

· 论著 · 一次研究 ·

鱼腥草水提取物基于PI3K、Wnt和NF- κ B抗炎信号通路抑制内毒素诱导的葡萄膜炎大鼠的机制研究

张 城¹, 高辰飞¹, 费春霞¹, 瞿 飞²

1. 嘉兴市中医医院检验科 (浙江嘉兴 314001)

2. 嘉兴市中医医院急诊科 (浙江嘉兴 314001)

【摘要】目的 探讨鱼腥草水提取物对内毒素诱导的大鼠葡萄膜炎 (EIU) 的影响及机制。**方法** 将 Lewis 大鼠随机分为 5 组: 正常对照组、EIU 组、EIU+ 生理盐水组、EIU+ 鱼腥草提取物组及 EIU+ 地塞米松组。建模 24 h 后观察各组大鼠眼部炎症、检测房水中的浸润细胞和蛋白质浓度、HE 染色观察眼部组织病理学变化。同时, 培养大鼠视网膜细胞分成 4 组: 正常对照组、LPS 组、LPS+ 生理盐水组及 LPS+ 鱼腥草组。24 h 后, 检测 4 组细胞的存活能力、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6) 以及炎症相关通路的蛋白表达水平。**结果** 与 EIU 组相比, 鱼腥草提取物组的临床炎症评分、浸润细胞数、病理分级和蛋白质浓度显著降低 ($P < 0.05$)。与 LPS 组和 LPS+ 生理盐水相比, LPS+ 鱼腥草组的大鼠视网膜细胞存活率明显升高, 而 TNF- α 、IL-6 mRNA 和蛋白表达水平以及磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) / 蛋白激酶 B (AKT) / 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)、Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin)、核因子 κ B (NF- κ B) / 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路相关蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。**结论** 鱼腥草水提取物可有效治疗 EIU 大鼠并缓解 LPS- 诱导的大鼠视网膜细胞炎症, 其机制可能与抑制 PI3K/AKT/mTOR、Wnt/ β -catenin 以及 NF- κ B/MAPK 信号通路相关。

【关键词】 鱼腥草水提取物; 葡萄膜炎; 炎症因子; 磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; Wnt/ β -连环蛋白; 核因子 κ B/丝裂原活化蛋白激酶

【中图分类号】 R285.5**【文献标识码】** A

Mechanism of houttuynia cordata aqueous extract inhibiting endotoxin-induced uveitis in rats based on the anti-inflammatory signaling pathways of PI3K, Wnt and NF- κ B

ZHANG Cheng¹, GAO Chenfei¹, FEI Chunxia¹, QU Fei²

1. Department of Laboratory, Jiaxing Traditional Chinese Medicine Hospital, Jiaxing 314001, Zhejiang Province, China

2. Department of Emergency, Jiaxing Traditional Chinese Medicine Hospital, Jiaxing 314001, Zhejiang Province, China

Corresponding author: ZHANG Cheng, Email: loginyy02@126.com

【Abstract】Objective To investigate the therapeutic effect of Houttuynia cordata extract on endotoxin induced uveitis (EIU) in rats and analyze its anti-inflammatory molecular

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202505020

基金项目: 嘉兴市公益性研究计划项目 (2022AD10008)

通信作者: 张城, 副主任技师, Email: loginyy02@126.com

<https://yxqy.whuzhmedj.com>

mechanism. **Methods** In the animal experiment, Lewis rats were randomly divided into 5 groups: normal control group, EIU model group, EIU model+normal saline group, EIU model+Houttuynia cordata extract group and EIU model+dexamethasone group. At 24 hours after modeling, ocular inflammation in five groups of rats was observed and scored, the concentrations of infiltrating cells and proteins in aqueous humor were detected, and HE staining was performed to observe the histopathological changes of ocular tissues. In the cell experiment, rat retinal cells were cultured, and the cells were randomly divided into 4 groups: the normal control group, the LPS group, the LPS+ normal saline group, and the LPS+Houttuynia cordata group. After 24 hours, the survival ability of the four groups of cells, TNF- α , IL-6, and the protein expression levels of inflammation-related pathways were detected. **Results** Compared with the EIU model group, the clinical inflammation score, the number of infiltrating cells, pathological grade and the protein concentration in the EIU model+Houttuynia cordata extract group were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the LPS group and LPS+normal saline group, the survival rate of retinal cells in the LPS+Houttuynia cordata group of rats was significantly increased. However, the expression levels of TNF- α , IL-6 mRNA and protein, as well as the protein expression levels of factors related to the PI3K/AKT/mTOR, Wnt/ β -catenin, NF- κ B/MAPK signaling pathways were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Houttuynia cordata extract can effectively treat EIU rats and alleviate LPS induced retinal cell inflammation in rats. Its mechanism may be related to inhibition of the activity of PI3K/AKT/mTOR, Wnt/ β -Catenin and NF- κ B/MAPK signaling pathways.

【Keywords】 Houttuynia cordata aqueous extract; Uveitis; Inflammatory factor; PI3K/AKT/mTOR; Wnt/ β -catenin; NF- κ B/MAPK

葡萄膜炎指眼睛中间着色部位、具有血管结构的眼球部位的炎症，好发于 20~50 岁的年龄段人群^[1]。虽然葡萄膜炎的病因尚未完全明确，但无论是感染性还是非感染性葡萄膜炎，其病因很大程度上均与病原体的感染和随之引发的炎症有关^[2]，即慢性炎症在葡萄膜炎的发生发展过程中发挥着重要作用^[3]。因此，最新的治疗理念将抗感染、抗炎作为治疗此类疾病的重点。目前，皮质类固醇是治疗大多数葡萄膜炎的一线疗法，但由于药物本身特征，会引发不良反应，如白内障、青光眼、儿童发育延迟等^[4]。因此，寻找和筛选具有更显著抗炎活性的药物，已成为葡萄膜炎新疗法和新药物开发的主要发展方向。鱼腥草（Houttuynia cordata）属于三白草科（Saururaceae），是一种具有重要药用价值的传统草本植物。现代药学研究表明，鱼腥草提取物对多种疾病有效，现已用于癌症、糖尿病、肥胖症、肺纤维化、皮肤病等疾病的治疗中，并取得了较好的临床效果^[5-7]。既往研究发现，鱼腥草提取物具有抗炎作用，鱼腥草提取物可降低丙泊酚诱导的神经元细胞中的炎症因子水平，如肿瘤坏死因子 α （tumor necrosis factor- α ，

TNF- α ）、白细胞介素（interleukin, IL）-6 和 IL-1 β ^[8]；鱼腥草提取物可抑制炎症因子（IL-6、IL-8 和 TNF- α ）水平，通过抗炎作用改善间质性膀胱炎大鼠膀胱损伤和症状^[9]；鱼腥草水提取物可通过抑制 TNF- α 、IL-6、 β -己糖苷酶等的释放以抑制免疫球蛋白 E 介导的炎症反应^[10]。由于鱼腥草提取物具有显著的抗炎特性，本研究拟采用鱼腥草水提取物对内毒素-诱导的葡萄膜炎（endotoxin induced uveitis, EIU）大鼠模型进行眼部局部治疗并对水提取物的在体疗效进行评价；同时，在细胞水平上，对鱼腥草水提取物的抗炎作用分子机制进行进一步的深入研究，以期为临床使用鱼腥草水提取物辅助治疗葡萄膜炎，提供细胞水平和动物模型水平的研究数据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

LX-200 离心机（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）；SCIENTZ-20F/A 冷冻干燥机（宁波新芝冻干设备股份有限公司）；SZX16 显微外科显微镜（日本 Olympus 公司）；BB15 二氧化

碳恒温培养箱（美国赛默飞世尔科技公司）；Multiskan™ FC 酶标仪（美国赛默飞世尔科技公司）；QuantStudio™ 3 实时荧光定量 PCR 仪（美国赛默飞世尔科技公司）；PowerPac HV 电泳仪（美国伯乐生命医学产品有限公司）。

1.2 主要药品与试剂

氯胺酮（批号：20210311）、甲苯噻嗪（批号：20220405）、盐酸去氧肾上腺素（批号：20220715）、托吡卡胺（批号：20220902）和盐酸羟丁卡因（批号：20210524）均购自山西太原药业；脂多糖（lipopolysaccharide, LPS, 美国 EMD Chemicals 公司，批号：0000434301，纯度 $\geq 97\%$ ）；地塞米松（批号：WXB5978V，纯度 $\geq 97\%$ ）、多聚甲醛（批号：SDBB3881）、台盼蓝溶液（批号：RNB1133）、磷酸酶抑制剂（批号：0000445805）、蛋白酶抑制剂（批号：0000403468）和 PVDF 膜（批号：0000354357）均购自美国 Sigma-Aldrich 公司；生理盐水（批号：ST341，上海碧云天生物技术有限公司）；BCA 蛋白质测定试剂盒（批号：0000459021）和 ECL 发光液系统（批号：0000473548）购自美国 Pierce 公司；苏木精和伊红染色试剂盒（HE，北京雷根生物技术有限公司，批号：20211214）；CCK-8 细胞增殖测定试剂盒（美国 Promega 公司，批号：BCCL9232）；TRIzol（美国 Thermo Fisher 公司，批号：10177091）；RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒（批号：20230545）、Quant cDNA 第一链合成试剂盒（批号：20230308）和 FastFire qPCR PreMix（SYBR Green）（批号：20230403）购自天根生化科技（北京）有限公司；TNF- α （批号：17212）和 IL-6 ELISA 检测试剂盒（批号：180105）购自上海酶联生物科技有限公司；IPA 裂解液（批号：3214589）和 BCA 测定试剂盒（批号：3214860）购自美国 Thermo Fisher 公司；一抗：磷脂酰肌醇-3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K, 批号：ab140307）、p-PI3K（批号：ab182651）、蛋白激酶 B（AKT, 批号：ab8805）、p-AKT（批号：ab38449）、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin, mTOR, 批号：ab32028）、p-mTOR（批号：ab109268）、Wnt3a（批号：ab219412）、 β -连环蛋白（ β -catenin, 批号：ab68183）、丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-

activated protein kinase, MAPK, 批号：ab170099）、p-MAPK（批号：ab308038）、核因子 κ B（nuclear factor kappa-B, NF- κ B, 批号：ab207297）、 β -肌动蛋白（ β -actin, 批号：ab8226）以及二抗山羊抗兔 IgG H&L（HRP, 批号：ab6721）均购自英国 Abcam 公司；DMEM（Dulbecco's Minimal Essential Medium）培养基（批号：C0891）、胎牛血清（批号：C0232）和青霉素/链霉素（批号：C0222）均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 动物

选取 8 周龄健康雄性 Lewis 大鼠[许可证号：SYXK（京）2022-0052，北京维通利华实验动物技术有限公司]，初始体重 160~220 g。所有大鼠饲养于 SPF 级动物实验中心的独立通风鼠笼系统中，每笼 3 只。温度 22~25℃，相对湿度 50%~70%。在构建 EIU 大鼠模型前，所有动物在实验环境中适应性饲养 1 周。本实验已通过嘉兴市中医院实验动物伦理委员会审查批准（伦理审批号：MDL2022-03-25-02）。

1.4 方法

1.4.1 鱼腥草水提取物制备

鱼腥草购于嘉兴市秀洲区常秀农贸市场。首先将鱼腥草根干燥粉碎，将 5.0 g 的鱼腥草根干粉与 50 mL 蒸馏水进行混合，室温条件下磁力搅拌 48 h；随后，将混合液在室温条件下以 2 800 $\times$ g 离心 10 min，取上清液经 Whatman® 4 号定性滤纸（孔径 20~25 μ m）过滤；滤液经冷冻干燥后，得到鱼腥草水提取物冻干粉，密封避光保存于 -20℃ 备用。使用前，鱼腥草水提取物冻干粉用生理盐水溶解。

1.4.2 EIU 大鼠模型的构建及分组

将大鼠随机分为 5 组：正常对照组（Control，常规饲养）、EIU 模型组（EIU，仅造模）、EIU 模型 + 生理盐水组（EIU+NS）、EIU 模型 + 鱼腥草水提取物组（EIU+HCAE）和 EIU 模型 + 地塞米松组（EIU+DEX），每组 3 只。除 Control 组外，其余各组均采用 LPS 诱导 EIU 模型^[1]。造模前，大鼠经腹膜内注射氯胺酮（72 mg/kg）和甲苯噻嗪（4 mg/kg）混合麻醉，眼部预处理包括 0.5% 盐酸去氧肾上腺素和 0.5% 托吡卡胺散瞳，以及 0.4% 盐酸羟丁卡因表面麻醉。造模时，于大鼠右后足垫皮下注

射 1.0 mg/kg LPS 溶液（用生理盐水溶解），Control 组注射等体积生理盐水。造模后，在手术显微镜引导下，使用 33 号微量注射器分别向 EIU+NS、EIU+HCAE 和 EIU+DEX 组大鼠右眼玻璃体内注射 20 μ L 生理盐水、20 μ L 鱼腥草水提物（10 μ g/ μ L）或 10 μ L 地塞米松（10 μ g/ μ L，用生理盐水溶解）。

1.4.3 眼部炎症的临床评分

造模后 24 h 进行临床评分。在显微镜下观察大鼠眼前节炎症表现，包括结膜血管扩张、迂曲、充血、结膜水肿、角膜后沉积、前房闪光、纤维渗出、虹膜后粘连、瞳孔膜闭合。根据 Behar-Cohen 评分标准^[12]，由 2 名经过培训且对实验分组设盲的医师对大鼠进行独立评分。将 EIU 严重程度分为 0~4 级：0 级：无炎症反应；1 级：虹膜和结膜血管离散扩张；2 级：虹膜和结膜血管中度扩张，前房中度耀斑；3 级：虹膜强烈充血伴前房耀斑；4 级：虹膜强烈充血伴前房耀斑，以及瞳孔缩小并在瞳孔区域有纤维蛋白渗出物存在。

1.4.4 房水炎症细胞计数及蛋白浓度检测

在 LPS 注射 24 h 后，采用 30-G 针头进行前房穿刺采集房水样本。将房水与台盼蓝溶液按 1 : 5 比例稀释后，使用血细胞计数器进行炎症细胞计数；同时采用 BCA 蛋白质测定试剂盒检测房水中的总蛋白质浓度。

1.4.5 HE 染色与病理学评估

在 LPS 注射 24 h 后对大鼠实施安乐死，迅速摘取眼球并置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h。固定后的眼球经石蜡包埋后，从视神经乳头起始连续切片（5 μ m 厚度）并进行 HE 染色。在光学显微镜下观察前房炎症细胞浸润情况，并根据改良病理学评分标准评估 EIU 严重程度：0 级：正常组织；1+：虹膜血管扩张伴基质增厚，前房可见少量渗出液及散在炎性细胞；2+：虹膜及睫状体基质中等量炎症细胞浸润；3+：虹膜及睫状体重度炎症细胞浸润；4+：前房大量细胞渗出伴蛋白聚集，角膜内皮细胞沉积。

1.4.6 大鼠视网膜细胞培养及实验分组

采用 DMEM 培养基培养，培养基中添加 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素双抗，置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。将细胞接种于 96 孔板后，进行 24 h 血清饥饿处理。实验分为 4 组：

Control 组（不做任何处理）、LPS 组（加入 20 μ L LPS，终浓度 100 ng/mL）^[12-13]、LPS+ 生理盐水组（LPS+NS，同时加入 20 μ L LPS 和 20 μ L 生理盐水）、LPS+ 鱼腥草水提物组（LPS+HCAE，同时加入 20 μ L LPS 和 20 μ L 鱼腥草水提物，终浓度 0.5 μ g/ μ L）^[14]。各组细胞处理 24 h 后进行后续检测。

1.4.7 CCK-8 法检测细胞活力

采用 CCK-8 细胞增殖检测试剂盒测定细胞活力，具体操作严格参照说明书进行。简要步骤如下：将 CCK-8 溶液按 1 : 10 比例加入细胞培养基中，37 $^{\circ}$ C 孵育 1~4 h 后，使用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔吸光度值，以此反映细胞存活能力。

1.4.8 qPCR 检测视网膜细胞 TNF- α 和 IL-6 mRNA 表达水平

采用 TRIzol 法在冰上裂解细胞并提取总 RNA，使用 RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒进行 RNA 纯化。随后应用 Quant cDNA 第一链合成试剂盒将 1 μ g RNA 反转录为 cDNA。以 GAPDH 为内参基因，使用 FastFire qPCR PreMix（SYBR Green）进行实时荧光定量 PCR 反应。引物由上海生工生物工程公司合成，引物序列如下：TNF- α 正向：5'-AACACACGAGACGCTGAAGT-3'，反向：5'-TCCAGTGAGTTCGGAAGCC-3'；IL-6 正向：5'-AGAGACTTCCAGCCAGTTGC-3'，反向：5'-AGTCTCCTCTCCGACTTGT-3'；GAPDH 正向：ACAACCTTTGGTATCGTGGAAGG，反向：GCCATCACGCCACAGTTTC。反应条件：95 $^{\circ}$ C，30 s；95 $^{\circ}$ C，10 s；60 $^{\circ}$ C，10 s。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算目的基因的相对表达量。

1.4.9 ELISA 检测视网膜细胞 TNF- α 和 IL-6 蛋白表达水平

收集各组细胞培养上清液，严格按照大鼠 TNF- α 和 IL-6 ELISA 检测试剂盒说明书检测对应靶蛋白浓度。

1.4.10 Western blot 检测炎症相关通路蛋白表达

采用含磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞，使用 BCA 法测定蛋白浓度后，取 10 μ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳分离，并转印至 PVDF 膜。用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后，分别与以下一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜：p-PI3K（稀

释比例 1 : 500)、PI3K (稀释比例 1 : 2 000)、p-AKT (稀释比例 1 : 1 000)、AKT (稀释比例 1 : 1 000)、p-mTOR (稀释比例 1 : 1 000)、mTOR (稀释比例 1 : 1 000)、Wnt3a (稀释比例 1 : 1 000)、 β -catenin (稀释比例 1 : 1 000)、p-MAPK (稀释比例 1 : 1 000)、MAPK (稀释比例 1 : 1 000)、NF- κ B (稀释比例 1 : 1 000) 及 β -actin (稀释比例 1 : 1 000)。次日室温下与 HRP 标记的山羊抗兔二抗 (稀释比例 1 : 2 000) 孵育 2 h, ECL 显影后采用 Image J 软件分析条带灰度值, 以 β -actin 为内参计算各蛋白相对表达量。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 23.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间两两比较采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠眼球前房部位临床炎症评分、房水中浸润细胞数量和蛋白浓度比较

5 组大鼠眼球前房炎症指标比较结果显示: EIU 组较 Control 组临床炎症评分显著升高 ($P < 0.05$), 房水中炎症细胞计数及蛋白浓度均明显增加 ($P < 0.05$); 而 EIU+HCAE 组和 EIU+DEX 组较 EIU 组均表现出临床炎症评分显著降低 ($P < 0.05$), 房水炎症细胞数及蛋白浓度亦明显减少 ($P < 0.05$)。具体见图 1。

2.2 大鼠组织病理学检查结果比较

组织病理学检查结果显示: 与 Control 组相比, EIU 组大鼠眼组织病理分级显著升高 ($P < 0.05$); 而 EIU+HCAE 组和 EIU+DEX 组

的病理分级较 EIU 模型组明显降低 ($P < 0.05$)。具体见图 1。

HE 染色结果显示: Control 组大鼠眼组织未见明显炎症改变; EIU 组大鼠表现为虹膜血管明显迂曲充血扩张、瞳孔缩小、角膜内皮炎症细胞聚集, 前房可见纤维蛋白渗出, 虹膜睫状体基质中有大量炎性细胞 (包括中性粒细胞和单核细胞) 浸润; 而 EIU+HCAE 组和 EIU+DEX 组上述炎症表现均显著减轻, 其中 EIU+DEX 组的改善效果最为明显。具体见图 2。

2.3 大鼠视网膜细胞存活率及炎症因子表达水平比较

CCK-8 检测结果显示, LPS 组视网膜细胞存活率较 Control 组显著降低 ($P < 0.05$), 而 LPS+HCAE 组细胞存活率较 LPS 组明显提高 ($P < 0.05$)。qPCR 和 ELISA 检测结果表明, 与 Control 组相比, LPS 组 TNF- α 、IL-6 的 mRNA 表达水平和蛋白分泌量均显著升高 ($P < 0.05$); 而 LPS+HCAE 组较 LPS 组两种炎症因子的 mRNA 表达和蛋白分泌水平均明显降低 ($P < 0.05$)。具体见图 3。

2.4 大鼠视网膜细胞炎症相关通路表达水平

Western blot 检测结果显示, 4 组大鼠视网膜细胞中 PI3K/AKT/mTOR、Wnt/ β -catenin 和 NF- κ B/MAPK 信号通路相关蛋白表达水平存在显著差异 ($P < 0.05$)。具体表现为: 与 Control 组相比, LPS 组 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 比值及 Wnt3a、 β -catenin、NF- κ B、p-MAPK/MAPK 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$); 而 LPS+HCAE 组较 LPS 组上述各通路蛋白的磷酸化水平和表达量均明显降低 ($P < 0.05$)。具体见图 4~图 6。

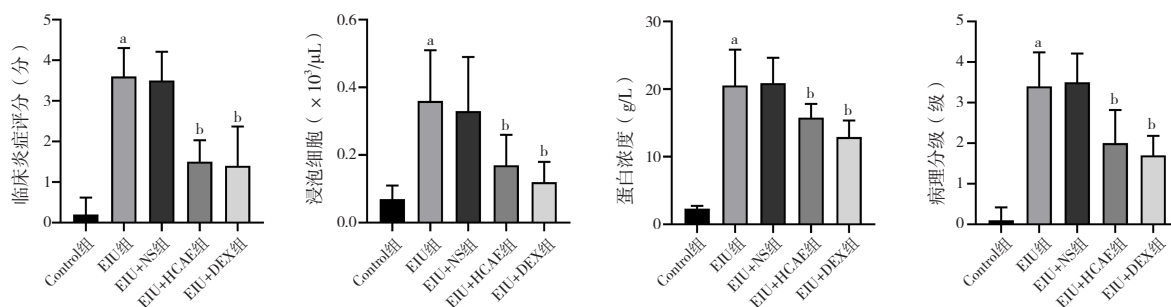


图1 大鼠眼球前房部位临床炎症评分、房水中浸润细胞数量和蛋白浓度的比较 ($n=3$)

Figure 1. Comparison of clinical inflammatory scores, the number of infiltrating cells and protein concentration in the anterior chamber of the rat eyeball ($n=3$)

注: 与 Control 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 EIU 组比较, ^b $P < 0.05$ 。

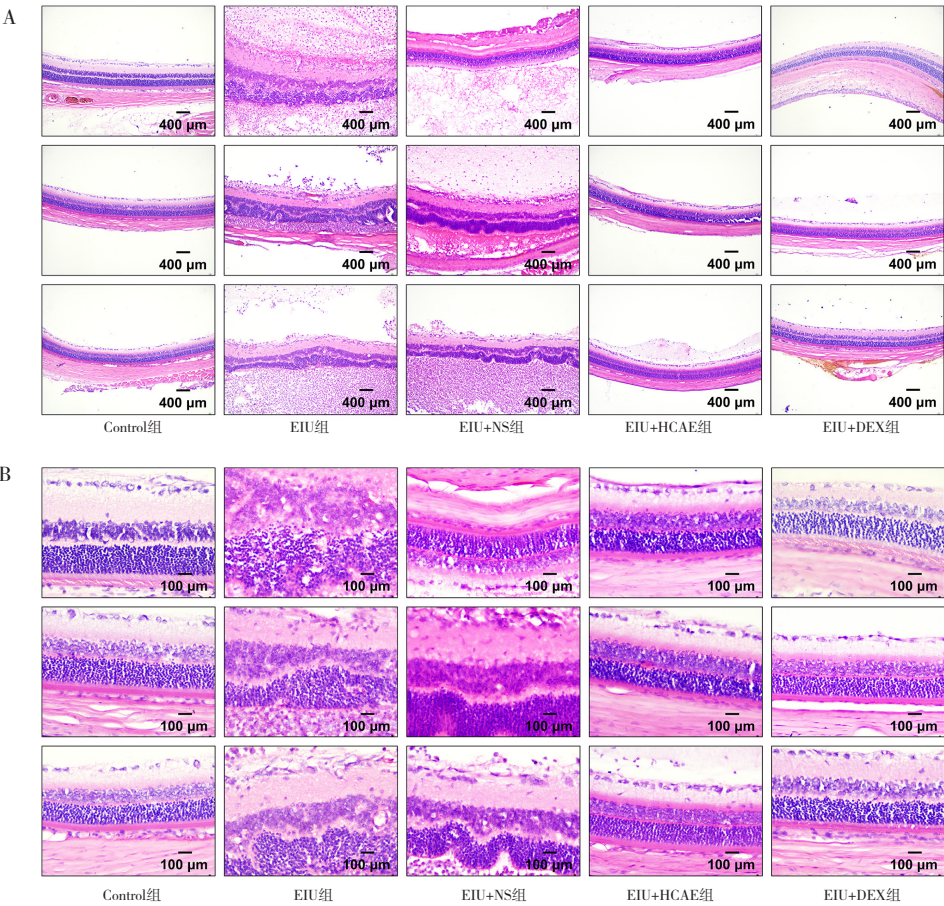


图2 大鼠眼组织切片HE染色图
Figure 2. HE stained section of rat eye tissue

注：A. ×100；B. ×400。

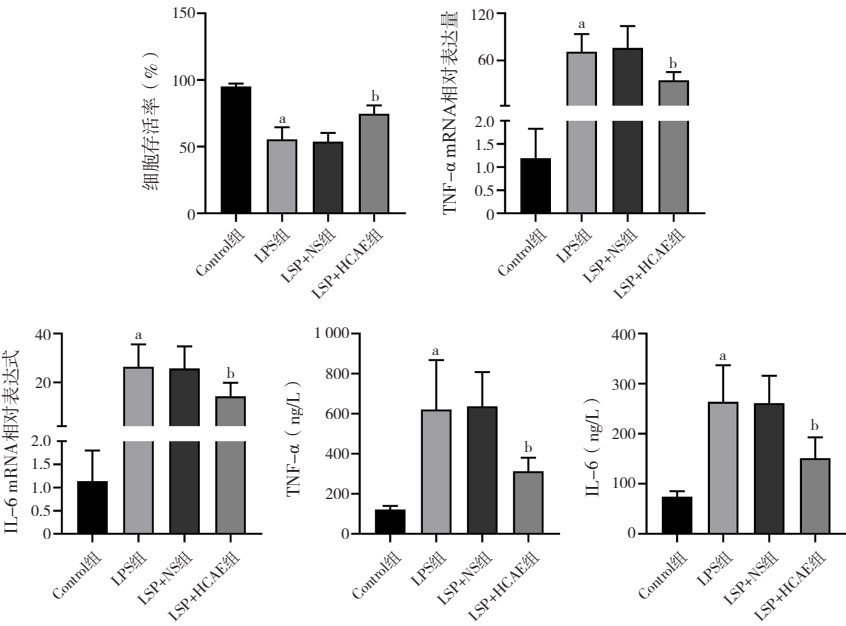


图3 大鼠视网膜细胞存活率及炎症因子表达水平比较结果 (n=3)

Figure 3. Comparison results of rat retinal cell survival rate and expression levels of inflammatory factors (n=3)

注：与Control组比较，^aP<0.05；与LPS组比较，^bP<0.05。

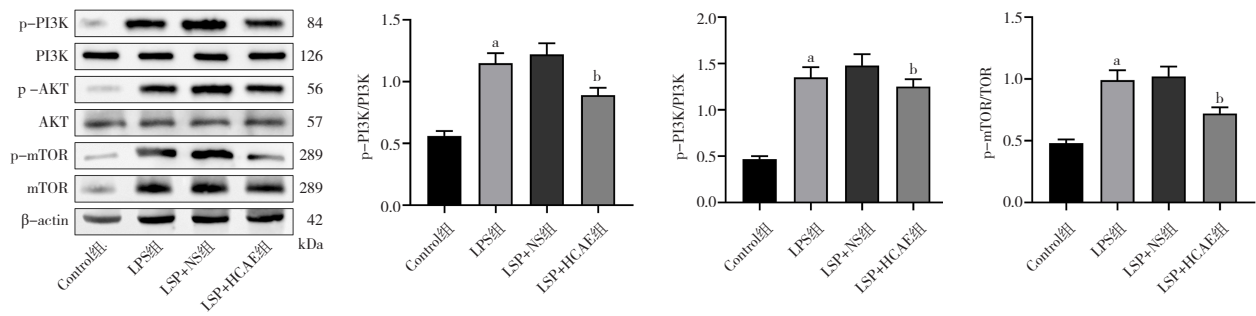


图4 大鼠视网膜细胞PI3K/AKT/mTOR信号通路相关因子表达水平比较 (n=3)

Figure 4. Comparison of expression levels of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway-related factors in rat retinal cells (n=3)

注：与Control组比较，^a*P*<0.05；与LPS组比较，^b*P*<0.05。

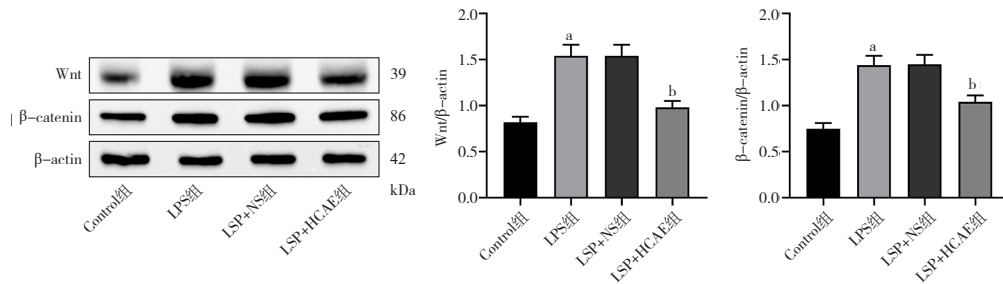


图5 大鼠视网膜细胞Wnt/β-catenin信号通路相关因子表达水平比较 (n=3)

Figure 5. Comparison of expression levels of Wnt/β-catenin signaling pathway-related factors in rat retinal cells (n=3)

注：与Control组比较，^a*P*<0.05；与LPS组比较，^b*P*<0.05。

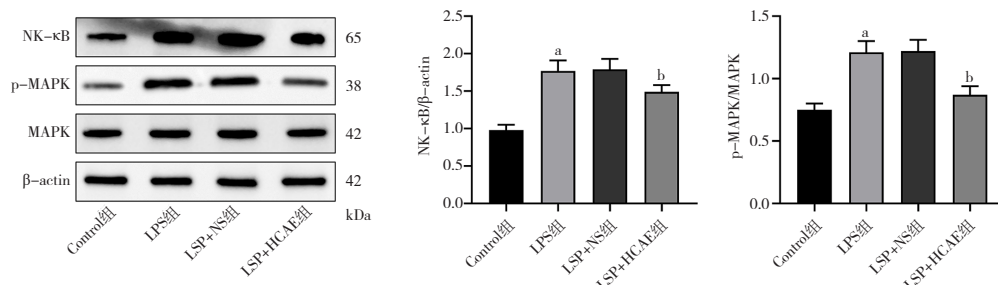


图6 大鼠视网膜细胞NF-κB/MAPK信号通路相关因子表达水平比较 (n=3)

Figure 6. Comparison of expression levels of NF-κB/MAPK signaling pathway-related factors in rat retinal cells (n=3)

注：与Control组比较，^a*P*<0.05；与LPS组比较，^b*P*<0.05。

3 讨论

在感染性葡萄膜炎的临床治疗中，针对明确病原体的特异性治疗联合全身性皮质类固醇、免疫抑制剂及类固醇植入物等局部治疗仍是主要手段^[15-16]。然而，这些传统疗法存在药物靶向性不足、系统不良反应风险高等局限性，促使研究者积极探索更安全高效的治疗策略。国内外多项研究显示：殷学伟等^[17]证实龙胆泻肝汤通过调节M1/M2巨噬细胞极化平衡改善自身免疫性葡萄膜炎；周梦贤等^[18]发现该方剂还能抑制Notch信号通路活化；袁立飞等^[19]则证实清热明目颗粒具有双向调节作用，既能抑制促炎因子分泌又可促进

抗炎因子生成；Choi等^[20]证实甜菜碱通过抗氧化和抗炎双重机制缓解症状；Park等^[21]揭示血管生成素通过调控NF-κB通路实现促炎/抗炎因子再平衡；Shi等^[22]报道KS23肽（一种源自球状脂联素的新肽）对LPS诱导的葡萄膜炎具有显著抗炎效果。这些研究为开发新型葡萄膜炎治疗药物提供了多元化的作用靶点。

鱼腥草作为多年生草本植物，其多种溶剂提取物及活性成分已被证实具有显著抗炎作用^[23-24]。现有研究表明：张俊等^[24]发现鱼腥草提取物通过抑制Toll样受体-2（Toll-like receptor-2, TLR-2）/髓分化因子88（myeloid differentiation factor 88, MyD88）/NF-κB信号通路改善支原体肺炎小鼠炎

症；王莹巍等^[25]证实鱼腥草素钠可减轻哮喘幼鼠肺部炎症，其机制可能与信号传导及转录激活蛋白3（signal transducer and activator of transcription 3, STAT3）/NF- κ B 通路抑制有关；张娅琴等^[26]报道复方鱼腥草软胶囊能增强头孢硫脒对儿童急性扁桃体炎的疗效；Cen 等^[27]则揭示鱼腥草多糖通过调节肠道菌群缓解溃疡性结肠炎。本研究基于房水细胞计数（血-房水屏障完整性指标）和临床评分系统^[28]，首次证实鱼腥草水提取物在 LPS 诱导的 EIU 模型中表现出与地塞米松相当的抗炎效果：治疗组大鼠前房炎症评分显著降低，房水炎症细胞数及蛋白浓度明显减少，HE 染色显示虹膜充血、炎细胞浸润等病理改变显著改善，病理分级显著下降。这些发现为鱼腥草在葡萄膜炎治疗中的应用提供了实验依据。

本研究进一步揭示了鱼腥草水提取物的多靶点抗炎机制。既往研究表明，LPS 处理可显著增加葡萄膜炎模型虹膜纤毛细胞和视网膜细胞中 IL-6、TNF- α 等促炎因子的表达^[29]。与本研究发现一致，鱼腥草提取物不仅能显著提高视网膜细胞存活率，还可同时降低 TNF- α 和 IL-6 mRNA 及蛋白水平的表达。这种双重调控作用可能源于其富含的挥发油、生物碱、有机酸和多糖等活性成分的协同效应，这些成分具有抗氧化、抗炎和免疫调节等多重功效。机制研究方面，Fang 等^[8]发现鱼腥草通过调节 PI3K/Akt 和 TLR4/NF- κ B 通路保护神经元；Chen 等^[30]证实其活性成分可抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路抗肿瘤。本研究 Western blot 结果显示，鱼腥草水提取物能同时下调 PI3K/AKT/mTOR、Wnt/ β -catenin 和 NF- κ B/MAPK 3 条关键炎症通路中 p-PI3K、 β -catenin、NF- κ B 等关键蛋白的表达。这种多通路协同抑制的特点，显著区别于龙胆泻肝汤^[17-18]的 Notch 通路调控或甜菜碱^[20]的抗氧化单靶点作用，体现了鱼腥草“多成分-多靶点-多通路”的综合调控优势，为开发新型葡萄膜炎治疗药物提供了更全面的作用靶点网络。

本研究存在以下局限性：首先，实验采用每组 3 只大鼠的小样本设计，尽管通过标准化饲养条件和盲法评估等措施保证数据可靠性，但样本量不足可能影响统计效力，后续研究将扩大至每组 ≥ 6 只以提高结论可靠性；其次，缺乏鱼腥草水提取物的浓度梯度实验，既未能建立量效关系确定最佳治疗剂量，也无法评估高剂量潜在毒性，

需补充梯度实验完善安全性评价。

综上所述，鱼腥草水提取物对 EIU 大鼠模型具有显著治疗效果，能有效改善 LPS 诱导的视网膜细胞炎症反应。其作用机制涉及多重信号通路的协同调控，包括抑制 PI3K/AKT/mTOR、Wnt/ β -catenin 和 NF- κ B/MAPK 等关键炎症通路的活化。这些发现为开发新型葡萄膜炎治疗药物提供了重要的实验依据和理论支持。

参考文献

- 1 熊慧, 杨明明, 于旭辉. 补体系统在葡萄膜炎发病机制中的作用[J]. 国际眼科杂志, 2022, 22(8): 1293-1297. [Xiong H, Yang MM, Yu XH. Role of complement system in the pathogenesis of uveitis[J]. International Eye Science, 2022, 22(8): 1293-1297.] DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2022.8.11.
- 2 王洪亚, 郑文, 戴永刚, 等. HLA-B27 阳性与阴性葡萄膜炎患者外周血中炎症因子表达研究[J]. 国际眼科杂志, 2022, 22(9): 1559-1563. [Wang HY, Zheng W, Dai YG, et al. Expression of inflammatory factors in peripheral blood of patients with HLA-B27 positive and negative uveitis[J]. International Eye Science, 2022, 22(9): 1559-1563.] DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2022.9.28.
- 3 荆锋, 宋志红. NLRP3 炎症小体与葡萄膜炎的关系[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(5): 690-693. [Jing F, Song ZH. The relationship between NLRP3 inflammasome and uveitis[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2021, 18(5): 690-693.] DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2021.05.035.
- 4 Gamalero L, Simonini G, Ferrara G, et al. Evidence-based treatment for uveitis[J]. Isr Med Assoc J, 2019, 21(7): 475-479. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31507124/>.
- 5 Wu Z, Deng X, Hu Q, et al. *Houttuynia cordata* Thunb: an ethnopharmacological review[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 714694. DOI: 10.3389/fphar.2021.714694.
- 6 Rafiq S, Hao H, Ijaz M, et al. Pharmacological effects of *Houttuynia cordata* Thunb (*H. cordata*): a comprehensive review[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2022, 15(9): 1079. DOI: 10.3390/ph15091079.
- 7 Laldinsangi C. The therapeutic potential of *Houttuynia cordata*: a current review[J]. Heliyon, 2022, 8(8): e10386. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e10386.
- 8 Fang H, Yang Z, Yang L. Protective effect of *Houttuynia cordata* extract on propofol-induced injury of rat hippocampal neurons by regulating PI3K/Akt and Toll-like receptor 4/NF- κ B signaling pathway[J]. Neuroreport, 2021, 32(7): 577-582. DOI: 10.1097/WNR.0000000000001627.
- 9 Li W, Yang F, Zhan H, et al. *Houttuynia cordata* extract ameliorates bladder damage and improves bladder symptoms via anti-inflammatory effect in rats with interstitial cystitis[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 9026901. DOI: 10.1155/2020/9026901.
- 10 Han EH, Park JH, Kim JY, et al. *Houttuynia cordata* water extract suppresses anaphylactic reaction and IgE-mediated allergic response by inhibiting multiple steps of Fc ϵ sRI signaling in

- mast cells[J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47(7): 1659–1666. DOI: [10.1016/j.fct.2009.04.025](https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.04.025).
- 11 Du L, Yip YWY, Ng HK, et al. Ruxolitinib alleviates uveitis caused by salmonella typhimurium endotoxin[J]. Microorganisms, 2021, 9(7): 1481. DOI: [10.3390/microorganisms9071481](https://doi.org/10.3390/microorganisms9071481).
- 12 Zhang D, Wang C, Cao S, et al. High-salt enhances the inflammatory response by retina pigment epithelium cells following lipopolysaccharide stimulation[J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015: 197521. DOI: [10.1155/2015/197521](https://doi.org/10.1155/2015/197521).
- 13 Chen CL, Chen JT, Liang CM, et al. Silibinin treatment prevents endotoxin-induced uveitis in rats *in vivo* and *in vitro*[J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0174971. DOI: [10.1371/journal.pone.0174971](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174971).
- 14 Cheng D, Sun L, Zou S, et al. Antiviral effects of Houttuynia cordata polysaccharide extract on murine norovirus-1 (MNV-1)—A human norovirus surrogate[J]. Molecules, 2019, 24(9): 1835. DOI: [10.3390/molecules24091835](https://doi.org/10.3390/molecules24091835).
- 15 Agarwal A, Aggarwal K, Gupta V. Infectious uveitis: an Asian perspective[J]. Eye (Lond), 2019, 33(1): 50–65. DOI: [10.1038/s41433-018-0224-y](https://doi.org/10.1038/s41433-018-0224-y).
- 16 张明新, 彭晓燕, 呼风, 等. 宏基因组测序技术检测感染性葡萄膜炎病原体的初步研究[J]. 中华眼科杂志, 2020, 56(7): 519–523. [Zhang MX, Peng XY, Hu F, et al. Identification of pathogens in the vitreous of patients with infectious uveitis by metagenomic sequencing[J]. Chinese Journal of Ophthalmology, 2020, 56(7): 519–523.] DOI: [10.3760/cma.j.cn112142-20190711-00371](https://doi.org/10.3760/cma.j.cn112142-20190711-00371).
- 17 殷学伟, 郭励劼, 周梦贤, 等. 龙胆泻肝汤对实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠 M1/M2 巨噬细胞极化平衡的调控作用[J]. 眼科新进展, 2021, 41(5): 408–412. [Yin XW, Guo LJ, Zhou MX, et al. Regulatory role of Longdan Xiegan decoction in polarization balance of M1/M2 macrophages in rats with experimental autoimmune uveitis[J]. Recent Advances in Ophthalmology, 2021, 41(5): 408–412.] DOI: [10.13389/j.cnki.rao.2021.0085](https://doi.org/10.13389/j.cnki.rao.2021.0085).
- 18 周梦贤, 殷学伟, 郭励劼, 等. 龙胆泻肝汤抑制 Notch 信号通路活化对实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠 Th1、Th2 细胞分化的影响[J]. 眼科新进展, 2021, 41(6): 506–510. [Zhou MX, Yin XW, Guo LJ, et al. Effects of Longdan Xiegan decoction on Th1 and Th2 cell differentiation by inhibiting Notch pathway activation in experimental autoimmune uveitis rats[J]. Recent Advances in Ophthalmology, 2021, 41(6): 506–510.] DOI: [10.13389/j.cnki.rao.2021.0105](https://doi.org/10.13389/j.cnki.rao.2021.0105).
- 19 袁立飞, 刘静娜, 张越, 等. 清热明目颗粒对实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠的治疗作用及抗炎机制研究[J]. 中国中医眼科杂志, 2021, 31(11): 770–775, 782. [Yuan LF, Liu JN, Zhang Y, et al. Therapeutic effect of Qingremingmu granule on experimental autoimmune uveitis rats and its anti-inflammatory mechanism[J]. Chinese Journal of Chinese Ophthalmology, 2021, 31(11): 770–775, 782.] DOI: [10.13444/j.cnki.zgzykz.2021.11.002](https://doi.org/10.13444/j.cnki.zgzykz.2021.11.002).
- 20 Choi Y, Jung K, Kim HJ, et al. Attenuation of experimental autoimmune uveitis in lewis rats by betaine[J]. Exp Neurobiol, 2021, 30(4): 308–317. DOI: [10.5607/en21011](https://doi.org/10.5607/en21011).
- 21 Park J, Kim JT, Lee SJ, et al. The anti-inflammatory effects of angiotensin II on endotoxin-induced uveitis in rats[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(2): 413. DOI: [10.3390/ijms21020413](https://doi.org/10.3390/ijms21020413).
- 22 Shi X, Zhu S, Jin H, et al. The anti-inflammatory effect of KS23, a novel peptide derived from globular adiponectin, on endotoxin-induced uveitis in rats[J]. Front Pharmacol, 2021, 11: 585446. DOI: [10.3389/fphar.2020.585446](https://doi.org/10.3389/fphar.2020.585446).
- 23 罗秋莲. 鱼腥草多糖的理化性质及抗氧化活性研究[J]. 安徽农业科学, 2022, 50(22): 164–166, 214. [Luo QL. Study on physico-chemical properties and antioxidant activity of polysaccharide from Houttuynia cordata[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2022, 50(22): 164–166, 214.] DOI: [10.3969/j.issn.0517-6611.2022.22.040](https://doi.org/10.3969/j.issn.0517-6611.2022.22.040).
- 24 张俊, 柴琳, 刘荣均, 等. 鱼腥草提取物对支原体肺炎小鼠 TLR-2/MyD88/NF-κB 信号通路的影响[J]. 中药材, 2021, 44(9): 2189–2193. [Zhang J, Chai L, Liu RJ, et al. The effect of Houttuynia cordata extract on the TLR-2/MyD88/NF-κB signaling pathway in mice with mycoplasma pneumoniae[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2021, 44(9): 2189–2193.] DOI: [10.13863/j.issn1001-4454.2021.09.033](https://doi.org/10.13863/j.issn1001-4454.2021.09.033).
- 25 王莹巍, 石立慧, 王颖, 等. 鱼腥草素钠通过抑制 STAT3/NF-κB 信号通路减轻哮喘幼鼠的肺内炎症反应[J]. 解剖科学进展, 2022, 28(3): 311–314. [Wang YW, Shi LH, Wang Y, et al. Sodium houttuynia reduced lung inflammation in asthmatic young mice by inhibiting STAT3/NF-κB signaling pathway[J]. Progress of Anatomical Sciences, 2022, 28(3): 311–314.] DOI: [10.16695/j.cnki.1006-2947.2022.03.018](https://doi.org/10.16695/j.cnki.1006-2947.2022.03.018).
- 26 张娅琴, 李小明, 吴守业. 复方鱼腥草软胶囊联合头孢硫脒治疗儿童急性扁桃体炎的临床研究[J]. 药物评价研究, 2020, 43(2): 269–272. [Zhang YQ, Li XM, Wu SY. Clinical study on compound Yuxingcao soft capsules combined with cefathiamidine in treatment of acute tonsillitis in children[J]. Drug Evaluation Research, 2020, 43(2): 269–272.] DOI: [10.7501/j.issn.1674-6376.2020.02.017](https://doi.org/10.7501/j.issn.1674-6376.2020.02.017).
- 27 Cen L, Yi T, Hao Y, et al. Houttuynia cordata polysaccharides alleviate ulcerative colitis by restoring intestinal homeostasis[J]. Chin J Nat Med, 2022, 20(12): 914–924. DOI: [10.1016/S1875-5364\(22\)60220-6](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(22)60220-6).
- 28 Yang L, Qiu Y, Liu J, et al. Retinal transcriptome analysis in the treatment of endotoxin-induced uveitis with tetramethylpyrazine eye drops[J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2019, 35(4): 235–244. DOI: [10.1089/jop.2018.0105](https://doi.org/10.1089/jop.2018.0105).
- 29 Li W, Liu L, Zhang Z, et al. Morroniside ameliorates endotoxin-induced uveitis by regulating the M1/M2 polarization balance of macrophages[J]. J Immunol Res, 2023, 2023: 1252873. DOI: [10.1155/2023/1252873](https://doi.org/10.1155/2023/1252873).
- 30 Chen H, Feng X, Gao L, et al. Inhibiting the PI3K/AKT/mTOR signalling pathway with copper oxide nanoparticles from Houttuynia cordata plant: attenuating the proliferation of cervical cancer cells[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2021, 49(1): 240–249. DOI: [10.1080/21691401.2021.1890101](https://doi.org/10.1080/21691401.2021.1890101).

收稿日期: 2025 年 05 月 09 日 修回日期: 2025 年 07 月 10 日
本文编辑: 马琳璐 钟巧妮