

复方银花解毒颗粒对脂多糖致幼龄大鼠急性肺炎模型的抗炎作用及 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路的影响

徐 颖, 王 爽, 秦婷婷, 马占强, 傅 强, 马世平*

中国药科大学中药学院, 江苏 南京 211198

摘要: 目的 研究复方银花解毒颗粒 (Compound Yinhu Jiedu Granule) 对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 致幼龄大鼠急性肺炎模型的抗炎作用及 Toll 样受体 4 (Toll like receptor 4, TLR4) /核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) /NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 信号通路的影响。方法 将 120 只幼龄大鼠随机分为 6 组, 分别为对照组、模型组、布洛芬颗粒组 (0.8 g/kg) 及复方银花解毒颗粒低、中、高剂量 (1.25、2.5、5 g/kg) 组, ig 给药 1 周, 末次给药 1 h 后尾 iv LPS (1 mg/kg) 制备急性肺炎模型, 6 h 后采用麻醉后颈椎脱臼处死。采用 ELISA 试剂盒检测各组大鼠肺泡灌洗液及血清中炎症因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-17、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平的变化; HE 染色观察肺组织形态学变化; 运用免疫组化染色法检测肺组织 TLR4, 入核 NF- κ B 和 NLRP3 蛋白的表达, Western blotting 法检测肺组织中 TLR4、磷酸化 NF- κ B (p-NF- κ B)、磷酸化核转录因子- κ B 抑制蛋白 α (nuclear factor- κ B inhibitor protein α , p-I κ B α) 和 NLRP3 蛋白的表达。结果 复方银花解毒颗粒预处理对 LPS 诱导幼龄大鼠急性肺损伤具有较强的保护作用, 可降低模型大鼠肺泡灌洗液及血清中炎症因子 IL-1 β 、IL-17、TNF- α 的水平, 减少肺组织中 TLR4、NF- κ B 的激活和 NLRP3 蛋白的表达。结论 复方银花解毒颗粒对 LPS 致幼龄大鼠急性肺炎模型具有抗炎作用, 其机制可能与下调 TLR4/NF- κ B/NLRP3 炎症信号通路有关。

关键词: 复方银花解毒颗粒; LPS; 急性肺炎; 炎症因子; Toll 样受体 4; 核转录因子- κ B; NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)01-0203-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.01.024

Anti-inflammatory effect of Compound Yinhu Jiedu Granules on LPS induced acute pneumonia in juvenile rats and its effect on TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway

XU Ying, WANG Shuang, QIN Ting-ting, MA Zhan-qiang, FU Qiang, MA Shi-ping

College of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract: Objective To study the anti-inflammatory effect of Compound Yinhu Jiedu Granules (复方银花解毒颗粒) and on lipopolysaccharide (LPS) induced acute pneumonia in juvenile rats the effect of TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway. **Methods** A total of 120 juvenile rats were randomly divided into six groups: normal control group, model group, Ibuprofen granule group (0.8 g/kg), and Compound Yinhu Jiedu Granules low-dose group, medium-dose group, high dose group (1.5, 2.5, and 5 g/kg). The drug was ig preadministered for one week, and LPS (1 mg/kg) was injected into the tail vein 1 h after the last administration to prepare the acute pneumonia model, than the animals was sacrificed by cervical dislocation after anesthesia 6 h later. The inflammatory factors interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-17 (IL-17), tumor necrosis factor- α (TNF- α) level change in alveolar lavage fluid and serum of mice in each group were detected by ELISA kit, at the same time, the changes of lung histopathology were observed by HE staining. The protein expression of TLR4, the nuclear NF- κ B and NLRP3 in lung tissues were detected by immunohistochemical staining. The protein expression of TLR4, phosphorylated NF- κ B (p-NF- κ B), phosphorylated I κ B α (p-I κ B α), and NLRP3 in lung tissues were detected by Western blotting. **Results** The preadministration of Compound Yinhu Jiedu Granules had a strong protective effect on

收稿日期: 2020-06-21

作者简介: 徐 颖 (1996—), 在读硕士, 主要从事中药药理学研究工作。Tel: 19825817002 E-mail: 2429116613@qq.com

*通信作者: 马世平 (1956—), 教授, 博士生导师, 主要从事中药及复方的药理、毒理学研究。E-mail: spma@cpu.edu.cn

LPS-induced acute lung injury in juvenile rats, reduced the inflammatory factors IL-1 β , IL-17, and TNF- α in juvenile rats alveolar lavage fluid and serum, and decreased the activation of TLR4, NF- κ B and the expression NLRP3 in lung tissues. **Conclusion** The anti-inflammatory protective effect of Compound Yinhua Jiedu Granules on LPS-induced acute pneumonia in juvenile rats may be related to the down-regulation of the TLR4/ NF- κ B /NLRP3 inflammatory signaling pathway.

Key words: Compound Yinhua Jiedu Granules; lipopolysaccharide; acute pneumonia; inflammatory factors; TLR4; NF- κ B; NLRP3

急性肺炎是一种多发的呼吸道疾病,患者以0~5岁的婴幼儿为主,是导致婴幼儿死亡的重要原因之一。其主要表现为发病迅速,症状重,并发症多,容易造成呼吸系统和循环系统衰竭,一旦发展为重症肺炎,会严重危害患儿的生命,甚至造成死亡^[1]。临床上,常用抗生素治疗小儿急性肺炎,然而,长期滥用抗生素产生的病毒抗性使其治疗效果不佳,并导致了抗生素的耐药性的发展^[2]。因此,探索更加安全、有效的防治途径成为临床上亟待解决的问题。复方银花解毒颗粒是由山银花、连翘、荆芥、薄荷、青蒿等中药提取加工制成的颗粒剂,具有疏风解表、清热解毒之功效,善治温病发热等病证。临床常用于上呼吸道感染及流行性感冒的治疗^[3],目前尚未有涉及复方银花解毒颗粒治疗急性肺炎的研究。故本研究建立了脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的幼龄大鼠急性肺炎模型,旨在考察复方银花解毒颗粒对幼龄大鼠急性肺炎模型的抗炎作用、量效关系及作用机制。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

SPF级雄性SD幼龄大鼠(3~5周),体质量50~70 g,购自浙江省医学科学院实验动物中心,合格证号SCXK(浙)2019-0002。动物饲养于中国药科大学药理学动物实验中心,许可证号SYXK(苏)2018-0019,自由摄食和饮水,室温(25 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度50%~60%,昼夜12 h交替。适应性喂养3 d后进行实验,所有动物实验均严格按照实验动物管理法规的规定和总则建议进行(伦理审批号2020-12-001)。

1.2 药品及试剂

LPS(批号078M4039V,美国Sigma公司),复方银花解毒颗粒(批号180911,天长亿帆制药有限公司),布洛芬颗粒(批号29180412,葵花药业集团有限公司)。白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA试剂盒(货号E-EL-R0012c)、IL-17 ELISA试剂盒(货号E-EL-R0566c)、TNF- α ELISA试剂盒(货号E-EL-R2856c),均为Elabscience公

司产品。Toll样受体4(Toll like receptor 4, TLR4)一抗(货号19811-1-AP)、NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)一抗(货号19771-1-AP)均为Proteintech公司产品;核转录因子- κ B(Nuclear factor- κ B, NF- κ B)一抗(货号8242S)、磷酸化NF- κ B(p-NF- κ B)一抗(货号3033S)、核转录因子- κ B抑制蛋白(Nuclear factor- κ B inhibitor protein, I κ B α)一抗(货号4812S)、磷酸化I κ B α (p-I κ B α)一抗(货号9246S)均为Cell Signaling Technology公司产品;兔二抗(批号AA01201, Bioworld公司)。BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号P0010,碧云天生物技术研究),RIPA裂解液(批号P0013B,碧云天生物技术有限公司),ECL发光试剂盒(批号36208ES60,上海翊圣生物科技有限公司)、PVDF膜(货号ISEQ00010,美国Millipore公司)。其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 仪器

5430R冷冻离心机(Eppendorf公司);-80 $^{\circ}$ C超低温冰箱、SN3001全波长多功能酶标仪、Milli-Q纯水仪(美国Thermo公司);TE124S电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);EPS 600电泳转膜仪(上海天能科技有限公司)、Chemidoc XRS+高灵敏度化学发光成像系统(美国Bio-Rad公司);GL-5250C磁力搅拌器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、给药及急性肺炎模型建立

按质量将幼龄大鼠随机分为6组,每组20只,分别为对照组、模型组、布洛芬颗粒(0.8 g/kg)组及复方银花解毒颗粒低、中、高剂量(1.25、2.50、5.00 g/kg)组。各组连续ig给药1周,对照组和模型组给予相同体积的生理盐水。末次给药1 h后尾iv LPS(1 mg/kg)制备幼龄大鼠急性肺炎模型,对照组注射等量的生理盐水,注射6 h后采用10%水合氯醛麻醉后进行后续操作。

2.2 ELISA 测定肺泡灌洗液中炎症因子的水平

每组取 6 只幼龄大鼠 ip 10% 水合氯醛 (3 mg/kg) 麻醉后, 手术分离颈部气管插管, 用 PBS 灌洗肺组织, 灌洗 3 次, 每次静止平衡 30 s, 合并灌洗液, 取灌洗液 1 mL, 3000 r/min 离心 5 min, 取上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 测定其中 IL-17、IL-1 β 和 TNF- α 的含量。

2.3 ELISA 测定血清中炎症因子的水平

每组取 6 只幼龄大鼠经眼眶取血后, 3000 r/min 离心 15 min, 取上清, 按 ELISA 试剂盒说明书操作, 测定其中 IL-17、IL-1 β 和 TNF- α 含量。

2.4 肺组织的病理学观察

每组取 3 只大鼠 ip 10% 水合氯醛麻醉后, 暴露胸腔, 先用 PBS 经右心室灌注冲血, 然后用 4% 多聚甲醛溶液灌注固定, 采用颈椎脱臼处死后迅速摘取右肺, 置于 10% 甲醛溶液中固定, 制作石蜡切片, 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察肺组织病理学变化, 观察肺泡上皮细胞的损伤程度以及肺泡壁增厚程度。

2.5 免疫组化检测炎症相关信号蛋白水平

每组取 3 只大鼠 ip 10% 水合氯醛麻醉后, 暴露胸腔, 先用 PBS 经右心室灌注冲血, 然后用 4% 的多聚甲醛溶液灌注固定, 采用颈椎脱臼处死后迅速摘取右肺, 置于 10% 甲醛溶液中固定, 制作石蜡切片, 染色, 显微镜下观察肺组织 TLR4、NF- κ B 和 NLRP3 阳性细胞, 分析阳性蛋白含量变化。

2.6 Western blotting 检测炎症相关蛋白水平

取大鼠的肺组织, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。肺组织加入 RIPA 裂解液裂解匀浆, 提取蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 等量蛋白经过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min, 室温二抗孵育 90 min, TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min, ECL 反应, 采集图像。采用 Image J 软件分析灰度值以统计蛋白表达量。

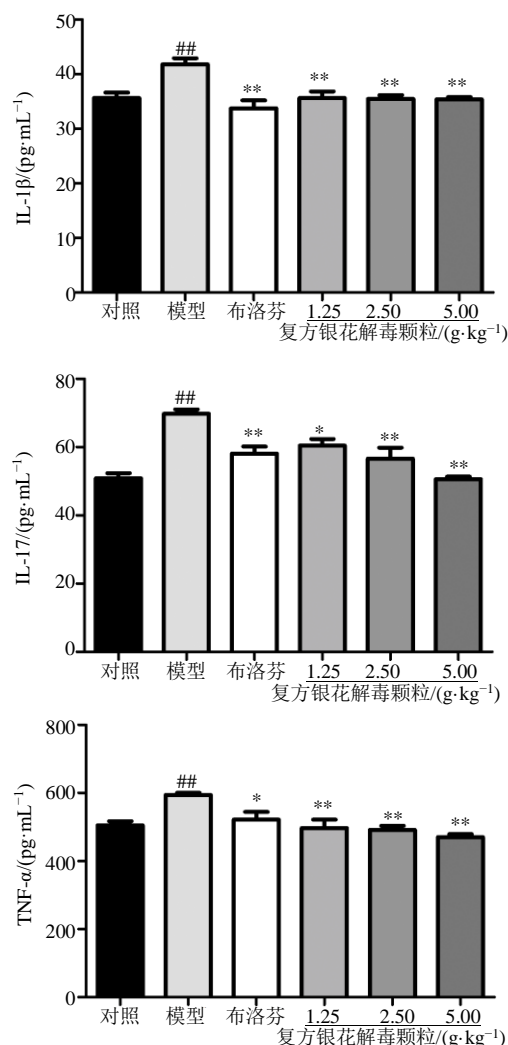
2.7 统计学分析

所有实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Graphpad prism 5 软件进行统计学分析, 多组间比较用单因素方差分析和 Tukey's test 进行分析。

3 结果

3.1 复方银花解毒颗粒对急性肺炎模型幼龄大鼠肺泡灌洗液中炎症因子表达的影响

由图 1 可知, 相比于对照组, 模型组肺泡灌洗



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下图同
$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as following figures

图 1 复方银花解毒颗粒对急性肺炎模型幼龄大鼠肺泡灌洗液中的炎症因子表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effects of Compound Yinhuajiedu Granules on expression of inflammatory factors in alveolar lavage fluid of juvenile rats with acute pneumonia ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

液中促炎因子 IL-1 β 、IL-17、TNF- α 表达水平显著升高 ($P < 0.01$), 而相比于模型组, 布洛芬组与复方银花解毒颗粒各剂量组均可显著降低 IL-1 β 、IL-17、TNF- α 的表达水平 ($P < 0.05, 0.01$)。提示复方银花解毒颗粒可显著抑制急性肺损伤幼龄大鼠的肺部炎症。

3.2 复方银花解毒颗粒对急性肺炎模型幼龄大鼠血清中炎症因子表达的影响

如图 2 所示, 模型组血清中促炎因子 IL-1 β 、IL-17、TNF- α 表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05,$

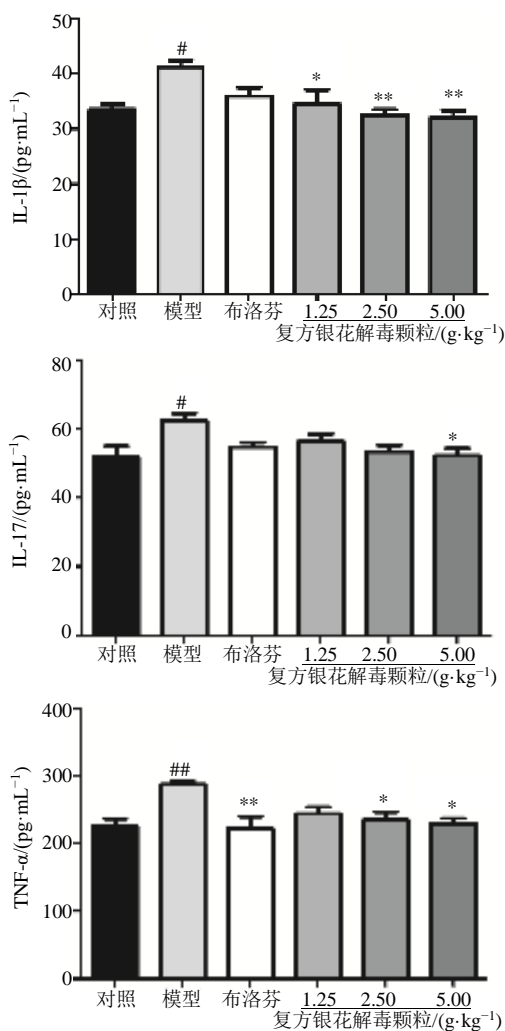


图2 复方银花解毒颗粒对急性肺炎模型幼龄大鼠血清中的炎症因子表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of Compound Yinhuajiedu Granules on expression of inflammatory factors in serum of juvenile rats with acute pneumonia ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

0.01); 与模型组相比,布洛芬组血清中 IL-1β、IL-17 表达水平有降低趋势,但无显著性差异,复方银花解毒颗粒各剂量组均可显著减少血清中 IL-1β 表达水平 ($P < 0.05, 0.01$)。对于血清中 IL-17 水平,仅复方银花解毒颗粒高剂量组 (5.00 g/kg) 可显著降低 ($P < 0.05$)。此外,布洛芬与复方银花解毒颗粒中、高剂量组 (2.50、5.00 g/kg) 均显著降低血清中 TNF-α 表达水平 ($P < 0.05, 0.01$)。提示复方银花解毒颗粒可降低急性肺炎模型幼龄大鼠血清中炎症因子的含量,抑制炎症。

3.3 复方银花解毒颗粒对急性肺炎模型幼龄大鼠中肺组织病理变化的影响

HE 染色结果显示,对照组中肺泡结构完整,基

本正常,未见出血及炎性细胞浸润。LPS 造模后,大鼠肺部发生组织病变,细胞核固缩,细胞膜破坏,肺泡壁变薄,肺泡大小不一,肺泡腔破损,有部分细胞核释放到肺泡腔内。布洛芬组和复方银花解毒颗粒各剂量组均可不同程度地改善这种病变。见图 3。

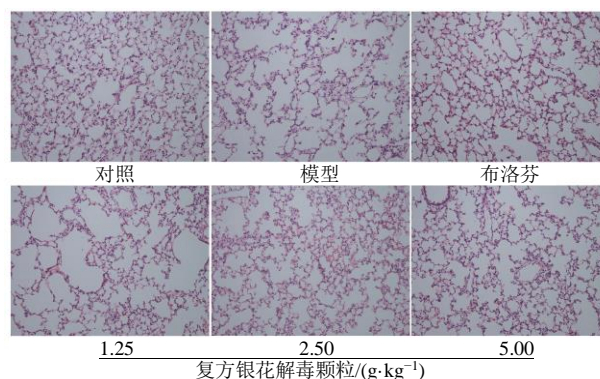


图3 复方银花解毒颗粒对急性肺炎模型幼龄大鼠中肺组织病理变化的影响 ($n = 3, \times 200, HE$)

Fig. 3 Effect of Compound Yinhuajiedu Granules on pathological changes in lung tissues of juvenile rats with acute pneumonia ($n = 3, \times 200, HE$)

3.4 复方银花解毒颗粒对急性肺炎模型幼龄大鼠的肺组织中 TLR4、NF-κB 及 NLRP3 蛋白表达的影响

免疫组化结果显示,与对照组相比,模型组大鼠肺部组织中 TLR4 的蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$);布洛芬组及复方银花解毒颗粒低、高剂量组 (1.25、5.00 g/kg) 能够显著降低模型组 TLR4 的蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。模型组大鼠相比于对照组肺部组织中入核 NF-κB 的蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$);布洛芬组及复方银花解毒颗粒各剂量组均能够显著降低模型组 NF-κB 的蛋白表达水平 ($P < 0.01$)。与对照组相比,模型组大鼠肺部组织中 NLRP3 的蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$);布洛芬组及复方银花解毒颗粒高剂量组 (5.00 g/kg) 能够显著降低模型组 NLRP3 的蛋白表达水平 ($P < 0.01$)。见图 4~6。

3.5 复方银花解毒颗粒对急性肺炎模型幼龄大鼠的肺组织中 TLR4/NF-κB/NLRP3 信号通路的影响

上述结果表明,复方银花解毒颗粒可下调 LPS 诱导急性肺炎幼龄大鼠中显著增加的 TLR4、NF-κB 和 NLRP3 的蛋白表达水平。为了进一步揭示复方银花解毒颗粒的抗炎作用机制,采用 Western blotting 实验检测 TLR4/NF-κB/NLRP3 信号通路的

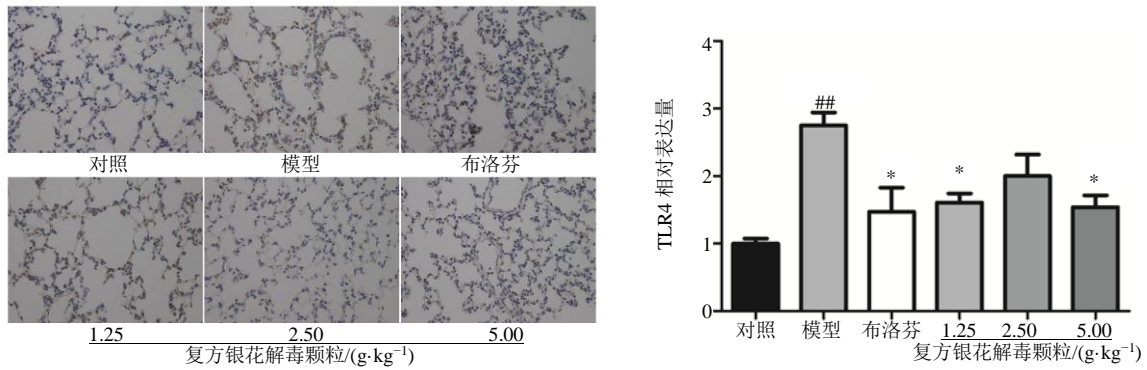


图4 复方银花解毒颗粒对急性肺炎模型幼龄大鼠的肺组织中 TLR4 表达的影响 (n = 3, × 400)

Fig.4 Effect of Compound Yinhuo Jiedu Granules on TLR4 expression in lung tissues of juvenile rats with acute pneumonia (n = 3, × 400)

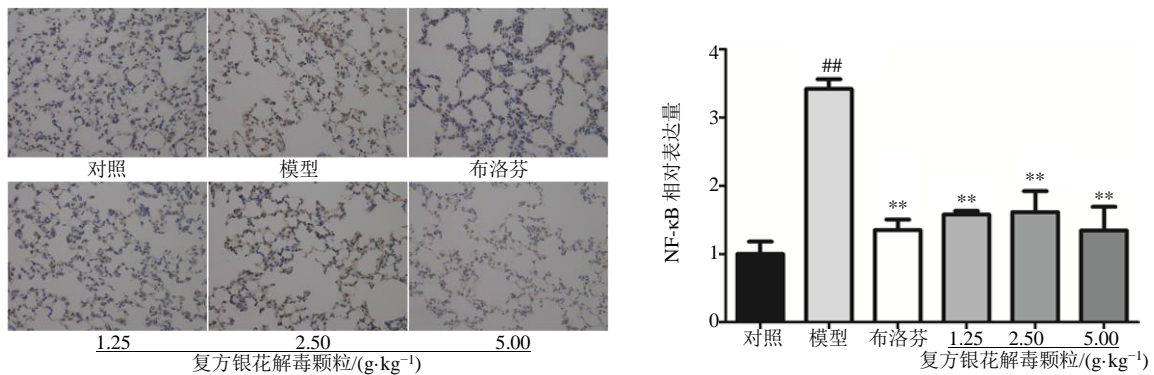


图5 复方银花解毒颗粒对急性肺炎模型幼龄大鼠的肺组织中入核 NF-κB 表达的影响 (n = 3, × 400)

Fig.5 Effect of Compound Yinhuo Jiedu Granules on nuclear NF-κB expression in lung tissues of juvenile rats with acute pneumonia (n = 3, × 400)

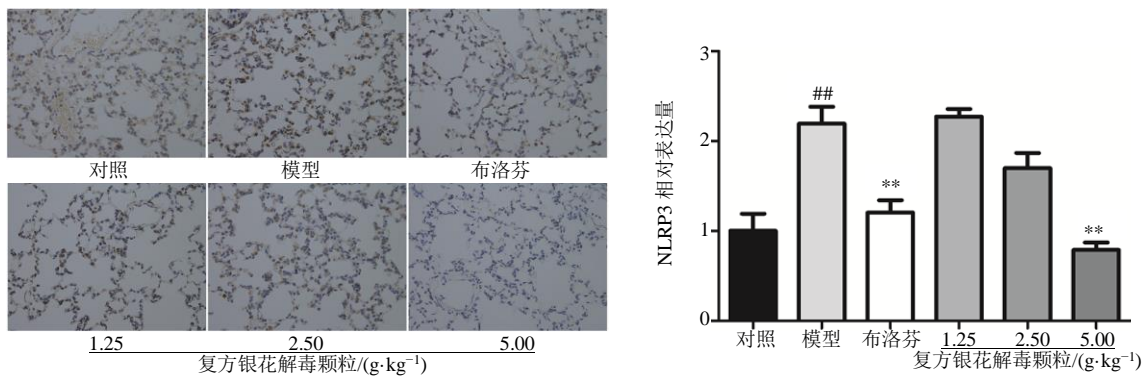


图6 复方银花解毒颗粒对急性肺炎模型幼龄大鼠的肺组织中 NLRP3 表达的影响 (n = 3, × 400)

Fig.6 Effect of Compound Yinhuo Jiedu Granules on NLRP3 expression in lung tissues of juvenile rats with acute pneumonia (n = 3, × 400)

相关蛋白, 见图 7。结果显示, 与对照组相比, 模型组肺组织中 TLR4、p-NF-κB、p-IκBα、NLRP3 的蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。而与模型中相比, 布洛芬组及复方银花解毒颗粒高剂量组 (5.00 g/kg) 均显著降低 TLR4、p-NF-κB、

p-IκBα 和 NLRP3 的蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

4 讨论

急性肺炎是一种主要由病原体引起的下呼吸道疾病, 临床表现为发热、咳嗽、咳痰、喘息等,

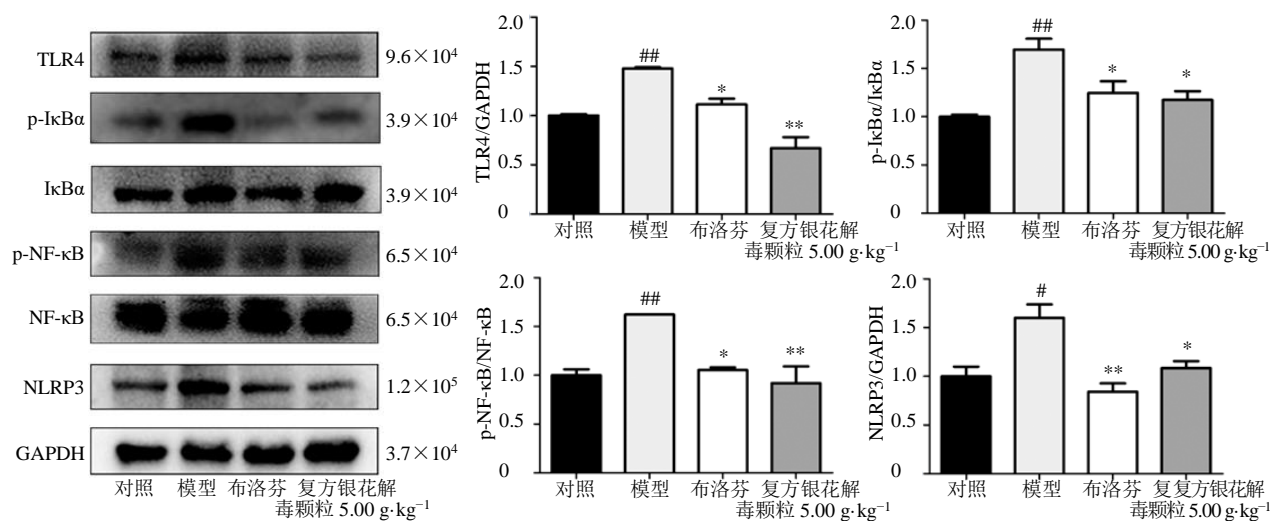


图7 复方银花解毒颗粒对急性肺炎模型幼龄大鼠的肺组织中 TLR4/NF-κB/NLRP3 信号通路的影响 ($n=3$)

Fig. 7 Effect of Compound Yinhuo Jiedu Granules on TLR4/NF-κB/NLRP3 signaling pathway in lung tissues of juvenile rats with acute pneumonia ($n=3$)

不仅造成小儿身体的伤害,严重时还可造成死亡^[4]。目前认为,多种病原体感染会导致患儿肺泡出现炎性改变或炎症细胞浸润,进而引起肺组织的损害和破坏^[5]。研究发现,包括巨噬细胞、淋巴细胞和中性粒细胞在内的多种免疫细胞参与了肺部炎症的过程。活化的巨噬细胞释放多种炎症因子,如活性氧、细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α , 促进炎症的严重破坏^[6]。而急性肺炎常与微生物(如内毒素)的炎症刺激有关, LPS 作为内毒素的主要成分,在体内外可引起炎症因子高表达,且常用于制备小动物感染性损伤模型,如肺炎模型被用来研究药物抗炎作用^[7]。

中医理论认为急性肺炎是由风热病毒引起的肺痹,属于风温肺热型疾病范畴,需利用“透”和“泄”的方式来治疗。复方银花解毒颗粒是以“银翘散”为基础方化裁而来,方中山银花、连翘为君,二药合用解表透邪,清热解毒;以荆芥、豆豉、薄荷为臣,共助君药疏散解表。山银花味甘、性寒,气味芳香,常用于温病发热等证;连翘性凉、味苦,气味俱薄。荆芥温而不燥,方中伍入此药则凉而有辛,可加强解表透邪之力;豆豉味苦、性寒,宜散表邪;薄荷辛凉,可发汗解热,利咽喉;佐入青蒿、大青叶、野菊花、鸭跖草、前胡,可起到清热解毒、凉血、肃肺化痰之效。现代药理学研究表明,此方中的许多中药的化学成分具有抗炎、抗病毒、解热等作用,如山银花中主要有效成分绿原酸和咖啡酸具有较好的抗炎、抗病毒、抑菌、抗氧化等作用,

并且可通过减少肺部炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的分泌,以治疗 LPS 所致急性肺炎^[8]。连翘中连翘酯苷能下调 LPS 诱发炎症因子 TNF- α 、环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 的释放,连翘苷能抑制急性肺损伤模型大鼠肺部出血,中性粒细胞浸润等病理改变^[9]。荆芥的主要药效成分挥发油类有抗病毒、抗炎、镇痛、免疫调节等作用,与薄荷挥发油类配伍时可减少甲型流感病毒感染小鼠肺部促炎因子的表达^[10-11]。此外,青蒿中青蒿琥酯可通过抑制 NF- κ B 炎症信号通路的激活,实现减轻巨细胞病毒感染小鼠肺部组织炎症的作用^[12],故推测此方对急性肺炎有一定的疗效。

TLR 是介导天然免疫的重要模式识别受体,其介导的信号通路在炎症的发生和发展过程中极其重要^[13]。研究表明, LPS 介导的免疫反应完全依赖于 TLR4, TLR4 在引发免疫效应、吞噬细菌等方面起主要作用。而 TLR4 作为识别 LPS 的关键上游受体,控制着 LPS 炎症信号的细胞内转导和 NF- κ B 的激活,以及众多炎症因子的释放。据报道, LPS 刺激后,肺部巨噬细胞和内皮细胞的 TLR4 可与不同的适配器分子结合,导致负责生产促炎细胞因子的下游信号通路的激活和随后的炎性细胞的浸润^[14]。研究表明 TLR4/NF- κ B 信号通路在 LPS 大鼠急性肺损伤模型的发展过程中起重要作用, TLR4 的激活可引起 NF- κ B 的活化入核^[15]。正常情况下, NF- κ B 蛋白二聚体在体内与 I κ B α 结合在一起以复合体形

式存在于细胞质中,当机体被 LPS 或细胞因子刺激后, I κ B α 被上游的 I κ B 激酶磷酸化,最终导致 NF- κ B 磷酸化后活化并易位至细胞核,可以诱导免疫、炎症反应等有关的多种基因转录后翻译^[16]。如 NLRP3 炎症小体的转录激活^[17],近年来的研究表明, NLRP3 炎症小体在急性肺损伤的炎症和细胞凋亡中起着非常重要的作用,在调节炎症反应和急性感染性肺炎的发生发展中具有重要意义, NLRP3 可通过 NF- κ B 相关通路激活而引起肺损伤,可能成为治疗肺损伤的新靶点^[18-19]。随着体内 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 IL-12 等促炎因子的增多, NF- κ B 可以进一步被激活,周而复始,炎症级联反应逐渐被放大,这种无法控制的炎症反应最终导致正常肺泡毛细血管屏障功能的丧失与肺组织结构的严重破坏^[20-23]。

本实验结果显示, LPS 激活了幼龄大鼠肺组织的 TLR4,促进了 I κ B α 磷酸化,与 NF- κ B 的磷酸化活化入核,进而激活 NLRP3 炎症小体使其表达增多,导致肺泡灌洗液促炎因子 IL-17、IL-1 β 和 TNF- α 水平的增加,形成局部炎症,损伤肺组织结构,使正常肺泡腔结构破裂,最终炎症级联蔓延至全身,促使循环血清中的促炎因子 (IL-17、IL-1 β 、TNF- α) 水平也显著增加。给予布洛芬颗粒及不同剂量复方银花解毒颗粒后,可减轻 LPS 引起的肺组织损伤,不同程度地降低肺泡灌洗液及血清炎症因子 (IL-17、IL-1 β 、TNF- α) 水平,其中高剂量组 (5.00 g/kg) 改善肺组织损伤作用最为明显。并且复方银花解毒颗粒预给药可显著下调 TLR4、p-I κ B α 、p-NF- κ B 与 NLRP3 的表达,提示其可能通过降低 TLR4 的表达,从而抑制 NF- κ B 与 NLRP3 炎症小体的激活,而减少促炎因子的表达而发挥抗炎作用。

综上所述,本研究结果表明复方银花解毒颗粒预处理对 LPS 诱导幼龄大鼠急性肺损伤具有较强的保护作用,其作用机制可能与减少肺部组织病变,降低肺泡灌洗液和血液中炎症因子水平,以及下调 TLR4/NF- κ B/NLRP3 炎症信号通路有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 张峰. 小儿肺炎并发症的诊治 [J]. 中国社区医师, 2018, 34(21): 61.
 [2] Jehan F, Nisar I, Kerai S, et al. Should fast breathing pneumonia cases be treated with antibiotics? The scientific rationale for revisiting management in low and middle income countries [J]. *Int J Infect Dis*, 2019, 85:

64-66.

- [3] 蒋萌,熊宁宁,奚肇庆,等. 银花解毒颗粒治疗上呼吸道感染及流行性感冒风热证的临床试验 [J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(4): 270-272.
 [4] Goodman D, Crocker M E, Pervaiz F, et al. Challenges in the diagnosis of paediatric pneumonia in intervention field trials: Recommendations from a pneumonia field trial working group [J]. *Lancet Respir Med*, 2019, 7(12):1068-1083.
 [5] Moynihan K M, McGarvey T, Barlow A, et al. Testing for common respiratory viruses in children admitted to pediatric intensive care: Epidemiology and outcomes [J]. *Pediatr Crit Care Med*, 2020, 21(6): e333-e341.
 [6] Shan M R, Zhou S N, Fu C N, et al. Vitamin B6 inhibits macrophage activation to prevent lipopolysaccharide-induced acute pneumonia in mice [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(5): 3139-3148.
 [7] Liu J, Chang G J, Huang J, et al. Sodium butyrate inhibits the inflammation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by regulating the toll-like receptor 4/nuclear factor κ B signaling pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(6): 1674-1682.
 [8] Li Y K, Li W, Fu C M, et al. *Lonicerae japonicae Flos* and *Lonicerae Flos*: A systematic review of ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology [J]. *Phytochem Rev*, 2020, 19(1): 1-61.
 [9] Wang Z Y, Xia Q, Liu X, et al. Phytochemistry, pharmacology, quality control and future research of *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl: A review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 210: 318-339.
 [10] 刘英男,牛凤菊,辛义周,等. 荆芥的化学成分、药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中国药房, 2020, 31(11): 1397-1402.
 [11] 束雅春,朱萱萱,陈亚军,等. 薄荷-荆芥不同配伍组分流感病毒的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(17): 9-19.
 [12] 王萍,陈盛,黄小桃,等. 青蒿琥酯对小鼠巨细胞病毒性肺炎的治疗作用 [J]. 药学学报, 2020, 55(11): 2651-2656.
 [13] Zhu Y G, Qu J M. Toll like receptors and inflammatory factors in sepsis and differential expression related to age [J]. *Chin Med J*, 2007, 120(1): 56-61.
 [14] Li K P, He Z R, Wang X, et al. Apigenin C-glycosides of *Microcos paniculata* protects lipopolysaccharide induced apoptosis and inflammation in acute lung injury through TLR4 signaling pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 124: 163-175.
 [15] Deng G M, He H, Chen Z, et al. Lianqinjiedu decoction

- attenuates LPS-induced inflammation and acute lung injury in rats via TLR4/NF- κ B pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 96: 148-152.
- [16] DiDonato J A, Mercurio F, Karin M. NF- κ B and the link between inflammation and cancer [J]. *Immunol Rev*, 2012, 246(1): 379-400.
- [17] Xu W J, Wang X X, Jin J J, *et al.* Inhibition of GGPPS₁ attenuated LPS-induced acute lung injury and was associated with NLRP3 inflammasome suppression [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 316(3): L567-L577.
- [18] Segovia J A, Chang T H, Winter V T, *et al.* NLRP3 is a critical regulator of inflammation and innate immune cell response during *Mycoplasma pneumoniae* infection [J]. *Infect Immun*, 2018, doi: 10.1128/iai.00548-17.
- [19] He X Y, Qian Y B, Li Z G, *et al.* TLR4-upregulated IL-1 β and IL-1RI promote alveolar macrophage pyroptosis and lung inflammation through an autocrine mechanism [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31663.
- [20] Fonceca A M, Zosky G R, Bozanich E M, *et al.* Accumulation mode particles and LPS exposure induce TLR-4 dependent and independent inflammatory responses in the lung [J]. *Respir Res*, 2018, 19: 15.
- [21] 孟雄, 王兮, 郭芮伶. 辛伐他汀对脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠保护作用及对 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. *职业与健康*, 2019, 35(11): 1470-1475.
- [22] Huang C, Yang X, Huang J, *et al.* Porcine beta-defensin 2 provides protection against bacterial infection by a direct bactericidal activity and alleviates inflammation via interference with the TLR4/NF- κ B pathway [J]. *Front Immunol*, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.01673.
- [23] Meliton A Y, Meng F Y, Tian Y F, *et al.* Oxidized phospholipids protect against lung injury and endothelial barrier dysfunction caused by heat-inactivated *Staphylococcus aureus* [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 308(6): L550-L562.

[责任编辑 潘明佳]