

香叶木素对胎粪诱导的新生大鼠急性肺损伤的作用及其机制探讨

郝莉霞¹, 卢 蓉², 马霞霞¹, 樊书娟³

(1. 延安大学附属医院新生儿科, 延安 716000; 2. 延安大学附属医院儿科一病区, 延安 716000; 3. 西安交通大学第一附属医院新生儿科, 西安 710061)

[摘要] 目的 探讨香叶木素对胎粪诱导的新生大鼠急性肺损伤的作用及其分子机制。方法 48只1日龄SPF级雄性SD大鼠由气管插管注入胎粪1.5 mL/kg, 建立胎粪肺损伤模型。大鼠随机分为4组: 对照组、模型组、甲强龙组和香叶木素组。全自动血气分析仪检测各组大鼠的动脉氧合指数。HE染色检测大鼠肺组织病理损伤程度, 并进行肺损伤病理评分。肺损伤模型建立24 h后, 切除肺组织, 称取其质量; 酶联免疫吸附测定法检测炎症因子如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和IL-6水平; 蛋白质印迹法检测含pyrin结构域的NOD样受体蛋白3 (NOD-like receptor with pyrin domain 3, NLRP3)炎症小体、剪切型半胱天冬酶1 (cleaved caspase-1, c-caspase-1)和IL-1 β 蛋白水平。结果 与模型组相比, 甲强龙组与香叶木素组大鼠的平均动脉氧合指数明显降低 (均 $P < 0.05$), 病理损伤程度及肺损伤病理评分明显降低 (均 $P < 0.05$), 炎症因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平明显降低 (均 $P < 0.01$), NLRP3、c-caspase-1和IL-1 β 蛋白表达明显下调 (均 $P < 0.01$)。结论 香叶木素通过降低动脉氧合指数及炎症因子表达水平, 并下调NLRP3、c-caspase-1和IL-1 β 蛋白表达水平, 对胎粪诱导的新生大鼠急性肺损伤具有一定的治疗作用。

[关键词] 香叶木素; 胎粪吸入性肺炎; 炎症因子; NOD样受体蛋白3; SD大鼠

[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2020)05-0384-07

胎粪吸入性肺炎 (meconium aspiration pneumonia) 又称胎粪吸入综合征, 是引起新生儿呼吸窘迫综合征的原因之一, 尤其在足月或过期妊娠婴儿中发病率和死亡率极高^[1]。在分娩过程中, 胎粪沿着呼吸道进入肺泡引起机械性阻塞和化学炎症反应, 同时引起其他器官损伤^[2]。胎粪吸入性肺炎占有呼吸衰竭病例的10%左右, 在发展中国家的死亡率约为39%, 早期诊断和早期

治疗对改善患者预后很重要^[3]。目前尚无有效的药物干预措施用于降低胎粪吸入性肺炎死亡率, 因此迫切需要开发新的有效的预防和治疗方法。

香木叶素是一种从橄榄叶和豆科植物中分离出来的黄酮类化合物, 具有抗炎、抗雌激素、抗氧化剂、抗微生物和抗肿瘤等药理作用^[4]。已有研究报道, 香木叶素可通过激活核因子E2相关因子2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 通路和抑制含pyrin结构域的NOD样受体蛋白3 (NOD-like receptor with pyrin domain 3, NLRP3) 炎症小体, 减轻脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤^[5], 说明香木叶素对肺损伤有治疗作用。然而目前尚未见有相关文献报道香叶木素对胎粪吸入性肺炎的作用机制。本研究用胎粪诱导建立

[收稿日期] 2019-12-27

[基金项目] 陕西省社会发展科技攻关项目(2015SF037)

[作者简介] 郝莉霞(1982—), 女, 副主任医师, 研究方向: 新生儿内科学。E-mail: xfjdf170g@sina.com

[通信作者] 卢 蓉(1983—), 女, 副主任医师, 研究方向: 儿科内科学。E-mail: 81727839@qq.com

大鼠急性肺损伤模型,探讨香叶木素对胎粪诱导的新生大鼠急性肺损伤的作用及其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 药物和主要试剂

香叶木素(批号111788-200801)购自中国食品药品检定研究院,化学式为 $C_{16}H_{12}O_6$,相对分子质量为300.3,纯度 $\geq 95.7\%$;甲强龙(CAS号2375-03-3)购自美国TargetMol公司;HE染色试剂盒(货号C0105)购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)(ab6671)、白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)(ab100704)、IL-6(ab100712)、NLRP3(ab214185)、剪切型半胱天冬酶1(cleaved caspase-1, c-caspase-1)(ab138483)和GAPDH单克隆抗体(ab9485)均购自英国Abcam公司。

1.2 动物模型的建立与分组

50只1日龄SPF级雄性SD大鼠购自空军军医大学(原第四军医大学)实验动物中心[SCXK(陕)2014-002],饲养于陕西省食品药品检验研究院[SYXK(陕)2018-002],室温23~25℃,光照/黑暗时间12h/12h,自由进食饲料和水。用氯胺酮(20 mg/kg)和甲苯噻嗪(5 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,行气管切开术。取48只大鼠随机分为4组,每组12只,按下述方法操作^[6]。手术对照组:将大鼠置于机械通气机上,气管中插入气管导管,呼吸机通气30 min,缓慢注入0.9%氯化钠溶液即生理盐水(1.5 mL/kg),呼吸机通气15 min,确保生理盐水均匀进入支气管及肺泡,缝合切口。模型组:将大鼠置于机械通气机上,气管中插入气管导管,呼吸机通气30 min,缓慢注入胎粪(1.5 mL/kg),呼吸机通气15 min,确保胎粪均匀进入支气管及肺泡,缝合切口。甲强龙组:操作同模型组,模型建立后尾静脉注射甲强龙(2 mg/kg),作为阳性对照。香叶木素组:操作同模型组,模型建立后腹腔注射香叶木素(20 mg/kg)。造模过程中,对照组大鼠死亡1只,模型组大鼠死亡4只,甲强龙组和香叶木

素组大鼠各死亡2只。模型组补充2只大鼠,以同样实验方法造模并成功,最终各组大鼠均取10只用于后续实验。

各组处理24 h后麻醉,开胸,心脏放血法处死大鼠。解剖后,取各组大鼠肺组织,称重,然后用体积分数为10%的甲醛溶液固定,行石蜡包埋切片。

1.3 动脉氧合指数

建模后24 h,处死前取各组大鼠动脉血,加入全自动血气分析仪,检测动脉血氧分压(arterial partial pressure of oxygen, PaO_2)和吸入氧分数(fraction of inspired oxygen, FiO_2),根据公式计算动脉氧合指数:氧合指数 = PaO_2 / FiO_2 。

1.4 HE染色

采用HE染色方法进行肺组织病理学检测。将石蜡切片脱蜡,蒸馏水润湿组织,苏木精染色细胞核5 min,水洗5 s,伊红染色细胞质30 s,水洗后,滤纸吸干,无水乙醇脱水2次后封固,在荧光显微镜下观测染色结果。参考Turhan等^[7]的方法,计算肺损伤病理评分。

1.5 酶联免疫吸附测定法检测IL-6、IL-1 β 和TNF- α 含量

模型建立24 h后,采用支气管肺泡灌洗术^[8]收集肺泡表面液体,在4℃下用50 mmol/L碳酸盐包被缓冲液溶解抗原后,以100 μ L/孔的量接种到96孔酶标板。按照试剂盒说明进行IL-6、IL-1 β 和TNF- α 含量检测,用酶标仪测定450 nm处吸光度,通过绘制标准曲线求出样品中IL-6、IL-1 β 和TNF- α 含量。

1.6 蛋白质印迹法检测NLRP3、IL-1 β 和c-caspase-1蛋白表达

将肺组织置于玻璃匀浆器内,在冰上溶解25 min。以12 000 r/min的速度离心10 min,加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液进行总蛋白提取,用BCA试剂盒测定蛋白质含量。取等量的蛋白质样品(20 mg),在100℃条件下变性5 min。然后采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离蛋白,电泳结束后将蛋白条带转移至聚偏二氟乙烯膜,在4℃条件下加入兔抗NLRP3、IL-1 β 和c-caspase-1单克隆抗体(工作液稀释比例均为

1:1 000), 并孵育过夜, 三羟甲基氨基甲烷缓冲液清洗, 然后在 4 °C 下加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (1:20 000) 并孵育 2 h, 最后加入电化学发光染色液, 曝光处理。应用 Image J 软件统计各条带灰度值, 以分析目的蛋白的相对表达水平。

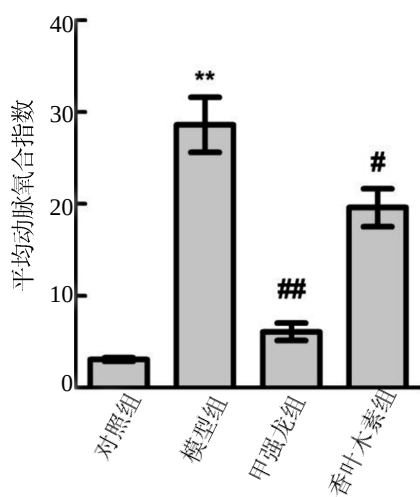
1.7 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件对各实验结果进行统计学分析。计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用多因素方差分析, 组内两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 香叶木素降低动脉氧合指数

与对照组比较, 胎粪诱导的新生大鼠急性肺损伤模型组平均动脉氧合指数明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。而与模型组相比, 甲强龙组 (即阳性药物对照) 的平均动脉氧合指数明显降低 ($P < 0.01$), 香叶木素组的平均动脉氧合指数也低于模型组 ($P < 0.05$), 但比甲强龙组有所回升 (6.10 ± 0.96 vs 19.60 ± 2.04) (图 1)。



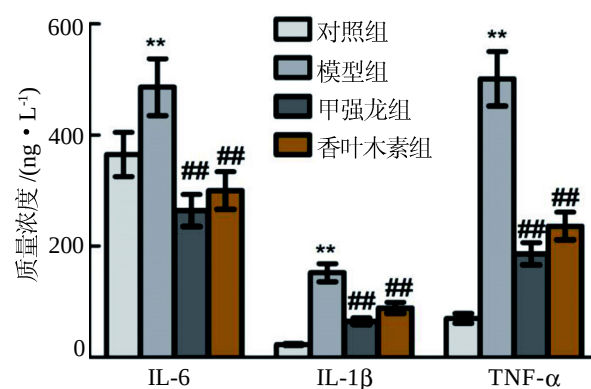
每组 10 只大鼠。与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 1 香叶木素对胎粪诱导的急性肺损伤大鼠动脉氧合指数的影响

Figure 1 Effect of diosmetin on the arterial oxygenation index in rats with meconium-induced acute lung injury

2.2 香叶木素下调炎症因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平

与对照组相比, 胎粪诱导的新生大鼠急性肺损伤模型组大鼠的 IL-6 水平明显升高 ($P < 0.01$), 而甲强龙组和香叶木素组的 IL-6 水平均明显低于模型组 (均 $P < 0.01$); 模型组的 IL-1 β 水平明显高于对照组 ($P < 0.01$), 而甲强龙组和香叶木素组的 IL-1 β 水平明显低于模型组 (均 $P < 0.01$); 与对照组相比, 模型组的 TNF- β 水平也明显升高 ($P < 0.01$), 而甲强龙组和香叶木素组的 TNF- α 水平也明显低于模型组 (均 $P < 0.01$) (图 2)。



每组 10 只大鼠。与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 2 香叶木素对胎粪诱导急性肺损伤大鼠中炎症因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平的影响

Figure 2 Effects of diosmetin on the levels of inflammatory cytokines IL-6, IL-1 β , and TNF- α in rats with meconium-induced acute lung injury

2.3 香叶木素减轻肺组织病理损伤程度

HE 染色检测各组大鼠肺组织病理损伤情况, 结果如图 3A 所示。对照组肺泡扩张良好, 支气管黏膜正常。与对照组相比, 胎粪诱导的新生大鼠急性肺损伤模型组表现出明显的病理损伤, 肺泡壁明显水肿, 肺实质明显实变, 管腔狭窄, 可见大量炎性细胞浸润, 肺损伤评分明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 甲强龙组的肺泡壁仍水肿、增厚, 但炎性细胞浸润减少, 肺组织评分明显降低 ($P < 0.05$)。香叶木素组较模型组的肺组织病理损伤程度明显降低, 肺泡壁轻微水肿, 中度出血及炎性细胞浸润, 肺组织评分明显降低 ($P < 0.05$, 图 3B)。

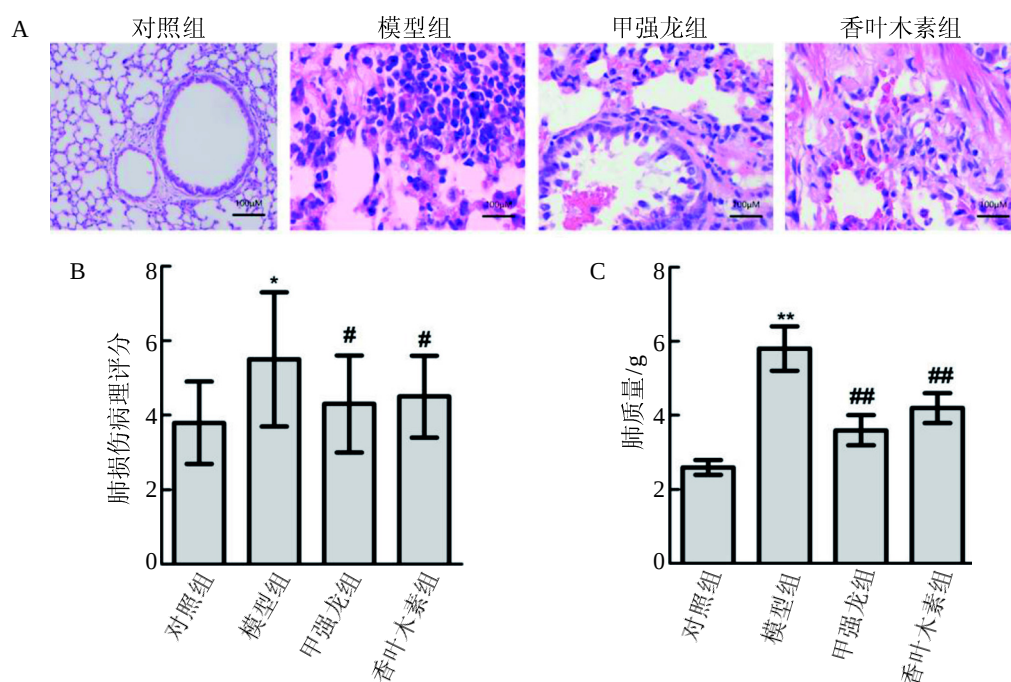
模型建立 12 h 后称肺组织质量, 结果如图

3C 所示: 模型组的肺质量明显高于对照组 ($P < 0.01$), 而甲强龙组和香叶木素组的肺质量明显低于模型组 (均 $P < 0.01$)。

2.4 香叶木素下调 NLRP3、c-caspase-1 和 IL-1 β 蛋白表达

蛋白质印迹法检测各组大鼠肺组织中 NLRP3、IL-1 β 和 c-caspase-1 蛋白水平, 结果如图 4 所示。与对照组相比, 胎粪诱导的新生大鼠

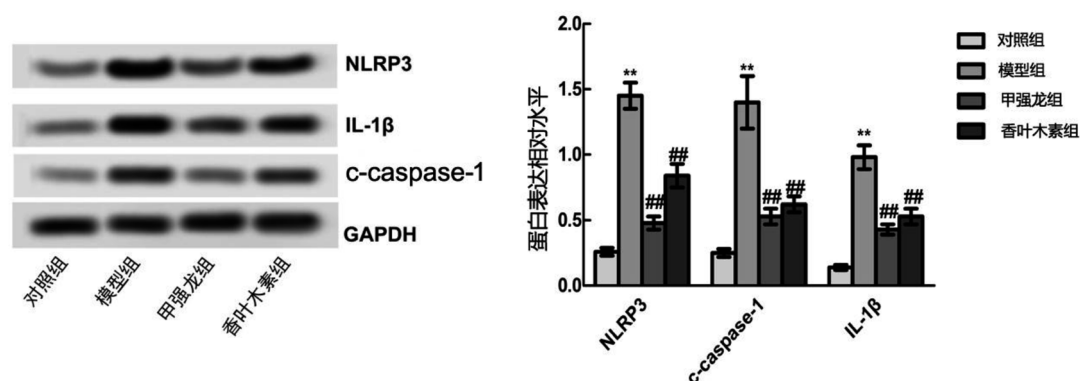
急性肺损伤模型组的 NLRP3 蛋白水平明显升高 ($P < 0.01$), 而甲强龙组和香叶木素组的 NLRP3 蛋白水平均明显低于模型组 (均 $P < 0.01$); 模型组的 c-caspase-1 蛋白水平也明显高于对照组, 甲强龙组和香叶木素组的 c-caspase-1 蛋白水平也明显低于模型组 (均 $P < 0.01$); 模型组的 IL-1 β 蛋白水平明显高于对照组、甲强龙组和香叶木素组 (均 $P < 0.01$)。



A 为肺组织病理学观察结构 (HE 染色, 比例尺大小为 100 μ m), B 为肺损伤病理学评分结果, C 为各组肺质量。每组 10 只大鼠; 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 3 香叶木素对胎粪诱导急性肺损伤大鼠的肺组织病理损伤程度的影响

Figure 3 Effect of diosmetin on the pathological degree of lung tissues in rats with meconium-induced acute lung injury



每组 10 只大鼠。与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 4 香叶木素对胎粪诱导急性肺损伤大鼠中 NLRP3、c-caspase-1 和 IL-1 β 蛋白水平的影响

Figure 4 Effects of diosmetin on NLRP3, c-caspase-1 and IL-1 β levels in rats with meconium-induced acute lung injury

3 讨论

胎粪吸入性肺炎是一种胎粪引起的新生儿呼吸功能障碍,能导致严重的肺功能衰竭。临床上,胎儿窘迫或子宫内抽吸导致胎粪吸入,从而发生炎症反应、气道阻塞、肺表面活性物质失活及细胞凋亡,从而破坏肺发育^[9-10]。目前,胎粪吸入性肺炎的确切机制在很大程度上仍不清楚,治疗仅局限于机械通气、表面活性剂治疗和气道清洁^[11]。因此,治疗胎粪吸入性肺炎想要取得良好的效果,需要探索新的有效药物。

香叶木素天然存在于豆科植物金合欢和橄榄叶的叶子中。已经证实香叶木素具有多种药性,包括抗菌、抗癌、抗炎和抗氧化活性^[12]。传统医学植物成分作为胎粪吸入性肺炎的预防和治疗药物正越来越受到人们的关注^[13]。组织病理学变化是胎粪吸入性肺炎的可视化反应,本实验通过HE染色观察发现香叶木素改善了胎粪诱导的肺组织病理学症状,如炎症细胞浸润和肺泡充血均减轻,肺损伤评分降低。此外,香叶木素明显减轻了胎粪诱导的新生大鼠肺组织质量。

胎粪吸入性肺炎患儿由于呼吸功能较差,肺部换气及通气功能受阻,导致机体氧供不足,引起血气指标发生相应的异常变化^[14]。血气分析能够反映组织氧供及耗氧状态。Chen等^[2]研究发现,高频振荡通气联合肺表面活性物质表达通过降低动脉氧合指数对胎粪吸入性肺炎具有显著疗效。本实验结果显示,香叶木素降低了新生大鼠胎粪吸入性肺炎的动脉氧合指数,表明香叶木素通过改善血气状态,对胎粪诱导新生大鼠的呼吸功能进行调节。

胎粪是水、上皮细胞、胆汁、黏液和羊水的复杂混合物,含有多种可能引起炎症反应的危险因子^[15]。炎症反应已被证明在胎粪诱导的肺损伤中发挥了关键作用^[16]。胎粪是中性粒细胞和肺泡巨噬细胞的有效激活剂。在胎粪吸入性肺炎的早期阶段,IL-1 β 是一种相当活跃的细胞因子,可引起促炎介质如IL-6和IL-8释放,从这些介质中获取支持,募集炎症细胞,过度炎症反应最终导致肺损伤^[17]。香叶木素可以改善促炎性细胞因子的产生,如TNF- α 、IL-1 β 和IL-6^[18]。Thomas

等^[19]研究发现,C5和CD14联合抑制体内胎粪诱导的炎症因子IL-6和IL-1 β 表达,从而治疗胎粪吸入性肺炎。Zhang等^[20]研究发现,香叶木素显著降低了细菌性脑膜炎大鼠模型的海马组织中促炎细胞因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的表达水平。本实验结果与上述研究结果一致,香叶木素极显著地降低支气管肺泡中炎症因子IL-6、IL-1 β 和TNF- α 分泌水平,同时降低了肺组织中IL-1 β 蛋白表达水平,表明香叶木素通过调节炎症因子水平改善胎粪诱导的新生大鼠肺损伤。

NLRP3炎症小体作为固有免疫的重要组分,在机体免疫反应和疾病发生过程中具有重要作用。NLRP3炎症小体由NOD样受体蛋白家族成员凋亡相关斑点样蛋白和caspase-1组成,可以通过各种刺激激活细菌、病毒、真菌和垂死细胞的重要成分^[21]。蛋白酶caspase-1介导细胞因子IL-1 β 和IL-18,刺激促炎免疫应答,并保护生物体免于病原体诱导的死亡^[22]。已有研究表明,NLRP3炎症小体过度激活释放炎症介质,导致与肺部疾病相关的炎症反应^[23]。Liu等^[5]研究发现,香叶木素通过激活Nrf2通路,抑制NLRP3炎症小体,减轻脂多糖诱导的急性肺损伤。Zhang等^[24]研究发现,褪黑素通过抑制NLRP3和c-caspase-1蛋白表达治疗急性肺损伤。本实验结果与上述研究结果一致,香叶木素下调胎粪诱导的急性肺损伤中NLRP3、c-caspase-1和IL-1 β 蛋白水平,提示NLRP3炎症小体可能与胎粪诱导的新生大鼠急性肺损伤病情严重程度以及病程有关,可以作为评估其疾病进程的一个指标。

综上所述,香叶木素改善新生大鼠炎症反应、呼吸状况及病理损伤的效果较好,可将香叶木素用于治疗新生儿胎粪吸入性肺炎。本实验尚存在一定局限性,如纳入样本少,指标单一,还需配合机械通气治疗,因此香叶木素治疗胎粪吸入性肺炎的安全性和有效性仍需要进一步的临床试验加以探究和证实。

参考文献:

- [1] Liu J, Cao HY, Fu W. Lung ultrasonography to diagnose meconium aspiration syndrome of the newborn[J]. J Int Med Res, 2016, 44(6):1534-1542.

- [2] Chen DM, Wu LQ, Wang RQ. Efficiency of high-frequency oscillatory ventilation combined with pulmonary surfactant in the treatment of neonatal meconium aspiration syndrome[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(8):14490-14496.
- [3] Swarnam K, Soraisham AS, Sivanandan S. Advances in the management of meconium aspiration syndrome[J]. *Int J Pediatr*, 2012, 2012:359571.
- [4] Jiang YS, Liu JG, Zhou ZM, et al. Diosmetin attenuates Akt signaling pathway by modulating nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B)/inducible nitric oxide synthase (iNOS) in streptozotocin (STZ)-induced diabetic nephropathy mice[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24:7007-7014.
- [5] Liu QM, Ci XX, Wen ZM, et al. Diosmetin alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury through activating the Nrf2 pathway and inhibiting the NLRP3 inflammasome[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2018, 26(2):157-166.
- [6] Turhan AH, Atici A, Muslu N, et al. Erythropoietin may attenuate lung inflammation in a rat model of meconium aspiration syndrome[J]. *Exp Lung Res*, 2016, 42(4):199-204.
- [7] Turhan AH, Atici A, Muslu N, et al. The effects of pentoxifylline on lung inflammation in a rat model of meconium aspiration syndrome[J]. *Exp Lung Res*, 2012, 38(5):250-255.
- [8] Zhao H, Gu HY, Liu TM, et al. Analysis of curative effect of adjuvant therapy with bronchoalveolar lavage on COPD patients complicated with pneumonia[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(5):3799-3804.
- [9] Kääpä PO. Meconium aspiration syndrome (MAS)—Where do we go? Research perspectives[J]. *Early Hum Dev*, 2009, 85(10):627-629.
- [10] Zagariya A, Sierzputovska M, Navale S, et al. Role of meconium and hypoxia in meconium aspiration-induced lung injury in neonatal rabbits[J]. *Mediators Inflamm*, 2010, 2010:204831.
- [11] Ota C, Gopallawa I, Ivanov V, et al. Protection of meconium-induced lung epithelial injury by protease inhibitors[J]. *J Lung Pulm Respir Res*, 2017, 4(5):145.
- [12] Liu J, Wen XJ, Liu B, et al. Diosmetin inhibits the metastasis of hepatocellular carcinoma cells by downregulating the expression levels of MMP-2 and MMP-9[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(3):2401-2408.
- [13] Chen XJ, Zhang B, Hou SJ, et al. Osthole improves acute lung injury in mice by up-regulating NRF-2/thioredoxin 1 [J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2013, 188(2):214-222.
- [14] Dargaville PA. Inflammation in meconium aspiration syndrome—one of many heads of the hydra[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2016, 51(6):555-556.
- [15] de Beaufort AJ, Bakker AC, van Tol MJD, et al. Meconium is a source of pro-inflammatory substances and can induce cytokine production in cultured A549 epithelial cells[J]. *Pediatr Res*, 2003, 54(4):491-495.
- [16] Mokra D, Drgova A, Pullmann R Sr, et al. Selective phosphodiesterase 3 inhibitor olprinone attenuates meconium-induced oxidative lung injury[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2012, 25(3):216-222.
- [17] Cross LJ, Matthay MA. Biomarkers in acute lung injury: Insights into the pathogenesis of acute lung injury[J]. *Crit Care Clin*, 2011, 27(2):355-377.
- [18] Yu G, Rong W, Yin GJ, et al. Diosmetin ameliorates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis in mice by inhibiting the activation of the nuclear factor- κ B[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(5):2133-2142.
- [19] Thomas AM, Schjalm C, Nilsson PH, et al. Combined inhibition of C5 and CD14 attenuates systemic inflammation in a piglet model of meconium aspiration syndrome [J]. *Neonatology*, 2018, 113(4):322-330.
- [20] Zhang Y, Jiang YL, Lu DJ. Diosmetin suppresses neuronal apoptosis and inflammation by modulating the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT/nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway in a rat model of pneumococcal meningitis[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25:2238-2245.
- [21] Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, et al. Inflammasomes in health and disease[J]. *Nature*, 2012, 481(7381):278-286.
- [22] Kovarova M, Hesker PR, Jania L, et al. NLRP1-dependent pyroptosis leads to acute lung injury and morbidity in mice [J]. *J Immunol*, 2012, 189(4):2006-2016.
- [23] Kebaier C, Chamberland RR, Allen IC, et al. Staphylococcus aureus α -hemolysin mediates virulence in a murine model of severe pneumonia through activation of the NLRP3 inflammasome[J]. *J Infect Dis*, 2012, 205(5):807-817.
- [24] Zhang Y, Li XR, Grailer JJ, et al. Melatonin alleviates acute lung injury through inhibiting the NLRP3 inflammasome [J]. *J Pineal Res*, 2016, 60(4):405-414.

Effect of Diosmetin on Acute Lung Injury Induced by Meconium and Its Mechanism in Neonatal Rats

HAO Lixia¹, LU Rong², MA Xiaxia¹, FAN Shujuan³

(1. Department of Neonatology, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, China;

2. Department of Pediatrics 1 Ward, Affiliated Hospital of Yan'an University,

Yan'an 716000, China; 3. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Correspondence to: LU Rong, 81727839@qq.com

[Abstract] Objective To investigate the therapeutic effect of diosmetin on fetal faecal-induced acute lung injury in neonatal rats. **Methods** Forty-eight neonatal male SD rats were enrolled. The rats were injected with 1.5 mL/kg fetal faecal by endotracheal intubation to replicate meconium lung injury model and randomly divided into 4 groups: control group, model group, methylprednisolone group and diosmetin group for subsequent experiments. Automatic blood gas analyzer was used to detect the arterial oxygenation index. Hematoxylin-eosin (HE) dye was used to detect the degree of lung tissue pathological injury and to evaluate the pathological score of lung injury. The lung tissue was removed and weighed 24 h after the establishment of lung injury model. The levels of inflammatory cytokines including tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The expressions of NOD-like receptor with pyrin domain 3 (NLRP3) inflammasome, cleaved caspase-1 (c-caspase-1) and IL-1 β proteins were detected by Western blotting. **Results** Compared with the model group, the mean arterial oxygenation index of methylprednisolone group and diosmetin group decreased significantly (both $P < 0.05$), and the pathological damage degree and lung injury pathological score were significantly reduced (both $P < 0.05$), the levels of inflammatory factors TNF- α , IL-6 and IL-1 β as well as the expressions of NLRP3, c-caspase-1 and IL-1 β proteins were significantly lower (all $P < 0.01$). **Conclusion** Diosmetin can down-regulate the levels of NLRP3, c-caspase-1 and IL-1 β , as well as reduce the arterial oxygenation index and the levels of inflammatory cytokines, thereby can be used to treat neonatal rats with meconium-induced acute lung injury.

[Key words] Diosmetin; Meconium aspiration pneumonia; Inflammatory cytokines; NOD-like receptor protein 3; SD rats