

血必净注射液通过抑制核转录因子- κ B 信号途径改善小鼠急性肺损伤炎症反应

杨涛 熊浪麇

永州职业技术学院附属医院重症医学科, 湖南永州 425000

通信作者: 熊浪麇, Email: 13789204445@163.com

【摘要】目的 探讨血必净注射液通过抑制核因子- κ B (NF- κ B) 信号途径减轻急性肺损伤 (ALI) 小鼠肺组织炎症反应的作用机制。**方法** ① 体外实验: 选择人肺微血管内皮细胞 (HPMEC), 按随机数字表法分为空白对照组、模型组和血必净预处理组, 每组 3 个复孔。HPMEC 先给予血必净注射液 5 g/L 进行预处理 24 h 后, 空白对照组及模型组均给与等体积生理盐水, 随后以 1 mg/L 的脂多糖 (LPS) 刺激 6 h 复制细胞炎症损伤模型。采用蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测各组 HPMEC 中 NF- κ B、磷酸化 NF- κ B (pNF- κ B)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL-6, IL-1 β) 的蛋白表达水平; 采用免疫荧光检测 HPMEC 中 NF- κ B 入核情况及 TNF- α 、IL-6 与 IL-1 β 表达强度。② 体内实验: 选择 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 30 只, 将小鼠按随机数字表法分为空白对照组、模型组和血必净注射液组, 每组 10 只。采用腹腔注射 LPS 的方法复制 ALI 模型, 制模后血必净注射液组给予血必净注射液 3 mL/kg, 每日 2 次, 空白对照组、模型组经尾静脉输注射等量生理盐水, 共 3 d。采用 Western blotting 检测各组肺组织中 pNF- κ B、NF- κ B、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的蛋白表达水平, 并观察各组肺组织的病理学改变。**结果** 在细胞炎症模型中, 与模型组比较, 血必净预处理组 NF- κ B 入核水平下降, 伴随着 TNF- α 、IL-6 与 IL-1 β 表达强度的下调 [TNF- α 表达强度 (荧光强度): 1.56 ± 0.60 比 2.32 ± 0.07 , IL-6 表达强度 (荧光强度): 1.45 ± 0.08 比 2.13 ± 0.12 , IL-1 β 表达强度 (荧光强度): 1.61 ± 0.11 比 3.06 ± 0.07 , 均 $P < 0.05$], 同时, Western blotting 实验表明, 细胞 pNF- κ B/NF- κ B 蛋白表达比值下调 (1.93 ± 0.13 比 2.94 ± 0.19 , $P < 0.05$), TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的蛋白表达水平明显下降 [TNF- α 蛋白表达 (TNF- α /GAPDH): 2.80 ± 0.80 比 6.94 ± 0.52 , IL-6 蛋白表达 (IL-6/GAPDH): 2.39 ± 0.50 比 4.42 ± 0.21 , IL-1 β 蛋白表达 (IL-1 β /GAPDH): 2.54 ± 0.10 比 5.53 ± 0.24 , 均 $P < 0.05$]。在 ALI 模型中, 与模型组比较, 血必净注射液组小鼠肺组织炎症损伤明显改善, 肺组织炎症细胞数量减少, 肺泡壁和间隔厚度下降, pNF- κ B/NF- κ B、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的蛋白表达水平明显下降 [pNF- κ B/NF- κ B 蛋白表达: 1.41 ± 0.06 比 2.01 ± 0.22 , TNF- α 蛋白表达 (TNF- α /GAPDH): 3.67 ± 0.05 比 4.70 ± 0.24 , IL-6 蛋白表达 (IL-6/GAPDH): 0.96 ± 0.29 比 2.89 ± 0.20 , IL-1 β 蛋白表达 (IL-1 β /GAPDH): 1.42 ± 0.06 比 3.08 ± 0.32 , 均 $P < 0.05$]。**结论** 血必净注射液可改善 ALI 小鼠和 HPMEC 的炎症反应, 其机制可能与抑制 NF- κ B 信号途径有关。

【关键词】 血必净注射液; 核转录因子- κ B; 急性肺损伤; 炎症反应

基金项目: 湖南省永州市卫生健康领域“小微改革”项目 (2024-03)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2024.05.003

Xuebijing injection alleviates the inflammatory response of acute lung injury in mice by inhibiting nuclear factor- κ B signaling pathway

Yang Tao, Xiong Lang'ao

Department of Intensive Care Unit, the Affiliated Hospital of Yongzhou Vocational Technical College, Yongzhou 425000, Hunan, China

Corresponding author: Xiong Lang'ao, Email: 13789204445@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of Xuebijing injection in reducing lung tissue inflammation in mice with acute lung injury (ALI) by inhibiting the nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway. **Methods** ① *In vitro* experiment: human pulmonary microvascular endothelial cell (HPMEC) were selected and divided into blank control group, model group, and Xuebijing injection pretreatment group according to the random number table method, with each group having 3 replicates. HPMEC were pretreated with Xuebijing injection at a concentration of 5 g/L for 24 hours. The blank control group and the model group were given an equal volume of physiological saline, followed by stimulation with lipopolysaccharide (LPS) at a concentration of 1 mg/L for 6 hours to replicate a cellular inflammation injury model. Western blotting was used to detect the protein expression levels of NF- κ B phosphorylated NF- κ B (pNF- κ B), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukins (IL-6, IL-1 β) in HPMEC of each group; immunofluorescence was used to detect the nuclear translocation of NF- κ B and the expression intensity of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in HPMEC. ② *In vivo* experiment: Thirty SPF grade male C57BL/6 mice were selected and divided into normal control group, model group, and Xuebijing injection group according to the random number table method, with 10 mice in each group. An

ALI model was replicated by intraperitoneal injection of LPS. After modeling, the Xuebijing injection group was given Xuebijing injection 3 mL/kg, twice a day, while the normal control group and the model group were administered an equal volume of physiological saline via tail vein injection, with a total treatment duration of 3 days. Western blotting was used to detect the protein expression levels of pNF- κ B, NF- κ B, TNF- α , IL-6, and IL-1 β in each group, and to observe the pathological changes in lung tissue of each group. **Results** In the cellular inflammation model, compared to the model group, the level of NF- κ B nuclear translocation in the Xuebijing injection pretreatment group decreased, accompanied by a downregulation of TNF- α , IL-6 and IL-1 β expression intensities [TNF- α expression intensity (fluorescence intensity): 1.56 ± 0.60 vs. 2.32 ± 0.07 , IL-6 expression intensity (fluorescence intensity): 1.45 ± 0.08 vs. 2.13 ± 0.12 , IL-1 β expression intensity (fluorescence intensity): 1.61 ± 0.11 vs. 3.06 ± 0.07 , all $P < 0.05$]. Concurrently, Western blotting experiments indicated a downregulation of the pNF- κ B/NF- κ B (1.93 ± 0.13 vs. 2.94 ± 0.19 , $P < 0.05$), and a decrease in TNF- α , IL-6 and IL-1 β protein expression levels [TNF- α protein expression (TNF- α /GAPDH): 2.80 ± 0.80 vs. 6.94 ± 0.5 , IL-6 protein expression (IL-6/GAPDH): 2.39 ± 0.50 vs. 4.42 ± 0.21 , IL-1 β protein expression (IL-1 β /GAPDH): 2.54 ± 0.10 vs. 5.53 ± 0.24 , all $P < 0.05$]. In the ALI model, compared to the model group, the Xuebijing injection group showed a significant improvement in lung tissue inflammation injury in mice, with a reduction in the number of inflammatory cells in lung tissue, a decrease in the thickness of alveolar walls and septa, and a significant decrease in the protein expression levels of pNF- κ B/NF- κ B, TNF- α , IL-6 and IL-1 β [pNF- κ B/NF- κ B protein expression: 1.41 ± 0.06 vs. 2.01 ± 0.22 , TNF- α protein expression (TNF- α /GAPDH): 3.67 ± 0.05 vs. 4.70 ± 0.24 , IL-6 protein expression (IL-6/GAPDH): 0.96 ± 0.29 vs. 2.89 ± 0.20 , IL-1 β protein expression (IL-1 β /GAPDH): 1.42 ± 0.06 vs. 3.08 ± 0.32 , all $P < 0.05$]. **Conclusion** Xuebijing injection can improve the inflammatory response of ALI mice and HPMEC, and the mechanism may be related to the inhibition of NF- κ B signaling pathway.

[Key words] Xuebijing injection; Nuclear factor- κ B; Acute lung injury; Inflammatory response

Fund program: Yongzhou City Health Field "Small and Micro Reform" Project, Hunan Province (2024-03)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2024.05.003

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是脓毒症患者常见的严重并发症之一, 临床表现为低氧血症、肺水肿和肺浸润增加, 其病死率极高, 达 40% ~ 60%^[1]。目前西医对 ALI 的治疗主要以控制原发病和呼吸支持为主, 仍缺乏有效的治疗手段及药物; 此外, 抗菌药物、类固醇、支气管扩张剂等的应用会产生许多不良反应, 而且对危重症患者的治疗效果有限^[2]。因此, 深入探讨 ALI 的发病机制, 寻找一种有效药物来治疗 ALI 有重要意义。

ALI 最初可导致肺容量减少、缺氧, 诱发呼吸功能不全、疲劳等症状, 严重者可触发急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 导致呼吸衰竭, 最后导致死亡的发生^[3]。由于肺部持续暴露于病原体中, 炎症反应在抵御任何入侵的外来物质方面起着至关重要的作用^[4]。肺内稳态对于维持炎症和抗炎之间的稳定性至关重要, ALI 造成的内皮损伤、肺泡间隙液体渗漏和肺间质水肿显著增加了肺血管通透性, 而血管通透性的增加严重破坏了肺内稳态, 诱发了肺部的炎症反应。这种严重的炎症反应综合征可导致患者死亡^[5]。

血必净注射液是由川芎、丹参、红花等组成的中药制剂, 含有芍药苷、丹参素、羟基红花黄素 A 等有效成分^[6]。一项多中心随机双盲临床研究表明, 血必净注射液作为一种中药的静脉制剂, 可明显降低脓毒症患者 28 d 内病死率^[7]。同样, 研

究表明, 血必净注射液能改善大鼠脓毒症早期阶段的肾脏灌注和氧合, 抑制肾脏炎症, 改善肾功能障碍^[8]。在脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 ARDS 模型中, 血必净注射液能通过磷脂酰肌醇-3-激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶/叉头框蛋白 O1 (phosphoinositide 3 kinase/serine-threonine protein kinase/forkhead box transcription factor O1, PI3K/Akt/FoxO1) 信号通路改善 ARDS 大鼠肺血管屏障功能^[9]。此外, 血必净注射液能通过 miR-142-3p/FoxO1 轴促进肺泡中性粒细胞凋亡, 改善体外循环所致的 ALI^[10]。核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是一种 DNA 结合蛋白, 在促炎因子 [包括肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 (interleukins, IL-6, IL-1 β)] 的转录中起重要作用^[11]。NF- κ B 的激活与 ALI 的发病机制密切相关, 抑制 NF- κ B 是阻断 ALI 中炎症反应的关键^[12]。目前对于血必净注射液抑制 ALI 炎症反应的具体机制尚未明确。因此, 本研究通过构建 LPS 相关 ALI 小鼠模型及细胞炎症损伤模型, 从炎症损伤的角度来探讨血必净注射液的作用机制, 为其进一步临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物: 选择 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 30 只, 7 ~ 8 周龄, 体质量 (20 ± 5) g, 购自长沙市天勤生物技术公司, 动物生产许可证号: SCXK (湘)

2022-0011。动物于 12 h 昼夜交替环境下适应性喂养 7 d 后进行制模。本实验符合国家有关实验动物的伦理管理及使用规定,并经永州职业技术学院附属医院医学伦理委员会批准(审批号:2024-01)。

1.2 细胞培养:人肺微血管内皮细胞(human pulmonary microvascular endothelial cell, HPMEC)购自浙江美森细胞科技有限公司,细胞接种于培养瓶中,加入 HPMEC 完全培养基,置于 5% 二氧化碳、37 °C 培养箱内培养,待细胞融合度达 80%~90% 时进行传代。

1.3 试剂:血必净注射液(批号:Z20040033)购自天津红日药业股份有限公司,胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司, NF- κ B、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 与 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体购自中国 Proteintech 公司,磷酸化 NF- κ B(phosphorylated NF- κ B, pNF- κ B)抗体购自中国 CST 公司, LPS 购自 MCE 公司, HPMEC 完全培养液购自浙江美森细胞科技有限公司,快速裂解液(radio immunoprecipitation assay, RIPA)、免疫染色封闭液、抗荧光淬灭封片液[含 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)、苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒、蛋白质提取试剂盒、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白质测定试剂盒均购自碧云天生物技术有限公司,聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜购自北京利科生化科贸有限公司。

1.4 方法

1.4.1 动物制模及给药:将 30 只小鼠按随机数字表法分为空白对照组、模型组和血必净预处理组,每组 10 只。根据参考文献[13],小鼠通过 1 mL 注射器腹腔注射 25 mg/kg LPS 复制 ALI 模型,同时,空白对照组给予等量生理盐水。制模 1 h 后,血必净注射液组经小鼠尾静脉缓慢注射血必净注射液(3 mL/kg,每日 2 次),连续 3 d,空白对照组和模型组经尾静脉注射等体积生理盐水。

1.4.2 细胞制模与给药:根据参考文献[14]制模及给药,HPMEC 给予血必净注射液 5 g/L 进行预处理 24 h,空白对照组及模型组给予等体积生理盐水,随后以 1 mg/L 的 LPS 刺激 6 h 复制细胞炎症损伤模型,每组 3 个复孔。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测相关蛋白表达:将细胞及小鼠肺组织通过蛋白质提

取试剂盒提取蛋白质,用 BCA 蛋白质测定试剂盒检测蛋白质浓度并调整各组蛋白样本的浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)、转膜及 5% 脱脂牛奶封闭 2 h 后,将膜与 pNF- κ B、NF- κ B、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 抗体和 GAPDH 在 4 °C 下孵育过夜。次日,室温下用二抗孵育 1 h,并通过增强化学发光底物检测各组蛋白的表达量,使用 Image J 软件对蛋白条带灰度值进行统计分析,并通过 GAPDH 标准化各蛋白的表达强度。

1.5.2 肺组织病理学观察:每组取 4 只小鼠的左肺组织于 4% 多聚甲醛水溶液中固定,经脱水、透明、石蜡包埋后,通过石蜡切片机制备厚度 5 μ m 的小鼠肺组织切片,随后使用 HE 染色试剂盒进行染色、封片后,于显微镜下观察各组肺组织病理学改变。

1.5.3 免疫荧光染色:细胞固定后,通过 0.4% TritunX-100 对细胞进行破膜,随后用免疫染色封闭液室温封闭 1 h,封闭结束后,用一抗孵育过夜,次日,室温孵育荧光二抗 1 h,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗后,加入含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂,在荧光显微镜下进行拍照观察。

1.6 统计学处理:使用 SPSS 19.0 统计软件分析数据,符合正态分布的计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析或配对 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血必净注射液对 LPS 处理 HPMEC 中 NF- κ B 表达的影响(图 1~2;表 1):NF- κ B 作为调控炎症反应的关键因子,参与细胞的炎症反应、免疫应答等众多生理过程。HPMEC 在血必净预处理后采用 LPS 制模,结果显示,血必净预处理组 pNF- κ B/NF- κ B 蛋白表达比值明显低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示用 LPS 处理的 HPMEC 由于 NF- κ B 出现入核,在给予血必净注射液干预后,细胞入核情况得到改善。

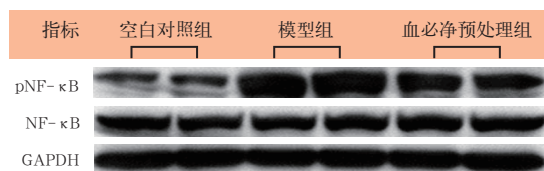


图 1 Western blotting 检测各组 HPMEC 中 NF- κ B 的蛋白表达情况

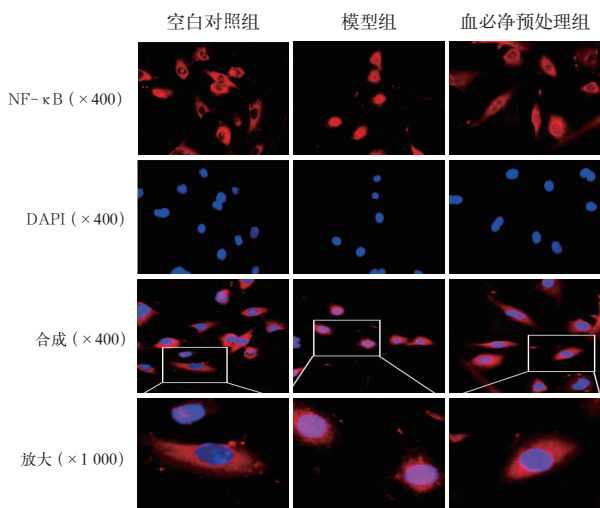


图2 免疫荧光检测各组 HPMEC 中 NF-κB 的人核情况 免疫荧光染色 高倍放大

表1 各组 HPMEC 中 pNF-κB、NF-κB 的蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	pNF-κB 蛋白表达 (pNF-κB/GAPDH)	NF-κB 蛋白表达 (NF-κB/GAPDH)	pNF-κB/NF-κB
空白对照组	3	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.08
模型组	3	2.62 ± 0.26 ^a	0.89 ± 0.04	2.94 ± 0.19 ^a
血必净预处理组	3	1.90 ± 0.12 ^b	0.98 ± 0.07	1.93 ± 0.13 ^b

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

2.2 血必净注射液对 LPS 处理 HPMEC 中炎症因子表达水平的影响(图 3~4;表 2~3):NF-κB 作为转录调控 TNF-α、IL-6 与 IL-1β 相关促炎分子的关键,其靶基因的表达在炎症、感染和癌症等诸多病理生理情况下异常升高。对 TNF-α、IL-6 与 IL-1β 的检测结果表明,血必净预处理组能明显抑制 LPS 诱导的 TNF-α、IL-6、IL-1β 蛋白表达水平(均 $P < 0.05$)。进一步免疫荧光实验结果表明,血必净预处理组 TNF-α、IL-6 与 IL-1β 的荧光表达水平较模型组明显降低(均 $P < 0.05$)。

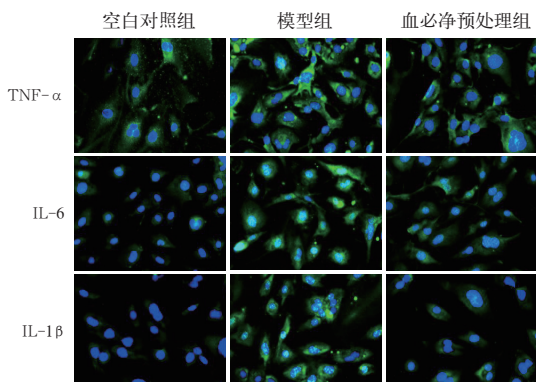


图3 免疫荧光检测各组 HPMEC 中 TNF-α、IL-6、IL-1β 的荧光表达 免疫荧光染色 高倍放大

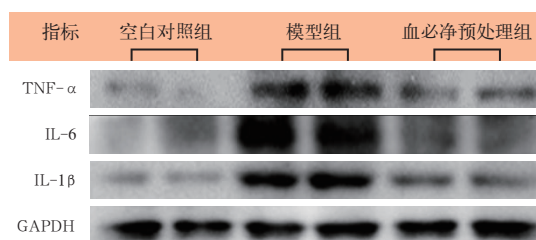


图4 Western blotting 检测各组 HPMEC 中 TNF-α、IL-6、IL-1β 的蛋白表达情况

表2 各组 HPMEC 中 TNF-α、IL-6、IL-1β 的蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	TNF-α 蛋白表达 (TNF-α/GAPDH)	IL-6 蛋白表达 (IL-6/GAPDH)	IL-1β 蛋白表达 (IL-1β/GAPDH)
空白对照组	3	1.00 ± 0.41	1.00 ± 0.70	1.00 ± 0.08
模型组	3	6.94 ± 0.52 ^a	4.42 ± 0.21 ^a	5.53 ± 0.24 ^a
血必净预处理组	3	2.80 ± 0.80 ^b	2.39 ± 0.50 ^b	2.54 ± 0.10 ^b

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

表3 各组 HPMEC 中 TNF-α、IL-6、IL-1β 的荧光表达强度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	TNF-α 表达强度 (荧光强度)	IL-6 表达强度 (荧光强度)	IL-1β 表达强度 (荧光强度)
空白对照组	3	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.08
模型组	3	2.32 ± 0.07 ^a	2.13 ± 0.12 ^a	3.06 ± 0.07 ^a
血必净预处理组	3	1.56 ± 0.60 ^b	1.45 ± 0.08 ^b	1.61 ± 0.11 ^b

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

2.3 血必净注射液对 ALI 小鼠肺组织病理学的影响(图 5):空白对照组肺组织中肺泡结构清晰,未见明显炎症细胞聚集或炎性渗出。与空白对照组比较,模型组小鼠肺组织结构消失、融合,肺泡腔内出现炎症细胞浸润,肺泡壁和间隔出现增厚,在给与血必净注射液干预后小鼠肺组织中炎症细胞数量减少,肺泡壁和间隔厚度较模型组下降。

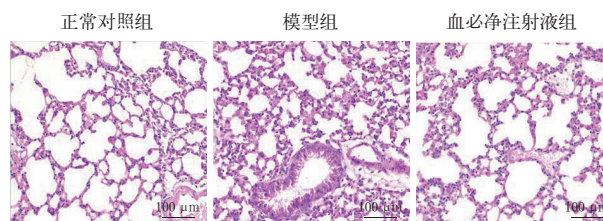


图5 各组小鼠肺组织病理学观察 HE 染色 高倍放大

2.4 血必净注射液对 ALI 小鼠肺组织中 NF-κB 及炎症水平的影响(图 6~7;表 4~5):为了进一步探讨 NF-κB 在小鼠 ALI 中的作用,通过 Western blotting 检测各组小鼠肺组织中 NF-κB、TNF-α、IL-6 与 IL-1β 的蛋白表达水平。结果显示,与空白对照组比较,模型组 NF-κB 显著激活,并伴随

TNF-α、IL-6 与 IL-1β 表达水平上调(均 $P < 0.05$), 而血必净注射液能有效抑制 NF-κB 的激活和相关炎症因子的表达(均 $P < 0.05$)。

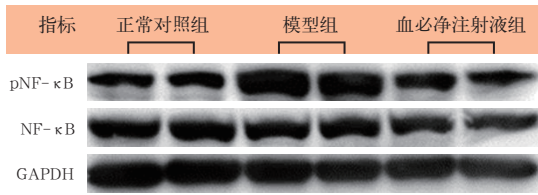


图 6 Western blotting 检测各组肺组织中 NF-κB 蛋白表达水平

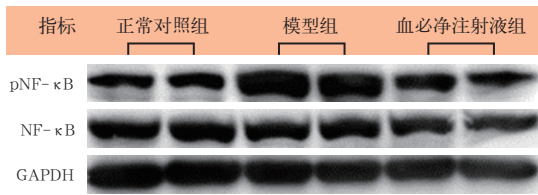


图 7 Western blotting 检测各组肺组织中 TNF-α、IL-6、IL-1β 的蛋白表达情况

表 4 各组肺组织中 pNF-κB、NF-κB 的蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	pNF-κB 蛋白表达 (pNF-κB/GAPDH)	NF-κB 蛋白表达 (NF-κB/GAPDH)	pNF-κB/NF-κB
正常对照组	10	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.04
模型组	10	2.14 ± 0.07 ^a	1.06 ± 0.10	2.01 ± 0.22 ^a
血必净注射液组	10	1.28 ± 0.03 ^b	0.91 ± 0.05	1.41 ± 0.06 ^b

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

表 5 各组肺组织中 TNF-α、IL-6、IL-1β 的蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	TNF-α 蛋白表达 (TNF-α/GAPDH)	IL-6 蛋白表达 (IL-6/GAPDH)	IL-1β 蛋白表达 (IL-1β/GAPDH)
正常对照组	10	1.00 ± 0.33	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.09
模型组	10	4.70 ± 0.24 ^a	2.89 ± 0.20 ^a	3.08 ± 0.32 ^a
血必净注射液组	10	3.67 ± 0.05 ^b	0.96 ± 0.29 ^b	1.42 ± 0.06 ^b

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

3 讨论

ALI 是由多种外伤因素引起的急性缺氧性呼吸功能不全, 表现为进行性低氧血症和呼吸窘迫, 是重症监护病房 (intensive care unit, ICU) 高发病率和高病死率的关键原因之一。在 ALI 的病理生理特征中, 肺血管完整性破坏是最重要的特征之一, 可导致富含蛋白质的液体进入肺泡, 并促进中性粒细胞在肺微血管中积聚, 随后活化的中性粒细胞释放促炎因子和蛋白酶等有害物质^[15]。研究表明, 血必净注射液能通过抑制肺泡巨噬细胞焦亡改善脓毒症小鼠肺

组织的炎症反应^[16]。临床研究表明, 大剂量血必净注射液可明显降低脓毒症患者的炎症水平, 改善脓毒症患者预后^[17-18]。

一些生物标志物与 ALI 引起的高发病率和高病死率密切相关, 其中, TNF-α、IL-6、IL-1β 与 ALI 的预后关系最为密切^[19]。因此, 靶向抑制肺组织炎症因子的表达水平是改善 ALI 患者预后的关键。本研究通过 LPS 构建体外细胞炎症模型及体内 ALI 模型, 检测 NF-κB 的激活和 TNF-α、IL-6、IL-1β 炎症因子的表达, 结果显示, 血必净注射液可有效抑制 NF-κB 在肺部的激活和 TNF-α、IL-6、IL-1β 在肺内的积聚, 改善肺组织炎症反应, 这可能与改善 ALI 预后有密切联系。

NF-κB 信号通路是炎症激活的关键环节之一, 可以转录激活 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 相关炎症因子, 在多种炎症相关疾病中起着重要作用^[20-22]。研究表明, Apelin-13 可通过抑制活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 形成及 NF-κB 通路的激活, 改善 LPS 诱导的 ALI^[23]。虾青素是一种叶黄素类胡萝卜素, 具有抗炎和抗氧化的功效, 其通过抑制丝裂素活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK)/NF-κB 信号通路的激活改善肺组织炎症损伤^[24]。同样, 本研究也显示, 血必净注射液也可通过抑制 NF-κB 信号通路的激活从而抑制肺组织炎症反应。TNF-α、IL-6 与 IL-1β 作为重要的炎症因子, 参与炎症的发生发展, 并与 ALI 预后密切相关。炎症反应是先天免疫系统的直接反应之一, 其目的是提供一个屏障来防止感染的传播, 并在病原体被消灭后促使受损组织的修复。炎症是由病原体的引入或对细胞或组织的机械损伤引起, 适度炎症反应在机体是一种必要的防御机制, 对宿主机体功能的恢复及免疫至关重要。然而, 过度的炎症反应发生概率更高, 并可诱发机体急性或慢性疾病的产生^[25]。研究表明, 蛋白激酶 C θ (protein kinase C θ, PKC θ) 基因敲除能通过增加血红素加氧酶 -1 (heme oxygenase-1, HO-1) 的表达, 并降低肺 pNF-κB 和 pNF-κB 抑制蛋白 α (pNF-κB inhibitor α, p-IκB α) 的水平, 进而改善氧化应激和炎症来减轻油酸诱导的 ALI^[26]。血必净注射液是由红花、丹参、当归等活血化瘀中药提炼而成。有研究表明, 血必净能通过抑制上皮标志物内皮素 -1 和血浆血管性血友病因子水平改善脓毒症早期肺内皮损伤、全身炎症反应和凝血功能障碍^[6]。此外, 血必净注射液

能通过预防细胞因子风暴,抑制炎症反应,改善调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)和 Th17 的平衡来改善感染性休克患者的生存率^[27]。本研究表明,血必净注射液可以降低肺组织及 HPMEC 中 TNF- α 、IL-6 与 IL-1 β 的蛋白表达水平,改善肺部炎症反应,缓解肺组织病理进展。

综上所述,本研究表明,血必净注射液能抑制 LPS 诱导的 HPMEC 模型及 ALI 小鼠肺组织中 NF- κ B 的激活,抑制 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的蛋白表达水平,进而抑制肺部炎症进展,改善肺组织病理损伤。本研究结果有助于理解血必净注射液改善肺部炎症损伤的机制,为血必净注射液的临床应用提供了实验依据。然而,本研究仅在体外细胞实验及体内动物实验中探讨了血必净注射液对 ALI 的保护机制,需要进一步临床研究加以验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] An XN, Sun XT, Hou YH, et al. Protective effect of oxytocin on LPS-induced acute lung injury in mice [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 2836. DOI: 10.1038/s41598-019-39349-1.
- [2] Lu D, Wang ZZ, Chen ZM, et al. Olmesartan attenuates single-lung ventilation induced lung injury via regulating pulmonary microbiota [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 822615. DOI: 10.3389/fphar.2022.822615.
- [3] Blázquez-Prieto J, Huidobro C, López-Alonso I, et al. Activation of p21 limits acute lung injury and induces early senescence after acid aspiration and mechanical ventilation [J]. *Transl Res*, 2021, 233: 104-116. DOI: 10.1016/j.trsl.2021.01.008.
- [4] Liu GY, Qian MJ, Chen M, et al. miR-21-5p suppresses mitophagy to alleviate hyperoxia-induced acute lung injury by directly targeting PGAM5 [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 4807254. DOI: 10.1155/2020/4807254.
- [5] Liu MM, Wang H, Yue Q, et al. Effects of ottonia anisum plant extract on local anesthetic, analgesic, anti-inflammatory and HCl-induced acute lung injury activities: a study in animal models [J]. *Bioresour Bioprocess*, 2023, 10 (1): 86. DOI: 10.1186/s40643-023-00706-8.
- [6] Lv J, Guo XX, Zhao HY, et al. Xuebijing administration alleviates pulmonary endothelial inflammation and coagulation dysregulation in the early phase of sepsis in rats [J]. *J Clin Med*, 2022, 11 (22): 6696. DOI: 10.3390/jcm11226696.
- [7] Liu SQ, Yao C, Xie JF, et al. Effect of an herbal-based injection on 28-day mortality in patients with sepsis: the EXIT-SEP randomized clinical trial [J]. *JAMA Intern Med*, 2023, 183 (7): 647-655. DOI: 10.1001/jamainternmed.2023.0780.
- [8] Liu JF, Wang ZZ, Lin J, et al. Xuebijing injection in septic rats mitigates kidney injury, reduces cortical microcirculatory disorders, and suppresses activation of local inflammation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 276: 114199. DOI: 10.1016/j.jep.2021.114199.
- [9] 耿平,熊佳俐,于芬,等.血必净注射液通过 PI3K/Akt/FOXO1 信号通路上调 claudin-5 表达改善 ARDS 大鼠肺血管屏障功能 [J]. *中华危重病急救医学*, 2022, 34 (2): 145-150. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20211117-01732.
- [10] 徐朝军,张胜康,张怡,等.从调控肺泡中性粒细胞凋亡探讨血必净注射液防治体外循环肺损伤的机制 [J]. *中华危重病急救医学*, 2024, 36 (2): 166-171. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20230128-00038.
- [11] Li JQ, Wang LL, Zeng GT, et al. Chymotrypsin attenuates adjuvant-induced arthritis by downregulating TLR4, NF- κ B, MMP-1, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 expression in Sprague-Dawley rats [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2022, 44 (6): 959-969. DOI: 10.1080/08923973.2022.2093743.
- [12] Ai MM, Lin SS, Zhang MX, et al. Cirsilinole attenuates LPS-induced inflammation in both *in vivo* and *in vitro* models via inhibiting TLR-4/NF κ B/IKK signaling pathway [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2021, 35 (8): e22799. DOI: 10.1002/jbt.22799.
- [13] Tu YF, Li XD, Fu YZ, et al. Isocorydine ameliorates IL-6 expression in bone marrow-derived macrophages and acute lung injury induced by lipopolysaccharide [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (5): 4629. DOI: 10.3390/ijms24054629.
- [14] Wu XY, Xin RM, Zhang YZ, et al. Xuebijing improves inflammation and pyroptosis of acute lung injury by up-regulating miR-181d-5p-mediated SPP1 inactivation [J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2024, 79: 100336. DOI: 10.1016/j.clinsp.2024.100336.
- [15] Zhan B, Shen J. Mitochondria and their potential role in acute lung injury (Review) [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 24 (1): 479. DOI: 10.3892/etm.2022.11406.
- [16] 陆莎莎,王璐瑶,张新宇,等.血必净注射液抑制肺泡巨噬细胞焦亡改善脓毒症诱导的小鼠急性肺损伤 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2023, 30 (4): 418-423. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2023.04.007.
- [17] 程小彬,李刚,卿慧玲.不同剂量血必净注射液对脓毒症患者炎症指标和替代治疗及预后的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2023, 30 (2): 132-135. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2023.02.002.
- [18] 崔文华,宋林超,程鹏,等.血必净注射液对复杂腹腔感染脓毒症患者炎症反应的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2024, 31 (2): 141-144. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2024.02.003.
- [19] Meduri GU, Kohler G, Headley S, et al. Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome [J]. *Chest*, 1995, 108 (5): 1303-1314. DOI: 10.1378/chest.108.5.1303.
- [20] Sevastre-Berghian AC, Ielciu I, Bab T, et al. Betula pendula leaf extract targets the interplay between brain oxidative stress, inflammation, and NF κ B pathways in amyloid A β ₁₋₄₂-treated rats [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12 (12): 2110. DOI: 10.3390/antiox12122110.
- [21] Santaniemi W, Åström P, Glumoff V, et al. Inflammation and neutrophil oxidative burst in a family with NF κ B1 p.R157X LOF and sterile necrotizing fasciitis [J]. *J Clin Immunol*, 2023, 43 (5): 1007-1018. DOI: 10.1007/s10875-023-01461-3.
- [22] Bergbreiter A, Jaeger T, Karle A, et al. Recurrent necrotizing cellulitis, multi-organ autoimmune disease and humoral immunodeficiency due to a novel NF κ B1 frameshift mutation [J]. *Eur J Med Genet*, 2021, 64 (3): 104144. DOI: 10.1016/j.ejmg.2021.104144.
- [23] Zhang HL, Chen S, Zeng MC, et al. Apelin-13 administration protects against LPS-induced acute lung injury by inhibiting NF- κ B pathway and NLRP3 inflammasome activation [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49 (5): 1918-1932. DOI: 10.1159/000493653.
- [24] Cai XD, Chen YF, Xie XN, et al. Astaxanthin prevents against lipopolysaccharide-induced acute lung injury and sepsis via inhibiting activation of MAPK/NF- κ B [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11 (3): 1884-1894.
- [25] Hosseinian N, Cho Y, Lockey RF, et al. The role of the NLRP3 inflammasome in pulmonary diseases [J]. *Ther Adv Respir Dis*, 2015, 9 (4): 188-197. DOI: 10.1177/1753465815586335.
- [26] Li W, Zhao X, Yu TT, et al. Knockout of PKC θ gene attenuates oleic acid-induced acute lung injury via reduction of inflammation and oxidative stress [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2021, 24 (7): 986-991. DOI: 10.22038/ijbms.2021.56908.12695.
- [27] Chen X, Feng Y, Shen X, et al. Anti-sepsis protection of Xuebijing injection is mediated by differential regulation of pro- and anti-inflammatory Th17 and T regulatory cells in a murine model of polymicrobial sepsis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 211: 358-365. DOI: 10.1016/j.jep.2017.10.001.

(收稿日期: 2024-08-18)

(责任编辑: 邸美仙)