

· 实验研究 ·

汉防己甲素对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤的保护作用及机制研究

王逸飞, 宋玲, 高云航, 陈腾飞, 张腾之, 穆素贞, 贾玲, 李晗*, 张广平*

中国中医科学院 中药研究所, 北京 100029

摘要: **目的** 探讨汉防己甲素对脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤的作用及机制。**方法** 将 ICR 小鼠根据体质量随机分为对照组、模型组、地塞米松组、汉防己甲素 (19.5、39.0、78.0 mg/kg) 组。给药干预 3 d 后除对照组小鼠鼻腔滴注无菌生理盐水外, 其余各组均鼻腔滴注脂多糖生理盐水溶液构建急性肺损伤模型, 24 h 后进行对小鼠进行肺部影像学检查; 并测定小鼠肺湿质量 (W) 与干质量 (D) 比值; 利用苏木素-伊红 (HE) 染色观察肺组织病理形态学变化; 采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量; 选用可见分光光度法检测肺组织中髓过氧化物酶 (MPO) 活性; Western blotting 验证小鼠肺组织 TNF- α 受体 1 (TNFR1) 与受体相互作用蛋白激酶 1 (RIPK1) 蛋白表达水平; 最后选择免疫荧光法检测小鼠肺组织 TNFR1 相对表达水平。**结果** 与模型组相比, 汉防己甲素组小鼠肺部影像与组织病理改变减轻; 汉防己甲素 39.0、78.0 mg/kg 组均可显著降低 W/D 值 ($P < 0.01$ 、 0.001); 并显著降低 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 且汉防己甲素 78.0 mg/kg 组可显著下调 MPO 的活性 ($P < 0.05$); Western blotting 结果显示, 汉防己甲素 39.0 mg/kg 组可显著下调 RIPK1 蛋白相对表达量, 汉防己甲素 78.0 mg/kg 组可显著下调 TNFR、TNF- α 的蛋白相对表达量 ($P < 0.05$); 免疫荧光结果也进一步验证汉防己甲素组可下调 TNFR 的荧光表达。**结论** 汉防己甲素能够减轻脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤, 其作用机制可能与 TNF 信号通路有关。

关键词: 汉防己甲素; 急性肺损伤; 脂多糖; 白细胞介素-1 β ; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子- α ; 髓过氧化物酶; TNF- α 受体 1; 受体相互作用蛋白激酶 1

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2025)01-0001-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.01.001

Protective effect and mechanism of tetrandrine on acute lung injury in mice induced by lipopolysaccharide

WANG Yifei, SONG Ling, GAO Yunhang, CHEN Tengfei, ZHANG Tengzhi, MU Suzhen, JIA Ling, LI Han, ZHANG Guangping

Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To discuss the effect and mechanism of tetrandrine in mice model of acute lung injury induced by lipopolysaccharide. **Methods** ICR mice were randomly divided into control group, model group, dexamethasone group, tetrandrine (19.5, 39.0, and 78.0 mg/kg) group. After 3 days of drug intervention, except for the control group of mice, which received intranasal infusion of sterile physiological saline, all other groups received intranasal infusion of lipopolysaccharide physiological saline solution to construct acute lung injury model. After 24 hours, radiographic examination was performed on mice, and then mice were sacrificed to measure the ratio of wet weight (W) to dry weight (D) of the lungs, observe the pathological changes of lung tissue by HE staining. IL-1 β , IL-6, and TNF- α levels in BALF were detected by ELISA. MPO activity in lung tissue was detected by visible spectrophotometry method, and Western blotting was used to verify the protein expression levels of TNFR1 and RIPK1 in mice lung tissue. Finally, immunofluorescence was used to detect the relative expression level of TNFR1 in mouse lung tissue. **Results**

收稿日期: 2024-10-18

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (82204740); 中国中医科学院优秀青年科技人才培养专项 (ZZ16-YQ-027)

作者简介: 王逸飞, 博士研究生, 研究方向为中药药理。E-mail: wangyifei0824@sina.com

*通信作者: 李晗, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药药理。E-mail: hli1989@icmm.ac.cn

张广平, 博士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药药理。E-mail: gpzhang@icmm.ac.cn

Compared with the model group, mice in the tetrandrine group had alleviated tissue pathology changes, and both tetrandrine 39.0 and 78.0 mg/kg groups could significantly reduce the W/D value ($P < 0.01, 0.001$), significantly reduce IL-1 β , IL-6, and TNF- α content ($P < 0.05, 0.01, \text{ and } 0.001$). And significantly reduce MPO activity in the tetrandrine 78.0 mg/kg group ($P < 0.05$). Western blotting results showed that tetrandrine 39.0 mg/kg group could significantly downregulate RIPK1 protein expression, while the tetrandrine 78.0 mg/kg group could significantly downregulate TNFR and TNF- α protein expression ($P < 0.05$). Immunofluorescence results also further verified that tetrandrine group can down-regulate the fluorescence expression of TNFR. **Conclusion** Tetrandrine can alleviate lipopolysaccharide induced acute lung injury in mice, and its mechanism of action may be related to the TNF signaling pathway.

Key words: tetrandrine; acute lung injury; lipopolysaccharide; IL-1 β ; IL-6; TNF- α ; MPO; TNFR1; RIPK1

急性肺损伤是一种由多种因素引起的肺部炎症性疾病, 主要特点为肺泡内的血管通透性增加, 导致肺部水肿与灌注不足。该病临床上表现为呼吸窘迫、低氧血症和肺部浸润, 严重时可发展为急性呼吸窘迫综合征, 成为危重患者死亡的主要原因之一^[1-2]。现阶段临床治疗多以激素冲击疗法辅助氧疗、机械通气与液体管理等支持治疗为主, 虽能起到缓解疾病作用, 但由于有限的治疗收益与不同程度的不良反应导致临床使用受限^[3], 因此研究高效防治急性肺损伤药物成为亟待解决的问题。

在中医理论中并没有“急性肺损伤”的病名记载, 但医者依据其主要临床表现, 可将其归属于“喘证”“暴喘”“喘脱”等范畴, 其中“痰”“湿”“热”“毒”是其重要致病因素^[4]。防己是防己科千金藤属草质藤本植物, 在《本草品汇精要》中记载其可治肺痿咯血多痰^[5]。防己中主要有效成分汉防己甲素是从块茎中提取的一类双苄基异喹啉类生物碱, 目前在临床上多用于治疗风湿痛、关节炎, 肺癌、肺纤维化等^[6-8]。本课题组前期研究表明, 汉防己甲素在治疗肺纤维化过程中具有良好的抗炎效果, 可显著降低肺组织中的炎性因子含量并减少炎性细胞浸润^[9]。肿瘤坏死因子(TNF)信号通路和急性肺损伤的关系非常密切, TNF作为一种重要的促炎细胞因子, 能够刺激中性粒细胞等炎症细胞的聚集和活化, 导致或加剧急性肺损伤的发生^[10]。因此, 本研究通过小鼠鼻内滴注脂多糖复制急性肺损伤模型, 旨在观察汉防己甲素在急性肺损伤病理过程中的药效作用及可能调控 TNF 信号通路的相关机制, 为汉防己甲素抗急性肺损伤的临床应用提供实验基础和理论依据。

1 材料

1.1 动物

72 只 SPF 级雄性健康 6~8 周龄 ICR 小鼠, 体质量 18~22 g, 购自北京市维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号 SCXK(京)2023-

0077。动物饲养于中国中医科学院中药研究所 SPF 级动物房, 饲养条件: 12 h 明暗交替, 温度(23±1)℃, 湿度(50±15)%, 自主饮水及进食。本实验相关动物饲养和所有实验操作均严格遵守中国中医科学院中药研究所实验动物伦理委员会批准(动物伦理号 2024B027)。

1.2 药品与试剂

汉防己甲素片(浙江金华康恩贝生物制药有限公司, 规格 20 mg/片, 批号 PH2110001A); 醋酸地塞米松片(新乡市常乐制药有限责任公司, 规格 75 mg/片, 批号 D2309071); 脂多糖[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司, 批号 0000135218]; 异氟烷(瑞普天津生物药业有限公司, 批号 20230702); 伊红与苏木素染色液(北京雷根生物技术有限公司, 批号 1023A20); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)抗体(美国 Proteintech 公司, 批号 00034845); 肿瘤坏死因子受体 1(TNFR1)抗体(美国 Proteintech 公司, 批号 00097736); 受体相互作用蛋白激酶 1(RIPK1)抗体(美国 Proteintech 公司, 批号 00057164); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(北京索莱宝科技有限公司, 批号 20230524); 4,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)(英国 Abcam 公司, 批号 ab104139); 辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG(H+L)(北京索莱宝科技有限公司, 批号 20230414); SDS-PAGE 凝胶试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司, 批号 CW0022M); 白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、TNF- α 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司, 批号 20230716、20230721、20230711); 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器

SpectraMax i3x 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); Quantum GX2 Micro-CT(美国 Perkin Elmer 公司); Centrifuge 5810R 型离心机(德国 Eppendorf 公司); TU-1900 紫外可见分光光度计(北

京普析通用仪器有限责任公司); MP Fastprep-24 匀浆仪 (美国 MP Biomedicals 公司); VIP-6 脱水机 (日本樱花有限公司); KD-BM 包埋机 (科迪仪器设备有限公司); NIKON CI-S 型倒置显微镜 (日本尼康公司); Amersham Imager600 化学发光成像分析仪 (美国 GE Healthcare 公司); Mini-PROTEAN Tetra 电泳系统 (美国 BIO-RAD 公司); TCS SP5 X 共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药

小鼠适应性喂养 3 d 后称体质量, 依据体质量随机分为对照组、模型组、地塞米松组、汉防己甲素 (19.5、39.0、78.0 mg/kg) 组, 每组 12 只。根据汉防己甲素治疗矽肺的单日最大剂量 100 mg 进行体表面积换算, 确定小鼠 ig 给药的临床等效剂量为 39.0 mg/kg, 并选择 19.5 mg/kg (0.5 倍临床等效剂量) 和 78.0 mg/kg (2 倍临床等效剂量), 1 次/d, 连续给药 3 d; 同时地塞米松组 ig 地塞米松溶液 1.56 mg/kg, 1 次/d, 连续给药 3 d; 对照组同法给予生理盐水。

2.2 模型制备

末次给药 1 h 后, 各组动物通过异氟烷进行气体麻醉, 小鼠麻醉后除对照组接受无菌生理盐水外, 其余各组均给予鼻腔滴注脂多糖生理盐水溶液, 50 μ L/只, 复制急性肺损伤模型^[1]。

2.3 小鼠肺部影像学检查

待脂多糖刺激小鼠肺部 24 h 后, 同时将 Micro CT 扫描设置参数: 管电流 88 μ A, 管电压 90 kV, 成像视野 72 nm \times 36 nm。小鼠麻醉后呈俯卧位行胸部 CT 断层平扫, 扫描时间约 2 min, 扫描完成后应用 Simple Viewer 软件重建图像。

2.4 标本采集

待小鼠肺部影像学检查完成后收集标本, ip 0.8%戊巴比妥钠麻醉后, 每组先取 6 只小鼠, 剪开颈部、暴露气管, 用预冷 0.5 mL PBS 灌洗肺泡, 反复灌洗 3 次, 收集于离心管中, 支气管肺泡灌洗液 (BALF) 回收率均在 85%以上。使用低温离心机 1 200 r/min 离心 5 min, 离心半径 10 cm, 取 BALF 取上清 0.5 mL, 用于检测炎症细胞因子表达水平。每组剩余 6 只小鼠, 麻醉后摘取双侧肺组织, 右肺组织置于 4%多聚甲醛固定, 左肺上叶用于测量肺湿质量 (W) 与干质量 (D) 比值, 左肺下叶冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

2.5 W/D 的测量

将小鼠左肺上叶置于生理盐水中清洗, 滤纸吸干水分, 称取质量并记录 W, 随后将肺组织放入 70 $^{\circ}$ C 恒温箱中干燥 48 h 后, 再次称取质量记录 D, 计算肺组织 W/D。

2.6 小鼠肺组织病理学观察

取小鼠右肺组织转移至 4%多聚甲醛溶液中, 固定 24 h 后, 进行常规脱水、石蜡包埋、切片厚度约 4 μ m, 随后进行苏木素-伊红 (HE) 染色, 光学显微镜下观察其病理形态。

2.7 ELISA 检测 BALF 中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量

取 BALF 并按照小鼠 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 酶联免疫检测试剂盒说明书进行测定。

2.8 可见分光光度法检测小鼠肺组织中髓过氧化物酶 (MPO) 活性

将左下肺剪碎取 0.1 g 放入研磨管内, 并加入 1.0 mL 预冷并含有 1% protein K 蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液, 冰浴匀浆后于 12 000 r/min 离心 10 min, 离心半径 10 cm 后提取上清, 取上清液置于冰上待测。按照 MPO 活性检测试剂盒说明书进行检测。

2.9 Western blotting 检测小鼠肺组织 TNF- α 、TNFR1、RIPK1 蛋白表达水平

组织匀浆、蛋白提取方法同 2.8 项下。50 μ g 蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离, 转膜, 封闭 1 h 后分别孵育 TNF- α (1:1 000)、TNFR1 (1:1 000) 与 RIPK1 (1:1 000) 抗体、GAPDH (1:2 000), TBST 洗膜, 孵育相应二抗 (1:2 000), 使用增强型化学发光试剂 (ECL) 发光后使用凝胶成像系统拍摄图片, 最后利用 Image J 软件计算灰度。

2.10 免疫荧光法检测小鼠肺组织 TNFR1 相对表达水平

将石蜡切片脱蜡后进行抗原修复, 在室温下封闭 30 min, 随后将切片与相应的一抗 (TNFR1, 1:100) 在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。PBS 洗涤切片, 滴加二抗后, 室温孵育 1 h。PBS 再次洗片, DAPI 进行复染, 室温避光孵育, 封片后用激光共聚焦显微镜进行拍摄。

2.11 统计学方法

采用 SPSS Statistics 25 统计软件进行统计分析, 计量资料符合正态分布且方差齐, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用单因素方差分析进行组间比较, 方差齐两两比较采用 LSD 检验, 方差不齐用邓尼特 T3 检验。

3 结果

3.1 汉防己甲素对小鼠肺部影像学的影响

对照组小鼠肺部纹理清晰，透过度均匀，两肺未见异常纹路和片状阴影。模型组小鼠可观察到双肺边缘模糊，纹理紊乱并可见弥漫性浸润。与模型组相比，地塞米松组与汉防己甲素组上述表现较轻，其中汉防己甲素 78.0 mg/kg 组的改善效果更明显，见图 1。

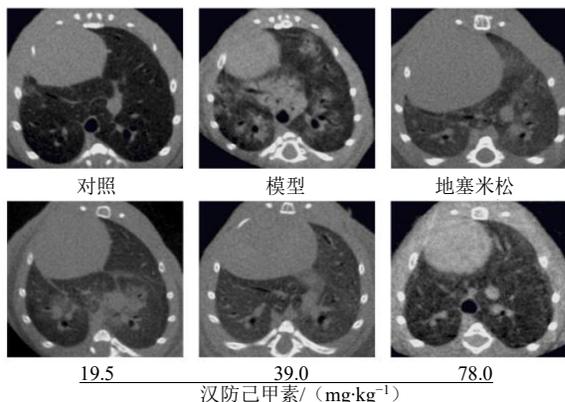
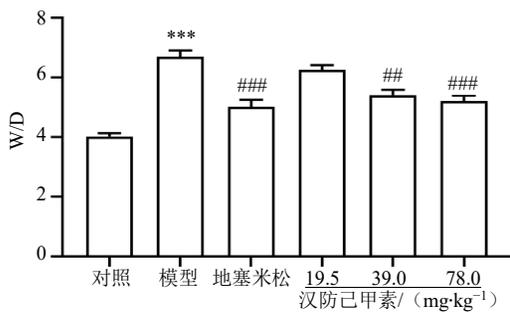


图 1 汉防己甲素对小鼠的肺部影像学检查

Fig. 1 Radiographic examination of the lungs in mice treated with tetrandrine

3.2 汉防己甲素对小鼠 W/D 的影响

与对照组相比，模型组 W/D 值显著升高 ($P < 0.001$)；而与模型组相比，地塞米松组、汉防己甲素 39.0、78.0 mg/kg 组 W/D 值显著下降 ($P < 0.01$ 、 0.001)，见图 2。



与对照组比较：*** $P < 0.001$ ；与模型组比较：## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。
*** $P < 0.001$ vs control group, ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 2 汉防己甲素对小鼠 W/D 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of tetrandrine on W/D in mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.3 汉防己甲素对小鼠肺组织病理学观察

对照组小鼠肺脏终末细支气管被覆单层柱状纤毛上皮清晰可见，呼吸性细支气管、肺泡管和肺泡规整、肺泡腔内未见明显炎性渗出。模型组小鼠

血管和支气管周围均可见多灶性炎细胞浸润，并可见轻度广泛性或弥漫性分布的肺泡壁增厚，同时可见多灶性肺泡和支气管腔内轻微渗出。地塞米松组小鼠肺脏血管和支气管周围均可见多灶性炎细胞浸润，并可见多灶性肺泡和支气管腔内轻微渗出。汉防己甲素 19.5 mg/kg 组小鼠肺脏可见肺泡壁增厚，增厚的壁内为大量炎细胞聚集，并可见支气管分支管周和血管周围有数量不等的炎细胞浸润；汉防己甲素 39.0 mg/kg 组小鼠肺脏可见少数肺泡壁增厚，增厚的壁内为数量不等炎细胞聚集，并可见支气管分支管周和血管周围有数量不等炎细胞浸润；而汉防己甲素 78.0 mg/kg 组小鼠肺脏可见轻度弥漫性肺泡壁增厚，整体情况优于其余各组，见图 3。

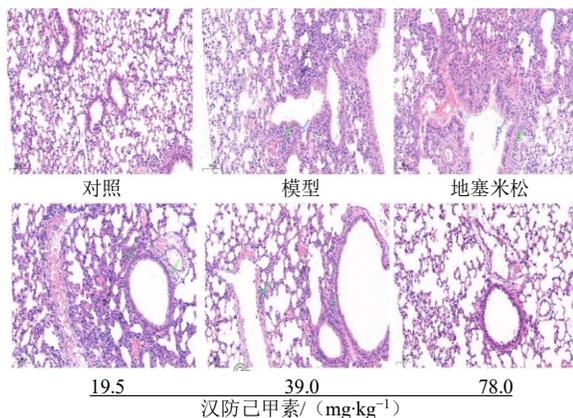


图 3 汉防己甲素对小鼠肺组织病理的影响 ($\times 200$)

Fig. 3 Effect of tetrandrine on lung histopathology in mice ($\times 200$)

3.4 汉防己甲素对小鼠 BALF 中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量的影响

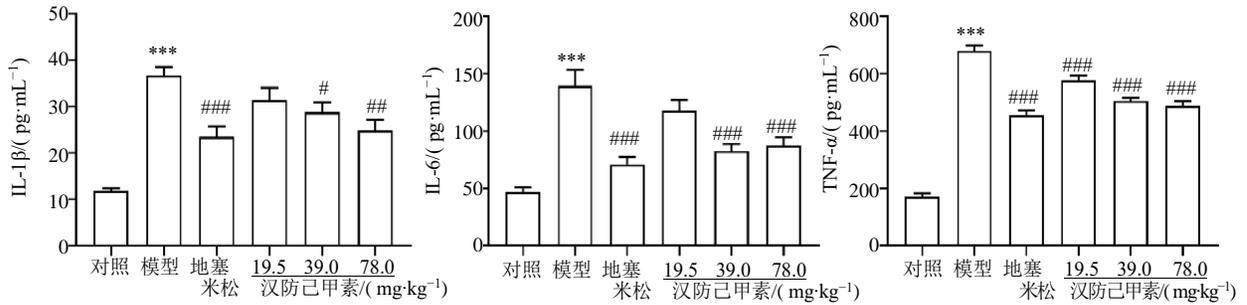
与对照组相比，模型组小鼠 BALF 中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量显著增加 ($P < 0.001$)；与模型组相比，汉防己甲素各剂量组 TNF- α 均含量显著降低 ($P < 0.001$)，汉防己甲素 39.0、78.0 mg/kg 组 IL-1 β 、IL-6 含量均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，见图 4。

3.5 汉防己甲素对小鼠肺组织中 MPO 活性的影响

与对照组相比，模型组小鼠肺组织中 MPO 活性显著增加 ($P < 0.01$)；与模型组相比，汉防己甲素 78.0 mg/kg 组的 MPO 活性显著降低 ($P < 0.05$)，见图 5。

3.6 汉防己甲素对小鼠 TNF 信号通路相关蛋白表达的影响

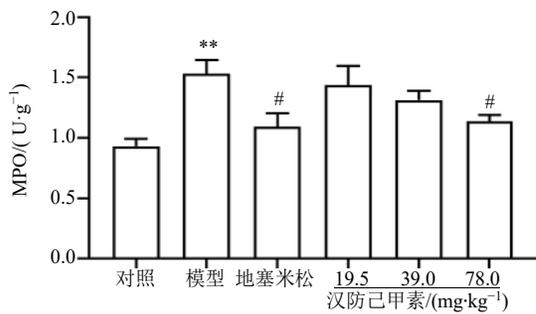
结果显示，与对照组相比，模型组 RIPK1、



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。
 *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 4 汉防己甲素对小鼠 BALF 中 IL-1β、IL-6、TNF-α 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

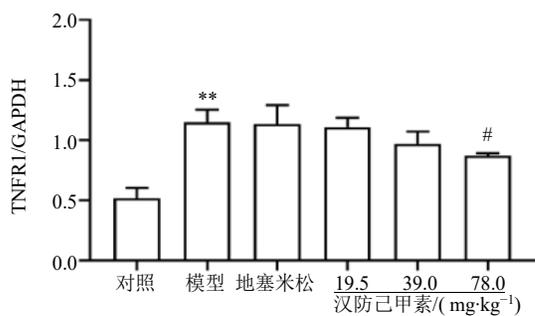
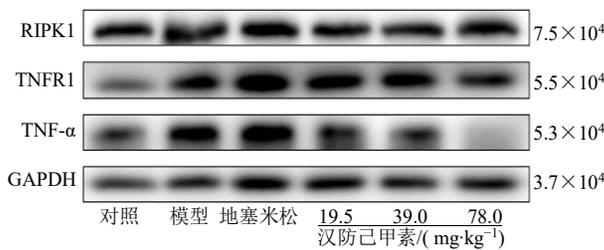
Fig. 4 Effect of tetrandrine on contents of IL-1β, IL-6 and TNF-α in BALF of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。
 ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

图 5 汉防己甲素对小鼠肺组织中 MPO 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effect of tetrandrine on MPO activity in lung tissue of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



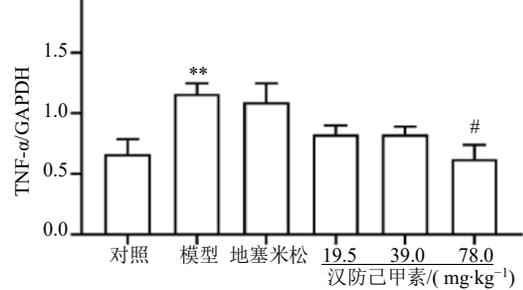
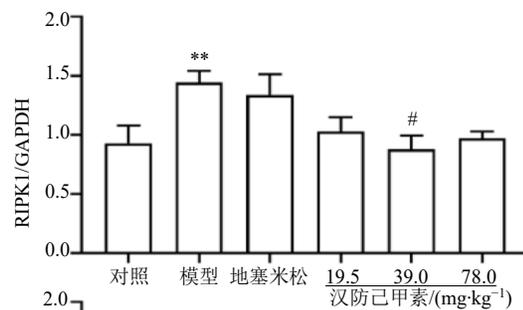
TNFR、TNF-α 蛋白相对表达量显著上调 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 汉防己甲素 39.0 mg/kg 组 RIPK1 蛋白相对表达量显著降低, 汉防己甲素 78.0 mg/kg 组 TNFR、TNF-α 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.05$), 见图 6。

3.7 汉防己甲素对小鼠 TNFR 表达的影响

与对照组相比, 模型组小鼠肺组织中 TNFR 表达显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 汉防己甲素各剂量组 TNFR 表达水平降低, 其中汉防己甲素 78.0 mg/kg 组逆转效果更优 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 见图 7、8。

4 讨论

急性肺损伤是一种严重的肺部疾病, 可由严重



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。
 ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

图 6 汉防己甲素对小鼠 TNF 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effect of tetrandrine on expression of TNF signaling pathway-related proteins in mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

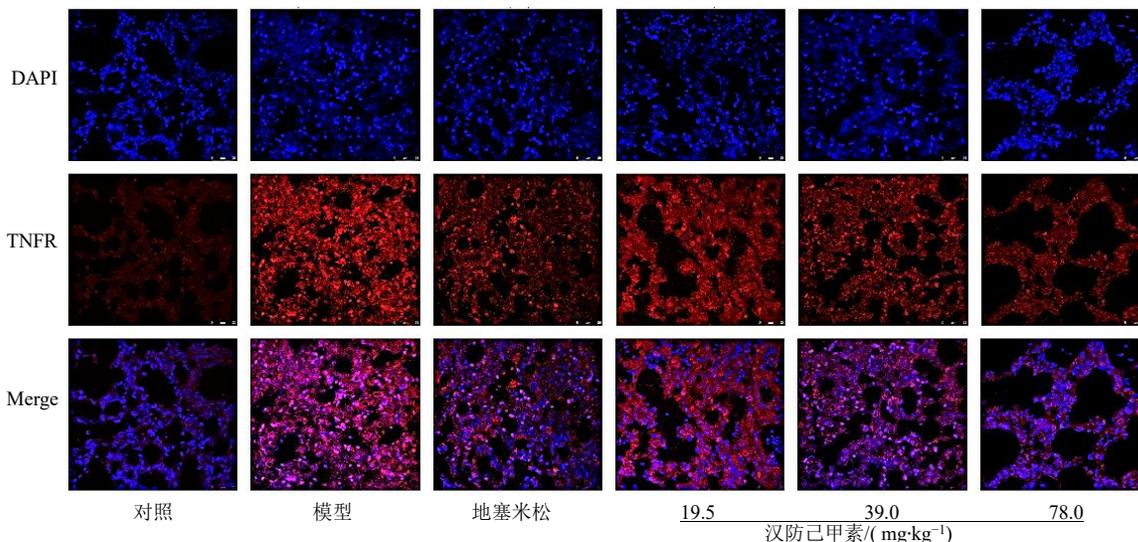
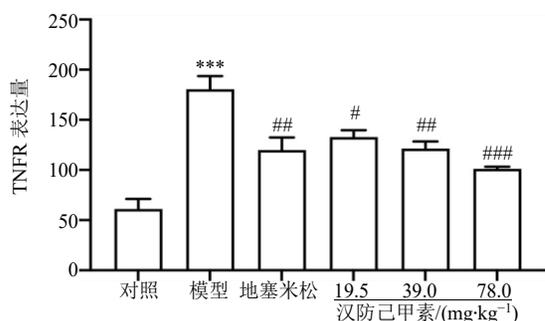


图 7 免疫荧光法检测汉防己甲素对小鼠 TNFR 表达的影响 (×630)

Fig. 7 Effect of tetrandrine on TNFR expression in mice was detected by immunofluorescence assay (×630)



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 8 汉防己甲素对小鼠 TNFR 表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 8 Effect of tetrandrine on the expression of TNFR of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

感染、败血症与肺创伤等多种直接或间接的致病因素引起, 主要影响肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞, 并造成弥漫性肺间质及肺泡水肿, 进而引发急性低氧性呼吸功能不全。若纠正不及时, 可能进一步发展为急性呼吸窘迫综合征, 导致呼吸衰竭, 甚至危及生命。尽管国内外学者已就急性肺损伤展开了大量的研究, 但至目前为止, 其病死率仍高达 29%~42%^[12]。因此, 继续寻找有效治疗药物具有不可估量的重要性和紧迫性。

在中医理论中, 急性肺损伤可归属于“喘证”与“暴喘”等范畴, 其中“喘证”与“暴喘”多与“痰”“湿”“热”“毒”有关, 湿毒气痹阻于肺, 导

致肺气宣降失常, 从而引发喘证。防己为防己科千金藤属植物粉防己的干燥根, 习称汉防己。其味辛苦, 性寒, 归膀胱、肺经。防己通过祛风除湿, 可改善肺部环境有助于缓解喘证症状。同时防己苦寒降利, 能清热利水, 善走下行而泄下焦膀胱湿热。而对于因水湿内停、肺气不降而导致的喘证, 防己通过利水消肿, 可以排除体内多余的水分, 减轻肺部负担, 从而有助于缓解喘证。防己中主要成分汉防己甲素被证明对类风湿性关节炎^[13-14]、肝炎^[15]、肾炎^[16]等多种炎症性疾病具有显著疗效。同时报道进一步显示汉防己甲素可以调节机体失衡的代谢通路, 逆转炎症过程, 减少炎症引起的其他病理损伤, 防止恶性循环^[17], 且汉防己甲素在清除身体炎症状态的同时, 不会破坏人体的正常免疫功能^[18]。本课题组围绕着汉防己甲素治疗呼吸系统疾病进行了长期研究, 发现汉防己甲素具有较好的抗炎与抗纤维化功效^[19]。同时临床研究也进一步提示其具有调节患者血清炎症因子水平作用^[20]。以上结果均提示汉防己甲素在治疗急性肺损伤方面具有一定的可行性和潜力。

脂多糖为革兰阴性细菌细胞壁的一种特有成分。脂多糖可借助信号转导通路诱发宿主的应答, 促进炎症细胞因子的合成与释放。这一过程与急性肺损伤的生理病理过程高度相关^[21-23]。因此, 本研究选择鼻腔滴注脂多糖的方法复制小鼠急性肺损伤模型。首先本研究利用 Micro-CT 清晰呈现了小鼠肺部细微结构的变化, 结果显示, 汉防己甲素组

可改善小鼠双肺边缘模糊, 纹理紊乱的现象。当急性肺损伤发生时, 通常由于肺内血管通透性增高导致血管外液体渗出到肺实质中, 造成肺泡腔和间质水肿。因此肺 W/D 这一比值可直观地反映小鼠肺水肿程度, 结果显示汉防己甲素 39.0、78.0 mg/kg 组 W/D 值显著下降, 表明汉防己甲素能有效抑制肺水肿。同时 HE 染色结果显示, 汉防己甲素可改善小鼠肺组织炎细胞浸润、肺泡壁增厚与渗出等现象。当滴注脂多糖复制小鼠急性肺损伤模型时, 脂多糖会破坏嗜中性粒细胞、巨噬细胞的活化, 从而导致促炎因子如 IL-6、IL-1 β 与 TNF- α 异常激活。作为“早期反应细胞因子”, TNF- α 在急性肺损伤时显著升高, 而 TNF- α 的升高可进一步加重肺实质的炎症反应与损伤^[24-25]。与 TNF- α 相似, IL-1 β 在急性肺损伤时也显著升高, 并与 TNF- α 协同发挥作用, 促进炎症介质的释放和白细胞聚集, 加剧肺部炎症反应^[26]。IL-6 主要由 TNF- α 和 IL-1 β 刺激肺泡巨噬细胞分泌, 其升高同样会加重肺部炎症反应和损伤程度。结果显示, 汉防己甲素均可降低 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平, 表明其可减轻炎症反应。MPO 位于中性粒细胞和单核细胞中, 当急性肺损伤发生时, 活化的中性粒细胞会释放 MPO, 进而增强炎症反应和组织损伤。因此, MPO 水平亦可作为评估肺损伤程度的一个重要指标。实验结果显示, 汉防己甲素可显著降低 MPO 活性^[27], 表明其可减轻急性肺损伤程度。综上所述, 汉防己甲素可通过缓解炎症反应与改善肺水肿从而缓解急性肺损伤。

感染或组织损伤时引发的炎症反应, 是人体抵御病原体入侵的第一道防线。然而, 当炎症反应过度活跃亦会引发严重的组织损伤, 甚至可能导致器官衰竭。因此, 抑制过度炎症反应可降低急性肺损伤的严重程度。TNF- α 作为一种重要的促炎细胞因子, 通过与其受体 TNFR 结合, 激活 RIPKs 等下游信号分子, 进而触发和加剧肺部的炎症反应和组织损伤^[28]。Western blotting 与免疫荧光结果显示, 汉防己甲素可下调通路中 RIPK1、TNFR、TNF- α 的表达, 从而减轻小鼠肺部炎症。

综上所述, 汉防己甲素可以抑制急性肺损伤小鼠肺部炎症因子的释放, 降低炎症反应, 减轻肺组织水肿和炎性细胞浸润, 对脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠具有较好的保护作用, 其作用机制可能与抑制 TNF 信号通路有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Long M E, Mallampalli R K, Horowitz J C. Pathogenesis of pneumonia and acute lung injury [J]. *Clin Sci*, 2022, 136(10): 747-769.
- [2] MOKrá D. Acute lung injury-from pathophysiology to treatment [J]. *Physiol Res*, 2020, 69(Suppl 3): S353-S366.
- [3] Lu Q Y, Huang S Y, Meng X Y, et al. Mechanism of phosgene-induced acute lung injury and treatment strategy [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(20):10933.
- [4] 卢悦, 张平平, 王东强, 等. 急性肺损伤中医病因病机的探讨 [J]. *中国中医急症*, 2020, 29(2): 280-282.
- [5] 席苑, 张海静, 叶祖光, 等. 汉防己甲素现代药理作用研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(1): 20-28.
- [6] Liu T, Liu X, Li W H. Tetrandrine, a Chinese plant-derived alkaloid, is a potential candidate for cancer chemotherapy [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(26): 40800-40815.
- [7] Bhagya N, Chandrashekar K R. Tetrandrine-A molecule of wide bioactivity [J]. *Phytochemistry*, 2016, 125: 5-13.
- [8] 杨焱, 王毛毛, 于淼, 等. 基于网络药理学、分子对接和体外实验探讨防己生物碱类活性成分逆转乳腺癌耐药的作用机制 [J]. *中草药*, 2023, 54(9): 2841-2851.
- [9] 王翼遥, 宋玲, 高云航, 等. 雾化吸入粉防己碱对博来霉素致肺纤维化大鼠的药效作用 [J]. *药物评价研究*, 2023, 46(12): 2592-2600.
- [10] Li N, Geng C H, Hou S K, et al. Damage-associated molecular patterns and their signaling pathways in primary blast lung injury: New research progress and future directions [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17): 6303.
- [11] Chen H, Bai C X, Wang X D. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2010, 4(6):773-783.
- [12] Blank R, Napolitano L M. Epidemiology of ARDS and ALI [J]. *Crit Care Clin*, 2011, 27(3): 439-458.
- [13] Gao L N, Feng Q S, Zhang X F, et al. Tetrandrine suppresses articular inflammatory response by inhibiting pro-inflammatory factors via NF- κ B inactivation [J]. *J Orthop Res*, 2016, 34(9): 1557-1568.
- [14] Jia Y G, Miao Y M, Yue M F, et al. Tetrandrine attenuates the bone erosion in collagen-induced arthritis rats by inhibiting osteoclastogenesis via spleen tyrosine kinase [J]. *FASEB J*, 2018, 32(6): 3398-3410.
- [15] Hsu Y C, Chiu Y T, Cheng C C, et al. Antifibrotic effects of tetrandrine on hepatic stellate cells and rats with liver fibrosis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22(1): 99-111.
- [16] Yin J Z, Lin J Z, Yu J, et al. Tetrandrine may treat

- membranous glomerulopathy via P13K/Akt signaling pathway regulation: therapeutic mechanism validation using Heymann nephritis rat model [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 6499-6515.
- [17] Gao L N, Feng Q S, Zhang X F, *et al.* Tetrandrine suppresses articular inflammatory response by inhibiting pro-inflammatory factors via NF- κ B inactivation [J]. *J Orthop Res*, 2016, 34(9): 1557-1568.
- [18] Song J W, Liu Y S, Guo Y R, *et al.* Therapeutic effects of tetrandrine in inflammatory diseases: A comprehensive review [J]. *Inflammopharmacology*, 2024, 32(3):1743-1757.
- [19] 席苑, 张海静, 高云航, 等. 汉防己甲素对 TGF- β 1 诱导的 MRC-5 细胞中 Col-I 及 FN 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(12): 94-99.
- [20] 胡朝阳, 张小红, 常瑞, 等. 汉防己甲素片联合吡非尼酮治疗肺间质纤维化的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(4): 739-743.
- [21] Sperandeo P, Martorana A M, Polissi A. Lipopolysaccharide biosynthesis and transport to the outer membrane of gram-negative bacteria [J]. *Subcell Biochem*, 2019, 92: 9-37.
- [22] Grégoire M, Uhel F, Lesouhaitier M, *et al.* Impaired efferocytosis and neutrophil extracellular trap clearance by macrophages in ARDS [J]. *Eur Respir J*, 2018, 52(2): 1702590.
- [23] Ehrentraut H, Weisheit C K, Frede S, *et al.* Inducing acute lung injury in mice by direct intratracheal lipopolysaccharide instillation [J]. *J Vis Exp*, 2019, 6(149): 10.3791/59999.
- [24] Lai W Y, Wang J W, Huang B T, *et al.* A novel TNF- α -targeting aptamer for TNF- α -mediated acute lung injury and acute liver failure [J]. *Theranostics*, 2019, 9(6): 1741-1751.
- [25] Lelli D, Sahebkar A, Johnston T P, *et al.* Curcumin use in pulmonary diseases: State of the art and future perspectives [J]. *Pharmacol Res*, 2017, 115: 133-148.
- [26] Butt Y, Kurdowska A, Allen T C. Acute lung injury: A clinical and molecular review [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2016, 140(4): 345-350.
- [27] Yao Q, Wen J C, Chen S M, *et al.* Shuangdan Jiedu Decoction improved LPS-induced acute lung injury by regulating both cGAS-STING pathway and inflammasome [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 10: 336: 118661.
- [28] Huyghe J, Priem D, Bertrand M J M. Cell death checkpoints in the TNF pathway [J]. *Trends Immunol*, 2023, 44(8): 628-643.

[责任编辑 高源]