

汉黄芩素抑制 NLRP3 炎症小体活化改善脂多糖诱导小鼠急性肺损伤作用

刘霞¹, 初英杰¹, 张美琦¹, 罗政², 乔媛媛², 高艳松², 王遥^{1,3*}

1. 北京中医药大学 生命科学学院, 北京 100029

2. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100029

3. 北京中医药大学 北京中医药研究院, 北京 100029

摘要: 目的 基于核酸结合寡聚结构域 (NOD) 样受体热蛋白结构域 3 (NLRP3) 炎症小体的激活, 探究汉黄芩素对脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠急性肺损伤的治疗作用。方法 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组和汉黄芩素低、高剂量 (40、80 mg·kg⁻¹) 组, 汉黄芩素 ip 给药 3 d, 对照组和模型组 ip 等量 0.9% 氯化钠溶液。第 3 次给药 1 h 后给予模型组和汉黄芩素低、高剂量组小鼠 ip 25 mg·kg⁻¹ 的 LPS, 对照组 ip 等量 0.9% 氯化钠溶液。统计小鼠死亡情况, 绘制生存曲线; LPS 刺激 12 h 后监测小鼠呼吸频率; 苏木精-伊红 (HE) 染色检测肺组织病理变化; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测肺组织炎症相关白细胞介素-1 β (*Il1b*)、肿瘤坏死因子 α (*Tnfa*) mRNA 水平; Western blotting 检测小鼠肺组织 NLRP3、凋亡相关的斑点样蛋白 (ASC)、天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶-1 (cleaved Caspase-1)、Gasdermin D-NT (GSDMD-NT) 的蛋白表达。采用 200 ng·mL⁻¹ LPS 分别联合 4 mmol·L⁻¹ 三磷酸腺苷 (ATP)、500 mg·mL⁻¹ 明矾 (Alum) 或 1 μ mol·L⁻¹ 短杆菌肽 (Gra) 刺激 PMs 细胞构建经典的 NLRP3 炎症小体活化模型, Western blotting 检测汉黄芩素 (5、10、20 μ mol·L⁻¹) 对 NLRP3 炎症小体相关蛋白 NLRP3、cleaved Caspase-1、IL-1 β 和细胞焦亡相关蛋白 GSDMD-NT 表达的影响。结果 在小鼠急性肺损伤模型中, 与模型组比较, 汉黄芩素 80 mg·kg⁻¹ 组小鼠的死亡率显著降低 ($P < 0.05$); 汉黄芩素显著改善小鼠呼吸频率降低 ($P < 0.05$), 显著改善小鼠肺组织损伤 ($P < 0.001$), 显著降低肺组织 *Il1b* 和 *Tnfa* mRNA 表达水平 ($P < 0.001$), 显著降低肺组织 NLRP3、GSDMD-NT 蛋白的表达量 ($P < 0.01$ 、 0.001)。在细胞模型中, 与模型组比较, 汉黄芩素显著降低 IL-1 β 、cleaved Caspase-1、GSDMD-NT 蛋白的表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 汉黄芩素通过抑制 NLRP3 炎症小体活化改善 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤。

关键词: 汉黄芩素; NLRP3 炎症小体; 急性肺损伤; 炎症; 细胞焦亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)05-1114-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.05.004

Study on mechanism of wogonin inhibiting NLRP3 inflammasome activation to ameliorate LPS-induced acute lung injury in mice

LIU Xia¹, CHU Yingjie¹, ZHANG Meiqi¹, LUO Zheng², QIAO Yuanyuan², GAO Yansong², WANG Yao^{1,3}

1. School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To explore the therapeutic effects of wogonin on lipopolysaccharide (LPS) - induced acute lung injury in mice based on the activation of the nucleotide oligomerization domain (NOD) like receptor family pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome. **Methods** C57BL/6J mice were randomly divided into the control group, model group, and low-dose (40 mg·kg⁻¹) and high-dose (80 mg·kg⁻¹) wogonin groups. Wogonin was ip administered for 3 d, while the control and model groups were ip injected with the same volume of 0.9% sodium chloride solution. One hour after the third administration, the model group and the low-dose and high-dose wogonin groups were ip injected with 25 mg·kg⁻¹ LPS, and the control group was ip injected with the same volume of

收稿日期: 2024-10-28

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82474153); 2023 年度北京中医药大学-优莎纳联合研究中心 (BURC) 基金重点项目 (BUCM-2022-JS-KF-003)

作者简介: 刘霞 (2000—), 硕士研究生, 研究方向为中药抗炎免疫药理。E-mail: xialiu0203@163.com

*通信作者: 王遥, 博士, 教授, 研究方向为中医药免疫学。E-mail: yaowang@bucm.edu.cn

0.9% sodium chloride solution. The mortality of mice was recorded, and the survival curve was plotted. The respiratory rate of mice was monitored 12 hours after LPS stimulation. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect the pathological changes of lung tissue. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the mRNA levels of inflammation-related interleukin-1 β (*Il1b*) and tumor necrosis factor α (*Tnfa*) in lung tissue. Western blotting was used to detect the protein expression of NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein (ASC), cleaved caspase-1, and gasdermin D-NT (GSDMD-NT) in mouse lung tissue. PMs cells were stimulated with 200 ng·mL⁻¹ LPS in combination with 4 mmol·L⁻¹ ATP, 500 mg·mL⁻¹ Alum, or 1 μ mol·L⁻¹ nigericin to establish a classic NLRP3 inflammasome activation model. Western blotting was used to detect the effects of wogonin (5, 10, and 20 μ mol·L⁻¹) on the expression of NLRP3 inflammasome-related proteins NLRP3, cleaved caspase-1, IL-1 β , and pyroptosis-related protein GSDMD-NT. **Results** In the acute lung injury model of mice, compared with the model group, the mortality rate of the 80 mg·kg⁻¹ wogonin group was significantly reduced ($P < 0.05$); wogonin significantly improved the decreased respiratory rate of mice ($P < 0.05$), significantly improved lung tissue injury ($P < 0.001$), significantly reduced the mRNA expression levels of *Il1b* and *Tnfa* in lung tissue ($P < 0.001$), and significantly reduced the protein expression levels of NLRP3 and GSDMD-NT in lung tissue ($P < 0.01, 0.001$). In the cell model, compared with the model group, wogonin significantly reduced the expression levels of IL-1 β , cleaved caspase-1, and GSDMD-NT proteins ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** Wogonin ameliorates LPS induced acute lung injury in mice through the inhibition of NLRP3 inflammasome activation.

Key words: wogonin; NLRP3 inflammasome; acute lung injury; inflammation; cell pyroptosis

急性肺损伤是脓毒症患者常见的并发症之一，其特征是肺部炎症细胞大量浸润、伴随肺泡上皮细胞和内皮细胞损伤，是一种高病死率的临床肺部疾病^[1-2]。核酸结合寡聚结构域 (NOD) 样受体热蛋白结构域 3 (NLRP3) 炎症小体的激活在急性肺损伤的发生与进展中发挥重要的作用^[3]。首先，肺组织在肺部感染、肺挫伤等直接肺损伤因素或严重感染、非胸部创伤等间接肺损伤因素的作用下，诱导肺泡巨噬细胞 NLRP3 炎症小体活化，产生白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和白细胞介素-18 (IL-18)，并伴随产生细胞焦亡，同时募集中性粒细胞、T 细胞到感染部位，导致促炎因子的大量成熟及过度分泌^[4]，不可控的炎症反应破坏肺泡-毛细血管膜屏障，导致急性肺损伤的发生。中医认为，在脓毒症引发急性肺损伤过程中，多伴有邪热内蕴、火毒炽盛的特点^[5]。《太平圣惠方》中记载在治疗脓毒症以及由此引发的急性肺损伤时，使用频次最多的 5 味中药为大黄、黄芩、甘草、栀子、麦冬^[6]。在黄连解毒汤治疗脓毒症及其并发症过程中，黄芩作为臣药发挥清泻上焦心肺之火的效用^[7]。

汉黄芩素是黄芩中的主要黄酮类化合物之一，具有抗氧化、抗菌、抗炎、抗病毒等多种保护作用^[8-9]。研究表明，汉黄芩素可通过抑制 NLRP3 炎症小体活化改善多种炎症相关疾病。如汉黄芩素通过腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) / 沉寂信息调节因子 (SIRT1) 信号通路抑制 NLRP3 炎症小体，从而改善缺血性脑损伤引起的炎症^[10]；通过抑制磷脂

酰肌醇-3-激酶 (PI3K) / 蛋白激酶 B (AKT) 信号通路调控 NLRP3 炎症小体的活化抑制心肌细胞凋亡、心肌纤维化和炎症反应改善冠心病老年大鼠心肌损伤^[11]。然而，基于 NLRP3 炎症小体活化探究汉黄芩素对急性肺损伤小鼠的治疗作用还未有研究。

本研究构建急性肺损伤小鼠模型和经典的小鼠腹腔巨噬 (PMs) 细胞 NLRP3 炎症小体活化模型，揭示汉黄芩素通过抑制 NLRP3 炎症小体的过度激活改善小鼠急性肺损伤的作用与机制，为脓毒症引发的急性肺损伤的药物研发与精准用药提供参考。

1 材料

1.1 药品与主要试剂

汉黄芩素 (质量分数 $\geq 98\%$ ，货号 PS0692-0010) 购于成都普思生物股份有限公司；二甲基亚砜 (DMSO，货号 D4540) 购于 Sigma 公司；转染试剂聚乙烯亚胺 (PEI，货号 BMS1003-A)、Trizol Reagent (货号 15596018) 购于 Invitrogen 公司；Evo M-MLV RT Kit (货号 AG11711)、SYBR[®] Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit (货号 AG11701) 购于湖南艾科瑞生物工程有限公司；DMEM 高糖培养基 (货号 C11995500CP)、青霉素-链霉素 (10 000 U·mL⁻¹，货号 15140-122)、胎牛血清 (FBS，货号 2358184P) 购于 Gibco 公司；CCK-8 细胞增殖-毒性检测试剂盒 (货号 CK04) 购于东仁化学科技 (上海) 有限公司；抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (货号 10494-1-AP) 购于武汉三鹰生物技术有

限公司；羊抗兔 IgG-HRP（货号 M21002）购于艾比玛特医药科技（上海）有限公司；羊抗鼠 IgG-HRP（货号 GB23301）购于武汉赛维尔生物科技有限公司；异氟烷（货号 R50-22-10）购于深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司；Anti-NLRP3（货号 AG-20B-0014-C100）、Anti-IL-1 β （货号 12242S）、Anti-凋亡相关的斑点样蛋白（ASC，货号 AG-25B-006-C100）抗体购于北京拜尔迪生物技术有限公司；Anti-Gasdermin D（GSDMD，货号 ab209845）抗体购于 Abcam 公司；Anti-天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白水解酶-1（Caspase-1，p10，货号 ab179515-100 μ L）抗体购于 Abcam 公司；羊抗兔 IgG-HRP（货号 M21002）购于艾比玛特医药科技（上海）有限公司；超敏 ELC 发光液（货号 WBKLS0500）购于美国 Millipore 公司；脂多糖（LPS，货号 L2880）购于美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠，6~8 周龄，体质量 20~22 g，购自斯贝福（北京）生物技术有限公司，实验动物生产许可证号 SCXK（京）2019-0010，小鼠饲养于温度 18~22 $^{\circ}$ C、相对湿度 50%~60%，自由进食饮水，动物于 12 h 昼夜交替环境下适应性喂养 1 周。本实验经北京中医药大学伦理委员会审查通过，伦理号为 BUCM-2024092403-3231。

1.3 主要仪器

CFX96 荧光定量 PCR 仪、T100 型 PCR 仪购于美国 BIO-RAD 公司；NanoDrop ONEC 型分光光度计、SorvallTM LegendTM Micro 21R 微量离心机购于美国 Thermo 公司；Spectra Max i3x 多功能酶标仪购于美谷分子仪器（上海）有限公司；Mill-Q 超纯水仪购于美国 Millipore 公司；ZHCH-C1115B 超净工作台购于上海智城分析仪器制造有限公司；DK-8D 型电热恒温水槽购于上海一恒科技有限公司；SK-L 180-Pro 数控线性摇床购于大龙兴创实验仪器（北京）股份公司；EPS-300 数显式稳压稳流电泳仪购于天能公司；SCI-VS 型可调式混匀仪购于美国 SCILOGEX 公司；Power Pac 型基础电泳仪购于美国 Bio-rad 公司；1300 Series A2 型生物安全柜、Heracell 15i 型 CO₂ 培养箱购于美国 Thermo 公司；CKX53 型倒置显微镜购于日本 Olympus 公司。

2 方法

2.1 LPS 诱导小鼠模型制备及给药

将小鼠随机分为对照组、模型组和汉黄芩素

低、高剂量（40、80 mg·kg⁻¹）组，每组 5 只。汉黄芩素 ip 给药 3 d（每只 100 μ L），对照组和模型组 ip 等量 0.9%氯化钠溶液。第 3 次给药 1 h 后予以模型组和汉黄芩素低、高剂量组小鼠 ip 25 mg·kg⁻¹ 的 LPS^[12]，对照组 ip 0.9%氯化钠溶液。造模前及造模后定时观察记录小鼠的饮食、毛色、精神状态、呼吸、体质量变化及死亡情况。在符合伦理道德情况下，当小鼠体质量较感染前下降超过 20%即视为死亡^[13]，统计小鼠死亡情况，绘制生存曲线。

2.2 小鼠呼吸频率监测

另取 15 只小鼠随机分为对照组、模型组和汉黄芩素 80 mg·kg⁻¹ 组，每组 5 只。造模及给药方法同“2.1”项，每组取 3 只小鼠，在 LPS 刺激 0、12 h 时，当小鼠处于相对安静的状态，每只小鼠同时由 3 位观察人员通过肉眼观察并记录其 1 min 内的呼吸次数，每只小鼠的呼吸频率取 3 位观察人员计数的平均值^[14]。

2.3 肺组织病理学观察及评分

呼吸频率监测实验结束后，每组取 5 只小鼠处死，取左肺组织于 4%多聚甲醛中固定，脱水、透明、石蜡包埋，制备组织切片，切片厚度 3~5 μ m，进行苏木精-伊红（HE）染色、封片后，于显微镜下观察肺组织病理学变化。采用 Smith 评分方法^[15]对肺水肿、肺泡以及间质炎症、肺泡及间质出血、肺不张和透明膜形成分别进行 0~4 分半定量分析：无损伤，0 分；病变范围 <25%，1 分；25% \leq 病变范围 <50%，2 分；50% \leq 病变范围 <75%，3 分；75% \leq 病变范围 \leq 100%，4 分。总肺损伤评分为上述各项之和，每只动物观察 10 个高倍镜视野，取其平均值。

2.4 实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）法检测汉黄芩素对小鼠肺组织中炎症因子 *Il1b*、肿瘤坏死因子 α （*Tnfa*）mRNA 表达的影响

取适量的肺组织于试管中，加入 Trizol Reagent 用组织匀浆仪打碎组织，提取 RNA 并合成 cDNA，进行 qRT-PCR 分析，检测相关基因的表达。相关引物序列见表 1。

2.5 Western blotting 法检测小鼠肺组织中 NLRP3、GSDMD-NT 蛋白的表达水平

取适量的肺组织于试管中，匀浆，加 IP 裂解液冰上充分裂解 30 min，4 $^{\circ}$ C 离心取上清，BCA 法测定蛋白浓度，加入 5 \times Loading Buffer 100 $^{\circ}$ C 金属浴 10 min 使蛋白变性。制备十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	序列 (5'→3')	
<i>Actb</i>	F-GTGACGTTGACATCCGTAAGA	R-GCCGGACTCATCGTACTCC
<i>Tnfa</i>	F- CCTGTAGCCCACGTCGTAG	R- GGGAGTAGACAAGGTACAACCC
<i>Il1b</i>	F-CTGTGACTCATGGGATGATGATG	R-CGGAGCCTGTAGTGCAGTTG

胺凝胶(SDS-PAGE),上样后进行 SDS-PAGE 电泳,湿法转膜后 5% BSA 封闭 1 h,于 4 °C 过夜孵育一抗 Anti-NLRP3 (1:1 000)、Anti-ASC (1:1 000)、Anti-GSDMD (1:1 000),然后室温孵育羊抗兔二抗 (1:5 000) 1 h,加入 ECL 化学发光试剂,于凝胶成像仪中曝光显影。

2.6 PMs 细胞制备

按照胎牛血清 0.1 g、0.5 mol·L⁻¹ EDTA 0.1 mL、磷酸盐缓冲液 (PBS) 100 mL 体系提前配制腹腔灌洗液备用。小鼠 ip 2 mL 3% 硫乙醇酸盐培养基,ip 后 24 h 对小鼠进行禁食不禁水处理,ip 后 48 h 将小鼠处死,四肢固定于超净工作台解剖板上,腹部涂抹酒精消毒。随后在小鼠生殖器上方剪开小口,充分打开腹腔并固定于两侧,注意避免戳破腹膜。在腹腔膜上开一小口,用镊子提起膜缘,右手持移液枪吸取 800 μL 洗液 (注意避免脂肪堵塞枪头),将枪头插入开口中,注入灌洗液并轻轻吹打后吸出灌洗液 (枪头尖尽量贴腹膜壁以减少脂肪吸入)。反复操作,直至注入 10 mL 腹腔灌洗液,将吸出的灌洗液置于冰上保存。随后将吸出的灌洗液在 4 °C、300×g 离心 10 min,倒掉上清后用 2 mL PBS 重悬,再加入 5 mL PBS,以 500×g 在 4 °C 离心 5 min。最后倒掉上清,用 2 mL DMEM 完全培养基重悬,进行细胞计数并铺板。整个过程严格遵循无菌操作,确保实验结果的可靠性。

2.7 汉黄芩素对腹腔巨噬细胞活力测定

汉黄芩素 10 mg 加入 351.8 μL DMSO 溶解为 100 mmol·L⁻¹ 母液,分装后储存于 -20 °C 备用;使用时用 DMEM 完全培养基稀释至使用浓度。

PMs 细胞以每孔 1.5×10⁵ 个的密度接种于 96 孔板,培养过夜使细胞完全贴壁;配制 0 (对照)、5、10、20、40、80、160、250 μmol·L⁻¹ 浓度的汉黄芩素加入细胞中,于 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱中培养;24 h 后,向每孔细胞加入 10 μL CCK-8 试剂孵育 30 min,无细胞孔为空白孔,使用酶标仪测定 450 nm 处吸光度 (A) 值,计算细胞相对存活率。

$$\text{细胞相对存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.8 Western blotting 法检测 PMs 细胞中 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达水平

以每孔 1.5×10⁶ 个的密度接种 PMs 细胞于 12 孔板中,37 °C 培养 2 h 后,去除不贴壁细胞,设置对照组、模型组、汉黄芩素组,汉黄芩素组加 5、10、20 μmol·L⁻¹ 汉黄芩素预处理,4 h 后全换液,除对照组外,加 LPS (200 ng·mL⁻¹) 刺激细胞,汉黄芩素组加药共同孵育,4 h 后全换液,除对照组外,分别加三磷酸腺苷 (ATP, 4 mmol·L⁻¹)、明矾 (Alum, 500 mg·mL⁻¹)、短杆菌肽 (Gra, 1 μmol·L⁻¹) 处理细胞 1 h^[11]。收集细胞,加 IP 裂解液冰上充分裂解细胞 30 min,4 °C 离心取上清,BCA 法测定蛋白浓度,加入 5×Loading Buffer 100 °C 金属浴 10 min 使蛋白变性。制备聚丙烯酰胺凝胶,上样后进行 SDS-PAGE 电泳,湿法转膜后 5% BSA 封闭 1 h,于 4 °C 过夜孵育一抗 Anti-NLRP3 (1:1 000)、Anti-IL-1β (1:1 000)、Anti-Caspase-1 (p10) (1:2 000)、Anti-GSDMD (1:1 000),然后室温孵育羊抗兔二抗 (1:5 000) 1 h,加入 ECL 化学发光试剂,于凝胶成像仪中曝光显影。

2.9 数据处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析,两组样本间通过双尾非配对 *t* 检验进行比较,多组样本使用单因素方差分析进行组间比较。

3 结果

3.1 汉黄芩素对 LPS 诱导小鼠存活率的影响

为了探究汉黄芩素在小鼠体内是否改善小鼠的急性肺损伤,构建了 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤模型。如图 1 所示,模型组小鼠在感染后 41 h 开始出现死亡,到 48 h 全部死亡。汉黄芩素 40、80 mg·kg⁻¹ 组小鼠在感染后 41 h 开始死亡,与模型组相比,汉黄芩素 80 mg·kg⁻¹ 组小鼠的死亡率显著减少,两组之间存在显著差异 ($P < 0.05$),表明汉黄芩素能改善 LPS 诱导急性肺损伤小鼠的存活率。

3.2 汉黄芩素对 LPS 诱导小鼠呼吸频率的影响

根据汉黄芩素对 LPS 诱导小鼠存活率的影响, 后续体内实验选取 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量。小鼠的呼吸频率变化如图 2 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠呼吸频率显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 汉黄芩素组小鼠呼吸频率显著升高 ($P < 0.05$)。汉黄芩素治疗能显著改善小鼠的呼吸频率, 改善小鼠肺功能。

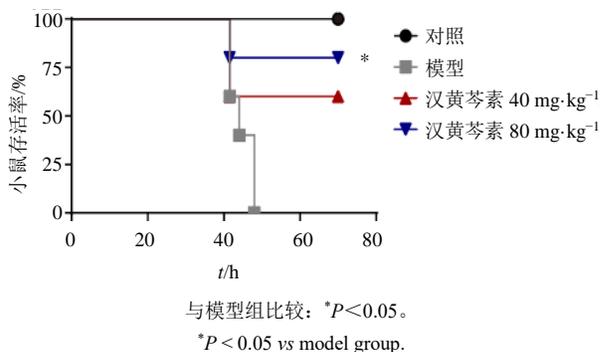
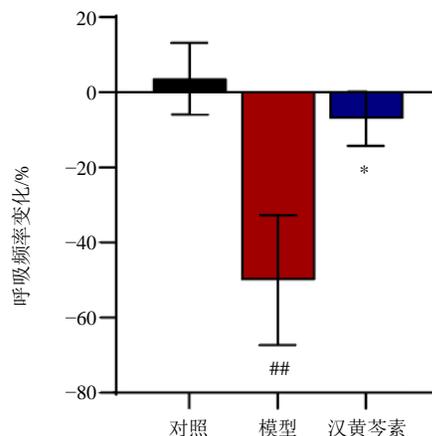


图 1 汉黄芩素对 LPS 诱导小鼠存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 1 Effect of wogonin on survival rate of LPS induced mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

3.3 汉黄芩素对 LPS 诱导小鼠肺组织损伤的影响

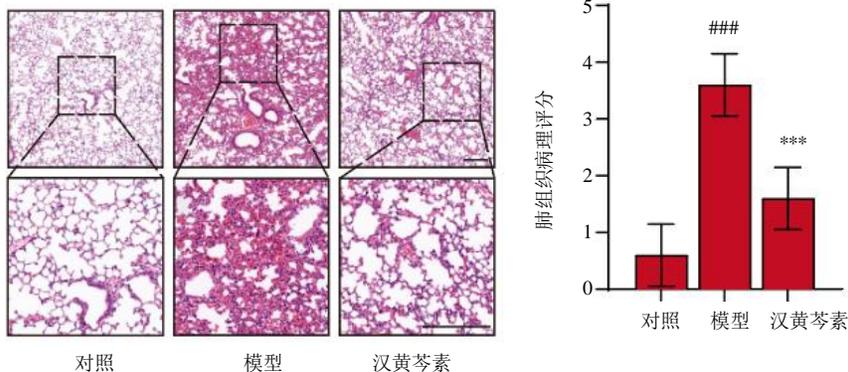
在 LPS 刺激 12 h 后, 取出小鼠的肺组织, HE 染色结果如图 3 所示, 对照组小鼠肺组织肺泡壁结构清晰, 未见明显的炎症改变; 模型组小鼠肺泡间



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 2 汉黄芩素对 LPS 诱导小鼠呼吸频率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of wogonin on LPS induced respiratory rate in mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)



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.

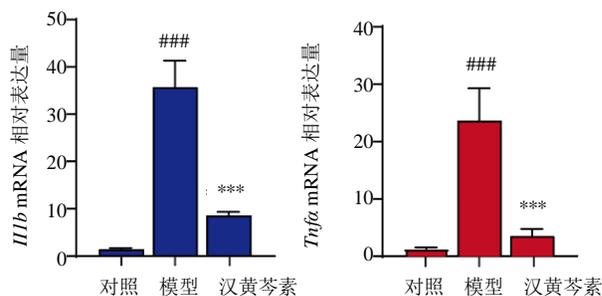
图 3 汉黄芩素对 LPS 诱导小鼠肺组织损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 3 Effect of wogonin on LPS induced lung tissue injury in mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

隔增厚, 肺泡腔变小, 肺泡水肿充血, 炎症细胞浸润严重; 与模型组比较, 汉黄芩素组肺组织结构损伤减轻, 包括肺水肿、肺泡壁增厚减轻, 炎症细胞浸润减少。与对照组比较, 模型组肺组织损伤评分显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 汉黄芩素组肺组织损伤评分均显著降低 ($P < 0.001$)。汉黄芩素治疗后可显著减轻 LPS 刺激引起的肺部炎症损伤。

3.4 汉黄芩素对 LPS 诱导小鼠肺组织中 *Il1b*、*Tnfa* mRNA 表达的影响

LPS 刺激引起的急性肺损伤与肺组织中炎症因子表达的升高有关^[16]。如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织中 *Il1b* 和 *Tnfa* mRNA 表达明显升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 汉黄芩素组 *Il1b* 和 *Tnfa* mRNA 表达明显降低 ($P < 0.001$)。结果表明汉黄芩素能显著减轻急性肺损伤小鼠的炎症反应。

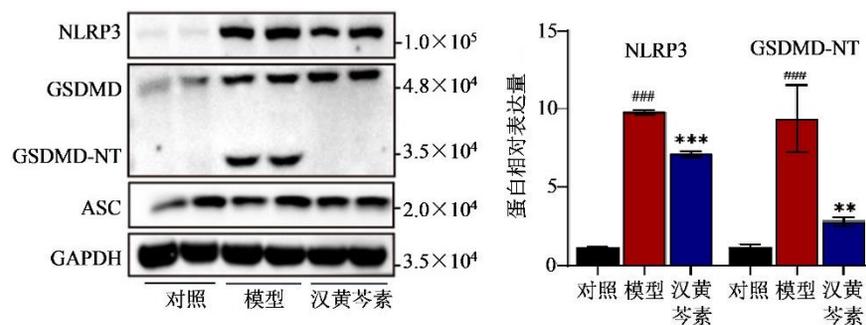


与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: *** $P < 0.001$ 。

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

图 4 汉黄芩素对 LPS 诱导小鼠肺组织中 *Il1b*、*Tnfa* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 4 Effect of wogonin on expression of *Il1b* and *Tnfa* mRNA in LPS induced mouse lung tissue ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)



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 5 汉黄芩素对 LPS 诱导小鼠肺组织 NLRP3 炎症小体及细胞焦亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effects of baicalein on expression of NLRP3 inflammasomes and pyroptosis-related proteins in LPS-induced lung tissue of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.6 汉黄芩素对 PMs 细胞活力的影响

如图 6 所示, 汉黄芩素 $250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下不影响 PMs 细胞的存活率。后续选取无细胞毒性的低、中、高浓度 (5 、 10 、 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 进行实验。

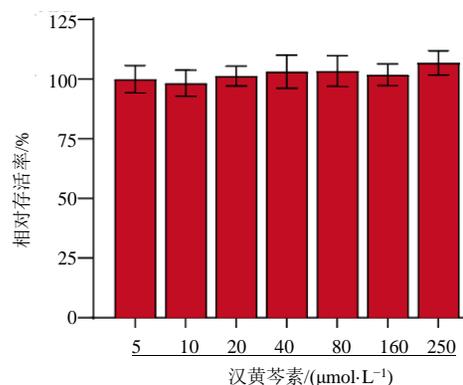


图 6 汉黄芩素对 PMs 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Effect of wogonin on survival rate of PMs cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.5 汉黄芩素对 LPS 诱导小鼠肺组织 NLRP3 炎症小体及细胞焦亡相关蛋白表达的影响

为进一步阐明汉黄芩素对小鼠急性肺损伤的作用, 通过 Western blotting 检测急性肺损伤小鼠肺中 NLRP3 炎症小体相关蛋白及 NLRP3 炎症小体激活后引起的 GSDMD 的剪切片段 GSDMD-NT 蛋白的表达水平。如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织 NLRP3、GSDMD-NT 蛋白的表达量显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 汉黄芩素组 NLRP3、GSDMD-NT 蛋白的表达量显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。结果表明汉黄芩素能显著改善急性肺损伤小鼠肺组织中因 NLRP3 炎症小体过度活化引起的焦亡。

3.7 汉黄芩素对 PMs 细胞中 NLRP3 通路相关蛋白表达的影响

如图 7-A 所示, 与对照组比较, LPS 联合 ATP 诱导的 PMs 细胞中 cleaved Caspase-1 与 IL-1 β 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, 10 、 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 汉黄芩素显著降低 cleaved Caspase-1 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 5 、 10 、 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 汉黄芩素显著降低 IL-1 β 蛋白表达水平 ($P < 0.001$), 且呈浓度相关性。但是给药后, NLRP3 蛋白未见明显降低, 分析原因可能为, NLRP3 在静息状态下通过 LRR 结构域自我抑制, 激活时通过解除自我抑制形成多聚体, 表现为活化形式, Western blotting 检测总 NLRP3 蛋白难以区分活性与非活性形式; 并且 NLRP3 炎症小体激活的关键标志包括 Caspase-1 的剪切 (p20/p10 片段)、成熟 IL-1 β 的释放等。检测 NLRP3 炎症小体活化更需关注下

游效应分子而非 NLRP3 的蛋白表达量, 因此本研究没有对 NLRP3 蛋白的表达水平进行量化分析。

如图 7-B 所示, 与对照组比较, 用 LPS 联合 Gra 或 Alum 诱导的 PMs 细胞中 cleaved Caspase-1 与 IL-1 β 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.001$); 与模

型组比较, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 汉黄芩素处理均显著降低了 cleaved Caspase-1 与 IL-1 β 蛋白的表达水平 ($P < 0.001$)。结果表明汉黄芩素抑制 LPS 联合第二信号刺激后 PMs 细胞中 NLRP3 炎症小体的活化, 并抑制后续炎症因子的分泌。

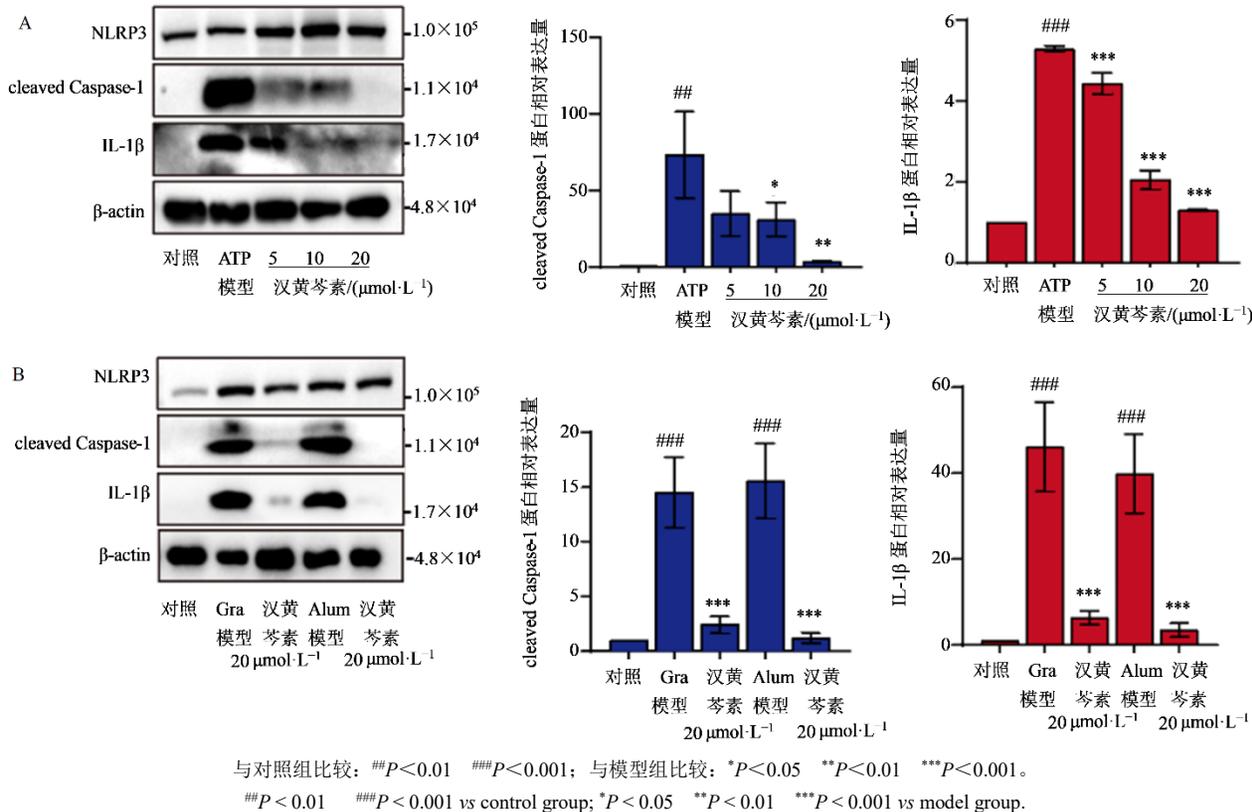


图 7 汉黄芩素对 LPS 联合 ATP (A)、Gra、Alum (B) 诱导的 PMs 细胞中 NLRP3 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 7 Effect of wogonin on expression of NLRP3 pathway-related proteins in PMs cells induced by LPS combined with ATP (A), Gra, and Alum (B) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.8 汉黄芩素对 PMs 细胞焦亡相关蛋白表达的影响

如图 8-A 所示, 与对照组比较, LPS 联合 ATP 刺激的 PMs 细胞中介导焦亡标志性蛋白 GSDMD-NT 表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 汉黄芩素显著降低 GSDMD-NT 蛋白表达水平 ($P < 0.001$)。与对照组比较, 用 LPS 联合 Gra 或 Alum 诱导的 PMs 细胞中, 模型组 GSDMD-NT 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 汉黄芩素 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 GSDMD-NT 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$)。结果表明, 汉黄芩素显著抑制 NLRP3 炎症小体活化导致的细胞焦亡。

4 讨论

急性肺损伤是严重的临床肺部疾病, 表现为肺部对各种损伤因素的炎症反应, 导致肺泡毛细血管

膜损伤和肺水肿^[17]。其主要诱因包括 (但不限于) 严重感染、创伤后肺部或全身的不可控炎症^[18]。首先, 局部炎症反应诱导炎症细胞迁移到感染或损伤部位, 释放大量促炎细胞因子和细胞毒介质, 增加血管通透性和诱导上皮细胞损伤, 导致间质、肺泡水肿以及透明膜发育^[19-20]。此外, 血管黏附因子的表达增加诱发了炎症的级联放大效应^[21]。研究表明, 适度的炎症反应有助于感染的清除和损伤的修复, 然而过度的炎症反应则是诱导急性肺损伤发生的重要原因^[22]。大量证据表明, NLRP3 炎症小体激活与过度的炎症反应及急性肺损伤发病机制密切相关^[23-24]。

NLRP3 炎症小体作为固有免疫的重要组分在机体免疫反应和疾病发生过程中具有重要作用^[25]。被多种类型的病原体或危险信号激活后, Caspase-1

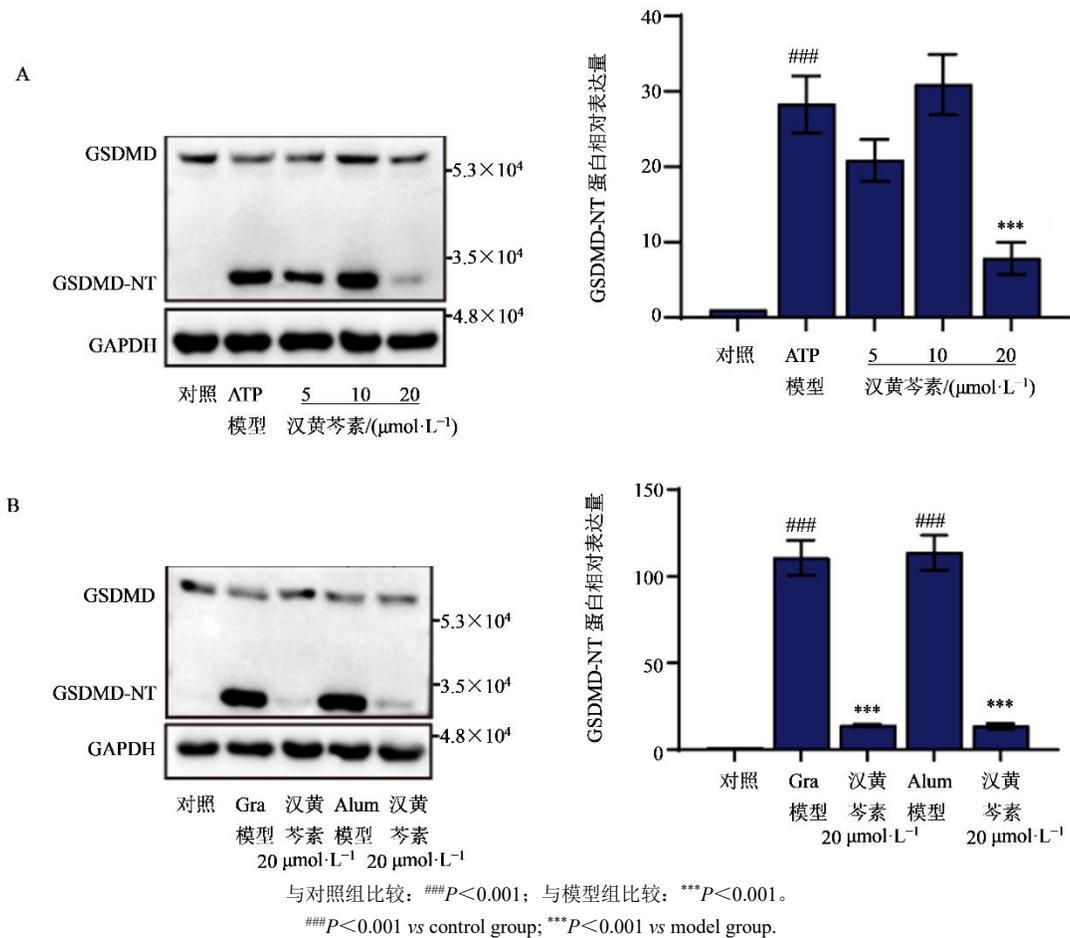


图 8 汉黄芩素对 LPS 联合 ATP (A)、Gra、Alum (B) 诱导的 PMs 细胞焦亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Fig. 8 Effect of wogonin on expression of pyroptosis-related proteins in PMs cells induced by LPS combined with ATP (A), Gra, and Alum (B) ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

剪切前体形式的 IL-1 β 和 IL-18, 使 IL-1 β 和 IL-18 等促炎细胞因子成熟、释放, 同时, Caspase-1 剪切 GSDMD, 诱发细胞焦亡^[26-27], 这对于宿主防御病原体和维持内环境稳定至关重要。然而, NLRP3 炎症小体的过度激活也会导致多种炎症性疾病, 包括腹膜炎、动脉粥样硬化、2 型糖尿病和神经退行性疾病等^[28]。因此, 作为炎症反应的核心, NLRP3 炎症小体可能为各种炎症性疾病的治疗提供新的靶点。黄芩, 味苦性寒, 入肺、胃、胆、大肠经。其中, 黄酮是其重要的药效成分。如黄芩苷和黄芩素具有显著的抑制炎症作用^[29-30]。汉黄芩素, 作为黄芩的另一种主要黄酮成分, 其抗炎活性明确。然而, 其抗炎的详细分子机制及其对 NLRP3 炎症小体的调控功能不清。本研究构建急性肺损伤小鼠模型和经典的原代 PMs 细胞 NLRP3 炎症小体活化模型, 在体内外探究汉黄芩素对急性肺损伤的治疗作用及其对 NLRP3 炎症小体活化的调控功能。

结果显示, 与模型组相比, 汉黄芩素组小鼠肺组织中中性粒细胞聚集、肺泡坍塌变形及肺组织中巨噬细胞坏死等肺组织损伤情况被显著改善; 汉黄芩素抑制急性肺损伤小鼠体内大量促炎细胞因子的释放, 发挥显著的抗炎作用。在原代 PMs 细胞 NLRP3 炎症小体活化模型中, 汉黄芩素能够显著抑制 cleaved Caspase-1、IL-1 β 和 GSDMD-NT 蛋白的表达水平, 抑制 NLRP3 炎症小体的活化和由此引发的细胞焦亡。因此, 推测汉黄芩素可以通过抑制 NLRP3 炎症小体过度活化, 改善脓毒症引起的急性肺损伤。

本研究初步阐明了汉黄芩素抑制 NLRP3 炎症小体活化的抗炎分子机制, 在体内证明其治疗脓毒症引起的急性肺损伤的新药理活性, 为汉黄芩素的潜在临床应用提供实验数据支持, 为相关药物在治疗急性肺损伤的药物研发提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] D'Alessandro-Gabazza C N, Yasuma T, Kobayashi T, et al. Inhibition of lung microbiota-derived proapoptotic peptides ameliorates acute exacerbation of pulmonary fibrosis [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1558.
- [2] Pang L, Liu C Y, Gong G H, et al. Synthesis, *in vitro* and *in vivo* biological evaluation of novel lappaconitine derivatives as potential anti-inflammatory agents [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(4): 628-645.
- [3] Song X L, Zhang J J, Li J, et al. Acetylated polysaccharides from *Pleurotus geesteranus* alleviate lung injury via regulating NF- κ B signal pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8): 2810.
- [4] Chen T, Zhang Z, Weng D, et al. Ion therapy of pulmonary fibrosis by inhalation of ionic solution derived from silicate bioceramics [J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(10): 3194-3206.
- [5] Li J S, Chen Y L, Yu X Q, et al. Diagnosis and treatment guideline for Chinese medicine on acute Trachea-bronchitis [J]. *J Evid Based Med*, 2021, 14(4): 333-345.
- [6] 兰悦嘉, 孟宪丽, 吴嘉思. 黄芩素调控 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路介导的焦亡减轻小鼠急性肺损伤作用 [J]. *中草药*, 2023, 54(20): 6694-6703.
- [7] Lan Y J, Meng X L, Wu J S. Baicalein alleviates acute lung injury in mice by regulating NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway mediated pyroptosis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(20): 6694-6703.
- [8] Wang K X, Gao Y, Gong W X, et al. A novel strategy for decoding and validating the combination principles of Huanglian Jiedu decoction from multi-scale perspective [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 567088.
- [9] Feng Y, Ju Y R, Yan Z J, et al. Protective role of wogonin following traumatic brain injury by reducing oxidative stress and apoptosis via the PI3K/Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2022, 49(4): 53.
- [10] 王斯楚, 孙一, 王晓溪, 等. 汉黄芩素对肺炎支原体肺炎小鼠肺组织中肺上皮间质形成因子表达的影响 [J]. *中草药*, 2023, 54(1): 172-180.
- [11] Wang S C, Sun Y, Wang X X, et al. Effect of wogonin on expression of lung epithelial-mesenchymal formation factor in lung tissue of mycoplasma pneumoniae pneumonia mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(1): 172-180.
- [12] Cheng Z J, Tu J L, Wang K, et al. Wogonin alleviates NLRP3 inflammasome activation after cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating AMPK/SIRT1 [J]. *Brain Res Bull*, 2024, 207: 110886.
- [13] 蒲俊, 何文凤, 胡厚祥. 汉黄芩素调控 PI3K/AKT 信号通路抑制 NLRP3 炎症小体活化改善老年冠心病大鼠心功能及心肌损伤 [J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(23): 5853-5859.
- [14] Pu J, He W F, Hu H X. Wogonin regulates PI3K/AKT signaling pathway, inhibits activation of NLRP3 inflammatory corpuscles and improves cardiac function and myocardial injury in elderly rats with coronary heart disease [J]. *Chin J Gerontol*, 2024, 44(23): 5853-5859.
- [15] 初英杰, 刘霞, 李琪琪, 等. 金合欢素抑制 NLRP3 炎症小体与细胞焦亡改善急性肺损伤的研究 [J]. *药物评价研究*, 2025, 48(4): 800-808.
- [16] Chu Y J, Liu X, Li Q Q, et al. Research on inhibition of NLRP3 inflammasome and pyroptosis by acacetin in improvement of acute lung injury [J]. *Durg Eval Res*, 2025, 48(4): 800-808.
- [17] Sia Z R, He X D, Zhang A L, et al. A liposome-displayed hemagglutinin vaccine platform protects mice and ferrets from heterologous influenza virus challenge [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(22): e2025759118.
- [18] Dai J M, Guo W N, Tan Y Z, et al. Wogonin alleviates liver injury in sepsis through Nrf2-mediated NF- κ B signalling suppression [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(12): 5782-5798.
- [19] 刘泽茹, 宋磊, 李丹. 急性肺损伤实验动物模型的特征和评价方法 [J]. *中国实验诊断学*, 2017, 21(6): 1100-1102.
- [20] Liu Z R, Song L, Li D. Characteristics and evaluation method of experimental animal model of acute lung injury [J]. *Chin J Lab Diagn*, 2017, 21(6): 1100-1102.
- [21] Guo Y X, Liu Y R, Zhao S H, et al. Oxidative stress-induced FABP5 S-glutathionylation protects against acute lung injury by suppressing inflammation in macrophages [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 7094.
- [22] Wu J, Song D Y, Li Z W, et al. Immunity-and-matrix-regulatory cells derived from human embryonic stem cells safely and effectively treat mouse lung injury and fibrosis [J]. *Cell Res*, 2020, 30(9): 794-809.
- [23] Cillo A R, Somasundaram A, Shan F, et al. People critically ill with COVID-19 exhibit peripheral immune profiles predictive of mortality and reflective of SARS-CoV-2 lung viral burden [J]. *Cell Rep Med*, 2021, 2(12): 100476.
- [24] Amo-Aparicio J, Garcia-Garcia J, Francos-Quijorna I, et al. Interleukin-4 and interleukin-13 induce different metabolic profiles in microglia and macrophages that relate with divergent outcomes after spinal cord injury [J]. *Theranostics*, 2021, 11(20): 9805-9820.
- [25] Chen H, Li Y S, Wu J F, et al. RIPK3 collaborates with GSDMD to drive tissue injury in lethal polymicrobial

- sepsis [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(9): 2568-2585.
- [21] Calvier L, Demuth G, Manouchehri N, et al. Reelin depletion protects against autoimmune encephalomyelitis by decreasing vascular adhesion of leukocytes [J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(556): eaay7675.
- [22] Zhai Z H, Ouyang W, Yao Y J, et al. Dexamethasone-loaded ROS-responsive poly(thioacetal) nanoparticles suppress inflammation and oxidative stress of acute lung injury [J]. *Bioact Mater*, 2022, 14: 430-442.
- [23] Zhang W F, Li G C, Luo R J, et al. Cytosolic escape of mitochondrial DNA triggers cGAS-STING-NLRP3 axis-dependent nucleus pulposus cell pyroptosis [J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(2): 129-142.
- [24] White A, Wang Z K, Wang X, et al. NLRP3 inflammasome activation in cigarette smoke priming for *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung injury [J]. *Redox Biol*, 2022, 57: 102467.
- [25] Liang H, Zhang F R, Wang W, et al. Heat shock transcription factor 2 promotes mitophagy of intestinal epithelial cells through PARL/PINK1/parkin pathway in ulcerative colitis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 893426.
- [26] Lan Z, Chen L Y, Feng J, et al. Mechanosensitive TRPV4 is required for crystal-induced inflammation [J]. *Ann Rheum Dis*, 2021, 80(12): 1604-1614.
- [27] Luo T, Jia X, Feng W D, et al. Bergapten inhibits NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis via promoting mitophagy [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44(9): 1867-1878.
- [28] Cao J, Li L L, Yao Y, et al. Dehydroepiandrosterone exacerbates nigericin-induced abnormal autophagy and pyroptosis via GPER activation in LPS-primed macrophages [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(4): 372.
- [29] 杨吾燕, 闫姣姣, 高丽, 等. 基于生物信息分析研究黄芩素通过 NOX2/STAT1/NF- κ B 通路抑制 LPS 诱导的 BV-2 细胞神经炎症的作用机制 [J]. *药学学报*, 2022, 57(3): 716-723.
- Yang W Y, Yan J J, Gao L, et al. Baicalein inhibits neuroinflammation via NOX2/STAT1/NF- κ B pathway in LPS-induced BV-2 cells based on bioinformatics methods [J]. *Acta Pharm Sin*, 2022, 57(3): 716-723.
- [30] 靳宜静, 李堪董, 詹智晖, 等. 黄芩苷对脂多糖诱导心肌细胞炎症反应和焦亡的抑制作用及其机制 [J]. *山东医药*, 2024, 64(5): 12-16.
- Jin Y J, Li K D, Zhan Z H, et al. Inhibitory effects of baicalin on LPS-induced inflammation and pyroptosis of cardiomyocytes and their mechanism [J]. *Shandong Med J*, 2024, 64(5): 12-16.

[责任编辑 兰新新]