

清咽滴丸通过调控 NLRP3/Caspase-1 和 p38 MAPK/JNK 信号通路缓解肺部炎症

李瑾颖¹, 王欣跃¹, 丁奕然¹, 任戎³, 耿彤³, 商丹丹³, 王跃飞^{1,2}, 杨静^{1*}, 张敏^{1,2*}

1. 天津中医药大学 现代中药创制全国重点实验室, 天津 301617

2. 现代中医药海河实验室, 天津 301617

3. 津药达仁堂集团股份有限公司 天津市中药质量控制重点实验室, 天津 300457

摘要: **目的** 基于 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor pyrin domain containing 3, NLRP3) /半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cystein-aspartate protease-1, Caspase-1) 信号通路和 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) /c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号通路探讨清咽滴丸缓解肺部炎症的作用机制。**方法** 50 只雄性 Balb/C 小鼠随机分为对照组、模型组、地塞米松 (5 mg/kg) 组和清咽滴丸低、高剂量 (0.2、0.8 g/kg) 组, 给药干预 7 d。末次给药 1 h 后, 除对照组外, 其余小鼠 ip 脂多糖 (5 mg/kg) 诱导急性炎症损伤模型。造模 4 h 后, 取血清和肺组织, 计算肺组织湿干质量比; 采用 ELISA 法检测血清中白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18)、IL-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色检测肺组织病理学变化; 免疫组化法检测肺组织中 p-p38 MAPK 蛋白表达; Western blotting 检测肺组织中 p-p38 MAPK、p-JNK、B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax)、NLRP3、B 细胞淋巴瘤-3 (B-cell lymphoma-3, Bcl-3)、硫氧还蛋白相互作用蛋白 (thioredoxin-interacting protein, TXNIP) 和 Caspase-1 的表达; DHE 染色法检测肺组织中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平; TUNEL 染色检测肺组织中细胞焦亡水平。**结果** 与模型组比较, 清咽滴丸可显著降低 LPS 诱导的小鼠肺组织湿干质量比 ($P<0.05$), 改善肺损伤, 显著下调血清中 IL-18、IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平 ($P<0.05$ 、 0.01), 降低肺组织中 p38 MAPK 和 JNK 的磷酸化水平 ($P<0.01$ 、 0.001), 显著下调肺组织中 Bax、NLRP3、Bcl-3、TXNIP 和 Caspase-1 蛋白表达 ($P<0.001$), 降低 ROS 的过度积累 ($P<0.01$ 、 0.001), 抑制细胞焦亡 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。**结论** 清咽滴丸可显著改善 LPS 诱导的小鼠肺部炎症, 其作用机制为通过抑制 NLRP3/Caspase-1 通路介导的细胞焦亡和 p38 MAPK/JNK 通路激活协同发挥抗炎作用。

关键词: 清咽滴丸; 炎症反应; NLRP3/Caspase-1 信号通路; p38 MAPK/JNK 信号通路; 细胞焦亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2026)14-5591-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.14.020

Qingyan Dropping Pills alleviates pulmonary inflammation via regulating NLRP3/Caspase-1 and p38 MAPK/JNK signaling pathways

LI Cuiying¹, WANG Xinyue¹, DING Yiran¹, REN Rong³, GENG Tong³, SHANG Dandan³, WANG Yuefei^{1,2}, YANG Jing¹, ZHANG Min^{1,2}

1. State Key Laboratory of Chinese Medicine Modernization, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Haihe Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

3. Tianjin Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Control, Tianjin Pharmaceutical Da Ren Tang Group Corporation Limited, Tianjin 300457, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Qingyan Dropping Pills (清咽滴丸, QDP) in alleviating pulmonary

收稿日期: 2025-12-16

基金项目: 现代中医药海河实验室科技项目 (25HHZYSS00006); 国家中医药管理局科技项目 (GZY-KJS-2025-063)

作者简介: 李瑾颖, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药活性物质评价。E-mail: lcying246@163.com

*通信作者: 杨静, 女, 高级实验师, 研究方向为中药质量评价。E-mail: yangjingoffice@163.com

张敏, 女, 副研究员, 研究方向为中药活性物质评价。E-mail: zhangm036@tjutcm.edu.cn

inflammation based on NOD-like receptor pyrin domain containing 3 (NLRP3)/cystein-aspartate protease-1 (Caspase-1) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)/c-Jun *N*-terminal kinase (JNK) signaling pathways. **Methods** A total of 50 male Balb/C mice were randomly divided into control group, model group, dexamethasone (5 mg/kg) group, QDP low-, high-dose (0.2, 0.8 g/kg) groups, and mice were intervened with drugs for 7 d. One hour after the last administration, except for the control group, all other mice were induced with lipopolysaccharide (5 mg/kg) to form an acute inflammatory injury model. After 4 h of modeling, serum and lung tissue were collected to calculate the wet dry weight ratio of lung tissue. Levels of interleukin-18 (IL-18), IL-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum were measured by ELISA. Histopathological changes in lung were evaluated by hematoxylin-eosin (HE) staining. Expression of p-p38 MAPK was assessed by immunohistochemistry. Western blotting was employed to analyze protein levels of p-p38 MAPK, p-JNK, Bcl-2-associated X protein (Bax), NLRP3, B-cell lymphoma-3 (Bcl-3), thioredoxin-interacting protein (TXNIP) and Caspase-1 in lung tissue. Reactive oxygen species (ROS) level was evaluated by dihydroethidium (DHE) staining. Pyroptosis level in lung tissue was detected by TUNEL staining. **Results** Compared with model group, QDP could significantly reduce the wet dry weight ratio of lung tissue in LPS-induced mice ($P < 0.05$), improve lung injury, significantly down-regulate the levels of IL-18, IL-6, TNF- α and IL-1 β in serum ($P < 0.05, 0.01$), reduce the phosphorylation levels of p38 MAPK and JNK in lung tissue ($P < 0.01, 0.001$), significantly down-regulate the protein expressions of Bax, NLRP3, Bcl-3, TXNIP and Caspase-1 in lung tissue ($P < 0.001$), reduce the excessive accumulation of ROS ($P < 0.01, 0.001$), and inhibit cell apoptosis ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** QDP could significantly improve LPS-induced lung inflammation in mice, and its mechanism is related to synergistically exert anti-inflammatory effects by inhibiting NLRP3/Caspase-1 pathway mediated cell apoptosis and p38 MAPK/JNK pathway activation.

Key words: Qingyan Dropping Pills (QDP); inflammatory response; NLRP3/caspase-1 signaling pathway; p38 MAPK/JNK signaling pathway; pyroptosis

清咽滴丸是基于《兰台轨范》记载的“清音丸”与《喉科心法》记载的“六神丸”经配伍优化,结合现代滴丸技术形成的中药复方制剂。全方由诃子、人工牛黄、青黛、甘草、冰片、薄荷脑 6 味药材组成,以青黛和诃子为双君药,协同发挥消肿、止痛、解毒、利咽、祛风等功效,临床上广泛应用于咽喉炎症及相关疾病的治疗^[1-2]。清咽滴丸上市至今已有 30 余年,临床疗效显著,已有研究证实其具有良好的抗病毒与抗流感的疗效^[3-5],但其对炎症反应过度激活的调控作用尚未得到系统阐释。

炎症反应是机体应对感染、损伤或外界刺激的重要防御机制,但其过度激活或持续存在可导致多种慢性疾病,如呼吸道感染、心血管疾病及代谢综合征等^[6]。中医药多成分、多靶点、多通路的特点为炎症相关疾病的治疗提供了新的思路^[7-8]。在炎症反应中, NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor pyrin domain containing 3, NLRP3) 通过感知病原体或损伤信号激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cystein-aspartate protease-1, Caspase-1), 产生白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-18 等促炎因子,介导细胞程序性死亡,诱导细胞焦亡,加剧炎症反应^[9-10]。当机体受到氧化应激刺激, p38 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) /c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun

N-terminal kinase, JNK) 信号通路被激活,磷酸化下游转录因子如激活蛋白-1 (activating protein-1, AP-1)、核因子 (nuclear factor- κ B, NF- κ B), 促进肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6 等炎症介质的释放,进一步放大炎症反应^[11]。因此,靶向抑制 NLRP3/Caspase-1 通路介导的细胞焦亡和 p38 MAPK/JNK 通路激活,可协同发挥抗炎作用。

本研究构建脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 诱导的小鼠炎症模型,综合运用 ELISA、Western blotting 等分子生物学技术,靶向 NLRP3/Caspase-1 和 p38 MAPK/JNK 信号通路,系统评估清咽滴丸对 LPS 诱导的小鼠肺部炎症的治疗作用并揭示其潜在作用机制,为其在临床治疗肺部炎症提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 Balb/C 小鼠 50 只, 6~8 周龄, 体重 18~22 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2019-0008。动物于昼夜交替环境下适应性喂养 3 d。动物实验经天津中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 TCM-LAEC2023136)。

1.2 药品与试剂

清咽滴丸 (国药准字 Z10930004, 批号 6223019) 由津药达仁堂集团股份有限公司提供; 地

塞米松磷酸钠注射液（国药准字 H37021969，批号 23010813，规格 5 mg/mL）、LPS（批号 L2880-100MG）购自山东鲁抗辰欣药业有限公司；IL-6 ELISA 试剂盒、IL-1 β ELISA 试剂盒、IL-18 ELISA 试剂盒、TNF- α ELISA 试剂盒（批号分别为 E20231213-35421、E20231213-35422、E20231213-35431、E20231213-35423）购自上海茁彩生物科技有限公司；HRP 标记的二抗、 β -tubulin 抗体、p38 MAPK 抗体、p-p38 MAPK 抗体、JNK 抗体、p-JNK 抗体、NLRP3 抗体、Caspase-1 抗体、B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 associated X protein, Bax）抗体、B 细胞淋巴瘤-3（B-cell lymphoma-3, Bcl-3）抗体、硫氧还蛋白相互作用蛋白（thioredoxin-interacting protein, TXNIP）抗体（批号分别为 AS014、AC008、A4771、AP0526、A4867、AP0631、A5652、22915-1-AP、A19684、A11582、A9342）购自武汉爱博泰克生物科技有限公司；BCA 试剂盒（批号 P0010S）购自上海碧云天生物技术有限公司；苯甲基磺酰氟（phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF）蛋白酶抑制剂、RIPA 裂解液（批号分别为 P1261、R0010-100）购自北京索莱宝科技有限公司；活性氧（reactive oxygen species, ROS）检测试剂盒、DAPI 染液（货号分别为 HR9069、C02-04002）购自北京百奥莱博科技有限公司；DAB 显色试剂盒、TUNEL 试剂盒（货号分别为 ZLI-9018、E-CK-A320）购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 仪器

JT-12J 型脱水机、JB-L8 型包埋机、JB-L8 冻台、JK-6 型组织摊片机（武汉俊杰电子有限公司）；LEiCA RM2245 型病理切片机（上海徕卡仪器有限公司）；DP26 型显微镜[奥林巴斯（中国）有限公司]；YW183FAI 型压力锅（浙江苏泊尔股份有限公司）；TS-200 型摇床（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）；Infinite F50 型酶标仪（瑞士帝肯公司）；CKX41SF 型倒置相差显微镜（日本奥林巴斯公司）；D-37520 Osterode 型台式高速冷冻离心机（美国赛默飞世尔科技公司）。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

50 只雄性 Balb/C 小鼠适应性喂养 3 d 后，按照随机数字法分为对照组、模型组、地塞米松（5 mg/kg）组和清咽滴丸低、高剂量（0.2、0.8 g/kg）组，每组 10 只。由于清咽滴丸溶于水后为混悬液状

态，无法采用 ip 给药，故清咽滴丸各剂量组 ig 药物溶液，地塞米松组 ip 地塞米松，对照组和模型组 ig 生理盐水，1 次/d，连续给药 7 d。在第 7 天给药 1 h 后，除对照组外，其余小鼠 ip LPS 溶液（5 mg/kg），造模 4 h 后取小鼠血清及肺组织。

2.2 小鼠一般体征观察

观察各组小鼠一般情况变化，包括小鼠体质量、毛发光泽、精神状态、呼吸、食欲、活动情况等。

2.3 肺组织湿干质量比测定

摘取小鼠右肺下叶，用生理盐水连续冲洗 3 次，洗净肺组织表面的血迹并分离多余组织，滤纸吸干水分，称定质量，记为湿质量。将洗净的肺组织置于 80 °C 烘箱烘烤 72 h，待肺组织干燥至恒定质量，再次称定质量，记为干质量。计算肺组织湿干质量比，肺组织湿干质量比越高，提示肺水肿越严重。

2.4 苏木素-伊红（hematoxylin-eosin, HE）染色观察肺组织病理变化

取小鼠左肺组织样本，通过常规方法进行脱水、包埋和切片，切片厚度为 3 μ m，脱蜡后进行 HE 染色，组织切片通过光学显微镜进行病理学观察。

2.5 ELISA 检测血清中炎症因子水平

将小鼠的血液样本在 4 °C 冰箱中静置过夜，随后以 4 °C、3 000 r/min 离心 20 min，取上层血清。按照 ELISA 试剂盒说明书测定血清中 IL-1 β 、IL-6、IL-18 和 TNF- α 水平。

2.6 Western blotting 检测肺组织中相关蛋白表达

使用 RIPA 裂解液提取肺组织总蛋白，通过 BCA 法测定蛋白浓度。等量蛋白样品经煮沸变性后进行 SDS-PAGE 电泳，随后湿转至 PVDF 膜。PVDF 膜经 5% 脱脂牛奶封闭 2 h 后，分别加入一抗（p-p38 MAPK、p-JNK、Bax、NLRP3、Bcl-3、TXNIP、Caspase-1），4 °C 孵育过夜；洗膜后，加入二抗于室温孵育 2 h，洗膜后，以增强化学发光试剂显影，使用 Image J 软件进行分析，以 β -tubulin 作为内参计算目标蛋白相对表达量。

2.7 免疫组化检测肺组织中 p-p38 MAPK 表达

肺组织切片经二甲苯与梯度乙醇（100%→85%→75%）脱蜡至水化后，置于柠檬酸盐缓冲液（pH 6.0）或 EDTA 缓冲液（pH 9.0）中进行微波抗原修复。随后以 3% 双氧水阻断内源性过氧化物酶，山羊血清封闭 30 min。滴加一抗于 4 °C 孵育过夜，PBS 洗涤后，加 HRP 标记的二抗于室温孵育 50 min，DAB 显色，苏木素复染细胞核，盐酸乙醇分

化,氨水返蓝,梯度乙醇(75%→100%)及二甲苯脱水透明,中性树胶封片,于显微镜下观察。

2.8 DHE 染色检测肺组织中 ROS 水平

肺组织切片经清洗液清洗后,避光条件下滴加稀释 100~200 倍的 DHE 探针工作液,37 °C 孵育 20~60 min,移除染色液后,PBS 洗涤 2~3 次,DAPI 复染细胞核,PBS 洗涤,甘油封片后于显微镜下观察。各样本均随机选取 3 个视野,采用 Image J 软件对 ROS 水平进行定量分析,并依据定量分析结果进行统计学分析。

2.9 TUNEL 染色检测肺组织中细胞焦亡水平

肺组织切片经蛋白酶 K (100 倍稀释) 处理后,滴加 TdT 平衡缓冲液 (100 μ L, 37 °C 孵育 10~30 min),吸干后加入荧光标记液的 TUNEL 检测液 (50 μ L, 37 °C 避光孵育 1 h)。PBS 洗涤 3 次后,DAPI (1:25 稀释) 复染细胞核 (5 min, 避光),PBS 洗涤 4 次,抗荧光淬灭剂封片后,于荧光显微镜下观察并拍照。各样本均随机选取 3 个视野,采用 Image J 软件对 TUNEL 阳性结果进行定量分析,并依据定量分析结果进行统计学分析。

2.10 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA),两组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 清咽滴丸对 LPS 诱导的小鼠一般状态的影响

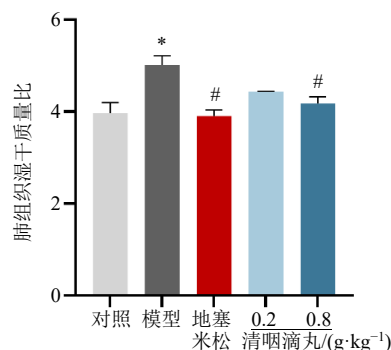
对照组小鼠毛色有光泽,精神状态良好,活动活跃,摄食正常,无聚集行为。模型组小鼠则逐渐表现出呼吸急促、喘息、精神萎靡、身体颤抖、食欲减退以及喜好扎堆等现象;清咽滴丸低剂量组小鼠上述症状较模型组减轻,而清咽滴丸高剂量组与地塞米松组小鼠上述症状进一步缓解,尤以喘息症状改善较为明显,但仍可见精神不佳和聚集倾向。

3.2 清咽滴丸对 LPS 诱导的小鼠肺组织湿干质量比的影响

如图 1 所示,与对照组比较,模型组小鼠肺组织湿干质量比显著升高 ($P < 0.05$),表明小鼠肺组织水肿程度明显加重,提示肺组织损伤模型成功建立;与模型组比较,地塞米松组和清咽滴丸高剂量组小鼠肺组织湿干质量比显著降低 ($P < 0.05$),表明地塞米松和清咽滴丸能够有效缓解肺水肿,减轻肺组织损伤。

3.3 清咽滴丸对 LPS 诱导的小鼠肺组织病理变化的影响

如图 2 所示,对照组肺组织形态结构正常,肺泡腔清晰,肺泡间隔无明显水肿或炎性细胞浸润。与对照组比较,模型组肺泡腔内可见大量炎性细胞浸润,肺泡壁水肿显著,腔内渗出物增多,肺泡间隔明显增厚,肺结构损伤严重,表明 LPS 成功诱导小鼠急性炎症模型。与模型组比较,各给药组肺组

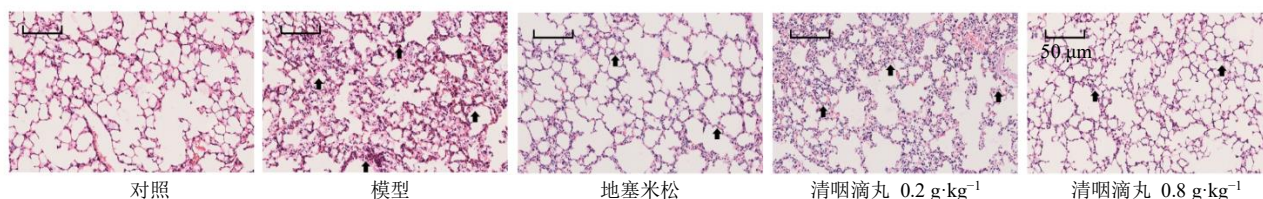


与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 下同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 1 各组小鼠肺组织湿干质量比 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 1 Wet dry weight ratio of lung tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)



箭头指示肺组织中炎性细胞浸润、肺泡壁增厚及肺泡结构破坏的病变区域。

Arrows indicate lesional areas with inflammatory cell infiltration, alveolar wall thickening and alveolar structural damage in lung tissue.

图 2 清咽滴丸对 LPS 诱导的小鼠肺组织病理变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 2 Effect of Qingyan Dropping Pills on pathological changes in lung tissue of LPS-induced mice (HE, ×200)

组织的炎性细胞浸润减少,肺组织病理损伤程度减轻,肺泡腔渗出物明显减少,且清咽滴丸高剂量组改善效果较为显著,接近地塞米松组。

3.4 清咽滴丸对 LPS 诱导的小鼠血清中 IL-18、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平的影响

如图 3 所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中炎症因子 IL-18、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001),表明炎症模型建立成功;与

模型组比较,各给药组小鼠血清中 IL-18、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),表明地塞米松和清咽滴丸能够有效抑制炎症因子释放,缓解炎症反应。

3.5 清咽滴丸对 LPS 诱导的小鼠肺组织中 MAPK 通路相关蛋白表达的影响

如图 4-A 所示,各组 p38 MAPK、JNK 蛋白表达无明显差异。与对照组比较,模型组小鼠肺组织

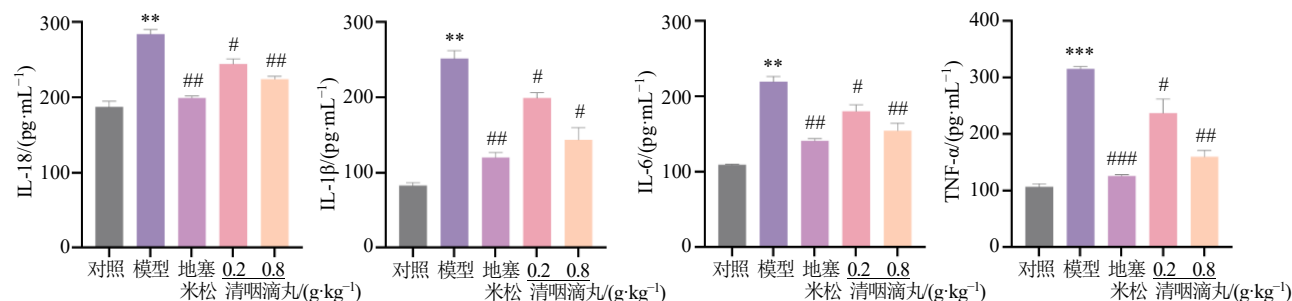
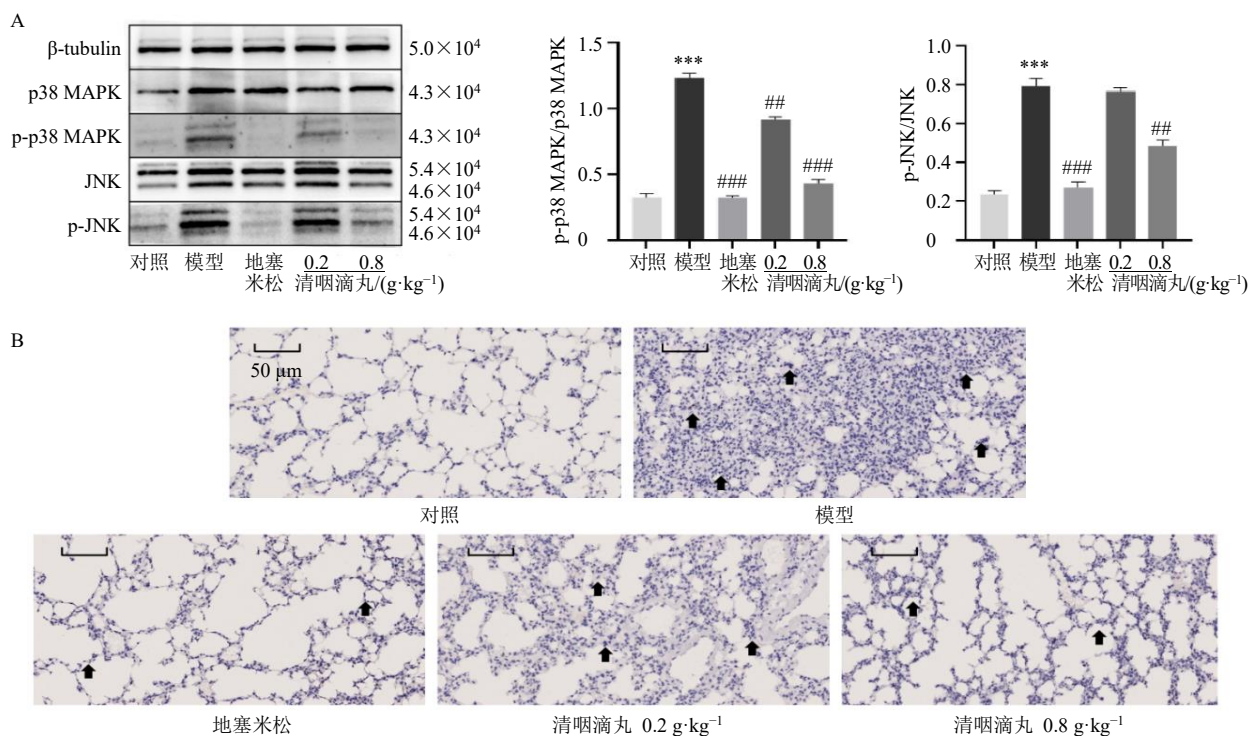


图 3 清咽滴丸对 LPS 诱导的小鼠血清中 IL-18、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effect of Qingyan Dripping Pills on levels of IL-18, IL-1 β , IL-6 and TNF- α in serum of LPS-induced mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)



A-Western blotting 检测肺组织 MAPK 通路相关蛋白表达; B-免疫组化检测肺组织 p-p38 MAPK 表达 ($\times 200$), 箭头指示 p-p38 MAPK 的阳性染色区域。

A-expressions of MAPK pathway-related proteins in lung tissue detected by Western blotting; B-expression of p-p38 MAPK in lung tissue detected by immunohistochemistry ($\times 200$), arrow indicates positive staining area of p-p38 MAPK.

图 4 清咽滴丸对 LPS 诱导的小鼠肺组织中 MAPK 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of Qingyan Dripping Pills on expressions of MAPK pathway related proteins in lung tissue of LPS-induced mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

中 p38 MAPK 和 JNK 的磷酸化水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组 p38 MAPK 的磷酸化水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 地塞米松组和清咽滴丸高剂量组 JNK 的磷酸化水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。免疫组化结果(图 4-B)与 Western blotting 结果一致, 各给药组小鼠肺组织中 p-p38 MAPK 的阳性表达减少。表明清咽滴丸可能通过抑制 MAPK 信号通路减轻 LPS 诱导的小鼠炎症反应。

3.6 清咽滴丸对 LPS 诱导的小鼠肺组织中 Bax、NLRP3、Bcl-3、TXNIP 和 Caspase-1 蛋白表达的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织中与细胞焦亡及炎症小体激活相关的关键蛋白(Bax、NLRP3、Bcl-3、TXNIP、Caspase-1)表达均显著上调($P < 0.001$), 表明细胞焦亡过程及 NLRP3 炎症小体通路被显著激活, 提示细胞焦亡和炎症反应的相互作用可能在疾病进展中发挥了重要作用。与模型组比较, 各给药组小鼠肺组织中 Bax、NLRP3、Bcl-3、TXNIP 及 Caspase-1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 表明清咽滴丸可能通过调控 Bax/Bcl-3 相关的细胞线粒体焦亡通

路以及 TXNIP/NLRP3/Caspase-1 炎症小体信号通路, 抑制细胞焦亡与炎症反应的级联放大效应, 从而保护肺组织。

3.7 清咽滴丸对 LPS 诱导的小鼠肺组织中 ROS 水平的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织中 ROS 水平显著升高 ($P < 0.001$), 表明肺组织发生了显著的氧化应激反应。与模型组比较, 地塞米松组和清咽滴丸高剂量组均能显著抑制 ROS 的过度积累 ($P < 0.001$), 提示二者可能通过减轻氧化应激来缓解肺组织损伤。

3.8 清咽滴丸对 LPS 诱导的小鼠肺组织中细胞焦亡的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织中焦亡细胞数量明显增加 ($P < 0.001$), 表明在病理状态下肺组织细胞焦亡水平显著升高, 这一变化可能与氧化损伤、炎症因子释放或线粒体功能异常等机制有关。与模型组比较, 各给药组焦亡细胞数量显著减少 ($P < 0.01$ 、 0.001), 表明地塞米松组和清咽滴丸可能通过干预焦亡相关信号转导途径, 减轻肺组织细胞的异常焦亡, 进而发挥肺保护作用。

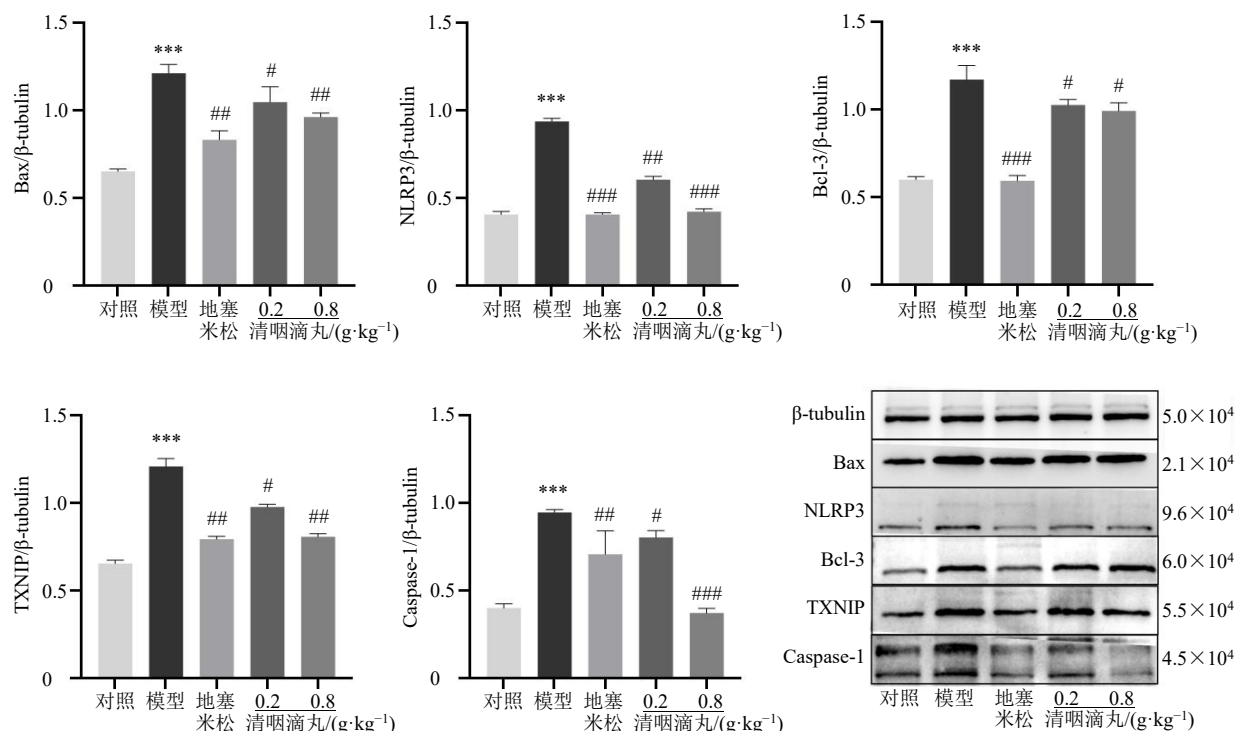
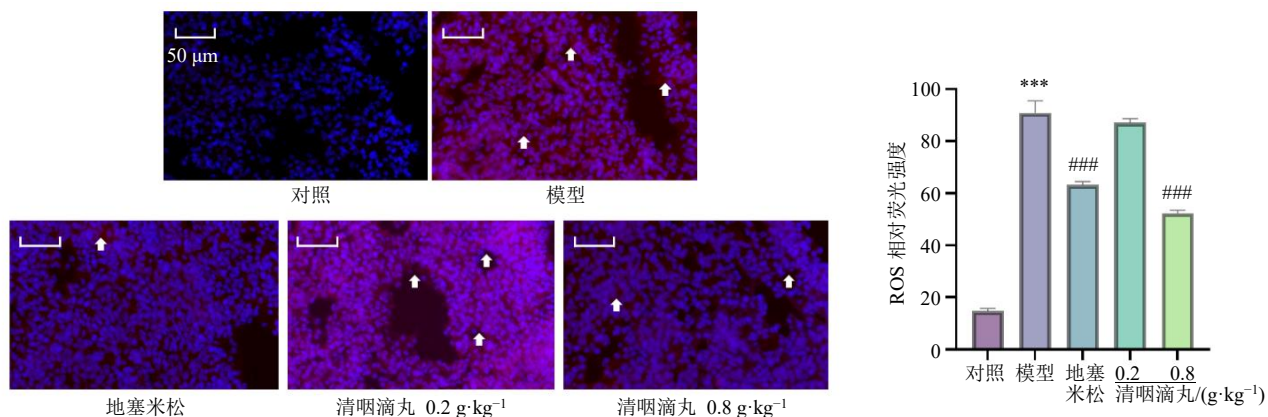


图 5 清咽滴丸对 LPS 诱导的小鼠肺组织中 Bax、NLRP3、Bcl-3、TXNIP 和 Caspase-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5 Effect of Qingyan Dripping Pills on expressions of Bax, NLRP3, Bcl-3, TXNIP and Caspase-1 proteins in lung tissue of LPS-induced mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

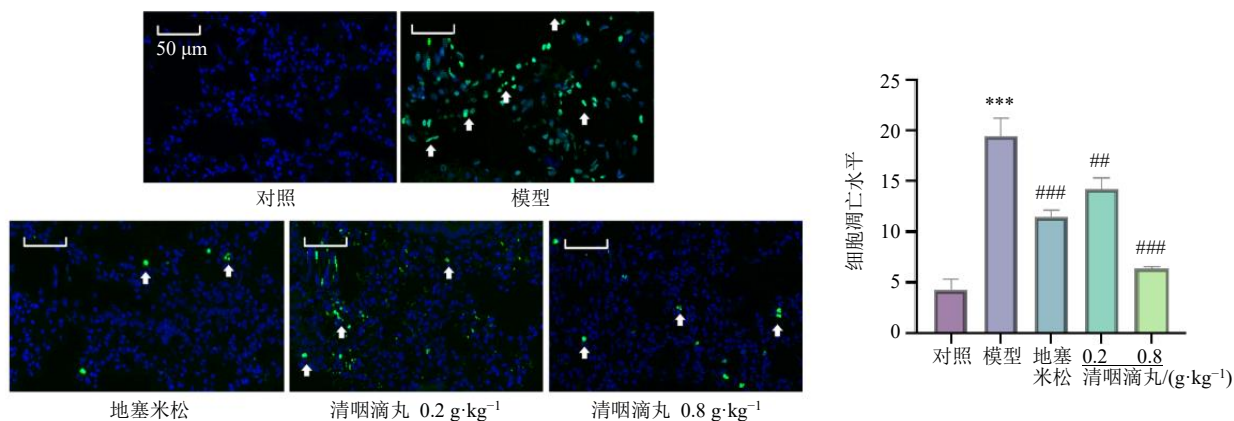


箭头指示肺组织中 ROS 高表达的阳性荧光区域。

Arrow indicates positive fluorescent region with high expression of ROS in lung tissue.

图 6 清咽滴丸对 LPS 诱导的小鼠肺组织中 ROS 水平的影响 ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effect of Qingyan Dripping Pills on ROS level in lung tissue of LPS-induced mice ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



箭头指示肺组织中 TUNEL 阳性的焦亡细胞。

Arrow indicates TUNEL positive pyroptosis cells in lung tissue.

图 7 清咽滴丸对 LPS 诱导的小鼠肺组织中细胞焦亡的影响 ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 Effect of Qingyan Dripping Pills on pyroptosis in lung tissue of LPS-induced mice ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

LPS 是革兰阴性菌细胞壁的主要成分, 可通过激活 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/NF- κ B 信号通路显著上调促炎因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) 和抗炎因子 (IL-4、IL-10、IL-13) 的表达, 并诱导肺、肾组织细胞凋亡。同时, LPS 能够诱导系统性炎症反应综合征^[12], 能较好模拟人类急性炎症的病理特征^[13]。炎症是机体抵御病原体入侵和组织损伤的重要生理过程, 然而其过度活化可引发组织病理改变及多种疾病的发生发展。课题组前期网络药理学研究表明, 清咽滴丸可激活 TNF 信号通路, 进而激活 MAPK 信号通路, 与 IL-17 等通路协同调控 IL-6、TNF 等核心炎症靶点, 在调节人体的免疫应

答和炎症反应中相互作用, 发挥抗炎、抗流感的功效。虚拟对接与体外活性实验也进一步证明, 清咽滴丸活性成分异鼠李素、山柰酚、诃子次酸、鞣花酸与 TNF- α 、IL-6 具有良好的结合活性, 且均能以剂量相关的方式显著抑制 TNF- α 和 IL-6 的分泌, 柯里拉京、柚皮芸香苷、金缕梅鞣质、没食子酸、异甘草苷、甘氨酸胆酸等成分均能剂量相关性地抑制一氧化氮释放, 并显著降低 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等促炎因子水平, 表明这些化合物对 LPS 诱导的炎症反应具有显著的抑制作用^[14-15], 为本次对于清咽滴丸调控 p38 MAPK/JNK 通路缓解肺部炎症的研究提供有力依据。

MAPK 信号通路在炎症调控中扮演核心角色,

而 p38 MAPK/JNK 是 MAPK 通路介导炎症的关键亚型, 具有将胞外信号转导至细胞核内的功能^[16], 清咽滴丸作用于细胞后可减少 ROS 生成, 抑制凋亡信号调节激酶 1 (apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK1) 的活化, 阻断 TXNIP 与 NLRP3 的结合, 抑制 NLRP3 炎症小体的激活^[17]; 丝裂原活化蛋白激酶激酶 3/6 (mitogen-activated protein kinase kinase 3/6, MKK3/6) 可进一步磷酸化 p38 MAPK 的 Thr180 和 Tyr182 位点, MKK4/7 可进一步磷酸化 JNK 的 Thr183 和 Tyr185 位点, 从而激活 p38 MAPK 和 JNK 信号通路^[18]。转化生长因子- β 激活激酶 1 (transforming growth factor- β -activated kinase 1, TAK1) 是 MAP3K 家族的重要成员, 也是 ROS 氧化应激下介导 MAPK 通路与 NLRP3 炎症小体交叉调控的关键信号枢纽。ROS 可直接活化 TAK1, 活

化后的 TAK1 一方面与 ASK1 协同作用, 通过磷酸化下游 MAP2K 亚型进一步激活 p38、JNK 等 MAPK 家族分子, 实现对 MAPK 通路的调控; 另一方面可调控 NLRP3 的转录表达, 同时通过直接的蛋白相互作用调控其活化过程, 从转录与活化 2 个层面参与 NLRP3 炎症小体的调控, 实现 2 条通路的协同调控, 成为 ROS 同时激活 MAPK 与 NLRP3 通路的核心分子节点, 并与 ASK1 的协同活化, 进一步放大氧化应激下的信号传导效应, 共同构成氧化应激调控细胞炎症与应激反应的重要上游调控网络^[19]。本研究结果表明, 清咽滴丸可减轻氧化应激, 降低炎症模型下肺组织中 p38 MAPK、JNK 的磷酸化, 从而减少炎症信号传导, 抑制 p38 MAPK/JNK 信号通路的激活, 进而发挥抗炎效应 (图 8)。

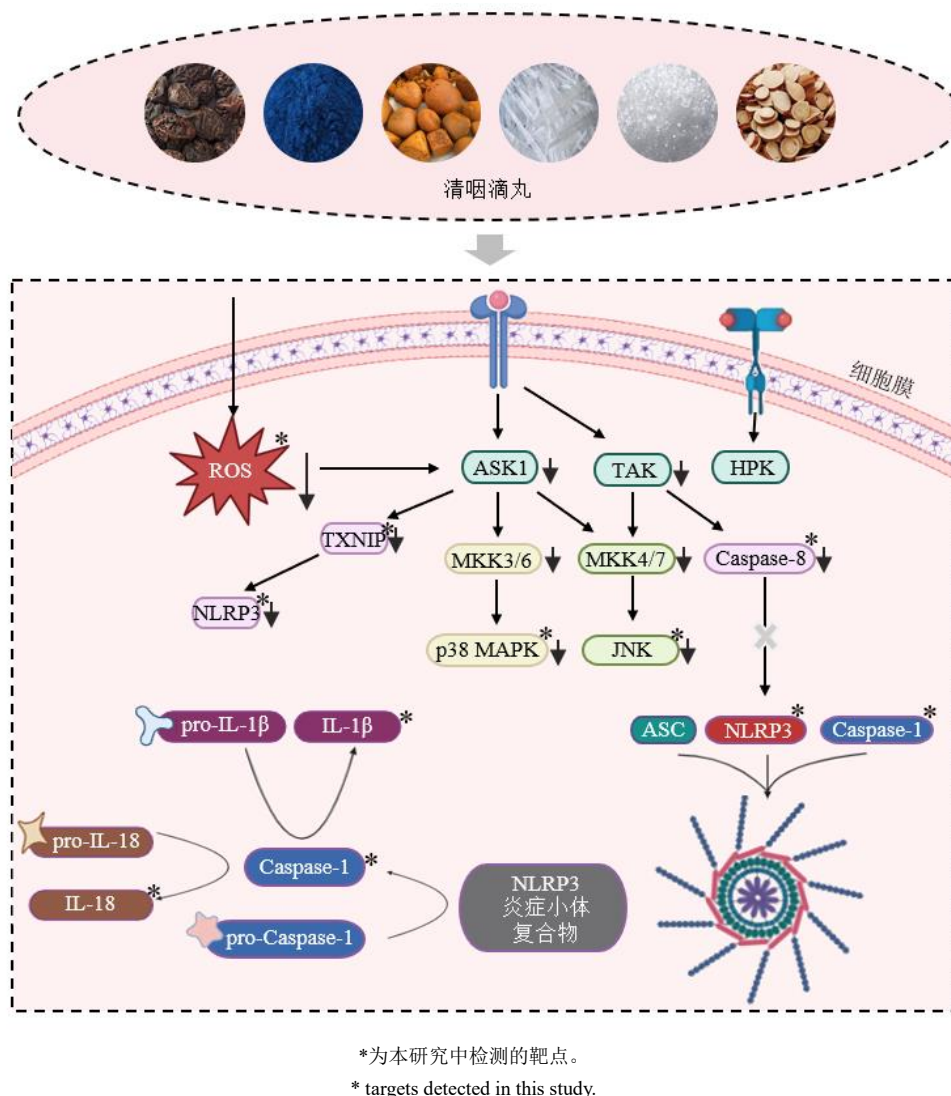


图 8 清咽滴丸抗炎作用机制

Fig. 8 Anti-inflammatory mechanism of Qingyan Dripping Pills

当细胞受到炎症刺激时, NLRP3 会与接头蛋白含 CARD 结构域的凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a card, ASC) 结合, 招募 Caspase-1 的前体 (pro-Caspase-1), 形成 “NLRP3-ASC-pro-Caspase-1” 炎症小体复合物, 进而诱导 pro-Caspase-1 发生自剪切, 生成具有酶活性的成熟 Caspase-1。IL-1 β 和 IL-18 均以无活性的前体形式 (pro-IL-1 β 、pro-IL-18) 存在于细胞内, 无法直接发挥炎症效应, 而成熟的 Caspase-1 作为特异性半胱天冬酶, 可直接切割 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18, 去除其无活性结构域, 使其转化为具有生物学活性的细胞因子并释放到细胞外, 最终启动并放大炎症反应^[20]。本研究聚焦 NLRP3/Caspase-1 信号通路, 通过多重实验验证清咽滴丸可降低小鼠肺组织中 Bax、NLRP3、Bcl-3、TXNIP、Caspase-1 的蛋白表达水平以及 IL-1 β 和 IL-18 等炎症因子的释放, 抑制 NLRP3/Caspase-1 信号通路, 减少细胞焦亡数量, 进而发挥抗炎、抗细胞焦亡的功效, 保护肺组织。

本研究发现, 清咽滴丸能够有效减少肺部炎症模型小鼠肺组织中 ROS 的异常积累, 并呈剂量相关性地抑制 p38 MAPK、JNK 的磷酸化水平, 同时抑制 NLRP3 炎症小体的生成及 Caspase-1 的剪切活化, 降低焦亡特异性炎症因子 IL-1 β 、IL-18 的表达水平。这一结果提示, ROS 作为核心上游氧化应激信号, 可同时激活 p38 MAPK/JNK 与 NLRP3/Caspase-1 2 条信号通路, 且这 2 条通路并非独立行使调控功能, 而是存在密切的双向交叉调控作用, 共同构成 ROS 介导的正反馈调控网络, 协同参与肺组织炎症反应的放大及细胞焦亡过程的调控。

作为氧化应激诱导肺损伤过程中同步激活 p38 MAPK/JNK 与 NLRP3/Caspase-1 通路的共同上游核心信号, ROS 对 2 条通路的激活机制已获得充分的实验证据证实。ROS 可通过氧化修饰 ASK1 等 MAP3K 家族成员, 促使其激活后进一步激活下游 MAP2K 分子, 最终诱导 p38 MAPK 与 JNK 发生磷酸化并实现核转位; 核转位后的 p38 MAPK 与 JNK 可作为转录调控因子, 结合 NLRP3、pro-Caspase-1 等焦亡相关基因的启动子区域, 从而上调其表达水平, 使细胞处于易发生焦亡的分子状态^[21-22]。与此同时, TXNIP 作为 ROS 激活 NLRP3/Caspase-1 通路的关键分子桥梁, 肺部炎症状态下过量产生的 ROS 可氧化失活硫氧还蛋白 (thioredoxin, Trx), 使 TXNIP 从 Trx-TXNIP 复合物中解离, 进而直接

结合 NLRP3 蛋白, 诱导 NLRP3 发生寡聚化, 并与 ASC、pro-Caspase-1 共同组装形成功能性 NLRP3 炎症小体; 此外, 线粒体来源的 ROS 还可通过直接氧化修饰 NLRP3 蛋白的半胱氨酸残基, 或通过损伤线粒体膜释放线粒体 DNA、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 等危险分子信号, 进一步增强 NLRP3 炎症小体的活化效应, 最终诱导 Caspase-1 剪切激活, 启动细胞焦亡进程并促进 IL-1 β 、IL-18 的成熟与释放^[23-24]。

综上, 本研究通过 LPS 诱导构建小鼠急性炎症模型, 系统探究了清咽滴丸对炎症反应及细胞焦亡的调控作用。清咽滴丸通过抑制 p38 MAPK/JNK 信号通路和 TXNIP/NLRP3/Caspase-1 介导的细胞焦亡通路, 进而降低 Bax、NLRP3、Bcl-3、TXNIP、Caspase-1 等与细胞焦亡相关的蛋白表达水平以及 IL-18、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子的表达水平, 显著缓解 LPS 诱导的体内炎症损伤, 为清咽滴丸的临床应用提供了关键的实验支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 郭英, 周慧芳, 阮岩, 等. 清咽滴丸治疗不同证型喉痹的临床研究 [J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2025, 33(1): 44-48.
- [2] 王宇婷, 王嘉玺, 阮岩, 等. 清咽滴丸治疗 4375 例咽喉痛患者的真实世界研究 [J]. 北京中医药, 2024, 43(5): 563-569.
- [3] Wang C J, Cao Y P, Yang Q, *et al.* High-throughput screening of dual-target inhibitors for SARS-CoV-2 main protease and papain-like protease from *Chebulae Fructus*: *In silico* prediction and experimental verification [J]. *Front Microbiol*, 2024, 15: 1510665.
- [4] Wang C J, Zhang H F, Wang X D, *et al.* Comprehensive review on fruit of *Terminalia chebula*: Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, toxicity, and pharmacokinetics [J]. *Molecules*, 2024, 29(23): 5547.
- [5] Zhang M, Wang C J, Feng L, *et al.* Targeting SARS-CoV-2 main protease for the discovery of a broad-spectrum COVID-19 inhibitor by intensive multi-tiered validation [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2025, 15(11): 5789-5802.
- [6] 王景, 白栓成. TLR4/NF- κ B/NLRP3 通路抑制炎症反应作用的研究 [J]. 中国当代医药, 2024, 31(11): 180-185.
- [7] 李欢, 张相安. 葛根在治疗炎症性肠病中的作用机制和应用研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(4): 1428-1439.
- [8] 王贤铃, 许颖杰, 李欣雨, 等. 基于目标成分敲出/敲入的丹参抑制 NLRP3 炎症小体活化的关键活性成分研究 [J]. 中草药, 2025, 56(21): 7783-7794.

- [9] Liu Z H, Xiao T S. Partners with a killer: Metabolic signaling promotes inflammatory cell death [J]. *Cell*, 2021, 184(17): 4374-4376.
- [10] Vande Walle L, Lamkanfi M. Drugging the NLRP3 inflammasome: From signalling mechanisms to therapeutic targets [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2024, 23(1): 43-66.
- [11] Cai J C, Wang S Y, Du H Y, *et al.* NDV-induced autophagy enhances inflammation through NLRP3/Caspase-1 inflammasomes and the p38/MAPK pathway [J]. *Vet Res*, 2023, 54(1): 43.
- [12] 易建华, 李雯. 脂多糖诱导的急性炎症小鼠模型血清促炎因子与抑炎因子表达研究 [J]. *陕西医学杂志*, 2023, 52(4): 395-398.
- [13] Zhou Y, Li P F, Goodwin A J, *et al.* Exosomes from endothelial progenitor cells improve outcomes of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. *Crit Care*, 2019, 23(1): 44.
- [14] 王欣跃, 王长健, 李鑫茹, 等. 基于分子网络-虚拟对接-实验验证的清咽滴丸抗流感活性物质发现 [J]. *药物评价研究*, 2025, 48(6): 1485-1496.
- [15] Liu L T, Li X R, Wang X Y, *et al.* Elucidation of anti-SARS-CoV-2 and anti-inflammatory bioactives in Qingyan Dropping Pills via integrated in silico screening and bioactivity validation [J]. *Front Med*, 2025, 12: 1684713.
- [16] 杜文胜, 朱杰华, 王娟, 等. 基于 JNK/P38 MAPK 信号通路调节 miR-194-5p 对肺结核模型大鼠的干预效果 [J]. *中国老年学杂志*, 2025, 45(7): 1658-1662.
- [17] Fu C, Zhang X Y, Zeng Z X, *et al.* Neuroprotective effects of Qingnao Dripping Pills against cerebral ischemia via inhibiting NLRP3 inflammasome signaling pathway: *In vivo* and *in vitro* [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 65.
- [18] Hotamisligil G S, Davis R J. Cell signaling and stress responses [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(10): a006072.
- [19] Xu Y R, Lei C Q. TAK1-TABs complex: A central signalosome in inflammatory responses [J]. *Front Immunol*, 2021, 11: 608976.
- [20] Swanson K V, Deng M, Ting J P. The NLRP3 inflammasome: Molecular activation and regulation to therapeutics [J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19(8): 477-489.
- [21] Li D D, Ren W Y, Jiang Z L, *et al.* Regulation of the NLRP3 inflammasome and macrophage pyroptosis by the p38 MAPK signaling pathway in a mouse model of acute lung injury [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(5): 4399-4409.
- [22] Zhuo L B, Liu Y M, Jiang Y H, *et al.* Zinc oxide nanoparticles induce acute lung injury via oxidative stress-mediated mitochondrial damage and NLRP3 inflammasome activation: *In vitro* and *in vivo* studies [J]. *Environ Pollut*, 2024, 341: 122950.
- [23] Abais J M, Xia M, Zhang Y, *et al.* Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector? [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 22(13): 1111-1129.
- [24] Li F, Xu M M, Wang M Y, *et al.* Roles of mitochondrial ROS and NLRP3 inflammasome in multiple ozone-induced lung inflammation and emphysema [J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 230.

[责任编辑 李亚楠]