

半夏提取物调控TNF- α /NOX2通路对巨噬细胞极化及细支气管炎小鼠肺损伤的影响

毕静贤¹ 李珊^{1*} 任思维² 向江屿³ 高其佳² 吴健翔¹

(¹长沙医学院第一临床学院, 长沙 410000; ²长沙医学院医学影像学院, 长沙 410000;

³长沙医学院医学检验学院, 长沙 410000)

摘要 该文旨在研究半夏提取物调控TNF- α /NADPH氧化酶2(NOX2)通路对巨噬细胞极化及细支气管炎小鼠肺损伤的影响。取BALB/c小鼠于两侧鼻内滴入呼吸道合胞病毒(RSV)混悬液建立细支气管炎模型, 并将其随机分为模型组、半夏提取物组、半夏提取物+pc-NC组、半夏提取物+pc-TNF- α 组, 每组10只, 另取10只BALB/c小鼠于两侧鼻内滴入等量生理盐水设为对照组, 干预治疗后检测各组小鼠肺功能指标气道阻力(Raw)、用力肺活量(FVC)和肺泡灌洗液(BALF)中炎性细胞数; 以HE、过碘酸希夫(PAS)染色分别检测各组小鼠肺组织病理形态; 以流式细胞实验测定各组小鼠巨噬细胞极化; 以ELISA法检测各组小鼠BALF与血清中炎症相关因子水平; 以一步法实时荧光定量PCR(RT-qPCR)和免疫印迹法检测各组小鼠肺组织TNF- α /NOX2与巨噬细胞极化相关蛋白表达情况。结果显示, 与对照组相比, 模型组小鼠肺组织发生明显病理损伤, 炎性细胞数、Raw、炎症评分、黏液分泌评分、M1型巨噬细胞比例, 血清中IL-6与TNF- α 水平以及小鼠肺组织TNF- α 、NOX2与iNOS表达水平显著升高($P<0.05$), FVC、M2型巨噬细胞比例和血清中TGF- β 、IL-10水平以及小鼠肺组织ARG-1表达水平显著降低($P<0.05$)。与模型组比较, 半夏提取物组小鼠肺组织病理损伤减轻, 炎性细胞数、Raw、炎症评分、黏液分泌评分、M1型巨噬细胞比例和血清中IL-6与TNF- α 水平, 小鼠肺组织TNF- α 、NOX2与iNOS表达水平降低($P<0.05$), FVC、M2型巨噬细胞比例和血清中TGF- β 、IL-10水平以及小鼠肺组织ARG-1表达水平升高($P<0.05$); 半夏提取物+pc-NC组小鼠各指标无明显变化($P>0.05$)。与半夏提取物组比较, 半夏提取物+pc-TNF- α 组小鼠肺组织病理损伤加重, 炎性细胞数、Raw、炎症评分、黏液分泌评分、M1型巨噬细胞比例, 血清中IL-6与TNF- α 水平以及小鼠肺组织TNF- α 、NOX2与iNOS表达水平显著升高($P<0.05$), FVC、M2型巨噬细胞比例和血清中TGF- β 、IL-10水平以及小鼠肺组织ARG-1表达水平降低($P<0.05$)。半夏提取物可通过阻止TNF- α /NOX2信号通路激活而促进巨噬细胞M2型极化, 抑制其M1型极化, 进而抑制细支气管炎小鼠体内与肺部炎症反应, 最终减轻其肺损伤。

关键词 半夏提取物; TNF- α /NOX2; 巨噬细胞极化; 细支气管炎; 肺损伤

Effects of *Rhizoma Pinelliae* Extract on Macrophage Polarization and Lung Injury in Bronchiolitis Mice by Regulating the TNF- α /NOX2 Pathway

BI Jingxian¹, LI Shan^{1*}, REN Siwei², XIANG Jiangyu³, GAO Qijia², WU Jianxiang¹

(¹The First Clinical College, Changsha Medical College, Changsha 410000, China; ²School of Medical Imaging, Changsha Medical University, Changsha 410000, China; ³College of Laboratory Medicine, Changsha Medical University, Changsha 410000, China)

收稿日期: 2024-10-09

接受日期: 2024-12-24

2023年度湖南省大学生创新创业训练计划一般项目(批准号: 20234073)资助的课题

*通信作者: Tel: 15200860629, E-mail: 898376442@qq.com

Received: October 9, 2024

Accepted: December 24, 2024

This work was supported by the General Project of Hunan Province College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program in 2023 (Grant No.20234073)

*Corresponding author. Tel: +86-15200860629, E-mail: 898376442@qq.com

Abstract This study was aimed to investigate the effects of *Rhizoma Pinelliae* extract on macrophage polarization and lung injury in mice with bronchiolitis by regulating the TNF- α /NOX2 (NADPH oxidase 2) pathway. BALB/c mice were intranasal instilled with RSV (respiratory syncytial virus) suspension on both sides to establish a bronchiolitis model, they were randomly separated into model group, *Rhizoma Pinelliae* extract group, *Rhizoma Pinelliae* extract+pc-NC group, and *Rhizoma Pinelliae* extract+pc-TNF- α group, with 10 mice in each group. Additionally, 10 BALB/c mice were intranasal instilled with an equal amount of normal saline as the control group. After intervention treatment with *Rhizoma Pinelliae* extract and pc-NC, pc-TNF- α plasmids, lung function indicators such as Raw (airway resistance), FVC (forced vital capacity), and inflammatory cell count in BALF (bronchoalveolar lavage fluid) were detected in each group. HE and PAS (periodic acid Schiff) staining were applied to detect the pathological morphology of lung tissue in each group. Flow cytometry experiments were applied to determine macrophage polarization in various groups. ELISA method was applied to detect the levels of inflammation related factors in BALF and serum of mice in each group. RT-qPCR (quantitative Real-time PCR) and immunoblotting were applied to detect the expression of TNF- α /NOX2 and macrophage polarization related proteins in lung tissues of mice in each group. The results showed that, compared with the control group, the lung tissue of mice in the model group exhibited obvious pathological damage, the number of inflammatory cells, Raw, inflammation score, mucus secretion score, M1 macrophage proportion, levels of IL-6 and TNF- α in serum, expressions of TNF- α , NOX2 and iNOS in mouse lung tissue were obviously increased ($P<0.05$), while FVC, M2 macrophage proportion, and TGF- β , IL-10, ARG-1 expression in mouse lung tissue were obviously decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the lung tissue pathological damage of mice in the *Rhizoma Pinelliae* extract group was reduced, the number of inflammatory cells, Raw, inflammation score, mucus secretion score, M1 macrophage proportion, levels of IL-6 and TNF- α in serum, expressions of TNF- α , NOX2 and iNOS in mouse lung tissue were decreased ($P<0.05$), while FVC, M2 macrophage proportion, while FVC, M2 macrophage proportion, and TGF- β , IL-10, ARG-1 expression in mouse lung tissue were obviously increased ($P<0.05$); there were no obvious changes in various indicators of mice in the *Rhizoma Pinelliae* extract+pc-NC group ($P>0.05$). Compared with the *Rhizoma Pinelliae* extract group, the mice in the *Rhizoma Pinelliae* extract+pc-TNF- α group showed aggravated lung tissue pathological damage, the number of inflammatory cells, Raw, inflammation score, mucus secretion score, M1 macrophage proportion, levels of IL-6 and TNF- α in serum, expressions of TNF- α , NOX2 and iNOS in mouse lung tissue were increased ($P<0.05$), while FVC, M2 macrophage proportion, while FVC, M2 macrophage proportion, and TGF- β , IL-10, ARG-1 expression in mouse lung tissue were obviously decreased ($P<0.05$). *Rhizoma Pinelliae* extract can promote M2 polarization of macrophages and inhibit M1 polarization by blocking the activation of the TNF- α /NOX2 signaling pathway, thereby suppressing inflammation in the body and lungs of bronchiolitis mice and ultimately reducing their lung injury.

Keywords *Rhizoma Pinelliae* extract; TNF- α /NOX2; macrophage polarization; bronchiolitis; lung injury

细支气管炎是临床常见的一种呼吸道感染性疾病,常发生于婴幼儿,呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是其主要病原体,黏液分泌增多、气道炎症是该病的主要病理特点,可显著提升患儿罹患哮喘的风险^[1-2]。RSV感染可刺激机体产生严重炎症,造成肺损伤,而肺泡巨噬细胞在上述病理过程中起到关键作用,其M1、M2极化水平与细支气管炎疾病严重程度密切相关,有研究显示,抑制巨噬

细胞M1型极化并促使其M2型极化,可有效减轻RSV感染引发的肺部炎症和肺损伤^[3-4]。TNF- α /NADPH氧化酶2(NADPH oxidase 2, NOX2)是调控炎症因子表达、炎症反应的发生发展及细胞凋亡等过程的主要信号通路相关蛋白酶之一^[5],参与介导各组肺损伤疾病的发病机制,下调NOX2的表达可通过抑制炎症细胞浸润、促炎细胞因子表达和氧化应激而缓解脂多糖诱导的肺损伤^[6],NOX2缺陷可导致聚六亚甲

基磷酸胍引发的肺组织损伤和肺纤维化减轻^[7], 基于以上研究推测TNF- α /NOX2可能是细支气管炎重要的治疗靶标。半夏(*Rhizoma Pinelliae*)为天南星科植物, 半夏的干燥块茎, 有抗炎、止咳、平喘等药理作用, 中医中常用于化痰止咳平喘^[8], 现代研究表明, 半夏及其炮制品水提取物具有明显的抗炎活性^[9], 可显著降低IL-6、TNF- α 因子表达水平, 且抑制哮喘大鼠气道平滑肌细胞凋亡并促使其增殖^[10], 因而推测半夏提取物可能通过抑制TNF- α /NOX2通路激活来治疗细支气管炎。本文通过构建细支气管炎模型小鼠, 探究半夏提取物调控TNF- α /NOX2通路对其巨噬细胞极化及肺损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

52只BALB/c小鼠(SPF级、18~21 g、雄性、6周龄)自山东博安生物技术股份有限公司采购, 生产许可证号: SCXK(鲁) 2020-0006, 在标准动物房内饲养, 环境条件: 12 h/12 h明暗循环, 温度23~26 °C, 湿度55%~70%, 进食饮水自由。该实验获得长沙医学院伦理委员会审批通过, 批件号为2023KY065。

RSV株、人宫颈癌HeLa细胞, 由ATCC提供。RSV接种在HeLa细胞内进行扩增; HeLa细胞和小鼠肺泡巨噬细胞培养基: 100 U/mL青霉素+DMEM/F12培养基+10%胎牛血清+100 μ g/mL链霉素; 培养条件: 饱和湿度、5% CO₂、37 °C。

1.2 主要试剂与仪器

半夏饮片购自四川新荷花中药饮片股份有限公司; pc-NC、pc-TNF- α 质粒购自广州易锦生物技术有限公司; HE染色液、过碘酸希夫(periodic acid Schiff, PAS)染色试剂盒、迪夫快速染色液购自上海联迈生物工程有限公司采购; 一步法实时荧光定量PCR(quantitative Real-time PCR, RT-qPCR)试剂盒购自上海康朗生物科技有限公司; HRP-二抗(小鼠抗兔)、小鼠TNF- α 、TGF- β 、IL-6与IL-10 ELISA试剂盒、小鼠CD11b-FITC、F4/80-PreCP-Cy5.5、CD86-PE、CD206-APC抗体、兔源抗小鼠Anti-TNF- α 、ARG-1、NOX2、GAPDH与iNOS一抗购自英国Abcam公司。

仪器包括: 无创肺功能检测仪(美国DSI Buxco公司, 型号: FinePointe WBP), 低温恒冷切片机(上海辅光精密仪器有限公司, 型号: FPMRC-HIS-2850), 光学显微镜(北京长恒荣创科技有限公司, 型号

UB102i), 垂直电泳系统、酶标仪、转印系统(美国Bio-Rad公司, 型号: Mini-PROTEAN Tetra Cell、iMark、Mini Trans-Blot Module)等。

1.3 制备细支气管炎小鼠模型并分组干预治疗

按照参考文献[11]制备细支气管炎小鼠模型。于39 °C温水浴内快速解冻HeLa细胞, 37 °C下离心(1 000 r/min、 $r=13.5$ cm、10 min)后洗涤细胞, 采用DMEM/F12完全培养基进行复苏、培养、传代, 传至第3代时进行RSV感染, 收集感染后的细胞, -80 °C下反复冻融3次、4 °C下离心(1 000 r/min、 $r=13.5$ cm、10 min), 取上清以空斑法测定病毒滴度, 将其滴度调整为 1×10^6 PFU/mL, 取BALB/c小鼠42只, 于两侧鼻内滴入RSV混悬液100 μ L, 连滴2天且1次/天, 第3天观察小鼠情况, 若出现精神萎靡、活动减少、咳嗽且呼吸急促、口唇、四肢发绀等症状, 提示细支气管炎小鼠模型构建成功, 共成功造模40只, 将其以随机数表法分为模型组、半夏提取物组、半夏提取物+pc-NC组、半夏提取物+pc-TNF- α 组, 每组10只, 另取10只BALB/c小鼠于两侧鼻内滴入等量生理盐水设为对照组。

于第3天开始分组干预治疗小鼠。取半夏饮片加8倍量水煎煮2次, 2 h/次, 煎煮后过滤并合并2次滤液进行减压浓缩, 获得生药量浓度为0.6 g/mL的半夏提取物药液, 采用高效液相色谱法测定其中代表性成分: 肌苷为 0.25 ± 0.07 mg/g, 鸟苷为 2.07 ± 0.11 mg/g, 腺苷为 2.61 ± 0.09 mg/g, 琥珀酸为 4.02 ± 0.28 mg/g, 盐酸麻黄碱为 6.23 ± 0.42 mg/g, 表明半夏提取物制备成功。对半夏提取物组、半夏提取物+pc-NC组、半夏提取物+pc-TNF- α 组小鼠进行灌胃(体积5 mL/kg, 1次/天, 半夏提取物剂量均达到3 g/kg)^[12], 同时对半夏提取物+pc-NC组、半夏提取物+pc-TNF- α 组分组尾静脉注射质粒(溶于生理盐水, 剂量参照说明书设为50 μ g/只, 体积为200 μ L, 2次/天), 而半夏提取物组同时尾静脉注射等剂量生理盐水(2次/天); 对照组和模型组小鼠以等剂量生理盐水替代进行灌胃与尾静脉注射, 各组小鼠均干预治疗2周。

1.4 各组小鼠肺功能、肺组织炎细胞浸润检测及标本采集

于干预治疗结束后24 h采用无创肺功能检测仪检测各组小鼠肺功能, 分析得出其肺功能指标用力肺活量(forced vital capacity, FVC)、气道阻力(airway resistance, Raw)具体数值。

肺功能检测后以浸有乙醚的棉球对各组小鼠进行麻醉,眼眶取血,4℃下离心(2 000 r/min、 $r=13.5\text{ cm}$ 、10 min),取上清得各组血清样本,于-80℃保存备检。

脱颈处死小鼠后开胸暴露肺脏,用注射器吸取1 mL生理盐水,自气管注入小鼠左肺,对其来回灌洗3次后,4℃下离心(1 500 r/min、 $r=13.5\text{ cm}$ 、10 min)洗液,取上清得各组肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)样本,于-80℃保存备检;对离气管底部遗留的细胞用PBS重悬后,取出一半行迪夫快速染色、固定处理后,以血细胞计数器计数其中炎性细胞数;剩余一半细胞悬液以同样方法离心后,用DMEM/F12培养基进行培养获得各组小鼠原代肺泡巨噬细胞,将其密度调整为 1×10^7 个/mL。

分离各组小鼠右肺并取下约360 mg肺组织,加入RAPI裂解液于冰水浴内进行研磨匀浆、离心(4℃、3 000 r/min、 $r=13.5\text{ cm}$ 、15 min)后提取各组总蛋白,经BCA法定量蛋白样品浓度后将其存于-80℃备检;取约200 mg右肺组织存在液氮内;再次取约1 cm×1 cm×1 cm大小的肺组织,预冷生理盐水漂洗、液氮速冻、OCT包埋后用低温恒冷切片机切片(厚约5 μm)备检。

1.5 各组小鼠肺组织病理变化检测

肺组织冰冻切片于室温下复温后,浸没在预冷(4℃)丙酮内固定2 h,取出洗涤后分别行HE、PAS染色,洗片、封固、镜下观察、拍摄图像,对HE染色图像根据气道周围炎细胞浸润情况做炎症评分,分5级进行评分^[11]:无细胞浸润、少量炎细胞浸润、炎细胞形成环状且有1个细胞层深、炎细胞形

成环状且有2~4个细胞层深、炎细胞形成环状且超过4个细胞层深,依次评为0、1、2、3、4分;对PAS染色图像根据染色面积大小做黏液分泌评分,分5级进行评分^[11]:小于5%、5%~25%、26%~50%、51%~75%、大于75%,依次评为0、1、2、3、4分。

1.6 各组小鼠巨噬细胞极化检测

取各组小鼠原代肺泡巨噬细胞悬液,以4%多聚甲醛在37℃下固定30 min后依次加入小鼠CD11b-FITC、F4/80-PreCP-Cy5.5、CD86-PE、CD206-APC抗体(稀释比例为1:2 000),4℃下黑暗环境中各孵育10 min,依次洗涤后上机于流式细胞仪内检测各组M1、M2型巨噬细胞比例,M1型巨噬细胞为CD11b、F4/80、CD86阳性且CD206阴性的细胞,M2型巨噬细胞为CD11b、F4/80、CD206阳性且CD86阴性的细胞。

1.7 各组小鼠BALF与血清中炎症相关因子水平检测

取存在-80℃的各组小鼠BALF与血清,4℃下解冻后每组各取0.45 mL BALF与0.45 mL血清,以ELISA法于酶标仪中测定两者中IL-6、TNF-α、TGF-β与IL-10水平,具体按照ELISA试剂盒操作说明进行检测。

1.8 各组小鼠肺组织*TNF-α*/*NOX2*与巨噬细胞极化相关蛋白mRNA表达水平检测

取存在液氮内的右肺组织,提取总RNA后进行RT-qPCR反应测定各组*TNF-α*、*NOX2*、*ARG-1*、*iNOS* mRNA表达情况,按一步法RT-qPCR试剂盒操作说明进行测定,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法分析数据,以*GAPDH*作为内参对照归一化各基因相对表达,引物序列见表1。

表1 各基因引物序列
Table 1 Primer sequences for each gene

基因名称 Gene name	方向 Direction	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
<i>TNF-α</i>	F	TAG CCC ACG TCG TAG CAA AC
	R	GCA GCC TTG TCC CTT GAA GA
<i>NOX2</i>	F	CTA CCT AAG ATA GCA GTT GA
	R	CTA ACA TCA CCA CCT CAT A
<i>ARG-1</i>	F	GCT GGT CTG CTG GAA AAA CTT
	R	AGG GGA GTG TTG ATG TCA GTG T
<i>iNOS</i>	F	GTT CTC AGC CCA ACA ATA CAA GA
	R	GTG GAC GGG TCG ATG TCA C
<i>GAPDH</i>	F	ACG GCC GCA TCT TCT TGT GCA
	R	ACG GCC AAA TCC GTT CAC ACC

1.9 各组小鼠肺组织TNF- α /NOX2与巨噬细胞极化相关蛋白表达水平检测

取存在-80 °C的各组小鼠肺组织蛋白样品液,煮沸变性其中蛋白,以每组20 μ g蛋白样本量进行上样电泳、全湿电转,在37 °C下封闭各组电转印后的蛋白,然后将各组TNF- α 、GAPDH、NOX2、ARG-1与iNOS蛋白条带剪下后分别孵育一抗、二抗。一抗孵育:4 °C过夜,稀释比例[TNF- α (1:2 000)、GAPDH(1:3 000)、NOX2(1:1 000)、ARG-1(1:2 500)、iNOS(1:2 000)];二抗孵育:室温2 h,稀释比例(1:1 000),显色后拍摄各组蛋白条带图片,用Image-Pro Plus软件量化各组TNF- α 、NOX2、ARG-1与iNOS蛋白相对表达(GAPDH蛋白为内参对照)。

1.10 数据分析

本实验数据采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计学分析,以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间多重差异比较采用单因素方差分析,组间两两差异进一步比较采用SNK- q 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 半夏提取物对各组小鼠肺功能、肺组织炎性细胞浸润的影响

与对照组相比,模型组小鼠BALF中炎性细胞数、Raw显著升高($P<0.05$),FVC显著降低($P<0.05$),提示细支气管炎小鼠模型构建成功。与模型组比较,半夏提取物组小鼠BALF中炎性细胞数、Raw降低($P<0.05$),FVC升高($P<0.05$),提示半夏提取物可减轻细支气管炎小鼠炎性细胞浸润程度并改善其肺功能。与半夏提取物组比较,半夏提取物+pc-TNF- α 组

小鼠BALF中炎性细胞数、Raw升高($P<0.05$),FVC降低($P<0.05$);半夏提取物+pc-NC组小鼠BALF中炎性细胞数、Raw、FVC无明显变化($P>0.05$),提示过表达TNF- α 可减弱半夏提取物对细支气管炎小鼠的上述药理作用。见表2。

2.2 半夏提取物对各组小鼠肺组织病理形态的影响

对照组小鼠肺组织形态正常、无病理损伤。模型组小鼠肺组织发生明显病理损伤:肺泡破损并发生融合,肺组织和支气管周围有大量炎症细胞浸润,杯状细胞明显增生并伴有大量黏液分泌,炎症评分和黏液分泌评分相比对照组显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,半夏提取物组小鼠肺组织病理损伤减轻,炎症评分和黏液分泌评分降低($P<0.05$),提示半夏提取物可减轻细支气管炎小鼠肺组织病理损伤。与半夏提取物组比较,半夏提取物+pc-TNF- α 组小鼠肺组织病理损伤加重,炎症评分和黏液分泌评分升高($P<0.05$);半夏提取物+pc-NC组小鼠肺组织病理损伤症状无改变、炎症评分和黏液分泌评分无明显变化($P>0.05$),提示过表达TNF- α 可减弱半夏提取物对细支气管炎小鼠的上述药理作用。见图1、图2、表3。

2.3 半夏提取物对各组小鼠巨噬细胞极化的影响

与对照组相比,模型组小鼠M1型巨噬细胞比例显著升高($P<0.05$),M2型巨噬细胞比例显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,半夏提取物组小鼠M1型巨噬细胞比例降低($P<0.05$),M2型巨噬细胞比例升高($P<0.05$),提示半夏提取物可减轻细支气管炎小鼠巨噬细胞M1极化,促进其M2极化。与半夏提取物组比较,半夏提取物+pc-TNF- α 组小鼠M1型巨噬细胞比例升高($P<0.05$),M2型巨噬细胞比例降低($P<0.05$);半夏提取物+pc-NC组小鼠M1、M2型巨

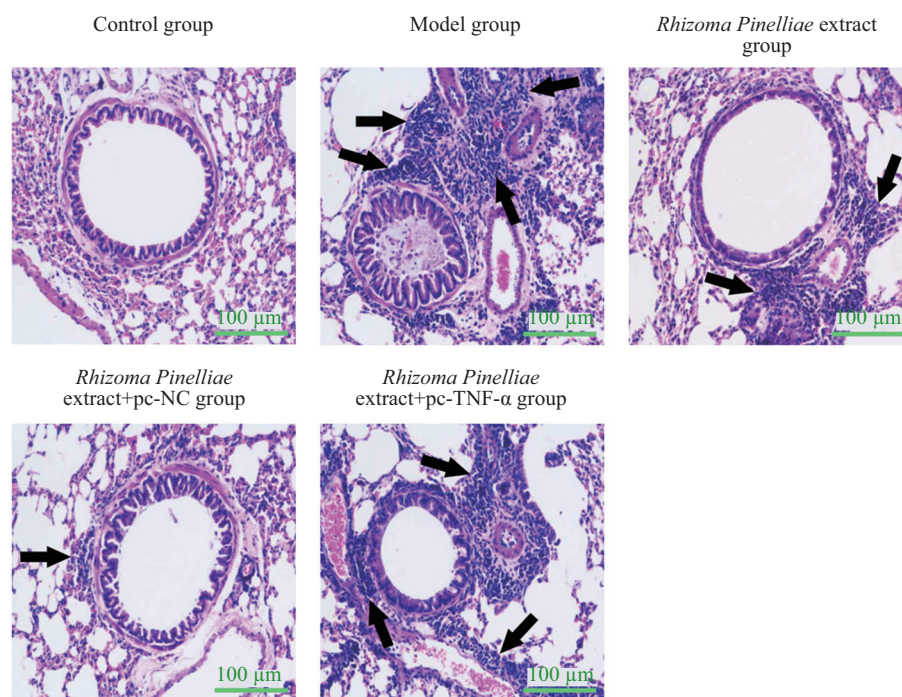
表2 各组小鼠BALF中炎性细胞数、Raw、FVC

Table 2 The number of inflammatory cells in BALF, Raw and FVC of mice in each group

组别 Groups	炎性细胞数/ $10^5\cdot\text{mL}^{-1}$ Number of inflammatory cells / $10^5\cdot\text{mL}^{-1}$	Raw / $\text{kPa}\cdot\text{s}\cdot\text{L}^{-1}$	FVC /mL
Control group	0.81 $\pm$ 0.26	22.93 $\pm$ 4.52	4.94 $\pm$ 0.51
Model group	11.94 $\pm$ 1.13*	68.02 $\pm$ 6.14*	1.78 $\pm$ 0.27*
Rhizoma Pinelliae extract group	1.52 $\pm$ 0.80 [#]	25.14 $\pm$ 4.73 [#]	4.53 $\pm$ 0.46 [#]
Rhizoma Pinelliae extract+pc-NC group	1.23 $\pm$ 0.97	24.53 $\pm$ 6.30	4.27 $\pm$ 0.25
Rhizoma Pinelliae extract+pc-TNF- α group	10.87 $\pm$ 1.09 Δ	63.57 $\pm$ 6.32 Δ	2.01 $\pm$ 0.34 Δ

* $P<0.05$, 对照组vs模型组; [#] $P<0.05$, 模型组vs半夏提取物组; Δ $P<0.05$, 半夏提取物组vs半夏提取物+pc-TNF- α 组。

* $P<0.05$, control group vs model group; [#] $P<0.05$, model group vs Rhizoma Pinelliae extract group; Δ $P<0.05$, Rhizoma Pinelliae extract group vs Rhizoma Pinelliae extract+pc-TNF- α group.



黑色箭头指示炎性细胞。

Black arrows indicate inflammatory cells.

图1 各组小鼠肺组织结构(HE染色)

Fig.1 Lung tissue structure of mice in each group (HE staining)

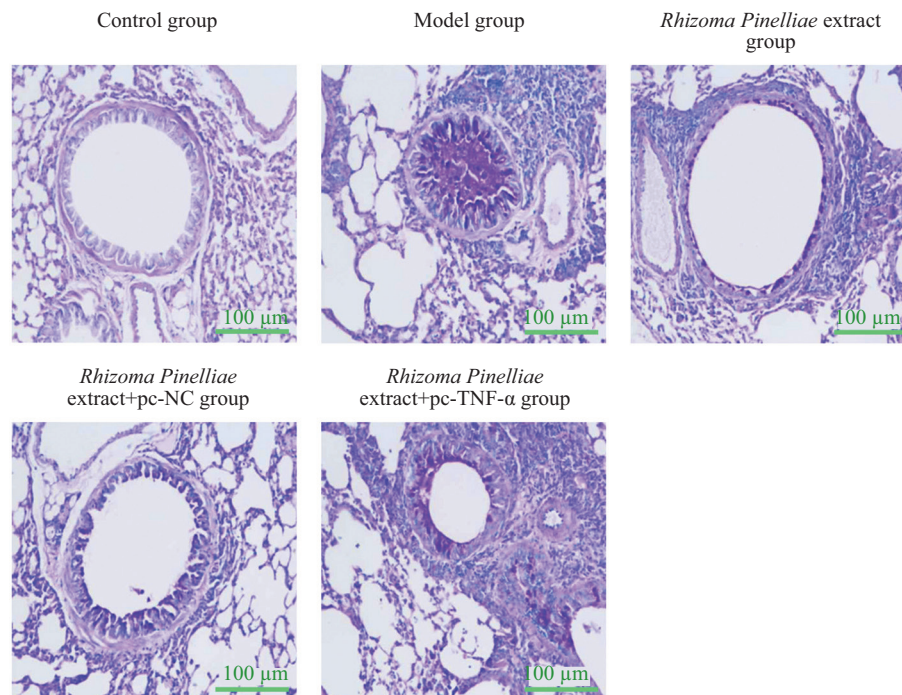


图2 各组小鼠肺组织杯状细胞分泌黏液情况(PAS染色)

Fig.2 Mucus secretion by goblet cells in lung tissue of mice in each group (PAS staining)

噬细胞比例无明显变化($P>0.05$), 提示过表达TNF- α 可减弱半夏提取物对细支气管炎小鼠的上述药理作用。见图3。

2.4 半夏提取物对各组小鼠BALF中炎症相关因子水平的影响

与对照组相比, 模型组小鼠BALF中IL-6、

表3 各组小鼠炎症评分和黏液分泌评分
Table 3 The inflammation score and mucus secretion score of mice in each group

组别 Groups	炎症评分/分 Inflammation score /points	黏液分泌评分/分 Mucus secretion score /points
Control group	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Model group	3.10 $\pm$ 0.36*	2.90 $\pm$ 0.34*
<i>Rhizoma Pinelliae</i> extract group	0.80 $\pm$ 0.40 [#]	0.60 $\pm$ 0.49 [#]
<i>Rhizoma Pinelliae</i> extract+pc-NC group	0.70 $\pm$ 0.47	0.50 $\pm$ 0.50
<i>Rhizoma Pinelliae</i> extract+pc-TNF- α group	2.90 $\pm$ 0.39 Δ	2.60 $\pm$ 0.45 Δ

* $P<0.05$, 对照组vs模型组; [#] $P<0.05$, 模型组vs半夏提取物组; Δ $P<0.05$, 半夏提取物组vs半夏提取物+pc-TNF- α 组。
^{*} $P<0.05$, control group vs model group; [#] $P<0.05$, model group vs *Rhizoma Pinelliae* extract group; Δ $P<0.05$, *Rhizoma Pinelliae* extract group vs *Rhizoma Pinelliae* extract+pc-TNF- α group.

TNF- α 水平显著升高($P<0.05$), BALF中TGF- β 、IL-10水平显著降低($P<0.05$)。与模型组比较, 半夏提取物组小鼠BALF中IL-6、TNF- α 水平降低($P<0.05$), BALF中TGF- β 、IL-10水平升高($P<0.05$), 提示半夏提取物可抑制细支气管炎小鼠炎症因子表达。与半夏提取物组比较, 半夏提取物+pc-TNF- α 组小鼠BALF中IL-6、TNF- α 水平升高($P<0.05$), BALF中TGF- β 、IL-10水平降低($P<0.05$); 半夏提取物+pc-NC组小鼠BALF中IL-6、TNF- α 、TGF- β 、IL-10水平无明显变化($P>0.05$), 提示过表达TNF- α 可减弱半夏提取物对细支气管炎小鼠的上述药理作用。见表4。

2.5 半夏提取物对各组小鼠血清中炎症相关因子水平的影响

与对照组相比, 模型组小鼠血清中IL-6、TNF- α 水平显著升高($P<0.05$), 血清中TGF- β 、IL-10水平显著降低($P<0.05$)。与模型组比较, 半夏提取物组小鼠血清中IL-6、TNF- α 水平降低($P<0.05$), 血清中TGF- β 、IL-10水平升高($P<0.05$), 提示半夏提取物可抑制细支气管炎小鼠炎症因子表达。与半夏提取物组比较, 半夏提取物+pc-TNF- α 组小鼠血清中IL-6、TNF- α 水平升高($P<0.05$), 血清中TGF- β 、IL-10水平降低($P<0.05$); 半夏提取物+pc-NC组小鼠血清中IL-6、TNF- α 、TGF- β 、IL-10水平无明显变化($P>0.05$), 提示过表达TNF- α 可减弱半夏提取物对细支气管炎小鼠的上述药理作用。见表5。

2.6 半夏提取物对各组小鼠肺组织TNF- α /NOX2与巨噬细胞极化相关蛋白表达的影响

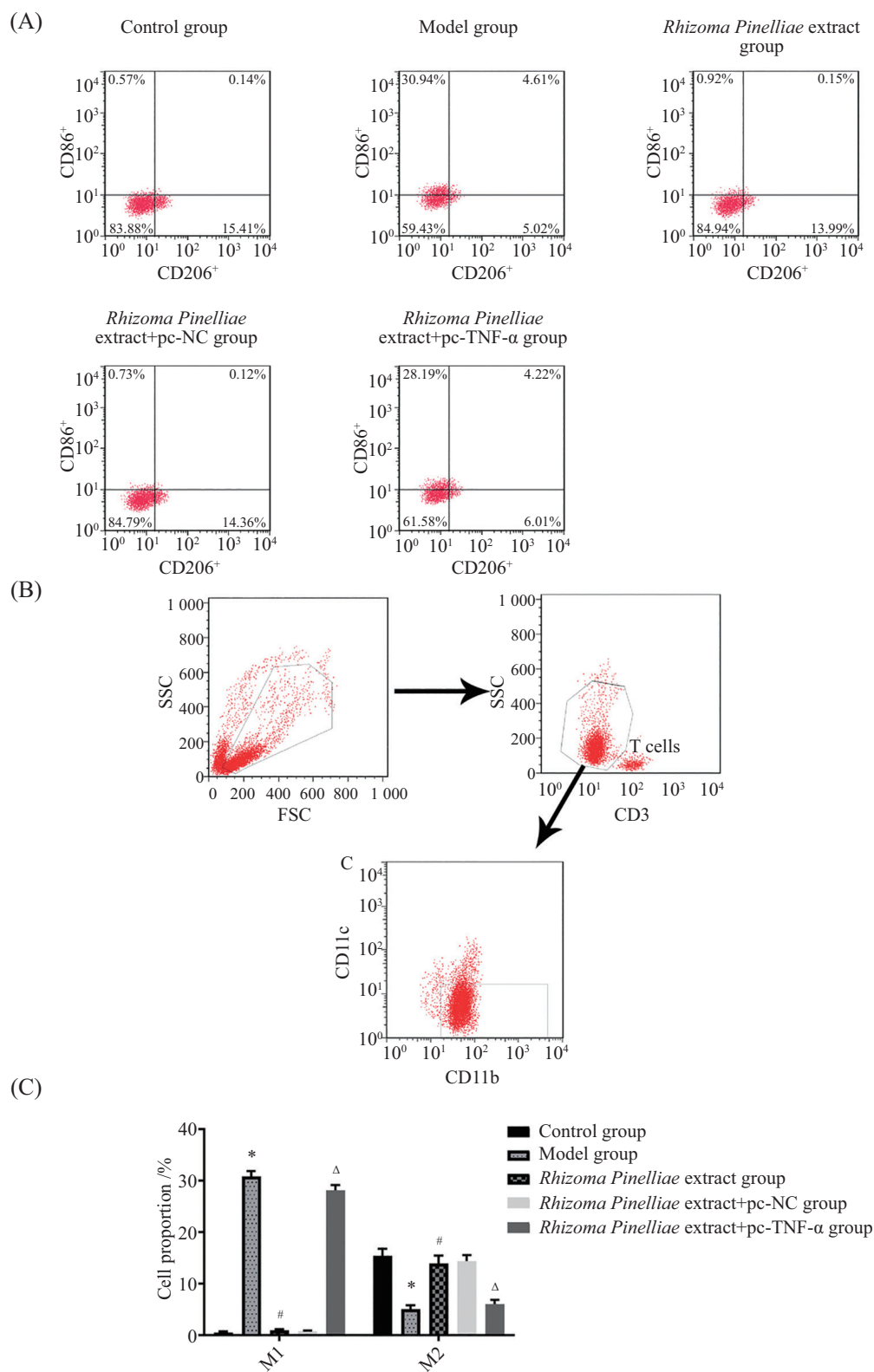
与对照组相比, 模型组小鼠肺组织TNF- α 、NOX2、iNOS表达水平显著升高($P<0.05$), ARG-1表达水平显著降低($P<0.05$)。与模型组比较, 半夏提取物组小鼠肺组织TNF- α 、NOX2、iNOS表达水平

降低($P<0.05$), ARG-1表达水平升高($P<0.05$), 提示半夏提取物可调控巨噬细胞极化相关蛋白表达, 并抑制TNF- α /NOX2通路蛋白表达。与半夏提取物组比较, 半夏提取物+pc-TNF- α 组小鼠肺组织TNF- α 、NOX2、iNOS表达水平升高($P<0.05$), ARG-1表达水平降低($P<0.05$); 半夏提取物+pc-NC组小鼠肺组织TNF- α 、NOX2、iNOS、ARG-1表达水平无明显变化($P>0.05$), 提示过表达TNF- α 可减弱半夏提取物对细支气管炎小鼠的上述药理作用。见图4。

3 讨论

RSV感染引起的细支气管炎发病机制与哮喘相似, 治疗手段也以吸氧、吸痰等对症治疗为主, 并伴随抗炎、抗感染治疗, 抗生素是RSV感染的常用药物, 但因抗药性的产生, 很多患者疗效并不好, 还易复发, 因此需积极探寻更有效的新型治疗药物来改善患者肺损伤症状^[13-14]。本文通过向小鼠两侧鼻内滴入RSV混悬液的方法来建立细支气管炎模型, 结果显示, 造模小鼠出现精神萎靡、活动减少、咳嗽且呼吸急促、口唇、四肢发绀等症状, 且小鼠肺功能发生损伤, 提示细支气管炎小鼠模型构建成功。

中草药在慢阻肺、支气管炎、哮喘等肺疾病的治疗中得到了广泛应用, 其中半夏是治疗慢性阻塞性肺疾病的常用中药材, 可改善其患者气喘、胸闷、咳嗽、咳痰等症状^[15], 半夏与藿香组成药可通过抑制细胞因子风暴、广谱抑菌及抗病毒而对新型冠状病毒肺炎起到治疗作用^[16], 另外半夏水煎液可有效拮抗小鼠呼吸道炎症^[12]。本文结果显示, 以半夏提取物干预治疗细支气管炎小鼠, 可降低小鼠炎性细胞数、Raw、炎症评分、黏液分泌评分, 升高其FVC, 并减轻其肺组织病理损伤, 表明半夏提取物



A: 流式细胞图; B: 流式实验的gating策略图; C: 统计图。* $P < 0.05$, 对照组vs模型组; # $P < 0.05$, 模型组vs半夏提取物组; $\Delta P < 0.05$, 半夏提取物组vs半夏提取物+pc-TNF- α 组。

A: the diagram of flow cytometry; B: the gating strategy diagram for streaming experiments; C: the statistical chart. * $P < 0.05$, control group vs model group; # $P < 0.05$, model group vs *Rhizoma Pinelliae* extract group; $\Delta P < 0.05$, *Rhizoma Pinelliae* extract group vs *Rhizoma Pinelliae* extract+pc-TNF- α group.

图3 流式细胞实验测定各组小鼠M1和M2型巨噬细胞比例

Fig.3 Flow cytometry assay to determine the ratio of M1 and M2 macrophages of mice in each group

表4 各组小鼠BALF中IL-6、TNF- α 、TGF- β 、IL-10水平
Table 4 The IL-6, TNF- α , TGF- β , IL-10 levels in BALF of mice in each group

组别 Groups	IL-6 /ng·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	TGF- β /ng·L ⁻¹	IL-10 /ng·L ⁻¹
Control group	10.53±2.31	8.14±2.05	20.42±3.14	12.94±1.83
Model group	56.20±4.74*	49.58±4.17*	3.53±0.92*	1.32±0.40*
<i>Rhizoma Pinelliae</i> extract group	12.35±2.60 [#]	9.94±2.32 [#]	18.79±2.87 [#]	11.02±1.65 [#]
<i>Rhizoma Pinelliae</i> extract+pc-NC group	11.67±4.93	9.16±4.82	19.21±1.02	11.65±0.23
<i>Rhizoma Pinelliae</i> extract+pc-TNF- α group	52.96±5.02 Δ	46.72±4.51 Δ	4.60±1.07 Δ	1.80±0.51 Δ

* P <0.05, 对照组vs模型组; [#] P <0.05, 模型组vs半夏提取物组; Δ P <0.05, 半夏提取物组vs半夏提取物+pc-TNF- α 组。
* P <0.05, control group vs model group; [#] P <0.05, model group vs *Rhizoma Pinelliae* extract group; Δ P <0.05, *Rhizoma Pinelliae* extract group vs *Rhizoma Pinelliae* extract+pc-TNF- α group.

表5 各组小鼠血清中IL-6、TNF- α 、TGF- β 、IL-10水平
Table 5 The IL-6, TNF- α , TGF- β , IL-10 levels in the serum of mice in each group

组别 Groups	IL-6 /ng·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	TGF- β /ng·L ⁻¹	IL-10 /ng·L ⁻¹
Control group	6.20±1.53	4.96±0.87	13.47±1.95	9.01±0.73
Model group	43.51±3.26*	36.15±2.03*	1.64±0.48*	0.68±0.21*
<i>Rhizoma Pinelliae</i> extract group	7.65±1.71 [#]	5.82±0.91 [#]	12.01±1.76 [#]	8.13±0.67 [#]
<i>Rhizoma Pinelliae</i> extract+pc-NC group	7.02±1.57	5.31±0.84	12.62±1.52	8.54±0.48
<i>Rhizoma Pinelliae</i> extract+pc-TNF- α group	40.37±3.46 Δ	34.07±2.14 Δ	2.06±0.53 Δ	0.89±0.24 Δ

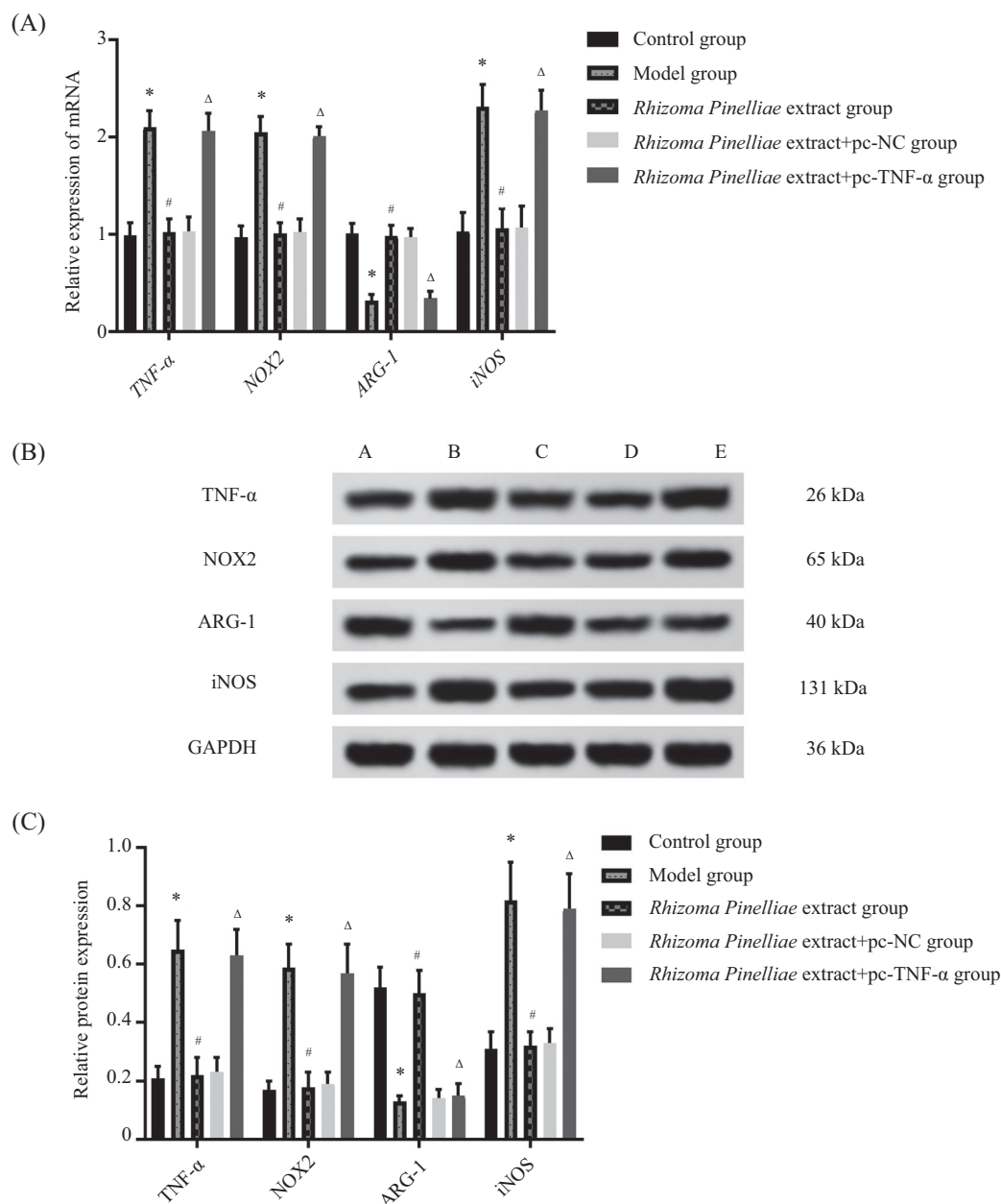
* P <0.05, 对照组vs模型组; [#] P <0.05, 模型组vs半夏提取物组; Δ P <0.05, 半夏提取物组vs半夏提取物+pc-TNF- α 组。
* P <0.05, control group vs model group; [#] P <0.05, model group vs *Rhizoma Pinelliae* extract group; Δ P <0.05, *Rhizoma Pinelliae* extract group vs *Rhizoma Pinelliae* extract+pc-TNF- α group.

可抑制细支气管炎小鼠肺组织炎细胞浸润、黏液分泌, 缓解其病理损伤, 并改善其肺功能。巨噬细胞是肺组织中主要的免疫细胞, 在RSV感染引发的细支气管炎发病过程中可发生M1型激活, 发挥着重要促炎作用, 而刺激巨噬细胞发生M2型极化可有效减轻细支气管炎所引发的肺部炎症损伤^[17-18]。本文以半夏提取物干预治疗细支气管炎小鼠, 可降低其M1型巨噬细胞比例、IL-6与TNF- α 水平、M1型巨噬细胞标志蛋白iNOS表达水平, 升高M2型巨噬细胞比例、M2型巨噬细胞标志蛋白ARG-1表达水平, 表明半夏提取物可抑制M1型巨噬细胞极化及其促炎因子分泌, 促进M2型巨噬细胞极化及其抗炎因子分泌, 揭示半夏提取物减轻细支气管炎小鼠肺损伤与对巨噬细胞极化的调控作用密切相关。

NOX2作为一种NADPH氧化酶, 可受到炎症因子TNF- α 的调控, 在感染性炎症疾病的发病过程中起到重要调控作用^[19], 下调NOX2表达可通过抑制氧化应激而缓解小鼠肺缺血再灌注损伤^[20], 降低NOX和炎症因子TNF- α 、IL-1 β 的表达水平可通过发挥抗氧化、抗炎和抗纤维化作用来减轻环磷酸腺苷

导的肺损伤^[21]。本文结果显示, 细支气管炎小鼠肺组织TNF- α 、NOX2表达水平相比于对照组小鼠显著升高, 表明TNF- α /NOX2信号通路参与调控细支气管炎的发病过程; 以半夏提取物干预治疗可逆转TNF- α 、NOX2上述表达变化趋势, 表明TNF- α /NOX2信号通路参与介导半夏提取物对细支气管炎小鼠肺损伤的减轻作用; 以半夏提取物干预治疗细支气管炎小鼠的同时用pc-TNF- α 质粒上调其TNF- α 表达, 可减弱半夏提取物单独干预对细支气管炎小鼠M1型巨噬细胞极化的抑制作用, 拮抗其对细支气管炎小鼠M2型巨噬细胞极化的促进作用, 减弱其对细支气管炎小鼠肺组织炎细胞浸润、黏液分泌、病理损伤的减轻作用, 最终逆转其对细支气管炎小鼠肺功能的改善作用, 提示半夏提取物是通过下调TNF- α 而减轻细支气管炎小鼠肺损伤的。

综上所述, 半夏提取物可下调TNF- α 、NOX2蛋白表达, 阻滞M1型巨噬细胞极化及其促炎因子分泌, 促使M2型巨噬细胞极化及其抗炎因子分泌, 继而减轻RSV感染引起的细支气管炎小鼠体内炎症, 缓解其肺组织炎细胞浸润、黏液分泌、病理损伤,



A: RNA相对表达统计图; B: 蛋白免疫印迹图; 对照组(A)、模型组(B)、半夏提取物组(C)、半夏提取物+pc-NC组(D)、半夏提取物+pc-TNF-α组(E); C: 蛋白相对表达统计图。* $P<0.05$, 对照组vs模型组; # $P<0.05$, 模型组vs半夏提取物组; $\Delta P<0.05$, 半夏提取物组vs半夏提取物+pc-TNF-α组。

A: the relative expression statistical chart of RNA; B: the protein immunoblot image; control group (A), model group (B), *Pinellia ternata* extract group (C), *Rhizoma Pinelliae* extract+pc-NC group (D), *Rhizoma Pinelliae* extract+pc-TNF-α group (E); C: the statistical chart of relative protein expression. * $P<0.05$, control group vs model group; # $P<0.05$, model group vs *Rhizoma Pinelliae* extract group; $\Delta P<0.05$, *Rhizoma Pinelliae* extract group vs *Rhizoma Pinelliae* extract+pc-TNF-α group.

图4 各组小鼠肺组织TNF-α/NOX2与巨噬细胞极化相关蛋白表达

Fig.4 Expression of TNF-α/NOX2 and macrophage polarization related proteins in lung tissues of mice in each group

最终改善其肺功能, 抑制 TNF-α/NOX2 信号通路激活可能是半夏提取物起到上述肺保护的药理机制, 本文证实了半夏提取物对 RSV 感染引发的细支气管炎具有治疗潜力, 为细支气管炎患儿的临床治疗提供了新的思路, 有利于其预后的改善。

参考文献 (References)

- [1] NIEVAS-SORIANO B J, MARTÍN-LATORRE M D M, MARTÍN-GONZÁLEZ M, et al. Worldwide research trends on bronchiolitis in pediatrics [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2023, 58(8): 2189-203.
- [2] MUÑOZ-QUILES C, LÓPEZ-LACORT M, DÍEZ-DOMINGO J,

- et al. Bronchiolitis, regardless of its etiology and severity, is associated with increased risk of asthma: a population-based study [J]. *J Infect Dis*, 2023, 228(7): 840-50.
- [3] PATEL A, KOSANOVICH J, SANSARE S, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of cerium oxide nanoparticles in respiratory syncytial virus infection [J]. *Bioact Mater*, 2022, 24: 124-35.
- [4] WANG Y, ZHENG J, WANG X, et al. Alveolar macrophages and airway hyperresponsiveness associated with respiratory syncytial virus infection [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1012048-59.
- [5] CAO Y, LUO F, PENG J, et al. KMT2B-dependent RFK transcription activates the TNF- α /NOX2 pathway and enhances ferroptosis caused by myocardial ischemia-reperfusion [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2022, 173: 75-91.
- [6] LIU F C, YU H P, LIAO C C, et al. Corilagin inhibits neutrophil extracellular trap formation and protects against hydrochloric acid/lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by suppressing the stat3 and nox2 signaling pathways [J]. *Antioxidants*, 2024, 13(4): 491-505.
- [7] CHO Y, JEON S, KIM S H, et al. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 2 deletion attenuates polyhexamethylene guanidine-induced lung injury in mice [J]. *Heliyon*, 2024, 10(3): e25045-54.
- [8] 杨丽, 周易, 王小明, 等. 炮制对半夏化学成分及药理作用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报 (YANG L, ZHOU Y, WANG X M, et al. Research progress on chemical constituents variation in processing of banxia (*Rhizoma Pinelliae*) [J]. *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*), 2022, 24(2): 49-53.
- [9] 周正繁, 王梦玲, 梅之南, 等. 基于非靶向代谢组学的半夏及其炮制品抗炎活性药效物质基础研究 [J]. 中国药师 (ZHOU Z F, WANG M L, MEI Z N, et al. Research on the material basis for the anti-inflammatory efficacy of pinelliae rhizoma and its processed products based on untargeted metabolomics [J]. *China Pharmacist*), 2022, 25(12): 2149-57.
- [10] 黄丽萍, 郭腾飞, 张文青. 半夏提取物通过 AMPK/FOXO3a 信号通路对哮喘大鼠气道平滑肌细胞增殖、凋亡的影响 [J]. 中国免疫学杂志 (HUANG L P, GUO T F, ZHANG W Q. Effect of extract of Pinellia on proliferation and apoptosis of airway smooth muscle cells in asthmatic rats through AMPK/FOXO3a signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Immunology*), 2023, 39(12): 2571-6.
- [11] 赵兴艳, 汤正珍, 岳春谭, 等. 橙皮苷调控 Jagged1/Notch1 通路对巨噬细胞极化及细支气管炎小鼠肺损伤的影响 [J]. 中国医学科学院学报 (ZHAO X Y, TANG Z Z, YUE C T, et al. Hesperidin regulates Jagged1/Notch1 pathway to promote macrophage polarization and alleviate lung injury in mice with bronchiolitis [J]. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*), 2022, 44(5): 777-84.
- [12] 薛凡, 郁红礼, 刘睿, 等. 半夏水煎液不同部位拮抗小鼠呼吸道炎症作用及其效应部位成分分析 [J]. 中国中药杂志 (XUE F, YU H L, LIU R, et al. Effect of different parts of *Pinelliae Rhizoma* decoction against airway inflammation and analysis of effective components [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*), 2021, 46(22): 5912-21.
- [13] WEIS A, HAILEY C. Bronchiolitis: safely doing less is the next big thing [J]. *Pediatr Ann*, 2024, 53(6): e223-8.
- [14] HERTER E D C, XAVIER L F, BARROS P B, et al. Management of bronchiolitis and recurrent wheezing in preschoolers [J]. *J Bras Pneumol*, 2023, 49(5): e20230298-99.
- [15] 彭思敏, 赵媚, 许光兰, 等. 基于现代医案挖掘中医药治疗慢性阻塞性肺疾病的证治规律 [J]. 中国实验方剂学杂志 (PENG S M, ZHAO M, XU G L, et al. Syndrome and treatment rules of traditional chinese medicine in treating chronic obstructive pulmonary disease based on modern medical cases [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*), 2022, 28(15): 173-82.
- [16] 滕龙飞, 陈佳丽, 王镓, 等. 基于网络药理学及分子对接探讨半夏-藿香抗新型冠状病毒肺炎作用机制 [J]. 世界中医药 (TENG L F, CHEN J L, WANG J, et al. Mechanism of pinelliae rhizoma-pogostemonis herba against covid-19 based on network pharmacology and molecular docking [J]. *World Chinese Medicine*), 2022, 17(10): 1356-60.
- [17] KUROI T, FUJII N, ICHIMURA K, et al. Characterization of localized macrophages in bronchiolitis obliterans after allogeneic hematopoietic cell transplantation [J]. *Int J Hematol*, 2021, 114(6): 701-8.
- [18] WATABE Y, TAGUCHI K, SAKAI H, et al. Bioinspired carbon monoxide delivery using artificial blood attenuates the progression of obliterative bronchiolitis via suppression of macrophage activation by IL-17A [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2022, 170: 43-51.
- [19] XU M, ZHANG C, HAN Y, et al. TNF- α promotes expression of inflammatory factors by upregulating nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-2 expression in human gingival fibroblasts [J]. *J Dent Sci*, 2024, 19(1): 211-9.
- [20] HUANG W, XIONG Y, CHEN Y, et al. NOX2 is involved in CB2-mediated protection against lung ischemia-reperfusion injury in mice [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(2): 277-85.
- [21] EL-KASHEF D H, RAHIM M A. Levocetirizine attenuates cyclophosphamide-induced lung injury through inhibition of TNF- α , IL-1 β , TGF- β and MMP-9 [J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2023, 24(1): 76-85.