

基于 TLR4/NF- κ B 信号通路研究木犀草素对幼鼠急性肺损伤的作用机制

邹国涛¹, 王英娟², 曾毅文¹, 张伟¹ (1. 重庆医科大学附属永川医院儿科, 重庆 402160; 2. 重庆医科大学附属永川医院急诊科, 重庆 402160)

摘要: **目的** 研究木犀草素对幼鼠急性肺损伤(ALI)的保护作用, 并探究其作用机制。**方法** 将 50 只 SPF 级 SD 幼鼠随机分为 5 组: 正常组, 模型组, 地塞米松组, 木犀草素高、低剂量组, 每组 10 只。除正常组外, 其余各组幼鼠雾化吸入脂多糖(LPS)建立急性肺损伤模型, 正常组大鼠雾化吸入等量生理盐水。模型复制前 3 d 起及模型复制后 1 h, 木犀草素高、低剂量组大鼠分别灌胃 40、20 mg·kg⁻¹ 的木犀草素, 地塞米松组于模型复制前 2 h 注射 5 mg·kg⁻¹ 地塞米松, 正常组和模型组大鼠灌胃等量 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)。模型复制后 12 h, 采用 ELISA 法检测血清及肺泡灌洗液(BALF)中白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和肺组织超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)含量; 检测大鼠肺组织湿干质量比(W/D); HE 染色检测肺组织病理变化; Western Blot 法和 qRT-PCR 法检测肺组织 Toll 样受体 4(TLR4)、核因子 κ B(NF- κ B)p65 蛋白和 mRNA 的表达水平。**结果** 与正常组比较, 模型组血清及 BALF 中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达水平明显升高, W/D 值升高, 肺组织 SOD 活力降低, MDA 含量升高, 肺损伤明显, TLR4、NF- κ B p65 蛋白和 mRNA 的表达水平增加($P < 0.05$)。与模型组比较, 木犀草素降低了血清及 BALF 中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平和 W/D 值, 提高了肺组织 SOD 活力, 降低了 MDA 含量, 肺损伤得到改善, 同时也降低了肺组织中 TLR4、NF- κ B p65 蛋白和 mRNA 的表达水平($P < 0.05$)。**结论** 木犀草素对幼鼠急性肺损伤具有保护作用, 其作用机制与抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路的活化有关。

关键词: 急性肺损伤; 木犀草素; TLR4/NF- κ B 信号通路; 幼鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)05-0661-06

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.05.010

Study on the Mechanism of Luteolin on Acute Lung Injury in Young Rats Based on TLR4/NF- κ B Signaling Pathway

ZOU Guotao¹, WANG Yingjuan², ZENG Yiwen¹, ZHANG Wei¹ (1. Department of Pediatrics, Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China; 2. Emergency Department, Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China)

Abstract: **Objective** To study the protective effect of luteolin on acute lung injury(ALI) in young rats and explore its mechanism. **Methods** 50 SPF SD young rats were randomly divided into 5 groups: normal group, model group, dexamethasone group, luteolin high-dose group and low-dose group, 10 rats in each group. Except for the normal group, young rats in the other groups were used to establish ALI model by atomizing LPS, and the rats in the normal group inhaled the same amount of normal saline. Three days before modeling and 1 hour after modeling, rats in the luteolin high-dose group and low-dose group were given intragastrically 40 mg·kg⁻¹ and 20 mg·kg⁻¹ luteolin, respectively. The dexamethasone group was given a one-time injection of 5 mg·kg⁻¹ dexamethasone 2 h before modeling. Rats in normal group and model group were given 0.5 % carboxymethylcellulose sodium (CMC-Na) by intragastric administration. 12 h after modeling, ELISA method was used to detect the levels of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum and alveolar lavage fluid (BALF),

收稿日期: 2020-10-02

作者简介: 邹国涛, 男, 主治医师, 本科, 研究方向: 小儿疾病。Email: ruoxi1959@163.com。通信作者: 张伟, 男, 副主任医师, 研究方向: 小儿疾病。Email: cth_tml@163.com。

基金项目: 2019 年重庆市教委项目(KJQN201900420)。

superoxide dismutase(SOD) activity and malondialdehyde(MDA) in lung tissues. The wet-to-dry weight ratio (W/D) of rat lung tissues was detected. HE staining was used to detect pathological changes of lung tissues. Western blot and qRT-PCR methods were used to detect the expression levels of toll-like receptor 4 (TLR4), nuclear factor kappa-B (NF- κ B) p65 protein and mRNA in lung tissues. **Results** Compared with normal group, the expression levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the serum and BALF of model group increased significantly, the W/D value increased, the SOD activity of the lung tissues decreased, the MDA content increased, and the lung injury was obvious. The expression levels of TLR4, NF- κ B p65 protein and mRNA increased($P < 0.05$). Compared with model group, luteolin reduced IL-1 β , IL-6, TNF- α levels in serum and BALF, lowered the W/D value, increased lung tissues SOD activity, reduced MDA content, and improved lung injury. It also reduced the expression levels of TLR4, NF- κ B p65 protein and mRNA in lung tissues ($P < 0.05$). **Conclusion** Luteolin has a protective effect on ALI in young rats, and its mechanism is related to the inhibition of the activation of TLR4/NF- κ B signaling pathway.

Keywords: Acute lung injury; luteolin; TLR4/NF- κ B signaling pathway; young rats

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是由各种直接或间接因素导致肺泡上皮细胞及血管内皮细胞受损,造成肺间质及肺泡水肿、呼吸功能不全,严重者可发展为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)^[1]。急性肺损伤是儿科各个年龄组最常见的危害性极大的疾病之一,在新生儿及儿童中的发病率和死亡率极高,儿童 ARDS 病死率可达 40%^[2]。

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),也称为内毒素,作为革兰氏阴性菌细胞壁外壁的主要成分可导致机体炎症和毒性反应,是诱发急性肺损伤的主要原因^[3]。研究^[4]表明,脂多糖诱发的炎症损伤与 Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4)/核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)信号转导途径密切相关。当机体受到脂多糖的刺激后,TLR4 被募集并与其衔接分子结合,从而导致 NF- κ B 活化,产生大量细胞因子如白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等,这些因子可进一步诱发和加重肺损伤。尽管在减轻急性肺损伤方面已取得了较大进展,但在人类尤其是幼儿中急性肺损伤的发病率和病死率仍然较高,因此,寻找新的预防和治疗方法仍是急性肺损伤治疗的关键。

木犀草素是一种存在于多种植物中的天然黄酮类化合物,具有抗炎、抗肿瘤、抗病毒、降尿酸及治疗心血管系统疾病等多种药理作用^[5]。Li 等^[6]研究表明,木犀草素可抑制脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤,减轻肺组织水肿,降低炎症因子水平。

目前,木犀草素对幼鼠急性肺损伤的作用研究较少,其作用机制尚不明了。因此,本研究通过使幼

鼠雾化吸入脂多糖建立急性肺损伤模型,以 TLR4/NF- κ B 信号通路为切入点,观察木犀草素对幼鼠急性肺损伤的保护作用,以期探究其作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 幼年鼠 100 只,4~5 周龄,体质量(100 $\pm$ 10)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2017-0011。饲养条件:室温(22 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,湿度(50 $\pm$ 10)%,每天定时换气,保持 12 h : 12 h 光暗照明,食水不限。研究方案获本院伦理委员会批准。

1.2 药物及试剂 木犀草素(纯度 $\geq$ 98%),大连美仑生物技术公司,批号:20180112;地塞米松磷酸钠注射液,天津天药药业股份有限公司,批号:170123;脂多糖,美国 Sigma-Aldrich 公司,批号:L2630;IL-1 β 、IL-6、TNF- α ELISA 试剂盒,武汉伊莱瑞特生物科技有限公司,批号分别为:E-EL-R0012c、E-EL-R0015c、E-EL-R2856c;SOD、MDA 检测试剂盒,南京建成生物工程研究所有限公司,批号分别为:A001-3-2、A003-1-2;TLR4、NF- κ B p65、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)兔源单克隆抗体及羊抗兔二抗,美国 CST 公司,批号分别为:14358S、8242、5174、7074;RevertAidTM first Strand cDNA Synthesis Kit、SYBR Green Real-Time PCR Master Mixes,美国 Thermo Scientific 公司,批号分别为:K1622、4472903。

1.3 主要仪器 DYCZ-24KS 型双板垂直电泳仪,北京六一仪器厂;7500 型 PCR 仪,美国 Applied Biosystems;IX53 型显微镜,日本奥林巴斯公司;G: BOX 型多功能凝胶成像系统,英国 Syngene 公

司; Multiskan MK3 型酶标仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; TGL16MB 型高速冷冻离心机, 长沙湘智离心机仪器有限公司。

1.4 分组、模型复制及给药方法 将 50 只 SPF 级 SD 幼鼠随机分为正常组、模型组、地塞米松组及木犀草素高、低剂量组, 每组 10 只。根据预实验结果, 模型复制前 3 d 及模型复制后 1 h, 木犀草素高、低剂量组大鼠分别灌胃 40、20 mg·kg⁻¹ 木犀草素(提前用 0.5% CMC-Na 混匀), 正常组和模型组大鼠灌胃等量 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na), 每天 1 次。地塞米松组大鼠于模型复制前 2 h 注射 5 mg·kg⁻¹ 地塞米松。第 4 天进行模型复制, 除正常组大鼠雾化吸入等量生理盐水外, 其余各组均参照相关方法^[7]雾化吸入 5 mg·mL⁻¹ 脂多糖 2 mL 建立急性肺损伤模型。

1.5 收集血清及肺泡灌洗液(BALF) 模型复制后 12 h, 取 5 只大鼠, 以乙醚麻醉并固定, 腹主动脉穿刺取血 3 mL, 置于 4 ℃冰箱中静置 2 h, 于 4 ℃以离心半径 12.5 cm、3 000 r·min⁻¹ 离心, 离心 10 min 后取血清; 取血完成后, 打开大鼠颈部, 分离气管, 在气管上做一 T 形切口, 插入静脉留置针, 用 PBS 缓冲液冲洗 3 次, 收集 BALF, 于 4 ℃以离心半径 12.5 cm、2 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 保存上清。血清及 BALF 均分装在 EP 管中, 放置在 -80 ℃超低温冰箱中保存备用。

1.6 血清及 BALF 中 IL-1β、IL-6、TNF-α 含量的检测 取各组待测血清和 BALF 上清, 按照试剂盒说明书步骤检测血清和 BALF 中 IL-1β、IL-6、TNF-α 的含量。

1.7 肺组织湿干质量比(W/D)的检测 取 5 只大鼠, 分离其右上肺叶用于 W/D 检测, 其余肺组织一部分浸泡于 4% 多聚甲醛中固定用于 HE 染色, 另一部分冻存于 -80 ℃用于试剂盒、qRT-PCR 和 Western Blot 检测。吸水纸擦干肺组织表面水分后称质量, 记为湿质重(W), 肺组织于 80 ℃烘干 24 h 后的质量记录为干质量(D), 湿质量与干质量之比即为 W/D。

1.8 肺组织病理变化检测 取“1.7”项下大鼠肺组织, 置于 4% 多聚甲醛中固定 48 h, 蒸馏水清洗, 然后置于不同浓度的酒精中进行梯度脱水, 制作组织蜡块; 冰上预冷切片, 切片厚度为 4 μm, 二甲苯脱蜡 30 min; 在不同浓度梯度的乙醇溶液中复水, 使用苏木精和伊红染液分别染细胞核和细胞质, 脱水、透明后用中性树胶封片, 置于显微镜下观察各组大鼠肺组织病理变化。

1.9 肺组织 SOD、MDA 含量检测 取“1.7”项下大鼠肺组织, 加入预冷 PBS 缓冲液, 冰上匀浆, 于

4 ℃以离心半径 12.5 cm、10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 取上清, 按照试剂盒说明书步骤检测 SOD 活力和 MDA 含量。

1.10 Western Blot 法检测肺组织 TLR4、NF-κB p65 蛋白表达 取大鼠肺组织, 提取肺组织蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 加入 loading buffer 混匀后煮沸 5 min 使蛋白变性。配置 15% 的分离胶和 5% 的浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 然后电转移至 PVDF 膜上, 5 % 脱脂奶粉封闭 2 h, 分别加入不同的抗稀释液, 稀释比例均为 1:1 000。4 ℃过夜, 洗膜, 滴加发光液, 置凝胶成像系统显影。

1.11 qRT-PCR 法检测肺组织 TLR4、NF-κB p65 mRNA 表达 取大鼠肺组织, 提取组织总 RNA, RevertAid™ first Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒合成 cDNA 作为荧光定量模版。反应体系: dNTPs 0.5 μL+5×Buffer 5 μL+Taq 酶 0.3 μL+MgCl₂ 1.5 μL+cDNA 模板 2 μL+上下游引物分别 1 μL, 加去离子水至总体积 25 μL。反应条件: 95 ℃预变性 5 min, 95 ℃变性 30 s、62 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 30 s, 重复 40 个循环; 最后 72 ℃延伸 10 min, 4 ℃5 min 终止反应。实验重复 3 次。采用 2^{-ΔΔCT} 法计算目的基因 mRNA 相对表达水平。实验引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计和合成。引物序列见表 1。

表 1 基因引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
TLR4	CTGGGTGAGAAAGCTGGTAA	AGCCTTCCTGGATGATGTGG
NF-κB p65	CCAAAGAAGGACACGACAGAATC	GGCAGGCTATTGCTCATCACA
GAPDH	TGCTTCACCACTTCTTGA	TCACCATCTTCCAGGAGC

1.12 统计学处理方法 应用 SPSS 25.0 统计软件分析数据, 实验重复 3 次。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多样本比较采用单因素方差分析, 两样本比较采用 SNK-q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清及 BALF 中 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平比较 见表 2。与正常组比较, 模型组大鼠的血清及 BALF 中 IL-1β、IL-6、TNF-α 表达水平明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较, 地塞米松组及木犀草素高、低剂量组大鼠的血清及 BALF 中 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平均降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

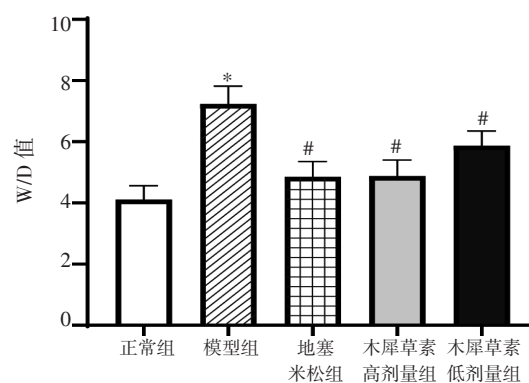
表2 各组大鼠血清及 BALF 中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平比较($\bar{x} \pm s$, $n=5$)Table 2 Comparison of IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels in serum and BALF($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	血清/(ng·mL ⁻¹)			BALF/(ng·mL ⁻¹)		
	IL-1 β	IL-6	TNF- α	IL-1 β	IL-6	TNF- α
正常组	4.30 $\pm$ 0.42	21.40 $\pm$ 1.15	25.35 $\pm$ 2.01	3.18 $\pm$ 0.30	18.35 $\pm$ 1.99	19.31 $\pm$ 1.62
模型组	6.34 $\pm$ 0.48 [*]	27.21 $\pm$ 1.56 [*]	33.12 $\pm$ 2.56 [*]	5.24 $\pm$ 0.42 [*]	22.15 $\pm$ 2.06 [*]	23.50 $\pm$ 1.98 [*]
地塞米松组	5.12 $\pm$ 0.40 [#]	22.89 $\pm$ 1.29 [#]	27.92 $\pm$ 2.22 [#]	3.86 $\pm$ 0.35 [#]	19.02 $\pm$ 1.87 [#]	21.12 $\pm$ 2.01 [#]
木犀草素高剂量组	5.20 $\pm$ 0.45 [#]	23.45 $\pm$ 1.34 [#]	28.24 $\pm$ 2.67 [#]	3.91 $\pm$ 0.29 [#]	19.23 $\pm$ 1.98 [#]	21.29 $\pm$ 2.18 [#]
木犀草素低剂量组	5.88 $\pm$ 0.51 [#]	25.19 $\pm$ 1.58 [#]	31.57 $\pm$ 2.49 [#]	4.63 $\pm$ 0.37 [#]	21.14 $\pm$ 2.15 [#]	22.43 $\pm$ 1.88 [#]

注: 与正常组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$

2.2 肺组织 W/D 值比较 见图 1。与正常组比较, 模型组大鼠肺组织 W/D 值明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较, 地塞米松组及木犀草素高、低剂量组大鼠肺组织 W/D 值降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 肺组织病理变化比较 见图 2。HE 染色结果显示, 正常组大鼠肺组织结构清晰、完整, 无炎性细胞浸润; 与正常组比较, 模型组大鼠肺组织结构紊乱, 肺泡壁增厚、肺间质充血水肿, 有大量炎症细胞浸润; 与模型组比较, 地塞米松组及木犀草素高剂量组大鼠肺组织增生、水肿和充血情况明显减轻, 炎性细胞浸润减少, 但木犀草素低剂量组仍有较多的炎性细胞浸润及部分肺泡壁增厚、肺间质充血水肿现象。



注: 与正常组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$

图1 各组大鼠肺组织 W/D 值比较($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 1 Comparison of W/D values of rat lung tissues in each group($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

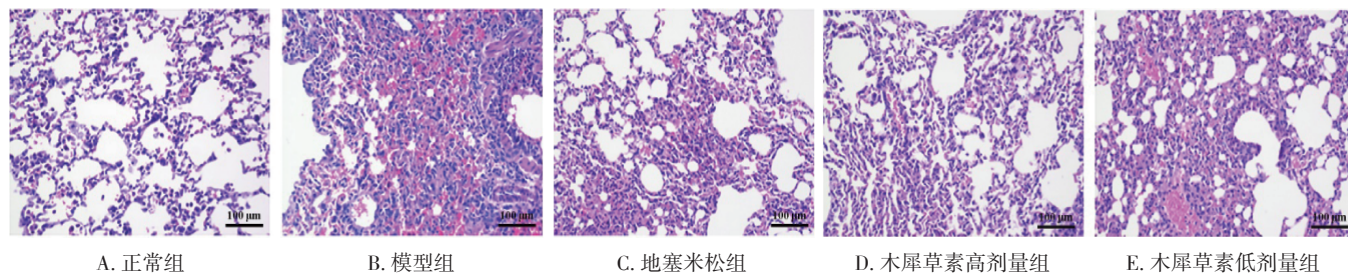
图2 各组大鼠肺组织病理变化比较(HE 染色, $\times 200$)

Figure 2 Comparison of pathological changes of rat lung tissues in each group(HE staining, $\times 200$)

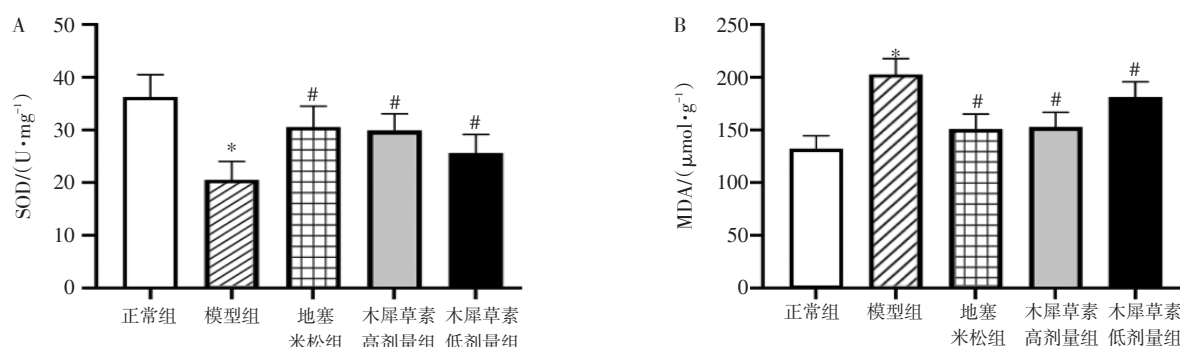
2.4 肺组织 SOD、MDA 含量比较 见图 3。与正常组比较, 模型组大鼠肺组织 SOD 活力降低, MDA 含量升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较, 地塞米松组及木犀草素高、低剂量组大鼠肺组织 SOD 活力升高, MDA 含量降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 肺组织 TLR4、NF- κ B p65 蛋白表达比较 见图 4。与正常组比较, 模型组大鼠肺组织 TLR4、NF- κ B p65 蛋白表达水平增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较, 地塞米松组及木犀草素

高、低剂量组大鼠肺组织 TLR4、NF- κ B p65 蛋白表达水平降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.6 肺组织 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 表达比较

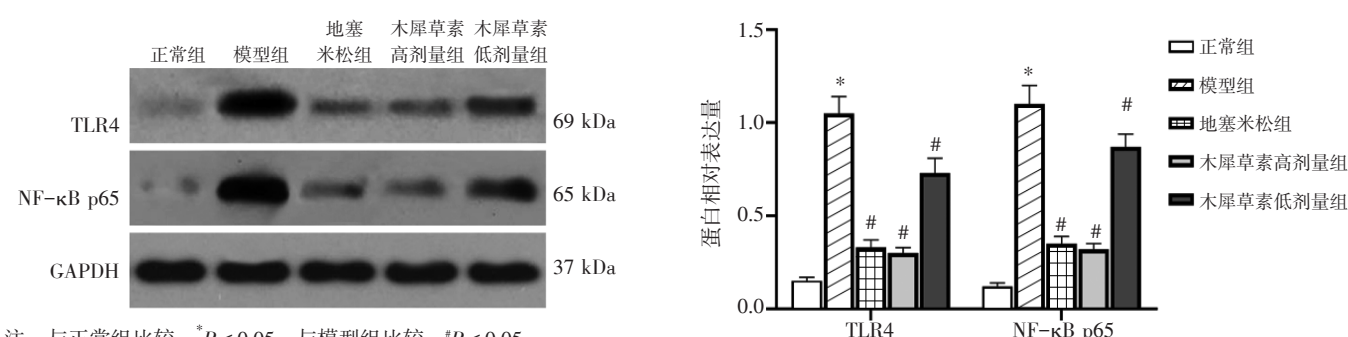
见图 5。与正常组比较, 模型组大鼠肺组织 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 表达水平均增加, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与模型组比较, 地塞米松组及木犀草素高、低剂量组大鼠肺组织 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 表达水平均降低, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。



注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$

图 3 各组大鼠肺组织 SOD、MDA 含量比较($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

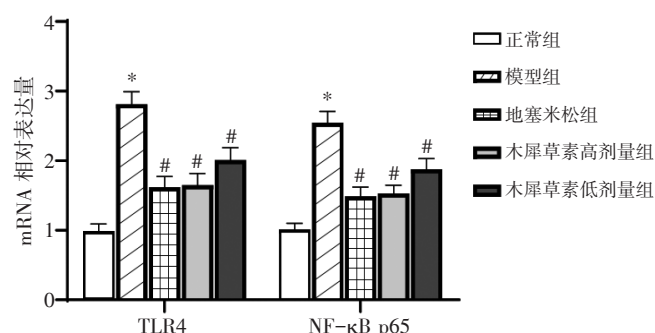
Figure 3 Comparison of SOD and MDA content of rat lung tissues in each group($\bar{x} \pm s$, $n=5$)



注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$

图 4 各组大鼠肺组织 TLR4、NF-κB p65 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 4 Comparison of TLR4 and NF-κB p65 protein expression of rat lung tissues in each group($\bar{x} \pm s$, $n=5$)



注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$

图 5 各组大鼠肺组织 TLR4、NF-κB p65 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 5 Comparison of TLR4 and NF-κB p65 mRNA expression of rat lung tissues in each group($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

3 讨论

急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征(ARDS)是因急性、过度炎性刺激导致肺泡腔和肺实质受损的临床危重疾病，其主要特征为弥漫性肺泡毛细血管受损，血管通透性增加及肺水肿^[8]。在急性肺损伤众多发病原因中，革兰氏阴性杆菌感染是引起急性肺损伤较为常见的因素之一。脂多糖是革兰氏阴性菌细胞壁外壁的主要成分，也是急性肺损伤最主要的致病因素^[9]。目前，急性肺损伤的临床治疗包括控制原发病、呼吸支持疗法和糖皮质激素等药物治疗，虽然人们对急性肺损伤的研究逐渐深入，但其在成人和儿童群体中的病死率依然较高^[10]。木犀草素是一种天然黄酮类化合物。Xiong 等^[11]研究显示，木犀草素可通过抑制炎症和氧化应激损伤保护和改善重症胰腺炎小鼠肺损伤的发生和发展。孙力超等^[12]发现，采用木犀草素预处理可通过抗炎和抗氧化作用抑制脓毒症相关急性肺损伤，是脓毒症诱导的急性肺损伤的潜在治疗药物。在本研究中，我们采用雾化吸入脂多糖建立幼鼠急性肺损伤模型，观察木犀草素对幼鼠急性肺损伤的保护作用，探究其作用机制。

肺损伤是临床急性呼吸衰竭的重要因素，目前比较公认的病因是肺内炎症因子释放增加，损伤肺泡上皮细胞和血管内皮细胞，触发氧化应激反应，导致肺功能受损，进而发展为呼吸衰竭^[13]。余洁等^[14]研究发现，木犀草素可抑制哮喘患儿外周血炎症细胞因子 IL-6 和 TNF-α 的分泌，其作用与调控 TLR4/NF-κB 信号通路有关。在本研究中，我们发现模型组血清及 BALF 中 IL-1β、IL-6、TNF-α 表达水平明显高于正常组，而木犀草素能够降低血清及 BALF 中 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平，初步表明木犀草素能

够抑制幼鼠急性肺损伤的炎症反应,减少炎症因子释放。另外,脂多糖诱导的急性肺损伤还可出现肺组织结构模糊,并伴有水肿和炎症浸润等现象^[15]。本研究结果显示,模型组 W/D 值明显高于正常组,而木犀草素可降低 W/D 值。另外,HE 染色显示正常组大鼠肺组织结构清晰、完整,无炎性细胞浸润;模型组大鼠则有明显的肺组织损伤现象,肺组织有大量炎症细胞浸润。与模型组比较,木犀草素高剂量组可明显改善肺组织增生、水肿和充血情况,减轻肺组织炎性细胞浸润,但木犀草素低剂量组仍有较多的炎性细胞浸润及部分肺泡壁增厚、肺间质充血水肿现象。上述研究结果表明,一定剂量的木犀草素可明显改善脂多糖诱导的幼鼠肺组织损伤。

在肺损伤中,氧化应激是一个基本病理过程,伴随大量的炎症因子释放和活性氧产生^[16]。研究^[17-18]表明,木犀草素在糖尿病、哮喘等多种疾病模型中具有减轻氧化应激反应的作用,从而保护组织免受氧化应激损伤。与上述研究结果一致,在本研究中,与正常组比较,模型组 SOD 活力降低,MDA 含量升高,而木犀草素能够提高 SOD 活力,降低 MDA 含量,表明木犀草素能够保护肺组织,减轻脂多糖诱导的氧化应激损伤。TLR4 是一种细胞膜表面受体,通过识别病原体细胞壁的保守成分诱发机体炎症免疫反应,经典的 TLR4/NF- κ B 信号通路则主要参与到细胞对脂多糖的识别并活化 TLR4 下游信号通路^[19]。研究^[20-21]表明,木犀草素可通过调控 TLR4/NF- κ B 信号通路减轻急性痛风性关节炎的炎症反应,也可通过该信号通路减轻脑出血后的神经炎症。因此,我们猜测木犀草素可能通过调控 TLR4/NF- κ B 信号通路改善脂多糖诱导的急性肺损伤。本研究结果显示,模型组 TLR4、NF- κ B p65 蛋白和 mRNA 表达水平明显高于正常组,而木犀草素能够降低 TLR4、NF- κ B p65 蛋白和 mRNA 表达水平,表明木犀草素能够抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路的活化,降低该信号通路的蛋白和 mRNA 表达水平。

综上所述,木犀草素能够降低脂多糖诱导的急性肺损伤的炎症反应和氧化应激损伤,改善肺组织病理学改变,其作用机制可能与抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路的活化有关。

参考文献:

- [1] MOWERY N T, TERZIAN W T H, NELSON A C. Acute lung injury[J]. *Curr Probl Surg*, 2020, 57(5): 100777.
- [2] VILLAR J, BLANCO J, KACMAREK R M. Current incidence and outcome of the acute respiratory distress syndrome[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2016, 22(1): 1-6.
- [3] KOLOMAZNIK M, NOVA Z, CALKOVSKA A. Pulmonary surfactant and bacterial lipopolysaccharide: the interaction and its functional consequences[J]. *Physiol Res*, 2017, 66(Suppl 2): S147-S157.
- [4] WANG J, FAN S M, ZHANG J. Epigallocatechin-3-gallate ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by suppression of TLR4/NF- κ B signaling activation[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 3391-3404.
- [5] IMRAN M, RAUF A, ABU-IZNEID T, et al. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: a review[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108612.
- [6] LI Y C, YEH C H, YANG M L, et al. Luteolin suppresses inflammatory mediator expression by blocking the Akt/NF κ B pathway in acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 383608.
- [7] 孙鹏, 李玖军, 刘凯, 等. 骨髓间充质干细胞对幼鼠急性肺损伤模型肺组织病理学改变及肺组织白细胞介素6和8表达的影响[J]. *中国小儿急救医学*, 2018, 25(8): 624-629.
- [8] MÁCA J, JOR O, HOLUB M, et al. Past and present ARDS mortality rates: a systematic review[J]. *Respir Care*, 2017, 62(1): 113-122.
- [9] NOVA Z, SKOVIEROVA H, CALKOVSKA A. Alveolar-capillary membrane-related pulmonary cells as a target in endotoxin-induced acute lung injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(4): 831.
- [10] PETRUCCI N, DE FEO C. Lung protective ventilation strategy for the acute respiratory distress syndrome[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013, 2013(2): CD003844.
- [11] XIONG J, WANG K, YUAN C, et al. Luteolin protects mice from severe acute pancreatitis by exerting HO-1-mediated anti-inflammatory and antioxidant effects[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(1): 113-125.
- [12] 孙力超, 陈旭, 姚尧, 等. 木犀草素对脓毒症小鼠急性肺损伤的保护作用[J]. *中华急诊医学杂志*, 2019, 3(6): 717-723.
- [13] 陈艳, 董良, 朱昭琼. 急性肺损伤治疗措施的研究进展[J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(1): 157-161.
- [14] 余洁, 彭哲, 谢婷, 等. 木犀草素对哮喘患儿外周血单核细胞 TNF- α 和 IL-6 分泌的影响及机制研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(13): 1580-1583, 1589.
- [15] 罗艳, 李清香, 杨洁, 等. 罗格列酮通过降低 IL-17 减轻 LPS 诱导的新生大鼠急性肺损伤[J]. *免疫学杂志*, 2019, 35(12): 1074-1080.
- [16] PEREZ M, ROBBINS M E, REVHAUG C, et al. Oxygen radical disease in the newborn, revisited: oxidative stress and disease in the newborn period[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 142: 61-72.
- [17] KIM A, LEE W, YUN J M. Luteolin and fisetin suppress oxidative stress by modulating sirtuins and forkhead box O3a expression under in vitro diabetic conditions[J]. *Nutr Res Pract*, 2017, 11(5): 430-434.
- [18] 邹华, 王颖, 秦晓宇, 等. 木犀草素通过抗氧化应激和抑制 COX-2 信号通路抑制哮喘幼鼠气道炎症[J]. *解剖科学进展*, 2019, 25(6): 634-636.
- [19] 宋瑜婷, 彭彬, 王莹, 等. TLR4/MD2/NF- κ B 信号通路与研究进展[J]. *免疫学杂志*, 2020, 36(7): 633-638.
- [20] 沈瑞明, 马丽辉, 郑颜萍. 木犀草素通过 TLR/MyD88/NF- κ B 通路参与急性痛风性关节炎大鼠的抗炎作用[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2020, 45(2): 115-122.
- [21] YANG Y, TAN X, XU J, et al. Luteolin alleviates neuroinflammation via downregulating the TLR4/IRAF6/NF- κ B pathway after intracerebral hemorrhage[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 126: 110044.

(编辑: 修春)