) 组、牡荆素高剂量 + Compound C 组, 每组各 10 只。显微镜下观察大鼠外耳道及中耳感染情况排除中耳感染性大鼠。除对照组外, 其余各组大鼠均采取内毒素法复制分泌性中耳炎大鼠模型<sup>[14]</sup>: 0.4% 的戊巴比妥钠麻醉大鼠, 大鼠仰卧位固定, 在手术显微镜下经鼓膜穿刺, 采用微量注射器注射内毒素 (200 ng/mL)。造模后光学显微镜下观察大鼠鼓膜浑浊、内陷以及分泌液等状况, 若大鼠鼓膜出现明显浑浊, 内陷且伴有气泡形成, 鼓室积液, 视为模型构建成功。建模后鼓膜充血, 光锥消失, 无穿孔。本实验中分泌性中耳炎大鼠造模成功率为 100%。造模成功后 1 d, 牡荆素 3、12 mg/kg 组分别 ip 相应剂量的牡荆素<sup>[15]</sup>; 牡荆素 + Compound C 组 ip 12 mg/kg 的牡荆素后, 立即 ip 20 mg/kg Compound C<sup>[16]</sup>; 对照组和模型组大鼠分别 ip 等量的生理盐水。以上各组均为 1 次/d, 连续给药 21 d。

**1.2.2 中耳黏膜组织病理学观察** 给药结束后各组大鼠均颈椎脱臼处死, 解剖内耳, 4% 多聚甲醛固定, 脱钙, 脱水, 石蜡包埋切片, 行 HE 染色, 显微镜下观察中耳黏膜组织病理形态变化。

**1.2.3 中耳黏膜厚度测定** 将大鼠颈椎脱臼处死后, 解剖头部并分离听泡, 滤纸吸除听泡水分, 于显微镜下剥离中耳黏膜组织, 最后利用测微计测定各组大鼠黏膜组织厚度, 每组测量 5 个不同位置, 取其平均值为最终黏膜厚度。

**1.2.4 大鼠听力功能检测** 各组大鼠给药结束后 24 h, 采取听觉脑干诱发电位 (ABR) 仪检测 ABR 反应阈值, 以此反映听力功能变化。各组大鼠麻醉后, 置于隔声屏蔽室内, 依据文献报道<sup>[3]</sup>严格按照 ABR 仪器操作方法进行 ABR 反应阈值测定。

**1.2.5 ELISA 检测 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平** 给药结束后, 大鼠腹主动脉取血, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 3 000

r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 按照 ELISA 检测说明书测定各组大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平。

**1.2.6 免疫组化检测中耳黏膜组织 p-AMK、NLRP3 蛋白阳性表达** 将脱蜡、透明、脱水后的黏膜组织切片抗原修复, 经 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  阻断内源性过氧化物酶, 山羊血清封闭非特异性位点后, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 p-AMPK 一抗 (1:200)、NLRP3 一抗 (1:500) 过夜, 室温条件下孵育对应二抗 30 min, 最后滴加 DAB 显色液, 经苏木精复染、脱水、封片处理, 显微镜下观察黏膜组织 p-AMPK、NLRP3 蛋白表达, 并经 Image J 软件对染色结果进行半定量分析。

**1.2.7 Western blotting 检测 AMPK/NLRP3 通路及焦亡相关蛋白表达** 收集各组大鼠中耳黏膜组织, 剪碎后混合加入蛋白酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下, 裂解 30 min。将离心管放置于离心机内并设置: 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液。BCA 法测定蛋白质浓度, 蛋白质变性, 蛋白上样, 电泳、转膜。室温条件下 PVDF 采用 6% BSA 封闭 1 h, TBST 洗膜后, 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下, 分别孵育 p-AMPK 一抗 (1:500)、AMPK 一抗 (1:1 000)、NLRP3 一抗 (1:1 000)、Caspase-1 p20 一抗 (1:500)、GSDMD-N 一抗 (1:500)、IL-1 $\beta$  一抗 (1:1 000)、IL-18 一抗 (1:1 000)、 $\beta$ -actin 一抗 (1:5 000) 16 h。次日取出 PVDF 膜, TBST 洗涤后加入相应 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG、山羊抗兔 IgG 孵育 2 h。TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。最后于 PVDF 膜上滴加显影液显影、拍照, 实验结果采用 Image J 软件进行 p-AMPK、AMPK、NLRP3、Caspase-1 p20、GSDMD-N、IL-1 $\beta$ 、IL-18 蛋白表达定量分析。

## 1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 牡荆素对大鼠中耳黏膜病理形态改变和黏膜厚度的影响

对照组大鼠中耳内黏膜上皮细胞排列整齐, 血管及纤维细胞含量丰富, 未有明显的炎性细胞浸润等现象。模型组大鼠中耳黏膜细胞肿胀, 黏膜组织明显增厚 ( $P < 0.05$ ), 有多处黏膜细胞脱落, 坏死, 可见大量炎性细胞浸润。与模型组相比, 牡荆素 3、12 mg/kg 组大鼠, 黏膜上皮细胞排列较为规整, 肿

胀程度减轻, 仅有少量的黏膜细胞脱落, 炎性细胞浸润程度减轻, 中耳黏膜厚度降低 ( $P<0.05$ ), 且伴随牡荆素剂量的增加, 中耳黏膜病理损伤及黏膜

厚度均减轻。与牡荆素 12 mg/kg 组相比, 牡荆素+Compound C 组大鼠中耳黏膜组织病理损伤程度加重, 且黏膜厚度增加 ( $P<0.05$ ), 见图 1、表 1。

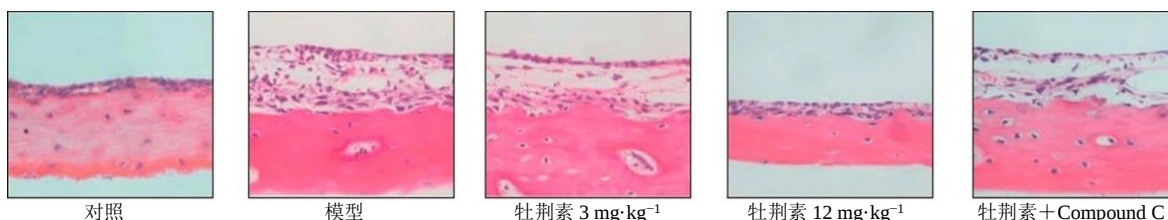


图 1 各组大鼠中耳病理学变化 (HE,  $\times 200$ )

Fig. 1 Pathological changes in the middle ear of rats in each group (HE,  $\times 200$ )

表 1 各组大鼠中耳黏膜厚度比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Table 1 Comparison of thickness of middle ear mucosa in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 组别             | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 中耳黏膜厚度/ $\mu$ m                    |
|----------------|---------------------------|------------------------------------|
| 对照             | —                         | 40.12 $\pm$ 6.33                   |
| 模型             | —                         | 159.66 $\pm$ 9.21*                 |
| 牡荆素            | 3                         | 118.99 $\pm$ 8.56 <sup>#</sup>     |
|                | 12                        | 52.22 $\pm$ 6.08 <sup>#&amp;</sup> |
| 牡荆素+Compound C | 12+20                     | 143.11 $\pm$ 8.77 <sup>@</sup>     |

与对照组比较: \* $P<0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P<0.05$ ; 与牡荆素 3 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较: <sup>&</sup> $P<0.05$ ; 与牡荆素 12 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较: <sup>@</sup> $P<0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>&</sup> $P < 0.05$  vs vitexin 3 mg·kg<sup>-1</sup> group; <sup>@</sup> $P < 0.05$  vs vitexin 12 mg·kg<sup>-1</sup> group

## 2.2 牡荆素对大鼠听觉功能的影响

与对照组相比, 模型组大鼠 ABR 反应阈值明显增加 ( $P<0.05$ )。与模型组相比, 牡荆素 3、12 mg/kg 组大鼠 ABR 反应阈值明显降低 ( $P<0.05$ ), 且呈剂量相关性。与牡荆素 12 mg/kg 组相比, AMPK 抑制剂 Compound C 能够增加大鼠 ABR 反应阈值 ( $P<0.05$ ), 见表 2。

表 2 各组大鼠 ABR 反应阈值比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Table 2 Comparison of ABR response thresholds in each group of rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 组别             | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | ABR 反应阈值/dB                        |
|----------------|---------------------------|------------------------------------|
| 对照             | —                         | 25.77 $\pm$ 3.89                   |
| 模型             | —                         | 69.87 $\pm$ 9.76*                  |
| 牡荆素            | 3                         | 46.62 $\pm$ 6.18 <sup>#</sup>      |
|                | 12                        | 31.20 $\pm$ 5.54 <sup>#&amp;</sup> |
| 牡荆素+Compound C | 12+20                     | 64.16 $\pm$ 9.27 <sup>@</sup>      |

与对照组比较: \* $P<0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P<0.05$ ; 与牡荆素 3 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较: <sup>&</sup> $P<0.05$ ; 与牡荆素 12 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较: <sup>@</sup> $P<0.05$   
\* $P < 0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>&</sup> $P < 0.05$  vs vitexin 3 mg·kg<sup>-1</sup> group; <sup>@</sup> $P < 0.05$  vs vitexin 12 mg·kg<sup>-1</sup> group

## 2.3 牡荆素对大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 水平影响

与对照组相比, 模型组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平明显增加 ( $P<0.05$ )。与模型组相比, 牡荆素 3、12 mg/kg 组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平均明显降低 ( $P<0.05$ ), 且呈剂量相关性。与牡荆素 12 mg/kg 组相比, 牡荆素+Compound C 组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平明显增加 ( $P<0.05$ ), 见表 3。

表 3 各组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Table 3 Comparison of serum TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-18 levels in each group of rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 组别             | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | TNF- $\alpha$ /(pg·mL <sup>-1</sup> ) | IL-6/(pg·mL <sup>-1</sup> )        | IL-1 $\beta$ /(pg·mL <sup>-1</sup> ) | IL-18/(pg·mL <sup>-1</sup> )       |
|----------------|---------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| 对照             | —                         | 12.88 $\pm$ 3.02                      | 35.01 $\pm$ 5.11                   | 17.00 $\pm$ 4.06                     | 23.62 $\pm$ 4.88                   |
| 模型             | —                         | 45.88 $\pm$ 6.31*                     | 132.88 $\pm$ 10.30*                | 62.33 $\pm$ 7.69*                    | 73.69 $\pm$ 7.46*                  |
| 牡荆素            | 3                         | 38.50 $\pm$ 4.30 <sup>#</sup>         | 110.20 $\pm$ 9.26 <sup>#</sup>     | 48.11 $\pm$ 6.66 <sup>#</sup>        | 58.33 $\pm$ 6.11 <sup>#</sup>      |
|                | 12                        | 28.01 $\pm$ 5.33 <sup>#&amp;</sup>    | 90.20 $\pm$ 8.88 <sup>#&amp;</sup> | 40.76 $\pm$ 6.08 <sup>#&amp;</sup>   | 36.87 $\pm$ 5.44 <sup>#&amp;</sup> |
| 牡荆素+Compound C | 12+20                     | 43.26 $\pm$ 7.02 <sup>@</sup>         | 125.48 $\pm$ 9.97 <sup>@</sup>     | 56.77 $\pm$ 8.29 <sup>@</sup>        | 69.22 $\pm$ 8.16 <sup>@</sup>      |

与对照组比较: \* $P<0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P<0.05$ ; 与牡荆素 3 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较: <sup>&</sup> $P<0.05$ ; 与牡荆素 12 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较: <sup>@</sup> $P<0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>&</sup> $P < 0.05$  vs vitexin 3 mg·kg<sup>-1</sup> group; <sup>@</sup> $P < 0.05$  vs vitexin 12 mg·kg<sup>-1</sup> group

## 2.4 牡荆素对大鼠中耳黏膜细胞焦亡相关蛋白表达的影响

与对照组相比, 模型组大鼠中耳黏膜组织

Caspase-1p20、GSDMD-N、IL-1 $\beta$ 、IL-18 蛋白相对表达量明显升高 ( $P<0.05$ )。与模型组相比, 牡荆素 3、12 mg/kg 组大鼠中耳黏膜组织 Caspase-1p20、

GSDMD-N、IL-1 $\beta$ 、IL-18 蛋白相对表达量均明显降低 ( $P<0.05$ ), 且呈剂量相关性。与牡荆素 12 mg/kg 组相比, AMPK 抑制剂 Compound C 能够明显逆转上述蛋白表达 ( $P<0.05$ ), 见图 2、表 4。

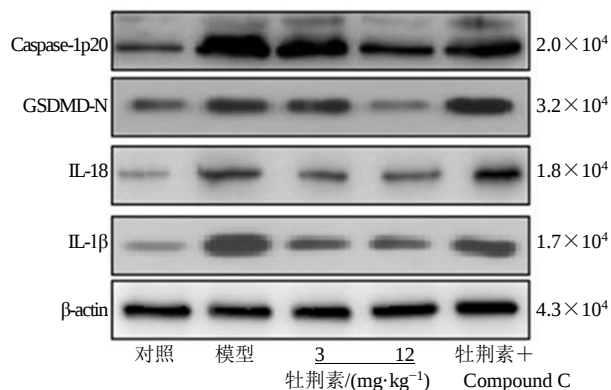


图 2 各组大鼠中耳黏膜组织 Caspase-1p20、GSDMD-N、IL-1 $\beta$ 、IL-18 蛋白凝胶电泳图  
Fig. 2 Gel electrophoresis of caspase-1p20, GSDMD-N, IL-1 $\beta$  and IL-18 proteins in middle ear mucosa of rats in each group

表 4 各组大鼠中耳黏膜组织 Caspase-1p20、GSDMD-N、IL-1 $\beta$ 、IL-18 蛋白相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Table 4 Relative expression of caspase-1p20, GSDMD-N, IL-1 $\beta$ , and IL-18 proteins in the middle ear mucosa of rats in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

| 组别               | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 蛋白相对表达量                       |                               |                               |                               |
|------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                  |                           | Caspase-1p20                  | GSDMD-N                       | IL-1 $\beta$                  | IL-18                         |
| 对照               | —                         | 1.03 ± 0.19                   | 1.01 ± 0.22                   | 1.00 ± 0.18                   | 1.05 ± 0.10                   |
| 模型               | —                         | 2.56 ± 0.42*                  | 1.96 ± 0.31*                  | 1.89 ± 0.20*                  | 2.63 ± 0.39*                  |
| 牡荆素              | 3                         | 1.81 ± 0.30 <sup>#</sup>      | 1.63 ± 0.20 <sup>#</sup>      | 1.31 ± 0.21 <sup>#</sup>      | 1.68 ± 0.18 <sup>#</sup>      |
|                  | 12                        | 1.42 ± 0.26 <sup>#&amp;</sup> | 0.96 ± 0.23 <sup>#&amp;</sup> | 1.02 ± 0.17 <sup>#&amp;</sup> | 1.36 ± 0.20 <sup>#&amp;</sup> |
| 牡荆素 + Compound C | 12 + 20                   | 2.15 ± 0.37 <sup>@</sup>      | 2.45 ± 0.33 <sup>@</sup>      | 1.89 ± 0.26 <sup>@</sup>      | 2.01 ± 0.31 <sup>@</sup>      |

与对照组比较: \* $P<0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P<0.05$ ; 与牡荆素 3 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较: <sup>&</sup> $P<0.05$ ; 与牡荆素 12 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较: <sup>@</sup> $P<0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>&</sup> $P < 0.05$  vs vitexin 3 mg·kg<sup>-1</sup> group; <sup>@</sup> $P < 0.05$  vs vitexin 12 mg·kg<sup>-1</sup> group

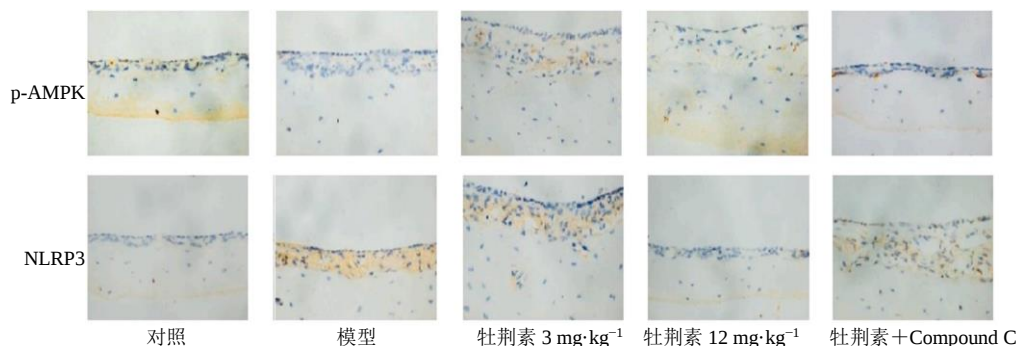


图 3 免疫组化检测 p-AMPK、NLRP3 阳性表达 (IHC, ×200)

Fig. 3 Immunohistochemical detection of positive expression of p-AMPK and NLRP3 (IHC, ×200)

## 2.5 牡荆素对大鼠黏膜组织中 AMPK/NLRP3 通路相关蛋白表达的影响

免疫组化染色结果显示, 与对照组相比, 模型组大鼠中耳黏膜组织 p-AMPK 阳性表达明显减少, NLRP3 阳性表达明显增加 ( $P<0.05$ )。与模型组相比, 牡荆素 3、12 mg/kg 组大鼠中耳黏膜组织 p-AMPK 阳性表达显著增加, NLRP3 阳性表达明显减少, 且呈剂量相关 ( $P<0.05$ )。与牡荆素 12 mg/kg 组相比, AMPK 抑制剂 Compound C 能够明显逆转 p-AMPK、NLRP3 阳性表达 ( $P<0.05$ ), 见图 3、表 5。Western blotting 检测显示, 模型组大鼠中耳黏膜组织 p-AMPK 蛋白表达降低, NLRP3 蛋白表达增加 ( $P<0.05$ )。与模型组相比, 牡荆素 3、12 mg/kg 组大鼠中耳黏膜组织 p-AMPK 蛋白表达升高, NLRP3 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ ), 且呈剂量相关性。与牡荆素 12 mg/kg 组相比, AMPK 抑制剂 Compound C 能够明显逆转 p-AMPK、NLRP3 蛋白表达 ( $P<0.05$ ), 见图 4、表 6。

表 5 各组大鼠中耳黏膜组织 p-AMPK、NLRP3 蛋白阳性表达比较结果 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Table 5 Comparison of p-AMPK and NLRP3 protein positive expression in middle ear mucosa tissues of rats in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

| 组别               | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 相对表达量                         |                               |
|------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                  |                           | p-AMPK                        | NLRP3                         |
| 对照               | —                         | 1.00 ± 0.17                   | 1.00 ± 0.20                   |
| 模型               | —                         | 0.23 ± 0.06*                  | 2.61 ± 0.41*                  |
| 牡荆素              | 3                         | 0.58 ± 0.10 <sup>#</sup>      | 1.89 ± 0.25 <sup>#</sup>      |
|                  | 12                        | 0.89 ± 0.21 <sup>#&amp;</sup> | 1.46 ± 0.23 <sup>#&amp;</sup> |
| 牡荆素 + Compound C | 12 + 20                   | 0.43 ± 0.08 <sup>@</sup>      | 2.10 ± 0.32 <sup>@</sup>      |

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与牡荆素 3 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较: <sup>&</sup> $P < 0.05$ ; 与牡荆素 12 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较: <sup>@</sup> $P < 0.05$   
\* $P < 0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>&</sup> $P < 0.05$  vs vitexin 3 mg·kg<sup>-1</sup> group; <sup>@</sup> $P < 0.05$  vs vitexin 12 mg·kg<sup>-1</sup> group

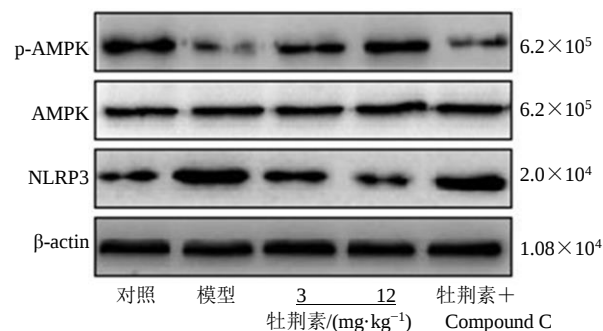


图 4 各组大鼠中耳黏膜组织 p-AMPK、AMPK、NLRP3 蛋白凝胶电泳图

Fig. 4 Gel electrophoresis of p-AMPK, AMPK and NLRP3 protein in middle ear mucosa of rats in each group

表 6 各组大鼠中耳黏膜组织 p-AMPK/AMPK、NLRP3 蛋白相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Table 6 Relative expression of p-AMPK/AMPK and NLRP3 proteins in the middle ear mucosa of rats in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

| 组别               | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | p-AMPK/AMPK                   | NLRP3 蛋白相对表达量                 |
|------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 对照               | —                         | 1.18 ± 0.20                   | 1.03 ± 0.20                   |
| 模型               | —                         | 0.41 ± 0.07*                  | 2.31 ± 0.32*                  |
| 牡荆素              | 3                         | 0.72 ± 0.14 <sup>#</sup>      | 1.68 ± 0.28 <sup>#</sup>      |
|                  | 12                        | 1.16 ± 0.21 <sup>#&amp;</sup> | 1.07 ± 0.21 <sup>#&amp;</sup> |
| 牡荆素 + Compound C | 12 + 20                   | 0.39 ± 0.05 <sup>@</sup>      | 2.19 ± 0.29 <sup>@</sup>      |

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与牡荆素 3 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较: <sup>&</sup> $P < 0.05$ ; 与牡荆素 12 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较: <sup>@</sup> $P < 0.05$   
\* $P < 0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>&</sup> $P < 0.05$  vs vitexin 3 mg·kg<sup>-1</sup> group; <sup>@</sup> $P < 0.05$  vs vitexin 12 mg·kg<sup>-1</sup> group

### 3 讨论

中耳炎可分为化脓性和非化脓性中耳炎,是由多种原因诱发的中耳全部或部分中耳炎性病变。非化脓性中耳炎是导致儿童听力损伤以及言语功能障碍的临床常见疾病,具有一定的自限性,但是仍有 20%~40%患者会出现反复发作,严重的影响了患者的生活质量<sup>[17]</sup>。因此,积极探寻分泌性中耳炎的病因及机制并予以药物干预治疗是临床治疗规范方案治疗的前提。

炎症基因和细胞因子诱发的免疫炎症是分泌性中耳炎的主要致病因素,抑制炎症细胞因子释放,可显著恢复中耳通气,改善分泌性中耳炎<sup>[18-19]</sup>。牡荆素主要是从山楂叶总黄酮分离、纯化而得到的活性单体化合物,具有显著的抗炎作用,能够明显减轻关节炎症,并通过抑制炎症因子表达改善葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠溃疡性结肠炎<sup>[20]</sup>。基于以上研究,推测牡荆素可能通过抑制炎症反应发挥分泌性中耳炎治疗作用。

本研究通过构建分泌性中耳炎大鼠模型,观察牡荆素对其治疗作用。研究发现,牡荆素能够通过抑制炎症因子释放,改善分泌性中耳炎大鼠中耳黏膜病理性损伤。但是,有关牡荆素是通过何种机制抑制炎症反应发挥抗分泌性中耳炎作用尚未完全阐明。细胞焦亡为炎症性细胞死亡方式,广泛参与多种疾病的发生发展。多项研究已证实,抑制 Caspase-1 介导的细胞焦亡能够明显降低炎症因子释放,进而改善疾病症状<sup>[21-22]</sup>。袁玥等<sup>[23]</sup>研究证实,细胞焦亡的发生及其过程中的相关促炎症细胞因子的释放,会导致炎症反应进一步扩大,加重气道炎症性疾病的进展,提示细胞焦亡可能参与分泌性中耳炎炎症反应过程。Ding 等<sup>[24]</sup>研究证实,牡荆素能够通过抑制 GSDMD 介导的细胞焦亡,降低炎症因子水平,进而缓解草酸钙晶体诱导的肾结石小鼠症状。既往研究共同提示,牡荆素可能通过调控细胞焦亡通路发挥抗分泌性中耳炎作用。基于此,本研究检测了焦亡相关蛋白表达,结果发现牡荆素能够明显抑制焦亡相关蛋白表达,降低炎症反应,进而改善分泌性中耳炎大鼠中耳黏膜损伤。AMPK/NLRP3 信号通路是与细胞焦亡发生密切相关。研究证实,NLRP3 炎症小体的组装是激活细胞焦亡过程中关键基因 Caspase-1 的前体,当细胞受到外界危险信号刺激后,NLRP3、ASC 及 pro-Caspase-1 三者会组装为 NLRP3 炎症小体蛋白复合

物,导致 pro-Caspase-1 裂解形成具有活性的 cleaved-Caspase-1 (Caspase-1p20) 诱导细胞焦亡发生<sup>[25]</sup>,此过程可由 AMPK 通路调控<sup>[26]</sup>。此外,抑制 AMPK 信号通路可显著促进 NLRP3 炎症小体活化,从而启动细胞焦亡<sup>[27]</sup>。以往研究也证实,AMPK 和 NLRP3 炎症小体参与中耳炎疾病的发生发展,激活 AMPK 通路或是抑制 NLRP3 炎症小体活化介导的炎症反应能够明显改善内皮细胞及中耳黏膜的损伤<sup>[28-29]</sup>,提示 AMPK、NLRP3 基因可能是分泌性中耳炎疾病发生的重要调控因子。此外,Zhang 等<sup>[30]</sup>研究证实,牡荆素能够通过抑制 NLRP3 炎症小体介导的炎症反应改善慢性脑缺血性神经损伤。Inamdar 等<sup>[31]</sup>研究发现,牡荆素能够通过激活 AMPK 信号通路,改善高脂饮食喂养诱导的小鼠非酒精性脂肪肝病病变。以上研究共同表明,牡荆素很有可能通过调控 AMPK、NLRP3 蛋白表达,发挥抗分泌性中耳炎作用。本研究结果显示,与模型组相比,牡荆素能够激活 AMPK 通路,抑制 NLRP3 蛋白表达,从而改善分泌性中耳炎大鼠中耳黏膜损伤,表明牡荆素可能通过调控 AMPK/NLRP3 通路,抑制分泌性中耳炎大鼠细胞焦亡。邓宏哲等<sup>[32]</sup>研究证实,人参皂苷 Rg1 能够通过激活 AMPK 途径抑制 NLRP3 炎症小体活化介导的细胞焦亡,发挥抗博来霉素诱导的大鼠肺纤维化保护作用,且此保护作用可被 AMPK 抑制剂 Compound C 逆转。为进一步明确 AMPK/NLRP3 通路在牡荆素抑制分泌性中耳炎中的作用,本研究通过对牡荆素高剂量大鼠 ip AMPK 抑制剂,观察牡荆素对大鼠分泌性中耳炎的作用能否被逆转。结果显示,与牡荆素组相比,AMPK 抑制剂 Compound C 能够抑制 AMPK 通路,促进 NLRP3 炎症小体活化介导的细胞焦亡,诱发炎症反应,损害分泌性中耳炎大鼠中耳黏膜组织,从而逆转牡荆素对分泌性中耳炎的保护作用。以上研究结果进一步证实了牡荆素改善大鼠分泌性中耳炎与调控 AMPK/NLRP3 介导的细胞焦亡相关。

综上所述,本研究通过探讨牡荆素对分泌性中耳炎大鼠炎症的影响及机制。结果发现,牡荆素能够通过活化 AMPK,抑制 NLRP3 炎症小体活化介导的细胞焦亡,减轻炎症反应,从而改善分泌性中耳炎大鼠中耳黏膜损伤。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

[1] 钟伦坤,胡文健,周兴玮,等.清窍胶囊对分泌性中耳

炎大鼠 Th17、Treg 细胞及炎症因子的影响 [J]. 医学信息, 2021, 34(17): 75-78.

[2] Zhang J, He J, Luo Y, et al. miR-210 regulates the inflammation of otitis media with effusion by inhibiting the expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1a [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 534: 401-407.

[3] 夏非,杨武,金鹏,等.白术内酯 I 调控 Janus 激酶 2/信号转导和转录激活因子 3 通路对分泌性中耳炎大鼠听功能及炎症反应的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(8): 1127-1131.

[4] 赵为陈,何春远,王法财.以 caspase-1 介导细胞焦亡筛选治疗糖尿病肾病潜在的中药及单体成分 [J]. 南方医科大学学报, 2020, 40(9): 1280-1287.

[5] Xu L, Wang H, Yu Q Q, et al. The monomer derivative of paeoniflorin inhibits macrophage pyroptosis via regulating TLR4/ NLRP3/ GSDMD signaling pathway in adjuvant arthritis rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 101(Pt A): 108169.

[6] Jie F, Xiao S, Qiao Y, et al. Kuijieling decoction suppresses NLRP3-Mediated pyroptosis to alleviate inflammation and experimental colitis *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 264: 113243.

[7] Zhang J, Huang L, Shi X, et al. Metformin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury and cell pyroptosis via AMPK/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Aging* (Albany NY), 2020, 12(23): 24270-24287.

[8] Zhang J, Fan W, Neng L, et al. Adenosine improves LPS-induced ROS expression and increasing in monolayer permeability of endothelial cell via acting on A2AR [J]. *Microvasc Res*, 2022, 143: 104403.

[9] Kariya S, Okano M, Zhao P, et al. NLRP3 inflammasome expression in lipopolysaccharide-induced otitis media [J]. *Acta Otolaryngol*, 2018, 138(12): 1061-1065.

[10] Li X S, Tang X Y, Su W, et al. Vitexin protects melanocytes from oxidative stress via activating MAPK-Nrf2/ARE pathway [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2020, 42(6): 594-603.

[11] Zhang D, Ning T, Wang H. Vitexin alleviates inflammation and enhances apoptosis through the regulation of the JAK/STAT/SOCS signaling pathway in the arthritis rat model [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2022, 36(12): e23201.

[12] Liang C, Jiang Y, Sun L. Vitexin suppresses the proliferation, angiogenesis and stemness of endometrial cancer through the PI3K/AKT pathway [J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1): 581-589.

[13] 周玲,刘军,李功璐,等.牡荆素通过调节 JAK2/STAT3/SOCS3 通路改善哮喘幼鼠肺部炎症 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2022, 30(9): 1536-1541.

- [14] 刘蓓, 任良宏. 巴曲酶对分泌性中耳炎大鼠炎症的抑制作用及机制 [J]. 山东医药, 2021, 61(19): 53-56.
- [15] 段鹏, 霍康, 王建懿, 等. 牡荆素对大鼠脑缺血再灌注损伤后的小胶质细胞/巨噬细胞 M2 极化的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2022, 22(19): 3618-3624.
- [16] 张晓蕾, 张凯, 秦永亨, 等. 木犀草素调控 AMPK/NLRP3 轴介导的细胞焦亡对病毒性心肌炎的保护作用 [J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(5): 514-519.
- [17] Urik M, Šlapák I, Machač J. Chronic secretory otitis media and tympanoplasty in children [J]. *Cas Lek Cesk*, 2019, 158(6): 240-242.
- [18] 刘柯, 赵兴泉, 钟渠. 细胞因子在分泌性中耳炎相关免疫机制中的研究进展 [J]. 医学信息, 2022, 35(12): 73-76.
- [19] Massa H M, Spann K M, Cripps A W. Innate immunity in the middle ear mucosa [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 764772.
- [20] Duan S, Du X, Chen S, *et al.* Effect of vitexin on alleviating liver inflammation in a dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis model [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109683.
- [21] Wen S, Deng F, Li L, *et al.* VX-765 ameliorates renal injury and fibrosis in diabetes by regulating caspase-1-mediated pyroptosis and inflammation [J]. *J Diabetes Investig*, 2022, 13(1): 22-33.
- [22] Shao R G, Xie Q W, Pan L H, *et al.* Necrostatin-1 attenuates Caspase-1-dependent pyroptosis induced by the RIPK1/ZBP1 pathway in ventilator-induced lung injury [J]. *Cytokine*, 2022, 157: 155950.
- [23] 袁玥, 付圣尧, 姜彦, 等. 细胞焦亡在慢性气道炎症性疾病中的研究进展 [J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2023, 37(4): 166-171.
- [24] Ding T, Zhao T, Li Y, *et al.* Vitexin exerts protective effects against calcium oxalate crystal-induced kidney pyroptosis *in vivo* and *in vitro* [J]. *Phytomedicine*, 2021, 86: 153562.
- [25] Li S, Sun Y, Song M, *et al.* NLRP3/caspase-1/GSDMD-mediated pyroptosis exerts a crucial role in astrocyte pathological injury in mouse model of depression [J]. *JCI Insight*, 2021, 6(23): e146852.
- [26] Li H, Yang D H, Zhang Y, *et al.* Geniposide suppresses NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis via the AMPK signaling pathway to mitigate myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Chin Med*, 2022, 17(1): 73.
- [27] Zhou Z, Liu Z, Zhang C, *et al.* Mild hypothermia alleviates early brain injury after subarachnoid hemorrhage via suppressing pyroptosis through AMPK/NLRP3 inflammasome pathway in rats [J]. *Brain Res Bull*, 2023, 193: 72-83.
- [28] Kariya S, Okano M, Zhao P, *et al.* NLRP3 inflammasome expression in lipopolysaccharide-induced otitis media [J]. *Acta Otolaryngol*, 2018, 138(12): 1061-1065.
- [29] Zhang J, Fan W, Neng L, *et al.* Adenosine improves LPS-induced ROS expression and increasing in monolayer permeability of endothelial cell via acting on A2AR [J]. *Microvasc Res*, 2022, 143: 104403.
- [30] Zhang Q, Fan Z, Xue W, *et al.* Vitexin regulates Epac and NLRP3 and ameliorates chronic cerebral hypoperfusion injury [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2021, 99(10): 1079-1087.
- [31] Inamdar S, Joshi A, Malik S, *et al.* Vitexin alleviates non-alcoholic fatty liver disease by activating AMPK in high fat diet fed mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 519(1): 106-112.
- [32] 邓宏哲, 陈昆, 李鹏, 等. 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 通过调控 AMPK/NLRP3 通路介导的细胞焦亡抑制大鼠肺纤维化研究 [J]. 中草药, 2023, 54(3): 841-848.

[责任编辑 高源]