

基于 HIF-1 α /NLRP3 信号通路探讨大补肺汤对高原低氧大鼠急性肺损伤的干预作用

李从艺^{1,2,3}, 曹旺杰^{1,2,3}, 黄勇^{1,2,3}, 苏韞^{1,2,3*}, 龚红霞^{1,2,3}, 冷光现⁴, 李莉霞⁵, 曾元丁^{1,2,3}(1.甘肃中医药大学基础医学院, 兰州 730000; 2.甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究省级重点实验室, 兰州 730000; 3.敦煌医学与转化教育部重点实验室, 兰州 730000; 4.兰州大学第二医院, 兰州 730000; 5.天水市中西医结合医院, 天水 741000)

摘要: **目的** 探讨大补肺汤通过调控 HIF-1 α /NLRP3 信号通路及相关分子的表达, 从而对高原低氧大鼠急性肺损伤的干预作用。**方法** SPF 级 SD 大鼠 60 只随机分为空白组, 模型组, 阳性药物组, 大补肺汤高、中、低剂量组, 每组 10 只。适应性饲养 3 d 后给药, 空白组和模型组大鼠灌胃给予等量生理盐水; 大补肺汤高、中、低剂量组分别连续灌胃大补肺汤 14 d; 阳性药物组给予地塞米松, 腹腔注射, 进舱前连续给药 3 d。除空白组外, 第 15 天起各组大鼠于实验动物低压模拟舱中进行低氧暴露, 连续 3 d。最后, 检测大鼠肺组织湿干重比 (wet to dry ratio, W/D); HE 染色法观察大鼠肺组织形态; ELISA 法检测血清中 IL-1 β 、IL-18 的水平; Western blotting 与 RT-qPCR 法分别检测大鼠肺组织中 HIF-1 α 、NLRP3、GSDMD、caspase-1 蛋白和 mRNA 表达。**结果** W/D 值结果表明, 与空白组相比, 模型组大鼠 W/D 显著升高 ($P<0.01$); 与模型组相比, 阳性药物组及大补肺汤高、中、低剂量组大鼠 W/D 显著降低 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。HE 结果显示, 与空白组相比, 模型组大鼠肺组织可见肺泡间隔增厚, 肺间质充血、水肿, 炎性细胞浸润, 肺泡腔内可见少量渗出; 与模型组相比, 阳性药组及大补肺汤高、中、低剂量组肺泡壁增厚减轻, 肺间质充血、水肿及炎性细胞浸润明显减轻。ELISA 结果显示大鼠血清中 IL-1 β 、IL-18 水平在模型组中均显著高于空白组 ($P<0.01$); 与模型组相比, 阳性药组及大补肺汤高、中、低剂量组血清中 IL-1 β 、IL-18 水平均显著下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。此外, Western blotting 与 RT-qPCR 结果显示, 与空白组相比, 模型组大鼠肺组织 HIF-1 α 、NLRP3、GSDMD 和 caspase-1 蛋白及 mRNA 相对表达显著升高 ($P<0.01$); 与模型组相比, 阳性药组及大补肺汤高剂量肺组织 HIF-1 α 、NLRP3、caspase-1、GSDMD 蛋白及 mRNA 表达显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 大补肺汤中剂量肺组织 HIF-1 α 、NLRP3、caspase-1、GSDMD 蛋白表达显著降低且 HIF-1 α 、caspase-1 mRNA 表达降低 ($P<0.05$), 大补肺汤低剂量肺组织 HIF-1 α 、GSDMD 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。阳性药物组及大补肺汤高剂量组作用效果更显著。**结论** 大补肺汤可调控 HIF-1 α /NLRP3 信号通路, 抑制细胞焦亡、减轻炎症反应, 对高原低氧大鼠急性肺损伤具有一定的保护作用。

关键词: 急性肺损伤; 高原低氧; HIF-1 α ; NLRP3; 大补肺汤; 炎症反应

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2024)06-0736-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223230

引用本文: 李从艺, 曹旺杰, 黄勇, 等. 基于 HIF-1 α /NLRP3 信号通路探讨大补肺汤对高原低氧大鼠急性肺损伤的干预作用[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(6): 736-742.

Intervention Effect of Dabufei Decoction on Acute Lung Injury in Rats with High Altitude Hypoxia Based on HIF-1 α /NLRP3 Signaling Pathway

LI Congyi^{1,2,3}, CAO Wangjie^{1,2,3}, HUANG Yong^{1,2,3}, SU Yun^{1,2,3*}, GONG Hongxia^{1,2,3}, LENG Guangxian⁴, LI Lixia⁵, ZENG Yuanding^{1,2,3}(1.School of Basic Medicine, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2.Gansu Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine and Traditional Chinese Medicine for Major Diseases, Lanzhou 730000, China; 3.Key Laboratory of Dunhuang Medicine and Transformation at Provincial and Ministerial Level, Lanzhou 730000, China; 4.The Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 5.Tianshui Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Tianshui 741000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the intervention effect of Dabufei decoction on acute lung injury in rats with high altitude hypoxia by regulating the expression of the HIF-1 α /NLRP3 signaling pathway and related molecules. **METHODS** Sixty SPF SD rats were randomly divided into blank group, model group, positive drug group, Dabufei decoction high-dose, medium-

基金项目: 甘肃省中医药管理局项目 (GSKP-2021-32); 甘肃省高校中 (藏) 药化学与质量研究重点实验室开放基金 (zzy-2019-06); 敦煌医学与转化教育部重点实验室开放基金 (DHYX20-03); 甘肃省自然科学基金项目 (21JR11RA144)

作者简介: 李从艺, 女, 硕士生 E-mail: 1846407623@qq.com *通信作者: 苏韞, 女, 硕士, 教授, 硕导 E-mail: suyungszy@126.com

dose, and low-dose groups with 10 rats in each group. After 3 d of adaptation to feeding, the rats in the blank group and model group were given the same amount of normal saline by gavage, and the rats in Dabufei decoction high-dose, medium-dose, and low-dose groups were given gavage for 14 d, respectively. The positive drug group was given dexamethasone by intraperitoneal injection for three consecutive days before entering the chamber. Except for the blank group, the rats in each group were exposed to hypoxia in the experimental animal low-pressure simulation chamber from the 15th day for three consecutive days. At the end of the experiment, the wet to dry ratio(W/D) of the rat lung tissue was detected. The morphology of lung tissue was observed by HE staining. ELISA detected the levels of IL-1 β and IL-18 in serum. Western blotting and RT-qPCR were used to detect the protein and mRNA expressions of HIF-1 α , NLRP3, GSDMD, and caspase-1 in the lung tissue of rats. **RESULTS** The W/D value showed that compared with the blank group, the W/D of the model group was significantly increased($P<0.01$). Compared with the model group, the W/D of rats in the positive drug group, Dabufei decoction high-dose group, medium-dose, and low-dose groups was significantly decreased($P<0.01$ or $P<0.05$). HE results showed that compared with the blank group, alveolar septum thickening, pulmonary interstitial congestion, edema, inflammatory cell infiltration, and a small amount of exudation in the alveolar cavity were seen in the lung tissue of the model group. Compared with the model group, the thickening of alveolar walls in the positive drug group, Dabufei decoction high-dose group, medium-dose, and low-dose groups were reduced, and the pulmonary interstitial congestion, edema, and inflammatory cell infiltration were significantly reduced. ELISA results showed that IL-1 β and IL-18 in rat serum were significantly higher in the model group than in the blank group($P<0.01$). Compared with the model group, the levels of IL-1 β and IL-18 in the serum of the rats in the positive drug group, Dabufei decoction high-dose group, medium-dose, and low-dose groups were significantly decreased($P<0.05$ or $P<0.01$). Moreover, the results of Western blotting and RT-qPCR showed that compared with the blank group, the relative protein and mRNA expressions of HIF-1 α , NLRP3, GSDMD, and caspase-1 in the lung tissue of the model group were significantly increased($P<0.01$). Compared with the model group, the relative protein and mRNA of HIF-1 α , NLRP3, caspase-1 and GSDMD in the positive drug group and Dabufei decoction high-dose group were significantly decreased($P<0.05$ or $P<0.01$), the relative protein of HIF-1 α , NLRP3, caspase-1 and GSDMD in Dabufei decoction medium-dose group were significantly decreased and HIF-1 α , caspase-1 mRNA were significantly decreased($P<0.05$), the relative protein of HIF-1 α and GSDMD in the low-dose group was decreased($P<0.05$). The positive drug group and Dabufei decoction high-dose group had the more significant effect. **CONCLUSION** Dabufei decoction can regulate the HIF-1 α /NLRP3 signaling pathway, inhibit pyroptosis and reduce inflammation, and has a certain protective effect on acute lung injury in rats with high altitude hypoxia. **KEYWORDS:** acute lung injury; high altitude hypoxia; HIF-1 α ; NLRP3; Dabufei decoction; inflammatory response

高原低氧环境影响人类健康已成为当前亟待解决的突出问题,急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是一种病情危重的临床综合征,其主要表现为呼吸衰竭和顽固性低氧血症^[1],以肺泡及肺实质发生急性炎症反应为特点。高原低氧环境可引起人体组织、器官缺氧而产生一系列病理生理改变,是ALI的重要诱因之一。研究表明,低氧环境下低氧诱导因子1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)表达增加,介导炎性反应的产生,而炎症反应的失衡加重了上皮或内皮细胞的损伤^[2],导致富含蛋白质的水肿液进入肺泡,从而促进ALI的进展^[3]。Nod样受体蛋白3(nod like receptor protein 3, NLRP3)是研究最为深入的一类炎症小体^[1],呼吸系统许多疾病的发生均与NLRP3炎症小体密切相关。研究证实,HIF-1 α 可激活NLRP3,进而通过HIF-1 α /NLRP3通路诱导炎性反应发生^[4-6]。

大补肺汤出自梁·陶弘景《辅行诀脏腑用药法要》,原方为“麦门冬、五味子、旋覆花各三两,细辛一两,地黄、竹叶、甘草各一两;上七味,以水一斗,煮取四升,温分四服,日三夜一服”^[7]。该方主治肺虚及肾、肺肾气虚、气失摄

纳、喘咳短气不足以息者,与高原低氧肺水肿临床表现甚为相合。研究显示^[8],大补肺汤用于治疗慢性肺系疾病方面的临床疗效显著,在高原低氧所致急性肺系疾病方面尚无大补肺汤方药的现代药理研究。鉴于高原低氧诱导的ALI具有气虚为主兼夹血瘀、阴液不足的病证特点,确立以益气活血为主兼有滋补阴液的治法,首次选用具有滋阴润肺、敛降肺气的大补肺汤来干预治疗。

本研究首次通过HIF-1 α /NLRP3信号通路,探讨大补肺汤对高原低氧诱发大鼠ALI的干预作用,为研究探讨高原低氧ALI干预策略提供实验数据,同时也为探索中医药防治高原缺氧疾病的新途径提供一定参考。

1 材料

1.1 动物

SPF级雄性SD大鼠60只,6~8周龄,体重180~200 g,由斯贝福北京生物技术有限公司提供,动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010。本实验符合甘肃中医药大学实验动物伦理会审查要求(审批号:2021-806)。

1.2 药物

大补肺汤(由麦门冬45 g、五味子45 g、旋覆

花 45 g、细辛 15 g、地黄 15 g、竹叶 15 g、甘草 15 g 组成), 购于甘肃中医药大学附属医院。加冷水浸泡 2 h, 煮沸后用文火慢煮 40 min, 过滤。药渣加水继续煎煮 40 min, 过滤。合并 2 次滤液后, 分装小瓶放入 4 ℃ 冰箱保存备用, 给药量按照人与大鼠的体质量换算为等效剂量 $195 \text{ g}/70(\text{kg}\cdot\text{d})\times 6.3\approx 17.55 \text{ g}\cdot(\text{kg}\cdot\text{d})^{-1}$ 。醋酸地塞米松片(浙江仙琚制药股份有限公司, 批号: 200320; 规格: 每片 0.75 mg)。

1.3 试剂与仪器

IL-1 β 、IL-18 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒购于江苏菲亚生物科技有限公司, 批号分别为 MM-0047R1, MM-0194R1; HIF-1 α 、caspase-1、 β -actin 抗体均购自美国 Immunoway 公司, 批号分别为 YT2133, YT0652, YM3029; NLRP3 抗体(碧云天生物技术有限公司, 批号: AF2155); GSDMD(美国 Affinity 公司, 批号: AF4012); RNA 逆转录试剂盒、荧光定量试剂盒均购自上海翊圣生物科技有限公司, 批号分别为 11141ES60, 11201ES08; BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司, 批号分别为 20190904, P1200。

VELOCITY 18R 型台式高速离心机(英国 Dynamica 公司, 离心半径 6.95 cm); CX31 生物显微镜(日本 Olympus 公司); HCP-III 实验动物低压模拟舱(西安富康空气净化设备工程有限公司)。

2 方法

2.1 分组、给药与造模

60 只 SPF 级 SD 大鼠随机分为空白组, 模型组, 阳性药物组, 大补肺汤高、中、低剂量组, 每组 10 只。适应性饲养 3 d 后给药, 空白组和模型组大鼠灌胃给予等量生理盐水, 大补肺汤高、中、低剂量组分别灌胃给予 35.1, 17.55, 8.775 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量药物, 每天 1 次, 连续 14 d。阳性药物组给予 0.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 地塞米松, 腹腔注射, 进舱前连续给药 3 d。除空白组外, 第 15 天起各组大鼠每日灌胃 30 min 后于实验动物低压模拟舱中进行低氧暴露, 设置实验动物低压模拟舱以 10 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ 速度上升至 3 000 m 停留 5 min; 同样速度上升至 4 500 m 停留 3 min; 再以 10 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ 速度上升至 6 000 m; 低氧暴露连续 72 h^[7]。第 18 天实验结束后处死动物, 空白组大鼠饲养结束后并与其余各组大鼠一同检测各项指标。

2.2 各组大鼠肺组织湿/干重比的测定

用 4 ℃ 预冷的生理盐水洗净右上肺, 吸干水分, 称取湿重 (W)。然后将肺组织置于烤箱中, 60 ℃ 干燥 48 h 至恒重后, 称取干重 (D), 计算肺组织的 W/D 值指数。

2.3 各组大鼠肺组织病理形态学观察

称重完毕后, 将大鼠右肺中叶置于 4% 多聚甲醛固定液中固定, 石蜡包埋后进行切片, 依次进行梯度二甲苯脱蜡, 酒精梯度脱水, 苏木精染色, 水洗, 盐酸酒精分化, 水洗, 酒精梯度脱水, 伊红染色, 酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片后在光学显微镜下观察其病理变化。

2.4 各组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-18 含量测定

大鼠取血后, 3 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 分离血清, ELISA 检测血清 IL-1 β 、IL-18 的含量。操作步骤按试剂盒说明进行, 反应终止后 15 min 内, 用 450 nm 波长测量各孔的吸光值 (OD 值)。以标准物的浓度为横坐标, OD 值为纵坐标, 绘出标准曲线。根据各孔的 OD 值由标准曲线算出相应浓度。

2.5 Western blotting 检测肺组织 HIF-1 α 、NLRP3、GSDMD、caspase-1 蛋白表达

取大鼠左肺叶, 提取总蛋白, BCA 蛋白浓度检测试剂盒检测蛋白浓度。加入 4 $\times$ 上样缓冲液煮沸使蛋白变性。配制 12% 分离胶和 5% 浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜, 封闭 2 h, 一抗 (1:1 000) 4 ℃ 室温摇床过夜; 次日 TBST 洗涤 3 次后加二抗 (1:10 000), 置于室温摇床上 2 h; 进而 TBST 洗膜 3 次, ECL 显色。采用 Image J 软件测蛋白条带灰度值后进行定量分析。

2.6 RT-qPCR 检测肺组织 HIF-1 α 、NLRP3、GSDMD、caspase-1 mRNA 表达

按总 RNA 提取试剂盒说明书提取左肺叶总 RNA, 进行反转录操作, 然后进行扩增, 应用相对表达量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对各组 mRNA 含量进行分析。引物由上海博迈德生物工程有限公司合成, 引物序列见表 1。

2.7 统计学处理

采用 SPSS 24.0 统计分析软件处理。计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用单因素方差分析和 t 检验分析组间差异显著性, 以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。计数资料各组间比较采用秩和检验。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

引物	上游(5'~3')	下游(5'~3')
<i>β-actin</i>	TGTCACCAACTG GGACGATA	GGGGTGTGAAGG TCTCAAA
<i>HIF-1α</i>	CTGTGTCAGAGT CCTTGGAG	GATAGTAGTAGCAG TGGCTGTGG
<i>NLRP3</i>	CAGCCAGAGTG GAATGATGC	TTGCTTGGATGC TCCTTGAC
<i>GSDMD</i>	TCAACCTGTC AATCAAGGAC	TCTGCTGAGT CACACGC
<i>caspase-1</i>	CTGAACCAGGA AGAGATGGATAC	ACTTGAGGG AACCACTCGG

3 结果

3.1 大补肺汤对各组大鼠肺组织 W/D 指数变化的影响

与空白组比, 模型组大鼠的肺 W/D 指数显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比, 阳性药物组及大补肺汤高、中、低剂量组大鼠肺 W/D 指数显著降低 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 见表 2。

表 2 各组大鼠肺组织 W/D 变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Tab. 2 Changes of W/D in lung tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	W/D值
空白组	4.66±0.50
模型组	8.08±1.71 ¹⁾
阳性药物组	6.08±0.53 ³⁾
大补肺汤高剂量组	6.26±0.89 ²⁾
大补肺汤中剂量组	6.31±0.91 ²⁾
大补肺汤低剂量组	6.44±0.76 ²⁾

注: 与空白组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with the blank control, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

3.2 大补肺汤对各组大鼠肺组织病理形态学影响

光镜下可见, 细胞核呈蓝色, 胞浆呈淡红色。空白组肺泡腔结构清晰, 肺泡壁厚度均匀, 各级支气管壁及肺泡间隔等肺间质无充血、水肿、炎细胞浸润, 肺泡腔内无出血、渗出。模型组可见肺泡间隔增厚, 各级支气管壁及肺泡间隔等肺间质充血、水肿, 大量中性粒细胞、巨噬细胞等炎性细胞浸润, 肺泡腔内可见少量渗出。阳性药物组及大补肺汤高、中、低剂量组肺泡壁增厚减轻, 肺间质充血、水肿及炎性细胞浸润明显减轻, 肺组织见图 1。

3.3 大补肺汤对各组大鼠血清 IL-1 β 、IL-18 的影响

与空白组比, 模型组大鼠血清 IL-1 β 、IL-

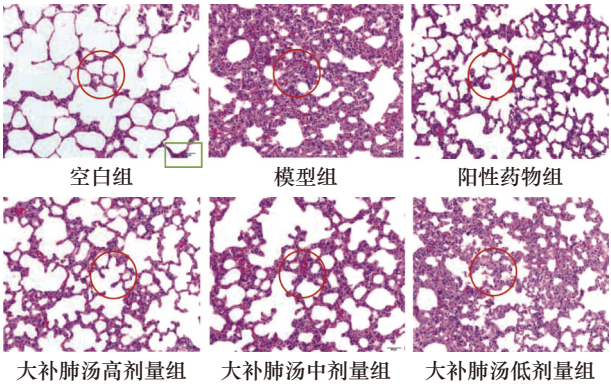


图 1 大补肺汤对肺组织病理变化的影响 (HE, 200 $\times$)
红圈表示典型病变部位。

Fig. 1 Effect of Dabufei decoction on the pathological changes of lung tissue(HE, 200 $\times$)
Red circle indicated the typical lesion site.

18 水平明显升高 ($P<0.01$); 与模型组比, 阳性药物组及大补肺汤高、中、低剂量组大鼠血清 IL-1 β 、IL-18 水平降低 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 见表 3。

表 3 各组大鼠血清 IL-1 β 、IL-18 表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Tab. 3 Serum levels of IL-1 β and IL-18 of rats in each group($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
pg·mL⁻¹

组别	IL-1 β	IL-18
空白组	17.88±0.98	65.97±3.37
模型组	38.17±1.01 ¹⁾	140.6±1.71 ¹⁾
阳性药物组	27.14±0.61 ³⁾	111.6±1.37 ³⁾
大补肺汤高剂量组	21.34±1.09 ³⁾	91.09±1.58 ³⁾
大补肺汤中剂量组	28.35±0.50 ³⁾	100.7±3.04 ³⁾
大补肺汤低剂量组	30.60±1.51 ²⁾	105.3±0.91 ²⁾

注: 与空白组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with the blank control, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

3.4 大补肺汤对各组大鼠肺组织中 HIF-1 α 、NLRP3、GSDMD、caspase-1 蛋白表达水平的影响

与空白组比, 模型组大鼠肺组织 HIF-1 α 、NLRP3、GSDMD、caspase-1 蛋白表达水平明显增加 ($P<0.01$); 与模型组比, 阳性药物组及大补肺汤高、中剂量组大鼠肺组织 HIF-1 α 、NLRP3、caspase-1、GSDMD 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$); 大补肺汤低剂量组大鼠肺组织 HIF-1 α 、GSDMD 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$), NLRP3、caspase-1 蛋白表达无统计学意义, 见图 2 和表 4。

3.5 大补肺汤对各组大鼠肺组织中 HIF-1 α 、NLRP3、GSDMD、caspase-1 mRNA 表达的影响

与空白组比, 模型组大鼠肺组织 HIF-1 α 、NLRP3、GSDMD、caspase-1 mRNA 表达水平明

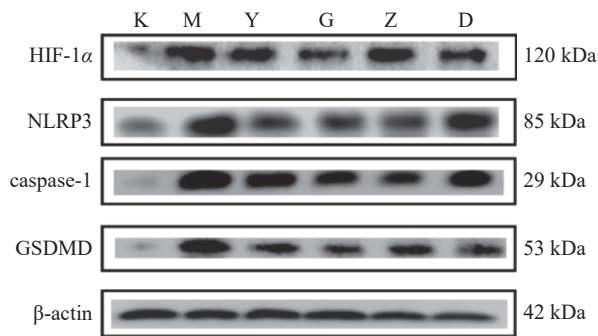


图 2 各组大鼠肺组织中 HIF-1 α 、NLRP3、GSDMD 和 caspase-1 蛋白表达
K-空白组；M-模型组；Y-阳性药物组；G-大补肺汤高剂量组；Z-大补肺汤中剂量组；D-大补肺汤低剂量组。

Fig. 2 HIF-1 α , NLRP3, GSDMD and caspase-1 protein expression in lung tissue of rats in each group

K-blank group; M-model group; Y-positive drug group; G-Dabufei decoction high-dose group; Z-Dabufei decoction medium-dose group; D-Dabufei decoction low-dose group.

表 4 各组大鼠肺组织中 HIF-1 α 、NLRP3、GSDMD 和 caspase-1 蛋白表达水平

Tab. 4 HIF-1 α , NLRP3, GSDMD and caspase-1 protein expression levels in lung tissue of rats in each group

组别	HIF-1 α	NLRP3	caspase-1	GSDMD
空白组	0.43 $\pm$ 0.03	0.19 $\pm$ 0.02	0.35 $\pm$ 0.08	0.15 $\pm$ 0.02
模型组	0.88 $\pm$ 0.04 ¹⁾	0.93 $\pm$ 0.07 ¹⁾	0.98 $\pm$ 0.06 ¹⁾	0.59 $\pm$ 0.04 ¹⁾
阳性药物组	0.67 $\pm$ 0.04 ³⁾	0.60 $\pm$ 0.06 ³⁾	0.73 $\pm$ 0.05 ³⁾	0.35 $\pm$ 0.02 ³⁾
大补肺汤高剂量组	0.56 $\pm$ 0.07 ³⁾	0.62 $\pm$ 0.02 ³⁾	0.68 $\pm$ 0.05 ³⁾	0.22 $\pm$ 0.02 ³⁾
大补肺汤中剂量组	0.63 $\pm$ 0.06 ²⁾	0.68 $\pm$ 0.03 ²⁾	0.69 $\pm$ 0.02 ²⁾	0.30 $\pm$ 0.06 ²⁾
大补肺汤低剂量组	0.65 $\pm$ 0.03 ²⁾	0.92 $\pm$ 0.03	0.87 $\pm$ 0.02	0.44 $\pm$ 0.02 ²⁾

注：与空白组比，¹⁾ $P<0.01$ ；与模型组比，²⁾ $P<0.05$ ，³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the blank control, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

显增加 ($P<0.01$)；与模型组相比，阳性药物组及大补肺汤高剂量组大鼠肺组织 HIF-1 α 、NLRP3、GSDMD、caspase-1 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)；大补肺汤中剂量组 HIF-1 α 、caspase-1 mRNA 表达显著降低 ($P<0.05$)，NLRP3、GSDMD mRNA 无统计学意义；大补肺汤低剂量组 HIF-1 α 、NLRP3、GSDMD、caspase-1 mRNA 均无统计学意义，见表 5。

4 讨论

高原低氧致 ALI 中存在缺氧和炎症反应的串扰，同时又存在低氧和炎症反应的失衡。低氧加重了上皮或内皮细胞的损伤，血管通透性的改变导致血管渗漏的增加，肺泡清除液体能力下降^[9]。炎症引起肺泡上皮细胞以及血管内皮细胞的破坏，肺的通气换气功能受影响^[10]，肺组织细胞的氧分压会迅速降低^[3]。这两者的刺激和调控影响

表 5 各组大鼠肺组织中 HIF-1 α 、NLRP3、GSDMD、caspase-1 mRNA 表达水平

Tab. 5 HIF-1 α , NLRP3, GSDMD and caspase-1 mRNA expression levels in the lung tissue of rats in each group

组别	HIF-1 α	NLRP3	caspase-1	GSDMD
空白组	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
模型组	2.68 $\pm$ 0.12 ¹⁾	2.72 $\pm$ 0.14 ¹⁾	2.52 $\pm$ 0.39 ¹⁾	2.45 $\pm$ 0.45 ¹⁾
阳性药物组	1.50 $\pm$ 0.30 ³⁾	2.05 $\pm$ 0.22 ²⁾	1.69 $\pm$ 0.12 ³⁾	1.47 $\pm$ 0.40 ²⁾
大补肺汤高剂量组	1.61 $\pm$ 0.14 ³⁾	2.06 $\pm$ 0.39 ²⁾	1.42 $\pm$ 0.17 ³⁾	1.40 $\pm$ 0.27 ³⁾
大补肺汤中剂量组	1.99 $\pm$ 0.20 ²⁾	2.40 $\pm$ 0.34	1.95 $\pm$ 0.30 ²⁾	1.99 $\pm$ 0.19
大补肺汤低剂量组	2.49 $\pm$ 0.46	2.41 $\pm$ 0.39	2.28 $\pm$ 0.13	2.16 $\pm$ 0.39

注：与空白组比，¹⁾ $P<0.01$ ；与模型组比，²⁾ $P<0.05$ ，³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the blank control, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

着 ALI 的进展，如不及时救治可发展为急性呼吸窘迫综合征^[11]，严重威胁生命健康。中医认为肺为气之主，司呼吸，主宣发肃降，而高原低压缺氧会使热邪侵袭人体，首先犯肺，伤津耗气，致机体气生成不足，阴液不足；邪热入里，热入营血，血热互结，血液黏滞导致血液运行障碍，积而成瘀。因此高原低氧 ALI 中医基本病机为本虚标实，气虚血瘀。本研究选用具有益气活血、滋阴润肺、敛降肺气的大补肺汤通过低氧炎症串扰的 HIF-1 α /NLRP3 信号通路来干预治疗高原低氧引起的 ALI。

NLRP3 炎症小体是由 NLRP3、接头蛋白 ASC 和效应蛋白 caspase-1 组成的大分子蛋白复合体。研究发现 HIF-1 α 是调节 NLRP3 炎性小体的重要因子，且 HIF-1 α 可作为 NLRP3 炎性小体的激活剂^[12]。当机体感知低氧时 HIF-1 α 的上调会激活 NLRP3，使得 NLRP3 进行自身寡聚化，切割 caspase-1 前体并释放活化的 caspase-1，随后活化的 caspase-1 通过蛋白质水解作用使 IL-1 β 前体和 IL-18 前体成为有活性的 IL-1 β 和 IL-18，切割 GSDMD 的 N 端序列，使其结合到膜上产生膜孔^[13]，IL-18、IL-1 β 等炎性因子释放到细胞外导致细胞焦亡^[14]。大量炎症因子可上调 HIF-1 α 的表达，促使炎症反应的级联放大，肺泡上皮通透性增加，导致细胞膜破裂、细胞崩解，参与 ALI 的发生和发展^[15-22]。研究表明，缺氧条件下，抑制 HIF-1 α 表达，NLRP3 表达也会受到抑制^[23]，并且可以减轻炎症反应，减缓 ALI 的进展^[24]。HIF-1 α /NLRP3 炎症串扰信号通路见图 3。

肺内正常的解剖结构支撑着其能够完成各项生理功能。本实验通过实验动物低压模拟舱成功

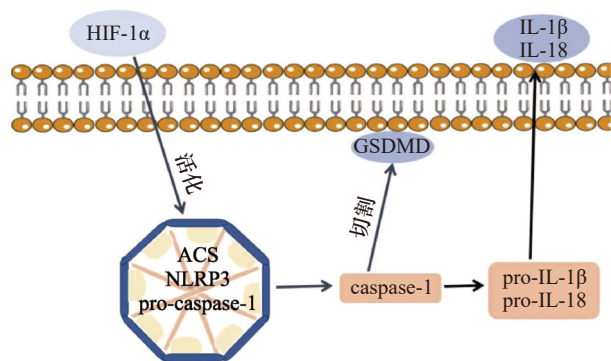


图3 HIF-1 α /NLRP3 信号通路图

Fig. 3 HIF-1 α /NLRP3 signal pathway diagram

建立大鼠高原低氧肺损伤模型，通过比较 W/D 指数，观察大鼠肺组织形态学变化显示高原低氧致使大鼠肺泡间隔增厚，各级支气管壁及肺泡间隔等肺间质充血、水肿，炎性细胞浸润，肺泡腔内可见少量渗出，这与骆亚莉等^[25]的研究结果相一致。Wu 等^[26]研究表明，LPS 联合急性低氧诱导大鼠 ALI 模型中，HIF-1 α 介导 TNF- α 、IL-1 β 、和 IL-6 炎症因子的大量分泌，成为 ALI 缺氧与炎症相互串扰以及发病和进展的重要原因。本实验的结果也证实了这一点，低氧致 ALI 发生后，大鼠肺组织 HIF-1 α 表达明显增加，同时血清中 IL-18、IL-1 β 炎症因子水平也升高，炎症因子的分泌导致肺血管上皮细胞损伤，血管通透性增加，使大量蛋白和液体进入肺间质；同时，炎症因子的分泌也会使肺泡上皮细胞损伤，肺泡液清除障碍，导致大量富含蛋白质的液体在肺泡腔内积聚，从而致使肺泡液体滞留，造成肺组织损伤。此外，细胞焦亡相关信号的激活，在 ALI 发生、发展中起着重要作用。研究表明^[27]，低氧可激活 NALP3 炎症小体，使 caspase-1 活化导致 IL-1 β 成熟和分泌，介导了 ALI 的发生、发展。本实验结果表明，高原低氧 ALI 大鼠肺 NLRP3、caspase-1、GSDMD 高表达，联合肺组织 HIF-1 α 以及血清中 IL-18、IL-1 β 的显著增加，提示 HIF-1 α 上调激活 NLRP3，从而活化 caspase-1 使 IL-1 β 前体和 IL-18 前体成为有活性的 IL-1 β 和 IL-18，同时活化 GSDMD，使其结合到膜上产生膜孔，IL-18、IL-1 β 等炎症因子释放到细胞外导致细胞焦亡，引起 ALI。

中药干预 ALI 能够抑制细胞焦亡介导的炎症通路，调控炎症介质来保护 ALI^[28-29]。研究发现^[30]，中药复方清温止咳方通过抑制 NLRP3 炎症

小体介导的细胞焦亡通路，进而改善脂多糖诱导的 ALI。本实验在大鼠造模前用大补肺汤进行干预，结果表明中药干预组大鼠血清中 IL-18、IL-1 β 的水平 and 肺组织 HIF-1 α 、NLRP3、caspase-1、GSDMD 的相对表达量显著下降，证实大补肺汤可通过下调 HIF-1 α /NLRP3 介导的细胞焦亡信号通路，从而抑制炎症因子的分泌，从而参与肺组织的抗损伤机制，达到保护肺组织，这与大补肺汤干预后肺组织形态学观察一致，光镜下肺组织病理切片显示大补肺汤可显著减轻大鼠肺组织肺泡壁增厚、炎性细胞浸润、肺间质充血、水肿，进而减轻炎症反应，对高原低氧 ALI 有明显的干预作用。

综上所述，低氧条件下，大补肺汤能够通过抑制 HIF-1 α /NLRP3 信号的级联激活，减轻高原低氧 ALI，保护肺组织。本研究通过大补肺汤干预低氧和炎症在 ALI 的串扰，从而保护肺组织的病理损伤，这对中医药防治 ALI 以及高原缺氧疾病的新途径有一定的应用、参考价值。然而，HIF-1 α /NLRP3 信号通路在 ALI 中的详细关联机制还有待进一步的研究。

REFERENCES

- [1] LIU Y L, WANG X D, LI P Y, et al. Targeting MALAT1 and miRNA-181a-5p for the intervention of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome[J]. *Respir Res*, 2021, 22(1): 1.
- [2] PINKERTON J W, KIM R Y, ROBERTSON A A B, et al. Inflammasomes in the lung[J]. *Mol Immunol*, 2017(86): 44-55.
- [3] LI X Q, SHAN C, WU Z H, et al. Correction to: Emodin alleviated pulmonary inflammation in rats with LPS-induced acute lung injury through inhibiting the mTOR/HIF-1 α /VEGF signaling pathway[J]. *Inflamm Res*, 2020, 69(7): 711.
- [4] YANG F, ZHU W, CAI X F, et al. Minocycline alleviates NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis in monosodium glutamate-induced depressive rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 526(3): 553-559.
- [5] JIANG Q, GENG X K, WARREN J, et al. Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) mediates NLRP3 inflammasome-dependent-pyrototic and apoptotic cell death following ischemic stroke[J]. *Neuroscience*, 2020(448): 126-139.
- [6] HUANG J J, XIA J, HUANG L L, et al. HIF-1 α promotes NLRP3 inflammasome activation in bleomycin-induced acute lung injury[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(4): 3424-3432.
- [7] CONG C Y. Analysis of Prescriptions for treating five Zang-organs diseases in Dunhuang suicide book "the prescription of auxiliary Prescriptions for treating Zang-organs" [J]. *Dunhuang Res(敦煌研究)*, 2002(3): 92-99.
- [8] XU Q, LIU H, ZHANG W, et al. Clinical experience of treating COPD in stable stage with Dabufei Decoction[J]. *Asia*

- Pac Tradit Med(亚太传统医药), 2017, 13(3): 111-112.
- [9] LI L, AN F Y, LIU Y Q, et al. Protective effects of *Astragalus-Lily* granules on intestinal mucosal barrier of mice in high altitude hypoxia[J]. Med J Chin People's Liberation Army(解放军医学杂志), 2016, 41(9): 773-778.
- [10] HEGER L A, KERBER M, HORTMANN M, et al. Expression of the oxygen-sensitive transcription factor subunit HIF-1 α in patients suffering from secondary Raynaud syndrome[J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(4): 500-506.
- [11] PATEL M N, CARROLL R G, GALVÁN-PEÑA S, et al. Inflammasome priming in sterile inflammatory disease[J]. Trends Mol Med, 2017, 23(2): 165-180.
- [12] HE Y, HARA H, NÚÑEZ G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation[J]. Trends Biochem Sci, 2016, 41(12): 1012-1021.
- [13] LIN H W, JIN F G. Advancement of pathological role of hypoxia-inducible factor 1 in acute lung injury[J]. Int J Respir(国际呼吸杂志), 2019, 39(24): 1885-1889.
- [14] YADAVALLI C S, UPPARAHALLI VENKATESHAIAH S, KUMAR S, et al. Allergen-induced NLRP3/caspase1/IL-18 signaling initiate eosinophilic esophagitis and respective inhibitors protect disease pathogenesis[J]. Communicat Biol, 2023, 6(1): 763.
- [15] YANG Y, LIU P Y, BAO W, et al. Hydrogen inhibits endometrial cancer growth via a ROS/NLRP3/caspase-1/GSDMD-mediated pyroptotic pathway[J]. BMC Cancer, 2020, 20(1): 28.
- [16] LIU Y H, SHANG L R, ZHOU J B, et al. Emodin attenuates LPS-induced acute lung injury by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis signaling pathway *in vitro* and *in vivo*[J]. Inflammation, 2022, 45(2): 753-767.
- [17] YE S M, HU Q H. Research progress on GSDMD-mediated pyroptosis[J]. J Pharm Res(药学研究), 2020, 39(7): 416-419.
- [18] ELLIOTT E I, SUTTERWALA F S. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly[J]. Immunol Rev, 2015, 265(1): 35-52.
- [19] YANG J, ZHAO Y F, ZHANG P, et al. Hemorrhagic shock primes for lung vascular endothelial cell pyroptosis: Role in pulmonary inflammation following LPS[J]. Cell Death Dis, 2016, 7(9): e2363.
- [20] PAN X B, LI X Y, WANG Z X, et al. Progress in the research of NLRP3-(Caspase-1)/IL-1 β signal pathway[J]. China Med Her(中国医药导报), 2019, 16(1): 41-44.
- [21] GAO Z M, SUI J D, FAN R, et al. Emodin protects against acute pancreatitis-associated lung injury by inhibiting NLRP3 inflammasome activation via Nrf2/HO-1 signaling[J]. Drug Des Devel Ther, 2020(14): 1971-1982.
- [22] SUN L B, MA W, GAO W L, et al. Propofol directly induces caspase-1-dependent macrophage pyroptosis through the NLRP3-ASC inflammasome[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(8): 542.
- [23] WEI Q. The relationship between hypoxia inducible factor-1 α and NLRP3 inflammasomes activation in hypoxia/reoxygenation[D]. Nanchang: Nanchang University, 2015.
- [24] QIU Y M, HUANG X W, HE W C. The regulatory role of HIF-1 in tubular epithelial cells in response to kidney injury[J]. Histol Histopathol, 2020, 35(4): 321-330.
- [25] LUO Y L, LIU Y Q, AN F Y, et al. Effects of Dunhuang prescription Daqinglong Decoction on lung injury in rats with altitude hypoxia[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2016, 38(12): 2529-2535.
- [26] WU G, XU G, CHEN D W, et al. Hypoxia exacerbates inflammatory acute lung injury *via* the toll-like receptor 4 signaling pathway[J]. Front Immunol, 2018(9): 1667.
- [27] PAN C Y, WU Y. Expression and significance of NALP3 in the hypoxic lung injury in rats[J]. J Clin Pathol Res(临床与病理杂志), 2015, 35(4): 635-641.
- [28] ZHANG Q Q, ZENG M N, ZHANG B B, et al. Study on the effect and mechanism of chrysosplenol D on inhibiting acute lung injury in mice[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2022, 31(4): 362-368.
- [29] MA A Y, ZHOU J Y, ZHONG R H, et al. The effect of nestorone on pulmonary inflammation in lipopolysaccharides-induced acute lung injury[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2024, 33(2): 159-167.
- [30] ZHANG C, WANG X R, WANG C G, et al. Qingwenzhike prescription alleviates acute lung injury induced by LPS *via* inhibiting TLR4/NF- κ B pathway and NLRP3 inflammasome activation[J]. Front Pharmacol, 2021(12): 790072.

收稿日期: 2022-12-21

(本文责编: 沈倩)