

• 实验研究 •

穿心莲内酯调节 NLRP3/Caspase-1 信号通路对呼吸道合胞病毒感染毛细支气管炎大鼠炎症反应的影响

刘宝娟¹, 付晓康², 高 帅³, 苏 琴², 尉全平², 孙子梅²

1. 张家口市妇幼保健院 药剂科, 河北 张家口 075000

2. 河北北方学院附属第二医院 儿内科, 河北 张家口 075000

3. 张家口市妇幼保健院 儿内科, 河北 张家口 075000

摘 要: **目的** 探究穿心莲内酯调节 NOD 受体蛋白 3 (NLRP3) /半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1 (Caspase-1) 信号通路对呼吸道合胞病毒 (RSV) 感染毛细支气管炎大鼠炎症反应的影响。**方法** 34 只大鼠采用 RSV 滴鼻法构建毛细支气管炎大鼠模型, 将建模成功的 30 只大鼠随机分为对照组、模型组、穿心莲内酯 (5、10 mg/kg) 组、NLRP3/Caspase-1 通路激活剂 Nigericin (1.45 mg/kg) 组、穿心莲内酯+Nigericin (10+1.45 mg/kg) 组。分析各组大鼠肺组织含水量和肺指数; 苏木精-伊红 (HE) 检测肺部病理变化; qRT-PCR 检测肺组织中 RSV 病毒载量; Western blotting 和 IHC 检测肺组织蛋白 NLRP3、Caspase-1 的表达情况; 流式细胞术检测大鼠外周血 Th1/Th2 细胞比例; ELISA 检测支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中肿瘤坏死因子- γ (TNF- γ)、白细胞介素 (IL) -6、IL-4 的水平。**结果** 与模型组相比, 穿心莲内酯 (5、10 mg/kg) 组肺指数、肺组织含水量及病毒载量减少, 肺部损伤得到改善, NLRP3、Caspase-1 阳性表达率和蛋白表达、Th2 细胞百分含量、TNF- γ 、IL-6 水平减少, Th1 细胞百分含量、BALF 中 IL-4 水平升高 ($P<0.05$ 、 0.001); 与穿心莲内酯 10 mg/kg 组相比, 穿心莲内酯+Nigericin 组上述指标表达均相反 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。**结论** 穿心莲内酯能改善 RSV 感染毛细支气管炎大鼠炎症反应, 可能是通过抑制 NLRP3/Caspase-1 通路实现的。

关键词: 穿心莲内酯; Nod 受体蛋白 3/半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1; 毛细支气管炎; 呼吸道合胞病毒

中图分类号: R286.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2025)04 - 0821 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.04.001

Effect of andrographolide on inflammatory response in bronchiolitis rats with respiratory syncytial virus infection by modulating NLRP3/Caspase-1 signaling pathway

LIU Baojuan¹, FU Xiaokang², GAO Shuai³, SU Qin², WEI Quanping², SUN Zimei²

1. Department of Pharmacy, Zhangjiakou Maternal and Child Health Hospital, Zhangjiakou 075000, China

2. Department of Pediatric, Hebei North University Affiliated Second Hospital, Zhangjiakou 075000, China

3. Department of Pediatric, Zhangjiakou Maternal and Child Health Hospital, Zhangjiakou 075000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of andrographolide on inflammatory response in bronchiolitis rats with respiratory syncytial virus (RSV) infection with bronchiolitis by modulating the NLRP3/Caspase-1 signaling pathway. **Methods** Thirty-four rats were selected and the rat model of bronchiolitis was constructed by RSV nasal drop. The 30 rats with successful modeling were randomly divided into control group, model group, andrographolide (5, 10 mg/kg) group, Nigericin group, and andrographolide + Nigericin group (10 + 1.45 mg/kg). The water content and lung index of lung tissue in each group were analyzed. HE was used to detect pathological changes in the lungs. RSV viral load in lung tissue was detected by qRT-PCR. Western blotting and IHC were used to detect the expressions of NLRP3 and Caspase-1 in lung tissue. Flow cytometry was used to detect the ratio of Th1/Th2 cells in rat peripheral blood. The levels of TNF- γ , IL-6, and IL-4 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected by ELISA. **Results** Compared with the model group, the lung index, lung tissue water content, and viral load of andrographolide (5, 10 mg/kg) group were reduced, and the lung injury was improved, the positive expression rate, the protein expression rates of NLRP3 and Caspase-1, the percentage content of Th2 cells, levels of TNF- γ , and IL-6 decreased, the percentage of Th1 cells, and the level of IL-4 in BALF

收稿日期: 2025-02-11

基金项目: 张家口市科学技术局科技项目 (2322087D)

作者简介: 刘宝娟, 女, 主管药师, 本科, 研究方向为药学。E-mail: drttv9@163.com

increased ($P < 0.05$, 0.001). Compared with the andrographolide 10 mg/kg group, the above indexes in andrographolide + Nigericin group were opposite ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). **Conclusion** Andrographolide can improve the inflammatory response in RSV infected bronchiolitis rats, possibly by inhibiting the NLRP3/Caspase-1 pathway.

Key words: andrographolide; NLRP3/Caspase-1; capillary bronchitis; respiratory syncytial virus

毛细支气管炎是由呼吸道合胞病毒 (RSV) 等病原体引起的, 在全世界范围内每年约有 350 万名 5 岁以下儿童因 RSV 引起的下呼吸道感染^[1]。毛细支气管炎婴幼儿患者临床上表现为流鼻涕、发烧和咳嗽通常先于下呼吸窘迫 (鼻张开、呼吸急促和肋下退缩) 的体征; 但急性病毒性毛细支气管炎和病毒性肺炎的症状相似, 通常很难区分它们, 特别是在 2 岁以下的儿童中^[2]。大多数婴幼儿患者症状较轻, 早期不需要使用抗生素, 后期若继发细菌感染可通过抗生素治疗, 但也会并发哮喘、肺炎, 危及婴幼儿生命健康。因此, 探寻一种成分安全、高效的药物对婴幼儿毛细支气管炎的临床治疗相当重要。穿心莲内酯是从穿心莲中提取的有效成分, 对炎症疾病的治疗有较好的效果。以往研究表明, 穿心莲内酯能有效降低脓毒症引起的炎症, 改善脓毒症引起的肺炎和肺部损伤, 也可显著降低由 RSV 诱导的毛细血管炎患者中 Th1/Th2 的值, 抑制细胞凋亡、氧化应激和促炎因子分泌^[3-6]。穿心莲及穿心莲内酯均具有抗 RSV 作用^[7-8]。炎症反应被认为是 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体引发的, 激活半胱氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1), 可催化白细胞介素 (IL)-1 β 蛋白水解加工为成熟的 IL-1 β , 过量的 IL-1 β 通过激活各种信号通路来刺激全身炎症反应, 释放大量的炎症因子, 使机体产生炎症。研究表明, 抑制 NLRP3/Caspase-1 通路, 可改善化脓性锥虫诱导的炎症, 也可减轻急性支气管炎, 改善肺部炎症损伤^[9-10]。重症毛细支气管炎患儿将临床治疗后 NLRP3 水平下降^[11], 推测 NLRP3/Caspase-1 信号通路与 RSV 感染毛细支气管炎大鼠炎症反应有关。本研究以 RSV 感染的毛细支气管炎大鼠为研究对象, 探究穿心莲内酯是否通过调节 NLRP3/Caspase-1 信号通路对 RSV 感染毛细支气管炎大鼠炎症反应产生影响。

1 材料与方法

1.1 材料来源

50 只 Wistar 雄性大鼠购自河北省实验动物中心 (河北医科大学实验动物学部), 7~8 周龄, 体质量 210~230 g, 许可证号 SCXK (冀) 2022-001;

实验经河北省实验动物中心动物伦理委员会批准 (20220301)。大鼠饲养在温度 20~24 °C, 湿度 45%~65%, 12 h/12 h 明暗循环的动物房内, 提供食物和水。HeLa 细胞 (武汉普诺赛公司)。

1.2 试剂与仪器

穿心莲内酯 (质量分数 > 98%, 货号 365645, 默克公司); NLRP3/Caspase-1 通路激活剂 Nigericin (货号 tlr1-nig-5, 深圳欣博盛公司); NLRP3、Caspase-1、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)、山羊抗兔 IgG H&L、山羊抗鼠 IgG H&L (货号 GTX00763、GTX101322、GTX627408、GTX04214-25、GTX04214-25, GeneTex 公司); 肿瘤坏死因子 γ (TNF- γ)、IL-6、IL-4 ELISA 检测试剂盒 (货号 ml027464、ml102828、ml102825, 上海酶联公司); 苏木精-伊红 (HE) 染色剂试剂盒、全蛋白提取试剂盒 (货号 G1120、BC3710, SOLAR BIO 公司); ECL 化学发光底物试剂盒。

FITC-CD3、APC-CD8、多功能酶标仪、垂直凝胶电泳仪、流式细胞仪 (赛默飞公司)。

1.3 方法

1.3.1 制备 RSV 混悬液 当 HeLa 细胞长满单层时, 37 °C 条件下将 RSV 快速融化, 依据 0.05 感染复数计算 RSV 接种量, 吸取 50 μ L 接种于 HeLa 细胞, 当细胞致病变效应达到 70% 以上时, 收集细胞, 反复冻融 3 次, 每次 1 h (-80 °C 冰箱); 离心取上清液 (4 °C、1000 r/min、10 min), 空斑法测定病毒滴度, 病毒滴度调整为 1×10^6 PFU/mL, 即 7×10^5 TCID₅₀/mL, 存于 -80 °C 冰箱备用。

1.3.2 造模、分组 34 只大鼠经乙醚麻醉后, 将大鼠头部后仰, 向两侧鼻孔滴入 RSV 混悬液 100 μ L (1×10^6 PFUs), 1 次/d, 连续 2 d, 以构建毛细支气管炎大鼠模型^[12]。连续 2 次滴鼻 24 h 后, 观察大鼠口周、四肢末梢发绀和咳嗽现象, 若活动减少且伴有呼吸急促, 且肺组织 HE 染色显示肺结构紊乱, 肺泡壁厚, 有炎症细胞浸润且水肿, 肺部出现明显损伤, 则证明毛细支气管炎模型制备成功^[13-14]。共有 30 只大鼠造模成功, 造模成功率为 88%。

随机选取 6 只 Wistar 大鼠作为对照组, 将 RSV

感染构建成功的大鼠模型分为穿心莲内酯 (5、10 mg/kg) 组、Nigericin 组、穿心莲内酯+Nigericin 组。穿心莲内酯组分别 ig 5、10 mg/kg 穿心莲内酯^[15]; Nigericin 组 ip 1.45 mg/kg 的 Nigericin^[16]; 穿心莲内酯+Nigericin 组 ig 10 mg/kg 穿心莲内酯的同时 ip 1.45 mg/kg Nigericin。每组 6 只大鼠, 对照组则 ig 等量的生理盐水 1 次/d, 持续给药 14 d。注意观察每组大鼠的状态。

1.3.3 样本采集 各组大鼠 14 d 给药结束后, 乙醚麻醉, 称量各组大鼠体质量, 毛细管取大鼠眼眶静脉丛外周血于加抗凝剂的离心管中 (每次取血 0.5 mL), 多次采血用于流式细胞术实验; 开胸取双肺并称量质量, 0.5 mL 生理盐水清洗肺 3 次, 收集 1.5 mL 支气管肺泡灌洗液 (BALF) 低速离心取上清, 用于后续 ELISA 检测; 左肺用于检测肺指数与肺组织含水量; 右肺一部分组织包埋用于 HE、IHC 实验, 另一部分右肺组织存于 -80 °C 冰箱用于 qRT-PCR 和 Western blotting。

1.3.4 检测大鼠肺组织含水量和肺指数 取大鼠左肺组织, 计算肺指数, 肺指数=双肺质量/大鼠体质量; 其中左肺称质量后, 烘干机干燥, 再次称量干质量, 计算肺组织含水量[肺组织含水量=(左肺湿质量-左肺干质量)/左肺湿质量]。

1.3.5 HE 染色检测肺部病理变化 取 1.3.3 项下的右肺组织, 4% 的多聚甲醛固定肺组织, 蒸馏水洗涤、脱水、蜡块包埋、切片, HE 染色根据苏木精伊红染色试剂盒进行, 显微镜下观察肺部病理变化。HE 染色结果由 2 位实验人员进行观察, 将观察记录汇总后, 选择 2 位实验人员均观察到的病理特征, 对病理结果进行判定。

1.3.6 IHC 检测肺组织中 NLRP3、Caspase-1 阳性表达 取 1.3.3 项下的右肺组织, 去蜡脱水制成切片, 加 NLRP3 (1:200)、Caspase-1 (1:500), 4 °C 过夜孵育, 室温复温 30 min, PBS 漂洗, 二抗 (1:1 000) 室温孵育 20 min, PBS 漂洗, DBA 溶液染色, 苏木素复染, 脱水晾干片子, 显微镜下拍照。每张切片随机挑选 5 个视野, Image J 软件分析阳性细胞染色情况, 以染成棕色或棕褐色的阳性细胞数与总细胞数的百分比表示阳性率。

1.3.7 qRT-PCR 检测肺组织中 RSV 病毒载量 使用 TRIzol 试剂从肺组织中提取总 RNA, 反转录后, 进行 qRT-PCR, 病毒载量以 C_t 值表示。RSV 正向引物: 5'-AGATCAACTTCTGTCATCCAGCAA-3',

反向引物: 5'-TTCTGCACATCATAATTAGGAGTATCAAT-3'; GAPDH 正向引物: 5'-ATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGC-3', 反向引物 5'-TCAAAGGTGGAGGAGTGGGTGTC-3'。

1.3.8 Western blotting 检测肺组织中 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达 取 1.3.3 项下右肺组织, 破碎组织提蛋白, BCA 蛋白测定, 电泳, 转印, 封闭, PBS 漂洗。一抗 Caspase-1 (1:2 000)、NLRP3 (1:1 000)、GAPDH (1:5 000), 4 °C 过夜孵育, PBS 漂洗, 然后二抗抗体 (1:5 000) 孵育 1 h, 化学发光显影仪 ECL 发光显色。Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

1.3.9 流式细胞术检测大鼠外周血 Th1/Th2 细胞比例 取采集的外周血 2 mL, 向离心管中加 2 mL PBS 稀释, Ficoll 密度梯度离心法用于分离外周血单个核细胞 (PBMC): 在 Ficoll 溶液上加稀释后的血液, 4 °C 离心取中间薄雾状层 (淋巴细胞) 于新离心管, PBS 重悬, 加 FITC-CD3、APC-CD8 抗体, 4 °C 孵育 10 min (避光), 加 PE-IL-4、IFN- γ , 流式细胞仪分析 CD3⁺CD8⁻/IFN- γ ⁺ (Th1)、CD3⁺CD8⁻/IL-4⁺ (Th2) 细胞的百分含量。

1.3.10 ELISA 检测 BALF 中 TNF- γ 、IL-6、IL-4 的水平 取收集的 BALF 上清, 通过大鼠 TNF- γ 、IL-6、IL-4 ELISA 试剂盒检测对应炎症因子水平, 步骤参照试剂盒操作说明书进行。

1.4 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 26.00 分析, 数据均符合正态分布且方差齐, 多组间比较用单因素方差分析, 组间两两比较用 SNK- q 检验。

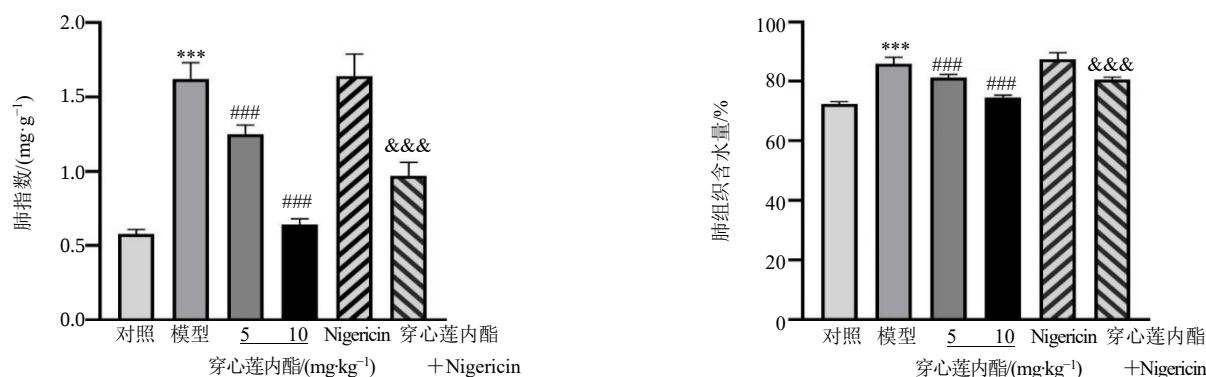
2 结果

2.1 穿心莲内酯对大鼠肺指数和组织含水量的影响

与模型组相比, 穿心莲内酯 (5、10 mg/kg) 组肺指数、肺组织含水量均显著减少 ($P < 0.001$); 与穿心莲内酯 10 mg/kg 组相比, 穿心莲内酯+Nigericin 组肺指数、肺组织含水量显著增加 ($P < 0.001$), 见图 1。

2.2 穿心莲内酯对大鼠肺部病理变化的影响

对照组肺部结果清晰结构完整, 肺泡壁薄, 无病理损伤; 模型组肺结构紊乱, 肺泡壁厚, 有炎症细胞浸润且水肿, 肺部出现明显损伤, 证明建模成功; 穿心莲内酯组相比于模型组肺泡壁相对薄, 轻微炎症细胞浸润; Nigericin 组与模型组病理损伤相似; 相比于穿心莲内酯 10 mg/kg 组, 穿心莲内酯+Nigericin 组病理损伤加重, 见图 2。



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$; 与穿心莲内酯 10 mg·kg⁻¹ 组比较: &&& $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group; &&& $P < 0.001$ vs andrographolide 10 mg·kg⁻¹ group.

图 1 各组大鼠肺指数和组织含水量变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 1 Changes of lung index and tissue water content in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

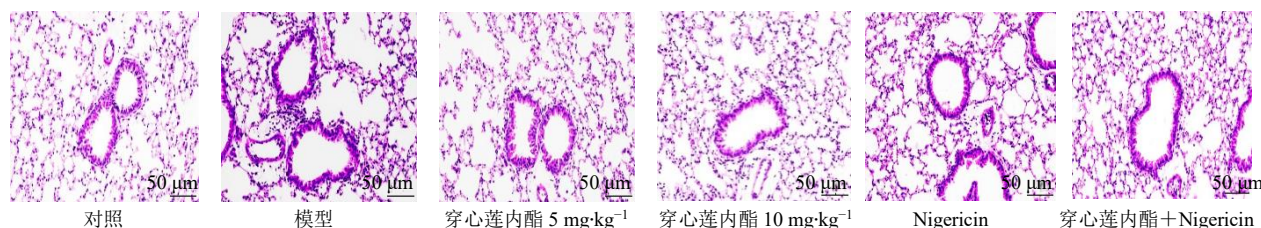


图 2 各组大鼠肺组织病理变化 ($\times 200$)

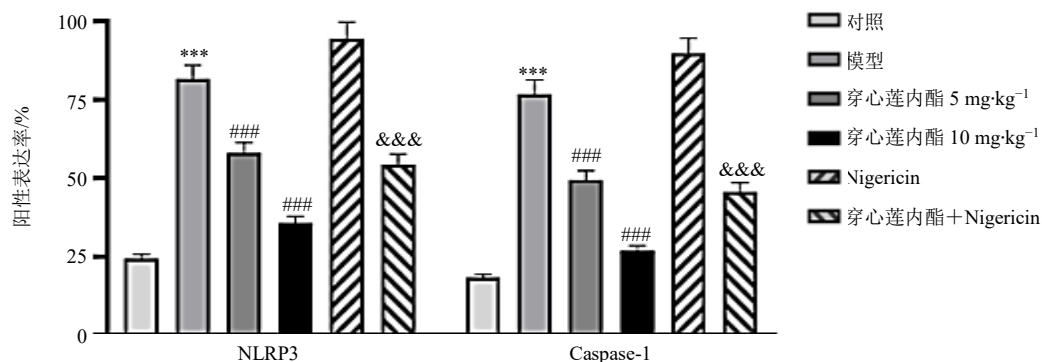
Fig. 2 Pathological changes of lung tissue in each group ($\times 200$)

2.3 穿心莲内酯对大鼠肺组织中 NLRP3、Caspase-1 阳性表达的影响

与模型组相比,穿心莲内酯(5、10 mg/kg)组 NLRP3、Caspase-1 阳性表达率显著降低 ($P < 0.001$);与穿心莲内酯 10 mg/kg 组相比,穿心莲内酯+Nigericin 组 NLRP3、Caspase-1 阳性表达率显著增加 ($P < 0.001$),见图 3、4。

2.4 穿心莲内酯对大鼠肺组织病毒载量的影响

对照组、模型组、穿心莲内酯(5、10 mg/kg)组、Nigericin 组、穿心莲内酯+Nigericin 组肺组织病毒载量分别为 0、 $(192.12 \pm 26.35) \times 10^5$ 、 $(105.42 \pm 6.89) \times 10^5$ 、 $(26.43 \pm 1.96) \times 10^5$ 、 $(187.75 \pm 24.71) \times 10^5$ 、 $(57.86 \pm 3.12) \times 10^5$ 。相比于模型组,穿心莲内酯(5、10 mg/kg)组病毒载量显著减少 ($P <$



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$; 与穿心莲内酯 10 mg·kg⁻¹ 组比较: &&& $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group; &&& $P < 0.001$ vs andrographolide 10 mg·kg⁻¹ group.

图 3 大鼠肺组织中 NLRP3、Caspase-1 阳性表达率 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 3 Positive expression rate of NLRP3 and Caspase-1 in lung tissue of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

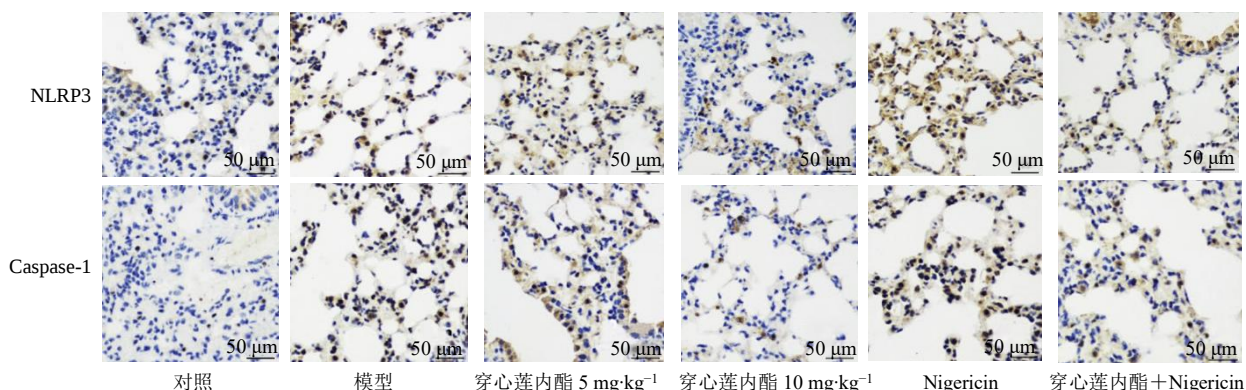


图 4 各组大鼠肺组织中 NLRP3、Caspase-1 阳性表达 (×200)

Fig. 4 NLRP3 and Caspase-1 were positively expressed in lung tissues of each group (×200)

0.001); 相比于穿心莲内酯 10 mg/kg 组, 穿心莲内酯+Nigericin 组得病毒载量显著增加 ($P < 0.05$)。

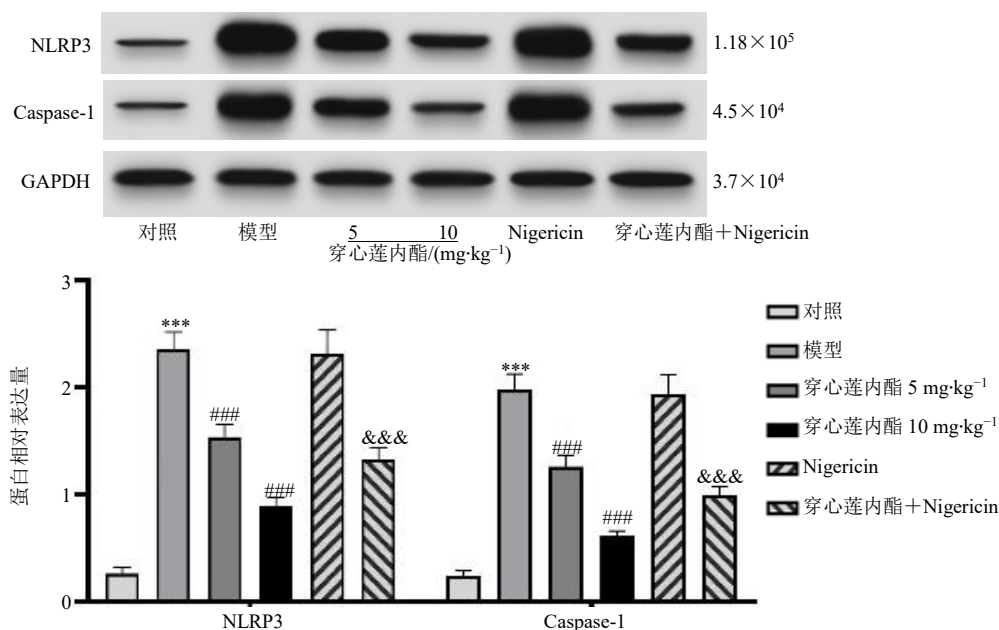
2.5 穿心莲内酯对大鼠肺组织中 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达的影响

相比于模型组, 穿心莲内酯组 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达显著减少 ($P < 0.001$); 相比于穿心莲内酯 10 mg/kg 组, 穿心莲内酯+Nigericin 组 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达显著增加 ($P <$

0.001), 见图 5。

2.6 穿心莲内酯对大鼠外周血 Th1/Th2 细胞比例的影响

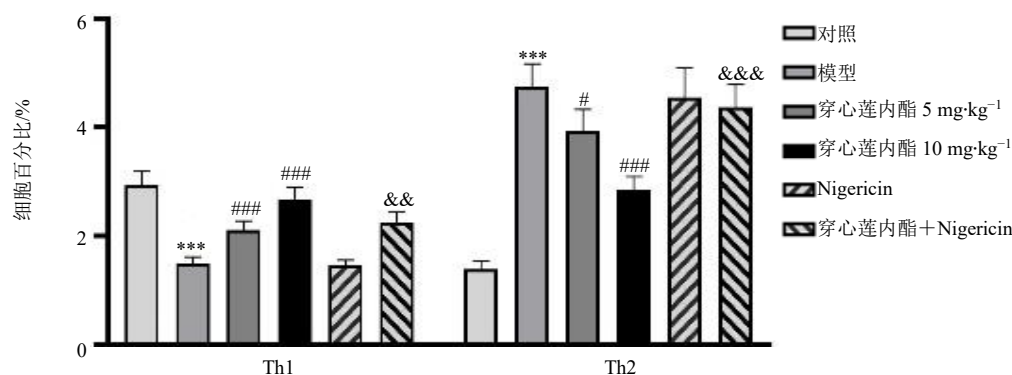
相比于模型组, 穿心莲内酯 (5、10 mg/kg) 组 Th1 细胞百分比显著增加, Th2 细胞百分比显著减少 ($P < 0.05, 0.001$); 相比于穿心莲内酯 10 mg/kg 组, 穿心莲内酯+Nigericin 组 Th1 细胞百分比显著下降, Th2 细胞百分比显著增加 ($P < 0.01, 0.001$), 见图 6。



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$; 与穿心莲内酯 10 mg·kg⁻¹ 组比较: &&& $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group; &&& $P < 0.001$ vs andrographolide 10 mg·kg⁻¹ group.

图 5 大鼠肺组织中 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 5 Expression of NLRP3 and Caspase-1 proteins in rat lung tissue ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$; 与穿心莲内酯 10 mg·kg⁻¹ 组比较: && $P < 0.01$ &&& $P < 0.001$ 。
*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs model group; && $P < 0.01$ &&& $P < 0.001$ vs andrographolide 10 mg·kg⁻¹ group.

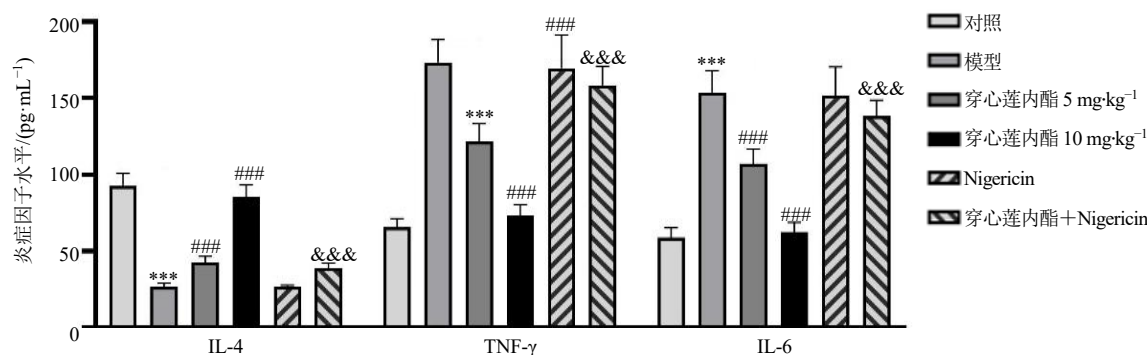
图 6 大鼠外周血 Th1/Th2 细胞比例 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 6 Th1/Th2 cell ratio in peripheral blood of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

2.7 穿心莲内酯对大鼠毛细支气管炎 BALF 中 TNF- γ 、IL-6、IL-4 的水平

相比于模型组, 穿心莲内酯 (5、10 mg/kg) 组 BALF 中 IL-4 水平显著升高, TNF- γ 、IL-6 水平显

著降低 ($P < 0.001$); 相比于穿心莲内酯 10 mg/kg 组, 穿心莲内酯+Nigericin 组 BALF 中 IL-4 水平降低, TNF- γ 、IL-6 水平显著升高 ($P < 0.001$), 结果见图 7。



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$; 与穿心莲内酯 10 mg·kg⁻¹ 组比较: &&& $P < 0.001$ 。
*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group; &&& $P < 0.001$ vs andrographolide 10 mg·kg⁻¹ group.

图 7 各组大鼠 BALF 中 TNF- γ 、IL-6、IL-4 的水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 7 Levels of TNF- γ , IL-6 and IL-4 in BALF in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3 讨论

RSV 是婴幼儿毛细支气管炎和肺炎的主要病原体, 是年轻患者哮喘的主要原因之一。既往报道显示, RSV 感染儿童和成人哮喘比例为 80%~85% 和 75%~80%^[17]。目前, 人们普遍认为毛细支气管炎和哮喘具有相似的发病机制。既往研究表明, 这 2 种疾病的 Th1/Th2 细胞比例均不平衡, 伴有呼吸道中 Th2 细胞因子水平升高和 Th1 细胞因子水平降低^[18]。Th1 细胞产生 TNF- γ 和 IL-2 等细胞因子, 通过激活 T 细胞和吞噬细胞, 诱导 Th 细胞转化为 Th1 细胞并抑制 Th2 细胞来拮抗炎症^[19]。Th2 细胞产生

细胞因子 IL-4 等, 通过促进免疫球蛋白 E (IgE) 分泌和敏化肥大细胞和嗜酸性粒细胞来诱导炎症^[20]。Th1 细胞失活和 Th2 细胞过度激活是哮喘发生的关键因素^[21]。本研究构建的毛细支气管模型中, 模型组肺结构紊乱, 肺泡壁厚, 有炎症细胞浸润且水肿, 肺部出现明显损伤; 肺指数、肺组织含水量及病毒载量增加; Th1、Th2 细胞百分含量增加, Th1/Th2 细胞比例下降; 炎症因子 IL-4 水平降低, TNF- γ 、IL-6 水平升高; 说明 RSV 滴鼻能够诱发肺损伤, 导致 Th1/Th2 细胞比例失衡, 促炎因子分泌增高, 抗炎因子分泌降低, 与上述描述基本一致, 提示构建

模型成功。虽然毛细支气管炎被认为是哮喘发展的危险因素,但只有相对一部分毛细支气管炎婴儿发展为哮喘,大多数婴儿在急性期治疗后可以治愈。因此,要积极防治毛细支气管炎,以减少哮喘的发生^[20]。

穿心莲内酯是从穿心莲中提取的有效成分,对炎症疾病的治疗有较好的效果。以往研究表明,穿心莲内酯在呼吸、消化、免疫、神经、心血管、骨骼、肿瘤等不同炎症疾病中均有抗炎作用^[22-24]。Yu 等^[25]表明,穿心莲内酯可减轻小鼠肺组织中中性粒细胞的浸润和气道重塑,抑制 Th17 相关细胞因子,进而改善卵清蛋白(OVA)诱导的哮喘。在 OVA 的实验小鼠模型中,Peng 等^[26]表明,穿心莲内酯以剂量相关性方式降低小鼠 BALF 中白细胞数量,降低炎症细胞因子 IL-4、IL-5 水平,增加 TNF- γ 水平,降低 Th2 型细胞因子水平和血清 IgE 水平。据报道,由 RSV 诱导的毛细支气管炎患者中 Th1/Th2 的值较低,表现为 IL-4/TNF- γ 减少^[6]。本研究结果与既往研究一致,模型大鼠外周血 Th1 细胞百分含量及 BALF 中 IL-4 水平下降,Th2 细胞百分含量、TNF- γ 、IL-6 水平升高。穿心莲内酯处理之后,IL-4 水平升高,TNF- γ 、IL-6 降低;肺指数、肺组织含水量及病毒载量减少;肺部损伤得到改善,肺泡壁相对薄,轻微炎症细胞浸润,且穿心莲内酯 10 mg/kg 的效果更好,说明在一定剂量范围内,穿心莲内酯的治疗效果随剂量增高而增加;提示穿心莲内酯能改善 RSV 感染的毛细支气管炎大鼠炎症反应。

炎症小体是先天免疫系统的重要组成部分,可以识别细胞应激和感染。炎症小体根据不同的感应蛋白命名,主要有 4 种类型:NLRP1、NLRP3、NLRC4 和 AIM212。其中,NLRP3 炎症小体在 RNA 病毒感染中具有重要功能^[27]。NLRP3 炎症小体由传感器蛋白(NLRP3)、接头蛋白[细胞凋亡相关斑点样蛋白,含有半胱天冬酶募集结构域(ASC)]和效应蛋白(Caspase-1)组成。在 NLRP3 炎症小体激活过程中,NLRP3 PYD 与 ASC PYD 相互作用,释放过量的 IL-1 β 通过激活各种信号通路来刺激全身炎症反应,释放大量的炎症因子;NLRP3/Caspase-1 信号途径对炎症反应起着重要作用。研究表明,抑制 NLRP3/Caspase-1 通路能改善 PM 2.5 诱导的肺炎炎症损伤和氧化损伤、炎症反应和 BALF 中的炎症细胞数量,促进细胞活力和减少炎症因子分泌^[28-29]。Kim 等^[10]表明,YG-1 提取物具有支气管扩张等作

用,在急性支气管和肺炎动物模型中,能抑制 NLRP3/Caspase-1 通路,减轻急性支气管炎,改善肺部炎症损伤。本研究表明,穿心莲内酯处理后,NLRP3、Caspase-1 的蛋白表达和阳性表达率降低,促炎因子 TNF- γ 、IL-6 表达降低,抗炎因子 IL-4 表达升高,施加通路激活剂能逆转 NLRP3、Caspase-1、TNF- γ 、IL-6、IL-4 表达,提示穿心莲内酯能抑制 NLRP3/Caspase-1 通路,改善毛细支气管炎大鼠炎症反应。

综上所述,穿心莲内酯可能通过抑制 NLRP3/Caspase-1 通路,抑制 RSV 感染毛细支气管炎大鼠炎症反应。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ghazaly M M H, Abu Faddan N H, Raafat D M, *et al.* Acute viral bronchiolitis as a cause of pediatric acute respiratory distress syndrome [J]. *Eur J Pediatr*, 2021, 180(4): 1229-1234.
- [2] Jartti T, Smits H H, Bønnelykke K, *et al.* Bronchiolitis needs a revisit: Distinguishing between virus entities and their treatments [J]. *Allergy*, 2019, 74(1): 40-52.
- [3] Yu L C, Liu Y, Cao C, *et al.* Andrographolide attenuates inflammation due to intra-abdominal sepsis by enhancing bacterial clearance in mice [J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16: 4413-4423.
- [4] Li Z, Li Z H, Chen Z Y, *et al.* Andrographolide contributes to spinal cord injury repair via inhibition of apoptosis, oxidative stress and inflammation [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 949502.
- [5] Cui J, Gao J, Li Y, *et al.* Andrographolide sulfate inhibited NF- κ B activation and alleviated pneumonia induced by poly I: C in mice [J]. *J Pharmacol Sci*, 2020, 144(4): 189-196.
- [6] Bush A. Cytokines and chemokines as biomarkers of future asthma [J]. *Front Pediatr*, 2019, 7: 72.
- [7] 王刚, 孙丹丹, 耿子凯, 等. 穿心莲抗病毒作用研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(7): 108-111.
- [8] Che S Y, Zhou N, Liu Y, *et al.* Andrographolide exerts anti-respiratory syncytial virus activity by up-regulating heme oxygenase-1 independent of interferon responses in human airway epithelial cells [J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(5): 4261-4272.
- [9] Liang H M, Wang B, Wang J W, *et al.* Pyolysin of *Trueperella pyogenes* induces pyroptosis and il-1 β release in murine macrophages through potassium/NLRP3/Caspase-1/Gasdermin D pathway [J]. *Front Immunol*,

- 2022, 13: 832458.
- [10] Kim H Y, Yoon J J, Kim D S, *et al.* YG-1 extract improves acute pulmonary inflammation by inducing bronchodilation and inhibiting inflammatory cytokines [J]. *Nutrients*, 2021, 13(10): 3414.
- [11] 司永华, 刘丽颖, 刘宝环, 等. 硫酸镁雾化吸入辅助治疗对重症毛细支气管炎患儿气道阻力、肺功能及炎症因子的影响 [J]. 河北医科大学学报, 2023, 44(1): 86-90.
- [12] 王海英, 刘良宵, 吴福玲, 等. γ -促分泌酶抑制剂阻断 Notch 信号通路对毛细支气管炎模型大鼠气道炎症的影响 [J]. 现代免疫学, 2017, 37(4): 308-312.
- [13] 胡亚静, 鹿璨, 张艳娣, 等. 蛇床子素调控 JAK2/STAT3 通路对毛细支气管炎模型小鼠 Th1/Th2 失衡的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(8): 801-806.
- [14] 史洋洋, 秦英飞, 吴福玲, 等. 胎盘间充质干细胞预处理预防小鼠毛细支气管炎 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(7): 991-995.
- [15] Peng S, Hang N, Liu W, *et al.* Andrographolide sulfonate ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by down-regulating MAPK and NF- κ B pathways [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2016, 6(3): 205-211.
- [16] 谢小芳, 赵展庆, 符妹垂. 丁香苷调节 NLRP3/Caspase-1 信号通路对脓毒症肺损伤大鼠细胞焦亡的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2023, 58(19): 1744-1751.
- [17] Kwon J H, Paek S H, Park S H, *et al.* COVID-19, influenza, and RSV in children and adults: A clinical comparative study of 12,000 cases [J]. *J Clin Med*, 2024, 13(6): 1702.
- [18] Yuan X H, Li Y M, Shen Y Y, *et al.* Clinical and Th1/Th2 immune response features of hospitalized children with human rhinovirus infection [J]. *J Med Virol*, 2020, 92(1): 26-33.
- [19] Men S, Yu Y Y, Zhang Y H, *et al.* Methylation landscape of RUNX3 promoter region as a predictive marker for Th1/Th2 imbalance in bronchiolitis [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 7795-7807.
- [20] Iwaszko M, Biały S, Bogunia-Kubik K. Significance of interleukin (IL)-4 and IL-13 in inflammatory arthritis [J]. *Cells*, 2021, 10(11): 3000.
- [21] Luo W H, Hu J D, Xu W F, *et al.* Distinct spatial and temporal roles for Th1, Th2, and Th17 cells in asthma [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 974066.
- [22] 徐建英, 赵波, 张娟, 等. TIMP-1 和 IL-33 水平与儿童 RSV 感染毛细支气管炎病情严重程度及预后的关系 [J]. 热带医学杂志, 2022, 22(9): 1231-1234.
- [23] Vinoda V, Md Z, Shekharc V, *et al.* Role of semi-purified andrographolide from *Andrographis paniculata* extract as nano-phytovesicular carrier for enhancing oral absorption and hypoglycemic activity [J]. *Chin Herb Med*, 2020, 12(2): 142-155.
- [24] 安丽丽, 孙贺军, 孔永红, 等. 具有线粒体靶向功能的穿心莲内酯 TPP-PEG-PE 脂质体的制备及其作用于胃癌模型小鼠的机制研究 [J]. 中草药, 2021, 52(7): 1945-1956.
- [25] Yu Q, Shi Y J, Shu C, *et al.* Andrographolide inhibition of Th17-regulated cytokines and JAK1/STAT3 signaling in OVA-stimulated asthma in mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 29: 6862073.
- [26] 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.
- [27] Pan P, Zhang Q, Liu W Y, *et al.* Dengue virus M protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce vascular leakage in mice [J]. *J Virol*, 2019, 93(21): e00996-e00919.
- [28] Jia H, Liu Y, Guo D, *et al.* PM2.5-induced pulmonary inflammation via activating of the NLRP3/caspase-1 signaling pathway [J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36(3): 298-307.
- [29] Huang D M, Shi S H, Wang Y L, *et al.* Astragaloside IV alleviates PM2.5-caused lung toxicity by inhibiting inflammasome-mediated pyroptosis via NLRP3/caspase-1 axis inhibition in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 150: 112978.

[责任编辑 高源]