DOI:10.16016/j.2097-0927.202206077

丹参酮ⅡA通过调控中性粒细胞胞外诱捕网保护脓毒症小鼠急性肺损伤

张晓慧[1],陈聪敏[1],丁新耘[1],董旭鹏[1],马玉清[2] 730000 兰州,兰州大学:第一临床医学院[1],第一医院麻醉科[2]

[摘要] **目的** 研究丹参酮ⅡA(tanshinoneⅡA,TanⅡA)对脓毒症小鼠急性肺损伤(acute lung injury,ALI)作用,并探讨其对中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps,NETs)的影响及可能机制。**方法** 采用腹腔注射脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)建立小鼠脓毒症模型。雄性6~8周龄C57BL/6小鼠30只,随机数字表法分为5组(n=6):①正常组(Nor组);②脂多糖组(LPS组,腹腔注射LPS 10 mg/kg);③丹参酮ⅡA组(LPS+TanⅡA组,LPS前30 min腹腔注射TanⅡA 30 mg/kg);④LY294002组(LPS+LY294002组,提前注射LY294002 30 mg/kg);⑤二甲基亚砜组(LPS+DMSO组,提前注射给药组等量DMSO)。造模12 h取材,计算肺系数,HE染色观察肺组织病理变化,ELISA检测肺组织炎症因子IL-1β、IL-10水平和NETs标志物MPO-DNA复合物、瓜氨酸化组蛋白H3(Cit H3)水平,Western blot检测PI3K/AKT信号通路的磷酸化水平。**结果** 相较于Nor组,LPS组肺系数增加,HE染色显示肺组织受损,肺组织IL-1β水平升高(P<0.05),IL-10水平下降(P<0.05),MPO-DNA复合物、Cit H3均显著增加(P<0.05),p-PI3K和p-AKT水平升高(P<0.05)。相较于LPS组,LPS+TanⅡA组和LPS+LY294002组肺系数降低,HE染色及肺损伤Smith评分显示肺组织病理损伤情况减轻,肺组织IL-1β水平增加(P<0.05),IL-10水平降低(P<0.05),MPO-DNA复合物、Cit H3显著减少(P<0.05),p-PI3K和p-AKT水平降低(P<0.05)。**结论** 丹参酮ⅡA可以减轻脓毒症ALI,其机制可能是通过抑制PI3K/AKT信号通路,调控NETs水平,减轻炎症反应。

[关键词] 急性肺损伤;丹参酮ⅡA;中性粒细胞胞外诱捕网;PI3K/AKT

[中图法分类号] R285.5;R563.9;R631.2 [文献标志码] A

Tanshinone Ⅱ A protects acute lung injury in septic mice by regulating neutrophil extracellular traps

ZHANG Xiaohui[1], CHEN Congmin[1], DING Xinyun[1], DONG Xupeng[1], MA Yuqing[2] [1]First Clinical Medical College, Lanzhou University; [2]Department of Anesthesiology, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730000, China

[**Abstract**] **Objective** To observe the effect of tanshinone Ⅱ A (Tan Ⅱ A) on acute lung injury (ALI) in septic mice, and to explore its effect on neutrophil extracellular traps (NETs) and its possible mechanism. **Methods** A mouse model of sepsis was established by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) at a dose of 10 mg/kg. Thirty male C57BL/6 mice aged 6~8 weeks were randomly divided into 5 groups (n = 6): Normal group (Nor group), LPS group, LPS+Tan Ⅱ A group (30 mg/kg Tan Ⅱ A was injected intraperitoneally 30 min before LPS injection), LPS+LY294002 group (pre-injection of 30 mg/kg LY294002), and LPS+DMSO group (pre-injection of the same amount of DMSO). At 12 h after modeling, the lung tissues were collected, lung coefficients were calculated, and pathological changes of lung tissue were observed with HE staining. ELISA was used to detect the levels of inflammatory factors IL-1β and

[基金项目] 甘肃省自然科学基金(21JRIRA077)

[通信作者] 马玉清,E-mail:myq2392466@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

IL-10 and NETs markers MPO-DNA complex and citrolinated histone H3 (Cit H3) in lung tissue. Western blotting was applied to detect the phosphorylation of the PI3K/AKT signaling pathway. **Results** Compared with the Nor group, the LPS group had an increased lung coefficient, significantly damaged lung tissue, increased levels of IL-1β ($P<0.05$) and decreased level of IL-10 ($P<0.05$), and elevated MPO-DNA complex and Cit H3 levels ($P<0.05$) as well as the levels of p-PI3K and p-AKT ($P<0.05$). While, the above conditions were much better in the LPS+TanⅡA group and the LPS+LY294002 group than the LPS group, with decreased lung coefficient, alleviated lung injury by HE staining and Smith scores, increased level of IL-1β and decreased IL-10 level in the lung tissue ($P<0.05$), reduced levels of MPO-DNA complex and Cit H3 ($P<0.05$) and p-PI3K and p-AKT ($P<0.05$). **Conclusion** TanⅡA can alleviate sepsis-induced ALI, and its mechanism may be through inhibiting PI3K/AKT signaling pathway, regulating the level of NETs, and thus reducing the inflammatory response.

[**Key words**] sepsis; acute lung injury; tanshinoneⅡA; neutrophils extracellular traps; PI3K/AKT

Supported by the Natural Science Foundation of Gansu Province (21JRIRA077). Corresponding author: MA Yuqing, E-mail: myq2392466@163.com

脓毒症被定义为由于宿主对于感染反应失调而导致的危及生命的器官功能障碍[1]。脓毒症在我国重症医学科收治患者中发病率可超过20%,90 d死亡率达35.5%[2]。急性肺损伤(acute lung injury,ALI)是脓毒症患者最重要的并发症,易感性高且进展迅速[3]。在脓毒症发生时,中性粒细胞作为重要的先天免疫细胞最先到达感染部位,而中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps,NETs)是一种新的中性粒细胞死亡机制的产物[4],其主要结构包括去聚化的DNA以及瓜氨酸化组蛋白H3(citrullinated histone H3,Cit H3)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)、中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase,NE)等,NETs具有一定捕获和消灭病原微生物的作用,但过度形成将进一步加重脓毒症ALI[5]。丹参酮是从丹参根茎和干根中提取的主要天然产物,TanⅡA是丹参酮中含量最高的脂溶性成分,具有活血祛瘀,通经止痛的作用[6]。现代医学研究发现其还有抗炎、降低氧化应激反应等作用。研究表明TanⅡA通过调节巨噬细胞极化,降低炎症因子表达水平,改善ALI[7]。尚有研究发现TanⅡA通过减少NETs形成并抑制炎症反应减轻小鼠慢性骨关节炎[8]。PI3K/AKT信号通路可激活NF-κB参与相关炎症反应[9],TAI等[10]发现TanⅡA可通过调控PI3K/AKT减轻肺组织中性粒细胞浸润及肺细胞凋亡,改善肾缺血再灌注损伤造成的ALI。TanⅡA对脓毒症ALI的作用及其与NETs的关系,尚未见相关报道。本研究采用脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)腹腔注射制备脓毒症小鼠模型,探讨TanⅡA对脓毒症ALI的作用及其与NETs的关系和可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要试剂

SPF级健康6~8周雄性C57BL/6小鼠,体质量20~25 g,由兰州大学实验动物中心提供。小鼠正常进食,自由进水,人工光照和黑暗时间12 h交替[动物许可证号:SCXK(甘)2018-0002]。适应性饲养1周后进行实验。LPS购于美国Sigma公司,PI3K抑制剂LY294002购于美国MCE公司,TanⅡA、二甲基亚砜(DMSO)、磷酸缓冲盐溶液(PBS)、RIPA裂解液购于北京索莱宝科技有限公司,兔抗鼠磷酸化磷脂酰肌醇-3-激酶[PI3 kinase p85(phospho Tyr467)/p55(phospho Tyr199) p-PI3K]、兔抗鼠磷酸化蛋白激酶B(AKT phospho Thr308,p-AKT)抗体购自美国GeneTex公司,白介素-1β(IL-1β)、白介素-10(IL-10)、MPO-DNA复合物、Cit H3酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司。依照参考文献[11]将10 mg LY294002及10 mg TanⅡA分别溶解于DMSO溶液20 μL,配制成浓度为0.5 g/mL的母液,4 ℃冰箱保存。小鼠腹腔注射前使用PBS按照1∶1 000将LY294002及TanⅡA母液稀释成浓度为0.5 mg/mL溶液,含0.1%DMSO。实验过程中动物处理措施符合伦理学要求,获得了兰州大学第一医院伦理委员会批准(审批号:LDYYLL2022-294)。

1.2 实验动物分组

30只小鼠按随机数字表法分为5组($n=6$):①正常组(Nor组);②脂多糖组(LPS组),腹腔注射LPS(10 mg/kg)[12];③丹参酮ⅡA组(LPS+TanⅡA组),LPS处理前30 min腹腔注射丹参酮ⅡA(30 mg/kg)[10];④LY294002组(LPS+LY294002组),LPS处理前

30 min 腹腔注射 LY294002(30 mg/kg)[13];⑤二甲基亚砜组(LPS+DMSO 组)在相同时间给予等量 0.1% DMSO 的 PBS 溶液作为对照。依照相关文献[10,13]和本研究预实验结果,选取 30 mg/kg 作为丹参酮ⅡA 和 LY294002 的小鼠给药量。

1.3 标本采集与观察指标

LPS 造模 12 h 处死小鼠,沿胸骨正中线剪开胸骨,充分暴露胸腔后取出肺脏。

1.3.1 肺系数检测 取肺脏吸干表面水分后称量,计算肺系数。肺系数=湿肺质量(mg)/小鼠体质量(g)[14]。

1.3.2 肺组织病理结构改变 取肺组织后,置于 4%多聚甲醛中固定 48 h,脱水后石蜡包埋、切片、HE 染色,显微镜下观察肺组织病理结构改变,肺组织病理评分依照 Smith 评分系统[15]从肺水肿、炎症细胞浸润、肺不张、出血和透明膜形成进行 0~4 分的半定量分析,每只小鼠取 2 张切片,每张切片观察 6 个视野,由两位病理科医师盲法判定评分结果后取平均值。

1.3.3 肺组织炎症相关因子 IL-1β、IL-10,NETs 标志物 MPO-DNA 复合物及 Cit H3 表达水平 肺组织称质量,按照 1 g 组织加入 9 mL PBS 的比例加入 PBS,在冰水浴中尽量剪碎组织,随后按照每 20 mg 肺组织中加入 150~200 μL RIPA 裂解液的比例加入裂解液,在冰上使用匀浆机制备成 10%肺组织匀浆。将制备好的 10%匀浆使用离心机 4 ℃,1 000×*g* 离心 15 min,离心后的匀浆取上清液进行分装,-80 ℃放置保存。按照 ELISA 试剂盒说明书检测肺匀浆炎症因子 IL-1β、IL-10 水平以及 NETs 标志物 MPO-DNA 复合物、Cit H3 水平。

1.3.4 Western blot 检测 PI3K/AKT 信号蛋白磷酸化表达水平 取-80 ℃肺组织匀浆,蛋白定量,经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 1.5 h,电转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,洗膜后加入 p-PI3K、p-AKT 一抗和 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)内参蛋白(稀释度均为 1∶1 000)4 ℃孵育过夜。次日洗膜,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗(稀释度均为 1∶50 000)37 ℃摇床孵育 2 h,含吐温-20 的 Tris-HCl 缓冲盐溶液(TBST)充分洗膜。电化学发光法显色曝光,采集图像,用 Image J 软件分析各组条带灰度值,以目标蛋白与内参蛋白的灰度值比值反映目标蛋白表达量。

1.4 统计学分析

采用 Graphpad Prism 9.0 软件进行数据统计学分析。本研究实验数据均为计量资料且符合正态分布,采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD-*t* 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般状态

LPS 造模 12 h,Nor 组小鼠精神状态、饮食、活动、呼吸及对刺激反应较造模前无明显改变;LPS 组及 LPS+DMSO 小鼠精神萎靡,进水进食量减少,寒战,呼吸急促,鼻腔及眼角分泌物增多,毛发无光泽,竖毛;LPS+TanⅡA 组和 LPS+LY294002 组小鼠上述表现较 LPS 组轻微。

2.2 各组小鼠肺系数比较

Nor 组、LPS 组、LPS+TanⅡA 组、LPS+LY294002 组及 LPS+DMSO 组小鼠体质量比较差异均无统计学意义。与 Nor 组相比,LPS 组湿肺质量及肺系数增加($P<0.05$);与 LPS 组相比,LPS+TanⅡA 组和 LPS+LY294002 组湿肺质量及肺系数明显降低($P<0.05$);LPS+LY294002 组与 LPS+TanⅡA 组相比湿肺质量及肺系数无统计学差异;与 LPS 组相比,LPS+DMSO 组湿肺质量及肺系数无明显差异,见表 1。

表 1 各组小鼠肺系数比较($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

组别	体质量/g	湿肺质量/mg	肺系数/mg·g^{-1}
Nor 组	27.47±2.78	107.01±5.57	3.91±0.19
LPS 组	25.39±2.20	135.10±5.33[a]	5.34±0.27[a]
LPS+TanⅡA 组	25.35±2.76	112.61±5.26[b]	4.46±0.24[b]
LPS+LY294002 组	23.83±2.23	111.58±6.47[b]	4.51±0.16[b]
LPS+DMSO 组	25.78±1.90	135.55±4.59	5.27±0.34

a:$P<0.05$,与 Nor 组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组比较

2.3 各组小鼠肺组织病理结构改变

光镜下观察 Nor 组肺组织结构完整,肺泡及间质未见水肿和明显炎性浸润;LPS 组肺间质水肿,肺泡明显萎陷,坏死组织出现,肺泡和间质可见大量炎症细胞浸润,肺泡腔可见出血及透明膜形成;LPS+TanⅡA 组肺泡充血、出血、炎症渗出、肺泡壁增厚和透明膜形成等损伤有所减轻;LPS+LY294002 组肺水肿和肺不张减轻,肺泡及间质炎症细胞浸润减少,肺泡出血减轻;LPS+DMSO 组肺泡结构紊乱,肺组织大量炎症细胞浸润,肺组织水肿明显,见图 1。

与 Nor 组相比,LPS 组 Smith 评分明显增加($P<0.05$);与 LPS 组相比,LPS+TanⅡA 组和 LPS+LY294002 组 Smith 评分均明显降低($P<0.05$);LPS+LY294002 组与 LPS+TanⅡA 组相比 Smith 评分无统计学差异;与 LPS 组相比,LPS+DMSO 组 Smith 评分无统计学差异,见图 2。

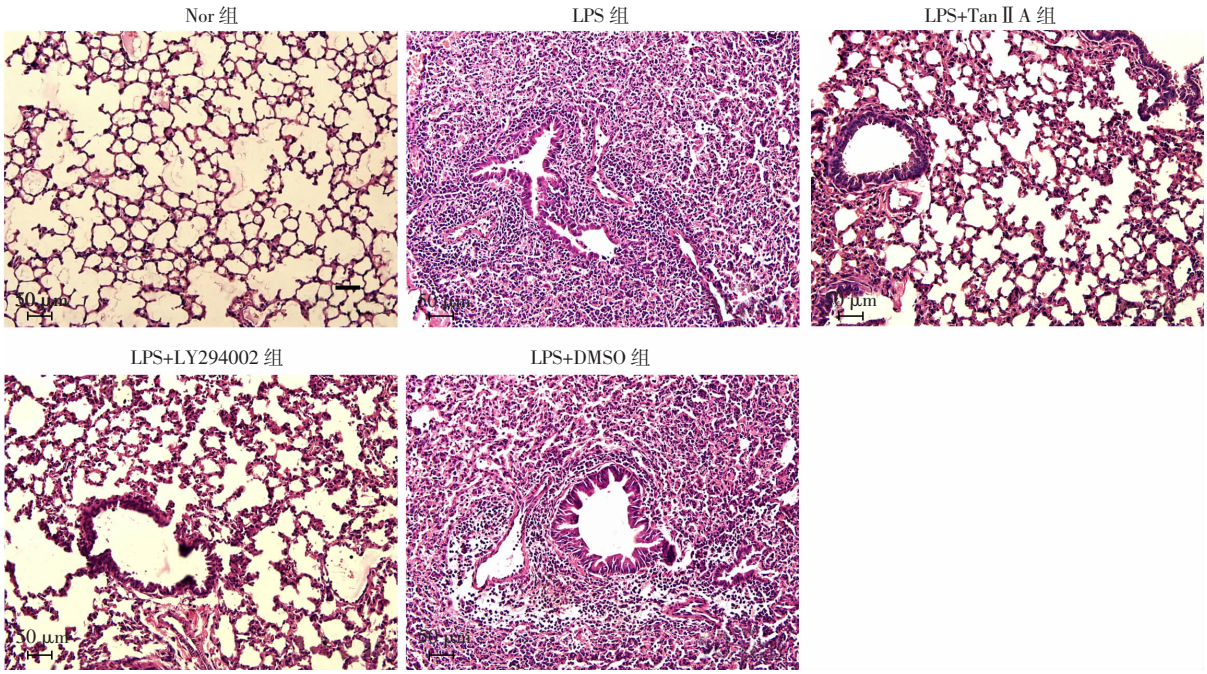
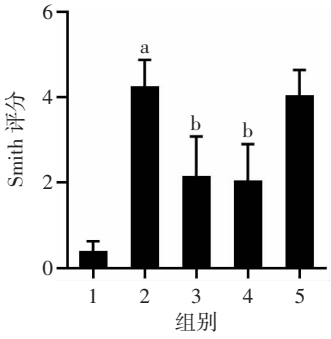


图 1 HE 染色观察各组小鼠肺组织病理学变化



a:$P<0.05$,与 Nor 组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组比较
1:Nor 组;2:LPS 组;3:LPS+Tan Ⅱ A 组;4:LPS+LY294002 组;5:LPS+DMSO 组

图 2 各组小鼠肺损伤 Smith 评分比较($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

2.4 各组小鼠肺组织 IL-1β、IL-10、MPO-DNA 复合物及 Cit H3 表达变化

ELISA 试剂盒检测各组小鼠肺组织炎症因子 IL-1β 和 IL-10 的表达情况,结果显示:与 Nor 组相比,LPS 组中 IL-1β、IL-10 表达增加;与 LPS 组相比,LPS+Tan Ⅱ A 组在 Tan Ⅱ A 预处理后 IL-1β 表达相对下降而 IL-10 表达升高($P<0.05$),LPS+LY294002 组在 LY294002 预处理后 IL-1β 表达相对下降而 IL-10 表达升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。此外,LPS+LY294002 组与 LPS+Tan Ⅱ A 组相比,IL-1β 和 IL-10 表达无统计学差异,见图 3。

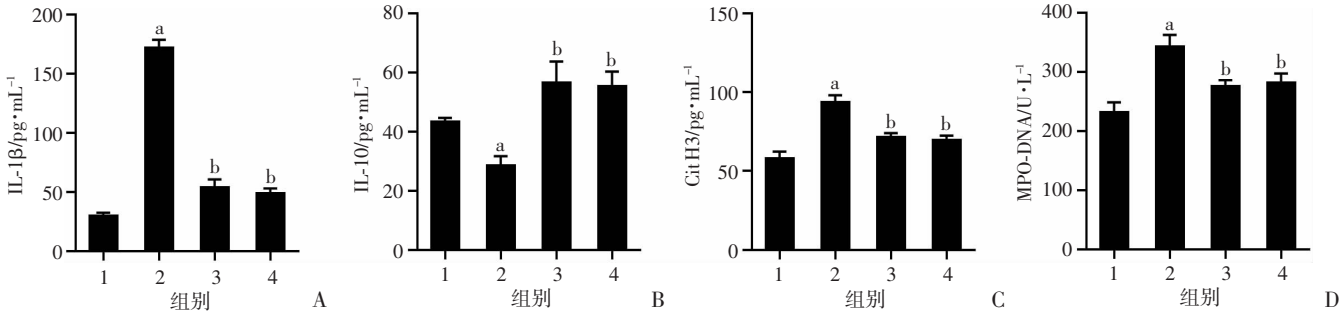
ELISA 试剂盒检测各组小鼠肺组织 NETs 标志物 Cit H3、MPO-DNA 复合物表达,结果显示:与 Nor 组相比,LPS 组中 Cit H3 和 MPO-DNA 复合物表达显著增加($P<0.05$);而 LPS+Tan Ⅱ A 组和 LPS+LY294002 组分别与 LPS 组相比,Cit H3 和 MPO-DNA 复合物表达均下降($P<0.05$)。LPS+LY294002 组与 LPS+Tan Ⅱ A 组相比,Cit H3 和 MPO-DNA 复合物表达无统计学差异,见图 3。

2.5 各组小鼠肺组织 PI3K/AKT 信号通路磷酸化水平变化

Western blot 检测各组小鼠肺组织 p-PI3K 和 p-AKT 表达情况,结果显示:与 Nor 组相比,LPS 组小鼠肺组织 p-PI3K、p-AKT 蛋白表达明显增加($P<0.05$);LPS+Tan Ⅱ A 组和 LPS+LY294002 组分别与 LPS 组相比,p-PI3K、p-AKT 蛋白表达均下降($P<0.05$);LPS+LY294002 组与 LPS+Tan Ⅱ A 组相比,p-PI3K、p-AKT 蛋白表达无统计学差异。见图 4。

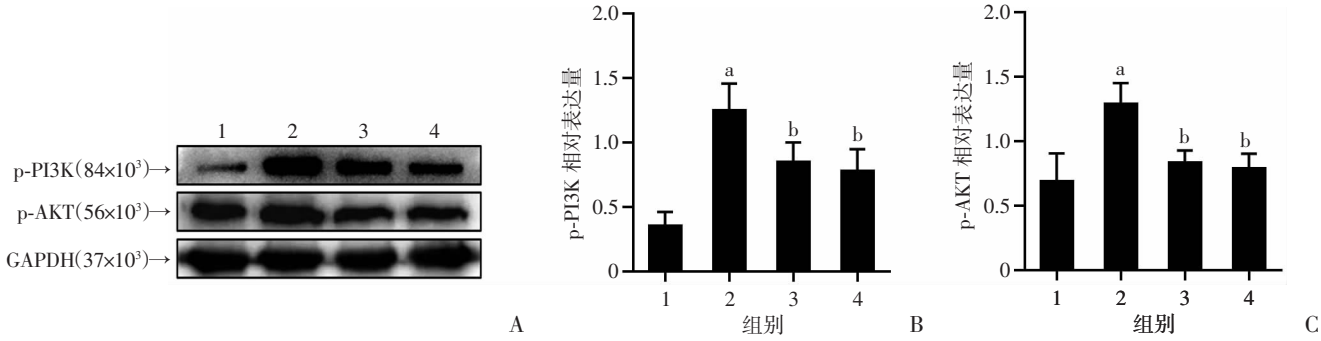
3 讨论

本实验通过腹腔注射 LPS 建立小鼠脓毒症 ALI 模型,LPS 组小鼠造模后 12 h,出现精神萎靡、进水进食量减少、寒战、呼吸急促等症状,肺系数显著增加,出现肺水肿,肺组织病理学显示肺泡明显萎陷并可见出血及透明膜形成,肺泡和间质可见大量炎症细胞浸润,肺损伤 Smith 评分升高,提示小鼠脓毒症 ALI 模型制备成功。本实验中 Tan Ⅱ A 及 LY294002 使用 DMSO 作为溶剂,因此设置 LPS+DMSO 组作为溶剂对照组,相较于 LPS 组,LPS+DMSO 组肺系数、肺组织病理学变化及肺损伤 Smith 评分均无明显差异,表明 DMSO 作为药物溶剂对本实验结果无明显影响。



a:$P<0.05$,与 Nor 组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组比较;1:Nor 组;2:LPS 组;3:LPS+TanⅡA 组;4:LPS+LY294002 组

图 3 ELISA 法检测各组小鼠肺组织 IL-1β(A)、IL-10(B)和 Cit H3(C)、MPO-DNA 复合物(D)水平($\bar{x}\pm s$,$n=6$)



1:Nor 组;2:LPS 组;3:LPS+TanⅡA 组;4:LPS+LY294002 组;a:$P<0.05$,与 Nor 组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组比较

A:Western blot 检测肺组织 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白表达水平;B:p-PI3K 蛋白相对表达量统计分析;C:p-AKT 蛋白相对表达量统计分析

图 4 Western blot 检测各组小鼠肺组织 p-PI3K 和 p-AKT 的蛋白表达水平($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

3.1 丹参酮ⅡA 预处理减轻脓毒症 ALI

脓毒症 ALI 出现于多数脓毒症患者中,发病率高且危及生命,严重影响国民健康及生活质量[16]。脓毒症 ALI 发病过程中大量炎症因子活化、肺间质水肿、肺毛细血管内皮以及肺泡毛细血管通透性出现广泛损伤,而脓毒症 ALI 根本原因为抗炎介质与促炎介质之间的失衡[3]。TanⅡA 作为丹参酮中最关键的活性成分,被认为有广泛的抗炎作用[17]。本研究发现,与 LPS 组相比,LPS+TanⅡA 组肺系数降低,病理组织学结果显示肺泡塌陷、出血及大量炎症细胞浸润等损伤减轻,Smith 评分明显降低,表明 TanⅡA 对脓毒症 ALI 具有一定保护作用。这与一些研究结果相似,QUAN 等[18]研究发现 TanⅡA 通过调节 Sirt1/NF-κB 信号通路阻止 LPS 诱导的炎症因子分泌,发挥 ALI 小鼠保护作用;JIANG 等[19]研究证实 TanⅡA 可减轻 LPS 导致的成纤维细胞中 IL-1β 和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)表达增加,并减少细胞增殖和其向肌成纤维细胞转化,减轻 ALI 造成的炎症及肺纤维化。

3.2 丹参酮ⅡA 调控 NETs 降低脓毒症 ALI 炎症水平

大量研究证实脓毒症 ALI 与 NETs 关系密切,MENG 等[20]研究发现脓毒症小鼠中 NETs 含量显著上升,而在注射重组人脱氧核糖核酸酶(rh DNase)后,肺组织中性粒细胞浸润减少,NETs 水平降低的同时炎症相关因子水平也显著降低,脓毒症 ALI 有所减轻,小鼠中位生存期延长。同时,红花及虎杖苷等传统药物被证实可通过调控 NETs 并减少炎症因子的释放,减轻 ALI[21-22],而 TanⅡA 对于脓毒症 ALI 的作用是否与 NETs 有关尚未见相关报道。

NETs 是一种基于染色质的网状结构,包含 MPO、NE、乳铁蛋白、明胶酶以及组蛋白等[23]。在脓毒症发生发展过程中 NETs 具有一定清除病原体的作用,然而当 NETs 过度形成时,将对机体造成损害,如 NETs 中的 MPO 和组蛋白等成分可直接损伤肺脏的内皮细胞和上皮细胞,也可作为损伤相关分子模式(DAMPs)启动炎症反应[4],进一步加重脓毒症 ALI。由于结构的复杂性,目前尚无方法可直接检测 NETs,主要通过检测其特异性成分的表达来反映其存在。其中精氨酸脱亚胺酶 4(PAD4)介导产生组蛋白瓜氨酸化产生 Cit H3 被认为是 NETs 形成的关键步骤[24],因此 Cit H3 被广泛应用于检测 NETs 的表达。MPO 作为 NETs 发挥作用的重要组分之一,镶嵌于 DNA 上与其他成分共同组成 NETs。研究表明测量 MPO-DNA 复合物可

能比单独评估细胞游离 DNA(cf DNA)量化 NETs 更具特异性[25],因此本研究选用 Cit H3、MPO-DNA 复合物作为 NETs 的检测指标。本研究中观察到 LPS 组 NETs 标志物 MPO-DNA 复合物、Cit H3 表达水平上调,炎症反应增强,肺水肿及肺组织病理损伤严重,表明脓毒症 ALI 过程中 NETs 形成增加,炎症水平上调,造成肺组织损伤。而 TanⅡA 干预后 NETs 水平下降,炎症因子表达下降,肺损伤有所减轻,表明 TanⅡA 可调控 NETs 抑制炎症反应,减轻脓毒症 ALI。与本研究相似的是 ZHANG 等[8]研究发现 TanⅡA 可降低类风湿性关节炎小鼠关节液中 MPO 及 NE 等 NETs 成分,并在体外实验中证实 TanⅡA 可以降低 LPS 诱导的中性粒细胞产生的 TNF-α 和 IL-6 的 mRNA 转录水平,但 TanⅡA 调控 NETs 减轻炎症反应的具体分子机制尚不明确。

3.3 丹参酮ⅡA 通过 PI3K/AKT 信号通路调控 NETs

多项研究表明 PI3K/AKT 信号通路参与 NETs 形成过程,ALHUSSIEN 等[26]研究发现 tau 干扰素通过阻断 PI3K/AKT 信号通路影响受精卵着床期血液中 NETs 数量,YANG 等[27]研究显示 Mir-1696 过表达后通过抑制谷胱甘肽过氧化物酶 3 并抑制 PI3K/AKT 信号通路的激活导致 NETs 形成减少。本研究观察到相似情况,实验发现 LPS+LY294002 组使用 PI3K 特异性抑制剂 LY294002[28]预处理后,脓毒症 ALI 小鼠肺组织 p-PI3K 及 p-AKT 水平下降并且 MPO-DNA 复合物、Cit H3 表达水平下调,表明抑制 PI3K/AKT 信号通路激活可以减少 NETs 的形成。与此同时,在 LPS+TanⅡA 组观察到了与上述 LPS+LY294002 组相似的结果,表明 TanⅡA 可能通过抑制 PI3K/AKT 信号通路减少 NETs 形成。PI3K/AKT 信号通路是炎症因子表达的中央调节剂,与肺部炎症损伤关系密切。研究显示 3-O-咖啡酰基齐墩果酸可通过抑制 PI3K/AKT 信号通路,减轻 LPS 诱导的 ALI[29],桑色素也可通过抑制 PI3K/AKT 信号通路减轻香烟对肺脏的炎症损伤[30]。本研究显示,与 LPS 组相比,LPS+TanⅡA 组小鼠肺组织 PI3K/AKT 信号通路磷酸化水平下降,NETs 生成明显减少,同时炎症因子水平降低而抗炎因子水平升高,肺水肿及肺组织病理损伤减轻,这与 LPS+LY294002 组结果相一致,推测 TanⅡA 发挥肺保护作用的机制可能是通过抑制 PI3K/AKT 信号通路的激活,调控 NETs 水平,降低肺组织炎症反应水平。

本研究仅在动物实验水平研究丹参酮ⅡA 对脓毒症小鼠 ALI 的作用及可能机制,未进行细胞水平和分子水平的干预研究,Western blot 也未检测信号通路 total-PI3K、total-AKT 的表达情况。此外,除 PI3K/AKT 信号通路,丹参酮ⅡA 可能还通过其他通路发挥作用,仍需进一步深入研究。

综上所述,丹参酮ⅡA 可以减轻脓毒症 ALI,其机制可能是通过抑制 PI3K/AKT 信号通路,调控 NETs 表达水平,减轻炎症反应。

参考文献:

[1] FERNANDO S M, ROCHWERG B, SEELY A J E. Clinical implications of the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3)[J]. CMAJ, 2018, 190(36): E1058-E1059. DOI:10.1503/cmaj.170149.

[2] XIE J F, WANG H L, KANG Y, *et al*. The epidemiology of sepsis in Chinese ICUs: a national cross-sectional survey[J]. Crit Care Med, 2020, 48(3): e209-e218. DOI:10.1097/CCM.0000000000004155.

[3] KUMAR V. Pulmonary innate immune response determines the outcome of inflammation during pneumonia and sepsis-associated acute lung injury[J]. Front Immunol, 2020, 11: 1722. DOI:10.3389/fimmu.2020.01722.

[4] DENNING N L, AZIZ M, GURIEN S D, *et al*. DAMPs and NETs in Sepsis[J]. Front Immunol, 2019, 10: 2536. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02536.

[5] DING Z, DU F, RÖNNOW C F, *et al*. Actin-related protein 2/3 complex regulates neutrophil extracellular trap expulsion and lung damage in abdominal sepsis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2022, 322(5): L662-L672. DOI: 10.1152/ajplung.00318.2021.

[6] NWAFOR E, LU P, LI J W, *et al*. Traditional Chinese medicine of Salvia miltiorrhiza Bunge: a review of phytochemistry, pharmacology and pharmacokinetics[J]. Tradit Med Res, 2021, 6(4): 35. DOI: 10.53388/tmr20201027204.

[7] ZHAO J Y, PU J, FAN J, *et al*. Tanshinone IIA prevents acute lung injury by regulating macrophage polarization[J]. J Integr Med, 2022, 20(3): 274-280. DOI:10.1016/j.joim.2022.01.006.

[8] ZHANG S, HUANG G, YUAN K, *et al*. Tanshinone IIA ameliorates chronic arthritis in mice by modulating neutrophil activities[J]. Clin Exp Immunol, 2017, 190(1): 29-39. DOI:10.1111/cei.12993.

[9] LI N, SUN W J, ZHOU X, *et al*. Dihydroartemisinin protects against dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through inhibiting the PI3K/AKT and NF-κB signaling pathways[J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 1415809. DOI: 10.1155/2019/1415809.

[10] TAI H, JIANG X L, SONG N, *et al*. Tanshinone IIA combined with cyclosporine A alleviates lung apoptosis induced by renal ischemia-reperfusion in obese rats[J]. Front Med (Lausanne), 2021, 8: 617393. DOI:10.3389/fmed.2021.617393

[11] 顾冬生, 严鸣光, 罗宇维, 等. LY294002 对小鼠体内调节性 T 细胞的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复,

2009, 13(31): 6085-6088. DOI:10.3969/j.issn.1673-8225.2009.31.018.
GU D S, YAN M G, LUO Y W, *et al*. Effect of LY294002 on regulatory T cells in mice[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2009, 13(31): 6085-6088. DOI:10.3969/j.issn.1673-8225.2009.31.018.

[12] LIU L Q, YAN M J, YANG R, *et al*. Adiponectin attenuates lipopolysaccharide-induced apoptosis by regulating the Cx43/PI3K/AKT pathway[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 644225. DOI:10.3389/fphar.2021.644225.

[13] HU S, HU H T, WANG R, *et al*. MicroRNA-29b prevents renal fibrosis by attenuating renal tubular epithelial cell-mesenchymal transition through targeting the PI3K/AKT pathway[J]. Int Urol Nephrol, 2021, 53(9): 1941-1950. DOI:10.1007/s11255-021-02836-4.

[14] 王文龙, 林胜友, 卢宏达, 等. 氧化苦参碱对放射性肺损伤模型小鼠肺纤维化的改善作用及其机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(5): 503-506. DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2020.05.007.
WANG W L, LIN S Y, LU H D, *et al*. Effect and mechanism of oxymatrine on pulmonary fibrosis in mice with radiation-induced pulmonary injury [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2020, 36(5): 503-506. DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2020.05.007.

[15] SMITH K M, MROZEK J D, SIMONTON S C, *et al*. Prolonged partial liquid ventilation using conventional and high-frequency ventilatory techniques: gas exchange and lung pathology in an animal model of respiratory distress syndrome[J]. Crit Care Med, 1997, 25(11): 1888-1897. DOI:10.1097/00003246-199711000-00030.

[16] 薄禄龙, 卞金俊, 邓小明. 2016年脓毒症最新定义与诊断标准: 回归本质重新出发[J]. 中华麻醉学杂志, 2016, 36(3): 259-262. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1416.2016.03.002.
BO L L, BIAN J J, DENG X M. New definition and clinical criteria for Sepsis and septic shock in 2016: back to the nature, head for the future[J]. Chin J Anesthesiol, 2016, 36(3): 259-262. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1416.2016.03.002.

[17] GUO R, LI L, SU J, *et al*. Pharmacological activity and mechanism of tanshinone IIA in related diseases[J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14: 4735-4748. DOI:10.2147/DDDT.S266911.

[18] QUAN M X, LV Y N, DAI Y, *et al*. Tanshinone IIA protects against lipopolysaccharide-induced lung injury through targeting Sirt1[J]. J Pharm Pharmacol, 2019, 71(7): 1142-1151. DOI:10.1111/jphp.13087.

[19] JIANG L X, WANG J H, JU J R, *et al*. Salvianolic acid B and sodium tanshinone II A sulfonate prevent pulmonary fibrosis through anti-inflammatory and anti-fibrotic process [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 883: 173352. DOI:10.1016/j.ejphar.2020.173352.

[20] MENG W, PAUNEL-GÖRGÜLÜ A, FLOHÉ S, *et al*. Depletion of neutrophil extracellular traps *in vivo* results in hypersusceptibility to polymicrobial Sepsis in mice[J]. Crit Care, 2012, 16(4): R137. DOI:10.1186/cc11442.

[21] WANG Y P, GUO Y, WEN P S, *et al*. Three ingredients of safflower alleviate acute lung injury and inhibit NET release induced by lipopolysaccharide [J]. Mediators Inflamm, 2020, 2020: 2720369. DOI:10.1155/2020/2720369.

[22] GU Z T, LI L, LI Q, *et al*. Polydatin alleviates severe traumatic brain injury induced acute lung injury by inhibiting S100B mediated NETs formation[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 98: 107699. DOI:10.1016/j.intimp.2021.107699.

[23] BRINKMANN V, REICHARD U, GOOSMANN C, *et al*. Neutrophil extracellular traps kill bacteria [J]. Science, 2004, 303(5663): 1532-1535. DOI:10.1126/science.1092385.

[24] BIRON B M, CHUNG C S, O'BRIEN X M, *et al*. Clamidine prevents histone 3 citrullination and neutrophil extracellular trap formation, and improves survival in a murine Sepsis model[J]. J Innate Immun, 2017, 9(1): 22-32. DOI:10.1159/000448808.

[25] SIL P, YOO D G, FLOYD M, *et al*. High throughput measurement of extracellular DNA release and quantitative NET formation in human neutrophils *in vitro*[J]. J Vis Exp, 2016(112): 52779. DOI:10.3791/52779.

[26] ALHUSSIEN M N, DANG A K. JAK3 and PI3K mediates the suppressive effects of interferon tau on neutrophil extracellular traps formation during peri-implantation period [J]. J Reproductive Immunol, 2021, 145: 103321. DOI:10.1016/j.jri.2021.103321.

[27] YANG Z J, WANG S C, YIN K, *et al*. miR-1696/GPx3 axis is involved in oxidative stress mediated neutrophil extracellular traps inhibition in chicken neutrophils[J]. J Cell Physiol, 2021, 236(5): 3688-3699. DOI:10.1002/jcp.30105.

[28] MD MOKHTAR A H, MALIK I A, ABD AZIZ N, *et al*. LY294002, a PI3K pathway inhibitor, prevents leptin-induced adverse effects on spermatozoa in Sprague-Dawley rats[J]. Andrologia, 2019, 51(3): e13196. DOI:10.1111/and.13196.

[29] HUANG J H, NONG X P, CHEN Y L, *et al*. 3-O-trans-caffeoyloleanolic acid improves acute lung injury *via* anti-inflammation and antioxidative stress-involved PI3K/AKT pathway[J]. Chem Biol Drug Des, 2021, 98(1): 114-126. DOI:10.1111/cbdd.13856.

[30] CAI B N, GAN X F, HE J X, *et al*. Morin attenuates cigarette smoke-induced lung inflammation through inhibition of PI3K/AKT/NF-κB signaling pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 63: 198-203. DOI:10.1016/j.intimp.2018.07.035.

(**收稿**:2022-06-13;**修回**:2022-07-31)
(编辑 栾 嘉)