

赤芍总苷对卵清蛋白诱导的支气管哮喘小鼠气道重塑的作用及其机制

周怡锦, 田新磊, 史兴蝉, 胡文杰, 朱珊*

河南省中医院儿科, 河南郑州 450003

[中图分类号] R562.2 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0474.2024.1120

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 周怡锦, 田新磊, 史兴蝉, 等. 赤芍总苷对卵清蛋白诱导的支气管哮喘小鼠气道重塑的作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(4): 467-474.

[收稿日期] 2024-04-11 [录用日期] 2024-06-26 [上线日期] 2024-11-20

[摘要] **目的** 探讨赤芍总苷(TPG)对支气管哮喘小鼠气道重塑的作用及其机制。**方法** 48只BALB/c小鼠随机分为对照组、模型组、卵清蛋白(OVA)+布地奈德组(OVA+BUD组)及OVA+TPG组, 每组12只。除对照组外, 其余各组均采用腹腔注射10%的OVA氢氧化铝混悬液致敏联合雾化吸入1%的OVA激发构建小鼠哮喘模型, 雾化吸入OVA前1h, OVA+BUD组小鼠雾化吸入2ml BUD混悬液, OVA+TPG组小鼠灌胃给予5g/kg TPG。收集各组小鼠肺组织和肺泡灌洗液(BALF), 采用苏木精-伊红(HE)和高碘酸希夫(PAS)染色观察肺组织病理学变化, 瑞氏-吉萨姆染色计数BALF中炎性细胞[白细胞(WBC)、中性粒细胞(NEU)、嗜酸性粒细胞(EOS)和淋巴细胞(LYM)], ELISA法检测BALF中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 和IL-6含量, Western blotting检测肺组织中气道重塑蛋白[纤连蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、I型胶原蛋白(collagen I)]和NOD样受体蛋白3(NLRP3)炎性小体相关蛋白[NLRP3、cleaved caspase-1、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)]的表达情况。将人支气管平滑肌细胞(HBSMCs)分为对照组(正常培养)、转化生长因子(TGF)- β_1 组(采用含10 ng/ml TGF- β_1 的培养基培养)与TGF- β_1 +TPG组(采用含10 ng/ml TGF- β_1 和50 μ g/ml TPG的培养基培养), CCK-8法检测细胞增殖率, Western blotting检测气道重塑蛋白和NLRP3炎性小体相关蛋白的表达情况。**结果** 与对照组相比, 模型组小鼠肺组织可见大量炎性细胞浸润, 气道黏膜上皮增生, 支气管管腔狭窄, 管壁增厚, 杯状细胞和黏液分泌增多, 肺损伤病理学评分增高($P<0.05$), BALF中炎性细胞数(WBC、NEU、EOS、LYM)及炎性因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6含量明显增多($P<0.05$), 纤连蛋白、 α -SMA、collagen I、NLRP3、cleaved caspase-1、ASC蛋白表达水平升高($P<0.05$)。与模型组相比, 经BUD或TPG处理后小鼠哮喘症状得到缓解, 肺组织病理学损伤减轻, 支气管管壁厚度减小, BALF中炎性细胞数(WBC、NEU、EOS、LYM)及炎性因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6含量明显减少, 纤连蛋白、 α -SMA、collagen I、NLRP3、cleaved caspase-1、ASC蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。与对照组相比, TGF- β_1 组HBSMCs细胞增殖率增高, 纤连蛋白、 α -SMA、collagen I、NLRP3、cleaved caspase-1、ASC蛋白表达水平明显升高($P<0.05$); 与TGF- β_1 组相比, 经TPG处理后HBSMCs的细胞增殖率明显降低, 纤连蛋白、 α -SMA、collagen I、NLRP3、cleaved caspase-1、ASC蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。**结论** TPG可有效缓解小鼠哮喘症状并抑制气道重塑, 其作用机制可能与下调气道重塑相关蛋白的表达和抑制NLRP3炎性小体的激活进而减轻炎症反应有关。

[关键词] 赤芍总苷; 哮喘; 气道重塑; 气道炎症

Effect and mechanism of total paeony glycoside on airway remodeling in bronchial asthma

Zhou Yi-Jin, Tian Xin-Lei, Shi Xing-Chan, Hu Wen-Jie, Zhu Shan*

Department of Pediatrics, Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450003, China

*Corresponding author, E-mail: zhshteacher@163.com

This work was supported by the Chinese Medicine Scientific Research Project of Henan Province (2022ZY1072)

[基金项目] 河南省中医药科学研究专项课题(2022ZY1072)

[作者简介] 周怡锦, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事中西医结合治疗儿童呼吸、内分泌疾病方面的研究

[通信作者] 朱珊, E-mail: zhshteacher@163.com

[Abstract] Objective To investigate the effect of total paeony glycoside (TPG) on airway remodeling in bronchial asthma mice and its underlying mechanisms. **Methods** Forty-eight BALB/c mice were randomly divided into control group, model group, ovalbumin+budesonide group (OVA+BUD group), and OVA+TPG group, with 12 mice in each group. Except the control group, mice in other groups were sensitized by intraperitoneal injection of 10% OVA aluminum hydroxide suspension, and then stimulated by atomized inhalation of 1% OVA to establish mouse asthma model. One hour before each inhalation of OVA, mice in OVA+BUD group were atomized with 2 ml BUD suspension, and mice in OVA+TPG group were given 5 g/kg TPG by intragastric administration. Lung tissues and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of mice from each group were collected, and the pathological morphology of the lung tissues was detected by hematoxylin-eosin (HE) and periodic acid schiff (PAS) staining. Inflammatory cell counts [white blood cell (WBC), neutrophil (NEU), eosinophils (EOS), and leukomonocyte (LYM)] in BALF were detected by Wright-giemsa staining. The contents of inflammatory factors including tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 in BALF were determined by ELISA. Airway remodeling proteins [fibronectin, α -smooth muscle actin (α -SMA), collagen I] and NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome-related proteins [NLRP3, cleaved caspase-1, apoptosis-associated speck-like protein (ASC)] levels were detected by Western blotting. Human bronchial smooth muscle cells (HBSMCs) were divided into control group (normal culture), transforming growth factor (TGF)- β_1 group (culture medium containing 10 ng/ml TGF- β_1), and TGF- β_1 +TPG group (culture medium containing 10 ng/ml TGF- β_1 and 50 μ g/ml TPG). Cell proliferation was detected by CCK-8 method, and Western blotting was used to detect the expression of airway remodeling proteins and NLRP3 inflammasome-related proteins. **Results** Compared with control group, model group exhibited increased infiltration of inflammatory cell in lung tissues, mucosal epithelium hyperplasia, narrowed bronchial lumen narrowed, tube wall thickened, increased cup cells and mucus secretion, and an elevated pathological score of lung injury ($P<0.05$); the number of inflammatory cells (WBC, NEU, EOS, and LYM) and the levels of inflammatory factors (TNF- α , IL-1 β , and IL-6) in BALF were increased ($P<0.05$), and the expressions of fibronectin, α -SMA, collagen I, NLRP3, cleaved caspase-1 and ASC were elevated ($P<0.05$). Compared with model group, BUD or TPG treatment effectively reduced asthma symptoms, improved lung histopathology injury, inhibited bronchial wall thickening, significantly reduced the number of inflammatory cells (WBC, NEU, EOS, and LYM) and the content of inflammatory factors (TNF- α , IL-1 β , and IL-6) in BALF, and inhibited expression of fibronectin, α -SMA, collagen I, NLRP3, cleaved caspase-1 and ASC ($P<0.05$). Compared with control group, the proliferation rate of HBSMCs was increased, and the protein expression levels of fibronectin, α -SMA, collagen I, NLRP3, cleaved caspase-1 and ASC were increased in TGF- β_1 group ($P<0.05$). Compared with TGF- β_1 group, TPG treatment decreased cell proliferation and inhibited the protein expression of fibronectin, α -SMA, collagen I, NLRP3, cleaved caspase-1 and ASC ($P<0.05$). **Conclusion** TPG may alleviate airway remodeling and asthma symptoms by decreasing the expression of airway remodeling-related proteins, inhibiting NLRP3 inflammasome activation, and reducing the inflammatory response.

[Key words] total paeony glycoside; bronchial asthma; airway remodeling; airway inflammation

支气管哮喘是儿童常见的慢性呼吸系统疾病,患病率约为3%,且呈逐年上升趋势^[1-2],长期反复发作可导致气道炎症、高反应性和重塑等,严重影响患儿的健康和正常生活^[3]。气道重塑过程中伴随着胶原沉积, I型胶原蛋白(collagen I)和纤连蛋白(fibronectin)表达水平升高引起的不可逆气道阻塞是哮喘难治的根本原因之一^[4-5]。 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)为平滑肌的特征性标志物,其表达增多与气道高反应性和气道重塑程度加重密切相关^[6]。NOD样受体蛋白3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)炎性小体是由NLRP3、cleaved caspase-1和凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein, ASC)等组成的蛋白复合体,参与调控包括哮喘在内的多种疾病的炎症反应^[7]。多项研究指出, NLRP3炎性小体的异常激活可影响哮喘患者气道重塑的发生发展^[8-9]。临床上常使用皮质类固醇治疗哮喘,虽可有效缓解哮喘症状,但长期应用易产生依赖性,且不利于儿童发育^[10]。

中医药治疗哮喘因疗效显著、不良反应少等优点,已被广泛应用于临床^[11]。赤芍是毛茛科植物芍药或川赤芍的干燥根,具有清热凉血、散瘀止痛等功效^[12],在中医临床中常用于治疗哮喘^[13]。有研究发现,赤芍可通过改善气道重塑减缓肺损伤^[14]。另有研究发现,赤芍可抑制肝硬化小鼠中NLRP3炎性小体的激活^[15]。目前,关于赤芍治疗哮喘作用机制的研究鲜见,为此,本研究通过制备哮喘小鼠模型,探讨赤芍的主要活性成分赤芍总苷(total paeony glycoside, TPG)对哮喘小鼠气道重塑的作用及其机制,以期对赤芍的临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及细胞 SPF级BALB/c小鼠48只,6-8周龄,体重(22 \pm 2)g,雌雄各半,由河南省实验动物中心提供[实验动物生产许可证号:SCXK(豫)2021-0018],于通风良好的清洁动物房中适应性饲养1周,温度20~22℃,自由饮水进食。本研究涉及的动物

实验严格按照《中华人民共和国动物福利法》以及河南省中医院动物伦理委员会要求执行(PZ-HNSZYY-2022-136)。人支气管平滑肌细胞(human bronchial smooth muscle cells, HBSMCs)购自美国Sciencell公司。

1.2 主要试剂 卵清蛋白(ovalbumin, OVA)购自美国Sigma公司;吸入用布地奈德(budesonide, BUD)混悬液(普米克令舒)购自中国阿斯利康制药有限公司;TPG由本院制剂科提供;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)、高碘酸希夫(periodic acid schiff, PAS)染色液购自美国Sigma公司;瑞氏-吉萨姆染色液、CCK-8试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6 ELISA检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;纤连蛋白、 α -SMA、collagen I、NLRP3、cleaved caspase-1、ASC、 β -actin蛋白一抗及IgG-HRP标记的蛋白二抗购自英国Abcam公司;苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、RIPA(radio immunoprecipitation assay)裂解缓冲液(放射免疫沉淀)购自北京索莱宝科技有限公司;平滑肌细胞培养基(smooth muscle cell medium, SMCM)购自美国Sciencell公司;胎牛血清(fatal bovine serum, FBS)、青霉素/链霉素溶液购自美国Gibco公司。

1.3 动物实验

1.3.1 实验动物分组及模型制备 将BALB/c小鼠随机分为对照组、模型组、OVA+BUD组及OVA+TPG组,每组12只。除对照组外,其余各组分别于第1、7天腹腔注射0.2 ml致敏液(含100 μ g OVA和2 mg氢氧化铝),对照组腹腔注射等体积生理盐水。第14天采用1% OVA进行雾化激发,1次/d,连续1周,对照组雾化吸入等体积生理盐水。雾化激发前1 h, OVA+BUD组雾化吸入2 ml BUD混悬液, OVA+TPG组灌胃给予5 g/kg TPG,对照组和模型组均给予等体积生理盐水。

1.3.2 小鼠一般行为观察 末次激发24 h内观察小鼠的行为学变化,包括呼吸状况、精神状态、口鼻部位分泌物等。

1.3.3 HE、PAS染色观察肺组织病理学变化 末次激发24 h后处死各组小鼠,取肺组织置于4%多聚甲醛溶液中固定并进行石蜡包埋,切成厚度为4 μ m的组织切片。HE染色:取各组肺组织切片,置于苏木精染液中染色5 min,水洗3次后浸入伊红染液中染色30 s,观察肺组织病理学变化,并针对水肿、炎性细胞浸润、出血及小气道损伤进行评分,使用4分量表(0~3分,0分为无该项病理改变或极轻,3分为非常显著的病理性改变),总分为4项评分之和。采

用ImageJ软件对HE图像进行分析,选取3个直径最大的支气管测定其管腔基膜周长和气管壁总面积,并计算气管壁厚度。气管壁厚度(μ m)=气管壁总面积(μ m²)/管腔基膜周长(μ m)。PAS染色:取各组肺组织切片,置于高碘酸溶液中氧化10 min后冲洗,希夫染色15 min,再次冲洗后用苏木精染色5 min,观察肺组织中结肠杯状细胞中黏液物质的分泌情况。

1.3.4 瑞氏-吉萨姆染色计数支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar fluid, BALF)中的炎性细胞 末次激发24 h后收集小鼠BALF,离心弃上清,加入0.5 ml PBS重悬细胞,涂片行瑞氏-吉萨姆染色,显微镜下计数白细胞(white blood cell, WBC)、中性粒细胞(neutrophil, NEU)、嗜酸性粒细胞(eosinophils, EOS)和淋巴细胞(leukomonocyte, LYM)。

1.3.5 ELISA法检测BALF中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6含量 严格按照试剂盒说明书步骤,采用ELISA法检测各组小鼠BALF中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的含量。

1.3.6 Western blotting检测气道重塑蛋白(纤连蛋白、 α -SMA、collagen I)和NLRP3炎性小体相关蛋白(NLRP3、cleaved caspase-1、ASC)的表达 取适量肺组织,加入含有PMSF的RIPA裂解液,离心取上清液,采用BCA法测定蛋白浓度。取样品加入5倍上样缓冲液稀释,煮沸变性,行SDS-PAGE凝胶电泳分离,转移到PVDF膜上,加入5%脱脂奶粉封闭1 h。加入纤连蛋白(1:1000)、 α -SMA(1:10000)、collagen I(1:1000)、NLRP3(1:1000)、cleaved caspase-1(1:1000)、ASC(1:1000)和 β -actin(1:1000)一抗于4 $^{\circ}$ C孵育过夜,加入IgG-HRP标记的蛋白二抗(1:5000)室温孵育2 h。采用ECL化学发光法显色得到目的蛋白条带。使用ImageJ软件处理,以 β -actin为内参照,计算目的蛋白的相对表达水平。

1.4 细胞实验

1.4.1 细胞培养及分组 HBSMCs使用含5% FBS和1%青霉素/链霉素溶液的SMCM培养基,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂细胞培养箱中培养。设置对照组(正常培养)、转化生长因子(TGF)- β ₁组(采用含10 ng/ml TGF- β ₁的培养基培养)及TGF- β ₁+TPG组(采用含10 ng/ml TGF- β ₁和50 μ g/ml TPG的培养基培养)。

1.4.2 CCK-8法检测细胞增殖率 培养24 h后,加入10 μ l CCK-8溶液,轻轻摇匀,于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂细胞培养箱中孵育2 h,采用酶标仪检测450 nm波长处的吸光度值,并计算细胞增殖率。

1.4.3 Western blotting检测气道重塑蛋白(纤连蛋白、 α -SMA、collagen I)和NLRP3炎症小体相关蛋白(NLRP3、cleaved caspase-1、ASC)的表达 收集各组细胞,采用Western blotting检测纤连蛋白、 α -SMA、collagen I、NLRP3、cleaved caspase-1及ASC蛋白表

达水平,具体步骤同1.3.6。

1.5 统计学处理 采用GraphPad Prism 7软件进行统计分析。所有数据均为计量资料且符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用Bonferroni检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TPG对哮喘小鼠一般行为特征的影响 与对照组相比,模型组小鼠出现明显的抓鼻、挠痒和打喷嚏现象,并伴有呼吸急促、烦躁不安、口鼻处有白色黏性分泌物等典型的哮喘症状;BUD或TPG干预后,小鼠的上述哮喘行为特征得到明显缓解,呼吸节律平稳,偶有抓鼻、打喷嚏现象,极个别小鼠口鼻处有白色黏性分泌物。

2.2 TPG对哮喘小鼠肺组织病理学变化的影响 HE染色结果显示,对照组小鼠肺组织中支气管结构完整,炎性细胞浸润极少;模型组小鼠肺组织发生明显的病理改变,可见大量炎性细胞浸润,支气管管腔狭窄,管壁增厚,气道黏膜上皮增生;与模型组

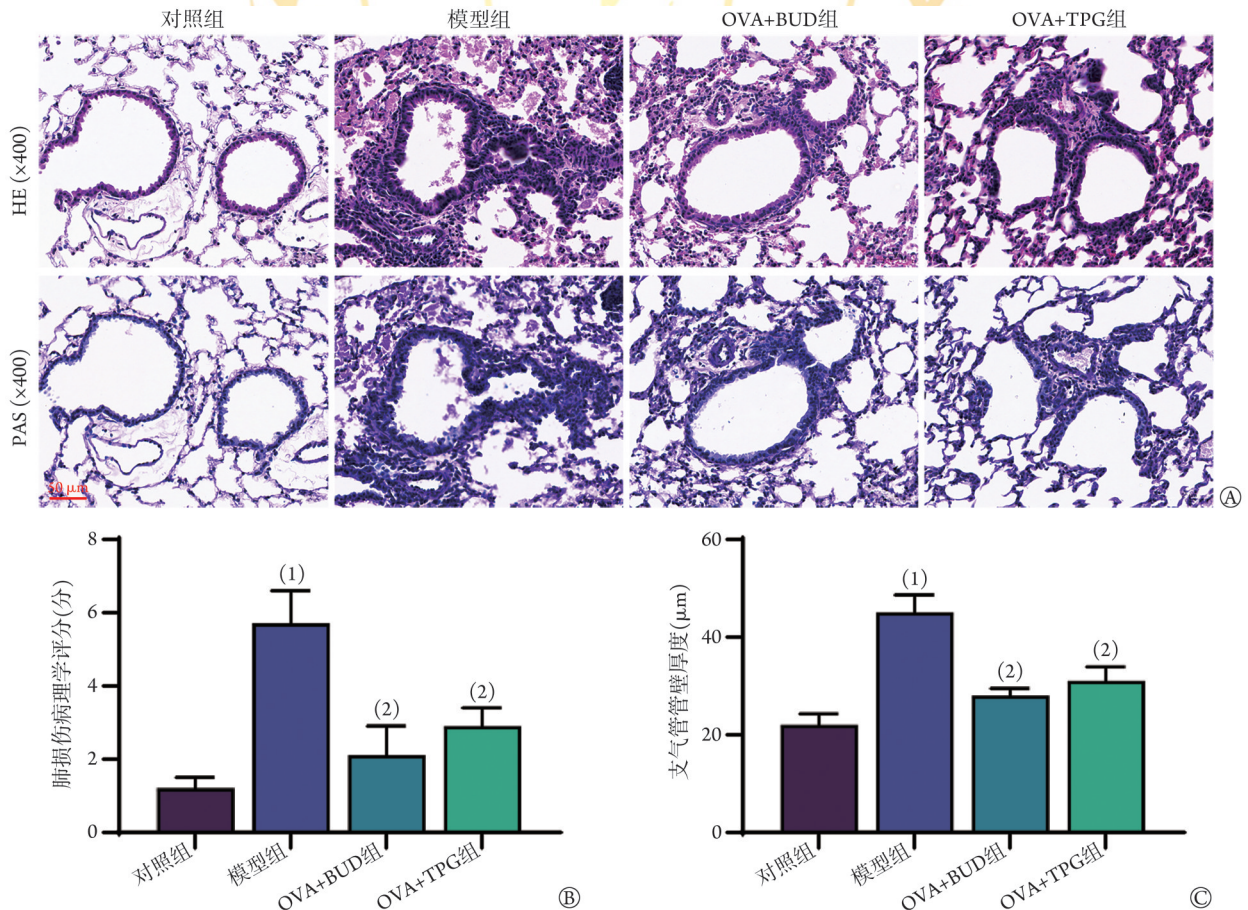
相比,OVA+BUD组、OVA+TPG组小鼠肺组织炎性细胞浸润明显减少,气道黏膜上皮增生减缓(图1A)。

PAS染色结果显示,对照组小鼠肺组织中可见少量杯状细胞,未见黏液分泌;模型组小鼠肺组织中大量杯状细胞增生,气道内分泌大量黏液;与模型组相比,OVA+BUD组、OVA+TPG组小鼠肺组织中杯状细胞减少,黏液分泌减少(图1A)。

与对照组相比,模型组小鼠肺损伤病理学评分明显增高,支气管管壁厚度明显增加($P<0.05$);与模型组相比,OVA+BUD组、OVA+TPG组小鼠肺损伤病理学评分明显降低,支气管管壁厚度明显减小,差异有统计学意义($P<0.05$,图1B、C)。

2.3 TPG对哮喘小鼠气道炎症的影响 瑞氏-吉萨姆染色结果显示,与对照组相比,模型组小鼠BALF中WBC、NEU、EOS、LYM均明显增多($P<0.05$);与模型组相比,OVA+BUD组、OVA+TPG组小鼠BALF中WBC、NEU、EOS、LYM均明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$,图2A)。

ELISA法检测结果显示,与对照组相比,模型组小鼠BALF中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6含量明显增加



OVA. 卵清蛋白; BUD. 布地奈德; TPG. 赤芍总苷; HE. 苏木精-伊红; PAS. 高碘酸希夫; A. 各组肺组织HE和PAS染色; B. 各组肺损伤病理学评分; C. 各组支气管管壁厚度; 与对照组比较, (1) $P<0.05$; 与模型组比较, (2) $P<0.05$

图1 赤芍总苷(TPG)对哮喘小鼠肺组织病理学变化的影响

Fig.1 Effect of total paeony glycoside (TPG) on lung histopathology in asthmatic mice

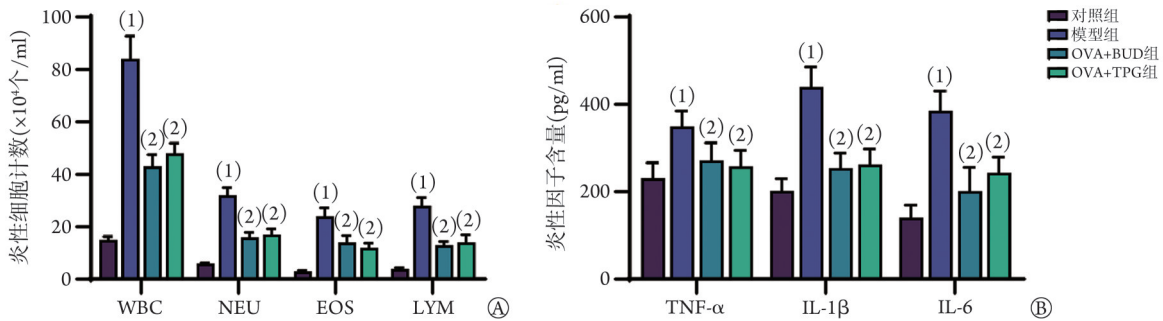
($P < 0.05$); 与模型组相比, OVA+BUD组、OVA+TPG组小鼠BALF中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6含量明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图2B)。

2.4 TPG对哮喘小鼠肺组织中气道重塑蛋白和NLRP3炎性小体相关蛋白表达的影响 Western blotting检测结果显示, 与对照组相比, 模型组小鼠肺组织中纤连蛋白、 α -SMA、collagen I、NLRP3、cleaved caspase-1、ASC蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$); 与模型组相比, OVA+BUD组、OVA+TPG组小鼠肺组织中纤连蛋白、 α -SMA、collagen I、

NLRP3、cleaved caspase-1、ASC蛋白表达水平明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$) (图3)。

2.5 TPG对TGF- β_1 诱导的HSMCs细胞增殖的影响 CCK-8法检测结果显示, 与对照组相比, TGF- β_1 组HSMCs细胞增殖率明显增高($136.26\% \pm 8.32\%$ vs. $100.00\% \pm 9.50\%$, $P < 0.05$); 与TGF- β_1 组相比, TGF- β_1 +TPG组HSMCs细胞增殖率明显降低, 差异有统计学意义($116.43\% \pm 9.78\%$, $P < 0.05$)。

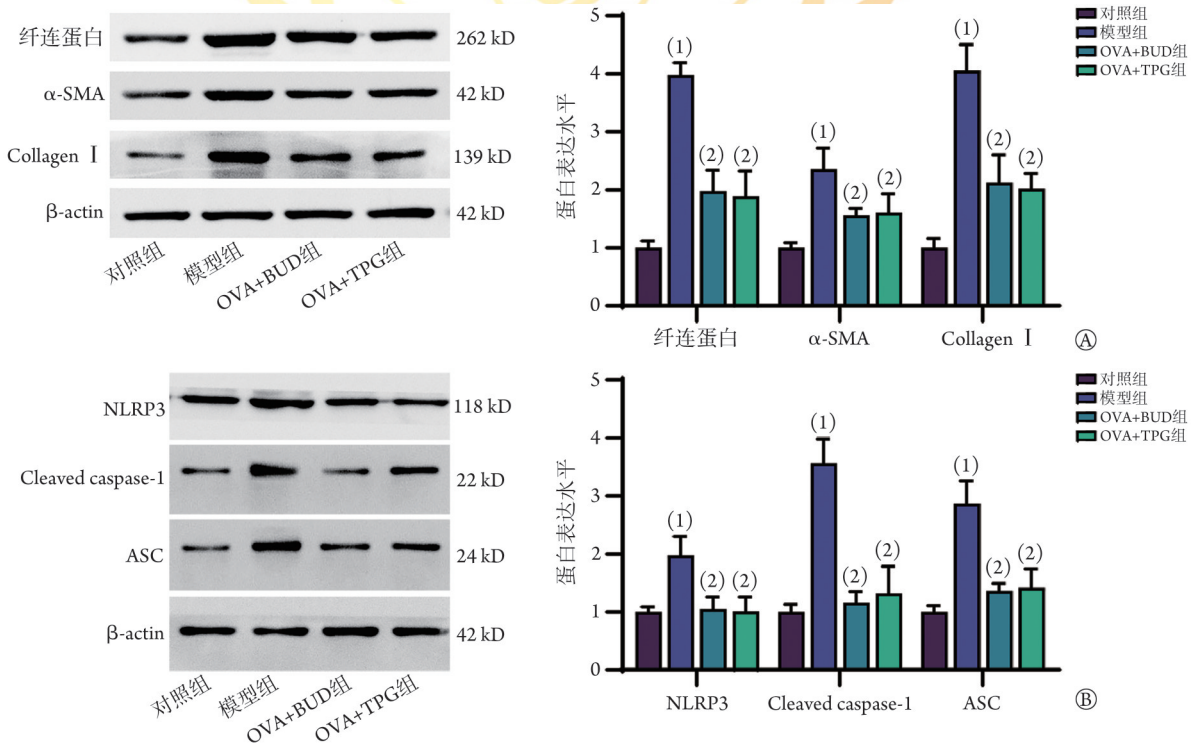
2.6 TPG对TGF- β_1 诱导的HSMCs中气道重塑蛋白和NLRP3炎性小体相关蛋白表达的影响 Western



TPG. 赤芍总苷; OVA. 卵清蛋白; BUD. 布地奈德; WBC. 白细胞; NEU. 中性粒细胞; EOS. 嗜酸性粒细胞; LYM. 淋巴细胞; TNF- α . 肿瘤坏死因子- α ; IL. 白细胞介素; A. 各组支气管肺泡灌洗液(BALF)中炎性细胞计数; B. 各组BALF中炎性因子含量; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与模型组比较, (2) $P < 0.05$

图2 TPG对哮喘小鼠气道炎症的影响

Fig.2 Effect of TPG on airway inflammation in asthmatic mice



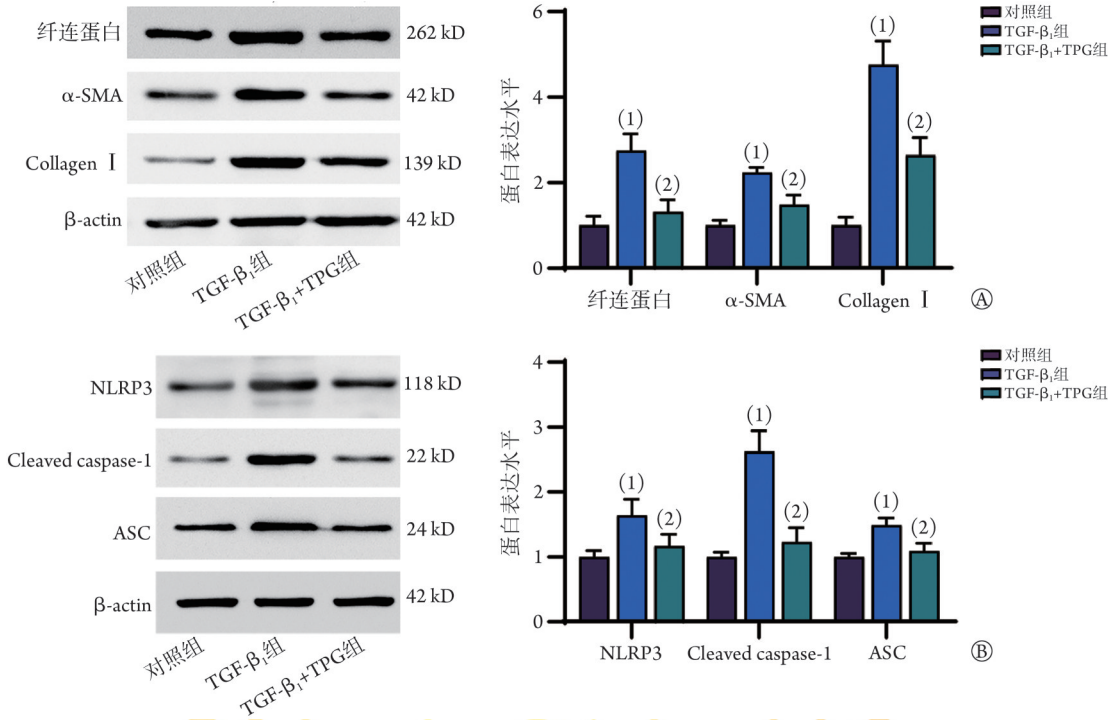
TPG. 赤芍总苷; OVA. 卵清蛋白; BUD. 布地奈德; α -SMA. α -平滑肌肌动蛋白; collagen I. I型胶原蛋白; NLRP3. NOD样受体蛋白3; ASC. 凋亡相关斑点样蛋白; A. 各组小鼠肺组织中气道重塑蛋白(纤连蛋白、 α -SMA和collagen I)的表达情况; B. 各组小鼠肺组织中NLRP3炎性小体相关蛋白(NLRP3、cleaved caspase-1和ASC)的表达情况; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与模型组比较, (2) $P < 0.05$

图3 TPG对哮喘小鼠肺组织中纤连蛋白、 α -SMA、collagen I、NLRP3、cleaved caspase-1和ASC蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of TPG on protein expression of fibronectin, α -SMA, collagen I, NLRP3, cleaved caspase-1 and ASC in asthmatic mice

blotting 检测结果显示, 与对照组相比, TGF- β_1 组 HBSMCs 中纤连蛋白、 α -SMA、collagen I、NLRP3、cleaved caspase-1 及 ASC 蛋白表达水平明显升高

($P < 0.05$); 与 TGF- β_1 组相比, TGF- β_1 +TPG 组 HBSMCs 中纤连蛋白、 α -SMA、collagen I、NLRP3、cleaved caspase-1 及 ASC 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)(图4)。



TPG. 赤芍总苷; TGF- β_1 . 转化生长因子- β_1 ; α -SMA. α -平滑肌肌动蛋白; collagen I. I型胶原蛋白; NLRP3. NOD样受体蛋白3; ASC. 凋亡相关斑点样蛋白; A. 各组HBSMCs中气道重塑蛋白(纤连蛋白、 α -SMA和collagen I)的表达情况; B. 各组HBSMCs中NLRP3炎性小体相关蛋白(NLRP3、cleaved caspase-1和ASC)的表达情况; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与TGF- β_1 组比较, (2) $P < 0.05$

图4 TPG对TGF- β_1 诱导的HBSMCs中纤连蛋白、 α -SMA、collagen I、NLRP3、cleaved caspase-1和ASC蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of TPG on protein expression of fibronectin, α -SMA, collagen I, NLRP3, cleaved caspase-1 and ASC in TGF- β_1 induced HBSMCs

3 讨论

支气管哮喘是一种常见的气道过敏性和炎症性疾病, 由于慢性炎症引起的气道频繁损伤和过度修复导致其结构改变, 称为气道重塑^[16]。气道重塑是顽固性哮喘的病理基础, 如何有效地控制气道重塑是近年来哮喘治疗的研究热点。研究发现, 多种中药有效成分和复方制剂均可有效控制气道重塑^[17-18]。

哮喘动物模型的构建需要经过致敏和激发两个阶段, 蛋清中OVA是常用的致敏原^[19]。本研究在致敏阶段采用腹腔注射OVA氢氧化铝混悬液, 激发阶段通过雾化给予OVA的方式构建哮喘小鼠模型。与对照组相比, 模型组小鼠出现典型的哮喘症状。HE和PAS染色显示模型组小鼠肺组织大量炎性细胞浸润, 杯状细胞及黏液分泌增多, 且支气管管壁厚度明显增加; BALF中炎性细胞明显增多, 炎性因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6含量明显增加。该结果与既往研究中动物哮喘症状及病理损伤结果一致^[20], 表明哮喘小鼠模型构建成功。BUD常用于治疗哮喘, 可

通过扩张支气管和抗炎缓解哮喘症状^[21], 本研究将BUD作为阳性对照药物。

有研究发现, 在气道重塑过程中, 气道细胞分泌 α -SMA、collagen I、纤连蛋白增多^[22-23], 通过抑制哮喘小鼠中纤连蛋白和 α -SMA的表达, 可减轻哮喘小鼠的气道重塑^[24]。本研究结果显示, 与对照组相比, 模型组小鼠中纤连蛋白、 α -SMA和collagen I蛋白表达水平明显升高, 与既往研究结果一致^[25]。BUD或TPG干预明显降低了哮喘小鼠肺组织中气道重塑蛋白纤连蛋白、 α -SMA和collagen I的表达, 表明TPG具有缓解哮喘小鼠气道重塑的作用。

目前, 炎性小体已被证实是治疗炎症的重要靶点, 其中NLRP3炎性小体在气道炎症性疾病中表征明显且作用广泛^[26-27]。细胞受到外来刺激、代谢物刺激或接收到损伤相关信号时, 可激活NLRP3炎性小体, 促进IL-1 β 的成熟和分泌, 引发炎症反应^[28]。谢荣芳等^[29]发现, 药方剂补元汤可通过调控NLRP3炎性小体信号通路缓解慢性阻塞性肺疾病大鼠的气道重塑。王丽艳等^[30]发现, 中药青蒿的活性成分青

蒿琥酯可通过抑制 NLRP3/caspase-1/IL-1 β 通路减轻哮喘幼鼠的气道重塑。本研究中,与对照组相比,模型组小鼠中 NLRP3 炎性小体相关蛋白表达水平升高,而给予 BUD 或 TPG 干预后, NLRP3 炎性小体相关蛋白表达水平降低,表明 TPG 可通过抑制哮喘小鼠 NLRP3 炎性小体的激活缓解气道重塑。

气道重塑发生过程中伴随着由炎症诱导的支气管平滑肌增生^[31]。TGF- β_1 是 TGF- β 家族的成员之一,在炎症过程中对细胞的增殖、分化、凋亡等具有调节作用,常作为诱导剂刺激细胞来建立哮喘的体外细胞模型^[32]。本研究发现,在 TGF- β_1 的诱导下, HBSMCs 细胞增殖率明显增高,细胞过度增长,且纤连蛋白、 α -SMA 和 collagen I 蛋白表达水平升高,而 TPG 干预可明显逆转 TGF- β_1 诱导的 HBSMCs 细胞增殖及细胞中气道重塑相关蛋白的表达,并抑制 NLRP3 炎性小体的激活,与动物实验结果一致,表明 TPG 可能通过抑制 NLRP3 炎性小体的激活,减少炎症因子诱导的支气管上皮细胞增生,发挥缓解气道重塑的作用。

综上所述,本研究结果发现,TPG 可能通过抑制 NLRP3 炎性小体的激活,减轻炎症反应,降低气道重塑相关蛋白的表达,从而缓解气道重塑。然而,本研究在细胞实验中仅验证了 TPG 对 HBSMCs 的作用,未来仍需在其他细胞如气道上皮细胞中进一步验证 TPG 的作用及其机制。

【参考文献】

- [1] Miller RL, Grayson MH, Strothman K. Advances in asthma: new understandings of asthma's natural history, risk factors, underlying mechanisms, and clinical management[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2021, 148(6): 1430-1441.
- [2] 崔天怡,刘佳蕊,吕彬,等.肠道菌群及免疫调节与儿童哮喘关系的研究进展[J]. *中国全科医学*, 2022, 25(8): 1021-1026.
- [3] 王歆,刘维英,武晨,等.1 α ,25-二羟维生素 D₃ 对哮喘小鼠 SIRT1、GATA-3 表达及气道炎症水平的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2024, 49(6): 686-693.
- [4] Zastrzezynska W, Przybyszowski M, Bazan-Socha S, et al. Omalizumab may decrease the thickness of the reticular basement membrane and fibronectin deposit in the bronchial mucosa of severe allergic asthmatics[J]. *J Asthma*, 2020, 57(5): 468-477.
- [5] 郑杭彬,许光兰,李国生,等.细胞外囊泡在慢性阻塞性肺疾病中的作用研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2023, 48(2): 231-236.
- [6] 杨卫,许晓云,监士宁,等.早期吸入布地奈德对过敏性哮喘模型大鼠肺功能、骨桥蛋白及 α -SMA 的影响[J]. *医学研究与教育*, 2020, 37(2): 31-36.
- [7] 邹进晶,陈国忠. NLRP3 炎性小体在慢性气道炎症性疾病中的作用研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2022, 3(47): 286-291.
- [8] Li X, Yang N. Exosome miR-223-3p in the bone marrow-derived mesenchymal stem cells alleviates the inflammation and airway remodeling through NLRP3-induced ASC/Caspase-1/GSDMD signaling pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 123: 110746.
- [9] Chen X, Xiao Z, Jiang Z, et al. Schisandrin B attenuates airway inflammation and airway remodeling in asthma by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and reducing pyroptosis[J]. *Inflammation*, 2021, 44(6): 2217-2231.
- [10] Haktanir Abul M, Phipatanakul W. Severe asthma in children: evaluation and management[J]. *Allergol Int*, 2019, 68(2): 150-157.
- [11] 孟庆玲,姜京植,李良昌,等.麻黄定喘汤通过调控 NLRP3 炎性小体改善咳嗽变异性哮喘豚鼠气道炎症[J]. *中国免疫学杂志*, 2023, 39(3): 566-571.
- [12] 许京淑,向航,谭军,等.利妥昔单抗联合赤芍治疗乙型肝炎病毒性肝炎病毒阳性非霍奇金淋巴瘤的临床研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(15): 1803-1805.
- [13] Gu ZR, Xue CM, Lyu X, et al. Study on drug properties and syndrome-symptom-formula-herb network of traditional chinese medicine in treatment of effort angina pectoris based on data visualization[J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2020, 45(18): 4482-4489.
- [14] 徐飞,林锦培,李璐璐,等.赤芍对慢性阻塞性肺疾病大鼠气道重塑的影响及机制研究[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(4): 1755-1760.
- [15] Zhang J, Fu Y, Yang B, et al. Total glucosides of paeony inhibits liver fibrosis and inflammatory response associated with cirrhosis via the FLI1/NLRP3 axis[J]. *Am J Transl Res*, 2022, 14(6): 4321-4336.
- [16] Banno A, Reddy AT, Lakshmi SP, et al. Bidirectional interaction of airway epithelial remodeling and inflammation in asthma[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2020, 134(9): 1063-1079.
- [17] Zhou BW, Liu HM, Jia XH. The role and mechanisms of traditional chinese medicine for airway inflammation and remodeling in asthma: overview and progress[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 917256.
- [18] 马小斐,马立光,刘函晔,等.紫云英苷抑制哮喘小鼠气道炎症的作用及机制研究[J]. *免疫学杂志*, 2022, 38(11): 944-949.
- [19] Casaro M, Souza VR, Oliveira FA, et al. OVA-induced allergic airway inflammation mouse model[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1916: 297-301.
- [20] Hu L, Li L, Zhang H, et al. Inhibition of airway remodeling and inflammatory response by icariin in asthma[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1): 316.
- [21] Beasley R, Harrison T, Peterson S, et al. Evaluation of budesonide-formoterol for maintenance and reliever therapy among patients with poorly controlled asthma: a systematic review and meta-analysis[J]. *JAMA Netw Open*, 2022, 5(3): e220615.
- [22] Janulaityte I, Januskevicius A, Kalinauskaitė-Zukauske V, et al. In vivo allergen-activated eosinophils promote collagen I and fibronectin gene expression in airway smooth muscle cells via TGF- β_1 signaling pathway in asthma[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 13-17.
- [23] Cheng WH, Kao SY, Chen CL, et al. Amphiregulin induces CCN2 and fibronectin expression by TGF- β through EGFR-dependent pathway in lung epithelial cells[J]. *Respir Res*, 2022, 23(1): 381.
- [24] Chen WQ, Xie ZZ, Wang X, et al. Influences of PON1 on airway inflammation and remodeling in bronchial asthma[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(1): 793-805.
- [25] An G, Zhang X, Wang W, et al. The effects of interleukin-33 on airways collagen deposition and matrix metalloproteinase expression in a murine surrogate of asthma[J]. *Immunology*, 2018, 154(4): 637-650.
- [26] Alvarez-Simon D, Ait Yahia S, de Nadai P, et al. NOD-like receptors

- in asthma[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 928886.
- [27] 杨盛, 孟博, 彭晴, 等. 间充质干细胞对细胞焦亡的调控作用及机制研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2023, 48(10): 1221-1228.
- [28] Fu J, Wu H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation[J]. *Annu Rev Immunol*, 2023, 41: 301-316.
- [29] 谢荣芳, 黄春燕, 李苗苗, 等. 补元汤调控NLRP3炎症小体信号通路对慢性阻塞性肺疾病大鼠气道重塑的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(11): 5459-5463.
- [30] 王丽艳, 鲍星星, 边俊梅. 青蒿琥酯改善哮喘幼鼠气道重塑的作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 6(40): 864-868.
- [31] Camoretti-Mercado B, Lockey RF. Airway smooth muscle pathophysiology in asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2021, 147(6): 1983-1995.
- [32] Tang J, Liu J, Zhang X. The role of osthole on TGF- β -induced lung epithelium apoptosis injury and epithelial-mesenchymal transition-mediated airway remodeling in pediatric asthma[J]. *J Healthc Eng*, 2022, 2022: 7099097.

(责任编辑: 纪方方)

