

## 基于 NLRP3 炎性小体活化探讨地龙提取物对肺动脉高压的保护机制

刘双月<sup>1</sup>, 邵磊<sup>2</sup>, 郭琦<sup>1</sup>, 郝佳<sup>1</sup>, 李伟红<sup>1\*</sup>, 许涛<sup>1\*</sup>

1. 锦州医科大学基础医学院, 辽宁 锦州 121000

2. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193

**摘要:** **目的** 研究地龙提取物对肺血管内皮细胞损伤及肺动脉高压的保护作用及机制。**方法** 雄性 SD 大鼠随机分成对照组、模型组、模型+地龙提取物组及地龙提取物组, 给予地龙提取物干预后, 采用颈静脉插管检测各组大鼠右心室收缩压, 计算右心室肥大指数; 分离肺组织, 采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察肺血管形态学变化; 采用免疫荧光及 Western blotting 法检测肺组织 Nod 样受体家族的吡啶结构域 3 (Nod-like receptor family pyrin domain-containing protein 3, NLRP3) 蛋白表达; 采用流式细胞术检测肺组织活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平; 采用 ELISA 法检测肺组织白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、IL-6 和 IL-18 水平。体外培养人肺动脉内皮细胞 (human pulmonary arterial endothelial cell, HPAEC), 给予 NLRP3 激动剂尼日利亚菌素诱导细胞损伤, 考察地龙提取物对 HPAEC 凋亡、线粒体功能、ROS 水平及 IL-1 $\beta$ 、半胱氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1) 和 IL-18 蛋白表达的影响。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠右心室收缩压和右心肥大指数显著升高, 肺血管壁增厚 ( $P < 0.01$ ), 肺组织 NLRP3 蛋白表达水平显著升高, ROS、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-18 水平升高 ( $P < 0.01$ ); 地龙提取物可显著降低模型大鼠右心室收缩压和右心肥大指数 ( $P < 0.01$ ), 改善肺血管重构, 同时下调肺组织 NLRP3 蛋白表达、ROS、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-18 的水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。尼日利亚菌素诱导 HPAEC 线粒体结构损伤及 ROS 增强, 导致细胞凋亡 ( $P < 0.01$ ); 地龙提取物对尼日利亚菌素诱导的 HPAEC 凋亡、ROS 水平、线粒体功能损伤及 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-18 蛋白表达有显著抑制作用 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。**结论** 地龙提取物通过降低肺血管内皮 NLRP3 诱导的线粒体 ROS 水平升高和炎症反应, 从而减轻肺动脉高压。

**关键词:** 地龙提取物; 肺动脉高压; 尼日利亚菌素; 肺动脉内皮细胞; Nod 样受体家族的吡啶结构域 3

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)02-0461-09

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.02.016

## Protective effect of *Pheretima* extract on pulmonary arterial hypertension based on NLRP3 inflammasome activation

LIU Shuang-yue<sup>1</sup>, SHAO Lei<sup>2</sup>, GUO Qi<sup>1</sup>, HAO Jia<sup>1</sup>, LI Wei-hong<sup>1</sup>, XU Tao<sup>1</sup>

1. College of Basic Medicine, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China

2. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

**Abstract: Objective** To elucidate protective effect and mechanism of Dilong (*Pheretima*) extract on pulmonary vascular endothelial cell damage and pulmonary arterial hypertension. **Methods** Male SD rats were randomly divided into control group, model group, model + *Pheretima* extract group and *Pheretima* extract group. After intervention with *Pheretima* extract, jugular vein cannula was used to detect right ventricular systolic pressure (RVSP), and right ventricular hypertrophy index (RVHI) was calculated. Lung tissue was isolated, and pulmonary vascular morphology changes were observed by HE staining. Nod-like receptor family pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) expression was detected by immunofluorescence and Western blotting. Flow cytometry was used to detect reactive oxygen species (ROS) level; Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, and IL-18 levels in supernatants were detected by ELISA. Human pulmonary artery endothelial cells (HPAEC) were cultured *in vitro*, and NLRP3 agonist nigericin was applied to stimulate cell damage. Effects of *Pheretima* extract on HPAEC apoptosis, mitochondrial function, ROS level and IL-1 $\beta$ , Caspase-1 and IL-18 protein expressions were investigated. **Results** Compared with control group, RVSP and RVHI of rats in model group were significantly

收稿日期: 2021-09-30

基金项目: 辽宁省教育厅青年研究项目 (JYTQN2020043); 辽宁省教育厅基础研究项目 (JYTJZR2020084, JYTJZR2020088)

作者简介: 刘双月 (1981—), 女, 副教授, 研究方向为中药保护作用机制研究。E-mail: dongfangyue5@sina.com

\*通信作者: 许涛 (1980—), 男, 高级实验师, 研究方向为中药保护作用机制研究。E-mail: 40267473@qq.com

李伟红 (1969—), 女, 教授, 研究方向为心血管疾病研究。E-mail: 1771961028@qq.com

increased, pulmonary vessel wall was thickened ( $P < 0.01$ ); NLRP3 protein expression in lung tissue was increased, ROS, IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-18 levels were significantly increased ( $P < 0.01$ ). RVSP and RVHI of model rats were significantly reduced ( $P < 0.01$ ), pulmonary vascular remodeling was improved, NLRP3 protein expression, ROS, IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-18 levels in lung tissue were down-regulated by *Pheretima* extract ( $P < 0.05, 0.01$ ). HPAEC mitochondrial structure damage and ROS enhancement which leading to cell apoptosis were induced by nigericin ( $P < 0.01$ ); Nigericin-induced HPAEC apoptosis, ROS levels, mitochondrial function damage and IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-18 protein expressions were significantly inhibited by *Pheretima* extract ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** *Pheretima* extract reduces pulmonary arterial hypertension by ameliorating increases in mitochondrial ROS level and inflammatory factors induced by NLRP3 in pulmonary vascular endothelial cells.

**Key words:** *Pheretima* extract; pulmonary arterial hypertension; nigericin; pulmonary arterial endothelial cell; Nod-like receptor family pyrin domain-containing protein 3

肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH) 是一种由多因素引起的致命性疾病, 最终可导致患者右心衰竭和死亡<sup>[1]</sup>。肺血管重构是 PAH 的主要病理表现, 但其机制仍不清楚。促炎性细胞因子对肺动脉内皮细胞 (pulmonary arterial endothelial cell, PAEC) 的长期刺激诱导细胞稳态失衡, 导致内皮功能障碍, 引发肺血管重构<sup>[2]</sup>。Nod 样受体家族的吡啶结构域 3 (Nod-like receptor family pyrin domain-containing protein 3, NLRP3) 是最常见的炎症小体<sup>[3]</sup>。PAH 模型大鼠中 NLRP3 诱导促炎性细胞因子如白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 和 IL-18 分泌, 介导细胞炎症反应和细胞凋亡<sup>[4-5]</sup>。

地龙是一种历史悠久的传统中药, 具有抗炎、抗氧化应激、解痉平喘等作用, 临床上被广泛用于治疗肺间质纤维化、哮喘、慢性阻塞性肺疾病等多种肺部疾病<sup>[6]</sup>。研究表明, 以地龙为主药的云药七龙天对肺胀患者有良好的疗效<sup>[7]</sup>, 以地龙提取物为主要成分的溶栓胶囊显著减轻二氧化硅致小鼠肺纤维化损伤<sup>[8]</sup>。本研究从调控 NLRP3 介导炎症反应减轻 PAEC 功能紊乱, 来探讨地龙提取物对 PAH 的保护作用, 为临床治疗 PAH 提供新的策略。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只, 6~8 周龄, 体质量 200~220 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号 SYXK (京) 2017-0033。动物于锦州医科大学动物中心适应性饲养 1 周, 温度 22~24 °C, 湿度 40%~60%, 大鼠自由进食饮水。动物实验经锦州医科大学动物伦理委员会批准 (批准号 2019031)。

### 1.2 细胞

人肺动脉内皮细胞 (HPAEC, 批号 6343) 购自美国 ScienCell 公司。

### 1.3 药品与试剂

溶栓胶囊 (国药准字 Z10960063, 批号 20190503, 0.25 g/粒) 购自山西中远威药业有限公司; 野百合碱 (批号 0492643-8) 购自美国 Cayman Chemical 公司; 尼日利亚菌素 (批号 HY-127019) 购自美国 MCE 公司; *N*-乙酰半胱氨酸 (*N*-acetyl-*L*-cysteine, NAC, 批号 5545-17-5) 购自美国 Sigma 公司; 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自大连美仑生物技术有限公司; IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 20201220)、IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒 (批号 20201219)、IL-18 ELISA 试剂盒 (批号 20201215) 购自上海广锐生物科技有限公司; NLRP3 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司; IL-1 $\beta$ 、半胱氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1)、IL-18 抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体购自美国 Merck 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 ab150120) 购自英国 Abcam 公司; HRP 标记的兔抗山羊 IgG 抗体 (批号 AB\_2844795)、Fluor488 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 AB\_2846212) 购自江苏亲科生物研究中心有限公司; MitoTracker<sup>®</sup> Deep Red FM 线粒体荧光探针购自上海翌圣生物公司; DCFH-DA 荧光探针、DAPI 染液购自北京索莱宝科技有限公司。

### 1.4 仪器

Powerlab 多通道电生理记录仪 (美国 ADInstruments 公司); Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra 电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司); Amersham Imager 600 型化学发光成像仪 (美国通用电气公司); SP5II 型共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司); 全自动组织脱水机 (日本樱花公司)。

## 2 方法

### 2.1 地龙提取物冻干粉的制备

将 7.5 g 溶栓胶囊粉末溶于 100 mL PBS 溶液

(pH 6.8、0.1 mol/L), 4 °C冷浸 36 h 后, 3500 r/min 离心 15 min, 取上清, 透析除盐后, 冷冻至干粉备用<sup>[9]</sup>。地龙提取物冻干粉含有蚓激酶、纤维蛋白酶溶解酶、蚓胶原酶等多种成分, 其纤溶活性主要来自蚓激酶, 经尿激酶-纤维蛋白平板法测定蚓激酶纤溶活性为 200 000 U/mg<sup>[8]</sup>。

## 2.2 体内实验

### 2.2.1 PAH 模型的制备、分组及给药

根据预实验结果, 将 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、模型+地龙提取物 (25 mg/kg)<sup>[8,10]</sup>组和地龙提取物 (25 mg/kg) 组, 每组 12 只。模型组和模型+地龙提取物组大鼠单次 ip 野百合碱 (60 mg/kg), 模型组正常饲养 28 d, 建立 PAH 模型<sup>[11]</sup>。地龙提取物冻干粉溶于 0.9%氯化钠溶液, 配制质量浓度为 12.5 mg/mL 的溶液。模型+地龙提取物组 ip 野百合碱 0.5 h 后, ip 地龙提取物, 1 次/d, 连续 28 d; 地龙提取物组和对照组分别 ip 地龙提取物和 0.9%氯化钠溶液, 1 次/d, 连续 28 d。

### 2.2.2 肺动脉压力及右心肥大指数 (right ventricular hypertrophy index, RVHI) 检测

末次给药 24 h 后, 大鼠 ip 10%水合氯醛麻醉, 分离大鼠右颈外静脉, 采用右心导管法将导管插入颈静脉, 随后推至右心室, 接入压力传感器, 测得每只大鼠右心室收缩压 (right ventricular systolic pressure, RVSP)。处死大鼠后分离心脏, 称定右心室和左心室加隔膜质量, 计算两者比值作为 RVHI。

### 2.2.3 地龙提取物对 PAH 大鼠肺血管病理变化的影响

取各组大鼠右肺, 于 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h, 脱水、透明行石蜡包埋, 按照 5 μm 厚度切片, 进行苏木素-伊红 (HE) 染色, 于光学显微镜下观察并拍照, 并进行肺血管的结构重塑评估。采用 Image J 软件测量并计算内侧壁厚百分比和内侧壁面积百分比。

内侧壁厚度比 =  $2 \times$  内壁厚 / 血管直径

内侧壁面积比 = 横截面内壁面积 / 血管总横截面面积

### 2.2.4 地龙提取物对 PAH 大鼠肺组织 NLRP3 蛋白表达的影响

(1) 免疫荧光法检测各组大鼠肺组织 NLRP3 蛋白表达: 取各组大鼠肺组织切片, 脱蜡至水、抗原修复后加入 NLRP3 抗体 (1 : 200), 4 °C 孵育过夜; 加入 Fluor488 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (1 : 500), 孵育 2 h, 加入含 DAPI 的封片液封片, 于共聚焦显微镜下观察并拍照, 采用 Image J 软件检测 NLRP3

相对荧光强度。

(2) Western blotting 法检测各组大鼠肺组织 NLRP3 蛋白表达: 各组取 50 mg 肺组织, 加入含苯甲基磺酰氟的裂解液研磨, 提取蛋白, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白质量浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后分别加入 NLRP3 抗体 (1 : 1000) 和 GAPDH 抗体 (1 : 3000), 4 °C 孵育过夜; 加入二抗孵育 1 h 后, 加入 ECL 发光液显影, 采用 Image J 软件分析。

### 2.2.5 地龙提取物对 PAH 大鼠肺组织中炎症因子水平的影响

取各组大鼠肺组织, 匀浆后离心, 取上清液, 按照试剂盒说明书检测上清液中 IL-1β、IL-6 和 IL-18 水平。

### 2.2.6 地龙提取物对 PAH 大鼠肺组织活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平的影响

取各组大鼠肺组织约 50 mg, 剪碎呈糊状后, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 加入 0.25% 胰酶, 37 °C 消化 30 min, 离心弃上清, 加入中和液终止消化; 加入 PBS 溶液, 经 100 目滤网滤过, 于 4% 多聚甲醛中固定 10 min; PBS 溶液洗涤 2 次, 加入含 0.1% Triton-X 100 的 DCFH-DA 染液, 染色 10 min 后; PBS 溶液洗涤 1 次, 经 300 目滤网滤过, 采用流式细胞仪检测荧光强度。

## 2.3 体外实验

### 2.3.1 细胞培养

HPAEC 用含 5% 胎牛血清、生长因子和双抗的内皮细胞培养基 (endothelial cell medium, ECM) 培养, 待培养瓶细胞融合度达到 85% 以上进行传代: 弃去 ECM, 用 DPBS 洗涤 2 次, 加入胰酶消化, 离心弃上清, 加入新鲜 ECM, 混匀, 按 1 : 3 比例进行传代。选择 3~6 代细胞进行后续实验。

### 2.3.2 地龙提取物对 HPAEC 存活率影响

于对数生长期的 HPAEC, 以  $3 \times 10^4$  孔接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后, 更换无血清 ECM 培养 24 h。设置对照组、尼日利亚菌素 (10 μmol/L) 组、尼日利亚菌素联合地龙提取物 (1.25、2.50、3.75、5.00 mg/mL) 组和地龙提取物 (5 mg/mL) 组, 按照上述分组加入相应药物, 培养 2 h; 其中尼日利亚菌素联合地龙提取物组和地龙提取物组加入地龙提取物预处理 2 h。每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 培养 2 h, 采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。每组设 6 个复孔。

细胞存活率 =  $A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$

### 2.3.3 地龙提取物对 HPAEC 凋亡的影响

按

“2.3.2”项下方法处理细胞，设置对照组、尼日利亚菌素（10 μmol/L）组、尼日利亚菌素联合地龙提取物（3.75 mg/mL）组、尼日利亚菌素联合 NAC（20 mmol/L）组和地龙提取物（3.75 mg/mL）组，按照上述分组加入相应药物，培养 2 h；其中尼日利亚菌素联合地龙提取物组和地龙提取物组加入地龙提取物预处理 2 h。按照试剂盒说明书检测各组细胞凋亡情况，于荧光显微镜下观察并拍照。

**2.3.4 地龙提取物对 HPAEC 线粒体功能的影响** 在 35 mm 共聚焦培养皿中接种细胞，按“2.3.3”项下方法进行分组及给药，加入含 mito-tracker Red（终浓度为 400 nmol/L）的培养基，37 °C 避光孵育 30 min，于共聚焦显微镜下观察并拍照。

**2.3.5 地龙提取物对 HPAEC ROS 水平的影响** 在 35 mm 共聚焦培养皿中接种细胞，按“2.3.3”项下方法进行分组及给药，加入含 DCFH-DA（终浓度为 10 μmol/L）的培养基，37 °C 避光孵育 10 min，于共聚焦显微镜下检测荧光强度。

**2.3.6 地龙提取物对 HPAEC IL-1β、Caspase-1 和 IL-18 蛋白表达的影响** 待培养瓶中细胞生长至 1×10<sup>6</sup>/瓶，按“2.3.3”项下方法进行分组及给药，收集细胞，提取蛋白，蛋白样品经十二烷基硫酸钠-

聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，封闭后分别加入 IL-1β 抗体（1：1000）、Caspase-1 抗体（1：1000）、IL-18 抗体（1：500）和 GAPDH 抗体（1：3000），4 °C 孵育过夜；加入二抗孵育 1 h 后，加入 ECL 发光液显影，采用 Image J 软件分析。

**2.4 统计学分析**

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示，使用 GraphPad Prism 8 软件进行分析。使用单向方差分析进行组间比较，行 Tukey 多重比较分析。

**3 结果**

**3.1 地龙提取物改善肺动脉高压大鼠的肺血流动力学**

如图 1 所示，与对照组相比，模型组大鼠 RVSP 升高，并伴 RVHI 增加（ $P < 0.01$ ）；给予地龙提取物后，肺动脉高压大鼠的 RVSP 和 RVHI 显著降低（ $P < 0.01$ ）。

**3.2 地龙提取物改善肺动脉高压大鼠的肺血管重构**

如图 2 所示，对照组大鼠肺组织形态结构完整，肺血管壁平滑且内皮细胞连续，血管壁无异常增厚；与对照组相比，模型组大鼠的肺血管壁明显增厚；管腔狭窄；给予地龙提取物后，肺动脉高压大鼠肺血管重构明显改善。

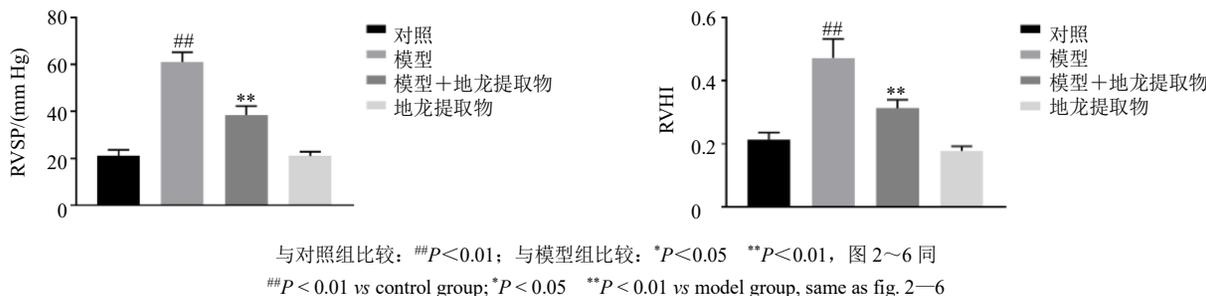


图 1 地龙提取物对肺动脉高压大鼠 RVSP 和 RVHI 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 1 Effect of *Pheretima* extract on RVSP and RVHI of rats with pulmonary arterial hypertension ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

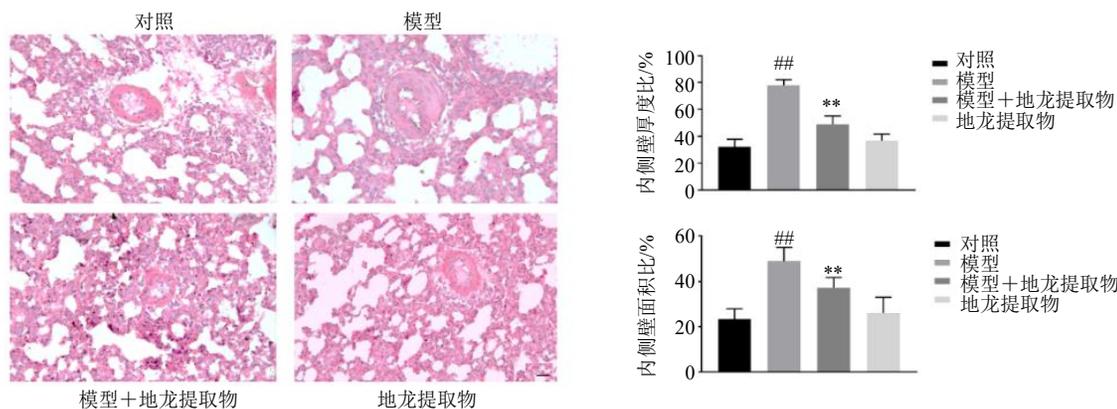


图 2 地龙提取物对肺动脉高压大鼠肺血管重构的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 2 Effect of *Pheretima* extract on pulmonary vascular remodeling in rats with pulmonary arterial hypertension ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 3.3 地龙提取物降低肺动脉高压大鼠肺组织 NLRP3 蛋白表达

免疫荧光(图3)和 Western blotting(图4)结果表明,肺动脉高压大鼠肺组织中 NLRP3 蛋白表达水平显著升高( $P < 0.01$ );给予地龙提取物后,肺动脉高压大鼠肺组织 NLRP3 蛋白表达水平显著降低( $P < 0.01$ )。

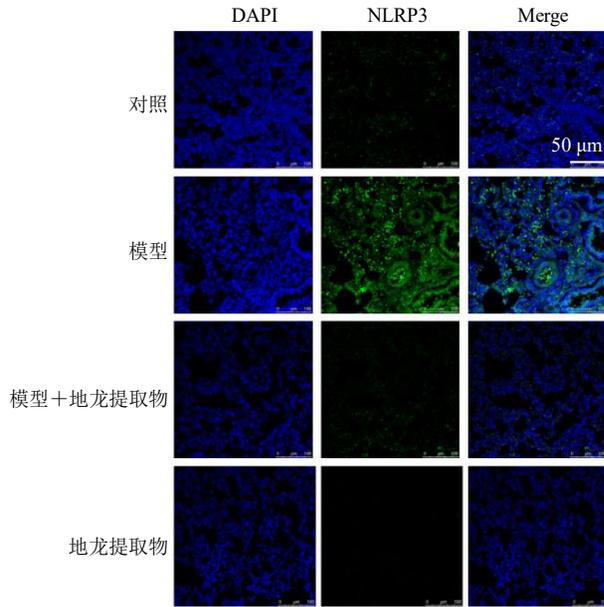


图3 免疫荧光法检测地龙提取物对肺动脉高压大鼠肺组织中 NLRP3 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 3 Effect of *Pheretima* extract on NLRP3 protein expression in lung tissue of rats with pulmonary arterial hypertension detected by immunofluorescence ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

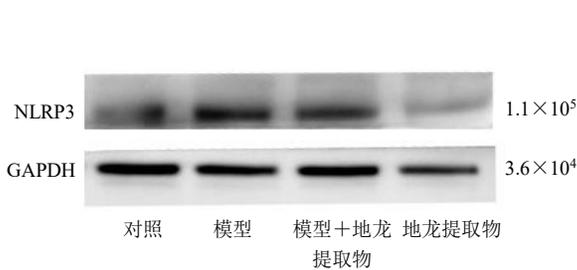


图4 Western blotting 法检测地龙提取物对肺动脉高压大鼠肺组织中 NLRP3 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effect of *Pheretima* extract on NLRP3 protein expression in lung tissue of rats with pulmonary arterial hypertension detected by Western blotting ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.4 地龙提取物减轻肺动脉高压大鼠肺组织上清液中炎症因子水平

如图5所示,与对照组比较,肺动脉高压大鼠肺组织炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18 水平显著升高( $P < 0.01$ );给予地龙提取物后,肺动脉高压大鼠肺组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18 水平显著降低( $P < 0.05, 0.01$ )。

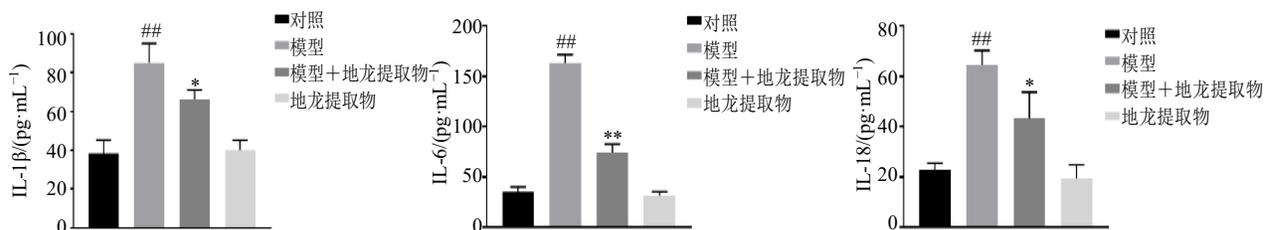
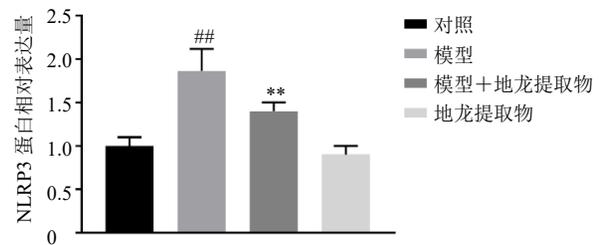
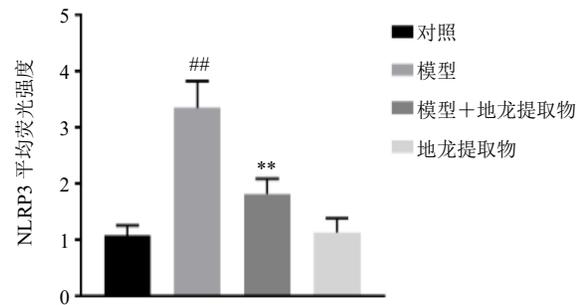


图5 地龙提取物对肺动脉高压大鼠肺组织 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-18 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 5 Effect of *Pheretima* extract on IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-18 levels in lung tissue of rats with pulmonary arterial hypertension ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 3.5 地龙提取物减轻肺动脉高压模型大鼠肺组织 ROS 水平

如图 6 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠肺组织 ROS 荧光强度显著增强 ( $P < 0.01$ ); 给予地龙提取物后, 肺动脉高压大鼠肺组织 ROS 荧光强度显著减低 ( $P < 0.05$ )。

### 3.6 地龙提取物对 HPAEC 存活率和凋亡的影响

如图 7 所示, 与对照组相比, 尼日利亚菌素处理 HPAEC 后, 细胞存活率显著降低 ( $P < 0.01$ ); 给

予地龙提取物 (3.75、5.00 mg/mL) 后, 细胞存活率显著升高 ( $P < 0.01$ )。

如图 8 所示, 与对照组相比, 尼日利亚菌素处理 HPAEC 后, 细胞凋亡数显著增加 ( $P < 0.01$ ); 给予地龙提取物或 NAC 后, 细胞凋亡数显著减少 ( $P < 0.01$ )。

### 3.7 地龙提取物减轻尼日利亚菌素诱导 HPAEC ROS 和线粒体损伤

DCFH-DA 染色 (图 9) 结果显示, 与对照组比

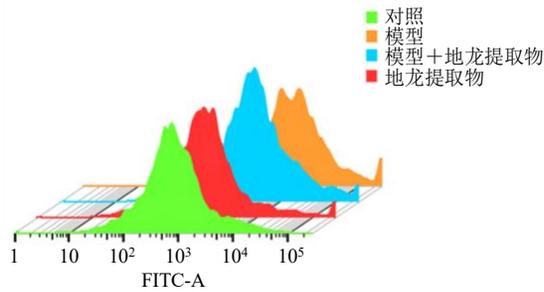
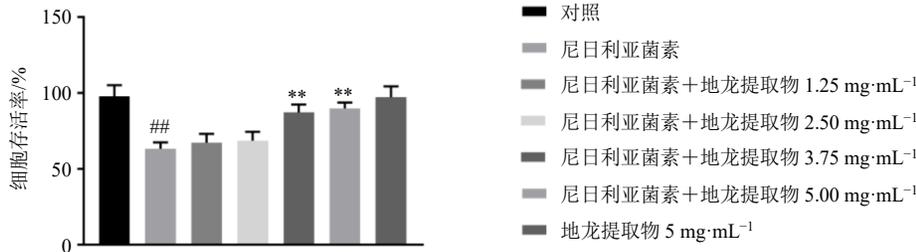
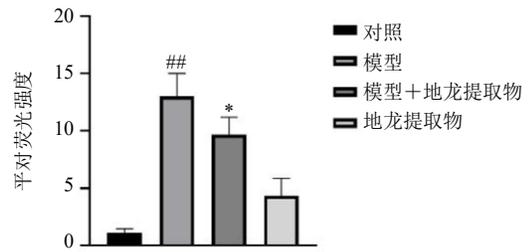


图 6 地龙提取物对肺动脉高压大鼠肺组织 ROS 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 Effect of *Pheretima* extract on ROS level in lung tissue of rats with pulmonary arterial hypertension ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



与对照组比较: ## $P < 0.01$ ; 与尼日利亚菌素组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ , 图 8、9、11 同  
## $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs nigericin group, same as fig. 8, 9, 11

图 7 地龙提取物对尼日利亚菌素诱导 HPAEC 存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 7 Effect of *Pheretima* extract on survival rate of HPAEC induced by nigericin ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

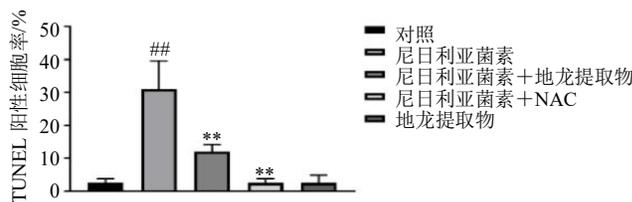
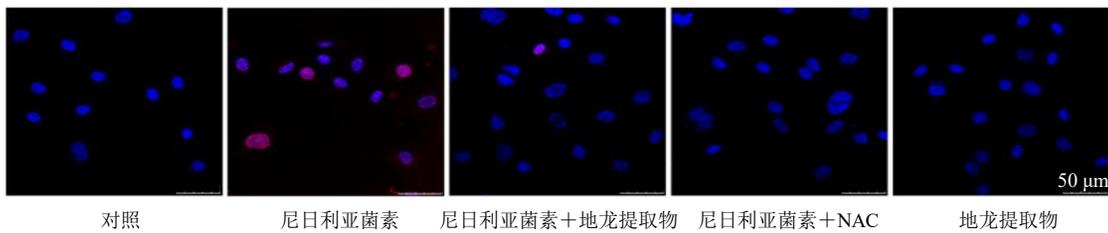


图 8 地龙提取物对尼日利亚菌素诱导 HPAEC 凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 8 Effect of *Pheretima* extract on apoptosis of HPAEC induced by nigericin ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

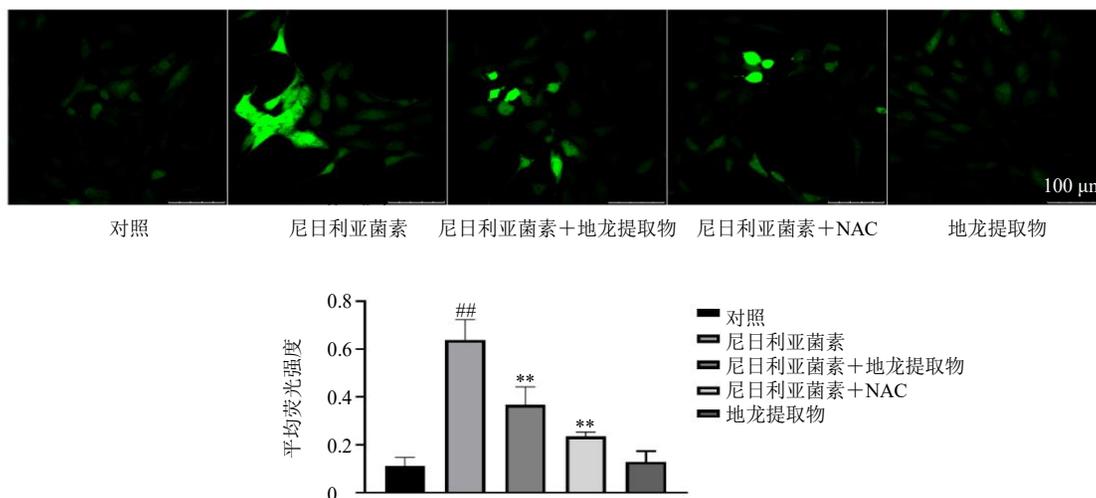


图9 地龙提取物对尼日利亚菌素诱导 HPAEC ROS 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 9 Effect of *Pheretima* extract on ROS level of HPAEC induced by nigericin ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

较, 尼日利亚菌素处理后细胞绿色荧光表达显著增强 ( $P < 0.01$ ); 给予地龙提取物或 NAC 后, 细胞绿色荧光表达明显降低 ( $P < 0.01$ )。Mito-tracker 染色 (图 10) 结果显示, 与对照组比较, 尼日利亚菌素处理细胞后, 细胞红色荧光标记线粒体形态改变, 提示线粒体裂变; 给予地龙提取物或 NAC 后, 线粒体裂变减少。

### 3.8 地龙提取物减轻尼日利亚菌素诱导 HPAEC 炎症相关蛋白表达

如图 11 所示, 与对照组比较, 尼日利亚菌素组 IL-1 $\beta$ 、Caspase-3 和 IL-18 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 给予地龙提取物或 NAC 后, 细胞 IL-1 $\beta$ 、Caspase-3 和 IL-18 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ )。

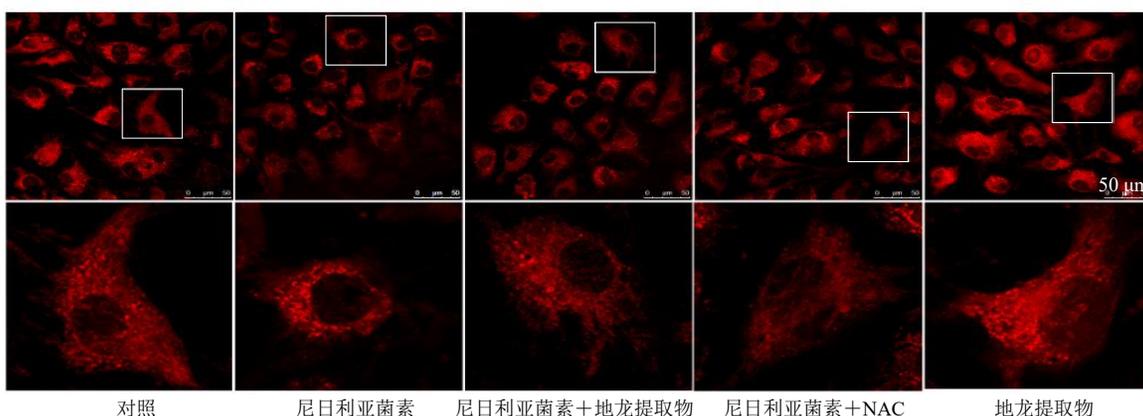


图 10 地龙提取物对尼日利亚菌素诱导 HPAEC 线粒体功能的影响

Fig. 10 Effect of *Pheretima* extract on mitochondrial function of HPAEC induced by nigericin

## 4 讨论

炎症因子在 PAH 患者的肺血管重构中发挥了关键作用<sup>[12]</sup>。野百合碱诱导 PAH 模型大鼠中, 其肺血管内皮细胞的损伤会募集大量免疫细胞和炎症细胞, 释放多种炎症因子造成血管内皮细胞功能紊乱<sup>[13]</sup>。炎症小体是 2002 年发现的一种模式识别受体, 而 NLRP3 炎症小体是迄今为止特征最丰富、最大的多聚体蛋白质复合物<sup>[14]</sup>。本研究发现, PAH

模型大鼠的肺组织中 NLRP3 蛋白表达显著增加, 同时 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-18 炎症因子分泌显著增多, 且给予 NLRP3 激动剂尼日利亚菌素刺激 HPAEC 后, 其炎症因子水平升高, 表明 NLRP3 的激活可增强肺血管内皮炎症反应。

地龙含有纤维蛋白溶解酶、蚓激酶和丝氨酸蛋白酶等多种活性蛋白成分, 具有良好的抗氧化、纤溶和免疫调节作用<sup>[15]</sup>。本研究结果显示, 地龙提取

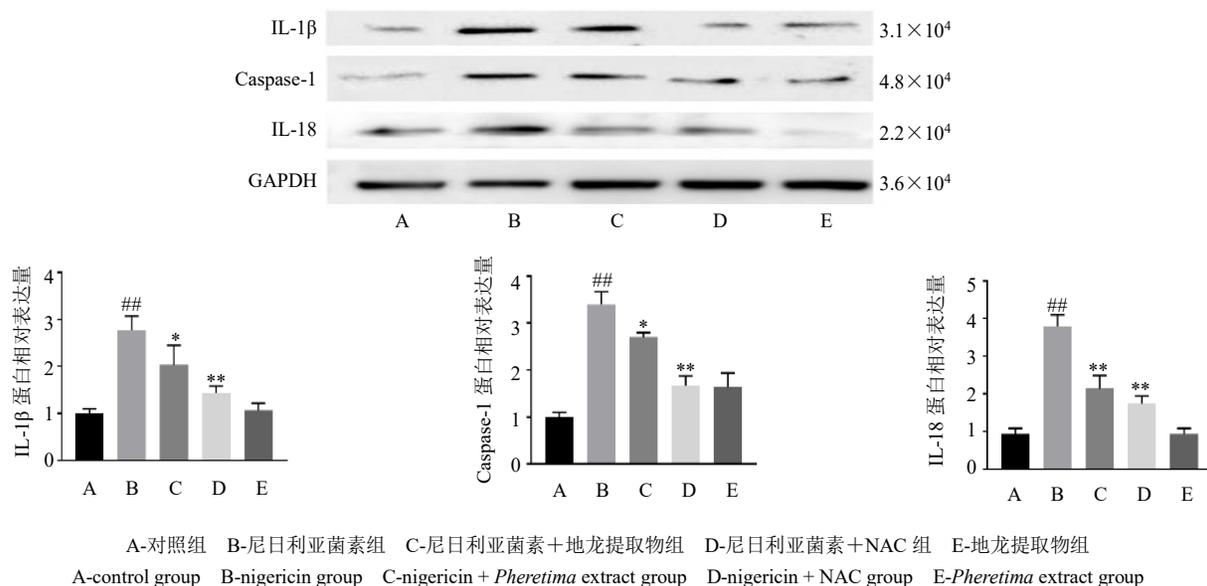


图 11 地龙提取物对尼日利亚菌素诱导 HPAEC IL-1β、Caspase-1 和 IL-18 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 11 Effect of *Pheretima* extract on IL-1β, Caspase-1 and IL-18 protein expressions in HPAEC induced by nigericin ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

物显著降低 PAH 大鼠的 RVSP，减轻肺血管重构，并抑制 PAH 大鼠肺组织中 NLRP3 激活；体外实验结果也证实，地龙提取物可减轻尼日利亚菌素刺激后的 HPAEC 中 IL-1β 等炎性因子的表达。由于 NAC 可治疗 PAH，显著改善肺血管内皮细胞功能紊乱，并抑制炎症反应及氧化应激、阻断 NLRP3 激活<sup>[16-17]</sup>，因此本研究将其作为对 HPAEC 保护的阳性对照药物。上述结果提示地龙提取物可显著减轻 PAH，其保护作用可能与阻断 NLRP3 过度激活、改善肺血管的炎症损伤密切相关。

PAH 与氧化应激密切相关<sup>[18]</sup>。肺血管内皮细胞损伤后引起线粒体功能异常，ROS 表达增加，诱导细胞凋亡<sup>[19]</sup>。应用抗氧化剂能够阻断 ROS 表达，改善肺血管内皮细胞功能紊乱<sup>[20]</sup>。本研究中地龙提取物降低 PAH 大鼠肺组织中 ROS 水平，减轻肺动脉内皮细胞线粒体功能损伤，抑制细胞凋亡，表明地龙提取物可能通过改善线粒体功能，减轻 PAH 大鼠内皮细胞损伤。

综上所述，本研究发现地龙提取物对 PAH 具有较好的防治作用，其机制可能是通过抑制肺血管内皮 NLRP3 诱导的线粒体 ROS 水平和炎症反应从而抑制肺血管重构。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 成然, 刘川, 黄岚. 2019 年国内外肺动脉高压基础领域

重要研究进展 [J]. 中华心血管病杂志: 网络版, 2020, 3(1): 1-6.

[2] 官莉, 高宝安, 陈世雄, 等. 肺动脉高压与脑利钠肽、血管内皮功能和炎性细胞因子的相关性 [J]. 天津医药, 2011, 39(7): 643-644.

[3] 付艳缙, 咎杰彧, 解玉. NLRP3 炎症小体与哮喘的关系及中医药调控作用概述 [J]. 山东中医药大学学报, 2021, 45(3): 413-417.

[4] 周声志, 陈建英. 炎症及 NLRP3 炎症小体在肺动脉高压中的作用研究进展 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2020, 28(5): 116-120.

[5] 蔡学定, 陈马云, 李文雅, 等. 姜黄素通过 NLRP3/Caspase-1/IL-1β 轴对低氧性肺动脉高压的干预作用 [J]. 温州医科大学学报, 2020, 50(2): 98-101.

[6] 王璐, 蒙艳丽, 王伟明. 地龙治疗肺部疾病 [J]. 黑龙江中医药, 2018, 47(6): 121-122.

[7] 张平云, 付义, 杨春艳. 云药七龙天治疗肺胀探析 [J]. 河南中医, 2020, 40(12): 1828-1830.

[8] Yang J, Wang T, Li Y, et al. Earthworm extract attenuates silica-induced pulmonary fibrosis through Nrf2-dependent mechanisms [J]. *Lab Invest*, 2016, 96(12): 1279-1300.

[9] 石召华, 陈立军, 黄文芳, 等. 地龙活性组分提取物干燥方式的筛选 [J]. 中药材, 2015, 38(7): 1363-1365.

[10] 陈宏, 张伟, 郭建波, 等. 地龙提取物抗肺纤维化的有效成分分析 [J]. 中医药信息, 2020, 37(3): 14-16.

[11] Nogueira-Ferreira R, Vitorino R, Ferreira R, et al. Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach [J].

- Pulm Pharmacol Ther*, 2015, 35: 8-16.
- [12] Rabinovitch M, Guignabert C, Humbert M, *et al.* Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension [J]. *Circ Res*, 2014, 115(1): 165-175.
- [13] 周美君, 邢岩江, 杨隽. NF- $\kappa$ B 抑制剂通过逆转 LPS 诱导的 BMPRII 下调改善肺血管重构 [J]. *生理学报*, 2020, 72(5): 541-550.
- [14] Wei S, Ma W, Zhang B, *et al.* NLRP3 inflammasome: A promising therapeutic target for drug-induced toxicity [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 634607.
- [15] 刘巧, 毕启瑞, 谭宁华. 地龙蛋白多肽类成分的研究进展 [J]. *中草药*, 2019, 50(1): 252-261.
- [16] Li Q, Qiu Y, Mao M, *et al.* Antioxidant mechanism of rutin on hypoxia-induced pulmonary arterial cell proliferation [J]. *Molecules*, 2014, 19(11): 19036-19049.
- [17] Shen C, Liu J, Zhu F, *et al.* The effects of cooking oil fumes-derived PM2.5 on blood vessel formation through ROS-mediated NLRP3 inflammasome pathway in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 174: 690-698.
- [18] 张艳华, 程江涛, 胡宇才. 氧化应激及其信号转导途径与肺动脉高压关系研究进展 [J]. *心肺血管病杂志*, 2016, 35(4): 334-337.
- [19] 苏恩勇, 高传玉. 内皮功能障碍与心血管疾病关系的研究进展 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2018, 32(6): 622-624.
- [20] 谢欣芸, 崑冰, 苑群, 等. CAT、CYBA 及 NIK 基因与慢性阻塞性肺疾病及相关肺动脉高压易感性的关系 [J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(7): 1302-1307.

[责任编辑 李亚楠]