

血必净注射液通过上调磷脂转运蛋白调控巨噬细胞 JNK/c-JUN 通路改善脓毒症相关急性呼吸窘迫综合征

徐璐¹, 潘缘瑾¹, 汪雨辰², 陈振宇¹, 蒋伟², 於江泉^{1,2}, 郑瑞强^{1,2}

¹徐州医科大学扬州临床学院重症医学科, 江苏 扬州 225001; ²扬州大学附属苏北人民医院重症医学科, 江苏 扬州 225001

摘要:目的 探讨血必净对脂多糖(LPS)诱导的脓毒症相关急性呼吸窘迫综合征(ARDS)小鼠模型的保护作用及其分子机制。方法 体内实验: C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、LPS 模型组、LPS+低剂量血必净注射液组(LPS+LXBJ)和 LPS+高剂量血必净注射液组(LPS+HXBJ)($n=15$)。检测生存率、肺组织病理(HE 染色、肺损伤评分、湿/干质量比)、炎症因子[肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)]水平、磷脂转运蛋白(PLTP)表达(转录组测序、实时荧光定量 PCR、Western blotting、酶联免疫吸附试验、免疫荧光)。体外实验: RAW264.7 巨噬细胞给予 LPS 与不同浓度血必净处理, 检测细胞活力、形态、炎症因子及 PLTP 表达, 并利用过表达 PLTP 验证其功能。信号通路: 检测 JNK/c-JUN 和 NF- κ B 通路蛋白表达。结果 与 LPS 组相比, 血必净治疗(尤其是高剂量组)提高脓毒症 ARDS 小鼠的 4 d 生存率($P<0.05$), 降低肺组织病理学损伤评分($P<0.001$)和湿/干质量比($P<0.001$)。血必净降低了血清及肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的水平: 在血清中, 低剂量血必净即可降低上述指标($P<0.05$), 高剂量血必净作用更为显著; 在肺泡灌洗液中, 低、高剂量血必净均可降低 IL-1 β 水平($P<0.05$), 高剂量血必净降低 TNF- α 、IL-6($P<0.05$)水平, 而低剂量血必净的作用未达到统计学意义($P>0.05$)。转录组测序及实验验证显示, LPS 下调肺组织 PLTP 表达($P<0.001$), 而血必净干预可逆转该趋势($P<0.05$)。体外实验显示, 血必净呈剂量依赖性地抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子释放($P<0.05$), 并上调 PLTP 表达。机制研究显示, 血必净通过上调 PLTP, 抑制了 JNK/c-JUN 和 NF- κ B 信号通路的磷酸化激活($P<0.05$), 而过表达 PLTP 则增强其效果($P<0.05$)。结论 血必净通过上调 PLTP 表达, 抑制 JNK/c-JUN 和 NF- κ B 信号通路, 减轻脓毒症相关 ARDS 的炎症反应与组织损伤, 提示 PLTP 可能为其作用的关键靶点。关键词: 血必净注射液; 脓毒症; 急性呼吸窘迫综合征; 磷脂转运蛋白; 巨噬细胞; JNK/c-JUN 通路; NF- κ B 通路

Xuebijing Injection ameliorates sepsis-associated acute respiratory distress syndrome in mice by upregulating phospholipid transfer protein to regulate macrophage JNK/c-JUN pathway

XU Lu¹, PAN Yuanjin¹, WANG Yuchen², CHEN Zhenyu¹, JIANG Wei², YU Jiangquan^{1,2}, ZHENG Ruiqiang^{1,2}

¹Department of Critical Care Medicine, Yangzhou Clinical College of Xuzhou Medical University, Yangzhou 225001, China; ²Department of Critical Care Medicine, Northern Jiangsu People's Hospital Affiliated to Yangzhou University, Yangzhou 225001, China

Abstract: Objective To investigate the ameliorative effect of Xuebijing Injection in a mouse model of sepsis-associated acute respiratory distress syndrome (ARDS) and its molecular mechanisms. **Methods** In a C57BL/6J mouse model of sepsis-associated ARDS induced by lipopolysaccharide (LPS), the ameliorative effect of pretreatment with Xuebijing injection at low and high doses prior to modeling were evaluated by analyzing survival rates, lung histopathology, levels of inflammatory cytokines, and expressions of phospholipid transfer protein (PLTP) using transcriptomics, qPCR, Western blotting, ELISA, and immunofluorescence staining. In the cell experiment, RAW264.7 macrophages treated with LPS and different concentrations of Xuebijing were examined for changes in cell viability, morphology, inflammatory cytokine levels, and PLTP expression. PLTP overexpression experiment was carried out to verify the function of PLTP, and the changes in expressions of JNK/c-JUN and NF- κ B pathway proteins were detected. **Results** Xuebijing pretreatment, especially at the high dose, significantly increased the 4-day survival rate, reduced lung histopathological injury score, and decreased lung wet/dry weight ratio in mice with sepsis-associated ARDS. High-dose Xuebijing more effectively lowered serum levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β than the low dose, while at both doses, Xuebijing significantly decreased IL-1 β levels in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF); Xuebijing at the high dose, but not the low dose, significantly reduced BALF levels of TNF- α and IL-6. LPS significantly downregulated PLTP expression in mouse lung tissue, a trend effectively ameliorated by Xuebijing pretreatment. In cultured RAW264.7 cells, Xuebijing dose-dependently inhibited LPS-induced inflammatory cytokine release and upregulated PLTP expression, resulting also in suppressed phosphorylation and activation of the JNK/c-JUN and NF- κ B signaling pathways, and this effect was significantly enhanced by PLTP overexpression. **Conclusion** Xuebijing

收稿日期: 2026-02-04

基金项目: 国家临床重点专科建设项目 (176[2022]); 国家中西医结合旗舰科室建设项目 (60[2023]); 江苏省中医药科技发展计划重点项目 (ZD202427); 江苏省医学重点学科培育单位 (JSDW20221); 江苏省前沿技术研发计划 (BF2025639); 扬州市卫生健康委科研重点项目 (2023-1-02); 江苏省苏北人民医院管理课题 (YYGL202306); 扬州市社会发展项目 (YZ2023105)

Supported by National Key Clinical Specialty Construction Project (176 [2022]); National Flagship Department of Integrated Chinese and Western Medicine Construction Project (60[2023])

作者简介: 徐璐, 在读硕士研究生, E-mail: sxmuxe@163.com

通信作者: 於江泉, 主任医师, 教授, 硕士生导师, E-mail: yujianguan2021@163.com; 郑瑞强, 主任医师, 教授, 博士生导师, E-mail: zhengruiqiang2021@163.com

alleviates sepsis-associated ARDS by upregulating PLTP and inhibiting JNK/c-JUN and NF- κ B signaling pathways, suggesting the potential of PLTP as a therapeutic target for this condition.

Keywords: Xuebijing injection; sepsis; acute respiratory distress syndrome; phospholipid transfer protein; macrophages; JNK/c-JUN pathway; NF- κ B pathway

脓毒症是由于对感染的失调免疫应答导致过度炎症和器官损伤而引起的危及生命的器官功能障碍,具有高发病率和死亡率^[1]。约30%的脓毒症患者患有脓毒症相关急性呼吸窘迫综合征,死亡率为30%~40%^[2]。急性呼吸窘迫综合征(ARDS)中重度ARDS住院病死率仍超过40%^[3,4]。

ARDS的病理生理机制复杂,涉及炎症反应失调、肺泡-毛细血管屏障损伤、凝血异常及氧化应激等。在此过程中,巨噬细胞作为关键的固有免疫细胞被激活,参与炎症级联反应^[3]。巨噬细胞是先天免疫系统中的第一道防线^[5]。调控巨噬细胞对控制脓毒症相关ARDS的炎症强度以及疾病进程具有重要作用。

磷脂转运蛋白(PLTP)在脂质代谢中起关键作用^[6]。在脓毒症中,脂质代谢紊乱是其病理生理过程的重要组成部分^[7]。PLTP已被证明能增强内毒素的清除和灭活,这在腹部脓毒症患者的临床研究中得到了证实^[8]。细菌内毒素,如脂多糖(LPS),是革兰氏阴性菌细胞壁的组成部分。PLTP可以与LPS结合并减弱LPS的促炎作用,PLTP介导的肝脏脂蛋白受体对LPS的摄取发挥关键作用,可使血浆LPS减少50%^[8,9]。PLTP还能够提高骨髓来源巨噬细胞的活力^[10]。

血必净注射液是一种中药复方制剂,由5种传统中药组成^[11]。血必净在中国已被批准用于脓毒症的治疗,并广泛用作脓毒症或脓毒症休克的辅助治疗^[12]。血必净可减轻炎症细胞因子释放,调节凝血通路并改善微循环功能,并且显著降低脓毒症和脓毒症休克患者28 d的死亡率^[13,14]。血必净可以通过减少巨噬细胞释放的炎症因子,减轻内毒素引起的组织损伤,并维持重要器官的生理功能^[15]。

尽管血必净在脓毒症相关ARDS的临床应用中表现出良好的抗炎与器官保护作用,但其具体分子靶点与信号调控网络尚未完全阐明,其是否通过调控PLTP表达及其下游信号通路来发挥保护作用,目前尚不清楚。因此,本研究旨在探讨血必净是否通过调控PLTP表达及下游JNK/c-JUN/NF- κ B信号通路,发挥对脓毒症相关ARDS的保护作用,以期为其中西医结合治疗提供新的依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 野生型成年雄性C57BL/6J小鼠(杭州子源实验动物有限公司),体质量22~24 g,7~8周龄。实

验小鼠饲养在恒温房间内,12 h光照/12 h黑暗的循环条件下,保持无菌环境。实验经扬州大学实验动物中心动物伦理委员会审查批准(伦理批号:202509041),且严格遵守伦理委员会规定。

1.1.2 主要试剂 血必净注射液(天津红日药业股份有限公司)为中药复方制剂,说明书中未标注原液浓度(规格:10 mL/支),故体内实验以体积剂量(mL/kg)表示,体外实验以体积稀释倍数表示。—抗包括PLTP(1:1000)、p-JNK(1:1000)、JNK(1:1000)、p-c-JUN(1:1000)、c-JUN(1:1000)、p-NF- κ B p65(1:1000)、NF- κ B p65(1:1000)、FLAG(1:20 000)、GAPDH(1:5000)(武汉三鹰生物技术有限公司),二抗为HRP标记的山羊抗兔IgG(1:5000)(武汉三鹰生物技术有限公司);引物由生工生物工程股份有限公司设计合成;siRNA、质粒(和元生物技术股份有限公司),RNA提取试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司),BCA蛋白试剂盒、PAGE凝胶试剂盒、ELISA试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司),特级南美胎牛血清(双洙生物),双抗(上海源培生物科技股份有限公司),DMEM(上海富衡生物科技股份有限公司),酶标仪(赛默飞世尔科技公司),电泳仪、电泳槽、转膜仪、ChemiDoc™成像系统(BIO-RAD)。siRNA序列见表1,qPCR引物序列见表2。

表1 siRNA序列
Tab.1 siRNA sequences

siRNA	Sequence (5'-3')
siPLTP-sense	GGUUUCAAUUCUACUCAAATTT
siPLTP-antisense	UUUGAGUAGAUUUGAAACCTT
siNC-sense	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
siNC-antisense	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

表2 qPCR引物序列
Tab.2 qPCR primer sequences

Primer	Sequence (5'-3')
PLTP(mouse)-F	TTCCTCTCAACCAGCAGATCT
PLTP(mouse)-R	CAGGAGGGAGTTGAGCAACAC
GAPDH(mouse)-F	TGACGTGCCGCTGGAGAAA
GAPDH(mouse)-R	AGTGTAGCCCAAGATGCCCTTCAG

1.2 研究方法

1.2.1 动物分组、造模及给药方案 采用随机数字表法将小鼠分为4组($n=15$):对照组(接受生理盐水腹腔注

射), LPS模型组(LPS腹腔注射, 10 mg/kg)、LPS+低剂量血必净组(LPS+LXBJ, 5 mL·kg⁻¹·d⁻¹), LPS+高剂量血必净组(LPS+HXB, 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹), 血必净组小鼠在注射LPS前连续3 d以及注射LPS后6 h腹腔注射相应的血必净。在LPS注射后24 h获取血液、支气管肺泡灌洗液和肺脏组织。肺脏迅速冷冻或固定于福尔马林中用于后续检查。冷冻肺脏保存于-80℃。

1.2.2 小鼠一般情况观察 每日观察各组小鼠精神状态(如小鼠聚团蜷缩、活动明显减少、精神萎靡、竖毛、眼角分泌物等表现)以及生存情况。

1.2.3 小鼠肺组织病理学观察 通过HE染色评估肺脏的病理变化。小鼠肺脏组织被切片并在4%多聚甲醛中固定过夜, 随后进行HE染色, 并在光学显微镜下观察肺脏组织的病理变化。根据先前建立的方案对肺损伤严重程度进行盲法评分: 0分表示无损伤; 1分表示肺损伤面积小于25%; 2分表示肺损伤面积25%~50%; 3分表示肺损伤面积50%~75%; 4分表示肺损伤面积超过75%。

1.2.4 细胞分组、造模及给药方案 RAW264.7细胞在37℃、含5% CO₂的条件下, 用含10%胎牛血清(FBS)的改良Eagle培养基培养, 培养基中添加了双抗(100 μg/mL青霉素和100 μg/mL链霉素)。LPS使用浓度为1 μg/mL。

1.2.4.1 筛选血必净适宜作用浓度及细胞表型观测的实验分组 对照组: 正常培养基处理; LPS组: 给予LPS刺激24 h; 不同浓度血必净预处理+LPS组: 分别在LPS刺激前12 h给予1:100、1:50、1:25及1:10稀释的血必净干预, 再予LPS处理24 h。

1.2.4.2 探究血必净调控PLTP表达及信号通路机制的分组 对照组: 正常培养基处理; LPS组: LPS刺激2 h; LPS+XBJ组: 1:50稀释血必净预处理12 h后加入LPS孵育2 h。

1.2.4.3 验证PLTP过表达与血必净协同效应的分组在RAW264.7细胞中分别转染空载对照或PLTP过表达质粒, 干预分组如下: Vector+LPS组: 空载转染+LPS; Vector+血必净(1:50稀释)+LPS组: 空载转染+血必净预处理+LPS; PLTP-OE+LPS组: PLTP过表达+LPS; PLTP-OE+血必净(1:50稀释)+LPS组: PLTP过表达+血必净预处理+LPS。

1.2.5 Real-time qPCR 总RNA通过RNA提取试剂盒提取。测其浓度后并进行逆转录获得cDNA, 按照荧光定量试剂盒配制反应体系后, 于荧光定量PCR仪中扩增检测。结果以GAPDH为内参照, 目的基因相对含量采用2^{-ΔΔCt}法计算。

1.2.6 Western blotting 实验细胞和小鼠组织使用RIPA缓冲液进行裂解, 并添加磷酸酶抑制剂和完整蛋白酶抑制剂。蛋白质样品通过SDS-PAGE使用电泳槽分离, 并转移到PVDF膜上。该膜用1×无蛋白快速封闭溶液封闭

1 h, 然后加入PLTP、p-JNK、JNK、p-c-JUN、c-JUN、p-NF-κB p65、NF-κB p65、FLAG、GAPDH抗体于4℃孵育过夜。次日取出后, 在室温下与HRP偶联的二抗孵育1 h。蛋白质条带通过化学发光显影, 并使用ImageJ进行定量。

1.2.7 ELISA检测 ELISA检测支气管肺泡灌洗液、小鼠肺组织匀浆和细胞培养上清液的炎症因子。将样品加入ELISA板, 然后加入特异性抗体和底物。最终酶促反应产生可测量的颜色信号。使用酶标仪测量吸光度A以计算各因子的浓度。

1.2.8 CCK-8检测细胞活性 将RAW264.7细胞接种于96孔板中, 细胞培养箱中培养24 h。使用LPS处理24 h后, 取10% CCK-8试剂液100 μL孵育细胞1~2 h, 在酶标仪检测吸光度A_{450nm}, 确定LPS的合适浓度。

1.2.9 质粒构建及细胞转染 为构建RAW264.7细胞PLTP的过表达载体, 将小鼠PLTP基因的完整编码序列(GenBank ID: NM_001420692.1)通过EcoRI酶切位点, 克隆至pSLenti-EF1-EGFP-P2A-Puro-CMV-MCS-3xFLAG-WPRE空载体中。所构建的重组质粒命名为pSLenti-EF1-EGFP-P2A-Puro-CMV-Pltp-3xFLAG-WPRE。该载体在CMV启动子驱动下表达PLTP蛋白, 其C端融合有3×FLAG标签, 并同时表达EGFP及嘌呤霉素抗性基因作为筛选标记。所有克隆均经Sanger测序验证(正向引物: CMV-F: 5'-CGCAATAGGCGGTA GGCGTG-3'; 反向引物: 101-R: 5'-AGAGACAGCAA CCAGGAT-3')。为进行瞬时过表达, 将上述构建的过表达质粒或相应的空载体对照, 使用jetPRIME®转染试剂按照说明书转染到RAW264.7细胞中。简言之, 将质粒DNA与jetPRIME®试剂在JetPRIME®缓冲液中混合, 孵育形成复合物后, 加入细胞培养基中。转染6 h后更换为完全培养基。在转染24 h后, 通过Western blotting使用抗FLAG抗体验证PLTP蛋白的瞬时过表达效率, 并随即进行后续的LPS刺激及药物处理等实验。

1.3 统计学分析

所有实验独立重复3次, 使用GraphPad Prism软件(版本10.4.2)进行数据统计分析。计量资料以均数±标准差表示, 数据符合正态分布(Shapiro-Wilk检验)和方差齐性(Levene检验), 两组比较采用独立样本t检验, 多组比较采用单因素方差分析后进行Bonferroni校正。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血必净对脓毒症相关ARDS小鼠具有保护作用

实验流程如图1A, 生存分析显示, 对照组小鼠在4 d内全部存活, 与对照组相比, LPS组小鼠生存率明显下降(P<0.001, 图1B)。而血必净治疗提高了脓毒症

ARDS小鼠的存活率,并且LPS+HXBJ组的改善程度更为显著($P=0.0449$,图1B)。组织病理学检测结果显示,与对照组相比,LPS组小鼠肺组织出现肺泡充血、炎细胞浸润等改变,与LPS组相比,LPS+LXBJ组和LPS+

HXBJ组有所改善,并且LPS+HXBJ组更明显(图1C)。LPS+LXBJ组和LPS+HXBJ组的肺损伤评分和肺组织湿干质量比W/D均低于LPS组($P<0.001$,图1D、E)。

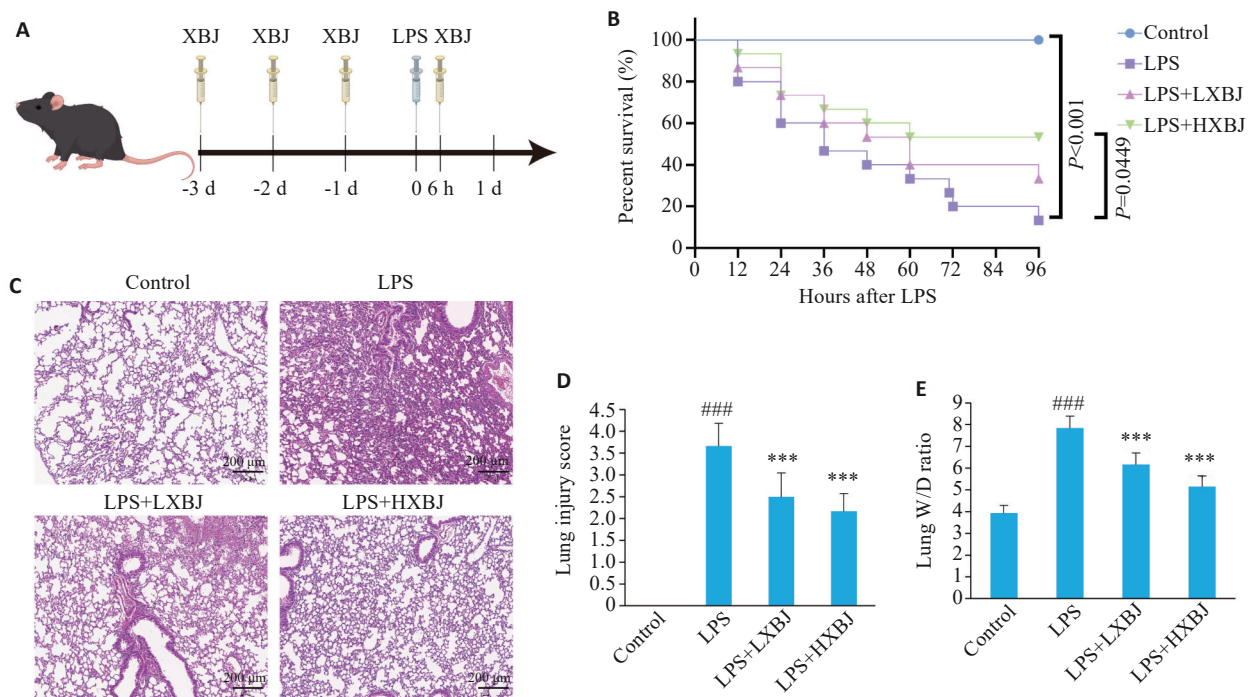


图1 血必净对脓毒症相关ARDS小鼠的保护作用

Fig.1 Protective effect of Xuebijing against sepsis-associated ARDS in mice. **A:** Schematic diagram of the experimental procedure. **B:** Four-day survival curves of the mice in each group ($n=15$). **C:** HE staining of mouse lung tissues. **D:** Lung injury scores ($n=6$). **E:** Lung wet/dry weight (W/D) ratio ($n=10$). $^{##}P<0.001$ vs Control group; $^{***}P<0.001$ vs LPS group.

2.2 血必净可改善脓毒症相关ARDS小鼠的炎症反应

免疫荧光共定位技术显示,在CD31⁺肺内皮细胞中,TNF- α 和IL-6的表达在各组间无明显变化(图2A)。而在F4/80⁺巨噬细胞中,两者的表达水平在LPS刺激后升高,并在XBJ干预后下降(图2B)。ELISA检测结果显示(图2C~H),与对照组相比,LPS组小鼠血清及支气管肺泡灌洗液(BALF)中的TNF- α 、IL-6和IL-1 β 水平均升高($P<0.001$)。与LPS组相比,血必净降低了血清及肺泡灌洗液中TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的水平,在血清中,低剂量血必净即可降低上述指标($P<0.05$),高剂量血必净作用更为显著($P<0.01$);在肺泡灌洗液中,低、高剂量血必净均可降低IL-1 β 水平($P<0.05$),高剂量血必净显著降低TNF- α 、IL-6($P<0.05$)水平,而低剂量血必净的作用未达到统计学意义($P>0.05$)。

2.3 血必净可升高脓毒症相关ARDS小鼠的PLTP水平

转录组测序结果显示,与对照组相比,LPS组中PLTP表达下调,而血必净干预后,PLTP表达明显回升(图3A)。热图分析显示,PLTP表达在不同组间呈现清晰的分组聚集趋势(图3B)。两组差异基因交集分析共

鉴定出1111个共有基因,其中包含PLTP(图3C)。qRT-PCR结果显示,与对照组相比,LPS组肺组织PLTP mRNA水平降低($P<0.001$);与LPS组相比,LPS+LXBJ组和LPS+HXBJ组PLTP mRNA水平升高($P<0.05$,图3D)。Western blotting结果显示,与对照组相比,LPS组肺组织PLTP蛋白表达降低($P<0.05$);与LPS组相比,LPS+HXBJ组PLTP蛋白表达升高($P<0.05$,图3E、F)。ELISA结果显示,与对照组相比,LPS组血清PLTP水平降低($P<0.01$);与LPS组相比,LPS+LXBJ组和LPS+HXBJ组的血清PLTP水平升高($P<0.05$,图3G)。相比于肺内皮细胞(图3H),PLTP在LPS刺激后其表达下降,血必净干预后回升,这一变化在巨噬细胞中更显著(图3I)。因此,后续将研究重点聚焦于巨噬细胞。

2.4 血必净可增强RAW264.7细胞的活力,并降低LPS诱导的RAW264.7细胞炎症因子的水平

稀释25~100倍的血必净对小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7)无毒性作用,稀释10倍的血必净处理后细胞活力下降($P<0.01$,图4A)。光学显微镜观察显示,对照组RAW264.7细胞为圆形,细胞边缘光滑。

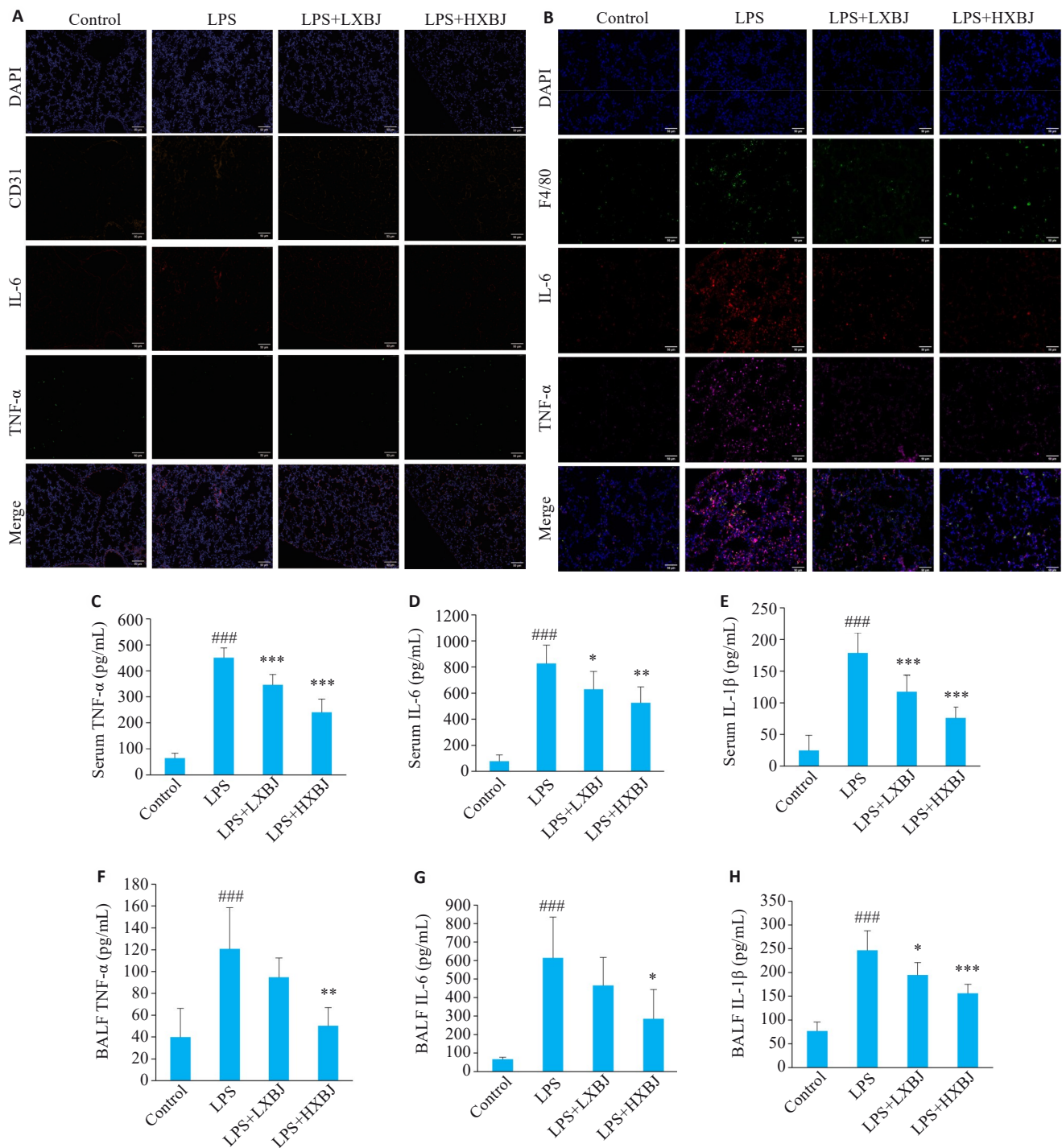


图2 血必净改善脓毒症相关ARDS小鼠的炎症反应

Fig.2 *Xuebijing* ameliorates inflammatory response in mice with sepsis-associated ARDS. A: Expressions of TNF-α and IL-6 in CD31⁺ endothelial cells detected by immunofluorescence co-localization (Scale bar=50 μm). B: Expression of TNF-α and IL-6 in F4/80⁺ macrophages detected by immunofluorescence co-localization (Scale bar=50 μm). C-H: Results of ELISA for measuring concentrations of TNF-α, IL-6, and IL-1β in serum (C-E) and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) (F-H) of the mice (n=6). ^{###}P<0.001 vs Control group; ^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01, ^{***}P<0.001 vs LPS group.

LPS刺激后的RAW264.7细胞体积增大,由圆形变为不规则多边形或多突触状且贴壁能力显著增强,细胞边缘可见明显的丝状伪足。经25~100倍稀释的血必净预处理12 h后,RAW264.7细胞的伪足形成显著减少,形态异常得到改善。虽然经过稀释10倍的血必净处理的RAW264.7细胞伪足形成减少,但漂浮细胞占比超过10%,部分细胞胞质皱缩,细胞核模糊不清(图4B)。

ELISA 检测结果显示,与对照相比,LPS上调RAW264.7细胞中IL6、TNF-α和IL-1β的水平,而血必净呈剂量依赖性抑制该效应($P<0.05$,图4C~E)。

2.5 血必净通过调节PLTP介导的JNK/c-JUN和NF-κB通路激活发挥作用

qRT-PCR检测结果显示,与对照组相比,LPS组RAW264.7细胞PLTP mRNA水平降低($P<0.01$,图5A)。

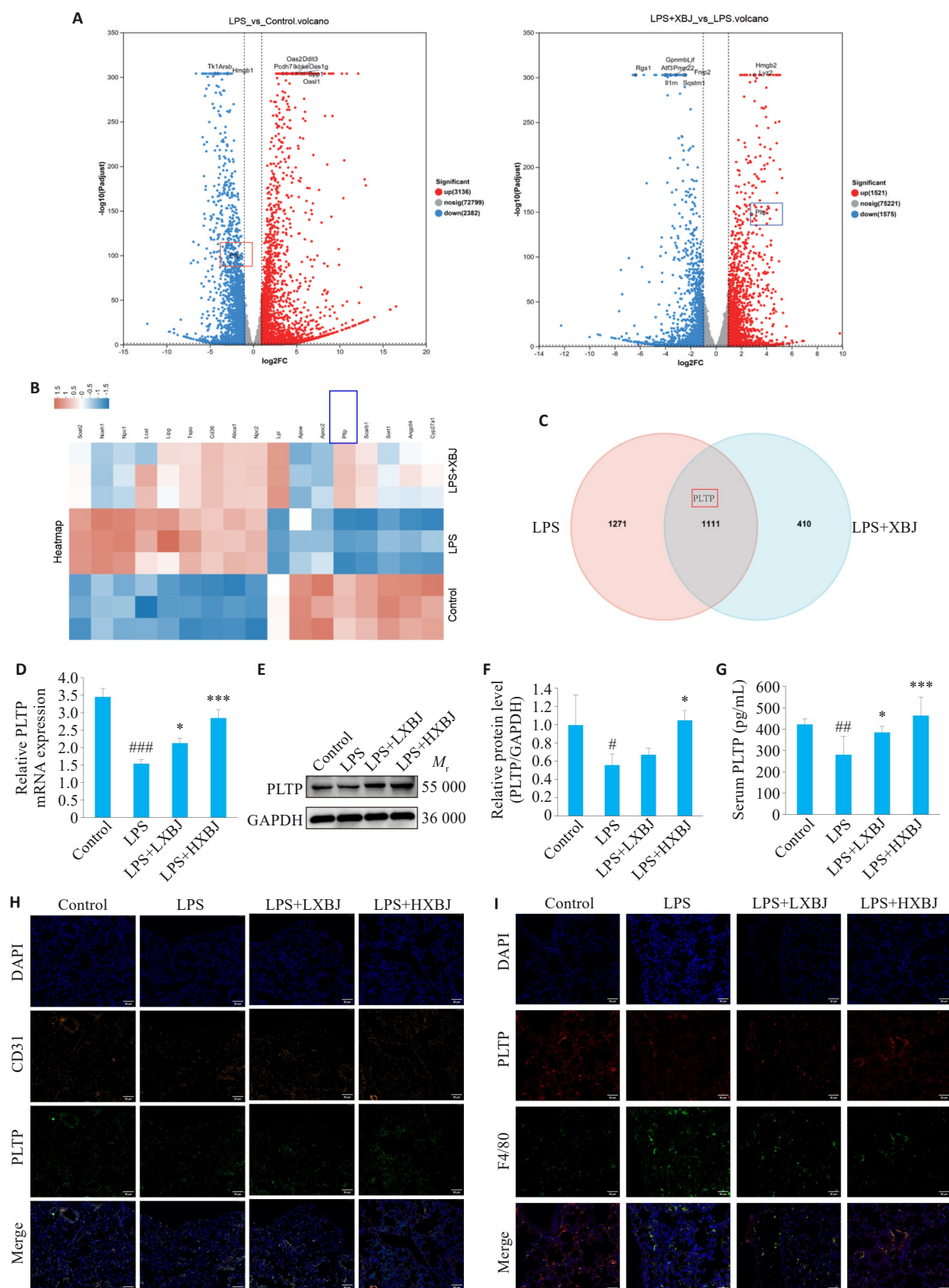


图3 血必净上调脓毒症相关ARDS小鼠的PLTP表达

Fig. 3 *Xuebijing* upregulates PLTP expression in sepsis-associated ARDS mice. **A**: Transcriptomic sequencing analysis showing downregulation of PLTP by LPS and upregulation by *Xuebijing*. **B**: Heatmap of PLTP expression in different groups. **C**: Venn diagram of differentially expressed genes between LPS and XBJ groups ($n=3$). **D**: qRT-PCR analysis of PLTP mRNA levels in mouse lung tissue. **E**, **F**: Western blotting for detecting PLTP protein expression in mouse lung tissue. **G**: ELISA measurement of serum PLTP levels. **H**: Immunofluorescence co-localization analysis of PLTP (green) with CD31⁺ endothelial cells (orange) in mouse lung tissue (Scale bar=50 μ m). **I**: Immunofluorescence co-localization analysis of PLTP (red) with F4/80⁺ macrophages (green) in mouse lung tissue (Scale bar=50 μ m). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs Control group; * $P<0.05$, *** $P<0.001$ vs LPS group.

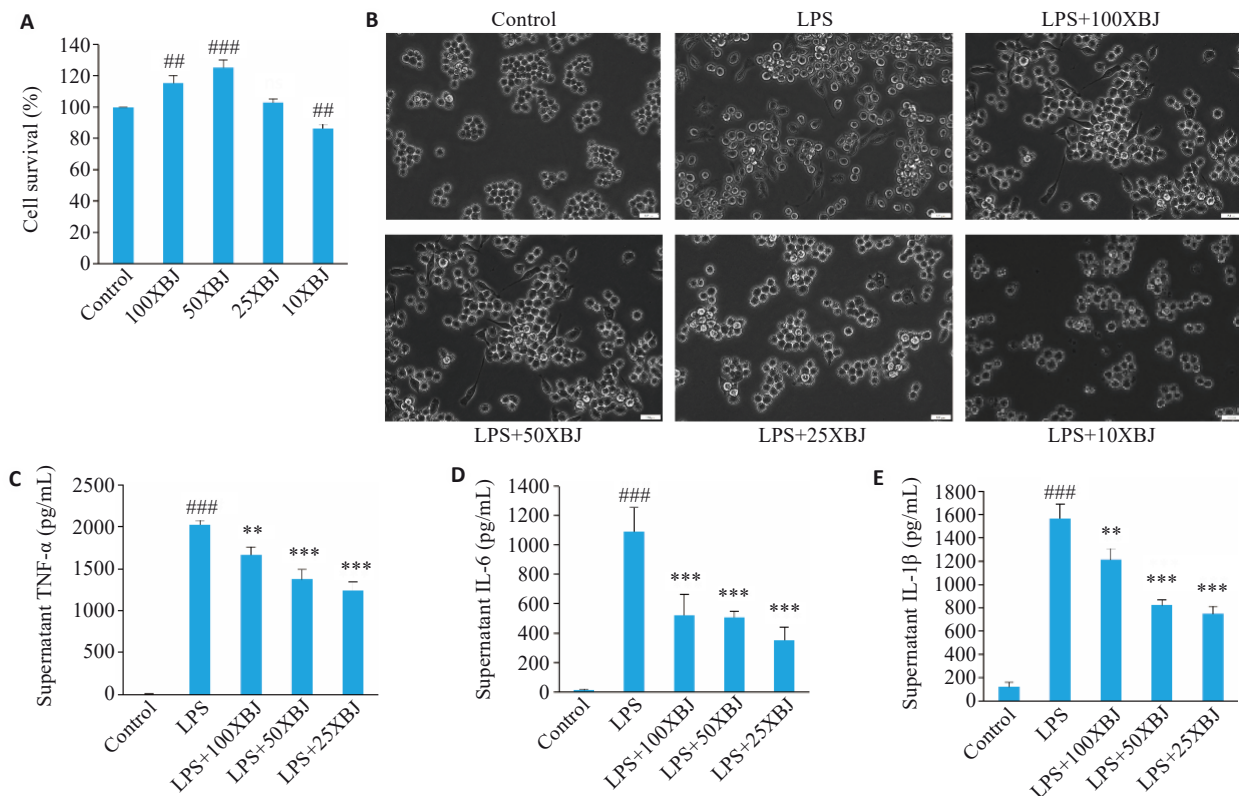


图4 血必净增强RAW264.7细胞活力并抑制LPS诱导的炎症因子释放

Fig.4 *Xuebijing* enhances viability and suppresses LPS-induced inflammatory cytokine release in RAW264.7 cells. **A:** Effect of *Xuebijing* at different dilutions on RAW264.7 cell viability measured by CCK-8 assay ($n=3$). **B:** Morphological changes of RAW264.7 cells induced by LPS and pretreatment with different concentrations of *Xuebijing* observed under optical microscope (Scale bar=100 μ m). **C-E:** ELISA measurement of TNF- α (**C**), IL-6 (**D**), and IL-1 β (**E**) levels in the supernatant of RAW264.7 cells pretreated with different concentrations of *Xuebijing* and stimulated with LPS ($n=3$). ^{###} $P<0.001$ vs Control group; ^{**} $P<0.01$, ^{***} $P<0.001$ vs LPS group.

Western blotting 检测结果显示,与对照组相比,LPS组 PLTP蛋白表达降低($P<0.05$,图5B、C)。不同稀释倍数血必净干预结果显示,与LPS组相比,稀释50倍血必净处理组 PLTP蛋白水平升高($P<0.05$,图5D、E)。KEGG 富集分析结果显示,与 siNC+LPS 组相比,siPLTP+LPS 组中差异基因显著富集于 TNF 信号通路(图5F)。Western blotting 检测结果显示,与对照组相比,LPS组 p-JNK、p-c-JUN、p-NF- κ B p65 蛋白表达水平均升高;与 LPS 组相比,LPS+XBJ 组 p-JNK、p-c-JUN、p-NF- κ B p65 蛋白表达水平均降低($P<0.05$,图5G~K)。

2.6 PLTP 过表达增强血必净对 LPS 诱导的 JNK/c-JUN 和 NF- κ B 通路激活以及炎症因子产生的抑制作用

在 RAW264.7 细胞中过表达 PLTP 后,qPCR 和 Western blotting 检测结果显示,PLTP 过表达组 PLTP mRNA 和蛋白水平均高于对照组($P<0.05$,图6A~C)。与 Vector+LPS 组相比,PLTP-OE+LPS 组 p-JNK、c-JUN、p-c-JUN 及 p-NF- κ B 蛋白表达水平降低;与 PLTP-OE+LPS 组相比,PLTP-OE+XBJ+LPS 组上述蛋白表达水平进一步降低($P<0.05$,图6D~H)。ELISA 检测结果显示,与 Vector+LPS 组相比,PLTP-OE+LPS 组细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平降低;与 PLTP-OE+

LPS 组相比,PLTP-OE+XBJ+LPS 组上述炎症因子水平进一步降低($P<0.05$,图6I~K)。

3 讨论

脓毒症是由宿主对感染反应失调所导致的危及生命的器官功能障碍,脓毒症时,全身免疫细胞激活和全身炎症反应导致器官损伤^[16]。肺是炎症因子介导的炎症反应的主要靶点,进而导致 ARDS,合并 ARDS 的脓毒症患者的 ICU 死亡率和住院死亡率明显升高^[17,18]。在中医中,脓毒症相关 ARDS 归于“暴喘、喘脱”等疾病范畴,其临床常见证型有热毒闭肺、肺热腑实、营热炽盛、痰瘀阻肺、阴阳两虚等^[19]。有学者认为,活血化瘀法应贯穿于 ARDS 治疗的全过程,因活血化瘀可祛除致病之瘀血,使肺络血行正常,减轻局部毒瘀阻滞^[20]。

近年来,中医药在脓毒症多靶点调控方面的价值日益受到重视。血必净注射液是中国国家药品监督管理局批准的静脉用注射剂,是王今达教授以清代名医王清任《医林改错》的血府逐瘀汤为基础,集活血与解毒为一体,通过红花、赤芍、川芎、丹参、当归5味中药制成的^[21]。作为一种标准化的中药提取物,该药物已被证实对脓毒症、多器官功能障碍综合征及新型冠状病毒肺炎具有明

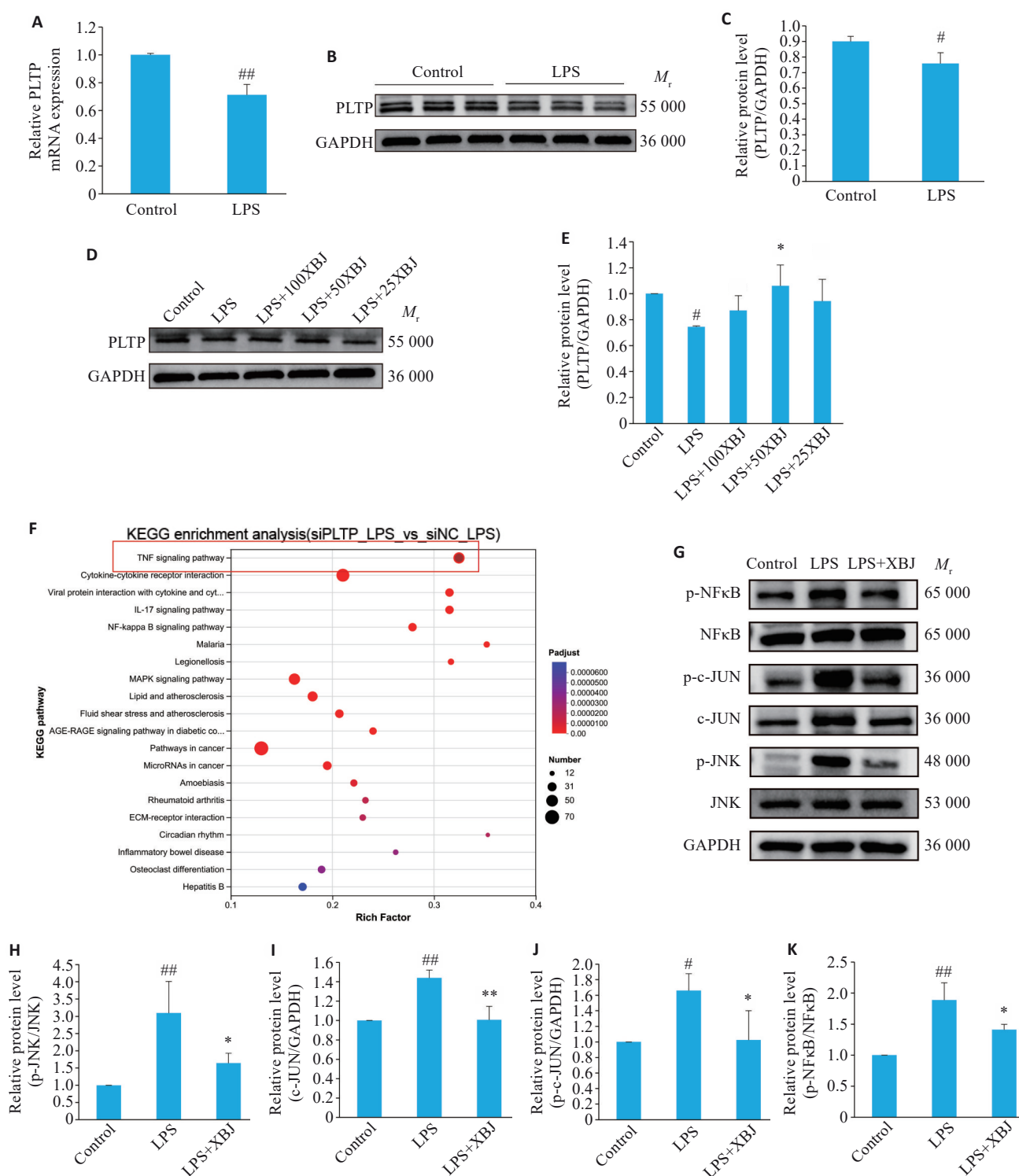


图5 血必净通过调节PLTP介导的JNK/c-JUN和NF-κB通路激活发挥作用

Fig.5 *Xuebijing* regulates PLTP-mediated activation of JNK/c-JUN and NF-κB pathways. A: qPCR analysis of the effects of LPS and *Xuebijing* on PLTP mRNA expression in RAW264.7 cells ($n=3$). B, C: Western blotting for detecting PLTP protein expression in response to LPS stimulation ($n=3$). D, E: Western blotting for detecting PLTP protein expression following treatment with different concentrations of *Xuebijing* ($n=4$). F: KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes between PLTP knockdown (siPLTP)+LPS group and control (siNC)+LPS group. G-K: Western blotting for analyzing the effects of LPS and *Xuebijing* treatment on the expressions of p-JNK, JNK, p-c-JUN, c-JUN, p-NF-κB p65, and NF-κB p65 proteins in RAW264.7 cells ($n=3$). # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs Control group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs LPS group.

确疗效^[22]。并且,脓毒症相关ARDS患者在接受100 mL/12 h,持续5 d的血必净输注后,28 d死亡率显著降低,机械通气持续时间和ICU住院时间缩短^[13]。既往研究提示,血必净可减轻脓毒症相关ARDS的炎症反应,但其

具体作用靶点与深层分子机制尚未完全阐明^[23-25]。在这一复杂的病理生理网络中,巨噬细胞作为固有免疫的关键效应细胞,在维持肺泡微环境稳态中起着关键作用,包括释放促炎因子、招募炎症细胞、分泌抗炎介质以及

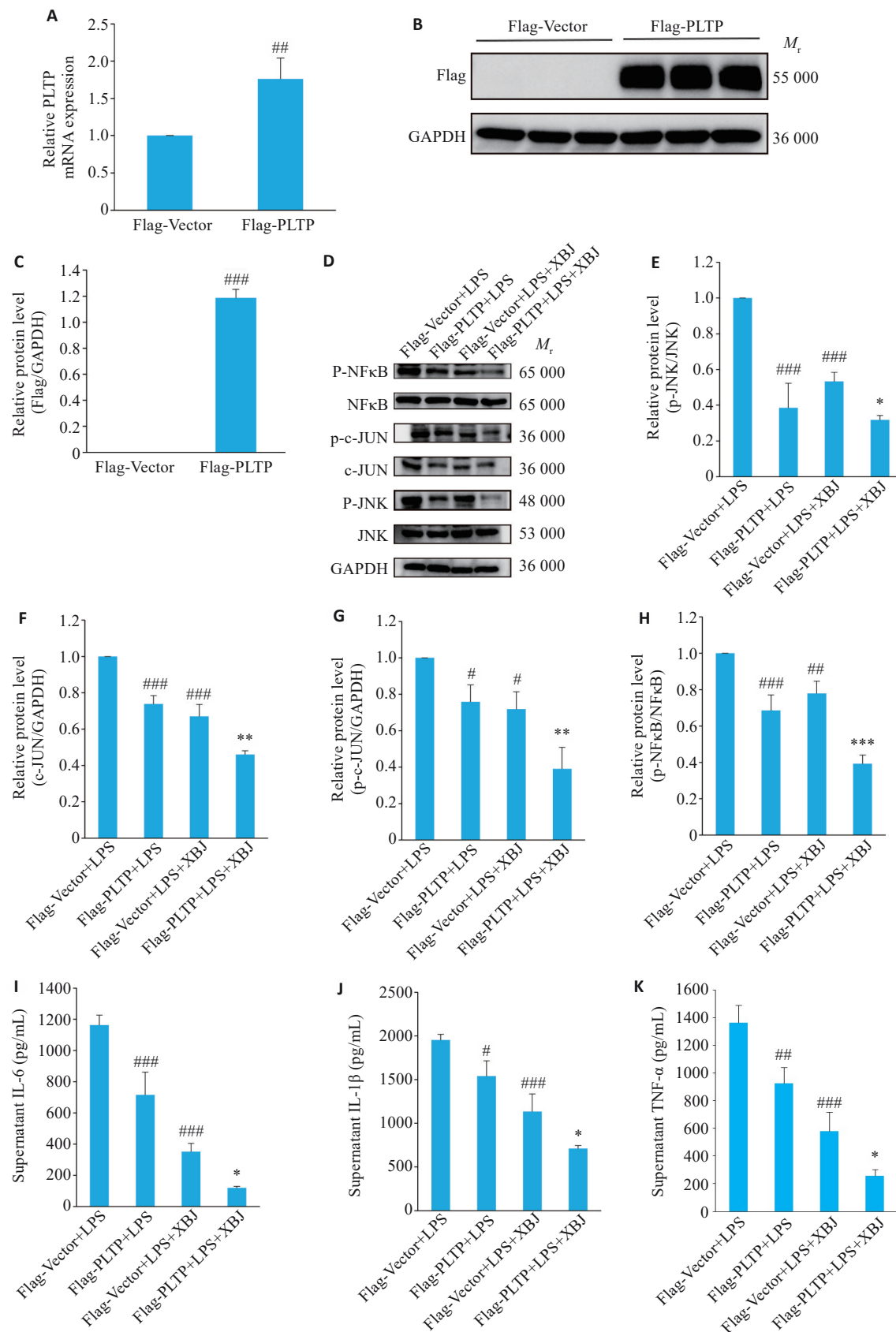


图6 PLTP过表达增强血必净对炎症通路及因子产生的抑制作用

Fig.6 PLTP overexpression enhances the inhibitory effect of Xuebijing on inflammatory pathways and cytokine production. A-C: Validation of PLTP overexpression efficiency in RAW264.7 cells by qPCR (A) and Western blotting (B, C) ($n=3$; ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ vs Flag-Vector group). D-H: Western blotting for analyzing the effects of PLTP overexpression and Xuebijing treatment on LPS-induced expressions of p-JNK, JNK, p-c-JUN, c-JUN, p-NF- κ B p65, and NF- κ B p65 proteins ($n=3$). I-K: Results of ELISA for measurement of the levels of IL-6 (I), IL-1 β (J), and TNF- α (K) in the supernatant of LPS-stimulated RAW264.7 cells with PLTP overexpression and XBJ treatment ($n=3$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs Flag-Vector+LPS group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs Flag-PLTP+LPS group.

清除细胞碎片^[26,27]。本研究通过免疫荧光共定位技术分别检测了TNF- α 、IL-6及PLTP在CD31⁺肺内皮细胞与F4/80⁺巨噬细胞中的表达特征。结果发现,TNF- α 和IL-6的表达水平在LPS刺激后升高、血必净干预后下降的变化也主要定位于巨噬细胞。同时,PLTP在LPS刺激后表达下降、血必净干预后回升的变化主要发生于巨噬细胞,在内皮细胞中无明显改变。上述结果表明,尽管肺内皮细胞是肺组织中的主要细胞成分,但本研究中PLTP的表达调控及其介导的炎症反应主要依赖于巨噬细胞。因此,本研究将后续机制研究聚焦于巨噬细胞。

本研究发现,血必净能剂量依赖性地改善LPS刺激下RAW264.7巨噬细胞的异常形态,抑制促炎细胞因子分泌,且无明显细胞毒性,提示其具有直接调控巨噬细胞炎症表型的作用。这一结果与先前研究认为血必净可拮抗内毒素、抑制单核/巨噬细胞炎症介质释放的结论相一致^[13]。更重要的是,通过转录组测序分析,我们首次发现血必净干预与PLTP表达及功能高度相关。PLTP是一种磷脂转运蛋白,能结合并转运多种两亲性化合物,包括磷脂、胆固醇、甘油二酯、生育酚和LPS等^[28]。这种功能使PLTP在脂蛋白代谢、心血管疾病、炎症、感染和脓毒症等疾病中发挥着重要作用^[9,29-31]。我们前期研究证实了PLTP在脓毒症相关急性肾损伤中的作用。具体为,PLTP敲除的脓毒症小鼠的肾功能损害程度较野生型脓毒症小鼠更为严重,其次对脓毒症小鼠给予rhPLTP处理后,提高了10 d生存率,调节了免疫炎症反应并且改善了肾功能损害^[32]。有研究表明PLTP激活对于巨噬细胞的炎症反应至关重要^[31]。本研究进一步拓展了PLTP在脓毒症相关ARDS中的角色,并明确血必净通过激活PLTP,进而抑制下游JNK/c-JUN/NF- κ B通路,减轻炎症级联反应。这一发现得到功能实验的支持:敲低PLTP后,血必净的抗炎作用被削弱,从而反向验证了PLTP在其药理机制中的关键地位。本研究结果提示,在LPS诱导的ARDS模型中,血必净通过激活PLTP,可能促进了巨噬细胞向抗炎表型转换,或抑制其过度活化的促炎方向,从而减轻肺泡炎症浸润与组织损伤。此外,血必净对PLTP-NF- κ B轴的影响,也为其改善脓毒症小鼠生存率及肺功能提供了解释。

本研究仍存在一定局限。首先,尽管本研究在细胞与动物模型中明确了血必净-PLTP-JNK/c-JUN/NF- κ B轴的作用,但PLTP是否为血必净的唯一直接靶点,仍需进一步通过结合实验予以验证。其次,血必净作为复方制剂,成分复杂,究竟是哪一类化合物主导了PLTP激活效应,值得深入分离鉴定。此外,本研究主要聚焦于巨噬细胞,而脓毒症中其他免疫细胞(如中性粒细胞、T细胞)及内皮细胞、上皮细胞等在PLTP调控网络中的作用,也有待后续探索。最后,临床患者中PLTP表达水平

与血必净疗效的相关性,仍需前瞻性队列研究加以证实。

综上所述,本研究从“瘀毒互结”理论出发,结合现代分子生物学技术,不仅证实了血必净在脓毒症相关ARDS中的保护作用,更首次揭示其通过靶向PLTP、抑制JNK/JUN/NF- κ B信号通路,调控巨噬细胞介导的全身炎症反应的新机制。这为血必净的临床应用提供了更深入的科学依据,也为脓毒症多靶点治疗策略的开发提供了新思路。未来需围绕PLTP在脓毒症免疫代谢调控中的角色,以及血必净多组分协同作用的药理网络进一步研究。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Abasiyanik MF, Wolfe K, Van Phan H, et al. Ultrasensitive digital quantification of cytokines and bacteria predicts septic shock outcomes[J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 2607.
- [2] Gong HK, Chen Y, Chen ML, et al. Advanced development and mechanism of sepsis-related acute respiratory distress syndrome[J]. *Front Med*, 2022, 9: 1043859.
- [3] Wick KD, Ware LB, Matthay MA. Acute respiratory distress syndrome[J]. *Bmj*, 2024, 387: e076612.
- [4] Bos LDJ, Ware LB. Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes[J]. *Lancet*, 2022, 400(10358): 1145-56.
- [5] Flannagan RS, Jaumouillé V, Grinstein S. The cell biology of phagocytosis[J]. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2012, 7: 61-98.
- [6] Jones Q, Zheng J, Li ZQ, et al. Effect of phospholipid transfer protein on plasma sphingosine-1-phosphate[J]. *J Biol Chem*, 2024, 300(11): 107837.
- [7] Augustin B, Wu DY, Black LP, et al. Multiomic molecular patterns of lipid dysregulation in a subphenotype of sepsis with higher shock incidence and mortality[J]. *Crit Care*, 2024, 28(1): 431.
- [8] Nguyen M, Alvarez M, Berthoud V, et al. High-density lipoproteins alleviate the endotoxin burden in patients with peritonitis and sepsis: TheLIPSstudy[J]. *Eur J Clin Investigation*, 2025, 55(12): e70099.
- [9] Gautier T, Deckert V, Nguyen M, et al. New therapeutic horizons for plasma phospholipid transfer protein (PLTP): Targeting endotoxemia, infection and sepsis[J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 236: 108105.
- [10] Ogier N, Klein A, Deckert V, et al. Cholesterol accumulation is increased in macrophages of phospholipid transfer protein-deficient mice: normalization by dietary alpha-tocopherol supplementation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(11): 2407-12.
- [11] Liao M, Zhang LT, Bai LJ, et al. Xuebijing injection reduces COVID-19 patients' mortality as influenced by the neutrophil to lymphocyte platelet ratio[J]. *J Integr Med*, 2025, 23(3): 282-8.
- [12] Li CY, Wang P, Li M, et al. The current evidence for the treatment of sepsis with Xuebijing injection: Bioactive constituents, findings of clinical studies and potential mechanisms[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 265: 113301.

- [13] Liu SQ, Yao C, Xie JF, et al. Effect of an herbal-based injection on 28-day mortality in patients with sepsis: the EXIT-SEP randomized clinical trial[J]. JAMA Intern Med, 2023, 183(7): 647.
- [14] Kang J, Hu DJ, Li YX, et al. Xuebijing injection reduces 28-day mortality in patients with septic shock[J]. Crit Care, 2025, 29(1): 419.
- [15] Cheng C, Ren C, Li MZ, et al. Pharmacologically significant constituents collectively responsible for anti-sepsis action of XueBiJing, a Chinese herb-based intravenous formulation[J]. Acta Pharmacol Sin, 2024, 45(5): 1077-92.
- [16] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3)[J]. Jama, 2016, 315(8): 801.
- [17] Auremma CL, Zhuo HJ, Delucchi K, et al. Acute respiratory distress syndrome-attributable mortality in critically ill patients with sepsis[J]. Intensive Care Med, 2020, 46(6): 1222-31.
- [18] Lorenzo Cárdenas C, Yébenes JC, Vela E, et al. Trends in mortality in septic patients according to the different organ failure during 15 years[J]. Crit Care, 2022, 26(1): 302.
- [19] 方邦江, 刘良. 脓毒症相关急性呼吸窘迫综合征的中西医治疗[J]. 临床急诊杂志, 2025, 26(01): 79-85.
- [20] 丁伟超, 陈娟, 叶英, 等. 血必净注射液治疗脓毒症相关急性呼吸窘迫综合征肺热血瘀证患者的临床疗效[J]. 中草药, 2024, 55(19): 6645-54.
- [21] Zhang ZY, Li XY, Zhou JP, et al. Xuebijing injection in the treatment of COVID-19: an update on clinical studies, potentially active metabolites and mechanisms[J]. Front Pharmacol, 2026, 16: 1667022.
- [22] Zhan YX, Wang YB, Zhang BY, et al. Xuebijing injection mitigates instant blood-mediated inflammatory reaction and enhances intrahepatic islet transplantation *via* target NF- κ B pathway[J]. Front Immunol, 2025, 16: 1671966.
- [23] Ren TY, Chen QH, Xu JZ, et al. Xuebijing alleviates sepsis-induced acute lung injury by inhibiting alveolar epithelial cell apoptosis *via* cAMP/PKA signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2025, 353: 120370.
- [24] Zhang S, Jiang M, Wu C, et al. Modulation of the CEACAM1/TIM3 pathway by traditional Chinese medicine Xuebijing alleviates sepsis-induced acute lung injury through inhibition of NETs formation[J]. J Ethnopharmacol, 2025, 353: 120280.
- [25] Cui JY, Deng YX, Li XC, et al. Herbal-based Xuebijing injection ameliorated vascular endothelial dysfunction *via* inhibiting ACLY/MYB/RIG-I axis in sepsis-associated lung injury[J]. Phytomedicine, 2025, 140: 156573.
- [26] Ji HY, Zhang CM, Xu FY, et al. Inhaled pro-efferocytic nanozymes promote resolution of acute lung injury[J]. Adv Sci, 2022, 9(26): 2201696.
- [27] Huang WC, Wen LH, Tian H, et al. Self-propelled proteomotors with active cell-free mtDNA clearance for enhanced therapy of sepsis-associated acute lung injury[J]. Adv Sci, 2023, 10(27): 2301635.
- [28] Mansuy M, Baille S, Canet G, et al. Deletion of plasma *Phospholipid Transfer Protein (PLTP)* increases microglial phagocytosis and reduces cerebral amyloid- β deposition in the J20 mouse model of Alzheimer's disease[J]. Oncotarget, 2018, 9(28): 19688-703.
- [29] Yazdanyar A, Jiang XC. Liver phospholipid transfer protein (PLTP) expression with a PLTP-null background promotes very low-density lipoprotein production in mice[J]. Hepatology, 2012, 56(2): 576-84.
- [30] Vergeer M, Bockholdt SM, Sandhu MS, et al. Genetic variation at the *Phospholipid transfer Protein* Locus affects its activity and high-density lipoprotein size and is a novel marker of cardiovascular disease susceptibility[J]. Circulation, 2010, 122(5): 470-7.
- [31] Vuletic S, Dong W, Wolfbauer G, et al. PLTP regulates STAT3 and NF κ B in differentiated THP1 cells and human monocyte-derived macrophages[J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Res, 2011, 1813(10): 1917-24.
- [32] Jiang W, Song L, Gong WL, et al. The role of phospholipid transfer protein in sepsis-associated acute kidney injury[J]. Crit Care, 2025, 29(1): 33.

(编辑:林萍)