

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2025.15.007

文章编号: 1005-8982 (2025) 15-0043-09

实验研究·论著

甘露清瘟方通过调控 Bcl-2/Bax/Caspase-3 信号通路抑制急性肺损伤大鼠肺组织细胞凋亡的机制研究*

李翔鹏¹, 李凤森^{1,2}, 徐丹^{1,2}, 李争^{1,2}, 王玲^{1,2}

(1. 新疆医科大学第四临床医学院, 新疆 乌鲁木齐 830000;
2. 新疆维吾尔自治区中医医院, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要: **目的** 探讨甘露清瘟方对急性肺损伤(ALI)/急性呼吸窘迫综合征(ARDS)大鼠B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)/凋亡效应蛋白Bax/Caspase-3信号通路的调节作用, 以及其调控细胞凋亡的作用机制。 **方法** 48只雄性SD大鼠随机分为6组, 甘露清瘟方低、中、高剂量组, 空白组, 脂多糖模型组, 地塞米松组, 每组8只。进行ALI大鼠模型复制。模型复制前3 d, 对6组大鼠进行灌胃给药, 1次/d, 连续3 d。空白组给予生理盐水1.0 mL/kg, 脂多糖模型组给予脂多糖5 mg/kg, 地塞米松组给予地塞米松溶液2 mg/kg, 甘露清瘟方低、中、高剂量组分别给予甘露清瘟方溶液0.60、1.20、2.40 g/kg; 第3天给药后, 将20 mg/kg脂多糖溶于100 μ L磷酸盐缓冲液(PBS)中, 地塞米松组和甘露清瘟方各组大鼠气管内滴注; 空白组大鼠气管内滴注等体积生理盐水。苏木精-伊红(HE)染色观察肺组织病理形态学变化; 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组大鼠血清及肺组织的肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-6(IL-6)水平; Western blotting检测各组大鼠肺组织Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白表达; 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测大鼠Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA表达。 **结果** 脂多糖模型组大鼠肺组织大面积实质化, 肺泡结构不清, 可见弥漫性炎症细胞浸润。与脂多糖模型组比较, 地塞米松组和甘露清瘟方低、中、高剂量组血清及肺组织IL-6、TNF- α 、IFN- γ 水平降低($P < 0.05$), Bcl-2蛋白表达及mRNA表达增加($P < 0.05$), Bax、Caspase-3蛋白表达及mRNA表达降低($P < 0.05$)。与甘露清瘟方低剂量组比较, 甘露清瘟方中剂量组大鼠肺组织Caspase-3蛋白相对表达量下降($P < 0.05$), 甘露清瘟方高剂量组大鼠肺组织Bcl-2蛋白相对表达量升高, Bax、Caspase-3蛋白相对表达量下降($P < 0.05$)。与甘露清瘟方低剂量组比较, 甘露清瘟方中、高剂量组大鼠肺组织Bax、Caspase-3 mRNA相对表达量下降($P < 0.05$), Bcl-2 mRNA相对表达量上升($P < 0.05$); 与甘露清瘟方中剂量组比较, 甘露清瘟方高剂量组大鼠肺组织Bax mRNA相对表达量下降($P < 0.05$), Bcl-2 mRNA相对表达量上升($P < 0.05$)。 **结论** 甘露清瘟方可通过促进Bcl-2表达、抑制Caspase-3、Bax表达减轻肺损伤并降低肺组织细胞凋亡。

关键词: 急性肺损伤; 急性呼吸窘迫综合征; 大鼠; 甘露清瘟方; 细胞凋亡; B淋巴细胞瘤-2; Bcl-2相关X蛋白; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3

中图分类号: R563

文献标识码: A

Ganlu Qingwen formula inhibits apoptosis in lung tissue of acute lung injury rats by regulating the Bcl-2/Bax/Caspase-3 signaling pathway*

收稿日期: 2025-04-17

* 基金项目: “天山英才”医药卫生高层次人才培养计划(No: TSYC202301B048); 新疆维吾尔自治区科学技术厅中医药防治呼吸系统疾病创新团队(No: 2023TSYCTD0018); 新疆维吾尔自治区重大科技专项项目(No: 2022A03006-1)。

[通信作者] 李凤森, E-mail: fengsen602@163.com; Tel: 13999980996

Li Xiang-peng¹, Li Feng-sen^{1,2}, Xu Dan^{1,2}, Li Zheng^{1,2}, Wang Ling^{1,2}

(1. The Fourth Clinical Medical College of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830000, China;

2. Xinjiang Uygur Autonomous Region Hospital of Traditional Chinese Medicine, Urumqi, Xinjiang 830000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Ganlu Qingwen Formula (GLQWF) on the Bcl-2/Bax/Caspase-3 signaling pathway and its role in inhibiting apoptosis in a rat model of lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury (ALI)/acute respiratory distress syndrome (ARDS). **Methods** Forty-eight male SD rats were randomized into: Blank (saline), Model (LPS), Dexamethasone (Dex, 2 mg/kg), and GLQWF Low, Medium, High dose groups (0.6, 1.2, 2.4 g/kg). Drugs were administered by gavage for 3 days. On day 3, ALI was induced by intratracheal LPS instillation (Blank: saline). Lung histopathology (H&E), serum and lung tissue cytokines (ELISA: TNF- α , IFN- γ , IL-6), and lung tissue apoptosis-related protein (Western blot) and mRNA (qRT-PCR) expression (Bcl-2, Bax, Caspase-3) were analyzed. **Results** Model group lungs showed extensive consolidation and inflammation. GLQWF (all doses) and Dex significantly reduced serum and lung TNF- α , IFN- γ , IL-6 levels compared to Model ($P < 0.05$). GLQWF (Medium/High doses) and Dex significantly increased Bcl-2 protein/mRNA and decreased Bax/Caspase-3 protein/mRNA expression compared to Model ($P < 0.05$). High-dose GLQWF showed greater effects on protein expression than low-dose. **Conclusion** Ganlu Qingwen Formula alleviates LPS-induced ALI/ARDS by modulating the Bcl-2/Bax/Caspase-3 pathway, promoting anti-apoptotic Bcl-2 expression, and inhibiting pro-apoptotic Bax and Caspase-3 expression.

Keywords: acute lung injury; acute respiratory distress syndrome; rats; Ganlu Qingwen formula; apoptosis; Bcl-2; Bax; Caspase-3

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI)/急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是缘于多种直接和间接原因引发, 如: 肺炎、创伤、中毒、误吸、胰腺炎、输血等^[1]引起的以进行性呼吸困难、持续性顽固低氧血症、弥漫性肺水肿为临床表现的综合征^[2-3]。其发病率较高, 30 d 病死率为 21.5% ~ 27.2%, 严重威胁全球人类健康^[4]。病原体入侵时, 激活固有免疫过程, 募集 Caspase-8/ Caspase-10 形成凋亡诱导复合物, 打破抗凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤 2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 与凋亡效应蛋白 Bax (recombinant Bcl-2 associated X protein) 间的平衡关系, 激活凋亡效应蛋白 Caspase-3, 诱导细胞凋亡过程的发生^[5]。

ALI/ARDS 症状多见发热、气喘等, 隶属于中医学“风温肺热”病的范畴, 本病病位在肺, 病性属于实证范畴, 病因多由于“热”“毒”炽盛, 故见发热, 邪气犯肺, 脏腑功能受损, 肺失宣降, 气喘气促。治疗多以清热解毒为法。甘露清瘟方是李风森教授治疗呼吸系统感染性疾病的经验方, 是由普济消毒饮加减化裁而成, 包含茵陈、青蒿、连翘、黄芩、射干、藿香、伊贝母、陈皮、法半夏、豆蔻、石菖蒲及燀桃仁, 具有清热解毒、清肺化痰之功^[6]。其在临床治疗病毒性感冒、冠状病毒感染、社区获得性肺炎等疾

病中, 取得良好疗效临床疗效。现代药理学研究证实, 茵陈可以抑制相关促凋亡因子的释放, 对细胞增殖和凋亡等生理过程存在一定的调控作用^[7]。青蒿琥酯可通过调控 TLR2/MyD88/NF- κ B 信号通路蛋白的表达来降低重症肺炎大鼠肺组织炎症性表达和肺血气功能, 从而起到肺组织保护作用^[8]。连翘在抗炎、降脂、保肝、抗菌、抗病毒及神经系统保护等方面具有显著的药理活性^[9]。黄芩苷脂质体雾化吸入对脂多糖诱导的肺损伤具有保护作用, 机制与减轻细胞因子分泌过量引起的氧化损伤、线粒体功能障碍和肺部菌群失衡有关^[10]。射干及其提取物具有抗病原微生物、抗炎、抗氧化、清除自由基、醛糖还原酶抑制、蛋白激酶 C 活化和抗癌等药理作用, 对多种细菌、真菌和病毒有抑制作用, 能显著抑制炎症反应, 具有抗氧化和清除自由基的能力^[11]。广藿香油具有解热镇痛、抗炎、抗菌、抗病毒等作用^[12]。伊贝母中的主要活性成分为异甾体生物碱西贝母碱和西贝母碱苷, 具有镇咳祛痰作用, 伊贝母还具有胆碱酯酶抑制作用、抗炎抗菌作用和抗氧化作用等^[13]。川陈皮素对抗炎和抗氧化反应活性具有有效的药理作用, 可以通过清除活性氧和激活核因子 E2 相关因子 2 来改善氧化应激^[14]。法半夏可能通过调节 T 细胞分化和免疫平衡来减轻炎症反应^[15]。

本研究通过评估甘露清瘟方对ALI大鼠肺损伤的干预效果,探讨甘露清瘟方对Bcl-2/Bax/Caspase-3信号通路的调节作用,旨在为寻找治疗ALI的机制靶点提供新的研究方向。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取8~9周龄雄性SPF级SD大鼠48只,体重180~220 g,购买并饲养于新疆医科大学动物实验中心[实验动物生产许可证号:SCXK(新)2023-0001,实验动物使用许可证号:SYXK(新)2023-0004]。饲养温度(23 ± 3)℃,相对湿度(50 ± 10)%,自由进食水。实验方案由新疆医科大学实验动物伦理委员会审查通过,审批号:IACUC-JT-20230831-52。

1.2 药物及试剂

甘露清瘟方包括茵陈15 g、青蒿15 g、连翘12 g、黄芩9 g、射干9 g、藿香6 g、伊贝母9 g、陈皮9 g、法半夏6 g、豆蔻9 g、石菖蒲9 g及燀桃仁9 g,药材购于新疆医科大学附属中医医院。取3剂甘露清瘟方草药,药物加10倍量水浸泡30 min,大火煮沸后,转小火煮30 min,无纺布过滤药渣,续以8倍量水,再次煎煮。将2次药液混匀,继以浓缩、低温烘干,最终获得约40 g干浸膏粉,密封、冷藏。疾病模型复制前以0.9%氯化钠溶液溶解。

地塞米松溶液、脂多糖、白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、 γ 干扰素(Interferon- γ , IFN- γ)(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司),5×蛋白上样缓冲液、苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、高效RIPA裂解液(北京索莱宝科技有限公司),BCA蛋白浓度测定试剂盒、特超敏ECL化学发光底物(北京兰杰柯科技有限公司),辣根过氧化物酶HRP标记的山羊抗兔二抗、兔Bcl-2、Bax、Caspase-3抗体(美国Abcam公司), β -actin(上海碧云天生物科技有限公司),广谱蛋白酶抑制剂混合物(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.3 仪器

DP-16B型高速离心机、Multiskan FC型酶标仪、ABI7500实时荧光定量PCR仪(美国赛默飞世尔科

技有限公司),小型垂直电泳槽电泳仪(美国Bio-Rad公司);Leica ST5010型全自动病理染色机(德国Leica公司)。

1.4 方法

1.4.1 分组与ALI模型复制 将适应性饲养3 d后的48只SD大鼠随机分为甘露清瘟方低、中、高剂量,空白组,脂多糖模型组,地塞米松组,每组8只。参照LOU等^[16]方案进行ALI大鼠模型复制。模型复制前3 d,对6组大鼠进行灌胃给药,1次/d,连续3 d。空白组给予生理盐水1.0 mL/kg,脂多糖模型组给予脂多糖5 mg/kg,地塞米松组给予地塞米松溶液2 mg/kg,甘露清瘟方组分为低、中、高、剂量组(甘露清瘟方溶液0.60、1.20、2.40 g/kg,相当于70 kg成人用药量5.27、10.53、21.60 g/kg);第3天给药后,将20 mg/kg脂多糖溶于100 μ L磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)中,地塞米松组和甘露清瘟方各组大鼠气管内滴注;空白组大鼠气管内滴注等体积生理盐水。24 h后取材。

1.4.2 HE染色 将大鼠右肺上叶置入4%多聚甲醛溶液中,充分固定24 h,梯度乙醇脱水、二甲苯溶液透明组织,石蜡包埋后采用Leica ST5010型全自动病理染色机脱蜡、水化、染色、脱水,以4 μ m厚度切片,封片后使用光学显微观察组织病理学改变。

1.4.3 酶联免疫吸附试验 各组大鼠在气管滴注给药完成24 h后,取大鼠腹主动脉血,3 000 r/min离心15 min,取血清于-20℃保存待测。取血后处死大鼠,取大鼠右肺中叶下叶,剪碎后加入PBS制备组织匀浆液。采用酶联免疫吸附试验检测血清和肺组织的TNF- α 、IFN- γ 、IL-6水平,严格按照说明书步骤操作。

1.4.4 Western blotting检测蛋白表达 取大鼠左肺,加入RIPA、广谱蛋白酶抑制剂混合物,使用塞维尔SWE-FP低温研磨仪制备组织匀浆液,3 000 r/min离心15 min,留取上清蛋白母液,BCA定量后,将母液、RIPA、5×上样缓冲液混,煮样10 min。上样20 μ g,进行SDS-PAGE凝胶电泳及转膜。5%脱脂乳室温封闭2 h,加入对应指标一抗(Bcl-2 1:5 000、Bax 1:5 000、Caspase-3 1:2 000,内参 β -actin 1:5 000),4℃摇床过夜。洗膜3次、二抗室温孵育50 min,洗膜3次,化学发光成像。采用Image J软件分析灰度值,计算目的蛋白相对表达量。

1.4.5 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 mRNA 表达 取大鼠肺组织 100 mg,加入 TRIzol、氯仿提取总 RNA,逆转录合成 cDNA。反应程序:95 ℃ 预热 30 min,95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 扩增 20 s,重复 40 个循环。内参基因为 GAPDH,以 2^{-ΔΔCt} 法检测大鼠肺组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA 相对表达量。引物合成由擎科生物公司提供,引物序列见表 1。

1.5 统计学方法

数据分析采用 Graphpad Prism 10.2 统计软件。

表 1 引物序列

基因	序列	长度/ bp
Caspase-3	正向:5'-ACGAACGGACCTGTGGACCTG-3'	82
	反向:5'-GTTTCGGCTTTCCAGTCAGACTCC-3'	
Bcl-2	正向:5'-TGGAGAGCGTCAACAGGGAGATG-3'	171
	反向:5'-ACAGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG-3'	
Bax	正向:5'-AGACACCTGAGCTGACCTTGGAG-3'	169
	反向:5'-GCTGCCACACGGAAGAAGACC-3'	
GAPDH	正向:5'-ACAGCAACAGGCTGCTGGAC-3'	255
	反向:5'-TTTGAGGCTGCACGGAAGCTT-3'	

计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用方差分析,两两比较用 Tukey 多重比较检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甘露清瘟方对 ALI 大鼠生存率的影响

模型复制后 24 h,空白组大鼠全部存活,生存率 100%;脂多糖模型组大鼠存活 5 只,生存率 62.50%;地塞米松组大鼠存活 6 只,生存率 75.00%;甘露清瘟方低剂量组大鼠存活 5 只,生存率 62.50%;甘露清瘟方中剂量组大鼠存活 6 只,生存率 75.00%;甘露清瘟方高剂量组大鼠存活 7 只,生存率 87.50%。

2.2 各组大鼠肺组织病理学表现

空白组支气管上皮细胞排列整齐,形态正常,细胞间质无水肿及炎症渗出;脂多糖模型组肺组织大面积实质化,肺泡结构不清,可见弥漫性炎症细胞浸润;地塞米松组肺组织小面积实质化,肺泡结构不清,可见大量炎症细胞浸润,肺泡间隔增宽,肺泡腔狭窄;甘露清瘟方各组均可见肺脏组织肺泡壁可见较多的炎症细胞浸润,大面积肺泡壁轻微增厚,肺泡间隔增宽,肺泡腔狭窄。见图 1。

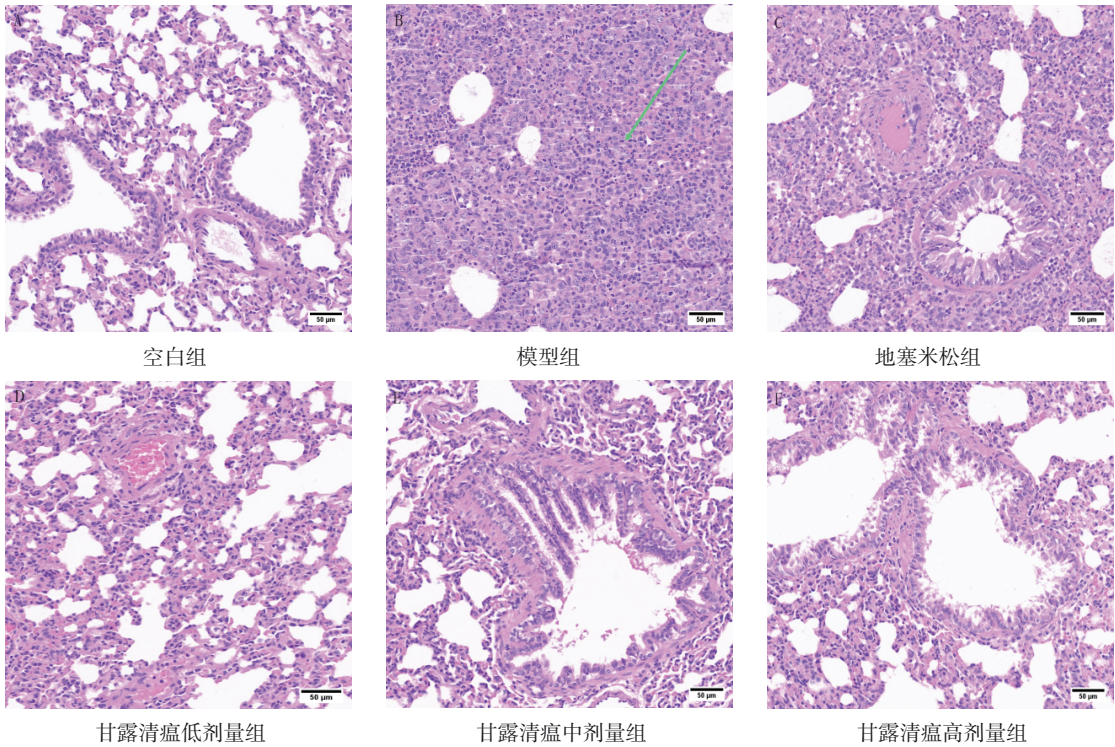


图 1 各组大鼠肺组织病理形态 (HE 染色 × 20)

2.3 甘露清瘟方对 ALI 大鼠血清 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 的影响

各组大鼠血清 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-6 水平比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与空白组比较,脂多糖模型组大鼠血清 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 水平升高($P < 0.05$);与脂多糖模型组比较,地塞米松组与甘露清瘟方低、中、高剂量组血清 IL-6、

TNF- α 、IFN- γ 水平降低($P < 0.05$);与地塞米松组比较,甘露清瘟方低、中、高剂量组血清 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 水平降低($P < 0.05$);与甘露清瘟方低剂量组比较,甘露清瘟方中剂量组 TNF- α 水平降低($P < 0.05$),甘露清瘟方高剂量组 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 水平降低($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠血清 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-6	TNF- α	IFN- γ
空白组	8	9.79 \pm 0.41	16.09 \pm 1.14	464.90 \pm 50.24
脂多糖模型组	5	19.74 \pm 1.07 ^①	35.19 \pm 3.21 ^①	818.80 \pm 96.09 ^①
地塞米松组	6	17.40 \pm 1.04 ^②	29.00 \pm 0.97 ^②	679.50 \pm 16.61 ^②
甘露清瘟方低剂量组	5	14.22 \pm 0.65 ^{②③}	24.69 \pm 1.09 ^{②③}	575.50 \pm 11.09 ^{②③}
甘露清瘟方中剂量组	6	12.28 \pm 0.39 ^{②③}	20.51 \pm 0.79 ^{②③④}	541.20 \pm 5.14 ^{②③}
甘露清瘟方高剂量组	7	11.88 \pm 0.24 ^{②③④}	19.07 \pm 1.28 ^{②③④}	516.70 \pm 7.08 ^{②③④}
<i>F</i> 值		82.540	75.030	32.730
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

注:①与空白组比较, $P < 0.05$;②与脂多糖模型组比较, $P < 0.05$;③与地塞米松组比较, $P < 0.05$;④与甘露清瘟方低剂量组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 甘露清瘟方对 ALI 大鼠肺组织 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 的影响

各组大鼠肺组织 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-6 水平比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与空白组比较,脂多糖模型组大鼠肺组织 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 水平升高($P < 0.05$);与脂多糖模型组比较,地塞米松组与甘露清瘟方低、中、高剂量组肺

组织 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 水平降低($P < 0.05$);与地塞米松组比较,甘露清瘟方低剂量组肺组织 TNF- α 、IFN- γ 水平降低($P < 0.05$),甘露清瘟方中、高剂量组肺组织 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 水平降低($P < 0.05$);与甘露清瘟方低剂量组比较,甘露清瘟方中、高剂量组肺组织 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 水平降低($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠肺组织 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 水平比较 (pg/mg, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-6	TNF- α	IFN- γ
空白组	8	162.00 \pm 15.36	18.60 \pm 2.38	315.00 \pm 24.13
脂多糖模型组	5	430.80 \pm 28.73 ^①	43.24 \pm 3.12 ^①	749.40 \pm 22.37 ^①
地塞米松组	6	345.50 \pm 11.44 ^②	36.15 \pm 1.28 ^②	631.30 \pm 24.08 ^②
甘露清瘟方低剂量组	5	305.00 \pm 17.43 ^②	31.55 \pm 2.11 ^{②③}	558.50 \pm 23.72 ^{②③}
甘露清瘟方中剂量组	6	223.80 \pm 17.27 ^{②③④}	27.01 \pm 1.10 ^{②③④}	470.60 \pm 13.12 ^{②③④}
甘露清瘟方高剂量组	7	192.60 \pm 12.62 ^{②③④}	23.11 \pm 1.34 ^{②③④}	421.90 \pm 42.92 ^{②③④}
<i>F</i> 值		64.270	78.800	136.400
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

注:①与空白组比较, $P < 0.05$;②与脂多糖模型组比较, $P < 0.05$;③与地塞米松组比较, $P < 0.05$;④与甘露清瘟方低剂量组比较, $P < 0.05$ 。

2.5 甘露清瘟方对 ALI 大鼠肺组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达的影响

各组大鼠肺组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与空白组比较,脂多糖模型组大鼠肺组

织中 Bcl-2 蛋白相对表达量下降,Bax、Caspase-3 蛋白相对表达量升高($P < 0.05$);与脂多糖模型组比较,地塞米松组和甘露清瘟方低、中、高剂量组大鼠肺组织 Bcl-2 蛋白相对表达量升高,Bax、Caspase-3 蛋白相对表达量下降($P < 0.05$);与地塞米松组比

较,甘露清瘟方中、高剂量组大鼠肺组织 Bcl-2 蛋白相对表达量升高,Bax、Caspase-3 蛋白相对表达量下降($P<0.05$);与甘露清瘟方低剂量组比较,甘露清瘟方中剂量组大鼠肺组织 Caspase-3 蛋白相对表达量下降($P<0.05$),甘露清瘟方高剂量组大鼠肺组织 Bcl-2 蛋白相对表达量升高,Bax、Caspase-3 蛋白相对表达量下降($P<0.05$)。见表 4 和图 2。

表 4 各组大鼠肺组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Bcl-2 蛋白相对表达量	Bax 蛋白相对表达量	Caspase-3 蛋白相对表达量
空白组	8	0.85 ± 0.13	0.11 ± 0.04	0.10 ± 0.01
脂多糖模型组	5	0.17 ± 0.03 ^①	0.51 ± 0.06 ^①	0.67 ± 0.01 ^①
地塞米松组	6	0.41 ± 0.11 ^②	0.36 ± 0.02 ^②	0.16 ± 0.01 ^②
甘露清瘟方低剂量组	5	0.50 ± 0.01 ^②	0.34 ± 0.05 ^②	0.16 ± 0.01 ^②
甘露清瘟方中剂量组	6	0.67 ± 0.05 ^{②③}	0.23 ± 0.06 ^{②③}	0.11 ± 0.01 ^{②③④}
甘露清瘟方高剂量组	7	0.78 ± 0.02 ^{②③④}	0.17 ± 0.02 ^{②③④}	0.12 ± 0.01 ^{②③④}
<i>F</i> 值		36.250	32.410	10 791.000
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

注：①与空白组比较, $P<0.05$;②与脂多糖模型组比较, $P<0.05$;③与地塞米松组比较, $P<0.05$;④与甘露清瘟方低剂量组比较, $P<0.05$ 。

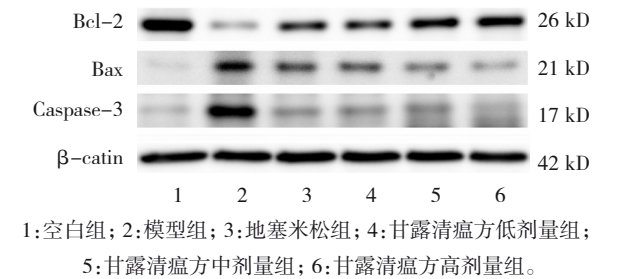


图 2 各组大鼠肺组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达

2.6 甘露清瘟方对 ALI 大鼠肺组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA 表达的影响

各组大鼠肺组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA 相对表达量的比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与空白组比较,脂多糖模型组大鼠肺组织 Bcl-2 mRNA 相对表达量下降,Bax、Caspase-3

mRNA 相对表达量上升($P<0.05$);与脂多糖模型组比较,地塞米松组和甘露清瘟方低、中、高剂量组大鼠肺组织 Bcl-2 mRNA 相对表达量上升,Bax、Caspase-3 mRNA 相对表达量下降($P<0.05$);与地塞米松组比较,甘露清瘟方低、中、高剂量组肺组织 Bax、Caspase-3 mRNA 相对表达量下降($P<0.05$),低剂量组 Bcl-2 mRNA 相对表达量无统计学意义($P>0.05$),中、高剂量组 Bcl-2 mRNA 相对表达量上升($P<0.05$);与甘露清瘟方低剂量组比较,甘露清瘟方中、高剂量组大鼠肺组织 Bcl-2 mRNA 相对表达量上升,Bax、Caspase-3 mRNA 相对表达量下降($P<0.05$);与甘露清瘟方中剂量组比较,甘露清瘟方高剂量组大鼠肺组织 Bcl-2 mRNA 相对表达量上升,Bax mRNA 相对表达量下降($P<0.05$)。见表 5。

表 5 各组大鼠肺组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA 相对表达量的比较

组别	<i>n</i>	Bcl-2 mRNA 相对表达量	Bax mRNA 相对表达量	Caspase-3 mRNA 相对表达量
空白组	8	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.10
脂多糖模型组	5	0.13 ± 0.01 ^①	7.06 ± 0.76 ^①	6.34 ± 0.62 ^①
地塞米松组	6	0.60 ± 0.04 ^②	5.04 ± 0.35 ^②	4.56 ± 0.39 ^②
甘露清瘟方低剂量组	5	0.59 ± 0.05 ^②	4.58 ± 0.34 ^②	2.20 ± 0.16 ^{②③}
甘露清瘟方中剂量组	6	0.69 ± 0.03 ^{②③④}	3.15 ± 0.40 ^{②③④}	1.24 ± 0.13 ^{②③④}
甘露清瘟方高剂量组	7	0.79 ± 0.06 ^{②③④⑤}	2.42 ± 0.19 ^{②③④⑤}	1.02 ± 0.07 ^{②③④}
<i>F</i> 值		574.400	243.500	451.200
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

注：①与空白对照组比较, $P<0.05$;②与脂多糖模型组比较, $P<0.05$;③与地塞米松组比较, $P<0.05$;④与甘露清瘟方低剂量组比较, $P<0.05$;⑤与甘露清瘟方中剂量组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

ALI/ARDS 是以肺部炎症反应为病理特征,表现为肺水肿和呼吸衰竭的严重肺部疾病^[17-18],具有肺顺应性下降、肺内分流增加、死腔容量增加、通气-血流比失衡、毛细血管通透性增加、肺间质水肿等生理病理特征。因过度的炎症反应导致大量中性粒细胞、巨噬细胞浸润肺泡出血,进而导致弥漫性的肺泡损伤、肺泡毛细血管和上皮细胞功能障碍甚至坏死、透明膜的形成,终而形成毛细血管内血栓。当病原体入侵时,分布于质膜表面的模式识别受体识别到病原体,通过特异性的配体受体相结合的方式,在细胞表面寡聚化形成含有死亡结构域和死亡效应结构域的 Fas 相关死亡结构域蛋白(Fas-associated death domain protein, FADD)、肿瘤坏死因子受体相关死亡结构域蛋白(tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein, TRADD)^[19]。FADD 与 TRADD 招募 Caspase-8 和 Caspase-10,死亡诱导信号复合物就此形成^[20-24]。死亡诱导信号复合物的形成导致 Bcl-2 蛋白各亚型之间的平衡关系被打破,从而激活细胞死亡^[25]。Bcl-2 家族包含 3 种亚型,分别是抗凋亡的 Bcl-2 亚型,促凋亡的 BH3-only (Bcl-2 homologous region 3 only protein)亚型,以及凋亡效应蛋白 Bax 亚型。正常状态下,凋亡与抗凋亡处于平衡状态,当 BH3-only 感受到凋亡信号,诱导 Bax 和 Bak 活化,Bcl-2 抗凋亡途径拮抗此过程。Bax 和 Bak 的活化导致线粒体外膜发生通透性改变,分布于线粒体的膜间隙内的细胞色素 C (Cytochrome C)及线粒体促凋亡蛋白(second mitochondria-derived activator of caspases/diablo protein, SMAC/Diablo)释放至细胞质^[26-27]。细胞色素 C 和凋亡蛋白酶激活因子(apoptotic protease activating factor-1, APAF-1)结合^[28],并利用 APAF-1 的 Caspase 募集结构域(caspase recruitment domain, CARD)与半胱氨酸蛋白酶 9 前体(Pro-caspase 9)结合形成凋亡小体^[28-32],细胞凋亡过程被激活。

因过度的炎症反应导致大量中性粒细胞、巨噬细胞浸润肺泡出血,进而导致弥漫性的肺泡损伤、肺泡毛细血管和上皮细胞功能障碍甚至坏死、透明膜的形成,终而形成毛细血管内血栓。抗感

染、抗炎及保护性的肺通气治疗为 ALI/ARDS 治疗的重中之重,其他的治疗包括:严格的液体管理减轻肺水肿,吸入性肺血管扩张药物改善分流,必要时予体外膜肺氧合提供体外呼吸、循环支持等,糖皮质激素的使用仍存在较大争议,虽然起到一定的抗炎作用,但其不能降低死亡率且存在一定的副作用^[33]。目前临床治疗 ALI/ARDS 以支持治疗为主,抗生素、激素等药物的使用,以及长时间的机械通气治疗,带来了许多并发症及后遗症,长时间的机械通气增加呼吸机感染风险、延长住院周期、增加患者死亡风险^[34];机械通气虽然能帮助塌陷的肺泡膨胀复张,改善氧合,纠正低氧血症^[35],但不当的压力及潮气量可导致机械性损伤及肺泡表面活性物质减少^[36],亦可导致毛细血管通透性增加,更多的炎症因子释放至间质^[37]。促炎症性细胞因子的大量堆积,诱导上皮细胞和血管内皮细胞受损,毛细血管通透性增加,炎症细胞浸润,导致肺组织损伤加重^[1,33,38-39],进而导致“炎症风暴”的发生。炎症性物质的刺激导致多条通路的程序性细胞死亡被激活,因此减少炎症性物质的释放,抑制程序性细胞死亡的发生,是 ALI 治疗的核心。

本研究中,脂多糖模型组肺组织病理切片表现出弥漫性肺泡及肺间质水肿,其间充斥大量炎症细胞,亦可见瘀血及微小血栓的形成,与 ALI/ARDS 病理表现相同,而甘露清瘟方各组可见肺组织炎症浸润情况明显减轻,间质水肿减少,表明甘露清瘟方能够有效减轻肺组织的炎症反应,减轻肺水肿。因此,抑制炎症细胞的产生和释放是预防和治疗 ALI/ARDS 的关键节点。本研究结果显示,甘露清瘟方可以明显降低 ALI/ARDS 大鼠血清及肺组织 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 水平;下调 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达,这表明,甘露清瘟方可通过调控 Bcl-2/Bax/Caspase-3 信号通路,降低 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 的水平,从而起到治疗作用。

综上所述,甘露清瘟方能够改善肺组织炎症浸润情况,减轻肺水肿,减少炎症因子的产生及释放。本研究为 ALI/ARDS 提供了治疗新靶点,但未对 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 进行共定位,且未进一步验证 Bcl-2/Bax/Caspase-3 信号通路与炎症通路之间的关系,后续须进一步深入研究。

参 考 文 献 :

- [1] KAKU S, NGUYEN C D, HTET N N, et al. Acute respiratory distress syndrome: etiology, pathogenesis, and summary on management[J]. *J Intensive Care Med*, 2020, 35(8): 723-737.
- [2] KELLUM J A, RONCO C. The role of endotoxin in septic shock[J]. *Crit Care*, 2023, 27(1): 400.
- [3] FOSTER D M, KELLUM J A. Endotoxic septic shock: diagnosis and treatment[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(22): 16185.
- [4] BAUER M, GERLACH H, VOGELMANN T, et al. Mortality in sepsis and septic shock in Europe, North America and Australia between 2009 and 2019- results from a systematic review and meta-analysis[J]. *Crit Care*, 2020, 24(1): 239.
- [5] YU Y, ZHANG X Z, LI Z Q, et al. LncRNA HOTAIR suppresses TNF- α induced apoptosis of nucleus pulposus cells by regulating miR-34a/BCL-2 axis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107: 729-737.
- [6] 张玮超, 李亚云, 高天慈, 等. 甘露消毒丹治疗病毒性肺炎的潜在成分及作用机制[J/OL]. *中国实验方剂学杂志*. (2025-04-18) [2025-04-20]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20251394>.
- [7] 李凌, 贾艺泉, 方守国, 等. 茵陈蒿提取物体外抗传染性支气管炎病毒的作用研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2024(20): 95-102.
- [8] 江慧, 包军波. 青蒿琥酯对重症肺炎大鼠的保护作用及机制[J]. *中国老年学杂志*, 2025, 45(5): 1243-1247.
- [9] 周明月, 霍金海, 孙国东, 等. 采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术鉴定连翘中 45 种化学成分[J]. *中国药房*, 2019, 30(22): 3067-3073.
- [10] 赵威威, 王洪新, 杨冰, 等. 黄芩苷脂质体雾化吸入对急性呼吸窘迫综合征小鼠肺损伤的保护作用及机制[J]. *药物评价研究*, 2025, 48(4): 856-865.
- [11] 刘锦河, 汪天青. 射干化学组分、药理作用及质量控制研究概述[J/OL]. *辽宁中医药大学学报*. (2025-04-07) [2025-04-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1543.R.20250407.1121.019.html>.
- [12] 陈婷婷, 陈建平, 成日青, 等. 广藿香油的研究进展[J]. *中医药导报*, 2025, 31(1): 112-119.
- [13] 焦豪妍, 陈晓芬, 胡嘉倩, 等. 伊贝母的化学成分和生物活性研究综述[J]. *广东化工*, 2023, 50(4): 92-93.
- [14] 杨静帆, 李敏艳, 秦燕勤, 等. 川陈皮素的药理活性研究进展[J]. *中医学报*, 2023, 38(4): 719-725.
- [15] 程砚秋. 法半夏对 COPD 小鼠的治疗作用及炮制工艺研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2022.
- [16] LOU L J, WANG M, HE J J, et al. Urolithin A (UA) attenuates ferroptosis in LPS-induced acute lung injury in mice by upregulating Keap1-Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1067402.
- [17] 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.
- [18] 曾小良, 王江伟, 玉佳宁, 等. 脓毒症相关急性呼吸窘迫综合征患者 T 淋巴细胞免疫功能状态研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2025, 35(3): 55-62.
- [19] CHEN Y, GU Y H, XIONG X, et al. Roles of the adaptor protein tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein (TRADD) in human diseases[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 153: 113467.
- [20] PARK Y H, HAN C W, JEONG M S, et al. DED interaction of FADD and caspase-8 in the induction of apoptotic cell death[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2022, 32(8): 1034-1040.
- [21] FÜLLSACK S, ROSENTHAL A, WAJANT H, et al. Redundant and receptor-specific activities of TRADD, RIPK1 and FADD in death receptor signaling[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2): 122.
- [22] SMYTH P, SESSLER T, SCOTT C J, et al. FLIP(L): the pseudo-caspase[J]. *FEBS J*, 2020, 287(19): 4246-4260.
- [23] HORN S, HUGHES M A, SCHILLING R, et al. Caspase-10 negatively regulates caspase-8-mediated cell death, switching the response to CD95L in favor of NF- κ B activation and cell survival[J]. *Cell Rep*, 2017, 19(4): 785-797.
- [24] HILLERT L K, IVANISENKO N V, BUSSE D, et al. Dissecting DISC regulation via pharmacological targeting of caspase-8/c-FLIP_L heterodimer[J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(7): 2117-2130.
- [25] KALE J, OSTERLUND E J, ANDREWS D W. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(1): 65-80.
- [26] BOCK F J, TAIT S W G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(2): 85-100.
- [27] GONG Y N, CRAWFORD J C, HECKMANN B L, et al. To the edge of cell death and back[J]. *FEBS J*, 2019, 286(3): 430-440.
- [28] ELENA-REAL C A, DÍAZ-QUINTANA A, GONZÁLEZ-ARZOLA K, et al. Cytochrome c speeds up caspase cascade activation by blocking 14-3-3 ϵ -dependent Apaf-1 inhibition[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 365.
- [29] WANG H J, ZHU J, JIANG L P, et al. Mechanism of heshouwuyin inhibiting the Cyt c/Apaf-1/Caspase-9/Caspase-3 pathway in spermatogenic cell apoptosis[J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 180.
- [30] OHTA E, ITOH M, UEDA M, et al. Cullin-4B E3 ubiquitin ligase mediates Apaf-1 ubiquitination to regulate caspase-9 activity[J]. *PLoS One*, 2019, 14(7): e0219782.
- [31] LI Z H, GUO D D, YIN X W, et al. Zinc oxide nanoparticles induce human multiple myeloma cell death via reactive oxygen species and Cyt-C/Apaf-1/Caspase-9/Caspase-3 signaling pathway *in vitro*[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 122: 109712.
- [32] DORSTYN L, AKEY C W, KUMAR S. New insights into apoptosome structure and function[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(7): 1194-1208.
- [33] BOS L D J, WARE L B. Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes[J]. *Lancet*, 2022, 400(10358): 1145-1156.
- [34] CECCONI M, EVANS L, LEVY M, et al. Sepsis and septic

- shock[J]. Lancet, 2018, 392(10141): 75-87.
- [35] YANG P, SJODING M W. Acute respiratory distress syndrome: definition, diagnosis, and routine management[J]. Crit Care Clin, 2024, 40(2): 309-327.
- [36] BROCHARD L, SLUTSKY A, PESENTI A. Mechanical ventilation to minimize progression of lung injury in acute respiratory failure[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2017, 195(4): 438-442.
- [37] LAI Y, HUANG Y B. Mechanisms of mechanical force induced pulmonary vascular endothelial hyperpermeability[J]. Front Physiol, 2021, 12: 714064.
- [38] DEVANEY J, CONTRERAS M, LAFFEY J G. Clinical review: gene-based therapies for ALI/ARDS: where are we now?[J]. Crit Care, 2011, 15(3): 224.
- [39] ZHANG J, WANG C S, WANG H L, et al. Loganin alleviates sepsis-induced acute lung injury by regulating macrophage polarization and inhibiting NLRP3 inflammasome activation[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 95: 107529.
- (张蕾 编辑)
- 本文引用格式:** 李翔鹏, 李凤森, 徐丹, 等. 甘露清瘟方通过调控 Bcl-2/Bax/Caspase-3 信号通路抑制急性肺损伤大鼠肺组织细胞凋亡的机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2025, 35(15): 43-51.
- Cite this article as:** LI X P, LI F S, XU D, et al. Ganlu Qingwen formula inhibits apoptosis in lung tissue of acute lung injury rats by regulating the Bcl-2/Bax/Caspase-3 signaling pathway[J]. China Journal of Modern Medicine, 2025, 35(15): 43-51.