

黄芩苷脂质体雾化吸入对急性呼吸窘迫综合征小鼠肺损伤的保护作用及机制

赵威或¹, 王洪新^{1#}, 杨冰², 张秋阳³, 朱或⁴

1. 天津医学高等专科学校, 天津 300222

2. 天津医科大学 基础医学院, 天津 300070

3. 天津市海河医院 基础医学实验部, 天津 300350

4. 天津市第三中心医院 检验科, 天津 300170

摘要: **目的** 考察黄芩苷脂质体雾化吸入对急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 小鼠肺损伤的保护作用, 并探讨其机制。**方法** 薄膜水化法制备黄芩苷脂质体, 并检测包封率、载药量、粒径、Zeta 电位、分散指数、累积释放率。BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组、黄芩苷溶液 (100 mg·kg⁻¹, 0.9% 氯化钠溶液配制) 组和黄芩苷脂质体低、高剂量 (50、100 mg·kg⁻¹) 组, 小鼠连续 3 d 雾化吸入黄芩苷脂质体及黄芩苷溶液, 每天 1 次, 末次给药 1 h 后除对照组外各组均鼻内滴注脂多糖 (LPS) 构建 ARDS 模型。造模 6 h 后, 取肺脏检测质量湿干比 (W/D), 采用苏木素-伊红 (HE) 和 Masson 染色观察肺组织病理变化, ELISA 法观察支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中白细胞介素-6 (IL-6)、CC 趋化因子配体 2 (CCL2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 水平以及肺组织中丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽 (GSH) 水平, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测肺组织 IL-6、TGF- β 1、TNF- α 和 CCL2 mRNA 表达, 16S rRNA 测序法观察支气管 BALF 菌群微生态的变化。将人正常肺上皮 BEAS-2B 细胞分为对照组、模型组、黄芩苷 (200 μ g·mL⁻¹) 和黄芩苷脂质体低、高质量浓度 (100、200 μ g·mL⁻¹) 组, 除对照组外, 均经 LPS (250 ng·mL⁻¹) 刺激造模, 造模的同时给药, 共培养 72 h 后, 采用 ELISA 试剂盒检测细胞中活性氧 (ROS)、线粒体膜电位 (MMP) 和线粒体超氧化物水平。**结果** 黄芩苷脂质体包封率为 91.7%, 载药量为 25.5%, 粒径为 (212.300 $\pm$ 0.424) nm, Zeta 电位为 (-22.4 $\pm$ 0.9) mV, 分散指数为 0.517 $\pm$ 0.052; 体外释放曲线显示, 黄芩苷脂质体体外释放速度显著低于黄芩苷溶液 ($P<0.05$)。与模型组比较, 黄芩苷脂质体雾化吸入可缓解 LPS 造成的小鼠肺组织损伤, 显著降低肺 W/D ($P<0.05$), 显著降低 BALF 和肺组织中 IL-6、TGF- β 1、CCL2、TNF- α 水平 ($P<0.05$), 显著升高肺组织 GSH、SOD 水平 ($P<0.05$), 显著降低肺组织 MDA 水平 ($P<0.05$), 升高菌群厚壁菌门/拟杆菌门和菌群 α 多样性 ($P<0.05$)。与模型组比较, 黄芩苷脂质体可显著缓解由 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞活性氧 (ROS) 过度表达、线粒体超氧化物水平上调以及 MMP 下调 ($P<0.05$)。且黄芩苷脂质体的上述改善作用均优于黄芩苷溶液。**结论** 黄芩苷脂质体雾化吸入对 LPS 诱导的肺损伤具有保护作用, 机制与减轻细胞因子分泌过量引起的氧化损伤、线粒体功能障碍和肺部菌群失衡有关, 脂质体包裹可提高黄芩苷药效。

关键词: 黄芩苷; 脂质体; 雾化吸入; 急性呼吸窘迫综合征; 炎症; 肺泡灌洗液菌群

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)04-0856-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.04.007

Protective effect and mechanism of liposome aerosol inhalation of baicalin on lung injury in acute respiratory distress syndrome mice

ZHAO Weiyu¹, WANG Hongxin¹, YANG Bing², ZHANG Qiuyang³, ZHU Yu³

1. Tianjin Medical Collage, Tianjin 300222, China

2. School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

3. Department of Basic Medicine, Tianjin Haihe Hospital, Tianjin 300350, China

4. Department of Clinical Laboratory, the Third Central Hospital, Tianjin 300170, China

收稿日期: 2024-10-11

基金项目: 天津市中医药重点领域科研项目 (2022008); 全国生物技术职业教育教学指导委员会教育教学改革项目 (XMLX202452); 天津市哲学社会科学规划项目 (TJJY23-004)

作者简介: 赵威或, 高级实验师, 研究方向为药物制剂、生物制药。E-mail: tjyhzwy@126.com

#共同第一作者: 王洪新 E-mail: wanghongxin2861@126.com

***通信作者:** 朱或, 主任技师, 研究方向为中药药理。E-mail: zhuyutj@126.com

Abstract: Objective To investigate the protective effect of liposome aerosol inhalation of Baicalin on lung injury in mice with acute respiratory distress syndrome (ARDS) and explore its mechanism. **Methods** The liposomes of baicalein were prepared by the thin film hydration method, and the entrapment efficiency, drug loading, particle size, Zeta potential, polydispersity index and cumulative release rate were detected. BALB/c mice were randomly divided into the control group, the model group, the baicalein solution group ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, prepared with 0.9% sodium chloride solution) and the low and high dose baicalein liposome groups ($50, 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). The mice were continuously nebulized with baicalein liposomes and baicalein solution for 3 days, once a day. One hour after the last administration, except for the control group, all groups were intranasally instilled with lipopolysaccharide (LPS) to establish the ARDS model. Six hours after modeling, the lungs were taken to detect the wet-to-dry weight ratio (W/D), and the pathological changes of lung tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining. The levels of interleukin-6 (IL-6), CC chemokine ligand 2 (CCL2), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and the levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and glutathione (GSH) in lung tissue were detected by ELISA. The mRNA expressions of *IL-6*, *TGF- β 1*, *TNF- α* and *CCL2* in lung tissue were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR), and the changes of BALF microbiota microecology were observed by 16S rRNA sequencing. BEAS-2B cells were divided into the control group, the model group, the baicalein group ($200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) and the low and high concentration baicalein liposome groups ($100, 200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Except for the control group, all groups were stimulated with LPS ($250 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) to establish the model, and the drugs were administered simultaneously. After co-culture for 72 h, the levels of reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential (MMP) and mitochondrial superoxide in cells were detected by ELISA kits. **Results** The entrapment efficiency of baicalein liposomes was 91.7%, the drug loading was 25.5%, the particle size was $(212.300 \pm 0.424) \text{ nm}$, the Zeta potential was $(-22.4 \pm 0.9) \text{ mV}$, and the polydispersity index was 0.517 ± 0.052 . The *in vitro* release curve showed that the *in vitro* release rate of baicalein liposomes was significantly lower than that of baicalein solution ($P < 0.05$). Compared with the model group, nebulization of baicalein liposomes could alleviate the lung tissue injury caused by LPS in mice, significantly reduce the lung W/D ($P < 0.05$), significantly reduce the levels of IL-6, TGF- β 1, CCL2 and TNF- α in BALF and lung tissue ($P < 0.05$), significantly increase the levels of GSH and SOD in lung tissue ($P < 0.05$), significantly reduce the level of MDA in lung tissue ($P < 0.05$), and increase the ratio of Firmicutes to Bacteroidetes and the α diversity of the microbiota ($P < 0.05$). Compared with the model group, baicalein liposomes could significantly alleviate the excessive expression of ROS, the up-regulation of mitochondrial superoxide and the down-regulation of MMP induced by LPS in BEAS-2B cells ($P < 0.05$). Moreover, the above-mentioned improvement effects of baicalein liposomes were better than those of baicalein solution. **Conclusion** Liposome aerosol inhalation of baicalin have a protective effect on LPS-induced lung injury, and the mechanism is related to the reduction of oxidative damage, mitochondrial dysfunction and lung microbiota imbalance caused by excessive cytokine secretion. Liposome encapsulation can improve the efficacy of baicalein.

Key words: baicalin; liposome; atomizing inhalation; acute respiratory distress syndrome; inflammation; alveolar lavage fluid flora

急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 是一种由严重感染等因素造成的以肺泡毛细血管损伤为主要表现的临床综合征, 可分为渗出期、增生期和纤维化期 3 个阶段, 其主要发病机制是炎症反应失调导致肺泡毛细血管内皮屏障受损, 从而引起肺组织纤维化及坏死^[1-2]。

目前 ARDS 治疗仍以原发病治疗与支持治疗为主, 通过改善心肺功能、减少肺水肿、降低肺渗透性和炎症反应, 提高救治成功率。天然化合物的抗炎作用经多年的临床实践证实, 具有靶点多、资源丰富、抗炎能力强和不良反应少等优点^[3]。多项研究证实黄芩苷具有调节细胞因子表达、抗氧化、抗炎等活性, 但由于其水溶性较差导致生物利用度较低, 限制了其临床应用^[4]。

脂质体主要由磷脂和胆固醇组成, 可有效提高

药物的溶解度及生物利用度, 吸入后可使药物黏附在气管和支气管黏膜上, 直接作用于呼吸道黏膜病灶^[5]。本研究拟通过小鼠模型, 分析脂质体对黄芩苷生物利用度的改善作用以及黄芩苷脂质体雾化吸入剂对 ARDS 造成的肺损伤的保护作用及机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

黄芩苷 (批号 572667, 质量分数 95%)、脂多糖 (LPS, 批号 SMB00704, 质量分数 97%) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽 (GSH)、线粒体膜电位 (MMP) 检测试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司; 线粒体超氧化物检测试剂盒、活性氧 (ROS) 检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司; 白细胞介素-6 (IL-6)、CC 趋化因子配体 2 (CCL2)、

肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) ELISA 试剂盒购自美国 R&D Systems 公司; BEGM Bullet Kit 培养基购自瑞士 Lonza 公司; 菌群基因组提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; TruSeq[®] DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒购自美国 Illumina 公司; 二油酰基磷脂酰乙醇胺购自阿拉丁生化科技股份有限公司; 胆固醇琥珀酸单酯购自上海迈瑞尔生化科技有限公司; 胆固醇和氯甲烷购自安徽泽升科技有限公司。

1.2 主要仪器

Miseq 测序仪购自美国 Illumina 公司; SPECTRONIC 200 紫外可见光谱仪、ALF 酶标仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Calibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司; CK40 倒置显微镜购自日本 Olympus 公司; SB25-12DTD 超声波清洗仪购自宁波新芝生物科技股份有限公司; S-250D 超声波细胞破碎仪购自美国 Branson 公司; HB10 旋转蒸发仪购自德国 IKA 公司; Mastersizer3000+ Lab 激光粒度分析仪购自英国 Malvern 公司; ZL-005 大小鼠雾化给药仪购自安徽耀坤生物科技有限公司。

1.3 动物与细胞

雄性 SPF 级 BALB/c 小鼠购自北京斯贝福生物技术有限公司, 6 周龄, 体质量约 20 g, 实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2019-0010。实验动物采光和通风条件良好, 温度为 24~26 °C、相对湿度 60%~75%、光照周期 12 h/12 h、自由饮水和食物, 适应性饲养 1 周后进行实验。所有动物实验操作步骤均在天津市海河医院实验动物委员会的批准下严格按照《赫尔辛基宣言》原则进行, 动物实验伦理编号 2021HHKT (A) -011。

人正常肺上皮 BEAS-2B 细胞购自北京协和细胞资源中心, 于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养, 应用 BEGM Bullet Kit 培养基, 选取对数生长期细胞进行实验。

2 方法

2.1 黄芩苷脂质体的制备

参照文献报道^[6-7], 通过薄膜水化法制备脂质体, 将二油酰基磷脂酰乙醇胺 (7 mg)、胆固醇琥珀酸单酯 (4 mg)、胆固醇 (2 mg) 和黄芩苷 (5 mg) 溶于氯甲烷 (6 mL), 37 °C 超声震荡 10 min, 确保上述药品溶解混匀后, 40 °C、150 r·min⁻¹ 旋转蒸发去除有机溶剂至形成薄膜, 加入 10 mL 磷酸盐缓

冲液 (PBS) 37 °C 超声震荡至薄膜完全溶解后, 使用超声波细胞破碎仪继续破碎脂质体 (超声功率 60 W、工作时间间隔 3 s、工作时间 2 min), 得到黄芩苷脂质体溶液, 在 4 °C 条件下贮存。空白脂质体的制备不加入黄芩苷, 其他步骤同上。

2.2 脂质体表征

2.2.1 粒径、分散指数、Zeta 电位测定 常温下, 通过激光粒度分析仪检测脂质体的粒径、分散指数和 Zeta 电位。

2.2.2 包封率、载药量测定 称取 2 mg 黄芩苷溶于 1 mL 二甲基亚砜 (DMSO) 中制备黄芩苷对照品母液, 依次用甲醇倍比稀释得到 3.125、6.250、12.500、25.000、50.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 黄芩苷溶液, 用甲醇做空白对照, 依次对对照品溶液进行紫外光谱扫描, 记录对照品溶液在 280 nm 处的吸光度 (A) 值。以质量浓度为横坐标, 以 A 值为纵坐标建立黄芩苷溶液的标准曲线。取 1 mL 黄芩苷脂质体在 4 °C 条件下 14 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 吸取 100 μL 上清, 加入 1 800 μL 甲醇破乳后加入 100 μL DMSO 充分溶解黄芩苷, 通过紫外分光光度计检测脂质体中黄芩苷的含量, 计算包封率、载药量。

$$\text{包封率} = W_{\text{包}} / W_{\text{总药物}}$$

$$\text{载药量} = W_{\text{包}} / (W_{\text{总药物}} + W_{\text{载体}})$$

$W_{\text{包}}$ 为 1 mL 脂质体中包封的黄芩苷的质量; $W_{\text{总}}$ 为 1 mL 脂质体中黄芩苷的总质量 (投药量); $W_{\text{载体}}$ 为 1 mL 脂质体中载体总质量

2.2.3 体外释放度测定 将黄芩苷脂质体 (以黄芩苷计 0.5 mg·mL⁻¹) 2 mL 在 4 °C 条件下以 14 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 收集上清液至于透析袋 (相对分子质量截留量为 1×10^5) 中, 置于 40 mL PBS (pH 7.0, 含 0.5% DMSO) 中 37 °C 水浴透析。分别于 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 h 收集 1 mL 释放介质于 EP 管中, 并补充 1 mL PBS, 以紫外分光光度计检测其在 280 nm 处的 A 值, 计算黄芩苷含量, 计算黄芩苷脂质体在不同时间点的黄芩苷累积释放率, 绘制累积释放曲线。按照上述相同方法计算黄芩苷溶液 (0.5 mg·mL⁻¹, 0.9% 氯化钠溶液配制) 在不同时间点的黄芩苷累积释放率。

$$Q = (V_c \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_T C_n) / M$$

Q 为累积释放率, V_c 为补充的新鲜介质的体积, V_T 为释放介质的总体积, C_i 为第 i 个时间点释放的药物浓度, C_n 为第 n 个时间点释放的药物浓度, M 为脂质体中药物的总质量

2.3 黄芩苷脂质体雾化吸入剂对 ARDS 小鼠的改善作用

2.3.1 ARDS 小鼠模型的构建及给药 BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组、黄芩苷溶液(100 mg·kg⁻¹, 0.9%氯化钠溶液配制)组和黄芩苷脂质体低、高剂量(50、100 mg·kg⁻¹)组,将黄芩苷溶液(0.5 mg·mL⁻¹, 4 mL)和黄芩苷脂质体(0.5 mg·mL⁻¹, 高、低剂量组分别为 4、2 mL)通过大小鼠雾化给药仪口鼻吸入(0.3 mL·min⁻¹)给予小鼠,给药结束后静置 5 min 保证充分吸入,对照组和模型组给予 4 mL PBS,每天 1 次,持续给药 3 d,末次给药 1 h 后,小鼠吸入 5%异氟醚(300 mL·min⁻¹,持续 3 min)麻醉后倾斜于 45°板上,在小鼠咽后壁滴入 LPS(每只 2 μg)^[8],置于笼中自行苏醒,构建 ARDS 小鼠模型,不做任何处理的小鼠作为对照组。LPS 造模 6 h 后,小鼠胸腔打开后用 1 mL 0.9%氯化钠溶液灌洗得到支气管肺泡灌洗液(BALF),解剖小鼠取肺组织进行后续实验^[8-9]。取已分离气管和食管的右肺叶,立即测量湿质量;将肺叶在 60 ℃条件下干燥 72 h,称量干燥的肺叶质量,并计算肺质量湿干比(W/D)。

2.3.2 病理损伤观察 小鼠肺组织用 4%多聚甲醛固定及石蜡包埋,切片后经苏木素-伊红(HE)和 Masson 染色,用显微在 400 倍下观察肺组织损伤情况。

2.3.3 ELISA 实验 将小鼠支气管 BALF 4 ℃、3 000×g 离心 10 min 取上清,按照试剂盒说明书方法通过酶标仪检测上清中 IL-6、TGF-β1、CCL2 和 TNF-α 含量。肺组织冰浴上用玻璃匀浆器匀浆,匀浆液经液氮反复冻融裂解,4 ℃、12 000×g 离心 10 min 取上清,按照试剂盒说明书方法通过酶标仪检测上清中 GSH、MDA 和 SOD 含量。

2.3.4 16S rRNA 测序分析 支气管 BALF 经营养肉汤在 37 ℃、5%CO₂、饱和湿度条件下进行扩菌培养 72 h 后,按照菌群基因组提取试剂盒说明书方法提取总 RNA。采用 PCR 技术对细菌 16S rRNA 基因 V4 可变区进行 PCR 扩增,V4 上游引物为 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3',V4 下游引物为 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'。PCR 条件为 94 ℃变性 2 min,94 ℃ 30 s,52 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s 共 30 个循环,72 ℃延伸 5 min。采用 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒进行文库构建,通过 Illumina Miseq 测序平台进行 16S

rRNA 测序。R 软件(Version2.15.3)用于菌群分析花瓣图和物种丰度聚类热图构建、非度量多维尺度分析(NMDS)等菌群异质性(β多样性)分析,采用 Wilcoxon 秩和检验进行肺部菌群相对丰度和 α多样性(Shannon 指数)分析。

2.3.5 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)实验 将小鼠肺组织冰浴上用玻璃匀浆器匀浆,Trizol 法提取总 RNA 后,通过逆转录试剂盒进行逆转录得到 cDNA,通过 qRT-PCR 技术对靶点以及内参基因 GAPDH 进行检测,分别取得 C_t 值,采用 2^{-ΔΔC_t} 法分析 IL-6、TGF-β1、TNF-α 和 CCL2 mRNA 相对表达差异,引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR Primer sequence	
基因名称	引物序列(5'→3')
TNF-α	上游: AGCACAGAAAGCATGATCCG
	下游: CTGATGAGAGGGAGGCCATT
TGF-β1	上游: TGATACGCCTGAGTGGCTGTCT
	下游: CACAAGAGCAGTGAGCGCTGAA
IL-6	上游: TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC
	下游: TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
CCL2	上游: TCAAAGTGAAGCTCGCACTCT
	下游: GGGGCATTGATTGCATCTGG
GAPDH	上游: ATGGGTGTGAACCACGAGA
	下游: CAGGGATGATGTTCTGGGCA

2.4 黄芩苷脂质体对 LPS 诱导肺上皮细胞氧化应激和线粒体功能异常的缓解作用^[8,10]

将 BEAS-2B 细胞培养于 96 孔板中(每孔 3 000 个)24 h 后,分为对照组、模型组、黄芩苷(200 μg·mL⁻¹)和黄芩苷脂质体低、高质量浓度(100、200 μg·mL⁻¹)组,除对照组外,均经 LPS(250 ng·mL⁻¹)刺激造模,造模的同时给药,共培养 72 h 后,通过胰酶消化收集细胞,采用 ELISA 试剂盒检测 ROS、MMP 和线粒体超氧化物水平。

2.5 统计学分析

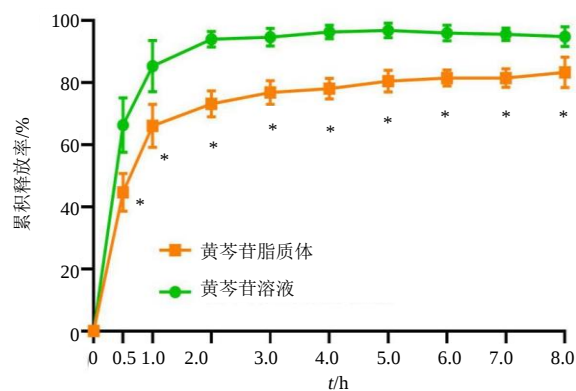
采用 SPSS11.0 软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用 One-way ANOVA 检验进行分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 黄芩苷脂质体表征

黄芩苷脂质体包封率为 91.7%,载药量为 25.5%,粒径为(212.300±0.424) nm,Zeta 电位为(-22.4±0.9) mV,分散指数为 0.517±0.052,表明脂质体表面存在均匀负电荷,具有一定稳定性,

脂质体中的粒子分散性较好。体外释放曲线结果显示(图 1),黄芩苷脂质体体外释放速度显著低于黄芩苷溶液($P<0.05$)。



与黄芩苷溶液组比较: * $P<0.05$ 。
* $P<0.05$ vs baicalin solution group.

图 1 黄芩苷脂质体体外释放曲线

Fig. 1 Accumulated release curve of liposome aerosol

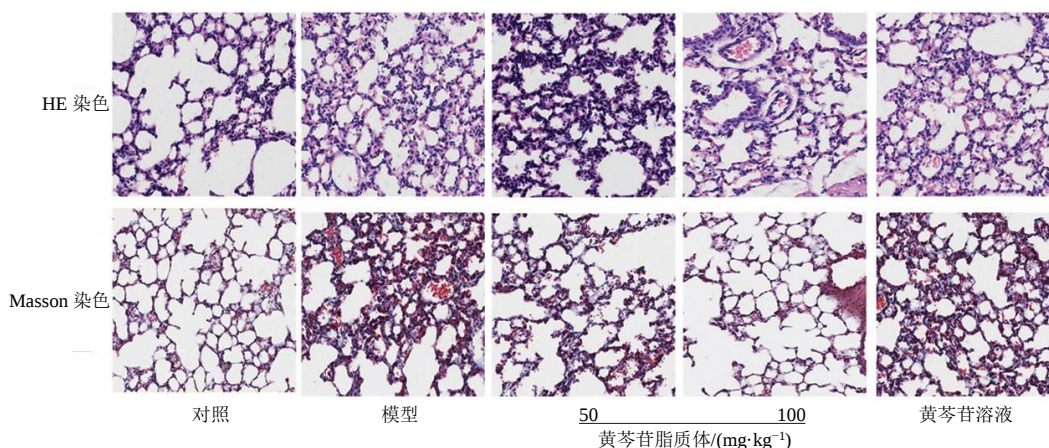


图 2 黄芩苷脂质体雾化吸入对 ARDS 小鼠肺损伤的保护作用($\times 400$)

Fig. 2 Protective effect of liposome aerosol inhalation of baicalin on lung injury in ARDS mice ($\times 400$)

表 2 黄芩苷脂质体雾化吸入对 ARDS 小鼠肺组织 W/D 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 2 Effect of liposome aerosol inhalation of baicalin on W/D in lung tissues of ARDS mice ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	W/D
对照	—	1.83±0.51
模型	—	3.56±0.88*
黄芩苷脂质体	50	2.76±0.57*#
	100	2.25±0.53#
黄芩苷溶液	100	2.95±0.54* ^Δ

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$; 与黄芩苷脂质体高剂量组比较: ^Δ $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group; ^Δ $P<0.05$ vs liposome aerosol inhalation of baicalin high dose group.

3.2 黄芩苷脂质体对 ARDS 小鼠肺损伤的影响

3.2.1 黄芩苷脂质体雾化吸入对 ARDS 小鼠肺损伤的保护作用 HE 染色显示 ARDS 小鼠肺内可见大量炎症细胞浸润,肺泡结构广泛破坏,肺泡毛细血管充血扩张;Masson 染色显示 ARDS 小鼠肺内纤维组织增生。黄芩苷脂质体雾化吸入剂对 LPS 诱导的肺损伤有保护作用,且保护效果优于黄芩苷溶液雾化吸入。结果见图 2。

与对照组比较,模型组小鼠 W/D 显著升高($P<0.05$);与模型组比较,黄芩苷脂质体组 W/D 显著降低($P<0.05$),且作用呈剂量相关性;与黄芩苷脂质体高剂量组比较,黄芩苷溶液组 W/D 显著升高($P<0.05$)。结果见表 2。

3.2.2 黄芩苷脂质体雾化吸入对 ARDS 小鼠肺部炎症反应的影响 与对照组比较,模型组 BALF 中 IL-6、TGF- β 1、CCL2、TNF- α 水平显著升高($P<0.05$);

与模型组比较,黄芩苷脂质体组 IL-6、TGF- β 1、CCL2 水平显著降低($P<0.05$),TNF- α 水平呈下降趋势;与黄芩苷脂质体高剂量组比较,黄芩苷溶液组 IL-6、TGF- β 1、CCL2 水平显著升高($P<0.05$),TNF- α 水平呈升高趋势。结果见表 3。

如表 4 所示,与对照组比较,模型组小鼠肺组织 IL-6、TGF- β 1、TNF- α 和 CCL2 mRNA 表达水平显著升高($P<0.05$);与模型组比较,黄芩苷脂质体雾化吸入后 ARDS 小鼠肺组织中 IL-6、TGF- β 1、TNF- α 和 CCL2 mRNA 表达均显著下调($P<0.05$);与黄芩苷脂质体高剂量组比较,黄

表 3 黄芩苷脂质体雾化吸入对 ARDS 小鼠支气管 BALF 中炎症因子含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 3 Effect of liposome aerosol inhalation of baicalin on cytokine in BALF of ARDS mice ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-6/(ng·L ⁻¹)	TGF-β1/(ng·L ⁻¹)	CCL2/(ng·L ⁻¹)	TNF-α/(ng·L ⁻¹)
对照	—	7.5±2.3	23.8±6.6	89.7±19.1	31.3±5.8
模型	—	40.2±12.3*	69.3±12.0*	202.6±64.0*	50.7±25.6*
黄芩苷脂质体	50	29.4±3.3*#	45.0±6.9*#	155.2±35.9*#	47.5±14.1*
	100	15.9±3.5*#	37.2±6.9*#	136.3±40.2*#	36.7±5.6*
黄芩苷溶液	100	24.3±5.3*#Δ	44.9±8.4*#Δ	181.3±41.7*Δ	42.3±7.7*

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$; 与黄芩苷脂质体高剂量组比较: Δ $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group; Δ $P<0.05$ vs liposome aerosol inhalation of baicalin high dose group.

表 4 黄芩苷脂质体雾化吸入对 ARDS 小鼠肺组织中炎症因子 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 4 Effect of liposome aerosol inhalation of baicalin on mRNA expression of cytokine in lung issue of ARDS mice ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量			
		IL-6	TGF-β1	CCL2	TNF-α
对照	—	1.00±0.13	1.00±0.12	1.00±0.11	1.00±0.12
模型	—	5.33±1.32*	4.46±0.97*	4.56±1.49*	3.16±1.06*
黄芩苷脂质体	50	3.12±1.07*#	3.23±0.64*#	3.66±1.03*	2.65±0.63*
	100	2.51±0.93*#	1.92±0.63*#	2.38±0.69*#	2.16±0.52*#
黄芩苷溶液	100	2.82±0.73*#	3.02±1.13*#Δ	3.69±0.93*Δ	2.81±0.77*Δ

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$; 与黄芩苷脂质体高剂量组比较: Δ $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group; Δ $P<0.05$ vs liposome aerosol inhalation of baicalin high dose group.

芩苷溶液组 *TGF-β1*、*TNF-α* 和 *CCL2* mRNA 表达显著升高 ($P<0.05$)。

3.2.3 黄芩苷脂质体雾化吸入对 ARDS 小鼠肺部菌群微环境的影响 通过 16S rRNA 测序发现, LPS 处理后小鼠支气管 BALF 菌群的物种组成发生了变化, 各组小鼠肺部菌群共有/特有操作性分类单元 (OTU) 见图 3-A, 菌群门水平热图见图 3-C。肺部菌群分布主要以变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和拟杆菌门 (Bacteroidota) 为主。与对照组相比, 模型组小鼠肺部菌群中变形菌门和拟杆菌门相对丰度增加, 厚壁菌门相对丰度减少; 与模型组比较, 黄芩苷脂质体雾化吸入可缓解变形菌门和厚壁菌门相对丰度异常 (图 3-B)。与对照组比较, 模型组厚壁菌门/拟杆菌门显著降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 黄芩苷脂质体组厚壁菌门/拟杆菌门显著升高 ($P<0.05$)。黄芩苷溶液雾化吸入不能显著缓解 LPS 造成的上述表型改变。

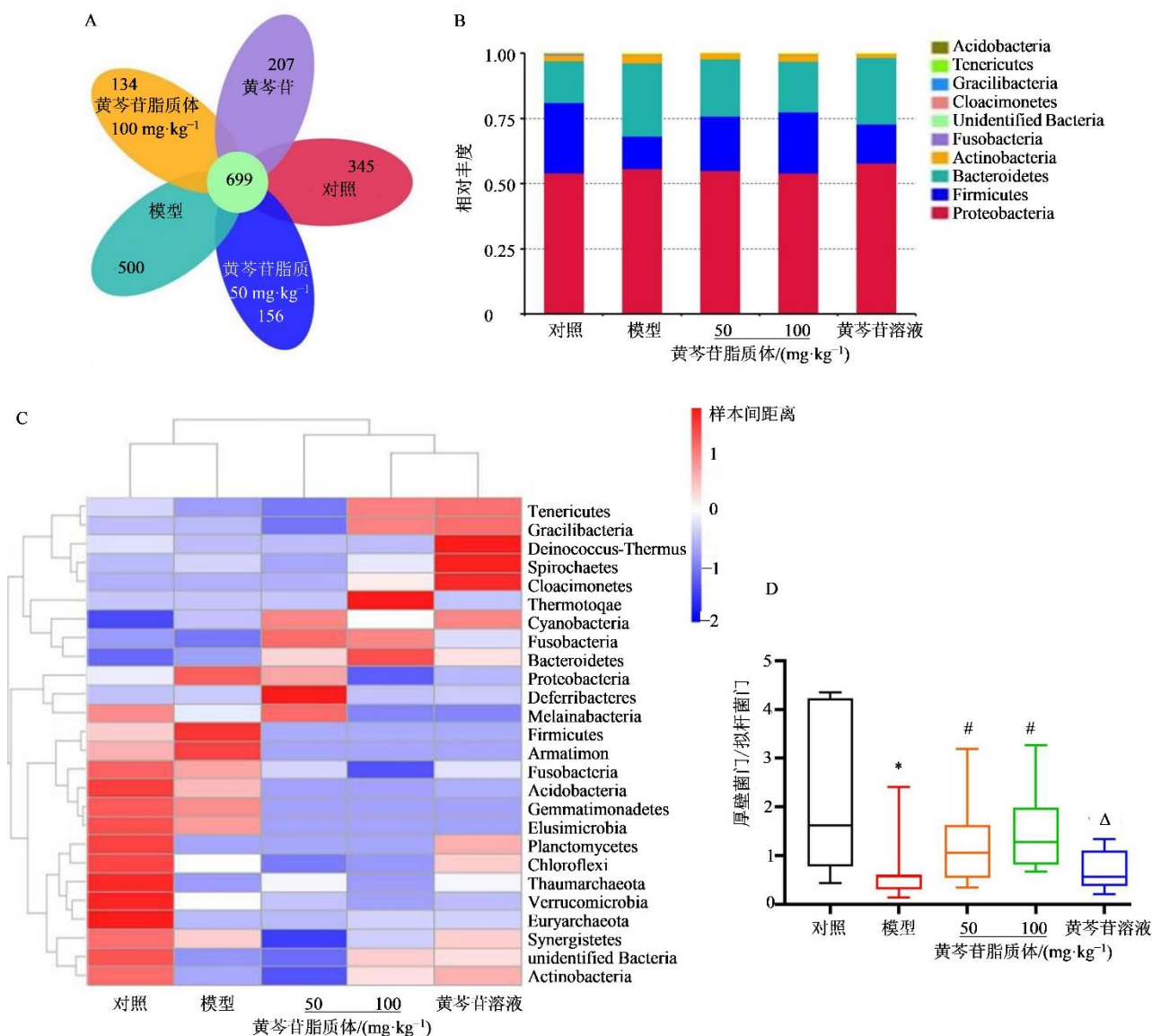
LPS 处理后小鼠肺部菌群多样性也发生了变化, 与对照组比较, 模型组小鼠支气管 BALF 中菌群 α 多样性 (Shannon 指数) 显著下调 ($P<0.05$); 与模型组比较, 黄芩苷脂质体组 Shannon 指数显著升高 ($P<0.05$) (图 4-A)。经 NMDS 分析发现, 菌

群异质性 (β 多样性) 发生了改变, 模型组离对照组较远, 黄芩苷脂质体雾化吸入可缓解 LPS 造成的小鼠肺部菌群多样性改变, 离对照组较近 (图 4-B)。

3.2.4 黄芩苷脂质体雾化吸入对 ARDS 小鼠肺部氧化还原平衡的影响 如表 5 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织中 GSH、SOD 水平显著降低 ($P<0.05$), MDA 水平显著升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 黄芩苷脂质体低、高剂量组 GSH、SOD 水平显著升高 ($P<0.05$), 高剂量组 MDA 水平显著降低 ($P<0.05$), 而黄芩苷溶液没有改善作用。结果表明, 黄芩苷脂质体雾化吸入可缓解 LPS 造成的小鼠肺部氧化还原系统失调。

3.3 黄芩苷脂质体对 LPS 诱导肺上皮细胞线粒体功能异常的影响

与对照组比较, 模型组 BEAS-2B 细胞 ROS 表达和线粒体超氧化物水平显著升高 ($P<0.05$), MMP 受到显著抑制 ($P<0.05$); 与模型组比较, 黄芩苷脂质体低、高浓度组 ROS 表达显著降低 ($P<0.05$), MMP 显著升高 ($P<0.05$), 高浓度组线粒体超氧化物相对表达量显著降低 ($P<0.05$); 与黄芩苷脂质体高质量浓度组比较, 黄芩苷溶液组 ROS 表达显著升高 ($P<0.05$), MMP 显著降低 ($P<0.05$)。



A-小鼠支气管 BALF 菌群分析花瓣图; B-菌群物种相对丰度柱形图 (门水平); C-菌群物种丰度聚类热图 (门水平); D-厚壁菌门/拟杆菌门; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与黄芩苷脂质体高剂量组比较: $\Delta P < 0.05$ 。

A-Flower petal diagram of bacterial community analysis in mouse bronchoalveolar lavage fluid; B-Bar chart of relative abundance of microbial species (phylum level); C-Microbiota species abundance clustering heatmap (phylum level); D-Firmicutes/Bacteroidetes; * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs liposome aerosol inhalation of baicalin high dose group.

图 3 黄芩苷脂质体雾化吸入剂对 ARDS 小鼠肺部菌群分布的影响 ($n=12$)

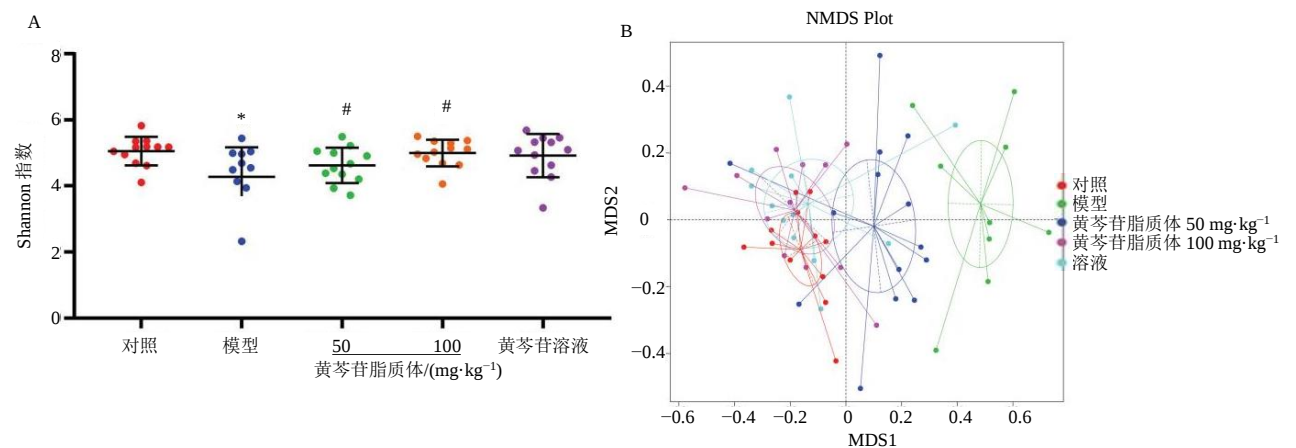
Fig. 3 Effect of liposome aerosol inhalation of baicalin on microbial distribution in lung issue of ARDS mice ($n=12$)

结果表明,黄芩苷脂质体可缓解 LPS 对细胞氧化应激和线粒体功能损伤。结果见表 6。

4 讨论

多项研究已证实,天然化合物对 ARDS 具有一定的治疗作用。黄芩苷是黄芩的主要成分,具有抗病毒、抗菌、抗过敏、免疫调节等多种药理作用^[11-12],在新药开发中具有广阔的前景,但其水溶性和生物利用度较差,限制了其应用^[13]。脂质体是由磷脂和胆固醇组成的具有双层生物膜的小囊泡,

可降低药物毒性,增加稳定性、水溶性和吸收率^[14]。天然复合脂质体已被尝试用于糖尿病等疾病的治疗^[15]。脂质体雾化吸入用于肺部药物传递的主要目的是调节药物的释放速度,减轻药物对呼吸道和肺部的刺激,增加药物在下呼吸道的浓度^[16]。既往研究表明,脂质体气雾剂由于直接作用于肺部,可用于治疗 ARDS、肺癌等呼吸系统疾病^[17-18]。本研究通过免疫组化结果发现, LPS 可引起小鼠肺部炎症细胞浸润、肺泡结构破坏以及纤维组织增生等肺损



A-菌群 α 多样性 (Shannon 指数); B-菌群异质性分析 (β 多样性); 与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$ 。
A-microbial diversity (Shannon index); B-microbiota heterogeneity analysis (β diversity); * $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group.

图 4 黄芩苷脂质体雾化吸入剂对 ARDS 小鼠肺部菌群异质性影响

Fig. 4 Effect of liposome aerosol inhalation of baicalin on microbial heterogeneity in lung issue of ARDS mice

表 5 黄芩苷脂质体雾化吸入剂对 ARDS 小鼠肺部氧化还原系统的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 5 Effect of liposome aerosol inhalation of baicalin on oxidation reduction system in lung issue of ARDS mice ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	GSH/(mg·g ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)
对照	—	1.08 ± 0.15	1.90 ± 0.37	20.58 ± 4.96
模型	—	0.75 ± 0.19*	2.38 ± 0.56*	16.70 ± 1.87*
黄芩苷脂质体	50	0.95 ± 0.12*#	2.21 ± 0.45	20.23 ± 4.44#
	100	1.04 ± 0.18#	1.94 ± 0.31#	20.41 ± 2.52#
黄芩苷溶液	100	0.88 ± 0.20*	2.32 ± 0.70*	18.32 ± 3.36

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

表 6 黄芩苷脂质体对 BEAS-2B 细胞 ROS 表达和线粒体功能的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 6 Effect of liposome aerosol inhalation of baicalin on ROS and mitochondrion function in BEAS-2B cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	质量浓度/(μg·mL ⁻¹)	ROS 相对表达量	线粒体超氧化物相对表达量	MMP 相对水平
对照	—	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.19
模型	—	3.75 ± 0.77*	1.34 ± 0.32*	0.63 ± 0.09*
黄芩苷脂质体	100	3.15 ± 0.92*#	1.19 ± 0.13*	0.77 ± 0.12*#
	200	2.55 ± 0.75*#	1.13 ± 0.13#	0.89 ± 0.10#
黄芩苷	200	3.16 ± 0.34*#Δ	1.29 ± 0.24*	0.72 ± 0.10*Δ

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$; 与黄芩苷脂质体高质量浓度组比较: Δ $P<0.05$ 。
* $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group; Δ $P<0.05$ vs liposome aerosol inhalation of baicalin high mass concentration group.

伤表型,黄芩苷脂质体雾化吸入对肺组织具有一定保护作用。同时,脂质体雾化吸入对肺损伤的保护作用优于溶液雾化吸入,提示脂质体包裹可提高黄芩苷生物利用度和治疗效果。

本研究探讨脂质体雾化吸入黄芩苷缓解 ARDS 肺损伤的机制,发现脂质体雾化吸入黄芩苷可通过降低 ARDS 小鼠 BALF 中 IL-6、TGF-β1 和 CCL2

等细胞因子的分泌来缓解 ARDS 症状,同时下调肺组织中上述细胞因子 mRNA 表达。细胞因子风暴引起的氧化损伤是 ARDS 患者死亡的重要原因,表现为脂质过氧化(MDA 含量升高及 SOD 失活)和 GSH 含量降低^[20-21]。感染引起线粒体功能障碍导致细胞能量耗竭、细胞内缺氧致使其功能丧失,是脓毒症并多器官功能障碍综合征的重要诱因。线粒体

功能障碍与氧化损伤密切相关, 过度氧化导致自由基过量产生和线粒体氧化应激, 从而损害线粒体膜及其功能^[22]。线粒体超氧化物是指线粒体内产生的一种高活性氧自由基, 具有强烈的氧化作用, 可引起脂质过氧化和蛋白质氧化, 导致细胞功能异常、DNA 损伤和细胞凋亡等。本研究发现, 黄芩苷脂质体雾化吸入可降低 ARDS 小鼠肺组织中的 MDA 水平, 上调 GSH 含量和 SOD 活性。在体外实验中证实, 黄芩苷脂质体可抑制 LPS 引起的肺上皮细胞 ROS 和线粒体超氧化物水平上调, 上调 LPS 引起的 MMP 下降。体内外实验提示, 黄芩苷脂质体对 ARDS 的治疗作用可能与恢复过度氧化应激导致的线粒体失能有关。

肺部曾经被认为是无菌的, 但是近年来的研究已证实肺部存在菌群定植。肺部健康的菌群微环境可通过产生抗菌物质抑制病原体定植, 有助于形成呼吸道黏膜免疫反应。当呼吸系统发生慢性阻塞性肺病、哮喘、肺炎、肺癌等病变时, 肺部菌群微环境会发生菌群组成失衡、多样性减少等改变, 进一步加重肺部症状^[23]。因此, 维持健康的肺部菌群微环境已经成为肺炎治疗的潜在手段。Motta 等^[24]和 Gennaro 等^[25]的研究均指出, ARDS 等肺病炎症患者肺脏中变形菌门和拟杆菌门相对丰度增加, 厚壁菌门相对丰度减少, 厚壁菌门/拟杆菌门失调^[24-25]。本研究发现, LPS 处理后小鼠肺部菌群的组成和多样性均发生了变化, 变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门等物种相对丰度发了改变, α 多样性下调以及菌群异质性增加。黄芩苷脂质体雾化吸入可显著缓解变形菌门和厚壁菌门相对丰度异常和厚壁菌门/拟杆菌门失调, 上调其 α 多样性并降低各组菌群异质性, 而黄芩苷溶液雾化吸入未见到肺部菌群组成和多样性的显著缓解, 表明与溶液雾化吸入相比, 黄芩苷脂质体具有纠正肺部菌群失衡的作用, 也是激素和抗生素等 ARDS 治疗手段所不具备的治疗机制。

本研究结果证实, 黄芩苷经脂质体包裹后雾化吸入可有效缓解 ARDS 导致的肺损伤, 其作用与减轻细胞因子分泌过量引起的氧化损伤、线粒体功能障碍和肺部菌群失衡有关。黄芩苷溶液雾化吸入虽然也具有一定上述活性, 但是其治疗效果弱于黄芩苷脂质体, 表明脂质体雾化吸入可黄芩苷提高生物利用度, 可能与脂质体包裹后可提高黄芩苷水溶性、使药物具备缓释作用、直接吸附呼吸道病灶并

增加药物滞留时间有关。本研究为黄芩苷脂质体雾化吸入剂的临床应用提供了理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Xu Y H, Xi Y, Cai S J, et al. Venovenous extracorporeal membrane oxygenation for COVID-19 and influenza H1N1 associated acute respiratory distress syndrome: A comparative cohort study in China [J]. J Intensive Med, 2023, 3(4): 326-334.
- [2] Yuan X Y, Zhao Z Q, Chao Y L, et al. Effects of early versus delayed application of prone position on ventilation-perfusion mismatch in patients with acute respiratory distress syndrome: A prospective observational study [J]. Crit Care, 2023, 27(1): 462.
- [3] Qin X, Wu Y L, Zhao Y, et al. Revealing active constituents within traditional Chinese Medicine used for treating bacterial pneumonia, with emphasis on the mechanism of baicalin against multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 321: 117488.
- [4] 龙宇. 黄芩苷脂质体对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤的保护作用及机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2021.
Long Y. Protective effect and mechanism of baicalin liposomes on lipopolysaccharide induced acute lung injury in mice [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2021.
- [5] Wang B H, Gao Y W, Sun L L, et al. Inhaled pulmonary surfactant biomimetic liposomes for reversing idiopathic pulmonary fibrosis through synergistic therapeutic strategy [J]. Biomaterials, 2023, 303: 122404.
- [6] Xiang Y, Long Y, Yang Q Y, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicity of Baicalin liposome on cerebral ischemia reperfusion injury rats via intranasal administration [J]. Brain Res, 2020, 1726: 146503.
- [7] Li N, Feng L L, Tan Y J, et al. Preparation, characterization, pharmacokinetics and biodistribution of baicalin-loaded liposome on cerebral ischemia-reperfusion after i.v. administration in rats [J]. Molecules, 2018, 23(7): 1747.
- [8] Li X M, Zhang X Y, Kang Y, et al. Scutellarein suppresses the production of ROS and inflammatory mediators of LPS-activated bronchial epithelial cells and attenuates acute lung injury in mice [J]. Antioxidants (Basel), 2024, 13(6): 710.
- [9] Deng L L, Ma M Y, Li S Y, et al. Protective effect and mechanism of baicalin on lung inflammatory injury in BALB/cJ mice induced by PM2.5 [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2022, 248: 114329.

- [10] 程瑶, 王远迎, 姚飞扬, 等. 黄芩苷通过调控 PI3K/AKT 信号通路抑制登革病毒感染诱导的人静脉内皮细胞的自噬 [J]. 南方医科大学学报, 2024, 44(7): 1272-1283.
- Cheng Y, Wang Y Y, Yao F Y, et al. Baicalin suppresses type 2 dengue virus-induced autophagy of human umbilical vein endothelial cells by inhibiting the PI3K/AKT pathway [J]. J South Med Univ, 2024, 44(7): 1272-1283.
- [11] 王佳梅, 易璐, 李雪珂, 等. 黄芩苷与黄芩素对结直肠癌多重调控作用的研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(2): 742-752.
- Wang J M, Yi L, Li X K, et al. Research progress of multiple regulatory effects of baicalin and baicalein on colorectal cancer [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(2): 742-752.
- [12] 侯晓杰, 张建锋, 侯长周, 等. 黄芩苷药理活性和作用机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(11): 2688-2696.
- Hou X J, Zhang J F, Hou C Z, et al. Research progress of pharmacological effects and mechanism of baicalin [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(11): 2688-2696.
- [13] Long Y, Xiang Y, Liu S Y, et al. Baicalin liposome alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice via inhibiting TLR4/JNK/ERK/NF- κ B pathway [J]. Mediators Inflamm, 2020, 2020: 8414062.
- [14] Adin S N, Gupta I, Aqil M, et al. Application of QbD based approach in development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of methotrexate and baicalin in dual-drug-loaded liposomes [J]. Biomed Chromatogr, 2023, 37(4): e5581.
- [15] Shahzad N, Alzahrani A R, Aziz Ibrahim I A, et al. Therapeutic strategy of biological macromolecules based natural bioactive compounds of diabetes mellitus and future perspectives: A systematic review [J]. Heliyon, 2024, 10(2): e24207.
- [16] Ponkshe P, Wang Y Z, Tan C. Systemic protein delivery via inhalable liposomes: Formulation and pharmacokinetics [J]. Pharmaceutics, 2023, 15(7): 1951.
- [17] Almurshedi A S, Almarshad S N, Bukhari S I, et al. A novel inhalable dry powder to trigger delivery of voriconazole for effective management of pulmonary aspergillosis [J]. Pharmaceutics, 2024, 16(7): 897.
- [18] Liu Y, Crowe W N, Wang L L, et al. Aerosolized immunotherapeutic nanoparticle inhalation potentiates PD-L1 blockade for locally advanced lung cancer [J]. Nano Res, 2023, 16(4): 5300-5310.
- [19] Liu H X, Yan L H, Niu H Y, et al. Effects of glutathione tablets on ferroptosis pathway and oxidative stress-related indexes in serum of patients undergoing sevoflurane inhalation general anesthesia and its clinical significance [J]. Altern Ther Health Med, 2024, 30(5): 249-255.
- [20] Cheng H P, Bao X W, Luo Y Y, et al. Sulfasalazine ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting oxidative stress and nuclear factor- κ B pathways [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2024, 169: 106530.
- [21] Huang Q R, Le Y, Li S S, et al. Signaling pathways and potential therapeutic targets in acute respiratory distress syndrome (ARDS) [J]. Respir Res, 2024, 25(1): 30.
- [22] Zhu W W, Liu X J, Luo L Q, et al. Interaction between mitochondrial homeostasis and barrier function in lipopolysaccharide-induced endothelial cell injury [J]. Int J Exp Pathol, 2023, 104(6): 272-282.
- [23] Mao B Y, Guo W L, Tang X, et al. Inosine pretreatment attenuates LPS-induced lung injury through regulating the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway *in vivo* [J]. Nutrients, 2022, 14(14): 2830.
- [24] Motta H, Reuwsaat J C V, Lopes F C, et al. Comparative microbiome analysis in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis [J]. Respir Res, 2024, 25(1): 211.
- [25] Gennaro D P, Brunella P, Flavio D M, et al. Lung microbiota composition, respiratory mechanics, and outcomes in COVID-19-related ARDS [J]. Microbiol Spectr, 2024, 12(4): 0357423.

[责任编辑 兰新新]