XXXX DOI：

β-谷甾醇对LPS致急性肺损伤大鼠肺泡巨噬细胞极化及NF-κB通路的影响

冉 燕[1]，王世艳[1]，赵建军[2]
（1.遵义医科大学附属医院呼吸与危重症医学科二病区，遵义 563003；
2.贵州省仁怀市贵州茅台医院呼吸内科，仁怀 564500）

【摘 要】目的：观察β-谷甾醇（beta sitosterol，BS）是否可以影响脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）诱导的大鼠急性肺损伤（acute lung injury，ALI），探讨其是否能影响核因子κB（nuclear factor kappa B，NF-κB）通路及肺泡巨噬细胞的极化。**方法：**30只无特定病原体（specific pathogen free，SPF）SD大鼠随机分为生理盐水对照组（NS组）、急性肺损伤组（LPS组）、β-谷甾醇低剂量干预组（BS-L组）、β-谷甾醇高剂量干预组（BS-H组）和地塞米松组（DX组），每组6只，造模成功后处死大鼠，检测各组大鼠肺组织病理学变化及测量肺组织湿干重比值（weight/dry，W/D）；支气管肺泡灌洗液肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor α，TNF-α）、白细胞介素1β（interleukin 1β，IL-1β）细胞因子水平；肺组织NF-κB p65、IL-1β、TNF-α mRNA相对表达情况；肺组织NF-κB p65、TNF-α蛋白表达水平以及肺组织中CD80标记的M1肺泡巨噬细胞（classically activated macrophages，M1）百分比。**结果：**①与NS组比较，LPS组、BS-L组、BS-H组及DX组可观察到行为异常伴发绀，BS不同剂量干预组和DX组较LPS组减轻；②与NS组相比，LPS组肺组织病理损伤评分、W/D比值、肺组织NF-κB p65、IL-1β和TNF-α mRNA相对表达水平、肺组织TNF-α、NF-κB p65蛋白表达水平、M1肺泡巨噬细胞表面标志物CD80百分比、BALF中炎症因子TNF-α、IL-1β浓度水平均升高（均$P<0.010$）；③与LPS组相比，BS-L组、BS-H组及DX组肺组织病理损伤评分、W/D比值、肺组织NF-κBp65、IL-1β和TNF-α mRNA相对表达水平、肺组织NF-κB p65、TNF-α蛋白表达水平、M1肺泡巨噬细胞表面标志物CD80百分比、BALF中炎症因子TNF-α、IL-1β水平降低（P均<0.001）；④BS-H组低于BS-L组（均$P<0.001$）；与BS-L组和BS-H组比较，DX组大鼠上述指标降低（均$P<0.010$）**结论：**BS可能能抑制NF-κB通路的激活，抑制ALI大鼠肺泡巨噬细胞向M1型巨噬细胞极化，减轻ALI程度。

【关键词】β-谷甾醇；NF-κB；肺损伤；巨噬细胞；M1极化
【中图分类号】R563.8 **【文献标志码】**A

Effects of β-sitosterol on alveolar macrophage polarization and NF-κB pathway in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats

Ran Yan[1], Wang Shiyan[1], Zhao Jianjun[2]
(1.Second Ward of Respiratory and Critical Care Medicine Department, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University; 2.Department of Respiratory Medicine, Guizhou Maotai Hospital)

【Abstract】*Objective*: To investigate whether beta-sitosterol (BS) can affect the polarization of alveolar macrophages and the nuclear factor kappa B (NF-κB) pathway in a rat model of acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharides (LPS). ***Methods*:** Thirty specific pathogen-free Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal saline group (NS group), ALI model group (LPS group), low-dose BS intervention group (BS-L group), high-dose BS intervention group (BS-H group), and dexamethasone group (DX group), with six rats in each group. After successful modeling, the rats were sacrificed for the following examinations: the pathological changes and wet-to-dry (W/D) weight ratio of lung tissue; the levels of tumor necrosis factor α (TNF-α) and interleukin 1β (IL-1β) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF); the relative mRNA expression levels of NF-κB p65, IL-1β, and TNF-α in lung tissue; the protein expression levels of NF-κB p65 and TNF-α and the percentage of CD80-positive M1 alveolar macrophages in lung tissue. ***Results*:** Abnormal behaviors and cyanosis were observed in all the groups except the NS group, with milder symptoms in the BS groups and DX group than in the LPS group. Compared with the NS group, the LPS group showed significant increases in the lung tissue pathological injury score, the W/D ratio, the relative mRNA expression levels of NF-κB p65, IL-1β, and TNF-α in lung tissue, the protein expression levels of TNF-α and NF-κB p65 in lung tissue, the percentage of CD80-positive M1 alveolar macrophages, and the levels of the inflammatory factors TNF-α and IL-1β in BALF (all $P<0.01$). Compared with the LPS group, the BS-L group, BS-H group and DX group showed significant decreases in the lung tissue pathological

作者介绍：冉 燕，Email：ranyan365@163.com。
研究方向：急性肺损伤的发病机制，肺部感染的基础与临床研究。
通信作者：赵建军，Email：610559131@qq.com。
基金项目：贵州省茅台医院人才培养基金（编号：MTyk2024-19）。

injury score, the W/D ratio, the relative expression levels of NF-κB p65, IL-1β, and TNF-α mRNAs in lung tissue, the protein expression levels of NF-κB p65 and TNF-α in lung tissue, the percentage of CD80-positive M1 alveolar macrophages, and the levels of TNF-α and IL-1β in BALF (all $P<0.001$). The above indicators were significantly lower in the BS-H group than in the BS-L group (all $P<0.001$). Compared with those in the BS-L and BS-H groups, the above indicators in the DX group were significantly decreased (all $P<0.01$). ***Conclusion***: BS may alleviate the severity of ALI through inhibiting the activation of the NF-κB pathway and suppressing the polarization of alveolar macrophages towards M1-type macrophages in ALI rats.

【Key words】beta-sitosterol; NF-κB; lung injury; macrophage; M1 polarization

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是指多种致病因素导致的肺部炎症损伤,临床特征为顽固性低氧血症和进行性呼吸窘迫,ALI易进展为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)。ALI/ARDS病死率高,严重威胁人类生命健康,故研究其发病机制及新的治疗方法对其预后有重要意义。革兰阴性菌感染产生内毒素血症是引发ALI/ARDS的主要原因[1],脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是内毒素的主要成分,因此在ALI动物模型建立中,以LPS为代表的生物因素诱导脓毒血症致ALI是最常见的方法[2]。

ALI/ARDS发病机制尚不十分清楚,目前认为炎症发挥主要作用,与巨噬细胞、中性粒细胞等炎性细胞浸润,促炎细胞因子分泌有关[3],其中肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, AM)在维持肺部免疫系统稳态以及宿主防御过程中有关键作用[4],巨噬细胞根据组织微环境适应性改变其功能表型,称为巨噬细胞极化现象,分为经典激活的M1型和替代激活的M2型,M1型释放促炎细胞因子,而M2型释放抗炎细胞因子,故影响巨噬细胞M1/M2极化稳态的因素可能导致机体疾病或炎症状态[5]。核因子-κB(nuclear factor kappa B, NF-κB)是体内经典的信号通路,在炎症反应中起重要作用。研究表明巨噬细胞极化及NF-κB通路在ALI中发挥重要作用[6]。近年有较多研究证实中草药在ALI预防和治疗中有一定疗效,并通过实验发现中药复方制剂及其活性成分基于调控巨噬细胞改善肺部炎症的证据[7],β-谷甾醇(beta sitosterol, BS)是中药中植物甾醇成分之一,具有抗氧化、抗炎、抗凋亡等多种生理活性,在炎症疾病中表现为抑制炎症[8]。文献报道BS为核心高频成分的中草药复方制剂能改善ALI[9-12]。BS能减轻LPS诱导的肺部炎症损伤,减少炎症细胞浸润及炎性因子释放[13-14]。在炎症过程中,NF-κB信号通路的激活会导致多种炎症基因转录上调,而BS能阻断这些信号通路激活,抑制炎症反应,减轻肺损伤[15-17]。在ALI发展过程中NF-κB通路的激活及AM的极化发挥重要作用,但BS能否调控NF-κB通路及巨噬细胞极化,减轻ALI程度,目前尚不明确。BS在ALI中的研究相关文献报道少,本研究拟通过建立LPS诱导的肺损伤大鼠模型,BS进行干预,检测其能否调控NF-κB通路及巨噬细胞极化及其对肺损伤的影响,以期为ALI治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 30只6~8周龄无特定病原体(specific pathogen free, SPF)SD雄性大鼠,体质量为(250 ± 10) g,在室温22 ℃~24 ℃,湿度40%~70%,噪声≤50 dB的环境中,光照12 h、黑暗12 h交替,喂养1周后实验。本研究符合实验动物伦理审查标准(伦理审查编号:ZMU21-2301-008)。

1.1.2 主要试剂与仪器 LPS(美国Sigma公司);BS(上海毕得医药科技股份有限公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒、ECL化学发光试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司);TNF-α、NF-Kb p65、β-actin兔抗鼠多克隆抗体(美国Cell Signaling公司);大鼠TNF-αELISA试剂盒、大鼠IL-1β ELISA试剂盒(上海江莱生物技术有限公司);IL-1β引物、TNF-α引物、NF-κB p65引物、β-actin引物(上海生工生物工程有限公司);实时定量PCR扩增、电泳仪、电转仪(美国Bio-Rad公司);流式细胞检测仪(美国BD公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组 将30只SPF级SD雄性大鼠随机分为生理盐水对照组(NS组)、急性肺损伤组(LPS组)、BS低剂量干预组(BS-L组)、BS高剂量干预组(BS-H组)和地塞米松组(DX组),每组6只。

1.2.2 ALI建模方法 NS组和LPS组以生理盐水(1 mL/100 g),而BS-L组和BS-H组以BS混悬液(BS-L组5 mg/kg质量浓度为0.5 mg/mL;BS-H组20 mg/kg,质量浓度为2 mg/mL)均连续灌胃7 d,每日1次。DX组以地塞米松(5 mg/kg,质量浓度5 mg/mL)连续灌胃7 d,每日1次。所有组大鼠7 d后麻醉,NS组舌下静脉注射生理盐水(0.1 mL/100 g),而LPS组、BS-L组、BS-H组、DX组均舌下静脉注射LPS生理盐水溶液(0.1 mL/100 g LPS溶液),6 h后处死。

1.2.3 肺组织湿/干重(weight/dry, W/D)比值测定 处死大鼠后取出右肺下叶组织,用滤纸吸取残余液体,称重所得数据即为肺组织湿重,记为W;设置烤箱温度为80 ℃,烘烤72 h后再次称取组织重量,所得数据即为肺组织干重,记为D。W/D即为肺组织湿/干重比值。

1.2.4 肺组织标本病理形态学检测 各组大鼠肺组织在4%

多聚甲醛中固定24 h，经组织脱水、二甲苯液体中透明、浸蜡和包埋等步骤制作石蜡块，切片，行苏木精-伊红染色（haematoxylin and eosin stain，HE）。经组织切片染色镜下观察肺组织病理改变及肺组织损伤病理评分结果判断各组大鼠ALI程度。每张病理切片随机选取4个视野（×100），观察各组大鼠肺组织病理改变，采用单盲法，由2名病理专业医师，根据2022年ALI动物模型病理评分标准[18]进行评判，对各组大鼠肺损伤程度进行评分。

1.2.5 流式细胞术（flow cytometry，FCM） 按步骤制备各组大鼠肺组织单个核细胞悬液，同时制备脾组织单个细胞悬液（用作流式细胞检测单染对照），染色：各对照管染色：空白对照（取LPS组大鼠肺组织单细胞悬液，不加抗体）；单染对照（取4个流式管，每管加LPS组大鼠脾组织单细胞悬液（1×10^6），加入PBS至1 mL，每管加死活染料1 μL，混匀，室温避光15 min，其中3管分别加入CD45、CD80及CD68（需固定破膜）；同型对照（100 μL LPS大鼠脾组织单细胞悬液（1×10^6），加入PBS至1 mL，加入死活染料1 μL，混匀，室温避光15 min。加CD80同型抗体，4 ℃避光30 min；FMO对照管（100 μL LPS组大鼠脾组织单细胞悬液（1×10^6），加入PBS至1 mL，染为$CD45^+$ $CD68^+$死活染料）。检测管染色：每管加100 μL细胞悬液（1×10^6），补PBS至1 mL，加1 μL死活染料混匀，室温避光15 min，加4 ℃预冷Staining Buffer 1 mL，350 g，离心5 min，弃上清，加100 μL Staining Buffer重悬细胞，表面染色（流式管中加入CD45 1 μL、CD80 2.5 μL，涡旋混匀，4 ℃避光30 min），同上洗涤步骤2次，重悬细胞，固定破膜（加1 mL Fix/Perm Buffer，4 ℃避光30 min），洗涤细胞（1 mL Perm/Wash洗2次），胞内染色（加入100 μL Perm/Wash Solution，重悬细胞，每管加入CD68 10 μL，4 ℃避光30 min），再清洗细胞2次，300 μL Staining Buffer重悬细胞，最后上流式细胞仪检测。

1.2.6 Real-time PCR 检测大鼠肺组织IL-1β、TNF-α、NF-κB p65 mRNA相对表达水平 提取肺组织总RNA、测定各组样本RNA纯度和含量、RNA逆转录为cDNA进行Real-time PCR反应：利用2×RealStar FAST染料法qPCR预混液试剂盒，按说明书操作。引物序列如下，IL-1β：上游引物AATCTCACAGCAGCATCTCGACAAG，下游引物TCCACGGGCAAGACATAGGTAGC；P65上游引物ATCTGCTTCTCCCTCCGCTACG，下游引物GCCACCCACATCCATCTTCTTCAG；TNF-α上游引物CACCACGCTCTTCTGTCTACTGAAC，下游引物TGGGCTACGGGCTTGTCACTC；β-actin上游引物GACATGCCGCCTGGAGAAAC，下游引物AGCCCAGGATGCCCTTTAGT。上海生工生物工程有限公司设计及合成引物。扩增程序如下：预变性：温度95 ℃，时间2 min，变性：温度95 ℃，时间15 s，退火/延伸：温度60 ℃，时间30 s，共40个循环，溶解曲线：温度65 ℃~95 ℃，时间30 s。

1.2.7 BALF中IL-1β、TNF-α检测 按IL-1β、TNF-α操作试剂盒操作。

1.2.8 WB检测大鼠肺组织TNF-α、IL-1β及NF-κB p65蛋白表达 提取肺组织蛋白、按照雅酶BCA测定试剂盒说明书操作行蛋白浓度测定，后行电泳、电转、封闭、抗体孵育，电转结束后将PVDF膜放入大小合适的抗体孵育盒内，目的及内参条带中分别加入按比例稀释的一抗（TNF-α 1∶1 000；NF-κB p65 1∶2 000；β-actin 1∶5 000），4 ℃条件下摇床孵育12 h，12 h后吸取一抗回收保存，使用0.1%TBST将PVDF膜淹没，于室温、65 r/min条件下重复洗膜3次，每次约15 min；PVDF膜洗好后根据一抗种属来源加入一抗对应种属的二抗（1∶4 000），4 ℃、65 r/min条件下孵育2 h后用0.1%TBST重复洗膜3次，每次约15 min。最后进行曝光，按1∶1比例配制增强型化学发光试剂（electrochemiluminescence，ECL），加入适量体积ECL显色液均匀覆盖PVDF膜，随后使用凝胶成像系统进行曝光；使用Image J软件计算目的条带灰度值。

1.3 统计学方法

实验数据采用SPSS 29.0软件Graphad Prism 9.5软件进行统计学分析。数据采用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用单因素方差分析（one-way ANOVA）进行组间比较，有差异者进一步采用LSD行两两比较，检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 观察大鼠行为学及肺组织标本外观

2.1.1 各组大鼠动物行为学改变 NS组大鼠状态正常，无症状，LPS组精神萎靡，鼻翼扇动，呼吸、心率加快，口唇、四肢发绀明显，提抓时无明显挣扎。BS-L组、BS-H组和DX组大鼠精神萎靡，鼻翼扇动、呼吸和心率加快、口唇和四肢发绀的情况不如LPS组明显，提抓时轻微挣扎，BS-H组较BS-L组症状轻，DX组较BS-H组症状轻。

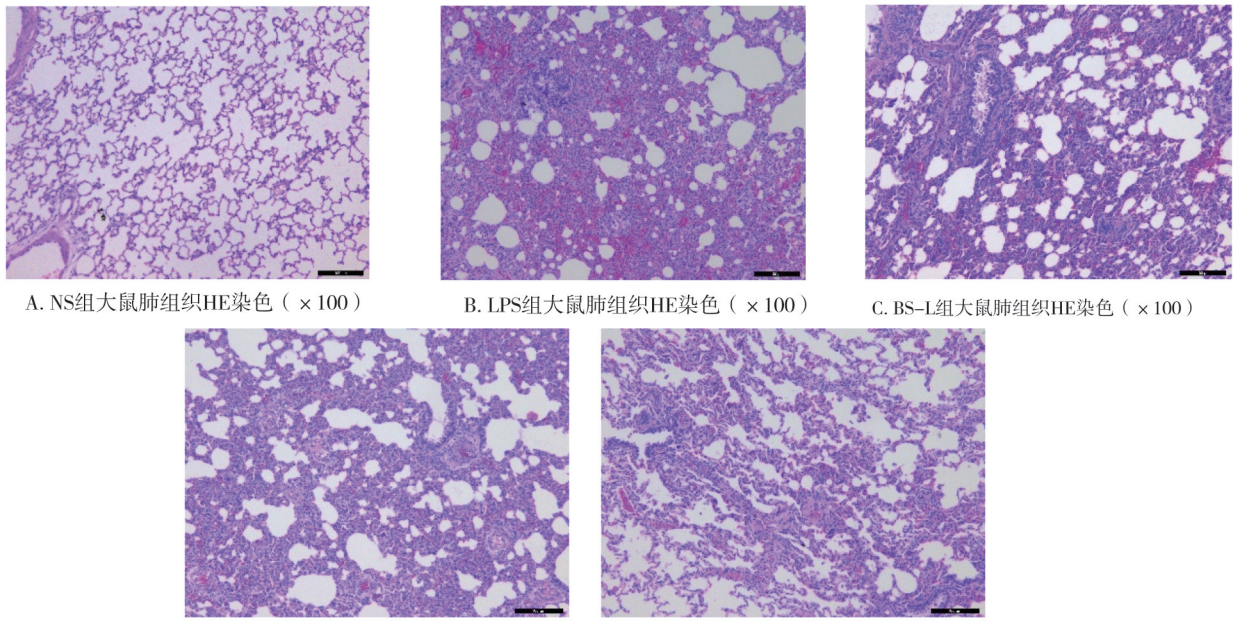
2.1.2 大鼠肺组织标本外观改变 NS组大鼠双肺湿润，光滑有弹性，呈淡粉色，无肿胀、充血、出血；LPS组大鼠双肺轮廓不清，粗糙无光泽，色暗红，呈肝样变，明显肿胀，可见充血、水肿及散在瘀斑；BS-L组、BS-H组和DX组双肺充血、水肿，部分可见散在出血点，色暗红，呈肝样变；与NS组相比，LPS组、BS不同剂量干预组及DX组大鼠肺脏外观符合ALI表现；与LPS组相比，BS不同剂量干预组及DX组肺脏损伤程度较轻；BS-H组较BS-L组损伤轻，DX组较BS-H组损伤轻。

2.2 BS对大鼠肺血管通透性的影响

NS组、LPS组、BS-L组、BS-H组、DX组大鼠肺组织W/D比值为4.443±0.388、7.572±0.352、6.514±0.261、5.723±0.368、5.063±0.437，组间比较差异有统计学意义（F=67.632，P<0.001）。

2.3 BS对各组大鼠肺组织病理改变的影响

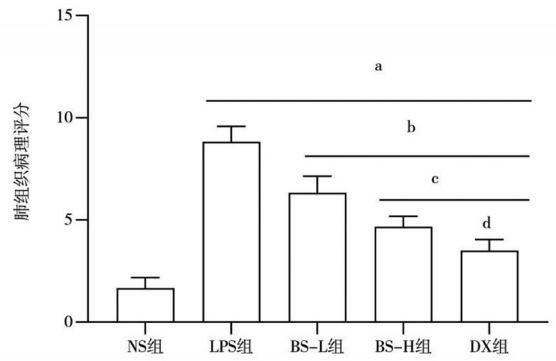
与NS组相比，LPS组大鼠肺组织镜下观察可见结构破坏严重，毛细血管明显充血，肺泡腔见出血，肺泡壁及肺泡间隔增厚，部分肺泡呈片状融合；BS不同剂量组及DX组大鼠肺组织上述病理改变减轻。见图1。各组大鼠肺组织HE染色病理评分分别为1.667±0.516、8.833±0.753、6.333±0.816、4.667±0.516、3.500±0.548。结果提示各组差异有统计学意义（F=108.669，P<0.001），与NS组相比，LPS组、BS不同剂量干预组、DX组上述分值升高（t=-19.308，-12.573，-8.082，-4.939，均P<0.001）；而BS不同剂量干预组、DX组较LPS组降低（t=-6.735，-11.225，-14.369，均P<0.001）；其中，BS-H组分值较BS-L组降低（t=-4.490，P<0.001）；DX组较BS-H组降低（t=-3.143，P=0.004）。见图2。



A. NS组大鼠肺组织HE染色（×100） B. LPS组大鼠肺组织HE染色（×100） C. BS-L组大鼠肺组织HE染色（×100）

D. BS-H组大鼠肺组织HE染色（×100） E. DX组大鼠肺组织HE染色（×100）

图1 各组大鼠肺组织HE染色(×100)



注：a，与NS组相比，$P<0.01$；b，与LPS组相比，$P<0.01$；c，与BS-L组相比，$P<0.01$；d，与BS-H组相比，$P<0.01$

图2 各组大鼠肺组织HE染色病理评分比较($\bar{x}\pm s$，$n=6$)

2.4 各组大鼠FCM检测肺组织中M1型肺泡巨噬细胞百分比

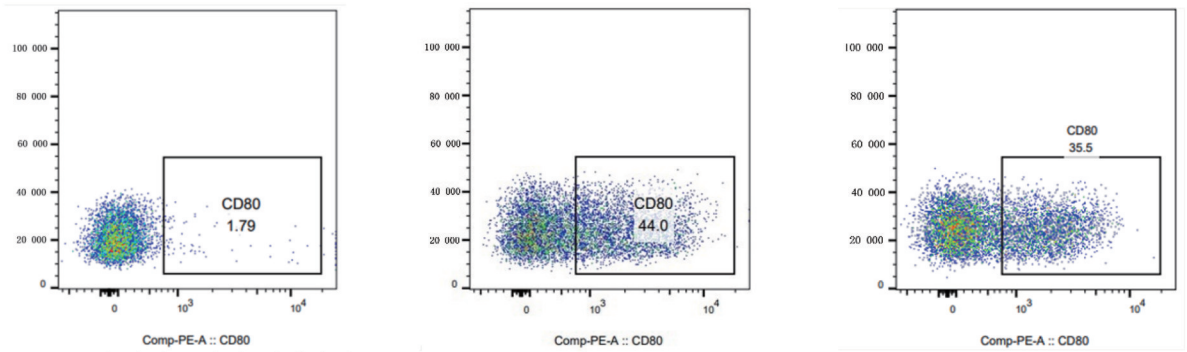
FCM检测肺组织中CD68标记的肺泡巨噬细胞和CD80标记的M1肺泡巨噬细胞，测定M1巨噬细胞所占百分比，见图3。结果提示：总体差异有统计学意义（$F=598.853$，$P<0.001$），NS组肺组织中M1型极化巨噬细胞少量表达；与NS组相比，LPS组肺组织中M1型巨噬细胞极化百分比明显增加（$t=-42.564$，$P<0.001$）；与LPS组相比，BS-L、BS-H、DX组中M1型巨噬细胞极化百分比逐渐降低（$t=-6.824$、-12.378、-28.670，均$P<0.001$），其中BS-H组百分比较BS-L组降低（$t=-5.554$，$P<0.001$）；DX组较BS-H组降低（$t=-16.292$，$P<0.001$），见图4。

2.5 Real-time PCR检测各组大鼠肺组织TNF-α、IL-1β、NF-κB p65 mRNA相对表达水平

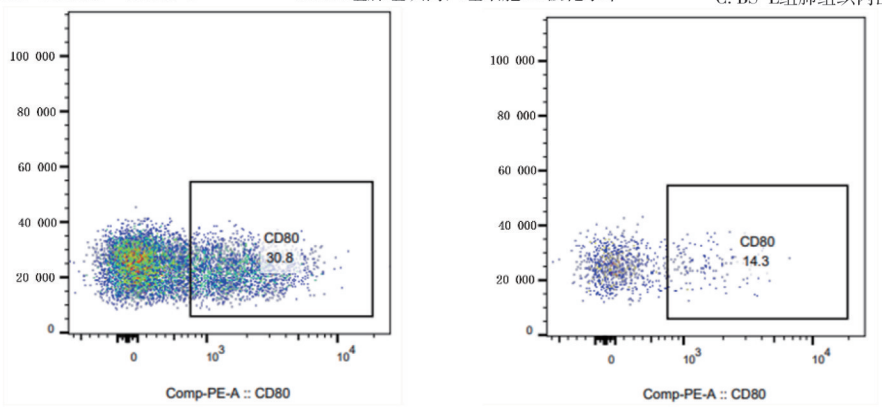
NS组、LPS组、BS-L组、BS-H组、DX组总体间TNF-α、IL-1β、NF-κB p65 mRNA相对表达水平差异均有统计学意义（$F=111.620$，$P<0.001$；$F=116.725$，$P<0.001$；$F=109.217$，$P<0.001$），与NS组相比，LPS组、BS-L组、BS-H组及DX组大鼠肺组织TNF-α mRNA、IL-1β mRNA、p65 mRNA相对表达量升高（TNF-α mRNA：$t=-19.357$、-9.635、-6.029、-3.056，$P<0.001$、$P<0.001$、$P<0.001$、$P=0.005$；IL-1β mRNA：$t=-23.101$、-9.826、-6.104、-2.974，$P<0.001$、$P<0.001$、$P<0.001$、$P=0.006$；p65 mRNA：$t=-18.929$、-11.243、-6.437、-3.308，$P<0.001$、$P<0.001$、$P<0.001$、$P=0.003$），与LPS组比较，BS-L组、BS-H组及DX组相对表达量降低（TNF-α mRNA：$t=-6.370$、-13.328、-16.301，P均<0.001；IL-1β mRNA：$t=-13.276$、-16.997、-20.127，均$P<0.001$；p65 mRNA：$t=-7.686$、-12.492、-15.621，均$P<0.001$），BS-H组较BS-L组降低（TNF-α mRNA：$t=-3.606$，$P=0.001$；IL-1β mRNA $t=-3.721$，$P=0.001$；p65 mRNA：$t=-4.086$，$P<0.001$），DX组较BS-H组TNF-α mRNA、IL-1β mRNA、p65 mRNA降低（TNF-α mRNA：$t=-2.973$，$P=0.006$；IL-1β mRNA：$t=-3.130$，$P=0.004$；p65 mRNA $t=-3.129$，$P=0.004$）。见表1。

2.6 BS对各组大鼠BALF中TNF-α、IL-1β水平变化的影响

NS组、LPS组、BS-L组、BS-H组、DX组大鼠BALF中TNF-α、IL-1β总体间差异有统计学意义（$F=62.199$，$P<0.001$；$F=277.385$；$P<0.001$），与NS组相比，LPS组、BS-L组、BS-H组及DX组大鼠BALF中TNF-α、IL-1β浓度升高（TNF-α：$t=-14.209$、-10.036、-6.299、-3.257，$P<0.001$、$P<0.001$、$P<0.001$、$P=0.003$；IL-1β：$t=-28.871$、-16.293、-6.280、-2.989，$P<0.001$、$P<0.001$、$P<0.001$、$P=0.006$），与LPS组比较，BS-L组、BS-H组及DX组浓度降低（TNF-α：$t=-4.173$、-7.910、-10.952，均$P<0.001$；IL-1β：$t=-12.578$、-22.591、-25.882，均$P<0.001$），BS-H组较BS-L组TNF-α、IL-1β降低（TNF-α：$t=-3.737$，$P<0.001$；IL-1β：$t=-10.013$，$P<0.001$），DX组较BS-H组降低（TNF-α：$t=-3.042$，$P=0.005$；IL-1β：$t=$

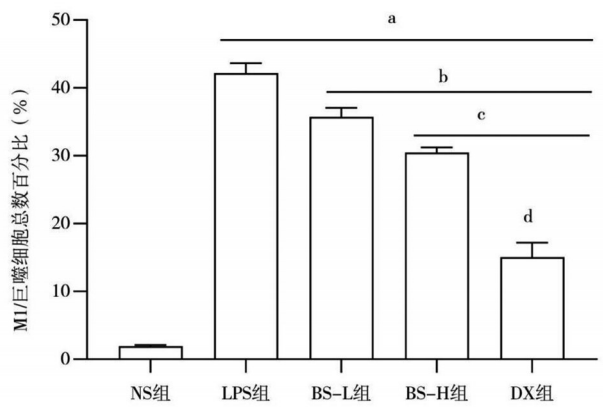


A. NS组肺组织内巨噬细胞M1极化水平　B. LPS组肺组织内巨噬细胞M1极化水平　C. BS-L组肺组织内巨噬细胞M1极化水平



D. BS-H组肺组织内巨噬细胞M1极化水平　E. DX组肺组织内巨噬细胞M1极化水平

图3　各组大鼠肺组织内巨噬细胞M1极化水平



注：a，与NS组相比，$P<0.01$；b，与LPS组相比，$P<0.01$；c，与BS-L组相比，$P<0.01$；d，与BS-H组相比，$P<0.01$

图4　各组大鼠肺组织内M1/巨噬细胞总数百分比（%）（$\bar{x}\pm s$，n=6）

表1　各组大鼠肺组织TNF-α mRNA、IL-1βmRNA、p65 mRNA相对表达量（$\bar{x}\pm s$，n=6）

组别	TNF-α mRNA	IL-1β mRNA	p65 mRNA
NS组	1.007 ± 0.132	1.009 ± 0.159	1.009 ± 0.151
LPS组	4.594 ± 0.643[a]	3.727 ± 0.410[a]	4.678 ± 0.636[a]
BS-L组	2.792 ± 0.200[ab]	2.318 ± 0.298[ab]	3.188 ± 0.166[ab]
BS-H组	2.124 ± 0.133[abc]	1.752 ± 0.116[abc]	2.257 ± 0.287[abc]
DX组	1.574 ± 0.16[abcd]	1.369 ± 0.054[abcd]	1.650 ± 0.164[abcd]

注：a，与NS组相比，$P<0.01$；b，与LPS组相比，$P<0.01$；c，与BS-L组相比，$P<0.01$；d，与BS-H组相比，$P<0.01$

-3.291，P=0.003）。见表2。

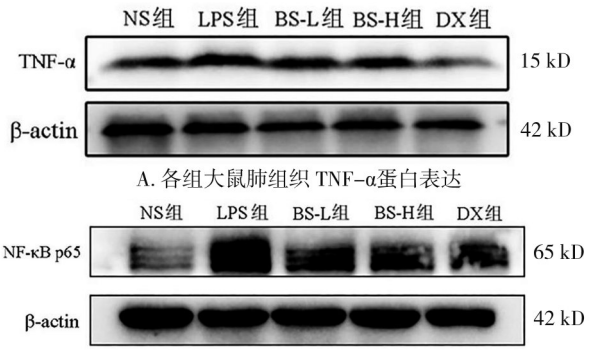
表2　各组大鼠BALF中TNF-α、IL-1β浓度的变化（pg/mL，s，n=6）

组别	TNF-α	IL-1β
NS组	11.382 ± 1.680	25.576 ± 2.170
LPS组	61.113 ± 9.751[a]	116.351 ± 7.976[a]
BS-L组	46.507 ± 8.392[ab]	76.803 ± 6.675[ab]
BS-H组	33.428 ± 3.167[abc]	45.322 ± 5.373[abc]
DX组	22.783 ± 2.318[abcd]	34.973 ± 2.55[abcd]

注：a，与NS组相比，$P<0.01$；b，与LPS组相比，$P<0.01$；c，与BS-L组相比，$P<0.01$；d，与BS-H组相比，$P<0.01$

2.7　WB检测大鼠肺组织TNF-α、NF-κB p65蛋白表达水平

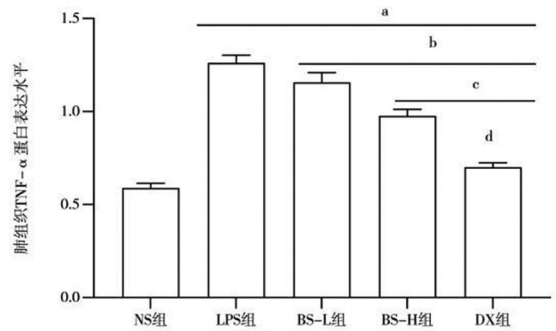
各组大鼠肺组织中TNF-α、NF-κB p65蛋白表达见图5。结果表明TNF-α、NF-κB p65蛋白表达总体间有差异（F=354.402，$P<0.001$；F=206.775，$P<0.001$），与NS组相比，LPS组、BS-L组、BS-H组及DX组大鼠肺组织TNF-α、NF-κB p65蛋白表达水平升高（TNF-α：t=-31.497、-26.551、-18.126、-5.177，均$P<0.001$；NF-κB p65：t=-25.177、-17.152、-12.553、-36.714，$P<0.001$、$P<0.001$、$P<0.001$、P=0.001），与LPS组比较，BS-L组、BS-H组及DX组蛋白表达水平降低（TNF-α：t=-4.946、-13.372、-26.319，均$P<0.001$；NF-κB p65：t=-8.024、-12.624、-21.504，均$P<0.001$），与BS-L组比较，BS-H组降低（TNF-α：t=-8.424，$P<0.001$，NF-κB p65：t=-45.994，$P<0.001$），与BS-H组比较，DX组降低（TNF-α：t=-12.951，$P<0.001$；NF-κB p65：t=-8.881，$P<0.001$），见图6。



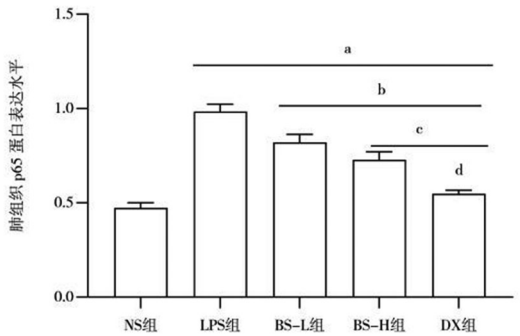
A. 各组大鼠肺组织 TNF-α蛋白表达

B. 各组大鼠肺组织NF-κB p65蛋白表达

图5 各组大鼠肺组织 TNF-α、NF-κB p65蛋白表达



A. TNF-α 蛋白表达水平（TNF-α/β-actin）



B. p65蛋白表达水平（p65/β-actin）

图6 各组大鼠TNF-α蛋白、NF-κB p65蛋白表达水平

($\bar{x} \pm s$, n=6)

3 讨 论

ALI/ARDS是临床上常见的急危重症之一，其以肺容积降低、通气/血流比例失调、急性进行性的呼吸困难、顽固性低氧血症及非心源性肺水肿为病理特征，具有病死率高的特点，给患者家庭及社会带来了沉重负担。因此，进一步研究ALI的发病机制，发现新的药物，对改善ALI患者的预后尤为重要。

目前研究发现ALI/ARDS与免疫过度激活、氧化应激、细胞因子风暴以及上皮细胞和内皮细胞损伤等有关[1]。人体细胞产生细胞因子，细胞因子结合细胞表面的受体后参与免疫调节和组织损伤修复等生物学进程。为了防御病原体带来的损害，免疫细胞产生大量细胞因子，形成细胞因子风暴。据报道，ALI/ARDS患者的BALF中IL-6和IL-8表达水平上调，当炎症发生时，IL-6和IL-8可通过激活不同信号通路途径产生炎症级联反应，促进ALI进展[19]。革兰氏阴性细菌细胞外膜的主要成分LPS，能够刺激多种免疫细胞聚集并激活，释放炎性介质，导致系统性炎症反应和免疫激活，引起体内组织损伤[1]。在LPS诱导的ALI小鼠模型中观察到的肺内白细胞聚集、肺水肿以及严重肺部炎症损伤等病理变化特点，与人类ALI病理过程高度相似[20]，其机制可能是LPS有效成分使肺泡结构破损严重，肺部毛细血管通透性明显增加，大量红细胞及炎细胞等渗出，使得肺泡腔及肺间质发生明显水肿，进而发生ALI，所以LPS可以广泛应用于ALI动物模型的建立。本研究通过给予大鼠舌下静脉注射LPS生理盐水溶液构建大鼠ALI模型。根据ALI模型评价标准，本研究中LPS组大鼠与ALI大鼠行为学改变一致，LPS组大鼠肺组织和镜下观察符合ALI病理特征。LPS组大鼠肺组织W/D比值较对照组升高，说明LPS可以增加大鼠肺血管通透性。另外，ELISA、Real-time PCR和WB检测发现LPS组大鼠BALF和肺组织中TNF-α、IL-1β表达水平升高，符合ALI炎症反应的特点，以上结果表明LPS诱导的大鼠ALI模型建立成功，可以用于后续实验。

肺组织巨噬细胞参与了ALI发生发展的全过程，是肺局部炎症反应和炎症微环境的重要调节细胞[5]。在肺损伤发生时，巨噬细胞通过释放细胞因子和趋化因子，使中性粒细胞和其他炎症细胞募集并激活，在炎症的启动及进展中发挥重要作用[5]。其中AM是肺内巨噬细胞发挥生物活性的主体，其具有高度可塑性，根据组织微环境的变化，可以极化为M1型或M2型。M1型巨噬细胞主要产生TNF-α、IL-1β、白细胞介素6（interleukin-6，IL-6）等促炎因子，M2型巨噬细胞主要产生转化生长因子-β1（transforming growth factor-beta 1，TGF-β1）、IL-10、白细胞介素-1受体拮抗剂（interleukin-1 receptor antagonist，IL-1Ra）等抗炎因子[5]。在本研究LPS诱导的ALI大鼠模型中，流式细胞学结果显示M1型巨噬细胞的比例升高，并且肺组织及BALF中

TNF-α、IL-1β的表达升高，表明LPS可以诱导AM的M1型极化，促进促炎因子的产生。以上结果说明M1极化可能参与了大鼠ALI的炎症进程。

NF-κB在多种组织细胞中广泛存在，可选择性与B细胞κ-轻链增强子结合，调控多种基因表达，在免疫应答及炎症反应程中发挥着关键性作用。当机体受到外界刺激时，NF-κB进入细胞核与特定的DNA靶点结合，启动多种促炎因子的转录与表达，释放IL-1β、IL-6、TNF-α等促炎性物质。而这些促炎因子可进一步以自分泌方式激活NF-κB信号，发生炎症级联反应[21]。Moine P等[22]研究发现NF-κB信号通路在ALI/ARDS患者的肺泡巨噬细胞和组织样本中被激活。在本研究中亦发现LPS诱导的ALI大鼠模型肺组织NF-κB p65表达升高。且另有多项研究表明，抑制NF-κB激活可有效缓解ARDS[23]。因此，NF-κB通路可能参与了LPS诱导的大鼠ALI进程，这与颜维孝、邱光玉等的文献报道一致[24-25]。Luan GX等[26]在LPS诱导的ALI小鼠模型中发现，抑制NF-κB通路能够抑制M1型巨噬细胞极化，显著降低LPS诱导的ALI小鼠死亡率。本研究也发现LPS诱导的ALI大鼠模型M1极化比例升高。所以推测NF-κB可能通过促进M1的极化参与LPS诱导的大鼠ALI进程。

ALI是严重的炎症性疾病，如不及时干预容易进展为ARDS。临床上主要侧重于预防ALI进展，皮质类固醇在缓解感染早期阶段的细胞因子风暴方面发挥着重要作用，但它们可能会引起严重的不良反应，所以寻找能有效减轻炎症反应、加快组织损伤修复且副作用小的药物是目前ALI治疗研究的难题。随着国家大力发展中药，越来越多临床病例证明中草药及其有效成分在防止ALI中具有一定作用，并通过体内外试验提供中药复方及其活性成分基于调控巨噬细胞改善肺部炎症的生物学证据[3]。BS目前已成为生命科学各领域特别是医学领域的研究热点。为了探索BS是否可以缓解大鼠ALI，本研究建立了BS预处理大鼠应用LPS诱导的ALI模型，发现不同剂量的BS预处理后，BALF和肺组织中TNF-α、IL-1β、p65的表达降低，提示BS可以减轻肺损伤的程度，并且呈剂量依赖性；为了进一步研究BS是否通过调节AM极化缓解ALI，本研究通过流式细胞学技术检测了AM的极化，发现应用BS后M1极化比例降低。同样，研究发现应用BS后，ALI大鼠肺组织NF-κB p65的表达降低。BS不同剂量干预组相互比较，M1极化水平、TNF-α、p65蛋白表达水平与BS浓度呈负相关关系。根据上述结果推测BS可以抑制NF-κB通路激活，抑制M1极化，减少炎症因子释放，从而缓解LPS诱导的大鼠ALI进程。地塞米松具有强大的抗炎、抗内毒素、抑制免疫等药理作用，广泛应用于多种疾病，故本研究选用地塞米松作为阳性对照，对比观察BS的疗效。在上述实验中，DX组中TNF-α、IL-1β、p65的表达以及M1的极化水平较BS不同剂量组降低，BS不同剂量干预组疗效较DX组逊色，这可能与糖皮质激素作为抗炎药全面抑制ALI气道炎症有关，也可能与BS水溶性和生物利用度差相关，未来可以进一步研究新型给药方案可能会改善这一缺点。

综上所述，BS可能可以抑制NF-κB信号通路的激活，可以抑制巨噬细胞M1型极化，减少炎性介质、细胞因子的产生与释放，从而减轻ALI。

参 考 文 献

[1] Li LL, Zhu YG, Jia XM, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorating *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung infection *via* inhibition of NLRC4 inflammasome[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 10: 581535.

[2] 付静怡，汪 雷，杨 异. 急性肺损伤动物模型建立的研究进展[J]. 上海交通大学学报(医学版)，2021，41(5)：690-694.
Fu JY, Wang L, Yang Y. Research progress in animal model of acute lung injury[J]. J Shanghai Jiao Tong Univ Med Sci, 2021, 41(5): 690-694.

[3] 薛 磊. 急性肺损伤治疗策略的现状与未来[J]. 上海医学，2021，44(8)：571-575.
Xue L. Treatment strategy of acute lung injury: present and future[J]. Shanghai Med J, 2021, 44(8): 571-575.

[4] Dong T, Chen XY, Xu HC, et al. Mitochondrial metabolism mediated macrophage polarization in chronic lung diseases[J]. Pharmacol Ther, 2022, 239: 108208.

[5] Cheng PY, Li SY, Chen HY. Macrophages in lung injury, repair, and fibrosis[J]. Cells, 2021, 10(2): 436.

[6] Luo Y, Mo D, Guo HJ, et al. NF-κB inactivation attenuates the M1 macrophage polarization in experimental necrotizing enterocolitis by glutaredoxin-1 deficiency[J]. Cell Biol Int, 2022, 46(11): 1886-1899.

[7] 袁 静，夏金婵，郭晓琦，等. 基于巨噬细胞可塑性的中药防治急性肺损伤的研究进展[J]. 实用医学杂志，2022，38(5)：644-649.
Yuan J, Xia JC, Guo XQ, et al. Research progress on traditional chinese medicine for the prevention and treatment of acute lung injury based on

macrophage plasticity [J]. Pract Med J, 2022, 38(5): 644-649.

[8] Babu S, Jayaraman S. An update on β-sitosterol: a potential herbal nutraceutical for diabetic management[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: 110702.

[9] 龙 敏, 刘克琴, 岳 煜, 等. 黄连解毒汤调控 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路改善大鼠脓毒症急性肺损伤[J/OL]. (2024-09-30) [2025-04-01]. https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx filename=ZSFX20240929001&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ.

Long M, Liu KQ, Yue Y, et al. Huanglian Jiedu Decoction regulates Nrf2/SLC7A11/GPX4 signaling pathway to improve acute lung injury in rats with sepsis[J/OL]. (2024-09-30) [2025-04-01]. https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx filename=ZSFX20240929001&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ.

[10] 蒋紫云, 袁庆霖, 陈余姗, 等. 苇芩泻白汤在急性肺损伤中的分子机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2025, 36(4): 542-551.

Jiang ZY, Yuan QL, Chen YS, et al. Molecular mechanism study of Weichen Xiebai Decoction in acute lung injury [J]. N Chin Med Clin Pharmacol, 2025, 36(4): 542-551.

[11] 陈石生, 叶健文, 严建刚, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨臻呼畅组合物改善急性肺损伤的作用机制[J]. 食品与发酵科技, 2024, 60(5): 44-55.

Chen SS, Ye JW, Yan JG, et al. Exploring the mechanism of SSD compound on acute lung injury improvement based on network pharmacology and experiment research[J]. Food Ferment Sci Technol, 2024, 60(5): 44-55.

[12] 罗 成, 叶远航, 姜 成, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨宣白承气汤治疗急性肺损伤的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(16): 4329-4337.

Luo C, Ye YH, Jiang C, et al. Mechanism of Xuanbai Chengqi Decoction in treating acute lung injury based on network pharmacology and experimental verification[J]. China J Chin Mater Med, 2024, 49(16): 4329-4337.

[13] 周 强, 张 坤, 李富强, 等. β-谷甾醇缓解 LPS 诱导的急性肺损伤大鼠炎症反应和纤维化[J]. 西部医学, 2022, 34(6): 813-818.

Zhou Q, Zhang K, Li FQ, et al. β-sitosterol alleviated inflammation response and fibrosis in rats with LPS-induced acute lung injury[J]. Med J West China, 2022, 34(6): 813-818.

[14] 刘莉莉, 陈 敏. β-谷甾醇对脂多糖诱导的小鼠乳腺上皮细胞炎症反应及乳蛋白合成的影响 [J]. 动物营养学报, 2023, 35(10): 5994-6003.

Liu LL, Chen M. The Effects of β-sitosterol on inflammatory response and milk protein synthesis in mouse mammary epithelial cells induced by lipopolysaccharide [J]. Chin J Anim Nutr, 2023, 35(10): 5994-6003.

[15] Chen XD, Chen J, Ren Y, et al. β-sitosterol enhances lung epithelial cell permeability by suppressing the NF-κB signaling pathway [J]. Discov Med, 2023, 35(179): 946-955.

[16] Khan Z, Nath N, Rauf A, et al. Multifunctional roles and pharmacological potential of β-sitosterol: emerging evidence toward clinical applications[J]. Chem Biol Interact, 2022, 365: 110117.

[17] 何大学. 植物甾醇抗急性肺损伤的应用与机制初探[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2022.

He DX. Preliminary study on the application and mechanism of phytosterol against acute lung injury[D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2022.

[18] Kulkarni HS, Lee JS, Bastarache JA, et al. Update on the features and measurements of experimental acute lung injury in animals: an official American thoracic society workshop report[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2022, 66(2): e1-e14.

[19] Ochocka N, Segit P, Walentynowicz KA, et al. Single-cell RNA sequencing reveals functional heterogeneity of glioma-associated brain macrophages[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 1151.

[20] Wang XS, Zhou LY, Ye SS, et al. rFGF4 alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting the TLR4/NF-κB signaling pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 117: 109923.

[21] Capece D, Verzella D, Flati I, et al. NF-κB: blending metabolism, immunity, and inflammation[J]. Trends Immunol, 2022, 43(9): 757-775.

[22] Moine P, McIntyre R, Schwartz MD, et al. NF-kappaB regulatory mechanisms in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome[J]. Shock, 2000, 13(2): 85-91.

[23] Peng JN, Tang R, He J, et al. S1PR3 inhibition protects against LPS-induced ARDS by inhibiting NF-κB and improving mitochondrial oxidative phosphorylation[J]. J Transl Med, 2024, 22(1): 535.

[24] 颜维孝, 宋亚娣, 李 娟. 培菲康通过下调 TLR4/NF-κB 信号减轻哮喘小鼠气道炎症及气道重塑[J]. 免疫学杂志, 2023, 39(6): 478-486.

Yan WX, Song YD, Li J. Pefigen reduces airway inflammation and airway remodeling in asthmatic mice by down-regulating TLR4/NF-κB signaling[J]. J Immunol, 2023, 39(6): 478-486.

[25] 邱光钰, 曹锋生, 黄 敏, 等. 下调 lncRNA NEAT1 通过 NF-κB 信号传导途径抑制 TNF-α 诱导的肺泡上皮细胞 A549 氧化损伤和炎症因子释放[J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(7): 1409-1414.

Qiu GY, Cao FS, Huang M, et al. Down-regulation of lncRNA NEAT1 inhibits TNF-α-induced oxidative damage and inflammatory factors release in alveolar epithelial cells A549 through NF-κB signaling pathway [J]. Chin J Immunol, 2023, 39(7): 1409-1414.

[26] Luan GX, Pan F, Bu LN, et al. Butorphanol promotes macrophage phenotypic transition to inhibit inflammatory lung injury *via* κ receptors [J]. Front Immunol, 2021, 12: 692286.

(收稿: 2025-04-02; 修回: 2025-07-18; 录用: 2025-08-13)

(责任编辑: 曾 玲)