

汉防己甲素对多壁碳纳米管联合脂多糖诱导小鼠肺结节病的保护作用

李 晗¹, 刘肖芸¹, 陈腾飞¹, 宋 玲¹, 高云航¹, 曹 科², 叶宇飞², 张广平^{1*}, 霍 旺^{2*}

1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100029

2. 解放军总医院第六医学中心 中医医学部, 北京 100048

摘要: **目的** 探讨汉防己甲素对多壁碳纳米管联合脂多糖诱导的小鼠肺结节病模型的保护作用及机制。**方法** 将 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组、汉防己甲素 (19.5、39.0、78.0 mg/kg) 组, 每组 10 只。采用苏木精-伊红染色观察肺组织病理形态, 免疫组化检测 CD3⁺T 淋巴细胞和 F4/80⁺巨噬细胞浸润, BCA 法检测支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中总蛋白含量, 显色法检测乳酸脱氢酶 (LDH) 活性, 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法检测 BALF 中白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ) 含量及血清中可溶性细胞间黏附分子-1 (sICAM-1)、可溶性血管细胞黏附分子-1 (sVCAM-1)、骨桥蛋白 (OPN) 水平, Western blotting 检测肺组织中 E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、N-钙黏蛋白 (N-cadherin)、ICAM-1、VCAM-1 蛋白表达。**结果** 与模型组相比, 汉防己甲素 78.0 mg/kg 组肺组织肉芽肿数量、肉芽肿面积占比、肺损伤评分显著降低 ($P < 0.05$); 汉防己甲素 39.0、78.0 mg/kg 组肺组织中 CD3⁺阳性面积百分比、F4/80 阳性面积百分比均显著下降 ($P < 0.01$ 、 0.001)。与模型组相比, 汉防己甲素各剂量组 sICAM-1 含量及 N-cadherin、VCAM-1 蛋白表达显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。与模型组相比, 汉防己甲素 39.0、78.0 mg/kg 组小鼠 BALF 中总蛋白、TNF- α 含量及血清 sVCAM-1、OPN 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 汉防己甲素 78.0 mg/kg 组小鼠 BALF 中 LDH、IL-1 β 、IL-6 含量及 ICAM-1 表达蛋白表达显著降低, E-cadherin 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。肺组织黏附分子表达水平与 CD3⁺T 细胞及 F4/80⁺巨噬细胞浸润程度呈正相关。**结论** 汉防己甲素对多壁碳纳米管联合脂多糖诱导的小鼠肺结节病具有明确保护作用, 其保护作用可能与下调 ICAM-1、VCAM-1 等黏附分子表达、抑制炎症细胞浸润及减轻局部炎症反应相关。

关键词: 汉防己甲素; 肺结节病; 多壁碳纳米管; 脂多糖; 可溶性细胞间黏附分子-1; 可溶性血管细胞黏附分子-1; 骨桥蛋白

中图分类号: R286.4

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2026)09-2476-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.09.002

Protective effect of tetrandrine on pulmonary sarcoidosis induced by multi-walled carbon nanotubes combined with lipopolysaccharide in mice

LI Han¹, LIU Xiaoyun¹, CHEN Tengfei¹, SONG Ling¹, GAO Yunhang¹, CAO Ke², YE Yufei², ZHANG Guangping¹, HUO Wang²

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

2. Department of Traditional Chinese Medicine, The Sixth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect and mechanism of tetrandrine on a mouse model of pulmonary sarcoidosis induced by multi-walled carbon nanotubes combined with lipopolysaccharide. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group, and tetrandrine (19.5, 39.0, and 78.0 mg/kg) groups, with 10 mice in each group. HE staining was used to observe the pathological morphology of lung tissue; immunohistochemistry was used to detect CD3⁺T lymphocyte and F4/80⁺ macrophage infiltration, BCA assay was used to detect total protein content in BALF, colorimetric assay was used to detect LDH activity, ELISA was used to detect the levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and IFN- γ in BALF, as well as serum levels of sICAM-1, sVCAM-

收稿日期: 2026-06-19

基金项目: 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2026A04618); 解放军总医院第六医学中心创新培育基金资助项目 (CXPY202406); 中国中医科学院中药研究所中央级公益性科研院所基本业务费专项资金资助 (ZXKT22045, ZXKT25006); 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: 李 晗, 副研究员, 硕士生导师, 博士, 研究方向为中药药理。E-mail: hli1989@icmm.ac.cn

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

霍 旺, 副主任医师, 硕士, 研究方向为中西医结合临床。E-mail: huowang1987@126.com

1, and OPN. Western blotting was used to detect the protein expression of N-cadherin, E-cadherin, ICAM-1, and VCAM-1 in lung tissue. **Results** Compared with the model group, the number of granulomas, the proportion of granuloma area, and the lung injury score in the tetrandrine 78.0 mg/kg group were significantly reduced ($P < 0.05$). Percentages of CD3⁺ positive area and F4/80 positive area in the lung tissue in the tetrandrine 39.0 and 78.0 mg/kg groups were significantly decreased ($P < 0.01, 0.001$). Compared with the model group, the contents of sICAM-1 and the protein expressions of N-cadherin and VCAM-1 in each dose group of tetrandrine were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Compared with the model group, the total protein, TNF- α content in BALF and the levels of sVCAM-1 and OPN in serum in the tetrandrine 39.0 and 78.0 mg/kg groups were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The contents of LDH, IL-1 β , IL-6 in BALF, and the protein expression of ICAM-1 in the tetrandrine 78.0 mg/kg group were significantly decreased, while the protein expression of E-cadherin was significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). The expression levels of adhesion molecules in lung tissue were positively correlated with the infiltration degree of CD3⁺ T cells and F4/80⁺ macrophages. **Conclusion** Tetrandrine exerts a definite protective effect against multi-walled carbon nanotubes combined with lipopolysaccharide-induced pulmonary sarcoidosis in mice, which may be associated with downregulating the expression of adhesion molecules such as ICAM-1 and VCAM-1, inhibiting inflammatory cell infiltration, and alleviating local inflammatory responses.

Key words: tetrandrine; pulmonary sarcoidosis; multi-walled carbon nanotubes; lipopolysaccharide; sICAM-1; sVCAM-1; OPN

肺结节病是一种病因未明的系统性肉芽肿性疾病,以非干酪样坏死性上皮样细胞肉芽肿为特征性病理改变,好发于 30~60 岁人群,且女性患病风险更高^[1-2]。该病虽可累及全身任何器官,但 90% 以上患者以肺部及胸腔淋巴结受累为主,临床多表现为双肺门淋巴结对称性肿大伴肺实质浸润^[3]。患者呼吸道症状以咳嗽、咳痰、胸闷及气短为主,然起病隐匿,表现多不典型,部分仅于体检时偶然发现肺门淋巴结肿大而肺功能正常。本病预后异质性显著,病程逾 5 年者自愈率显著降低,25%~40% 转为慢性迁延或进展恶化^[4]。持续肉芽肿性炎症可触发肺间质重构,继发肺纤维化、肺动脉高压,终末期出现呼吸衰竭^[5-6]。当前肺结节病发病机制尚未完全阐明,因此深入探究肺结节病发病机制并寻找有效干预策略,对阻断肺纤维化进展、改善预后、减轻公共卫生负担具有重要意义。

目前肺结节病的现代医学治疗以糖皮质激素为一线用药,虽短期疗效确切,但长期应用不良反应突出、停药易复发^[7-8],且免疫抑制剂、生物制剂及抗纤维化药物存在起效缓慢、感染风险高或缺乏循证证据等局限^[9],外科手术无法改善易患体质且仍存在肉芽肿复发风险^[10]。中医将肺结节病归为“肺积”“痰核”范畴,认为其属本虚标实、痰瘀毒结于肺络所致,治当攻补兼施^[11]。粉防己性味苦寒,归肺、膀胱经,具祛风止痛、利水消肿之效,其主要活性成分汉防己甲素具有抗炎、治疗矽肺等多重作用^[12-13]。从作用机制看,汉防己甲素作为双苄基异喹啉类生物碱,具有钙通道阻滞作用,可抑制巨噬细胞和 T 淋巴细胞的活化与浸润,并下调细

胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 等黏附分子表达^[14];而巨噬细胞、T 淋巴细胞异常募集及黏附分子介导的炎症细胞跨内皮迁移正是肺结节病肉芽肿形成的核心环节,二者在机制上高度契合。此外,本课题组前期研究已证实汉防己甲素可通过抑制黏附分子的表达来减轻肺部炎症与纤维化反应^[15-16],但其对肺结节病的干预效果尚未阐明,故本研究拟进一步探讨汉防己甲素对肺结节病模型小鼠的保护作用及可能的作用途径。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,50 只,6~8 周龄,体质量 18~22 g,购于北京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。小鼠饲养于中国中医科学院中药研究所 SPF 级动物房,饲养条件为 12 h 明暗交替,温度 (23 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$,湿度 (50 $\pm$ 15) %,自由饮水及进食。实验方案经中国中医科学院中药研究所医学伦理委员会审核批准,实验动物伦理审查编号为 2024B027。

1.2 药品与试剂

脂多糖 (Sigma-Aldrich 上海公司,批号 0000135218);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,批号 PH2110001A);多壁碳纳米管 (上海源叶生物科技有限公司,批号 S33198);阿佛丁 (Sigma-Aldrich 上海公司,批号 T48402);多聚甲醛 (北京索莱宝科技有限公司,批号 20250613);伊红与苏木精染色液 (北京柏赛生物科技有限公司,批号 H9627-100G);乳酸脱氢酶

(LDH) 细胞毒性检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司, 批号 20251126); 白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ 干扰素 (IFN- γ)、骨桥蛋白(OPN)、sICAM-1、可溶性血管细胞黏附分子-1 (sVCAM-1) 酶联免疫吸附试验(ELISA) 试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司(批号 20251017、20251021、20250918、20250630、20251104、20251106、20251117); β -肌动蛋白(β -actin)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、ICAM-1、VCAM-1 一抗均来自上海碧云天生物技术股份有限公司(批号 A422261603、Z872260526、A424260505、A365260031、A175262613); HRP 标记山羊抗兔 IgG (H+L) 二抗购自北京索莱宝科技有限公司(批号 20250423); 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器

DH3600 型恒温培养箱(天津泰斯特仪器有限公司); Finesse 325 型石蜡切片机及全自动染色机(美国 Thermo 公司); VIP-6 型全自动组织脱水机(日本樱花公司); KD-BM 型包埋机(科迪仪器设备有限公司); MP Fastprep-24 型快速匀浆仪(美国 MP Biomedicals 公司); Centrifuge 5810R 型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); Nikon Ci-S 型倒置显微镜(日本尼康公司); SpectraMax i3x 型多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); Mini-PROTEAN Tetra 型电泳系统及配套转膜仪(美国 Bio-Rad 公司); Amersham Imager 600 型化学发光成像分析仪(美国 GE Healthcare 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

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、汉防己甲素(19.5、39.0、78.0 mg/kg) 组, 每组 10 只。将多壁碳纳米管(5.3 mg/mL) 与脂多糖(3.3 mg/mL) 共混于生理盐水中, 配制成混合悬液。除对照组外, 其余各组小鼠按 1.5 μ L/g 体质量气管滴注混合悬液, 每 7 天 1 次, 共 4 次^[17]。自造模之日起, 给药组小鼠根据汉防己甲素治疗矽肺的最大剂量 300 mg 进行体表面积换算, 确定小鼠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) 作为低、高剂量。汉防己甲素各剂量组每日 ig 给予对应药物溶液 1 次, 对照组与模型组则 ig 等体积 0.9% 氯化钠溶液, 所有组别均

连续干预 28 d。

2.2 标本采集

末次给药 24 h 后, 小鼠经 ip 1.2% 阿佛丁(16 mL/kg) 实施麻醉。固定动物后, 沿颈前正中剪开皮肤, 逐层分离以充分暴露气管, 行气管插管并注入预冷 0.9% 氯化钠溶液 0.5 mL 进行肺泡灌洗, 如此重复 3 次, 灌洗液收集于离心管内, 各组支气管肺泡灌洗液(BALF) 回收率均高于 85%。所获 BALF 经 1 500 r/min 离心 5 min (离心半径 10 cm), 吸取 0.5 mL 上清液, 待测炎性细胞因子水平。此后经腹主动脉取血约 1 mL, 以 3 000 r/min 离心 10 min (离心半径 10 cm), 分离血清 100 μ L 并置于 -80 $^{\circ}$ C 条件下冻存。采血结束后完整取出小鼠双肺, 其中右肺浸入 4% 多聚甲醛溶液中固定, 左肺则于 -80 $^{\circ}$ C 冻存待用。

2.3 小鼠肺组织病理学观察

取 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h 小鼠右肺组织, 常规梯度脱水后行石蜡包埋, 连续切片(厚度 4 μ m), 采用苏木精-伊红(HE) 法染色, 光学显微镜下观察肺组织病理形态学改变, 参照 Szapiel 等的方法^[18], 根据上皮增生、肺泡炎、水肿和炎性细胞浸润程度进行半定量分级评估肺损伤; 采用 Image J 软件定量分析肉芽肿密度。每只小鼠取 5~10 个非重叠视野($\times 200$), 以比例尺标定后勾画肺实质面积 A (mm^2), 计数符合判定标准(边界清楚、上皮样/巨噬细胞聚集、直径 ≥ 50 μ m) 的肉芽肿数 N , 计算肉芽肿密度 = N/A ; 评估肉芽肿面积占比, 于相同视野下, 用 Image J 多边形选区工具圈出肉芽肿轮廓, 测量获得各肉芽肿面积并求和 (S_g), 另勾画同一视野内全部肺实质区域, 测量获得肺组织总面积 (S_t)。计算肉芽肿面积占比 (S_g/S_t)。

2.4 小鼠肺组织 CD3⁺和 F4/80 蛋白表达测定

石蜡切片常规脱蜡至水后, 行抗原修复处理, 后续步骤按免疫组化试剂盒说明书进行。分别滴加 CD3⁺ 抗体(稀释度 1:200) 与 F4/80 一抗(稀释度 1:400), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 次日以磷酸盐缓冲液充分漂洗, 滴加对应的酶标二抗, 室温条件下反应 1 h; 漂洗后采用 3,3'-二氨基联苯胺(DAB) 显色, 苏木精复染细胞核, 中性树脂封固。最后在光学显微镜下观察肺组织内 CD3⁺ 及 F4/80 蛋白的阳性表达并拍照记录。

2.5 小鼠 BALF 中总蛋白和 LDH 活性的测定

吸取 BALF 上清液与 LDH 检测试剂共置于 EP

管中,充分振荡混匀,37℃避光条件下孵育 30 min,终止反应后将混合液转移至 96 孔板内,使用酶标仪检测 490 nm 波长处的吸光度(A)值,并根据根据标准曲线计算样本浓度。BALF 总蛋白含量采用 BCA 法测定:分别将 20 μ L 样品与系列浓度牛血清白蛋白标准品(0~2 000 μ g/mL)点样于 96 孔板,每孔加入新鲜配制 BCA 工作液 200 μ L,振荡混匀 30 s,于 37℃避光孵育 30 min,测定 562 nm 波长处吸光度(A)值,根据标准曲线计算总蛋白含量。

2.6 BALF 中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 含量的测定

BALF 上清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 含量采用小鼠 ELISA 试剂盒进行检测,具体操作参照试剂盒说明书。

2.7 血清 sICAM-1、sVCAM-1、OPN 水平的测定

血清 sICAM-1、sVCAM-1、OPN 水平采用 ELISA 试剂盒测定,具体操作参照试剂盒说明书。

2.8 Western blotting 法检测肺组织中 N-cadherin、E-cadherin、VCAM-1、ICAM-1 蛋白表达水平

取左肺组织剪碎,精密称取 100 mg 置于研磨管内,加入 1.0 mL 含 1%蛋白酶抑制剂的预冷裂解液,冰浴匀浆,4℃、12 000 r/min 离心 10 min(离心半径 10 cm),留取上清冰浴待测。取 50 μ g 蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后电转移至 PVDF 膜,室温下以 5%脱脂奶粉封闭 1 h;随后分别加入 ICAM-1、VCAM-1、E-cadherin、N-cadherin 一抗(稀释比例均为 1:1 000)及内参 β -actin 一抗(1:2 000),置 4℃摇床孵育过夜。次日洗膜 3 次、每次 5 min,加入 HRP 标记二抗(1:2 000)室温孵育 1 h,洗涤后经 ECL 显色液显色,于成像系统中采集条带图像,并采用 Image J 软件分析各目标条带灰度值。

2.9 肺组织黏附分子表达与 CD3 $^{+}$ T 淋巴细胞及 F4/80 $^{+}$ 巨噬细胞浸润的相关性分析

以每只小鼠为独立样本,将肺组织 ICAM-1、VCAM-1 蛋白相对表达量分别与对应个体的 CD3 $^{+}$

T 细胞、F4/80 $^{+}$ 巨噬细胞阳性面积百分比进行 Spearman 相关分析,计算相关系数。

2.10 统计方法

统计学分析采用 SPSS Statistics 27 软件完成。计量资料经正态性检验及方差齐性检验后,以 $\bar{x} \pm s$ 形式呈现;多组间比较采用单因素方差分析,若方差齐则组间两两比较采用 LSD 法,若方差不齐,则采用 Welch 方差分析。肺组织病理评分等级资料以中位数(P_{25} , P_{75})及平均秩次表示,多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验,组间两两比较采用 Dunn 检验,并以 Bonferroni 法校正检验水准。

3 结果

3.1 汉防己甲素对肺结节病模型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。模型组小鼠肺中可见多个肉芽肿灶,表现为巨噬细胞或上皮样细胞的高度聚集;且伴有大量黄褐色的色素沉积,色素高度聚集成团块状;该视野下肺泡的细胞成分也明显增多,表现为肺泡壁中性粒细胞、单核细胞的浸润。汉防己甲素各剂量组可见轻微多灶性色素沉着和肉芽肿,部分肺组织小鼠可见轻微弥漫性肺泡细胞成分增多,其中汉防己甲素 78.0 mg/kg 组整体情况优于其余各组,见图 1。定量分析显示,与模型组相比,汉防己甲素 78.0 mg/kg 组肺组织肉芽肿数量、肉芽肿面积占比、肺损伤评分均显著降低($P<0.05$),见图 2。

3.2 汉防己甲素对肺结节病模型小鼠 CD3 $^{+}$ 蛋白表达的影响

对照组小鼠肺组织中可见少量 CD3 $^{+}$ T 细胞散在分布;模型组肺组织内 CD3 $^{+}$ T 细胞浸润明显增多,阳性细胞呈灶状聚集于肉芽肿区域,CD3 $^{+}$ 阳性面积百分比显著升高($P<0.001$)。汉防己甲素 39.0、78.0 mg/kg 组干预后,CD3 $^{+}$ 阳性面积百分比显著下

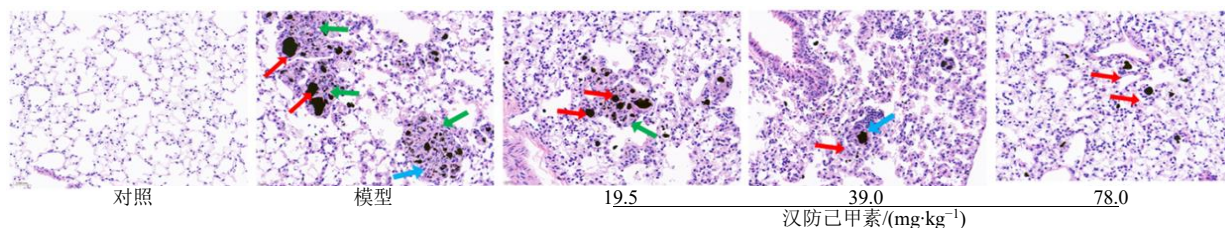
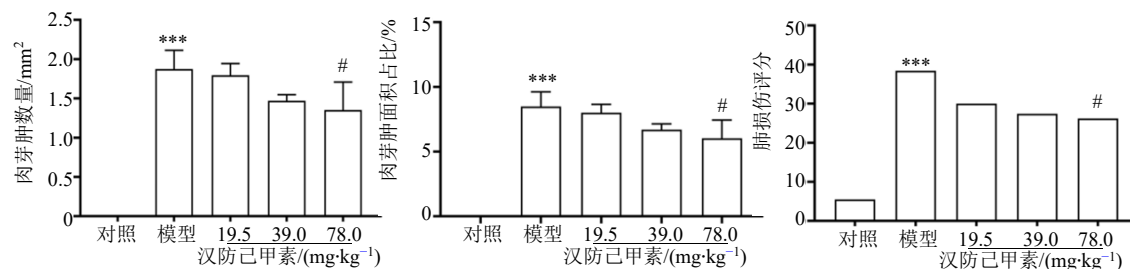


图 1 汉防己甲素对肺结节病模型小鼠肺组织病理的影响($\times 200$)

Fig. 1 Effect of tetrandrine on lung tissue pathology in a mouse model of pulmonary sarcoidosis ($\times 200$)



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

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

图 2 汉防己甲素对肺结节病模型小鼠肺组织肉芽肿数量、肉芽肿面积占比、肺损伤评分 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 2 Effect of tetrandrine on lung tissue granuloma number, proportion of granuloma area, lung injury score in a mouse model of pulmonary sarcoidosis ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

降 ($P < 0.001$), 见图 3。

3.3 汉防己甲素对肺结节病模型小鼠 F4/80 蛋白表达的影响

对照组小鼠肺组织中可见少量 F4/80 巨噬细胞散在分布。模型组肺组织内 F4/80 巨噬细胞浸润显著增多, 阳性细胞聚集成团, 胞质着色明显加深。汉防己甲素 39.0、78.0 mg/kg 组干预后, F4/80 阳性面积显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 见图 4。

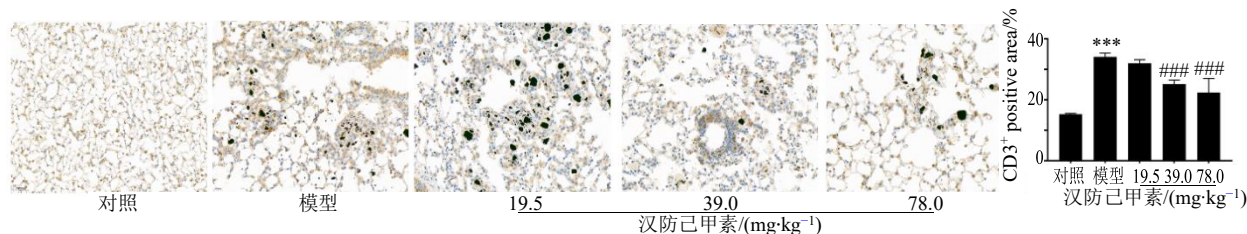
3.4 汉防己甲素对肺结节病模型小鼠炎症指标的影响

与模型组相比, 汉防己甲素 39.0、78.0 mg/kg 组

小鼠 BALF 中总蛋白、TNF- α 含量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 汉防己甲素 78.0 mg/kg 组小鼠 BALF 中 LDH、IL-1 β 、IL-6 含量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见图 5。

3.5 汉防己甲素对肺结节病模型小鼠细胞黏附分子的影响

与模型组相比, 汉防己甲素各剂量组 sICAM-1 含量均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 汉防己甲素 39.0、78.0 mg/kg 组的 sVCAM-1、OPN 含量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见图 6。

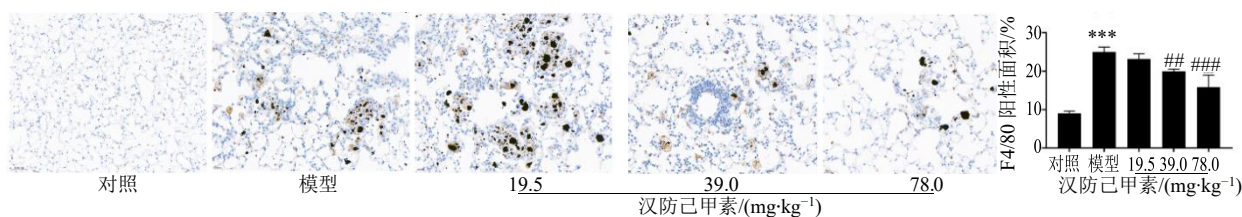


与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$ 。

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

图 3 汉防己甲素对肺结节病模型小鼠 CD3⁺ 蛋白表达的影响 ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 3 Effect of tetrandrine on CD3⁺ protein expression in lung tissue in a mouse model of pulmonary sarcoidosis ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

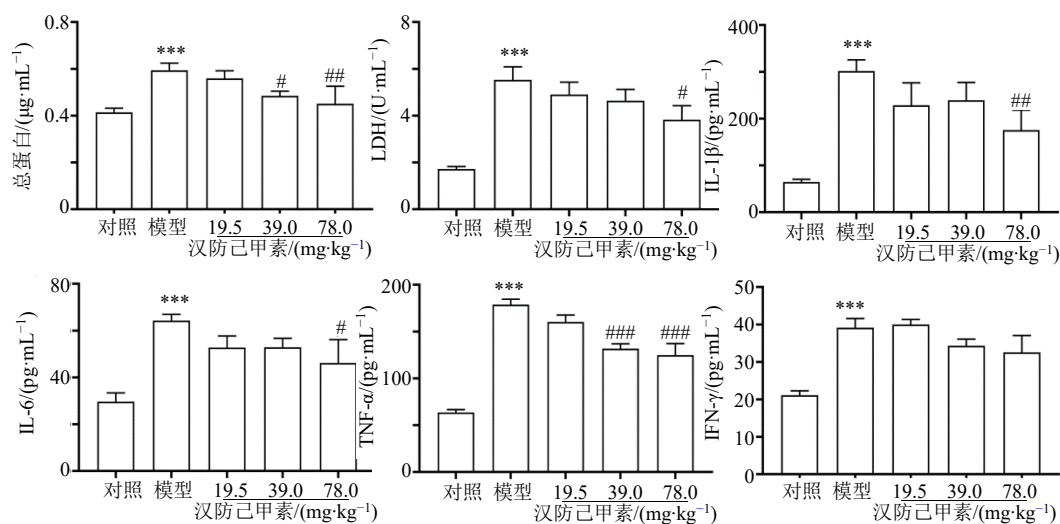


与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

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

图 4 汉防己甲素对肺结节病模型小鼠 F4/80 蛋白表达的影响 ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

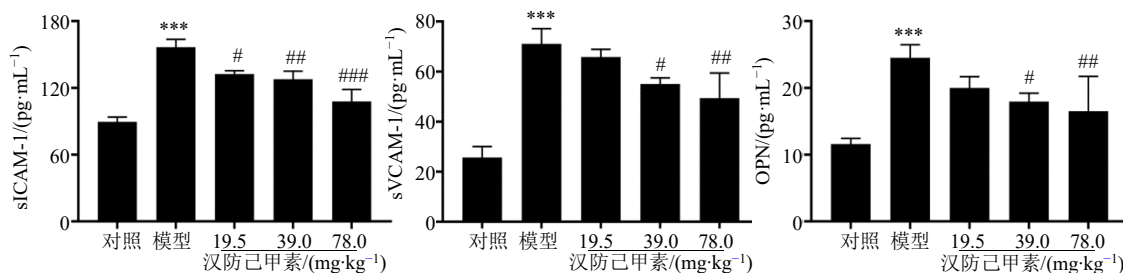
Fig. 4 Effect of tetrandrine on F4/80 protein expression in lung tissue in a mouse model of pulmonary sarcoidosis ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)



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 5 汉防己甲素对肺结节病模型小鼠 BALF 中总蛋白、LDH、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Fig. 5 Effect of tetrandrine on the contents of total protein, LDH, IL-1 β , IL-6, TNF- α , and IFN- γ in BALF in a mouse model of pulmonary sarcoidosis ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)



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 6 汉防己甲素对肺结节病模型小鼠血清中 sICAM-1、sVCAM-1、OPN 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 6 Effect of tetrandrine on the levels of sICAM-1, sVCAM-1, and OPN in serum in a mouse model of pulmonary sarcoidosis ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.6 汉防己甲素对肺结节病模型小鼠 N-cadherin、E-cadherin、VCAM-1、ICAM-1 蛋白表达的影响

与模型组相比, 汉防己甲素各剂量组 N-cadherin、VCAM-1 蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$ 、 0.001); 汉防己甲素 78.0 mg/kg 组 E-cadherin 蛋白表达显著升高, ICAM-1 表达显著降低 ($P < 0.05$), 见图 7。

3.7 肺组织黏附分子表达与 CD3⁺ T 淋巴细胞及 F4/80⁺巨噬细胞浸润的相关性分析

Spearman 相关分析结果显示, 肺组织 VCAM-1 蛋白相对表达量与 CD3⁺ T 细胞阳性面积百分比呈显著正相关 (相关系数=0.762, $P < 0.001$), 与 F4/80⁺巨噬细胞阳性面积百分比呈显著正相关 (相

关系数=0.791, $P < 0.001$); ICAM-1 蛋白相对表达量与 CD3⁺ T 细胞阳性面积百分比呈显著正相关 (相关系数=0.764, $P < 0.001$), 与 F4/80⁺巨噬细胞阳性面积百分比呈显著正相关 (相关系数=0.739, $P < 0.001$)。上述结果表明, 肺组织黏附分子表达水平与 CD3⁺ T 细胞及 F4/80⁺巨噬细胞浸润程度密切相关, 见图 8。

4 讨论

肺结节病起病隐匿、进程缓慢, 多数患者无明显临床症状, 常于体检时偶然发现^[19]。有症状者以咳嗽、活动后呼吸困难为主要表现, 可伴乏力、体质下降等全身症状^[20]。从病理本质而言, 肺结节病以非干酪样坏死性上皮样细胞肉芽肿为特征性

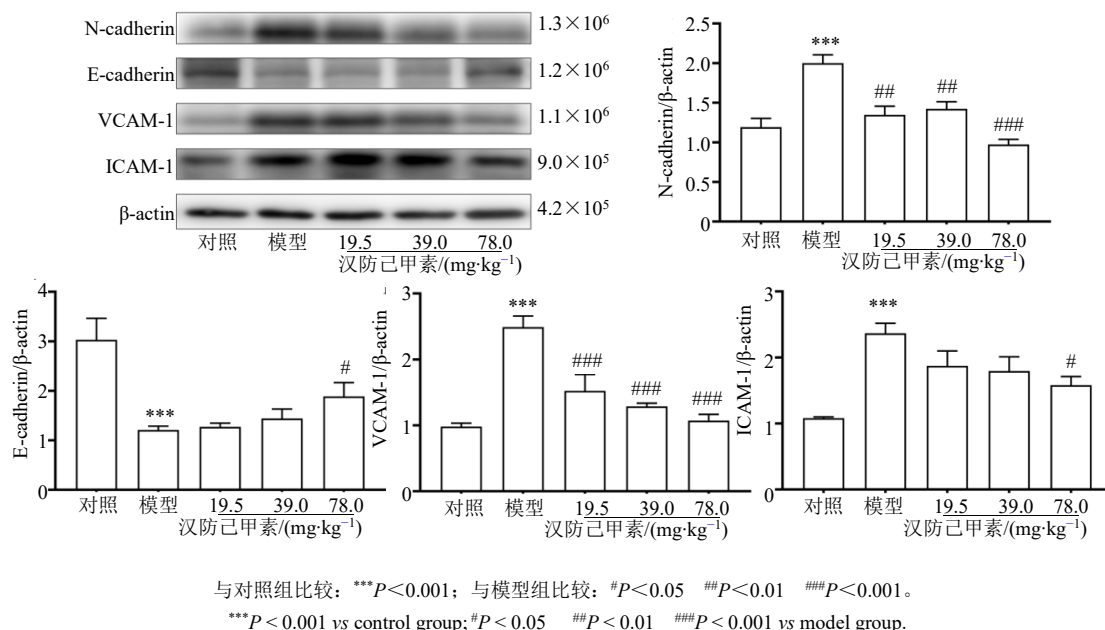


图 7 汉防己甲素对肺结节病模型小鼠肺组织中 N-cadherin、E-cadherin、VCAM-1、ICAM-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 7 Effect of tetrandrine on the protein expression of N-cadherin, E-cadherin, VCAM-1, and ICAM-1 in lung tissue in a mouse model of pulmonary sarcoidosis ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

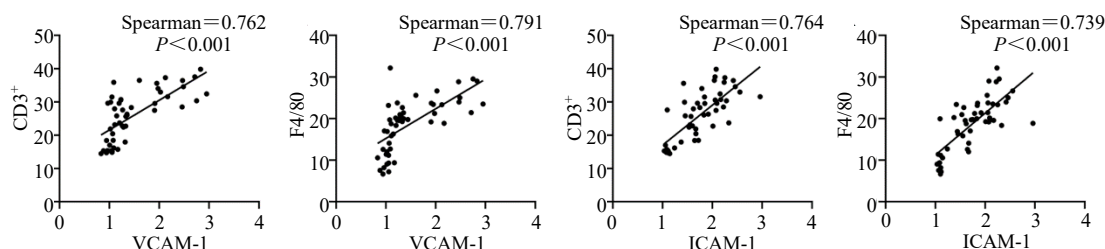


图 8 肺组织黏附分子表达与 $CD3^+$ T 淋巴细胞及 $F4/80^+$ 巨噬细胞浸润的相关性分析

Fig. 8 Correlation analysis between the expression of lung tissue adhesion molecules and the infiltration of $CD3^+$ T lymphocytes and $F4/80^+$ macrophages

改变^[21], 核心病理环节包括慢性肺部炎症、T 淋巴细胞及巨噬细胞异常浸润^[22-23]; 25%~40% 的患者转为慢性持续状态或进展恶化^[4], 持续肉芽肿性炎症可继发肺纤维化、肺动脉高压, 终末期出现呼吸衰竭^[24-25]。因此尽早识别并干预肺结节病对于阻断肺纤维化进展、改善预后具有重要临床意义。目前肺结节病的发病机制普遍认为与遗传易感性、环境因素及自身免疫反应密切相关^[26-28], 现有化学药物治疗存在疗效局限及不良反应突出等瓶颈, 深入探究其发病机制并寻找安全有效的干预策略仍是当前研究的重要方向。

粉防己入药首载于《神农本草经》, 传统用于风湿、风水、皮水及痰饮诸证, 《本草品汇精要》亦载

其“与葶苈子等量捣末, 糯米汤送服”可治肺痿咯血伴痰多之症。汉防己甲素作为粉防己的主要活性成分, 现代临床已拓展应用于肺癌、矽肺及煤工尘肺等肺部疾病, 可改善胸闷、胸痛、咳嗽等临床症状, 并能在提升肺活量的同时改善呼吸功能^[13,29]。本课题组前期围绕汉防己甲素抗肺纤维化及急性肺损伤的作用机制开展了系统研究, 证实其可通过抑制上皮-间质转化、减少促炎因子释放等途径缓解肺部纤维化病变^[14-15], 基于上述研究基础, 推测汉防己甲素对肺结节病可能具有潜在保护作用, 故本实验在前期工作基础上进一步开展相关探索。

肺结节病是以非干酪样坏死性上皮样细胞肉芽肿为典型病理特征的疾病, 其核心致病机制在于

活化巨噬细胞与 T 淋巴细胞在肺泡腔内的异常募集与局部积聚^[30-31]。黏附分子作为介导炎症细胞跨内皮迁移的关键调控因子,在该病理过程中发挥重要介导作用。已有研究表明,肺结节病患者肺泡中 ICAM-1 表达水平显著上调^[32]。此外,患者血清及支气管肺泡灌洗液中可溶性黏附分子(sICAM-1、sVCAM-1)水平亦明显升高,进一步佐证了内皮细胞活化及炎症细胞浸润在肺结节病进展中的关键作用^[33]。鉴于黏附分子在免疫细胞定向募集、抗原提呈及肉芽肿形成过程中所具有的核心调控功能,以黏附分子为靶点的干预策略已成为肺结节病治疗研究的重要方向,亦为本研究探讨汉防己甲素通过下调黏附分子表达而发挥抗肺结节病作用的实验设计提供了理论支撑。

本研究首先选择了多壁碳纳米管结合脂多糖构建小鼠肺结节病模型。传统多壁碳纳米管构建肺结节病模型存在 T 淋巴细胞浸润不足及炎症数据有限等局限,而脂多糖可有效模拟感染性炎症微环境,促进免疫细胞募集与活化,弥补上述缺陷。本研究结果显示,汉防己甲素对多壁碳纳米管联合脂多糖诱导的小鼠肺结节病模型具有明确保护作用。病理学观察表明,模型组肺组织呈现典型肉芽肿性病变伴大量炎性细胞浸润,汉防己甲素干预后,各剂量组肺组织病理损伤均呈不同程度减轻。免疫组化结果表明,模型组肺组织 CD3⁺ T 淋巴细胞及 F4/80⁺巨噬细胞浸润明显增多,汉防己甲素干预后二者表达显著下降,提示其可有效抑制肺结节病肉芽肿微环境中的免疫细胞募集。在炎症指标方面,汉防己甲素组可显著降低 BALF 中总蛋白、LDH、IL-1 β 和 IL-6 水平,表明其具有减轻局部炎症反应的作用。进一步检测血清可溶性黏附分子及 OPN 发现,模型组 sICAM-1、sVCAM-1、OPN 水平显著上调,而汉防己甲素组可不同程度下调其表达。Western blotting 结果证实,汉防己甲素干预后,肺组织 N-cadherin、VCAM-1、ICAM-1 蛋白表达显著下降,而 E-cadherin 表达显著升高。进一步相关性分析显示,肺组织 ICAM-1、VCAM-1 表达水平与 CD3⁺ T 淋巴细胞、F4/80⁺巨噬细胞浸润程度均呈显著正相关,提示汉防己甲素下调黏附分子表达与其减少上述免疫细胞肺内募集的效应密切相关。

综上所述,本研究证实汉防己甲素对多壁碳纳米管联合脂多糖诱导的小鼠肺结节病模型具有明确的保护作用。其作用机制可能与下调肺组织及血

清中 ICAM-1、VCAM-1 等黏附分子表达,减少 CD3⁺ T 淋巴细胞与 F4/80⁺巨噬细胞在肺组织中的异常募集,同时降低 BALF 中总蛋白、LDH 等肺损伤指标及 IL-1 β 、IL-6 等炎症因子水平,从而阻断肉芽肿形成并减轻局部炎症损伤有关。本研究不仅为汉防己甲素治疗肺结节病的临床应用提供了实验依据,更为探索以黏附分子为靶点的肺结节病干预策略提供了新的思路与方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Cao J M, Li H Q, Yin X F, *et al.* Global burden of pulmonary sarcoidosis from 1990 to 2021: A comprehensive analysis based on the GBD 2021 study [J]. *Front Med*, 2025, 12: 1585005.
- [2] Xu D F, Tao X H, Fan Y B, *et al.* Sarcoidosis: Molecular mechanisms and therapeutic strategies [J]. *Mol Biomed*, 2025, 6(1): 6.
- [3] Jain R, Yadav D, Puranik N, *et al.* Sarcoidosis: Causes, diagnosis, clinical features, and treatments [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(4): 1081.
- [4] Patterson K C, Streck M E. Pulmonary fibrosis in sarcoidosis. Clinical features and outcomes [J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2013, 10(4): 362-370.
- [5] Comes A, Sofia C, Richeldi L. Novel insights in fibrotic pulmonary sarcoidosis [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2022, 28(5): 478-484.
- [6] Israël-Biet D, Pastré J, Nunes H. Sarcoidosis-associated pulmonary hypertension [J]. *J Clin Med*, 2024, 13(7): 2054.
- [7] 张倩,黄慧,徐作军.肺结节病的诊治进展[J].临床内科杂志,2020,37(10):684-688.
- [8] 罗成,吴聪,王玉光.结节病药物治疗研究进展[J].新医学,2023,54(6):384-387.
- [9] Thillai M, Atkins C P, Crawshaw A, *et al.* BTS clinical statement on pulmonary sarcoidosis [J]. *Thorax*, 2021, 76(1): 4-20.
- [10] Schultz H H, Andersen C B, Steinbruchel D, *et al.* Recurrence of sarcoid granulomas in lung transplant recipients is common and does not affect overall survival [J]. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*, 2014, 31(2): 149-153.
- [11] 张晓梅,姜良铎,肖培新.肺结节病因病机探讨[J].环球中医药,2019,12(3):435-437.
- [12] 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.
- [13] 毛翎,彭莉君,王焕强,等.尘肺病治疗中国专家共识

- (2024 年版) [J]. 环境与职业医学, 2024, 41(1): 1-21.
- [14] Bhagya N, Chandrashekar K R. Tetrandrine-A molecule of wide bioactivity [J]. *Phytochemistry*, 2016, 125: 5-13.
- [15] 王逸飞, 宋玲, 高云航, 等. 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 [J]. 现代药物与临床, 2025, 40(1): 1-8.
- [16] 李晗, 黄舒茨, 宋玲, 等. 汉防己甲素通过调控 CDK-Rb-E2F 信号通路抗肺纤维化作用机制 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(12): 3439-3446.
- [17] 李晗, 王逸飞, 宋玲, 等. 不同模型复制方式致肺结节小鼠模型的比较研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2025, 35(19): 21-30.
- [18] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D, *et al.* Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120(4): 893-899.
- [19] Rossides M, Darlington P, Kullberg S, *et al.* Sarcoidosis: Epidemiology and clinical insights [J]. *J Intern Med*, 2023, 293(6):668-680.
- [20] Ungprasert P, Ryu J H, Matteson E L. Clinical manifestations, diagnosis, and treatment of sarcoidosis [J]. *Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes*, 2019, 3(3): 358-375.
- [21] Takemura T. Pathological diversity of pulmonary sarcoidosis [J]. *Front Med*, 2025, 12: 1666973.
- [22] Moldoveanu B, Otmishi P, Jani P, *et al.* Inflammatory mechanisms in the lung [J]. *J Inflamm Res*, 2009, 2: 1-11.
- [23] Asif H, Ribeiro Neto M, Culver D. Pulmonary fibrosis in sarcoidosis [J]. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2023, 40(3): e2023027.
- [24] Valeyre D, Prasse A, Nunes H, *et al.* Sarcoidosis [J]. *Lancet*, 2014, 383(9923): 1155-1167.
- [25] Malkova A, Zinchenko Y, Starshinova A, *et al.* Sarcoidosis: Progression to the chronic stage and pathogenic based treatment (narrative review) [J]. *Front Med*, 2022, 9: 963435.
- [26] Nunes H, Bouvry D, Soler P, *et al.* Sarcoidosis [J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2007, 2: 46.
- [27] Sanjay M, Marie-christine A. Pulmonary granulomas: Differential diagnosis, histologic features and algorithmic approach [J]. *Diagn Histopathol*, 2013, 19(8): 288-297.
- [28] Chen C, Luo N Z, Dai F Q, *et al.* Advance in pathogenesis of sarcoidosis: Triggers and progression [J]. *Heliyon*, 2024, 10(5): e27612.
- [29] Guo X Z, Qi J, Li H X, *et al.* Clinical efficacy of acetylcysteine combined with tetrandrine tablets on patients with silicosis and its effect on exercise tolerance and pulmonary function [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(2): 1285-1290.
- [30] Zhang H, Costabel U, Dai H P. The role of diverse immune cells in sarcoidosis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 788502.
- [31] Grunewald J, Grutters J C, Arkema E V, *et al.* Sarcoidosis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1) :45.
- [32] Melis M, Gjomarkaj M, Pace E, *et al.* Increased expression of leukocyte function associated antigen-1 (LFA-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) by alveolar macrophages of patients with pulmonary sarcoidosis [J]. *Chest*, 1991, 100(4): 910-916.
- [33] Dalhoff K, Bohnet S, Braun J, *et al.* Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in the pathogenesis of mononuclear cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis [J]. *Thorax*, 1993, 48(11): 1140-1144.

[责任编辑 高源]