

阿那其根醇提物通过 JNK、p-JNK/p38MAPK 信号通路调控咳嗽变异性哮喘大鼠脑部神经炎症的作用研究

陈 伟, 杨 浩, 金小越*

新疆医科大学第六附属医院 药学部, 新疆 乌鲁木齐 830002

摘要: 目的 探讨阿那其根醇提物 (EEAP) 对咳嗽变异性哮喘 (CVA) 大鼠神经炎症和 c-Jun N-末端激酶 (JNK) /p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK) 信号通路的调控作用。方法 体外实验中, 将大鼠海马神经元 H19-7 细胞分为 6 组, 分别为对照组、模型组、醋酸泼尼松 ($0.025 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 阳性药对照组和 EEAP 高、中、低质量浓度 (6.4 、 3.2 、 $1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 组, 采用脂多糖 (LPS) 诱导细胞炎症模型, 采用酶联免疫吸附 (ELISA) 法检测各组细胞上清液中的白细胞介素-6 (IL-6)、IL-8、IL-18 的水平, Western blotting 法检测各组神经元细胞中 JNK、p-JNK 和 p38MAPK 的蛋白表达。动物实验中, 将 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、醋酸泼尼松 ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组和 EEAP 高、中、低剂量 (640 、 320 、 $160 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组, 除对照组外, 各组大鼠使用 1 mg OVA 致敏, 大鼠 sc 新鲜配制的 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 OVA 溶液, 在各大鼠后足跖、腹股沟、腰部、背部和颈部总共取 10 个点, 每个点注射 0.05 mL , 同时 ip 0.5 mL , 共计 1 mL ; 造模后第 15 天开始, 大鼠持续雾化吸入 1% OVA 15 d , 每天 1 次, 每次 20 min 以激发哮喘。对照组以 0.9% 氯化钠溶液代替 OVA 溶液进行 sc 和雾化吸入。从造模第 30 天开始, 对照组和模型组 ig 给予等量 0.9% 氯化钠溶液, 各给药组分别 ig 给予相应剂量药物, 每日 1 次, 持续 30 d 。采用免疫组织化学法检测海马区组织中 JNK 和 p38MAPK 的表达, 采用 Western blotting 法检测海马区组织中 p-JNK 的蛋白表达, 采用 ELISA 法检测各组大鼠海马区组织中 IL-6、IL-8、IL-18 的水平。结果 体外实验显示, 与对照组比较, 模型组细胞培养上清液中的 IL-6、IL-8、IL-18 水平明显升高 ($P < 0.05$), 模型组 LPS 刺激的神经元细胞中的 p-JNK、p38MAPK 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 醋酸泼尼松组及 EEAP 高、中剂量组细胞培养上清液中的 IL-6、IL-8、IL-18 水平明显降低 ($P < 0.05$), 细胞中 p-JNK、p38MAPK 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 且 EEAP 的炎症因子和蛋白表达抑制作用呈浓度相关性。动物实验中, 与对照组比较, 模型组大鼠脑组织中 IL-6、IL-8、IL-18 的水平和 JNK、p-JNK 和 p38MAPK 的蛋白表达水平均升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 醋酸泼尼松组及 EEAP 各组的 IL-6、IL-8、IL-18 的水平和 JNK、p-JNK 和 p38MAPK 的蛋白表达水平均降低 ($P < 0.05$)。且 EEAP 作用具有剂量相关性。结论 EEAP 抑制 CVA 诱导的神经炎症, 可通过调节炎症因子 IL-6、IL-8、IL-18 和 JNK、p-JNK/p38MAPK 信号通路发挥抗炎作用。

关键词: 阿那其根醇提物; 咳嗽变异性哮喘; 神经炎症反应; c-Jun N-末端激酶/p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路; 白细胞介素; 海马神经元

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 11-2559-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.11.011

Effect of ethanol extract of root of *Anacyclus pyrethrum* on regulating neuroinflammation in brain of cough variant asthma rats through JNK and p-JNK/p38MAPK signaling pathways

CHEN Wei, YANG Hao, JIN Xiaoyue

Department of Pharmacy, the Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830002, China

Abstract: Objective To investigate the regulatory effects of (ethanol extract of the root of *Anacyclus pyrethrum*, EEAP) on neuroinflammation and c-Jun N-terminal kinase (JNK)/p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) signaling pathway in cough-variant asthma (CVA) rats. **Methods** In *in vitro* experiments, rat hippocampal neuronal cells H19-7 were divided into six

收稿日期: 2024-06-20

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目 (2021D01C458)

第一作者: 陈 伟 (1989—), 男, 主管药师, 本科, 主要从事临床药理研究。E-mail: 1209248647@qq.com

*通信作者: 金小越 (1961—), 女, 主任药师, 硕士, 主要从事药物分析及临床药学研究。E-mail: jinxiaoyue0112@163.com

groups, namely, the control group, the model group, the prednisone acetate ($0.025 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) positive drug control group, and the EEAP high, medium, and low mass concentration ($6.4, 3.2, \text{ and } 1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) group, and lipopolysaccharide (LPS) was used to induced cellular inflammation model, and the levels of interleukin-6 (IL-6), IL-8, and IL-18 in the cell supernatants of each group were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the protein expression of JNK, p-JNK, and p38MAPK in the neuronal cells of each group was detected by Western blotting. In the animal experiments, SPF-grade male SD rats were randomly divided into control, model, prednisone acetate ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and EEAP high, medium, and low dose ($640, 320, \text{ and } 160 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) groups, and rats in each group except the control group were sensitized with 1 mg of OVA, and the rats sc freshly prepared $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ OVA solution was injected at a total of 10 points in the hindfoot plantar, inguinal, lumbar, dorsal, and cervical regions of each rat, with 0.05 mL injected at each point, while 0.5 mL was injected intraperitoneally, for a total of 1 mL. Starting on the 15th d after modeling, the rats were continuously nebulized and inhaled with 1% OVA for 15 d, once per day, for 20 min each time in order to stimulate asthma. The control group was sc and nebulized inhalation with 0.9% NaCl solution instead of OVA solution. Starting from the 30th d of modeling, the control group and the model group ig were given equal amounts of 0.9% NaCl solution, and each dosing group ig was given the corresponding dose of drug once a day for 30 d. The expression of JNK and p38MAPK in hippocampal tissues was detected by immunohistochemistry, and the protein expression of p-JNK in the tissues of hippocampal region was detected by Western blotting. ELISA was used to detect the levels of IL-6, IL-8 and IL-18 in the hippocampal area tissues of rats in each group. **Results** The *in vitro* experiments showed that the levels of IL-6, IL-8, and IL-18 in cell culture supernatants of the model group were significantly higher compared with those of the control group ($P < 0.05$), and the protein expression levels of p-JNK and p38MAPK in LPS-stimulated neuronal cells in the model group were significantly higher ($P < 0.05$). Compared with the model group, the levels of IL-6, IL-8, and IL-18 in cell culture supernatants of the prednisone acetate group and the EEAP high- and medium-dose groups were significantly decreased ($P < 0.05$). The levels of IL-6, IL-8 and IL-18 in cell culture supernatant were significantly reduced ($P < 0.05$), and the protein expression levels of p-JNK and p38MAPK in cells were significantly reduced ($P < 0.05$). And the inhibitory effects of inflammatory factors and protein expression of EEAP showed concentration correlation. In animal experiments, the levels of IL-6, IL-8, IL-18 and the protein expression levels of JNK, p-JNK and p38MAPK in the brain tissues of rats in the model group were elevated compared with those in the control group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the levels of IL-6, IL-8, IL-18 and the protein expression levels of JNK, p-JNK and p38MAPK were decreased in the prednisone acetate group and the EEAP groups ($P < 0.05$). And the EEAP effect was dose-related. **Conclusion** EEAP inhibited CVA-induced neuroinflammation and could exert anti-inflammatory effects by regulating inflammatory factors IL-6, IL-8, IL-18 and JNK, p-JNK/p38MAPK signaling pathways.

Key words: ethanol extract of *Anacyclus pyrethrum*; cough variant asthma; neuroinflammatory response; c-Jun N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway; interleukins; hippocampal neurons

咳嗽变异性哮喘(CVA)又称咳型哮喘或隐匿性哮喘,是哮喘类型之一^[1]。近年来,多项研究发现,哮喘是一种高度异质性的炎症性疾病,其与神经炎症密切相关,并影响认知记忆功能^[2-5]。Dill-McFarland等^[6]在研究哮喘气道炎症时,发现肺部T17型炎症相关蛋白介导传入肺-脑细胞和分子途径,参与神经炎症;研究提示,哮喘肺部炎症对神经炎症具有一定影响,通过改善肺部炎症或是减轻或缓解神经炎症的新方法。目前,CVA的治疗方法和哮喘相同,采用支气管扩张药、吸入皮质类固醇和白三烯受体拮抗剂。上述药物具有一定程度的不良反应,部分患者不能耐受。中药具有多靶点、多通路改善CVA的作用,不良反应较化学药少^[7]。阿那其根为菊科植物罗马除虫菊 *Anacyclus pyrethrum* (L.) DC 的根,是新疆民族常用药材之一。《维吾尔药志》中记载其含有黄酮、菊糖、墙草碱等

成分^[8]。已有研究报道,阿那其根具有治疗哮喘的作用,但其机制尚不明确^[9]。本课题组前期研究发现,阿那其根醇提物(ethanol extract of *Anacyclus pyrethrum*, EEAP)可降低CVA大鼠血清炎症因子水平、抑制Toll样受体4(TLR4)/核因子- κ B(NF- κ B)信号通路并缓解肺部炎性改变^[10],并改善脑部炎症^[11]。此外,阿那其根还具有潜在的神经保护作用^[12]。基于本课题组研究及文献报道,EEAP调节CVA神经炎症及其信号通路的作用机制尚不明确。本研究旨在探索EEAP对脑部神经组织中炎症因子和c-Jun N-终端激酶(JNK)/p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)信号通路在CVA大鼠模型中表达的影响,及对海马神经元细胞炎症因子的表达和免疫调节作用,以明确EEAP改善CVA诱导的神经炎症的机制,为CVA引发相关疾病的临床治疗提供科学依据。

1 材料

1.1 细胞与动物

大鼠海马神经元H19-7细胞购于上海钦诚生物科技有限公司。60只SPF级雄性SD大鼠(体质量221~262 g, 8周龄)由新疆医科大学动物实验中心提供,动物生产许可证号:SCXK(新)2018-0002。大鼠自由进食、水,饲养于新疆医科大学实验动物屏障环境内,温度20~26℃,相对湿度40%~70%,昼夜明暗交替时间:12 h/12 h。实验相关的各项操作符合新疆医科大学第六附属医院伦理委员会批准规定的试验伦理守则(伦理批准号:2022-05-011)。

1.2 试剂与仪器

Dulbecco 改良 Eagle/F12 (DMEM/F12) 培养基和胎牛血清购自美国 Thermo Fisher 公司;脂多糖(LPS)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;卵白蛋白(OVA)购于美国 Sigma 公司;白细胞介素-6(IL-6)、IL-8、IL-18 的酶联免疫吸附(ELISA)测定试剂盒购于中国上海美联公司;TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司;JNK 和 p38MAPK 蛋白的抗体(JNK1/JNK2 monoclonal antibody、p38 MAPK monoclonal antibody)均购于美国 Cell Signaling Technology 公司;电化学发光(Electro-Chemi-Luminescence, ECL)试剂和 RIPA 试剂盒购于上海 Beyotime 生物科技有限公司;二辛可宁酸(BCA)蛋白检测试剂盒购于美国 CoWin 生物科技有限公司;聚偏氟乙烯(PVDF)膜购于美国 Millipore 公司。DMI4000B 荧光倒置显微镜(莱卡公司);Galaxy 170R 型 CO₂ 培养箱(New Brunswick 公司);KS 18 型生物安全柜(Thermo Fisher Scientific 公司);Bio-Rad 3350 酶标仪(Bio-Rad 公司);电泳仪(Bio-Rad 公司);3-18 K 型高速冷冻离心机(Sigma 公司)。

1.3 药材

阿那其根粗粉(新疆本草堂药业有限公司提供,批号 809081)。

2 方法

2.1 EEAP 的制备

取阿那其根粗粉 500 g,用 65% 乙醇 5 L 回流提取 1 h,提取 3 次,提取液滤过浓缩,制成质量浓度 1 g·mL⁻¹ 药液。采用分光光度法在 508 nm 处测定吸光度值,计算得到其黄酮质量分数为 23.56 mg·g⁻¹。

2.2 EEAP 对大鼠神经元 H19-7 细胞炎症相关指标的影响

2.2.1 神经元细胞培养及给药 将大鼠海马神经

元 H19-7 细胞加入 2 mL 0.25% 胰酶(T25 瓶)消化 1 min,加入 DMEM/F12 培养基 2 mL 终止消化,将细胞悬液 3 500×g 离心 4 min 弃上清,加 2 mL DMEM/F12 培养基吹匀重悬后按照 1:2 比例加入 2 个 T25 培养瓶中进行培养,置于 5%CO₂ 培养箱内,每 2~3 天换液 1 次,待生长至对数生长期后将细胞分为 6 组,每组 3 个复孔。分别为对照组、模型组、醋酸泼尼松(0.025 mg·mL⁻¹)阳性药对照组和 EEAP 高、中、低质量浓度(6.4、3.2、1.6 mg·mL⁻¹)组。除对照组外,其余各组采用 LPS(0.5 mg·L⁻¹)诱导神经元细胞炎症模型,各给药组分别于 LPS 作用 24 h 后加入相应质量浓度的药物,24 h 后收集细胞和培养上清液,每组重复 3 次。

2.2.2 ELISA 法测定细胞培养上清液中 IL-6、IL-8、IL-18 的水平 各组神经元细胞静置 30 min, 4℃、3 500×g 离心 15 min 得到上清液,于 Bio-Rad 3350 酶标仪上测定 450 nm 处的吸光度值,使用相应的 ELISA 试剂盒换算上清液中 IL-6、IL-8、IL-18 的浓度。

2.2.3 Western blotting 法检测神经元细胞中 p-JNK 和 p38MAPK 的蛋白表达 各组神经元细胞加入裂解液,加入蛋白酶抑制剂,冰上裂解 20~30 min, 4℃、3 500×g 离心 30 min,得到上清液,在预冷 PBS 缓冲液中洗涤 3 次,用 RIPA 分离总蛋白。BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度。等量的总蛋白电泳到 SDS-PAGE,后转移到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h。用 JNK、p-JNK 和 p38MAPK 的一抗(1:1 000)在 4℃ 下孵育过夜。用 HRP 偶联的山羊抗兔免疫球蛋白 IgG 二抗(1:2 000)孵育 2 h。用 ECL 化学发光试剂对膜上的条带进行显色。采用 GAPDH 作为内参蛋白归一化,采用 Image J 软件对蛋白条带灰度值进行分析定量。

2.3 EEAP 对 CVA 大鼠脑组织中炎症因子和 JNK、p-JNK/p38MAPK 的影响

2.3.1 实验动物分组、造模、给药方案 60 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为 6 组,每组 10 只,分别为对照组、模型组、醋酸泼尼松(2.5 mg·kg⁻¹)组和 EEAP 高、中、低剂量(640、320、160 mg·kg⁻¹)组,所有大鼠自由获得水和食物。除对照组外,各组大鼠使用 1 mg OVA 致敏,大鼠 sc 新鲜配制的 1 mg·mL⁻¹ 的 OVA 溶液(临用前用 0.9% 氯化钠溶液配成 1% 的溶液,加入 10% 完全弗氏佐剂中,得质量浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的 OVA 溶液),在各大鼠后足跖、腹股沟、腰部、背部和颈部总共取 10 个点,每个点注射 0.05 mL,同时 ip 0.5 mL,

共计1 mL;造模后第15天开始,将大鼠置于自制的透明雾化盒内,以400 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)恒压喷入1%OVA溶液,使其持续雾化吸入15 d,每天1次,每次20 min以激发哮喘^[13]。对照组以0.9%氯化钠溶液代替OVA溶液进行sc和雾化吸入。从造模第30天开始,对照组和模型组ig给予等量0.9%氯化钠溶液,各给药组分别ig给予相应剂量药物,每日1次,持续30 d。各组大鼠继续饲养至60 d后执行安乐死,收集海马区脑组织。

2.3.2 标本采集 末次给药后禁食水24 h,大鼠ip戊巴比妥钠(100 mg·kg⁻¹)安乐死后,分离大脑后用刀片沿矢状缝切开成两半球,分离海马,前2/3的海马沿锥体线直接分离。每组随机取2只大鼠海马组织,用4%多聚甲醛固定,用于免疫组化检测。另随机取4只大鼠海马组织,制备匀浆后静置30 min,4 °C、3 500×g离心15 min,取上清液,用于ELISA检测。余下4只大鼠的海马组织,液氮下碾碎用于Western blotting检测。

2.3.3 ELISA法测定大鼠脑组织中IL-6、IL-8、IL-18的水平 取“2.3.2”项制备的海马组织上清液,按试剂盒说明书方法测定IL-6、IL-8、IL-18水平。

2.3.4 免疫组织化学法检测JNK和p38MAPK蛋白表达 取“2.3.2”项下用4%多聚甲醛固定好的脑组织,用0.15% Triton X-100渗透组织30 min。然后,

用5% BSA封闭细胞1.5 h,用兔抗JNK(1:800)和p38MAPK(1:500)孵育后在4 °C下过夜。用荧光染料偶联二抗孵育细胞1.5 h。用蔡司显微镜观测视野中JNK和p38MAPK的蛋白表达并拍摄图片,使用Image J软件识别阳性区域并分析各组蛋白的表达量。

2.3.5 Western blotting法检测脑组织中p-JNK蛋白表达 取“2.3.2”项下液氮下碾碎的脑组织。按照“2.2.3”项方法检测p-JNK蛋白表达。

2.4 统计学分析

数据采用SPSS 23.0软件进行统计,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示;两组间数据的比较采用独立样本 t 检验。采用单因素方差分析法统计治疗后各组间数据,并采用LSD- t 进行两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 EEAP对LPS刺激的神经元细胞炎症因子的影响

与对照组比较,模型组LPS刺激的神经元细胞上清液中的IL-6、IL-8、IL-18水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,醋酸泼尼松组及EEAP高、中剂量组的IL-6、IL-8、IL-18水平明显降低($P < 0.05$),EEAP低剂量组无统计学意义($P > 0.05$);且EEAP的炎症因子抑制作用呈剂量相关性。见图1。

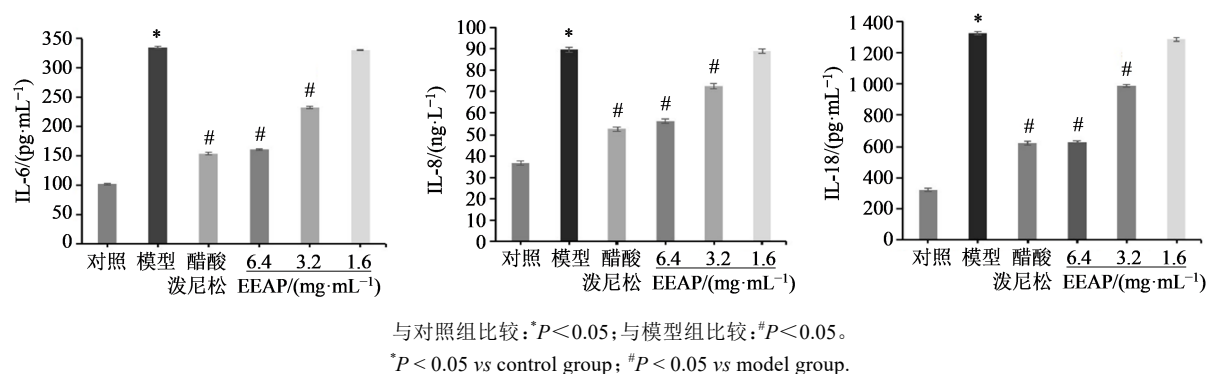


图1 EEAP对LPS刺激的神经元细胞上清液中炎症因子的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Effect of EEAP on levels of inflammatory cytokines in LPS-stimulated neurons supernatant ($\bar{x} \pm s, n=6$)

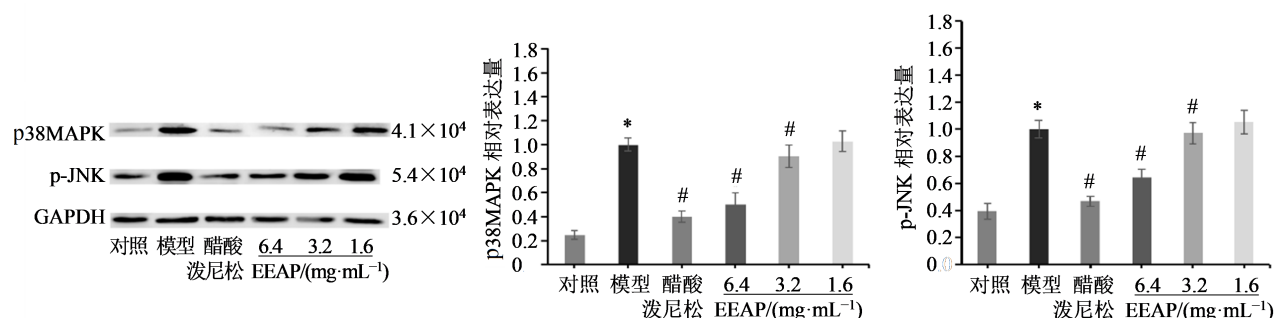
3.2 EEAP对LPS刺激的神经元细胞p-JNK/p38MAPK信号蛋白表达的影响

Western blotting法检测神经元细胞中p-JNK和p38MAPK的蛋白表达,结果见图2。与对照组比较,模型组LPS刺激的神经元细胞中的p-JNK、p38MAPK蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,醋酸泼尼松组及EEAP高、中剂量组

的p-JNK、p38MAPK蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$),EEAP低剂量组无统计学意义($P > 0.05$);且EEAP的p-JNK、p38MAPK蛋白表达抑制作用呈剂量相关性。

3.3 EEAP对CVA大鼠脑组织炎症因子的影响

与对照组比较,模型组大鼠脑组织中IL-6、IL-8、IL-18水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,醋酸



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

图2 EEAP对LPS刺激的神经元细胞p-JNK和p38MAPK蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

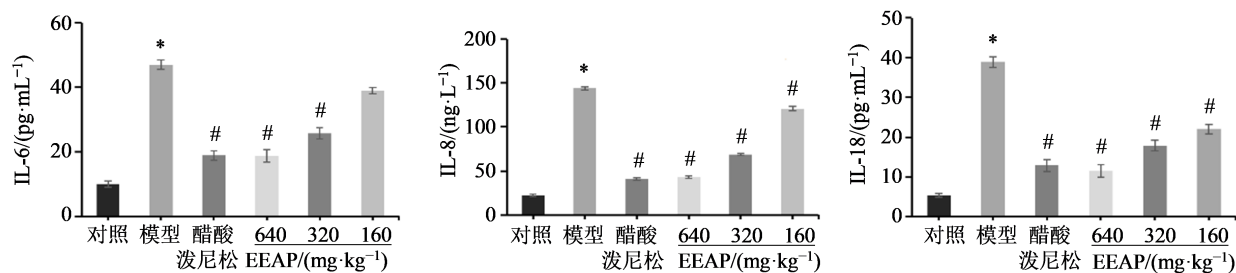
Fig. 2 Effect of EEAP on expression of p-JNK and p38MAPK protein in LPS-stimulated neurons ($\bar{x} \pm s, n=6$)

泼尼松组和EEAP高、中、低剂量组大鼠脑组织中的IL-6、IL-8、IL-18水平均明显降低 ($P < 0.05$)；且EEAP的炎症因子抑制作用呈剂量相关性。见图3。

3.4 EEAP对CVA大鼠脑组织中JNK、p-JNK/p38MAPK信号通路的影响

免疫组化法检测各组脑组织中JNK和p38MAPK的蛋白表达水平变化，组间总体差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。Western blotting法检测各组脑组织中p-JNK的蛋白表达水平变化，组间总

体差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组比较，模型组大鼠脑组织中JNK、p-JNK和p38MAPK的蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，醋酸泼尼松组及EEAP高、中、低剂量组JNK、p-JNK和p38MAPK的蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$)；与醋酸泼尼松组比较，EEAP高剂量组JNK、p-JNK和p38MAPK的蛋白表达水平变化均无统计学意义 ($P > 0.05$)；EEAP高、中、低剂量组JNK、p-JNK和p38MAPK的蛋白表达水平随着EEAP剂量增加而降低 ($P < 0.05$)。结果见图4和5。



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

图3 各组大鼠脑组织中IL-6、IL-8、IL-18的水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 3 Comparison of levels of IL-6, IL-8, and IL-18 in brain tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

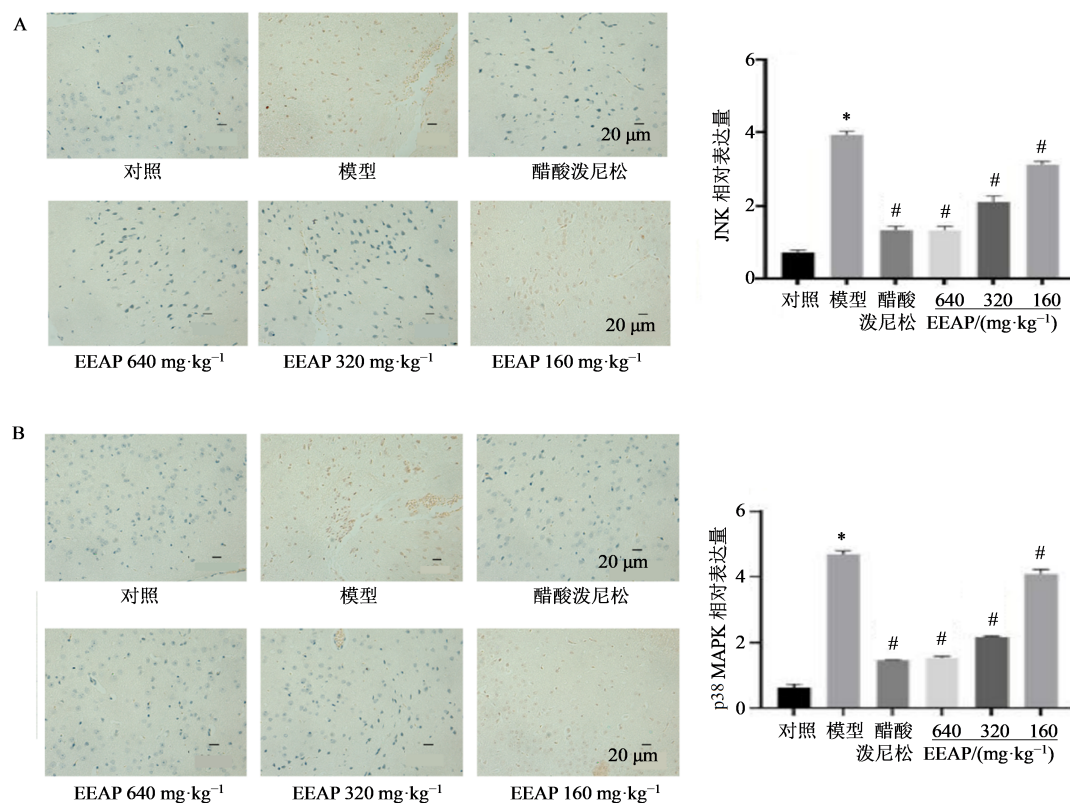
4 讨论

本研究结果初步证实：在CVA大鼠模型中，脑组织的p-JNK、p38MAPK、IL-6、IL-8、IL-18水平明显升高。阳性药物醋酸泼尼松组、EEAP各剂量组的炎症因子和JNK、p-JNK、p38MAPK水平均明显降低。表明EEAP抑制了CVA大鼠脑部炎症反应。

IL-6、IL-8、IL-18均是重要的促炎症细胞因子，在免疫反应和炎症过程中起着关键作用^[14]。哮喘中，这些细胞因子的生成和释放可以导致气道炎症

和病情加重，并引起神经组织的炎症损伤^[15-17]。多种细胞均可产生IL-6，包括肺组织上皮细胞和巨噬细胞^[18]。IL-6参与调节免疫反应、细胞增殖和巨噬细胞激活，其在CVA患者体内大幅度升高，并且与疾病的严重程度和气道炎症显著相关^[19]。本研究发现在CVA大鼠脑组织中IL-6、IL-8、IL-18的表达明显上调，表明IL-6、IL-8、IL-18是CVA大鼠神经炎症发生的关键因子。

随着对CVA研究的深入，应用中药治疗CVA

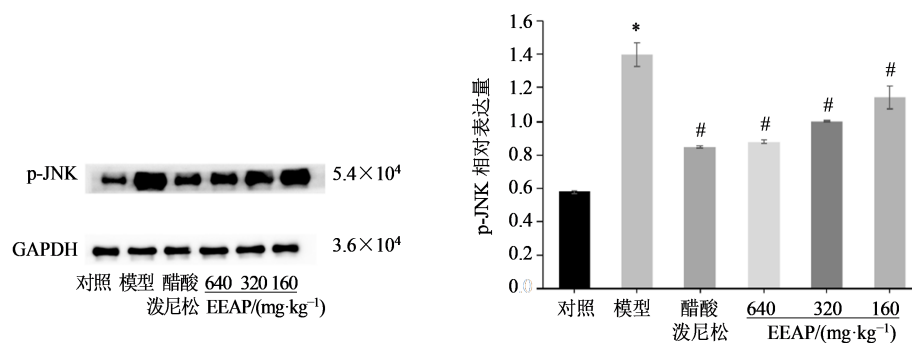


与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

图 4 各组脑组织中 JNK(A) 和 p38 MAPK(B) 的蛋白表达量比较 (免疫组化, $\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 4 Comparison of protein expression levels of JNK (A) and p38MAPK (B) in brain tissues of rats in each group (immunohistochemistry, $\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

图 5 各组脑组织中 p-JNK 蛋白表达量比较 (Western blotting, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Comparison of protein expression levels of p-JNK in brain tissues of rats in each group (Western blotting, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

的研究也越来越多^[20-23]。阿那其根临床可用于治疗癫痫、白化病和肝脏疾病^[24]。前期课题组研究证实了 EEAP 可以通过下调肺上皮细胞中 IL-6、IFN- γ 、TNF- α 的水平抑制 NF- κ B 通路的激活从而对 CVA 起到抗炎作用^[25]。本研究发现不同剂量 EEAP 均可

以抑制 CVA 大鼠脑组织中 IL-6、IL-8、IL-18 的表达,抑制效果呈剂量相关性。体外实验也验证了 EEAP 可以抑制 LPS 诱导的神经元炎症反应。因此,研究初步表明 EEAP 具有明显的抗炎作用,可改善 CVA 大鼠的神经炎症。

JNK/p38MAPK 信号转导途径在哮喘和神经炎症中均可发挥重要功能^[26-27]。已知 JNK/p38MAPK 信号通路对细胞凋亡、炎症介质的释放以及免疫细胞的激活起调控作用^[28],这些均在动物实验中得以证实。哮喘中 JNK 和 p38MAPK 途径的异常活化可能导致气道炎症和肌肉收缩等病理改变^[29]。有研究表明 p-JNK 的增强,能促进小胶质细胞中 TLR4 信号通路的激活,最终促进炎症因子的释放^[30]。本研究结果证实 CVA 大鼠脑组织和体外细胞实验中 p-JNK 的表达明显上调,初步表明 CVA 大鼠通过激活 p-JNK 信号通路产生神经炎症。

研究中发现,CVA 能够诱导大鼠产生脑部炎症,JNK/p38MAPK 或是引起 CVA 炎症反应的信号通路。EEAP 可能抑制了 JNK/p38MAPK 信号通路激活,改善脑部炎症。在 CVA 大鼠脑组织和肺组织中,EEAP 的干预可导致 JNK、p-JNK 和 p38MAPK 的蛋白表达水平明显降低。与此同时,体外实验中 EEAP 能够明显抑制神经元细胞中的 p-JNK 和 p38MAPK 的蛋白表达。

本研究还存在一定的局限性。首先,仅使用了大鼠模型进行研究,还需要更多动物实验及临床试验验证本研究的结果;其次,EEAP 的具体成分和作用机制并不清楚,仅考察了其在 CVA 模型中对炎症因子和信号通路的影响,其他作用机制有待进一步探讨。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Xiong J, Qi W, Yang H, et al. Acupuncture treatment for cough-variant asthma: A Meta-analysis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021: 6694936.
- [2] Duan J, Kang J, Qin W, et al. Exposure to formaldehyde and diisononyl phthalate exacerbate neuroinflammation through NF- κ B activation in a mouse asthma model [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2018, 163: 356-364.
- [3] Kim B G, Park M K, Lee P H, et al. Effects of nanoparticles on neuroinflammation in a mouse model of asthma [J]. Respir Physiol Neurobiol, 2020, 271: 103292.
- [4] Zhuang T T, Pan C, Chen J J, et al. Chronic asthma-induced behavioral and hippocampal neuronal morphological changes are concurrent with BDNF, cofilin1 and Cdc42/RhoA alterations in immature mice [J]. Brain Res Bull, 2018, 143: 194-206.
- [5] Tamayo J M, Osman H C, Schwartz J J, et al. The influence of asthma on neuroinflammation and neurodevelopment: From epidemiology to basic models [J]. Brain Behav Immun, 2024, 116: 218-228.
- [6] Dill-McFarland K A, Altman M C, Esnault S, et al. Molecular pathways underlying lung-brain axis signaling in asthma: Relevance for psychopathology and neuroinflammation [J]. J Allergy Clin Immunol, 2023, 153(1): 111-121.
- [7] Chen Y B, Shergis J L, Wu Z H, et al. Herbal medicine for adult patients with cough variant asthma: A systematic review and Meta-analysis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 5853137.
- [8] 刘勇民. 维吾尔药志. 下册 [M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1999.
- [9] Liu Y M. Uyghur Pharmacopoeia: Volume 2 [M]. Urumqi: Xinjiang Science and Technology Health Publishing House, 1999.
- [9] Javadi B, Sahebkar A, Ahmad Emami S. Medicinal plants for the treatment of asthma: A traditional persian medicine perspective [J]. Current Pharmaceutical Design, 2017, 23(11): 1623-1632.
- [10] 娜迪热·伊卜拉伊木, 刘长江, 金小越. 阿那其根醇提取物对咳嗽变异性哮喘模型大鼠的改善作用研究 [J]. 中国药房, 2019, 30(10): 1371-1374.
- [10] Nadire·Y, Liu C J, Jin X Y. Study on improvement effects of ethanol extract of the root of *Anacyclus pyrethrum* on cough variant asthma model rats [J]. China Pharm, 2019, 30(10): 1371-1374.
- [11] 杨浩, 陈瑶, 娜迪热·伊卜拉伊木, 等. 阿那其根醇提取物对咳嗽变异性哮喘豚鼠脑组织 TNF- α 和 IL-6 水平的影响 [J]. 新疆医学, 2020, 50(4): 334-338.
- [11] Yang H, Chen Y, Nadire·Y, et al. Effect of *Pyrethrum* root alcohol extract on TNF- α and IL-6 levels in brain tissue of guinea pigs with cough variant asthma [J]. Xinjiang Med J, 2020, 50(4): 334-338.
- [12] Ramji G, Arshad P, Sokindra K, et al. Review on potential plant based drugs for memory enhancer [J]. World J Pharm Res, 2014, 3(5): 286-293.
- [13] 陈良, 徐晓琴, 郭文辉, 等. 意大利牛舌草对咳嗽变异性哮喘大鼠 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(5): 698-702.
- [13] Chen L, Xu X Q, Guo W H, et al. Effects of *Anchusa italica* Retz. on cough variant asthma and the level of TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2024, 40(5): 698-702.
- [14] Zareen Z, Strickland T, Eneaney V M, et al. Cytokine dysregulation persists in childhood post neonatal encephalopathy [J]. BMC Neurol, 2020, 20(1): 115.
- [15] Chen L X, Xu C M, Gao F, et al. Associations of IL-18 and IL-9 expressions and gene polymorphisms with asthma [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(12): 2565-2572.

- 6931-6938.
- [16] Ambrus-Aikelin G, Takeda K, Joetham A, et al. JT002, a small molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of autoinflammatory disorders [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 13524.
- [17] 苏敏, 任漪, 黄迪, 等. 多瘤促活化因子3在高氧诱导的II型肺泡上皮细胞损伤中的作用 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2021, 36(21): 1642-1647.
- Su M, Ren Y, Huang D, et al. The role of polyomavirus enhancer activator 3 in hyperoxic-induced alveolar epithelial cells type II injury [J]. Chin J Appl Clin Pediatr, 2021, 36(21): 1642-1647.
- [18] Kheir S, Villeret B, Garcia-Verdugo I, et al. IL-6-elafin genetically modified macrophages as a lung immunotherapeutic strategy against *Pseudomonas aeruginosa* infections [J]. Mol Ther, 2022, 30(1): 355-369.
- [19] Ren Y, Li X, Zhang Y, et al. Xiaoqinglong decoction suppresses childhood cough variant asthma and inhibited the body inflammatory response by regulating IL-6/STAT3 signalling pathway [J]. Ann Med Surg, 2023, 85(11): 5469-5477.
- [20] 章莉, 徐泳, 黄婧怡, 等. 射干麻黄汤化痰治疗小儿咳嗽变异性哮喘的Meta分析 [J]. 中草药, 2021, 52(2): 519-526.
- Zhang L, Xu Y, Huang J Y, et al. Clinical efficacy of modified Shagan Mahuang Decoction for cough variant asthma in children: A Meta-analysis [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2021, 52(2): 519-526.
- [21] Chen Y B, Shergis J L, Wu Z H, et al. Herbal medicine for adult patients with cough variant asthma: A systematic review and Meta-analysis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 5853137.
- [22] Kyou-Hwan H, Haeng C K, Cui S Q, et al. Effectiveness and safety of traditional Chinese herbs in children with cough variant asthma: A systematic review and Meta-analysis [J]. J Tradit Chin Med, 2021, 41(5): 661-668
- [23] 胡思源. 儿童咳嗽变异性哮喘中药临床试验设计与评价技术指南 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(8): 1621-1627.
- Hu S Y. Guideline on design and evaluation of clinical trials for chinese medicine in common pediatric diseases: Cough variant asthma [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(8): 1621-1627.
- [24] Elazzouzi H, Fadili K, Cherrat A, et al. Phytochemistry, biological and pharmacological activities of the *Anacyclus pyrethrum* (L.) lag: A systematic review [J]. Plants, 2022, 11(19): 2578.
- [25] 娜迪热·伊卜拉伊木. 阿那其根醇提取物对咳嗽变异性哮喘体内作用及机制研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2019.
- Nadire-Y. *In vivo* study on the mechanism of the ethanol extract of root of *Anacyclus Pyrethrum* on cough variant asthma [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2019.
- [26] Wu M Y, Yu J E, Bai L, et al. Pingchuan formula (平喘方) improves allergic asthma in mice through inhibiting nuclear factor-kappa B/mitogen-activated protein kinase signaling pathway [J]. J Tradit Chin Med, 2021, 41(6): 883-890.
- [27] Bai D H, Sun Y J, Li Q, et al. Leonurine attenuates OVA-induced asthma via p38 MAPK/NF- κ B signaling pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 114: 109483.
- [28] Yadav R K, Minz E, Mehan S. Understanding abnormal c-JNK/p38MAPK signaling in amyotrophic lateral sclerosis: Potential drug targets and influences on neurological disorders [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2021, 20(5): 417-429.
- [29] Ahmadi A, Ahrari S, Salimian J, et al. p38 MAPK signaling in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis and inhibitor therapeutics [J]. Cell Commun Signal, 2023, 21(1): 314.
- [30] 顾艳兰, 赵思远, 陆秋霞, 等. 小鼠小胶质细胞内 SENP3介导的神经炎症在创伤性脑损伤中的作用机制研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(7): 1161-1168.
- Gu Y L, Zhao S Y, Lu Q X, et al. Microglial SENP3 mediates neuroinflammation after traumatic brain injury in mice [J]. Chin J Pathophysiol, 2022, 38(7): 1161-1168.

[责任编辑 刘东博]