

## 凉膈散对 LPS 诱导的急性肺损伤的保护作用及其机制

于鑫<sup>1</sup>, 董铮<sup>2</sup>, 张引<sup>1</sup>, 蔡相龙<sup>1</sup>, 刘亮亮<sup>1</sup>, 孙娜<sup>1</sup>, 牛文博<sup>3</sup>, 杨磊<sup>4</sup>, 杨文杰<sup>5</sup>

(1. 武警特色医学中心综合重症医学科, 天津 300162; 2. 武警天津总队医院内二科, 天津 300162;  
3. 锦州海关综合技术服务中心, 辽宁 锦州 121013; 4. 天津市南开医院急腹症研究所, 天津 300100;  
5. 天津市第一中心医院感染科, 天津 300190)

**[摘要]** **目的:** 探讨凉膈散(LGS)对脂多糖(LPS)诱导的急性肺损伤(ALI)的保护作用, 并阐明其作用机制。**方法:** 将40只雄性的C57BL/6小鼠随机分为假手术组(SHMA组)、模型组(LPS组)、低剂量LGS组(LGSL组,  $8.58 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  LGS)和高剂量LGS组(LGSH组,  $17.16 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  LGS), 每组10只。LPS组、LGSL组和LGSH组小鼠采用气管滴注LPS诱导建立ALI模型, 造模24 h后取材。采用HE染色法观察各组小鼠肺组织病理形态表现并进行病理评分, 流式细胞术检测各组小鼠肺组织中中性粒细胞和肺泡上皮细胞百分率, 免疫组织化学染色法检测各组小鼠肺组织中髓过氧化物酶(MPO)水平, 酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测各组小鼠肺泡灌洗液中相关炎症介质白细胞介素18(IL-18)、白细胞介素 $1\beta$ (IL- $1\beta$ )和白蛋白水平, Western blotting法检测各组小鼠肺组织中高迁移率族蛋白B1(HMGB1)、NLR家族Pyrin域蛋白3(NLRP3)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶1(Caspase-1)和消皮素D(GSDMD)蛋白表达水平。**结果:** HE染色, 与SHMA组比较, LPS组小鼠肺组织病理损伤加重, 病理评分明显升高( $P<0.05$ ); 与LPS组比较, LGSL组和LGSH组小鼠肺组织病理学评分明显降低( $P<0.05$ )。流式细胞术, 与SHMA组比较, LPS组小鼠肺组织中中性粒细胞百分率明显升高( $P<0.05$ ), 肺泡上皮细胞百分率明显降低( $P<0.05$ ); 与LPS组比较, LGSL组和LGSH组小鼠肺组织中中性粒细胞百分率明显降低( $P<0.05$ ), 肺泡上皮细胞百分率明显升高( $P<0.05$ )。免疫组织化学染色法, 与SHMA组比较, LPS组小鼠肺组织中MPO水平明显升高( $P<0.05$ ); 与LPS组比较, LGSL组和LGSH组小鼠肺组织中MPO水平明显降低( $P<0.05$ )。ELISA法, 与SHMA组比较, LPS组小鼠肺泡灌洗液中IL-18、IL- $1\beta$ 和白蛋白水平明显升高( $P<0.05$ ); 与LPS组比较, LGSL组和LGSH组小鼠肺泡灌洗液中IL-18、IL- $1\beta$ 和白蛋白水平明显降低( $P<0.05$ )。Western blotting法, 与SHMA组比较, LPS组小鼠肺组织中HMGB1、NLRP3、Caspase-1和GSDMD蛋白表达水平均明显升高( $P<0.05$ ); 与LPS组比较, LGSL组和LGSH组小鼠肺组织中HMGB1、NLRP3、Caspase-1和GSDMD蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ )。**结论:** LGS可通过降低中性粒细胞浸润和上皮细胞焦亡以减轻LPS诱导的病理肺损伤和炎症反应, 其机制可能与其通过HMGB1信号通路下调NLRP3、Caspase-1和GSDMD蛋白表达有关。

**[关键词]** 凉膈散; 急性肺损伤; 细胞焦亡; NOD样受体蛋白3; 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶1; 消皮素D

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2025-01-21 [录用日期] 2025-03-31

[基金项目] 天津市卫健委医学重点学科建设资助项目(TJYXZDXK-3-001D)

[作者简介] 于鑫(1983—), 男, 黑龙江省哈尔滨市人, 主治医师, 医学硕士, 主要从事呼吸与危重症方面的研究。

[通信作者] 杨文杰, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师(E-mail: yangm8006@sina.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

## Protective effect of Liangge powder on LPS-induced acute lung injury and its mechanism

YU Xin<sup>1</sup>, DONG Zheng<sup>2</sup>, ZHANG Yin<sup>1</sup>, CAI Xianglong<sup>1</sup>, LIU Liangliang<sup>1</sup>, SUN Na<sup>1</sup>, NIU Wenbo<sup>3</sup>,  
YANG Lei<sup>4</sup>, YANG Wenjie<sup>5</sup>

(1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Characteristic Medical Center of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China; 2. Department of Internal Medicine, Tianjin Armed Police Corps Hospital, Tianjin 300162, China; 3. Comprehensive Technical Service Center of Jinzhou Customs, Jinzhou 121013, China; 4. Tianjin Key Laboratory of Acute Abdomen Disease Associated Organ Injury and ITCWM Repair, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin, 300100, China; 5. Department of Infection, First Central Hospital, Tianjin City, Tianjin 300190, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the protective effect of Liangge Powder (LGS) on lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury (ALI), and to clarify its mechanism. **Methods:** Forty male C57BL/6 mice were randomly divided into sham operation group (SHMA group), model group (LPS group), low dose of LGS group (LGSL group, 8.58 g·kg<sup>-1</sup> LGS), and high dose of LGS group (LGSH group, 17.16 g·kg<sup>-1</sup> LGS), with 10 mice in each group. The mice in LPS group, LGSL group, and LGSH group were intratracheally instilled with LPS to induce the ALI model, and samples were taken 24 h after modeling. HE staining was used to observe the pathomorphology of lung tissue of the mice in various groups and to perform the pathological scores; flow cytometry was used to detect the percentages of neutrophils and epithelial cells in lung tissue of the mice in various groups; immunohistochemistry staining assay was used to detect the level of myeloperoxidase (MPO) in lung tissue of the mice in various groups; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of related inflammatory mediators interleukin-18 (IL-18), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and albumin in bronchoalveolar lavage fluid of the mice in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of high mobility group box 1 (HMGB1), NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3), cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (Caspase-1), and gasdermin D (GSDMD) proteins in lung tissue of the mice in various groups. **Results:** The HE staining results showed that compared with SHMA group, the pathological injury of lung tissue of the mice in LPS group was aggravated, and the pathological score was significantly increased ( $P < 0.05$ ); compared with LPS group, the pathological scores of lung tissue of the mice in LGSL group and LGSH group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The flow cytometry results showed that compared with SHMA group, the percentage of neutrophils in lung tissue of the mice in LPS group was increased ( $P < 0.05$ ), and the percentage of epithelial cells was decreased ( $P < 0.05$ ); compared with LPS group, the percentages of neutrophils in lung tissue of the mice in LGSL group and LGSH group were decreased ( $P < 0.05$ ), and the percentages of epithelial cells were increased ( $P < 0.05$ ). The immunohistochemistry staining results showed that compared with SHMA group, the MPO level in lung tissue of the mice in LPS group was significantly increased ( $P < 0.05$ ); compared with LPS group, the MPO levels in lung tissue of the mice in LGSL group and LGSH group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The ELISA results showed that compared with SHMA group, the levels of IL-1 $\beta$ , IL-18, and albumin in bronchoalveolar lavage fluid of the mice in LPS group were significantly increased ( $P < 0.05$ ); compared with LPS group, the levels of IL-1 $\beta$ , IL-18, and albumin in bronchoalveolar lavage fluid of the mice in LGSL group and LGSH group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The Western blotting results showed that compared with SHMA group, the expression levels of HMGB1, NLRP3, Caspase-1, and GSDMD proteins in lung tissue of the mice in LPS group were significantly increased ( $P <$

0.01); compared with LPS group, the expression levels of HMGB1, NLRP3, Caspase-1, and GSDMD proteins in lung tissue of the mice in LGS group and LGS group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** LGS can alleviate LPS-induced pathological lung injury and inflammatory response by reducing neutrophil infiltration and epithelial cell pyroptosis, and its mechanism may be related to the down-regulation of NLRP3, Caspase-1, and GSDMD protein expressions through the HMGB1 signaling pathway.

**KEYWORDS** Liangge San; Acute lung injury; Pyroptosis; NOD-like receptor protein 3; Cysteinyl aspartate specific proteinase-1; Gasdermin D

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) /急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是危重症患者最常见的死亡原因之一, 其特征是肺泡毛细血管屏障被破坏和过度炎症反应。多数 ARDS 病例由感染性肺炎和脓毒症引起, 是 ALI/ARDS 最重要的致病因素<sup>[1]</sup>。目前临床上除了纠正原发病和呼吸支持以外, 对 ALI/ARDS 仍缺乏切实有效的预防和治疗措施<sup>[2]</sup>。但是关于 ARDS 发生和发展的确切机制尚未充分阐明, 特别是对 ARDS 过程中机体免疫功能紊乱的发病过程和病理生理意义仍认识不足<sup>[3]</sup>。在机体发生 ARDS 时, 毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞均受损, 活化的肺泡巨噬细胞释放趋化因子, 激活炎症级联反应, 导致中性粒细胞不断迁移至肺部, 导致肺损伤的发生<sup>[4]</sup>。尽管中性粒细胞通过产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、细胞因子、蛋白酶和基质金属蛋白酶来参与肺损伤调节, 但中性粒细胞胞外陷阱 (neutrophil extracellular traps, NETs) 在 ALI 发病机制中发挥关键作用<sup>[5]</sup>。NETs 主要由核染色质、线粒体 DNA 和中性粒细胞颗粒蛋白混合物组成, 可显著促进微血管功能障碍和血栓炎症<sup>[6]</sup>。在脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 ALI 期间形成的 NETs 可直接损伤器官并加剧以白细胞积聚、弥漫性肺泡损伤和细胞因子释放为特征的炎症反应<sup>[7]</sup>。肺泡上皮细胞的损伤是 ALI/ARDS 的标志性致病事件, 临床研究<sup>[8]</sup>结果显示: 细胞焦亡与 ALI 的发生和发展密切相关, 阻断细胞焦亡途径可明显改善 ALI/ARDS 的预后。在小鼠中细胞焦亡的激活途径分为依赖于含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (cysteinyl aspartate specific proteinase, Caspase)-1 诱导的经典激活途径和 Caspase-11 诱导非经典激活途径<sup>[9]</sup>。在经典细胞焦亡途径中, Caspase-1 将全长的消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 蛋白剪切为 1 个相对分子质量为 31 000 的氨基端结构域 GSDMD-N,

GSDMD-N 结构域具有亲脂性和细胞毒性, 可在细胞膜上“打孔”, 并使细胞膜通透性发生改变, 细胞肿胀、破裂, 继而发生细胞焦亡<sup>[10]</sup>。研究<sup>[11]</sup>表明: 抑制肺上皮细胞焦亡可显著保护 LPS 诱导的 ALI。凉膈散 (Liangge San, LGS) 是中医方剂“以泻代清”的清热泻火名方, 现代药理研究发现中医的清热泻火与西医的抗炎存在相似的作用效果。LGS 可显著抑制 ALI 小鼠肺组织中核因子- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B) 信号通路的活化<sup>[12]</sup>, 降低 ALI 大鼠肺水肿以及肺水通道蛋白 1 和水通道蛋白 5 的表达<sup>[13]</sup>。LGS 可通过诱导中性粒细胞凋亡减轻 LPS 引起的 ALI 大鼠肺组织病理损伤<sup>[14]</sup>。LGS 还可以降低肺组织中高迁移率族蛋白 B1 (high-mobility group box 1, HMGB1) 基因和蛋白的表达, 抑制肺组织炎症反应<sup>[15]</sup>。目前, 国内外关于中药复方调控细胞焦亡的研究较少, 尤其缺乏对肺泡上皮细胞焦亡与中性粒细胞浸润交互作用的深入探讨。本研究结合体内模型与分子机制分析, 探讨 LGS 通过抑制 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3 (NLR family, Pyrin domain containing protein 3, NLRP3) /GSDMD 信号通路减轻肺泡上皮焦亡、减少中性粒细胞浸润及炎症因子释放的作用, 为 LGS 治疗 ALI/ARDS 提供新机制依据, 同时为中药调控细胞程序性死亡提供理论参考。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物、药物、主要试剂和仪器** 40 只 6~8 周的雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠购自北京华阜康实验动物技术有限公司, 动物生产许可证号: SCXK (京) 2019-0008。LGS 的方药成分组成: 大黄、芒硝、生甘草、栀子、薄荷、黄芩和连翘, 饮片购自天津市第一中心医院。透明质酸酶、IV 型胶原酶和 DNase I 和 LPS 购自美国 Sigma 公司, 髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。酶联免疫吸附试验

(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自杭州联科生物技术有限公司, 抗CD362、CD11b、CD45和Ly6G流式抗体购自Biolegend公司, HMGB1、NLRP3、Caspase-1、GSDMD和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)蛋白抗体购自美国CST公司, MPO抗体购自美国Abcam公司, 免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥公司。流式细胞仪(型号: CytoFLEX S)购自美国贝克曼库尔特有限公司, 酶联免疫检测仪(型号: ST-360)购自上海科华实验系统有限公司, 包埋机(型号: EG1150H)、切片机(型号: RM2235)和聚焦光学显微镜(型号: DM2500)购自德国Leica公司, 化学发光仪(型号: iMark)购自美国Bio-Rad公司。

**1.2 小鼠ALI模型制备和分组** 按随机数字表法将40只雄性小鼠随机分为4组: 假手术组(SHAM组)、模型组(LPS组)、低剂量LGS组(LGSL组,  $8.58 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  LGS)和高剂量LGS组(LGSH组,  $17.16 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  LGS), 每组10只。本研究采用气管滴注LPS制备ALI小鼠模型。小鼠适应环境7 d后, 腹腔注射氯胺酮进行麻醉, 固定小鼠的四肢和牙齿, 用酒精棉签对气管周围皮肤进行消毒, 沿颈正中中线环状软骨下缘约5 mm处作横向切口, 长度约为5 mm, 逐层分离皮下组织并暴露气管。用1 mL的注射器将LPS溶液( $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )缓慢滴注到小鼠气管中, 用缝合线缝合切口后, 进行皮肤的消毒。假手术组小鼠气管中滴注等体积的磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS), 小鼠术后自由正常饮水和饮食。造模24 h后过量麻醉处死小鼠, 取肺组织进行相关检测。

**1.3 HE染色观察各组小鼠肺组织病理形态表现和肺组织病理评分** 造模24 h后, 过量麻醉后处死各组小鼠, 取右上肺叶, 放入到4%的多聚甲醛中, 固定48 h, 制备石蜡切片, 行HE染色, 光镜下观察各组小鼠肺组织的病理形态表现并进行肺组织病理评分。病理评分标准: 正常(未见肺组织学改变)记为0分; 肺泡壁毛细血管扩张和充血记为1分; 肺泡壁增厚、毛细血管扩张充血记为2分; 肺泡内存在渗出物、壁增厚和毛细血管扩张充血记为3分; 肺泡内存在渗出物、壁增厚、毛细血管扩张充血、肺泡融合成肺大泡和大量炎症细胞浸润记为4分。

**1.4 流式细胞术检测各组小鼠肺组织中中性粒细胞和肺泡上皮细胞百分率** 造模24 h后处死各组小鼠, 取肺组织用剪刀剪碎, 加入透明质酸酶、IV型胶原酶和DNase I在37 °C水浴中消化30 min。用70  $\mu\text{m}$ 过滤器的组织滤器研磨肺组织, 离心后加入红细胞裂解液, 常温裂解15 min, 离心后加入PBS缓冲液重选细胞。进行抗体标记, 中性粒细胞标记方法: 抗Ly6G-APC和抗CD11b-FITC; 肺泡上皮细胞标记方法: 抗CD326-PE和抗CD45-FITC。染色20 min后, 加入PBS缓冲液清洗2次, 离心后用100  $\mu\text{L}$ 的PBS缓冲液重新悬浮细胞, 并上机检测。使用NovoCyte流式软件分析流式细胞术检测结果。

**1.5 免疫组织化学染色法检测各组小鼠肺组织中MPO水平和免疫组织化学评分** 取各组小鼠肺组织石蜡切片, 采用免疫组织化学染色法进一步检测各组小鼠肺组织中MPO水平, 先进行脱蜡处理, 用柠檬酸缓冲液进行抗原修复后, 加入 $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液去除内源性过氧化物酶, 加入稀释好的MPO一抗(抗体稀释比为1:200), 放入4 °C的冰箱中避光孵育过夜。依次加入生物素标记的二抗和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)-生物素偶联的三抗, 并进行DAB显色和苏木精染色, 脱水后进行封片处理, 并在光学显微镜下观察各组MPO的表达。MPO评分方法: MPO免疫组织化学染色结果采用H-score评分法(0~300分)进行半定量分析, 镜下定位肺泡间隔及血管周围组织为观察有效区域并严格排除坏死、出血区域, 于400倍高倍镜下随机选取5~10个不重叠视野, 依据细胞胞质内颗粒显色程度将阳性中性粒细胞分为4级, 其中0级(阴性)为无显色、1级(弱阳性)为淡黄色、2级(中度阳性)为棕黄色、3级(强阳性)为深棕褐色, 分别计数各级阳性细胞占视野内总中性粒细胞的百分比, 按照公式( $\text{H-score} = 1 \times \text{弱阳性细胞百分比} + 2 \times \text{中度阳性细胞百分比} + 3 \times \text{强阳性细胞百分比}$ )计算单个视野评分, 取所有选取视野评分的平均值作为该样本最终H-score值。

**1.6 ELISA法检测各组小鼠肺泡灌洗液中IL-18、IL-1 $\beta$ 和白蛋白水平** 造模24 h后, 进行肺泡灌洗, 将1 mL的预冷PBS缓冲液缓慢注射到小鼠气管中, 灌洗2次, 离心取上清进行ELISA法检测, 按照ELISA试剂盒说明依次加入待测样品、标准品和相关显示试剂后, 用酶标仪测定各孔波长

450 nm处的吸光度(A)值,按照标准品A值绘制标准曲线,计算各样本中炎症因子和白蛋白水平。

### 1.7 Western blotting法检测各组小鼠肺组织中NLRP3、Caspase-1、GSDMD和HMGB1蛋白表达水平

造模24 h后过量麻醉处死各组小鼠,取小鼠肺组织提取蛋白,取离心后、没有加热变性的蛋白进行定量,使用BCA蛋白质测试试剂盒检测各组蛋白浓度,加入十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)上样缓冲液,放到金属浴中,加热变性后进行蛋白电泳,根据目的蛋白的相对分子质量,切割分离胶,并裁剪与分离胶同样大小的聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,将蛋白转运到PVDF膜上,转膜结束后,取出PVDF膜,加入10 mL的5%的脱脂奶粉进行封闭,加入目的蛋白的抗体,抗体稀释比例为1:1 000,4℃冰箱中孵育过夜。在膜上滴加适量增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)显色液,并使用化学发光仪进行显影,使用Image J软件进行蛋白的定量,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/GAPDH蛋白条带灰度值。

1.8 统计学分析 采用SPSS 20.0软件进行统计学分析,采用GraphPad Prism 8软件作图。各组小

鼠肺组织病理评分、中性粒细胞和肺泡上皮细胞百分率、MPO水平和免疫组织化学评分、炎症因子和白蛋白水平以及NLRP3/GSDMD焦亡通路相关蛋白表达水平均服从正态性分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用SNK-*q*检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

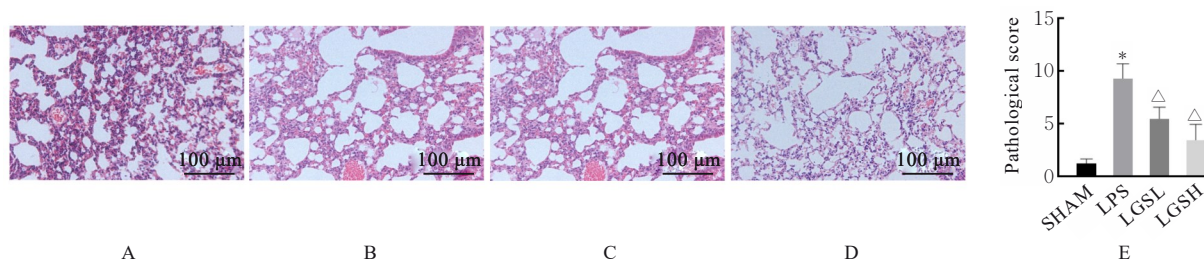
## 2 结果

### 2.1 各组小鼠肺组织病理形态表现和肺组织病理评分

肺组织HE染色结果显示:SHAM组小鼠肺组织形态正常,未见炎症细胞浸润;LPS组小鼠可见肺泡壁明显增厚,上皮细胞间炎症细胞的浸润明显增加;LGSL组和LGSH组小鼠肺泡壁增厚明显减少,上皮细胞间炎症细胞的浸润数目明显减少。肺组织病理评分结果显示:与SHAM组比较,LPS组小鼠肺组织病理评分明显升高( $P<0.05$ );与LPS组比较,LGSL组和LGSH组小鼠肺组织病理评分明显降低( $P<0.05$ )。见图1。

### 2.2 各组小鼠肺组织中中性粒细胞百分率

与SHAM组比较,LPS组小鼠肺组织中中性粒细胞百分率明显升高( $P<0.05$ );与LPS组比较,LGSL组和LGSH组小鼠肺组织中中性粒细胞百分率明显降低( $P<0.05$ )。见图2。



A: SHAM group; B: LPS group; C: LGSL group; D: LGSH group; E: Pathological score. \* $P<0.05$  compared with SHAM group;  $\Delta P<0.05$  compared with LPS group.

图1 各组小鼠肺组织病理形态表现(A~D)及病理评分(E)(HE)

Fig. 1 Pathomorphology(A-D) and pathological scores(E) of lung tissue of mice in various groups (HE)

### 2.3 各组小鼠肺组织中MPO水平和免疫组织化学评分

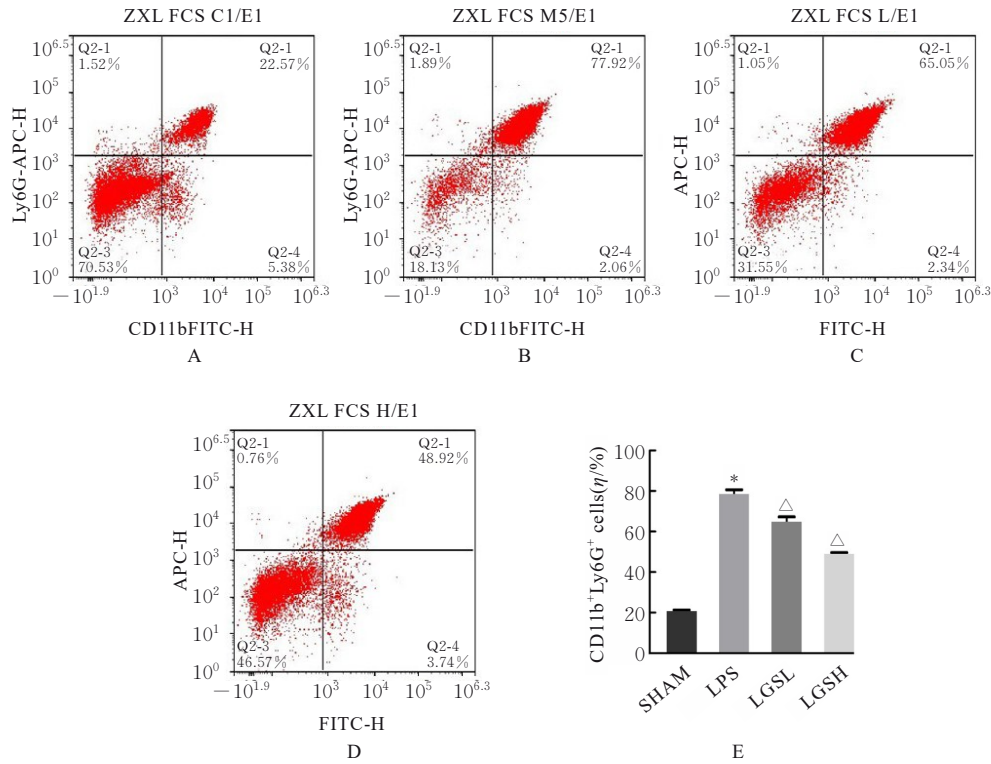
与SHAM组比较,LPS组小鼠肺组织中MPO水平明显升高( $P<0.05$ );与LPS组比较,LGSL组和LGSH组小鼠肺组织中MPO水平和免疫组织化学评分明显降低( $P<0.05$ );与LGSL组比较,LGSH组小鼠肺组织中MPO水平和免疫组织化学评分明显降低( $P<0.05$ )。见图3和表1。

### 2.4 各组小鼠肺组织中肺泡上皮细胞百分率

与SHAM组比较,LPS组小鼠肺组织中肺泡上皮细胞百分率明显降低( $P<0.05$ );与LPS组比较,LGSL组和LGSH组小鼠肺组织中肺泡上皮细胞百分率明显升高( $P<0.05$ )。见图4。

### 2.5 各组小鼠肺泡灌洗液中IL-18、IL-1 $\beta$ 和白蛋白水平

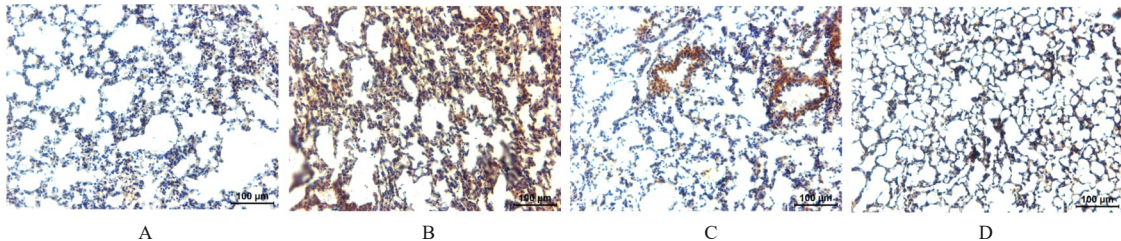
与SHAM组比较,LPS组小鼠肺泡灌洗液中IL-18、IL-1 $\beta$ 和白蛋白水平明显升高( $P<0.05$ );与LPS组比较,LGSL组和LGSH组小鼠



A: SHAM group; B: LPS group; C: LGSL group; D: LGSH group; E: Histogram. \* $P < 0.05$  compared with SHAM group;  $\Delta P < 0.05$  compared with LPS group.

图2 各组小鼠肺组织中中性粒细胞百分率(A~D)及直条图(E)

Fig. 2 Percentages(A-D) and histogram(E) of neutrophils in lung tissue of mice in various groups



A: SHAM group; B: LPS group; C: LGSL group; D: LGSH group.

图3 各组小鼠肺组织中MPO的表达情况(免疫组织化学,  $\times 200$ )

Fig. 3 Expressions of MPO in lung tissue of mice in various groups (Immunohistochemistry,  $\times 200$ )

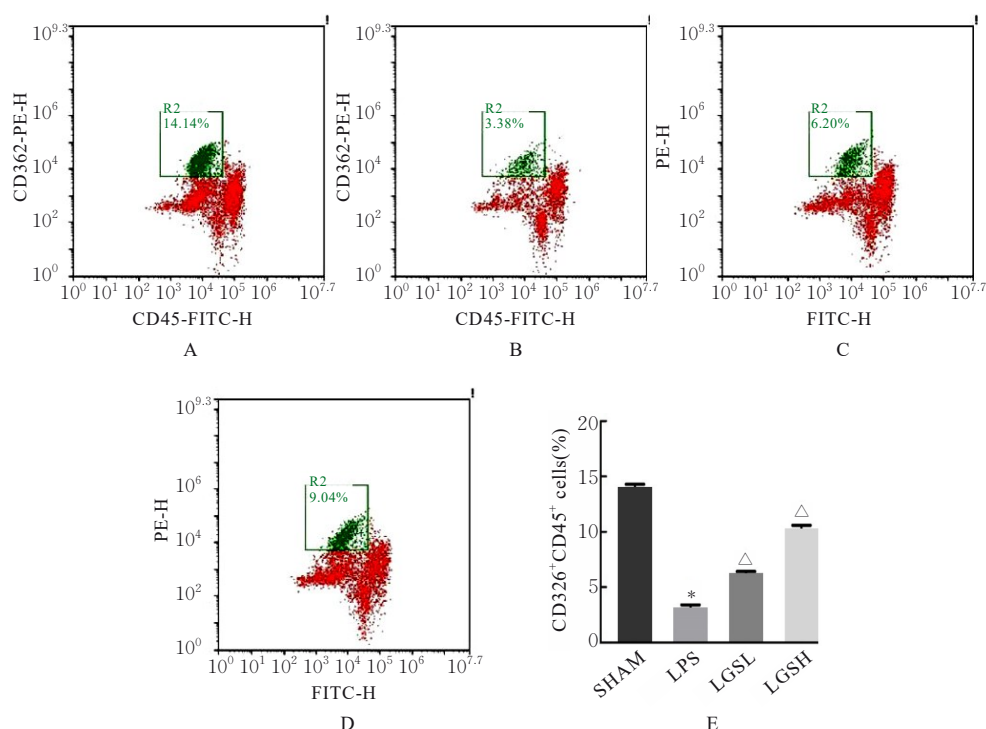
表1 各组小鼠肺组织MPO水平和免疫组织化学评分  
Tab. 1 Levels of MPO and immunohistochemistry scores in lung tissue of mice in various groups ( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

Group	MPO [ $\lambda_B / (U \cdot g^{-1})$ ]	Immunohistochemistry score
SHAM	0.12 $\pm$ 0.01	8.50 $\pm$ 0.96
LPS	0.35 $\pm$ 0.03*	88.50 $\pm$ 3.95*
LGSL	0.22 $\pm$ 0.01 <sup>△</sup>	29.67 $\pm$ 4.02 <sup>△</sup>
LGSH	0.17 $\pm$ 0.01 <sup>△#</sup>	13.07 $\pm$ 1.07 <sup>△#</sup>

\* $P < 0.05$  compared with SHAM group;  $\Delta P < 0.05$  compared with LPS group; # $P < 0.05$  compared with LGSL group.

肺泡灌洗液中 IL-18、IL-1 $\beta$  和白蛋白水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

2.6 各组小鼠肺组织中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 和 HMGB1 蛋白表达水平 与 SHAM 组比较, LPS 组小鼠肺组织中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 和 HMGB1 蛋白表达水平均明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与 LPS 组比较, LGSL 组和 LGSH 组小鼠肺组织中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 和 HMGB1 蛋白表达水平均明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图 5。



A: SHAM group; B: LPS group; C: LGSL group; D: LGSH group; E: Histogram. \* $P < 0.05$  compared with SHAM group;  $^{\Delta}P < 0.05$  compared with LPS group.

图4 各组小鼠肺组织中肺泡上皮细胞百分率(A~D)及直条图(E)

Fig. 4 Percentages(A-D) and histogram(E) of epithelial cells in lung tissue of mice in various groups

表2 各组小鼠肺泡灌洗液中IL-18、IL-1 $\beta$ 和白蛋白水平  
Tab. 2 Levels of IL-18, IL-1 $\beta$  and albumin levels in alveolar lavage fluid of mice in various groups

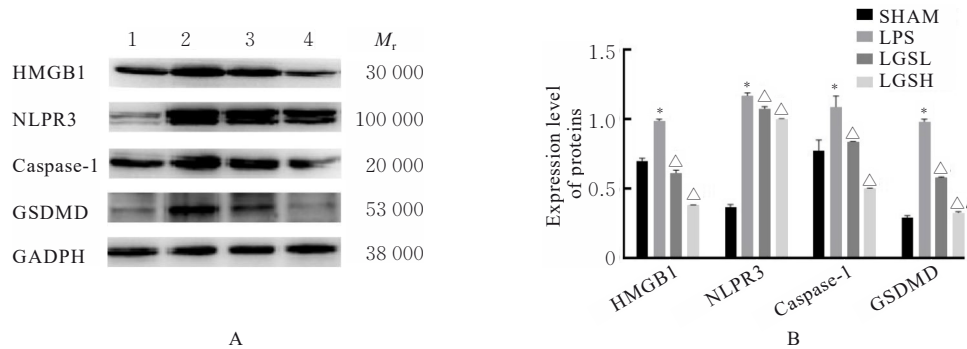
Group	[ $n=6, \bar{x} \pm s, \rho_B / (\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$ ]		
	IL-18	IL-1 $\beta$	Albumin
SHAM	34.74 $\pm$ 7.23	54.00 $\pm$ 1.03	5.71 $\pm$ 0.26
LPS	221.23 $\pm$ 9.65*	128.47 $\pm$ 5.58*	18.78 $\pm$ 0.28*
LGSL	129.30 $\pm$ 29.60 <sup>△</sup>	98.63 $\pm$ 0.92 <sup>△</sup>	15.51 $\pm$ 0.63 <sup>△</sup>
LGSH	76.61 $\pm$ 9.28 <sup>△</sup>	86.30 $\pm$ 8.94 <sup>△</sup>	10.05 $\pm$ 0.57 <sup>△</sup>

\* $P < 0.05$  compared with SHAM group;  $^{\Delta}P < 0.05$  compared with LPS group.

### 3 讨论

LGS是中医清热解毒活血化瘀的代表方剂。临床研究<sup>[16]</sup>表明：LGS加减辅助治疗ALI/ARDS可显著降低患者炎症反应和凝血功能障碍。网络药理学研究<sup>[17]</sup>结果表明：LGS中的核心成分是连翘苷、槲皮素、豆甾醇和光甘草定等，可作用于磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)和晚期糖基化终产物(advanced glycation end products, AGE)/晚期糖基化终产物受体(receptor

for advanced glycation end products, RAGE)信号通路，从抗炎、抗氧化、抗菌和免疫调节等方面发挥治疗ALI的作用。本研究通过LPS诱导ALI小鼠模型，探讨LGS对LPS诱导ALI的保护作用，通过气管滴注LPS成功构建ALI小鼠模型，结果显示：LPS组小鼠肺组织病理评分明显升高，表现为肺泡壁增厚、炎性细胞浸润和肺泡内渗出物积聚，符合ALI典型病理特征；同时，LPS组小鼠支气管肺泡灌洗液中白蛋白水平较SHAM组明显升高，提示肺泡毛细血管屏障完整性被破坏，与临床ARDS患者肺水肿形成机制一致<sup>[18]</sup>；小鼠肺组织中中性粒细胞百分率(Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>)和MPO水平明显升高，反映中性粒细胞浸润和活化，这一现象与LPS通过Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)激活NF- $\kappa$ B信号、诱导趋化因子CXC基序配体1[chemokine (C-X-C motif) ligand 1, CXCL1]/趋化因子CXC基序配体2[chemokine (C-X-C motif) ligand 1, CXCL2]等趋化因子分泌的机制相符<sup>[19]</sup>。上述结果与既往研究中LPS诱导的ALI模型表现高度一致，表明本实验条件下小鼠ALI模型构建成功。本研究结果显示：LGS可显著降低



Lane 1: SHAM group; Lane 2: LPS group; Lane 3: LGSL group; Lane 4: LGSH group. \* $P < 0.05$  compared with SHAM group;  $\Delta P < 0.05$  compared with LPS group.

图5 各组小鼠肺组织中NLRP3、Caspase-1、GSDMD和HMGB1蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 5 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of NLRP3, Caspase-1, GSDMD, and HMGB1 proteins in lung tissue of mice in various groups

小鼠肺组织的病理损伤并降低组织血管通透性。通过降低炎症细胞浸润和抑制炎症因子IL-1 $\beta$ 和IL-18的分泌来改善肺部炎症反应。

本研究结果表明: LGS可能通过抑制NLRP3/Caspase-1/GSDMD信号通路的活化,降低炎症因子的表达,抑制上皮细胞的焦亡,从而保护LPS诱导的ALI。尽管肺组织包含多种细胞类型,但以下证据可能支持肺泡上皮细胞是焦亡主要发生部位。本研究流式细胞术检测结果显示: LPS组小鼠肺组织中CD326<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>肺泡上皮细胞比例下降43%,提示该群体细胞数量减少可能与焦亡性死亡有关;肺泡上皮细胞特异性表达NLRP3炎症小体组分,且既往研究<sup>[20]</sup>证实LPS可通过Toll样受体4(Toll like receptor 4, TLR4)直接激活肺泡上皮细胞的焦亡通路。因此,综合焦亡蛋白表达、上皮细胞数量变化及文献证据,本研究结果可能主要反映LGS对肺泡上皮细胞焦亡的调控作用。但未来仍需要通过细胞特异性敲除模型(上皮细胞条件性GSDMD敲除小鼠)明确焦亡的细胞来源。研究<sup>[21]</sup>表明: 中性粒细胞在肺组织的大量聚集在ALI发生和发展中发挥关键性调控作用,是ALI的早期进展的关键标志。在ARDS患者肺泡灌洗液中中性粒细胞的数目显著增加,并且中性粒细胞百分率与ARDS的严重程度和预后呈正相关关系,中性粒细胞的大量浸润是造成ALI死亡的主要原因<sup>[22-24]</sup>,因此降低中性粒细胞百分率是保护ALI的重要措施之一。本研究采用流式细胞术检测小鼠肺组织中中性粒细胞百分率,结果显示: LGS可显著降低其百分率。NETs的形成依赖于ROS和颗粒

酶释放,而焦亡相关因子IL-18可进一步趋化中性粒细胞,形成“焦亡-炎症-细胞浸润”的正反馈环路。LGS可能通过打破这一恶性循环,既减少初始中性粒细胞募集,又通过降低IL-18水平来抑制后续NETs形成。但本研究未直接检测NETs相关标志物(人瓜氨酸组蛋白H3、中性粒细胞弹性蛋白酶-DNA复合物),未来将进一步进行实验验证。

综上所述, LGS可减轻LPS诱导的小鼠ALI和炎症反应,减少肺组织中中性粒细胞浸润和MPO的释放,其机制可能与抑制小鼠肺组织中NLRP3、Caspase-1和GSDMD蛋白表达有关。然而, LGS对中性粒细胞的作用及机制仍需要进一步研究。中性粒细胞与上皮细胞之间的相互关系以及LGS治疗ALI多通路之间的相互作用,仍需要进行更加深入研究。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

于鑫、董铮和张引参与实验操作及论文撰写,蔡相龙和刘亮亮参与数据统计学分析,孙娜和牛文博参与研究选题,杨磊和杨文杰参与实验设计、论文指导及审校。

#### [参考文献]

- [1] THOMPSON B T, CHAMBERS R C, LIU K D. Acute respiratory distress syndrome[J]. N Engl J Med, 2017,377(6):562-572.
- [2] BOS L D J, WARE L B. Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes[J]. Lancet, 2022,400(10358):1145-1156.

- [3] LONG M E, MALLAMPALLI R K, HOROWITZ J C. Pathogenesis of pneumonia and acute lung injury [J]. Clin Sci (Lond), 2022, 136(10): 747-769.
- [4] BHATIA M, ZEMANS R L, JEYASEELAN S. Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012, 46(5): 566-572.
- [5] SCOZZI D, LIAO F Y, KRUPNICK A S, et al. The role of neutrophil extracellular traps in acute lung injury [J]. Front Immunol, 2022, 13: 953195.
- [6] MORÁN G, UBERTI B, QUIROGA J. Role of cellular metabolism in the formation of neutrophil extracellular traps in airway diseases [J]. Front Immunol, 2022, 13: 850416.
- [7] LIU S, SU X L, PAN P H, et al. Neutrophil extracellular traps are indirectly triggered by lipopolysaccharide and contribute to acute lung injury [J]. Sci Rep, 2016, 6: 37252.
- [8] WEI T C, ZHANG C P, SONG Y L. Molecular mechanisms and roles of pyroptosis in acute lung injury [J]. Chin Med J, 2022, 135(20): 2417-2426.
- [9] 陈瑜, 李艳, 余贇, 等. 细胞焦亡的分子机制及其在感染性疾病中的作用 [J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(2): 185-188.
- [10] ZHAO Y, SHI J J, SHAO F. Inflammatory caspases: activation and cleavage of gasdermin-D *in vitro* and during pyroptosis [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1714: 131-148.
- [11] KANG J Y, XU M M, SUN Y, et al. Melatonin attenuates LPS-induced pyroptosis in acute lung injury by inhibiting NLRP3-GSDMD pathway *via* activating Nrf2/HO-1 signaling axis [J]. Int Immunopharmacol, 2022, 109: 108782.
- [12] 林慧, 余林中, 秦清和. 凉膈散对内毒素肺损伤小鼠肺组织核因子- $\kappa$ B活性的影响 [J]. 四川中医, 2004, 22(7): 16-18.
- [13] 刘建新. 凉膈散对内毒素致急性肺损伤大鼠肺水通道蛋白表达的影响 [D]. 广州: 南方医科大学, 2010.
- [14] 周勇, 赵玮. 凉膈散对内毒素致急性肺损伤大鼠肺组织病理学及血中性粒细胞凋亡的影响 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2017, 27(4): 278-281.
- [15] 周勇, 赵玮. 凉膈散对内毒素致急性肺损伤大鼠高迁移率族蛋白1影响 [J/OL]. 中华临床医师杂志(电子版), 2017, 11(4): 607-611.
- [16] 苏燕娟. 凉膈散加减干预实证急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征的临床观察 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2011.
- [17] 杨丽玲, 周湘君, 晏丽君, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨凉膈散抑制急性肺损伤细胞因子风暴的机制 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2021, 21(7): 780-787.
- [18] CAVE C, SAMANO D, SHARMA A M, et al. Acute respiratory distress syndrome: a review of ARDS across the life course [J]. J Investig Med, 2024, 72(8): 798-818.
- [19] HU D N, ZHANG R H, YAO S, et al. Cultured human uveal melanocytes express/secrete CXCL1 and CXCL2 constitutively and increased by lipopolysaccharide *via* activation of Toll-like receptor 4 [J]. Curr Eye Res, 2021, 46(11): 1681-1694.
- [20] SHEN X, HE L L, CAI W R. Role of lipopolysaccharides in the inflammation and pyroptosis of alveolar epithelial cells in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome [J]. J Inflamm Res, 2024, 17: 5855-5869.
- [21] ZHANG M F, LI S P, YING J J, et al. Neutrophils: a key component in ECMO-related acute organ injury [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1432018.
- [22] GERARD L, LECOCQ M, DETRY B, et al. Airway epithelium damage in acute respiratory distress syndrome [J]. Crit Care, 2024, 28(1): 350.
- [23] ZONG X L, WANG X C, LIU Y R, et al. Comparative analysis of compartment-specific immunothrombotic biomarker profiles in bronchoalveolar lavage fluid and serum of patients with pneumonia-related acute respiratory distress syndrome: a preliminary cross-sectional study [J]. J Investig Med, 2025, 73(1): 104-115.
- [24] 魏玲玉, 全淑, 王梦儿, 等. 雷公藤通过调控骨髓源性抑制细胞的分化及功能缓解急性肺损伤 [J]. 中南大学学报(医学版), 2025, 50(5): 840-850.