汉黄芩素对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠气道炎症的影响及机制Δ

邹　曲[1*]，符丹丹[2]，范腾阳[1]，欧阳瑶[3#]（1.遵义医科大学附属医院全科医学科，贵州 遵义　563000；2.遵义医科大学第二附属医院呼吸内科，贵州 遵义　563000；3.遵义医科大学附属医院呼吸内科，贵州 遵义　563000）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）09-1060-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.09.07

摘　要　目的　研究汉黄芩素（Wog）对慢性阻塞性肺疾病（COPD）模型大鼠气道炎症的影响及可能机制。**方法**　将84只大鼠按随机数字表法分为对照组，模型组，Wog低、高剂量组（灌胃给药，50、100 mg/kg），氨茶碱组（阳性对照，灌胃给药，2.3 mg/kg），重组大鼠受体相互作用蛋白激酶1[rRIPK1，受体相互作用蛋白激酶1（RIPK1）激活剂]组（尾静脉注射给药，8 μg/kg），Wog高剂量+rRIPK1组（灌胃100 mg/kg Wog并尾静脉注射8 μg/kg rRIPK1），每组12只。除对照组外，其余各组大鼠均利用烟熏联合气管注射脂多糖的方法构建COPD模型。建模24 h后，进行给药处理；每天给药1次，持续4周。末次给药后，测定各组大鼠的吸气峰流量（PIF）、呼气峰流量（PEF）、每分钟通气量（MV）和第1秒用力呼气容积（FEV_1）/用力肺活量（FVC）比值，测定大鼠血清中白细胞介素1β（IL-1β）、IL-6、肿瘤坏死因子α（TNF-α）水平，观察大鼠肺组织病理形态学变化，测定大鼠肺上皮细胞凋亡率，并测定大鼠肺组织中RIPK1、RIPK3、混合系激酶区域样蛋白（MLKL）mRNA和RIPK1、RIPK3、磷酸化MLKL（p-MLKL）蛋白表达水平。**结果**　与对照组比较，模型组大鼠PIF、PEF、MV、FEV_1/FVC比值显著降低（$P<0.05$），IL-1β、IL-6、TNF-α水平显著升高（$P<0.05$），肺组织有大量炎症细胞浸润、支气管壁增厚，肺上皮细胞凋亡率及RIPK1、RIPK3、MLKL mRNA和RIPK1、RIPK3、p-MLKL蛋白表达水平也显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，Wog低、高剂量组大鼠上述指标均显著改善（$P<0.05$），病理损伤明显减轻；而rRIPK1组大鼠对应指标却显著恶化（$P<0.05$），病理损伤也进一步加重；并且，rRIPK1可明显减弱高剂量Wog对COPD大鼠气道炎症和RIPK1/RIPK3/MLKL通路的抑制作用（$P<0.05$）。**结论**　Wog可能通过抑制RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路改善COPD大鼠的气道炎症。

关键词　汉黄芩素；慢性阻塞性肺疾病；气道炎症；受体相互作用蛋白激酶1；受体相互作用蛋白激酶3；混合系激酶区域样蛋白

Effects and mechanisms of wogonin on airway inflammation in rats with chronic obstructive pulmonary disease

ZOU Qu[1], FU Dandan[2], FAN Tengyang[1], OUYANG Yao[3]（1. Dept. of General Practice, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Guizhou Zunyi 563000, China; 2. Dept. of Respiratory Medicine, the Second Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Guizhou Zunyi 563000, China; 3. Dept. of Respiratory Medicine, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Guizhou Zunyi 563000, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the effects and potential mechanism of wogonin (Wog) on airway inflammation in rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **METHODS** Eighty-four rats were randomly divided into control group, model group, Wog low-dose and high-dose groups (intragastric administration of 50, 100 mg/kg), aminophylline group (positive control, intragastric administration of 2.3 mg/kg), recombinant rat receptor-interacting protein kinase 1 [rRIPK1, receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1) activator] group (tail vein injection of 8 μg/kg), and Wog high-dose+rRIPK1 group (intragastric administration of Wog 100 mg/kg+tail vein injection of rRIPK 8 μg/kg), with 12 rats in each group. Except for control group, COPD model of other groups was induced by smoking combined with tracheal injection of lipopolysaccharide. Twenty-four hours after successful modeling, the rats were administered once a day for 4 weeks. The changes of peak inspiratory flow (PIF), peak expiratory flow (PEF) and minute ventilation (MV), forced expiratory volume in one second (FEV_1)/forced vital capacity (FVC) were measured after the last medication; the serum levels of interleukin 1β (IL-1β), IL-6 and tumor necrosis factor-α (TNF-α) were measured by ELISA; the pathological changes of lung tissue in rats were observed; the apoptotic rate of pulmonary epithelial cells was detected. mRNA expressions of RIPK1, RIPK3 and mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL), and protein expressions of RIPK1, RIPK3 and p-MLKL were all detected in lung tissue of rats. **RESULTS** Compared with control group, PIF, PEF, MV and FEV_1/FVC of model group were decreased significantly ($P<0.05$), while the levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α were increased significantly ($P<0.05$); there was a large number of inflammatory cells infiltration in the lung tissue and bronchial

Δ **基金项目**　贵州省科技计划项目（No.黔科合支撑〔2020〕4Y141号）

＊ **第一作者**　主治医师。研究方向：慢性阻塞性肺疾病。电话：0851-28608728。E-mail：ya_yaj@163.com

\# **通信作者**　主任医师，硕士。研究方向：慢性阻塞性肺疾病。电话：0851-28608155。E-mail：ouyangyao116@sohu.com

wall thickening in model group; the apoptotic rate of pulmonary epithelial cells, mRNA expressions of RIPK1, RIPK3 and MLKL, protein expressions of RIPK1, RIPK3 and p-MLKL were increased significantly ($P<0.05$). Compared with model group, above indexes of rats were improved significantly in Wog low-dose and high-dose groups ($P<0.05$), and pathological injuries were alleviated significantly. The corresponding indexes of rats were worsened in rRIPK1 group ($P<0.05$), and pathological damage had further worsened. rRIPK1 significantly attenuated the inhibitory effect of high-dose Wog on airway inflammation and RIPK1/RIPK3/MLKL pathway in COPD rats ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Wog may improve airway inflammation in COPD rats by inhibiting RIPK1/RIPK3/MLKL signal pathway.

KEYWORDS wogonin; chronic obstructive pulmonary disease; airway inflammation; receptor-interacting protein kinase 1; receptor-interacting protein kinase 3; mixed lineage kinase domain-like protein

慢性阻塞性肺疾病（chronic obstructive pulmonary disease，COPD）是一种慢性呼吸道疾病，由于气道和肺部的长期炎症，气道结构发生重塑，通常表现为持续的气流受限和呼吸道症状，严重影响COPD患者的生活质量和身体健康[1]。虽然有皮质类固醇、长效毒蕈碱拮抗药、长效β_2受体激动剂等治疗药物，但其只能提供短期益处，并不能阻止COPD的进展[2]。越来越多的证据表明，COPD的核心特征是炎症，炎症会导致肺部不同部位的病理变化[3]。因此，开发新的药物来治疗COPD的气道炎症具有重要意义。

汉黄芩素（wogonin，Wog）是一种从黄芩根中分离出来的类黄酮物质，具有抗氧化、抗炎、抗凋亡等活性[4]。已有研究报道，Wog可抑制脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）诱导的肺上皮细胞炎症和细胞凋亡，进而发挥对急性肺损伤的保护作用[5]。然而关于Wog对COPD过程中气道炎症的影响鲜有报道。受体相互作用蛋白激酶1（receptor-interacting protein kinase 1，RIPK1）可与RIPK3相互作用并使混合系激酶区域样蛋白（mixed lineage kinase domain-like protein，MLKL）磷酸化，磷酸化的MLKL（p-MLKL）会形成寡聚体并转移到质膜，从而破坏膜的完整性，促进炎症因子的释放[6]。相关研究显示，RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路的激活可加剧急性呼吸窘迫综合征大鼠的肺组织病理损伤[7]。而Wog能否通过调控RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路影响COPD大鼠气道炎症尚不明确。本研究主要通过烟熏联合气管注射LPS的方法构建COPD模型来探究Wog对COPD大鼠气道炎症的影响，并从RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路角度探讨其可能的作用机制，为Wog治疗COPD提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有：大鼠烟熏箱（上海玉研科学仪器有限公司）、Pclab-430C型生物信号采集系统呼吸传感器（北京北瑞未来分析仪器有限公司）、ST-960型酶标仪（上海科华实验系统有限公司）、BX53型光学显微镜（日本Olympus公司）、ABI 7900型荧光定量PCR仪（美国ABI公司）、DYCZ-24DH型双板垂直电泳仪（北京六一仪器厂）。

1.2 主要药品与试剂

Wog对照品（批号20210609，纯度≥98%）、氨茶碱对照品（批号20221125，纯度≥90%）均购自上海晅科生物科技有限公司；重组大鼠RIPK1（recombinant rat RIPK1，rRIPK1，即RIPK1激活剂）购自武汉华美生物工程有限公司；大鼠白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）、IL-6、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）酶联免疫吸附检测（ELISA）试剂盒均购自武汉菲恩生物科技有限公司；兔源RIPK1一抗（批号ab300617）、RIPK3一抗（批号ab286151）、p-MLKL一抗（批号ab208910）、MLKL一抗（批号ab243142）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）一抗（批号ab8245）及辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗兔IgG二抗（批号ab6721）均购自英国Abcam公司。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级雄性SD大鼠，共84只，7周龄，体质量250～260 g，购自遵义医科大学实验动物中心，动物生产许可证号为SCXK（黔）2021-0002。大鼠饲养于相对湿度为50%～60%，温度为18～22 ℃，12 h昼夜交替的环境中，饲养期间可自由进食、饮水。本研究经遵义医科大学动物伦理委员会批准（批准号为ZMU21-2105-105）。

2 方法

2.1 COPD大鼠模型的构建

采用烟熏联合气管注射LPS的方式构建COPD大鼠模型[8]。将大鼠置于烟熏箱中，持续烟熏20 min，每日3次，连续12周，分别在烟熏第1、70天通过大鼠气管注射0.2 g LPS。通过观察各组大鼠肺功能指标及肺组织病理变化来评估造模是否成功[9]。

2.2 动物分组与给药

将84只大鼠按随机数字表法分为对照组，模型组，Wog低、高剂量组（灌胃给药，50、100 mg/kg[10]），氨茶碱组（阳性对照，灌胃给药，2.3 mg/kg[11]），rRIPK1组（尾静脉注射给药，8 μg/kg[12]），Wog高剂量+rRIPK1组（灌胃100 mg/kg Wog并尾静脉注射8 μg/kg rRIPK1），每组12只。除对照组外，其余各组大鼠均按“2.1”项下方法构建

COPD模型；对照组大鼠置于烟熏箱但不进行烟熏处理，并在造模大鼠注射LPS的相同时间点通过气管注射等体积的生理盐水。造模24 h后开始给药，Wog低、高剂量组和氨茶碱组大鼠在灌胃对应剂量药物的同时还需尾静脉注射等体积的生理盐水；rRIPK1组大鼠在尾静脉注射对应剂量药物的同时还需灌胃等体积的生理盐水；Wog高剂量+rRIPK1组大鼠在灌胃对应剂量药物的同时还需尾静脉注射相应的药物；对照组、模型组大鼠需灌胃及尾静脉注射等体积的生理盐水。各组大鼠每天给药1次，持续4周。

2.3 大鼠肺功能检测

末次给药24 h后，利用生物信号采集系统呼吸传感器测定各组大鼠的吸气峰流量（peak inspiratory flow，PIF）、呼气峰流量（peak expiratory flow，PEF）、每分钟通气量（minute ventilation，MV）和第1秒用力呼气容积（forced expiratory volume in one second，FEV_1）/用力肺活量（forced vital capacity，FVC）比值的变化。

2.4 标本收集

肺功能检测后，大鼠腹主动脉取血，离心（3 000 r/min，10 min）收集血清，用于ELISA检测；血清收集结束后，用2%戊巴比妥钠麻醉并处死大鼠，收集大鼠的肺组织并分为两部分，每部分包含6只大鼠的肺组织。将一部分肺组织固定于4%多聚甲醛中，用于苏木精-伊红（HE）和TUNEL染色；另一部分冻存于－80 ℃冰箱中，用于相应mRNA和蛋白表达检测。

2.5 大鼠血清中IL-1β、IL-6、TNF-α水平检测

取“2.4”项下血清，严格按照ELISA试剂盒说明书方法操作，检测大鼠血清中IL-1β、IL-6、TNF-α水平。

2.6 大鼠肺组织病理形态学变化观察

采用HE染色法检测。将固定于4%多聚甲醛中的肺组织包埋在石蜡中，常规制备5 μm厚的石蜡切片，再常规行HE染色后进行组织学分析。所有切片均使用光学显微镜以200倍的放大倍数成像。

2.7 大鼠肺组织中肺上皮细胞凋亡检测

采用TUNEL染色法检测。将“2.6”项下石蜡切片脱蜡至水合，依次用3%过氧化氢和蛋白酶K液体（20 mg/mL）处理，随后在37 ℃下用TUNEL试剂处理60 min。然后将切片用100 μL 3，3′-二氨基联苯胺在25 ℃下染色10 min，并用苏木精复染。在光学显微镜下以200倍放大倍数鉴定和计数每个切片中的TUNEL阳性凋亡细胞。TUNEL阳性凋亡细胞的细胞核呈棕色或棕褐色，而正常细胞的细胞核呈蓝色。计算细胞凋亡率，细胞凋亡率（%）＝TUNEL阳性凋亡细胞数/总细胞数×100%。

2.8 大鼠肺组织中RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路相关mRNA表达检测

采用实时荧光定量（qRT）-PCR法检测。取“2.4”项下肺组织，制备组织匀浆，采用Trizol试剂提取组织中总RNA，并检测其纯度。将总RNA逆转录为cDNA后，以cDNA为模板进行qRT-PCR反应。反应体系包括：正、反向引物各0.5 μL，2×SYBR Premix Ex Taq 10 μL，cDNA模板1 μL，用dd H_2O补至总体积为20 μL。反应程序为：95 ℃预变性5 min；95 ℃变性15 s，60 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，共40个循环。以GAPDH为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算RIPK1、RIPK3、MLKL mRNA的表达水平。引物序列由广州基迪奥生物科技有限公司合成，引物序列及扩增产物长度见表1。

表1 qRT-PCR引物序列及扩增产物长度

基因名称	正向引物（5′-3′）	反向引物（5′-3′）	扩增产物长度/bp
GAPDH	GTGGACCTGACCTGCCGTCT	GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT	86
RIPK1	AGGTACAGGAGTTTGGTATGGGC	GGTGGTGCCAAGGAGATGTATG	122
RIPK3	TAGTTTATGAAATGCTGGACCGC	GCCAAGGTGTCAGATGATGTCC	106
MLKL	GCCACTGGAAAGATCCCGTT	CAACAACTCGGGGCAATCCT	98

2.9 大鼠肺组织中RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.4”项下肺组织，用RIPA裂解缓冲液裂解并提取肺组织匀浆中的总蛋白，利用二喹啉甲酸法测定总蛋白浓度，将总蛋白在95 ℃下变性5 min后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（分离胶电压80 V，电泳时间40 min；浓缩胶电压120 V，电泳时间1 h）分离后，再在300 mA电流的作用下，转膜1 h至聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上，5%脱脂牛奶封闭1.5 h后，与一抗RIPK1（稀释比例1∶2 000）、RIPK3（稀释比例1∶1 000）、p-MLKL（稀释比例1∶3 000）、MLKL（稀释比例1∶2 000）、GAPDH（稀释比例1∶3 000）在4 ℃下孵育过夜；洗膜后，再将膜与二抗（稀释比例1∶3 000）在室温下孵育1 h。使用ECL试剂使蛋白质条带可视化。利用Image J 1.8.0软件分析蛋白条带灰度值，以RIPK1、RIPK3蛋白与内参蛋白（GAPDH）条带灰度值的比值表示RIPK1、RIPK3蛋白的表达水平，以p-MLKL蛋白条带与MLKL蛋白条带灰度值的比值表示p-MLKL蛋白的表达水平。

2.10 统计学方法

使用SPSS 19.0软件进行统计分析。符合正态分布的数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步组间比较采用SNK-q检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 Wog对大鼠肺功能的影响

与对照组比较，模型组大鼠PIF、PEF、MV、FEV_1/FVC比值显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，Wog低、

高剂量组和氨茶碱组大鼠PIF、PEF、MV、FEV_1/FVC比值显著升高（$P<0.05$），且Wog的作用具有明显的剂量依赖性；rRIPK1组大鼠上述指标水平显著降低（$P<0.05$）。与Wog高剂量组比较，Wog高剂量+rRIPK1组大鼠上述指标水平显著降低（$P<0.05$）。结果见表2。

表2　各组大鼠的PIF、PEF、MV及FEV_1/FVC比值测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

组别	PIF/(mL/s)	PEF/(mL/s)	MV/mL	FEV_1/FVC比值
对照组	9.41±0.33	12.62±0.41	131.14±5.69	0.81±0.06
模型组	7.25±0.14[a]	8.69±0.34[a]	95.58±3.25[a]	0.59±0.05[a]
Wog低剂量组	8.26±0.17[b]	9.63±0.37[b]	104.43±4.26[b]	0.66±0.06[b]
Wog高剂量组	9.04±0.20[bc]	11.39±0.44[bc]	125.59±5.67[bc]	0.76±0.07[bc]
氨茶碱组	9.07±0.22[b]	11.61±0.46[b]	126.64±5.43[b]	0.77±0.06[b]
rRIPK1组	6.18±0.11[b]	7.23±0.21[b]	81.89±4.16[b]	0.52±0.05[b]
Wog高剂量+rRIPK1组	8.38±0.21[d]	10.32±0.29[d]	107.72±4.11[d]	0.67±0.05[d]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与Wog低剂量组比较，$P<0.05$；d：与Wog高剂量组比较，$P<0.05$

3.2　Wog对大鼠血清中IL-1β、IL-6、TNF-α水平的影响

与对照组比较，模型组大鼠血清中IL-1β、IL-6、TNF-α水平显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，Wog低、高剂量组和氨茶碱组大鼠血清中IL-1β、IL-6、TNF-α水平显著降低（$P<0.05$），且Wog的作用具有明显的剂量依赖性；rRIPK1组大鼠上述指标水平显著升高（$P<0.05$）。与Wog高剂量组比较，Wog高剂量+rRIPK1组大鼠上述指标水平显著升高（$P<0.05$）。结果见表3。

3.3　Wog对大鼠肺组织病理形态学变化的影响

与对照组比较，模型组大鼠肺组织有大量炎症细胞浸润，支气管壁增厚，肺泡体积扩大。与模型组比较，Wog低、高剂量组和氨茶碱组大鼠肺组织的病理形态学变化有一定程度改善，而rRIPK1组大鼠肺组织病理损伤加重。与Wog高剂量组比较，Wog高剂量+rRIPK1组大鼠肺组织病理损伤也加重。结果见图1。

表3　各组大鼠血清中IL-1β、IL-6、TNF-α水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=12$，pg/mL）

组别	IL-1β	IL-6	TNF-α
对照组	3.69±0.15	5.51±0.23	2.55±0.21
模型组	27.72±1.33[a]	32.25±1.38[a]	18.83±0.74[a]
Wog低剂量组	22.35±1.19[b]	25.54±1.37[b]	15.51±0.42[b]
Wog高剂量组	7.78±0.24[bc]	8.68±0.35[bc]	5.53±0.22[bc]
氨茶碱组	7.86±0.25[b]	8.79±0.41[b]	5.61±0.23[b]
rRIPK1组	42.25±2.31[b]	46.65±2.58[b]	29.34±1.32[b]
Wog高剂量+rRIPK1组	15.68±1.33[d]	17.78±1.04[d]	10.66±0.43[d]

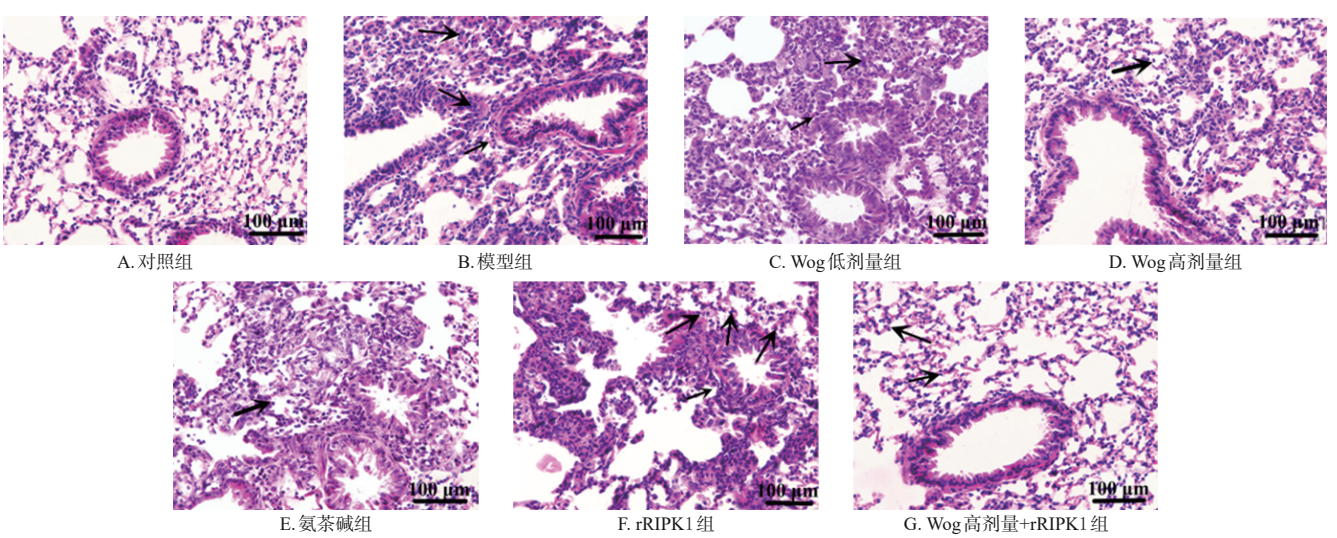
a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与Wog低剂量组比较，$P<0.05$；d：与Wog高剂量组比较，$P<0.05$

3.4　Wog对大鼠肺上皮细胞凋亡的影响

与对照组[(3.67±0.14)%]比较，模型组大鼠肺上皮细胞凋亡率[(16.69±1.12)%]显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，Wog低、高剂量组和氨茶碱组大鼠肺上皮细胞凋亡率[分别为(12.15±1.03)%、(6.65±0.34)%、(6.59±0.29)%]显著降低（$P<0.05$），rRIPK1组大鼠肺上皮细胞凋亡率[(22.31±1.45)%]显著升高（$P<0.05$）；与Wog高剂量组比较，Wog高剂量+rRIPK1组大鼠肺上皮细胞凋亡率[(10.33±1.02)%]显著升高（$P<0.05$）。结果见图2。

3.5　Wog对大鼠肺组织中RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路相关mRNA及蛋白表达的影响

与对照组比较，模型组大鼠肺组织中RIPK1、RIPK3、MLKL mRNA及RIPK1、RIPK3、p-MLKL蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，Wog低、高剂量组和氨茶碱组大鼠肺组织中上述mRNA及蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$），且Wog的作用具有明显的剂量依赖性；rRIPK1组大鼠肺组织中上述mRNA及蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$）。与Wog高剂量组比较，Wog高剂量+rRIPK1组大鼠肺组织中上述mRNA及蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$）。结果见图3、表4。

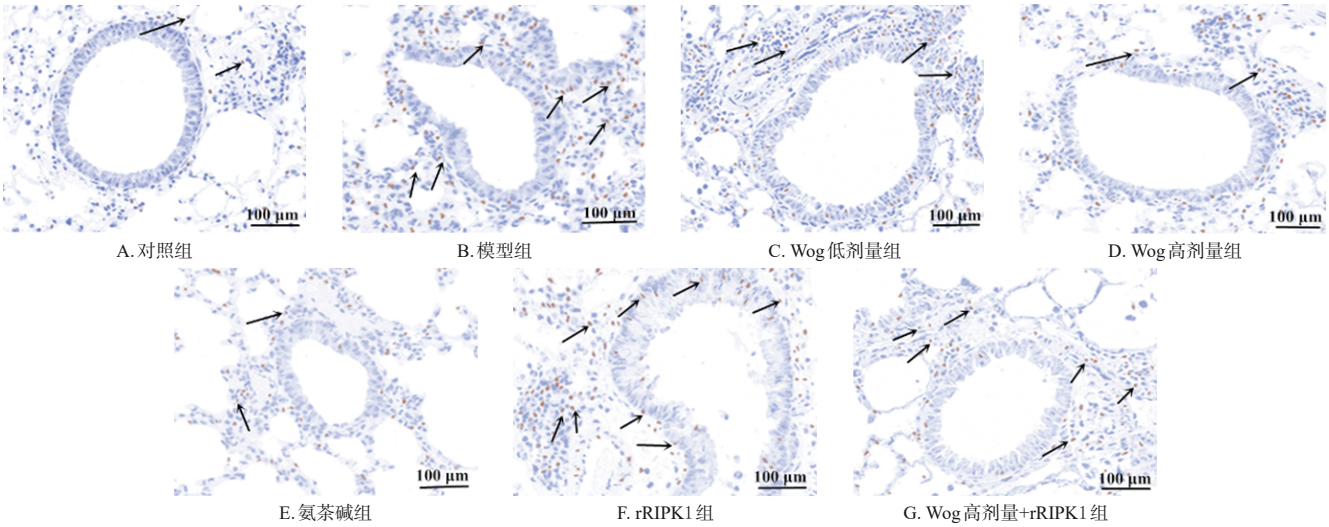


A. 对照组　B. 模型组　C. Wog低剂量组　D. Wog高剂量组

E. 氨茶碱组　F. rRIPK1组　G. Wog高剂量+rRIPK1组

注：箭头所指方向表示炎症细胞浸润

图1　各组大鼠肺组织病理形态学观察显微图（HE染色）

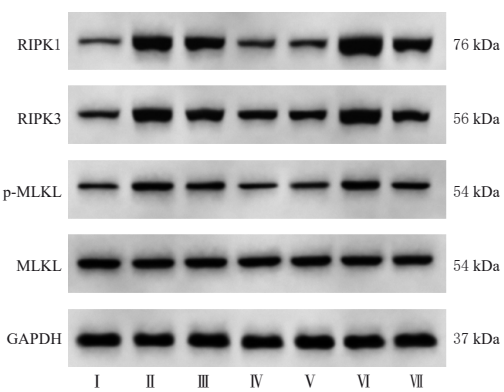


A. 对照组　B. 模型组　C. Wog低剂量组　D. Wog高剂量组

E. 氨茶碱组　F. rRIPK1组　G. Wog高剂量+rRIPK1组

注：箭头所指为凋亡细胞

图2　各组大鼠肺上皮细胞凋亡观察显微图（TUNEL染色）



Ⅰ：对照组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：Wog低剂量组；Ⅳ：Wog高剂量组；Ⅴ：氨茶碱组；Ⅵ：rRIPK1组；Ⅶ：Wog高剂量+rRIPK1组

图3　各组大鼠肺组织中RIPK1、RIPK3、MLKL、p-MLKL蛋白表达的电泳图

表4　各组大鼠肺组织中RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路相关mRNA及蛋白表达水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	mRNA表达			蛋白表达		
	RIPK1	RIPK3	MLKL	RIPK1/GAPDH	RIPK3/GAPDH	p-MLKL/MLKL
对照组	1.00	1.00	1.00	0.16±0.01	0.38±0.02	0.21±0.02
模型组	2.88±0.19^{a}	2.42±0.17^{a}	1.93±0.14^{a}	1.38±0.12^{a}	1.14±0.10^{a}	0.84±0.06^{a}
Wog低剂量组	2.14±0.13^{b}	1.95±0.14^{b}	1.62±0.11^{b}	1.09±0.11^{b}	0.83±0.07^{b}	0.60±0.05^{b}
Wog高剂量组	1.45±0.11^{bc}	1.23±0.12^{bc}	1.12±0.10^{bc}	0.38±0.02^{bc}	0.51±0.04^{bc}	0.32±0.02^{bc}
氨茶碱组	1.43±0.10^{b}	1.21±0.11^{b}	1.11±0.09^{b}	0.37±0.03^{b}	0.49±0.03^{b}	0.34±0.03^{b}
rRIPK1组	3.35±0.21^{b}	2.86±0.23^{b}	2.23±0.20^{b}	1.82±0.24^{b}	1.45±0.12^{b}	0.98±0.02^{b}
Wog高剂量+rRIPK1组	2.07±0.11^{d}	1.82±0.14^{d}	1.58±0.13^{d}	0.83±0.07^{d}	0.72±0.06^{d}	0.55±0.04^{d}

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与Wog低剂量组比较，$P<0.05$；d：与Wog高剂量组比较，$P<0.05$

4　讨论

COPD是一种常见的慢性肺部疾病，可引起一些呼吸道症状，包括咳嗽、呼吸困难和多痰[13]。为研究COPD的病理生理机制和探索潜在的治疗药物，本研究首先利用烟熏联合气管注射LPS的方法构建COPD大鼠模型。结果显示，与对照组比较，模型组大鼠PIF、PEF、MV降低，FEV_1/FVC比值低于0.7。临床上常以FEV_1/FVC比值低于70%作为诊断COPD的依据[14]，这提示COPD大鼠肺功能减弱，模型构建成功。经Wog干预后，COPD大鼠的PIF、PEF、MV升高，Wog高剂量组大鼠FEV_1/FVC比值高于0.7，表明Wog对烟熏联合气管注射LPS诱导的COPD大鼠具有保护作用。

IL-1β、IL-6、TNF-α是COPD发生发展过程中相关的炎症因子，这些炎症因子可引起肺组织不同的病理改变[15]。本研究发现，与对照组比较，模型组大鼠血清中IL-1β、IL-6、TNF-α水平升高，肺组织病理损伤严重，这与上述研究结果一致。据报道，在COPD大鼠肺组织中存在细胞大量凋亡的现象[16]。本研究结果显示，与对照组比较，模型组大鼠肺上皮细胞凋亡率升高，提示COPD大鼠肺组织细胞凋亡异常，这也与文献报道情况相符。此外，本研究还发现，经Wog干预后，COPD大鼠血清中IL-1β、IL-6、TNF-α水平及肺上皮细胞凋亡率降低，肺组织病理损伤减轻，表明Wog对烟熏联合气管注射LPS诱导的COPD大鼠的保护作用与抑制气道炎症反应和肺上皮细胞凋亡有关。

某些刺激因子，如炎症，可以启动TNF-α介导的坏死性凋亡信号通路，导致RIPK1的激活，激活的RIPK1与RIPK3相互作用并形成坏死体，坏死体中激活的RIPK3使MLKL磷酸化并导致寡聚体形成，寡聚体易位至细胞膜并导致细胞膜损伤和坏死性细胞凋亡[17]。因此，RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路是介导坏死性细胞凋亡的主要通路之一。相关研究显示，抑制RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路激活可减轻脑卒中大鼠神经元坏死样凋亡[18]。本研究结果显示，与模型组比较，rRIPK1组大鼠肺组织中RIPK1、RIPK3、MLKL mRNA及RIPK1、RIPK3、p-MLKL蛋白表达上调，提示RIPK1/RIPK3/

MLKL信号通路参与了COPD大鼠气道炎症。此外，本研究还发现，Wog可抑制COPD大鼠肺组织中RIPK1、RIPK3、MLKL mRNA及RIPK1、RIPK3、p-MLKL蛋白的异常上调，故笔者推测Wog可能是通过抑制RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路的激活，从而发挥对COPD大鼠的保护作用。为了验证该推测，本研究在高剂量Wog作用的基础上再利用RIPK1激活剂——rRIPK1干预COPD大鼠。结果显示，rRIPK1减弱了高剂量Wog对COPD模型大鼠的保护作用，证实了猜想的正确性，即Wog可能通过抑制RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路发挥对COPD大鼠的保护作用。

综上所述，Wog可能通过抑制RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路改善COPD大鼠气道炎症。然而，本研究尚存在一些不足之处，如Wog对COPD大鼠气道炎症的抑制作用可能还涉及其他通路，本研究尚未探究，这将是本团队下一步研究的重点之一。

参考文献

[1] TANG F, LING C H. Curcumin ameliorates chronic obstructive pulmonary disease by modulating autophagy and endoplasmic reticulum stress through regulation of SIRT1 in a rat model[J]. J Int Med Res, 2019, 47(10): 4764-4774.

[2] LIN L, LI J, SONG Q, et al. The role of HMGB1/RAGE/TLR4 signaling pathways in cigarette smoke-induced inflammation in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Immun Inflamm Dis, 2022, 10(11): e711.

[3] RAO W, WANG S, DULEBA M, et al. Regenerative metaplastic clones in COPD lung drive inflammation and fibrosis[J]. Cell, 2020, 181(4): 848-864.e18.

[4] ZHENG Z C, ZHU W, LEI L, et al. Wogonin ameliorates renal inflammation and fibrosis by inhibiting NF-κB and TGF-β1/Smad3 signaling pathways in diabetic nephropathy [J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14: 4135-4148.

[5] GE J L, YANG H H, ZENG Y F, et al. Protective effects of wogonin on lipopolysaccharide-induced inflammation and apoptosis of lung epithelial cells and its possible mechanisms[J]. Biomed Eng Online, 2021, 20(1): 125.

[6] LI H Y, WANG Y Z, YANG H G, et al. Furosine, a Maillard reaction product, triggers necroptosis in hepatocytes by regulating the RIPK1/RIPK3/MLKL pathway[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(10): 2388.

[7] 潘龙，姚敦琛，余雨中，等. 程序性坏死参与油酸诱导的大鼠急性呼吸窘迫综合征的发病过程[J]. 生理学报，2016，68(5)：661-668.

[8] 许海江，欧阳松云，陈兰兰，等. 赤芍总苷对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠的干预作用[J]. 中国新药与临床杂志，2022，41(9)：561-565.

[9] 马琳，张萌，陈光宴. 基于TGF-β1/Smads信号通路观察异丙托溴铵雾化液对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺功能、气道重塑的影响[J]. 中国现代应用药学，2022，39(24)：3249-3255.

[10] 沈晓庆，王晶，李婷君. 汉黄芩素对胶原诱导性关节炎大鼠的治疗作用及对NLRP3炎症小体的影响[J]. 中医药导报，2021，27(8)：26-30.

[11] 李晶，陈剑超，段珊. 仙鹤草乙醇提取物通过抑制STAT3表达促进慢性阻塞性肺疾病大鼠Th17/Treg平衡恢复[J]. 中国老年学杂志，2022，42(1)：192-196.

[12] ZHAI Y Y, ZHU Y L, LIU J Y, et al. Dexmedetomidine post-conditioning alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by inhibiting high mobility group protein B1 group (HMGB1)/toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor kappa B (NF-κB) signaling pathway[J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e918617.

[13] ALFAHAD A J, ALZAYDI M M, ALDOSSARY A M, et al. Current views in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis and management[J]. Saudi Pharm J, 2021, 29(12): 1361-1373.

[14] 仲昭双，孔灵菲. 老年慢性阻塞性肺疾病患者FEV1/FVC诊断标准探讨[J]. 实用老年医学，2014，28(7)：566-568.

[15] 吴雨珊，金寿德，强丽霞，等. IL-1β、IL-6及TNF-α在慢性阻塞性肺疾病中的作用及研究进展[J]. 国际呼吸杂志，2021，41(4)：298-303.

[16] 杨添文，杨丽芬，任朝凤，等. 烟草相关性慢性阻塞性肺疾病气道炎症研究进展[J]. 中国呼吸与危重监护杂志，2020，19(6)：621-625.

[17] YAO D B, ZHANG S, HU Z W, et al. CHIP ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by attenuating necroptosis and inflammation[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(23): 25564-25577.

[18] 张议月，刘斌，罗秀菊，等. 女贞苷抑制RIPK1/RIPK3/MLKL通路减轻脑卒中大鼠神经元坏死样凋亡[J]. 中国药理学与毒理学杂志，2021，35(10)：805-806.

（收稿日期：2022-11-15　修回日期：2023-03-29）

（编辑：林　静）