

五味沙棘散对卵清蛋白诱导的过敏性支气管哮喘大鼠的保护作用及机制

赵慧梅¹, 唐志书^{1,3}, 全心雨¹, 宋忠兴¹, 王 梅^{1,2*}, 张 珍^{1*}

1. 陕西中医药大学 陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心, 陕西 咸阳 712046

2. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102

3. 中国中医科学院, 北京 100700

摘要: **目的** 探究五味沙棘散对卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 诱导的过敏性哮喘大鼠的保护作用及机制。**方法** SD 大鼠随机分为对照组、模型组、地塞米松 (0.5 mg/kg) 组和五味沙棘散 (0.5、2.0 g/kg) 组, 建立 OVA 诱导的大鼠早期支气管哮喘模型, 苏木素-伊红(HE)和 Masson 染色观察支气管病理情况及纤维化程度; 免疫组化检测支气管间隙连接蛋白 43(connexin 43, Cx43) 的表达和分布; ELISA 检测血清中免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE) 和白细胞介素-13 (interleukin-13, IL-13) 水平; 亚甲基蓝法和 WSP-1 荧光探针法测定血清中硫化氢 (hydrogen sulfide, H₂S) 水平。建立 CdCl₂ 诱导的支气管上皮 BEAS-2B 细胞损伤模型, MTT 法检测细胞活性; Hoechst 33342 染色法观察细胞核形态变化; MitoSOX 染色检测细胞线粒体活性氧 (mitochondrial reactive oxygen species, mtROS) 水平; Western blotting 检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cysteine-aspartate protease-3, Caspase-3)、核因子红细胞系 2 相关因子 (nuclear factor erythroid 2-related factor, Nrf2) 和 Kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (Kelch like ECH associated protein 1, Keap1) 蛋白表达。**结果** 五味沙棘散能够减少支气管黏膜上皮细胞脱落和黏液分泌 ($P < 0.001$), 降低胶原纤维的沉积和 Cx43 的表达及分布 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 降低血清中 IgE、IL-13 水平 ($P < 0.05$), 升高血清中 H₂S 水平 ($P < 0.05$ 、0.01)。五味沙棘散含药血清呈剂量相关性地抑制 CdCl₂ 诱导的 BEAS-2B 细胞凋亡及 mtROS 水平 ($P < 0.01$ 、0.001), 上调 Caspase-3 和 Nrf2 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、0.01), 下调 Keap1 蛋白表达 ($P < 0.01$)。**结论** 五味沙棘散对 OVA 诱导的哮喘大鼠和 CdCl₂ 诱导的支气管上皮细胞凋亡均具有保护作用, 其机制可能与调控 Nrf2/Keap1 信号通路有关。

关键词: 五味沙棘散; 支气管哮喘; 细胞损伤; 凋亡; Nrf2/Keap1 信号通路; 栀子苷; 甘草苷; 槲皮素; 异鼠李素; 甘草酸铵; 木香烃内酯; 去氢木香烃内酯

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)13-4423-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.13.014

Protective effect and mechanism of Wuwei Shaji Powder against ovalbumin-induced allergic bronchial asthma in rats

ZHAO Huimei¹, TANG Zhishu^{1,3}, QUAN Xinyu¹, SONG Zhongxing¹, WANG Mei^{1,2}, ZHANG Zhen¹

1. Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

2. Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China

3. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect and mechanism of Wuwei Shaji Powder (五味沙棘散, WSP) on ovalbumin (OVA)-induced allergic bronchial asthma in rats. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, model group, dexamethasone (0.5 mg/kg) group and WSP (0.5, 2.0 g/kg) groups, rats were sensitized with OVA to induce an early bronchial asthma model. Hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining were used to observe the pathological changes and degree of fibrosis in the

收稿日期: 2024-02-27

基金项目: 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目”(2060302); 陕西省技术创新引导专项(基金)(2018HJCG-21); 陕西省科技厅一般项目(2021SF-368); 陕西省教育厅协同创新项目(21JY012)

作者简介: 赵慧梅, 硕士研究生, 从事中药抗哮喘作用及机制研究。E-mail: zhaohuimei990701@outlook.com

*通信作者: 王 梅, 硕士生导师, 从事中药药效物质基础及质量控制研究。E-mail: 2285181192@qq.com

张 珍, 讲师, 从事中药药理作用及机制研究。E-mail: zhzh626@outlook.com

bronchi; Immunohistochemistry was performed to detect the expression and distribution of of connexin 43 (Cx43) in bronchi; ELISA was used to measure the levels of immunoglobulin E (IgE) and interleukin-13 (IL-13) in serum; Methylene blue method and WSP-1 fluorescence probe method were used to determine hydrogen sulfide (H₂S) level in serum. The CdCl₂-induced bronchial epithelial cell (BEAS-2B) injury model was established, cell viability was detected by MTT assay; Nuclear morphological changes were observed by Hoechst 33342 staining; Mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) level in cell was detected using MitoSOX staining. The expression levels of cystein-aspartate protease-3 (Caspase-3), nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2) and Kelch like ECH associated protein 1 (Keap1) were analyzed by Western blotting. **Results** WSP could reduce the shedding of bronchial mucosal epithelial cells and mucus secretion ($P < 0.001$), decrease the deposition of collagen fibers and the expression and distribution of Cx43 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), lower the levels of IgE and IL-13 in serum ($P < 0.05$), elevated H₂S level in serum ($P < 0.05, 0.01$). WSP drug-containing serum showed dose-dependent inhibition of CdCl₂-induced BEAS-2B cell apoptosis and mtROS levels ($P < 0.01, 0.001$), up-regulation of Caspase-3 and Nrf2 protein expressions ($P < 0.05, 0.01$), and down-regulation of Keap1 protein expression ($P < 0.01$). **Conclusion** WSP has a protective effect on OVA-induced asthma rats and CdCl₂-induced apoptosis of bronchial epithelial cells, and its mechanism may be related to the regulation of Nrf2/Keap1 signaling pathway.

Key words: Wuwei Shaji Powder; bronchial asthma; cellular damage; apoptosis; Nrf2/Keap1 signaling pathway; garminoside; liquiritin; quercetin; isorhamnetin; ammonium glycyrrhizinate; covanolactone; dehydrocovanolactone

支气管哮喘是以局部炎症和气道高反应性为特征的慢性气道疾病, 临床表现为反复发作的喘息、气急、胸闷或咳嗽等症状, 根据表型的不同分为过敏性和非过敏性哮喘^[1]。据统计, 全世界有 3 亿多人罹患哮喘, 我国 20 岁及以上患者总数达 4 570 万^[2]。目前临床上用于治疗哮喘的药物疗效有限, 且存在较强的不良反应。因此, 寻找可有效缓解支气管哮喘且不良反应小的药物具有重要的意义。

五味沙棘散 (Wuwei Shaji Powder, WSP) 出自《医海法鉴》, 属蒙古族验方, 现收载于《中国药典》2020 年版一部。功能主治为清热祛痰、止咳定喘, 用于肺热久嗽, 喘促痰多, 胸中满闷, 胸胁作痛, 慢性支气管炎见上述证候者。WSP 由沙棘膏、木香、白葡萄干、甘草、栀子 5 味药组成, 主要含有栀子苷、甘草苷、槲皮素、异鼠李素、甘草酸铵、木香烃内酯和去氢木香内酯 7 种成分^[3]。王全巧等^[4]采用 UPLC 法同时测定五味沙棘散中 7 个成分的含量, 研究了各成分质量浓度线性范围, 为 WSP 质量控制提供参考。临床报道, WSP 联合无创正压通气或十六味杜鹃丸治疗慢性阻塞性肺病, 联合川芎嗪注射液治疗肺心病, 均疗效显著^[5-6]。包桂兰等^[7-8]研究表明 WSP 可改善吸烟致小鼠肺部炎症, 可明显减轻小鼠慢性支气管炎病变; WSP 分别应用于小鼠二氧化硫和豚鼠枸橼酸引咳模型、小鼠酚红排泌和大鼠毛细支气管排痰模型、组胺和氯化乙酰胆碱混合液诱导豚鼠哮喘模型, 发现 WSP 能显著减少二氧化硫致小鼠和枸橼酸喷雾致豚鼠的咳嗽次数, 延长咳嗽潜伏期, 能促进小鼠气管酚红的排泌

和增加大鼠支气管的排痰量, 延长组胺和氯化乙酰胆碱混合液引起的豚鼠哮喘的咳嗽潜伏期^[9]。但是, WSP 是否具有抗过敏性哮喘的作用及其作用机制尚不清楚。本研究建立卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 诱导的大鼠支气管哮喘模型, 探究 WSP 对哮喘大鼠支气管的影响及其机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 (180±20) g, 6~8 周龄, 购自西安展梦生物科技有限公司, 动物生产许可证号 SCXK (陕) 2018-001。大鼠饲养于温度 20~26 °C、相对湿度 50%~65%、12 h 光照和黑暗循环的环境中, 适应性喂养 1 周, 自由进食饮水。动物实验经陕西中医药大学伦理委员会的批准 (批准号 SUCMDL20221202002), 实验进程遵守《实验动物管理条例》。

1.2 细胞

人支气管上皮 BEAS-2B 细胞由广州吉妮欧生物科技有限公司提供。

1.3 药材

WSP 由沙棘膏 180 g、木香 150 g、白葡萄干 120 g、甘草 90 g、栀子 60 g 组成。小果沙棘选自青海省海西蒙古族藏族自治州兰县的小果, 其余药材购自陕西兴盛德药业有限责任公司, 以上中药饮片经陕西中医药大学白吉庆教授分别鉴定为胡颓子科植物沙棘 *Hippophae rhamnoides* L. 的干燥成熟果实、菊科植物木香 *Aucklandia lappa* Decne. 的干燥根、葡萄科植物葡萄 *Vitis vinifera* L. 的干燥果实、豆

科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎、茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实。

1.4 药品与试剂

OVA (批号 A5253, 质量分数为 62%~88%)、氢氧化铝[Al(OH)₃, 批号 V900163]、CdCl₂ (批号 655198)、MTT (批号 298931) 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 地塞米松片 (批号 LB2383, 国药准字 H33020822, 0.75 mg/片) 购自浙江仙琚制药有限公司; 大鼠免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE) 测定试剂盒 (批号 ERC117) 购自欣博盛生物科技有限公司; 大鼠白细胞介素-13(interleukin-13, IL-13) 测定试剂盒 (批号 MM-0085R1) 购自江苏酶免实业有限公司; 硫化氢 (hydrogen sulfide, H₂S) 含量检测试剂盒 (批号 20220718) 购自北京索莱宝科技有限公司; WSP-1 荧光探针 (批号 11179) 购自 Cayman 公司; MitoSOX™ (批号 M36009) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 间隙连接蛋白 43 (connexin 43, Cx43) 抗体 (批号 3512s)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, Caspase-3) 抗体 (批号 9662s) 均购自美国 CST 公司; 核因子红细胞系 2 相关因子 (nuclear factor erythroid 2-related factor, Nrf2) 抗体 (批号 137550)、Kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (Kelch like ECH associated protein 1, Keap1) 抗体 (批号 ab227828) 均购自英国 Abcam 公司; β-肌动蛋白 (β-actin) 抗体 (批号 66009-1-1) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; Hoechst 33342 (批号 C1168S)、山羊抗兔二抗 (批号 A0208)、山羊抗鼠二抗 (批号 A0216) 均购自上海碧云天生物技术有限公司; 对照品栀子苷 (批号 G101668, 质量分数 98%)、甘草苷 (批号 L101535, 质量分数 98%)、槲皮素 (批号 Q111273, 质量分数 98.5%)、异鼠李素 (批号 I109591, 质量分数 98%)、甘草酸铵 (批号 G109354, 质量分数 98%)、木香烃内酯 (批号 C115678, 质量分数 98%)、去氢木香内酯 (批号 D303789, 质量分数 98%) 均购自阿拉丁科技股份有限公司; 磷酸、乙腈为色谱纯, 水为超纯水。

1.5 仪器

Waters Acquity UPLC 超高效液相色谱仪、光电二极管阵列检测器 (美国 Waters 公司); KQ-300VDE 型双频数控超声波水浴仪 (昆山市超声仪器有限公司); 311 型细胞培养箱、Thermo Multiskan GO 多

功能酶标仪 (美国 Thermo 公司); SWCJ-2FD 型超净工作台 (江苏苏净集团有限公司); DSZ2000X 型倒置显微镜 (重庆澳浦光电技术有限公司); LD5-2A 型低速离心机 (北京雷博尔离心机有限公司); Chemi Doc XRS+ Western blotting 曝光仪器 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 WSP 粉末的制备及含量测定

2.1.1 WSP 粉末的制备 称取沙棘 300 g, 去除杂质后加 2 L 水煎煮 3 次, 每次 2 h, 合并煎液, 滤过, 浓缩得到 150 g 沙棘膏。沙棘膏和白葡萄干按比例冷冻干燥后打细粉, 随后加入木香、甘草和栀子 (提前粉碎成细粉), 混匀, 过筛 (100 目) 即得。

2.1.2 色谱条件 Waters C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.1% 磷酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱: 0~3 min, 10% 乙腈; 3~7 min, 10%~20% 乙腈; 7~12 min, 20%~30% 乙腈; 12~20 min, 30%~40% 乙腈; 20~35 min, 40%~60% 乙腈; 35~40 min, 60%~95% 乙腈。体积流量 0.2 mL/min; 检测波长 250 nm; 柱温 30 °C; 进样量 3 μL。

2.1.3 混合对照品溶液的制备 精密称取栀子苷、甘草苷、槲皮素、异鼠李素、甘草酸铵、木香烃内酯和去氢木香内酯对照品各适量, 加纯甲醇 40 °C 超声 (250 W、40 kHz) 溶解后, 配制每 1.4 毫升含栀子苷 394.857 μg、甘草苷 212.57 μg、槲皮素 292.857 μg、异鼠李素 290 μg、甘草酸铵 199.143 μg、木香烃内酯 218.29 μg、去氢木香内酯 118.29 μg 的混合对照品储备溶液, 室温避光保存, 备用。

2.1.4 供试品溶液的制备 取 WSP 均匀粉末 6 g, 精密称定, 加入 20 mL 纯甲醇, 40 °C 超声 (250 W、40 kHz) 处理 1 h 后取出, 放冷, 纯甲醇补足缺失质量, 摇匀, 滤过, 稀释 10 倍, 即得, 于室温避光保存。

2.2 哮喘大鼠模型的建立、分组及给药

SD 大鼠适应性饲养 1 周后, 称定体质量, 随机分为对照组、模型组、地塞米松 (0.5 mg/kg) 组和 WSP 低、高剂量 (0.5、2.0 g/kg, 分别相当于临床等效剂量的 1、4 倍) 组, 每组 6 只。第 1、8 天, 模型组和各给药组 ip 10% OVA+10% Al(OH)₃ 混悬液, 1 mL/只; 第 14 天开始连续 2 周滴鼻给予 1% OVA (50 μL/只), 大鼠出现明显的口唇发绀、产生哮喘音、点头呼吸或站立不稳等现象, 表明造模成功。取 4 片地塞米松片研磨成粉末, 加入 12 mL 生

理盐水溶解,即得地塞米松给药溶液;称取 4 g WSP 粉末溶于生理盐水配制成 0.25 g/mL 的 WSP 给药溶液。各给药组在滴鼻给予 1% OVA 前 2 h ig 相应药物,对照组和模型组 ig 生理盐水,1 次/d,连续给药 2 周。

2.3 样本采集

大鼠禁食禁水 16 h 后,ip 1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,腹主动脉取血,2 000 r/min 离心 10 min,保存于-80 °C;取大鼠脾和胸腺,生理盐水冲洗,称定质量并拍照记录;取完整左肺,生理盐水冲洗,4%多聚甲醛固定,保存于 4 °C 冰箱;取完整右肺,以最大面积切块分装,立即冻入液氮,随后-80 °C 冻存。

2.4 肺组织病理学观察

2.4.1 苏木素-伊红(HE)染色 取左肺组织,生理盐水清洗,4%多聚甲醛固定,常规脱水、包埋、切片,进行 HE 染色,观察大鼠支气管病理改变。

2.4.2 Masson 染色 取左肺组织,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋和切片,进行 Masson 染色。观察大鼠支气管胶原沉积情况,并使用 Image J 软件对胶原纤维的蓝色阳性染色进行定量分析。

2.5 血清中 IgE 和 IL-13 水平的测定

从-80 °C 冰箱中取出血清,于 4 °C 冰箱解冻,按照试剂盒说明书,通过预实验确定适宜的检测浓度后(IgE 稀释 10 倍,IL-13 使用原血清),依次检测血清中 IgE、IL-13 的水平。

2.6 血清中 H₂S 水平的测定

2.6.1 亚甲基蓝法 取 300 μL 血清,按照 H₂S 试剂盒说明书进行操作,665 nm 处测定吸光度(*A*)值,计算并分析 H₂S 水平。

2.6.2 WSP-1 荧光探针法 取血清 100 μL 于 96 孔板,加入 150 μmol/L WSP-1 荧光探针,37 °C 反应 30 min,测定荧光强度($E_x/E_m=E_{465}/E_{515}$)。

2.7 免疫组化检测肺组织 Cx43 表达

4%多聚甲醛固定肺组织,石蜡包埋,切片,乙醇脱水,抗原修复。按照 DAB 免疫组化试剂盒进行染色,DAB 显色液显色,阳性表达呈棕黄色或深棕色染色。于显微镜下观察并拍照,应用 Image J 软件对 Cx43 表达进行定量统计分析。

2.8 细胞培养

BEAS-2B 细胞用含 10%胎牛血清、100 μg/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM-F12 培养基,常规培养于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱,每 3 天用

0.25%胰蛋白酶消化并传代铺板。

2.9 WSP 含药血清的制备

12 只雄性 SD 大鼠适应性喂养 7 d,随机分为对照组和 WSP(2 g/kg)组,每组 6 只。WSP 组 ig WSP,对照组 ig 等体积生理盐水,1 次/d,连续 10 d。于末次给药 1 h 后麻醉,腹主动脉取血到促凝管,2 500 r/min 离心 15 min,收集血清,56 °C 水浴 30 min 补体灭活,0.22 μm 微孔滤器滤过除菌,分装于 2 mL 离心管中,-80 °C 冰箱保存备用。

2.10 MTT 测定细胞活性

取处于对数生长期的 BEAS-2B 细胞,以 4×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中,培养 24 h,加入 15%、20%、25%、30% WSP 含药血清处理细胞 24 h,或加入 12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 μmol/L CdCl₂ 处理细胞 48 h,另设置不含药物的对照组。给药结束后,每孔加入 10 μL MTT 溶液,于培养箱中孵育 4 h,弃上清,每孔加入 50 μL DMSO 溶液,将细胞板置于摇床上轻轻摇晃 10 min 充分溶解甲臞结晶,采用酶标仪于 490 nm 处测定 *A* 值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}}$$

设置对照组、模型组和不同体积分数(15%、20%、25%、30%)WSP 含药血清组,对照组加入不含药物的培养基,给药组加入 WSP 含药血清处理 1 h 后,模型组和给药组加入 100 μmol/L CdCl₂ 刺激 48 h,每孔加入 10 μL MTT 溶液,测定细胞存活率。

2.11 Hoechst 33342 染色法观察细胞核形态变化

取处于对数生长期的 BEAS-2B 细胞,以 4×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中,培养 24 h。设置对照组、模型组和不同体积分数(15%、20%、25%、30%)WSP 含药血清组,对照组加入不含药物的培养基,给药组加入 WSP 含药血清处理 1 h 后,模型组和给药组加入 100 μmol/L CdCl₂ 刺激 48 h,每孔加入 Hoechst 33342 染色液 5 μL(10 μg/mL),避光孵育 10 min,荧光显微镜下观察细胞核形态变化并拍照。

2.12 MitoSOX 染色法检测细胞线粒体活性氧(mitochondrial reactive oxygen species, mtROS)水平

按“2.11”项下方法分组和给药,给药结束后,按试剂说明书配制适量工作液,PBS 洗涤 2 次,每孔加入 25 μL MitoSOX 探针工作液(5 μmol/L),37 °C 避光孵育 10 min,采用预热的 Hanks 清洗细胞 2 次,采用酶标仪测定荧光强度($E_x/E_m=E_{510}/E_{580}$),荧光显微镜下观察并拍照。

2.13 Western blotting 检测细胞 Caspase-3、Nrf2、Keap1 蛋白表达

取处于对数生长期的 BEAS-2B 细胞,以 4×10^5 个/mL 接种于 12 孔板中,培养 48 h,按“2.11”项下方法分组和给药,给药结束后,收集细胞,加入含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 强裂解液,提取总蛋白,采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,封闭后加入一抗,4 °C 孵育过夜, PBST 洗膜,加入二抗,室温孵育 1 h,洗膜后 ECL 发光试剂显影,凝胶成像系统拍照。采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.14 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用 *t* 检验。

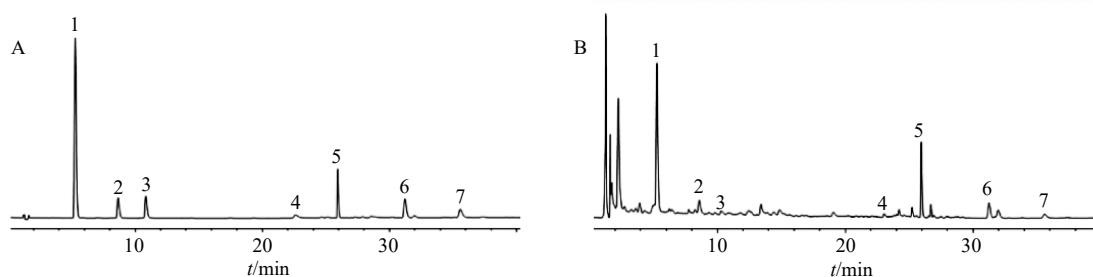
3 结果

3.1 WSP 成分分析和含量测定

采用外标一点法测得 WSP 各成分质量分数由高到低依次为 槲子苷 5219.5 $\mu\text{g/g}$ 、甘草酸铵 318.6 $\mu\text{g/g}$ 、木香烃内酯 162.2 $\mu\text{g/g}$ 、甘草苷 156.5 $\mu\text{g/g}$ 、异鼠李素 120.0 $\mu\text{g/g}$ 、去氢木香烃内酯 93.6 $\mu\text{g/g}$ 、槲皮素 55.2 $\mu\text{g/g}$ (图 1)。

3.2 WSP 减轻哮喘大鼠支气管病理形态改变

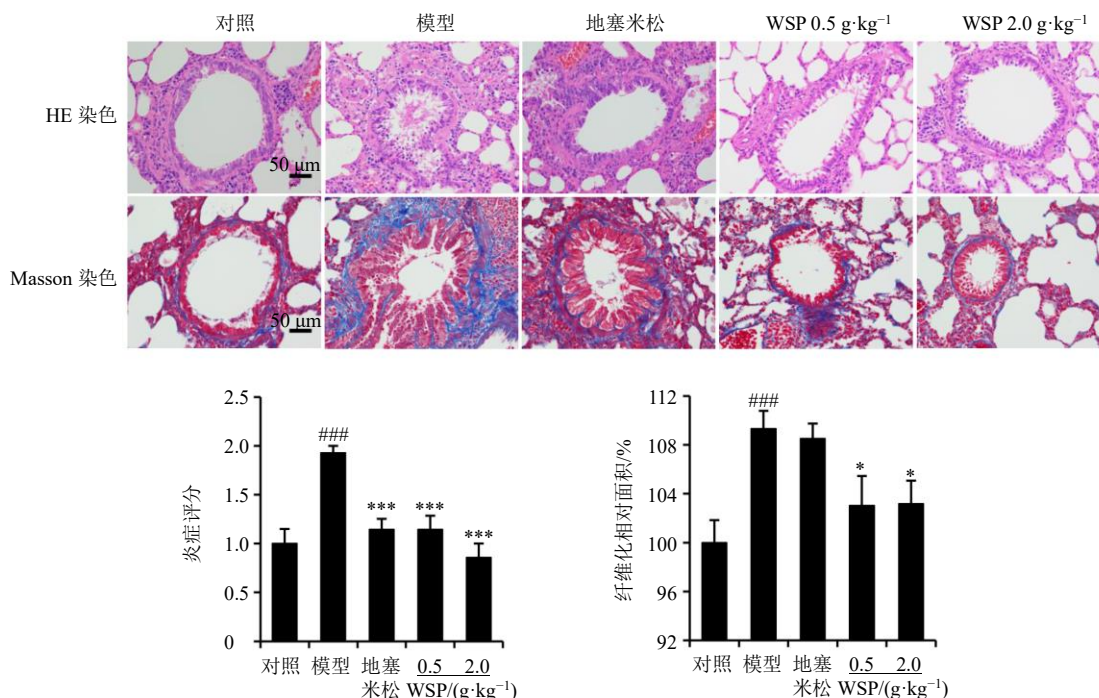
如图 2 所示,与对照组比较,模型组大鼠支气管



1-槲子苷; 2-甘草苷; 3-槲皮素; 4-异鼠李素; 5-甘草酸铵; 6-木香烃内酯; 7-去氢木香烃内酯。
1-garinoside; 2-liquiritin; 3-quercetin; 4-isorhamnetin; 5-ammonium glycyrrhizinate; 6-covanolactone; 7-dehydrocovanolactone.

图 1 混合对照品 (A) 和 WSP 供试品溶液 (B) 的 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of mixed reference substance (A) and WSP test solution (B)



与对照组比较: **P* < 0.05 ###*P* < 0.01 ###*P* < 0.001; 与模型组比较: **P* < 0.05 ***P* < 0.01 ****P* < 0.001, 下图同。
P* < 0.05 ##*P* < 0.01 ###*P* < 0.001 vs control group; **P* < 0.05 *P* < 0.01 ****P* < 0.001 vs model group, same as below figures.

图 2 WSP 对哮喘大鼠肺组织中支气管病理的影响 (×400)

Fig. 2 Effect of WSP on lung pathology of asthmatic rats (× 400)

管黏膜上皮细胞脱落,黏液分泌增多,平滑肌增厚,支气管官腔狭小,细胞水肿严重,支气管周围胶原纤维沉积增多($P<0.001$);WSP 各剂量组支气管炎和胶原纤维沉积较模型组明显减轻($P<0.05$ 、 0.001)。表明 WSP 能够改善哮喘大鼠的支气管病理改变。

3.3 WSP 对哮喘大鼠血清中 IgE、IL-13 和 H₂S 水平的影响

如图 3 所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中 IgE 和 IL-13 水平显著升高($P<0.05$ 、 0.001),H₂S 水平和荧光强度显著下降($P<0.05$ 、 0.01);与模型组比较,各给药组血清 IgE 水平显著下降($P<0.05$ 、 0.01),H₂S 水平明显升高($P<0.05$);地塞米

松组和 WSP 高剂量组血清中 IL-13 水平显著降低($P<0.05$)。表明 WSP 能够降低哮喘大鼠血清中 IgE 和 IL-13 的水平,升高大鼠血清中 H₂S 水平。

3.4 WSP 对哮喘大鼠体质量、脾脏指数和胸腺指数的影响

如图 4 所示,给药期间,模型组大鼠体质量增长缓慢,脾脏和胸腺指数显著增加($P<0.05$ 、 0.01);地塞米松组大鼠体质量在第 3、4 周大幅度减轻($P<0.001$),胸腺和脾脏指数显著下降($P<0.01$),表明地塞米松具有免疫抑制的不良反应;WSP 干预后,大鼠体质量、脾脏和胸腺指数较地塞米松组均显著改善($P<0.05$ 、 0.01),均趋近于对照组。表明 WSP 具有抗哮喘的作用,且没有地塞米松免疫抑制的不

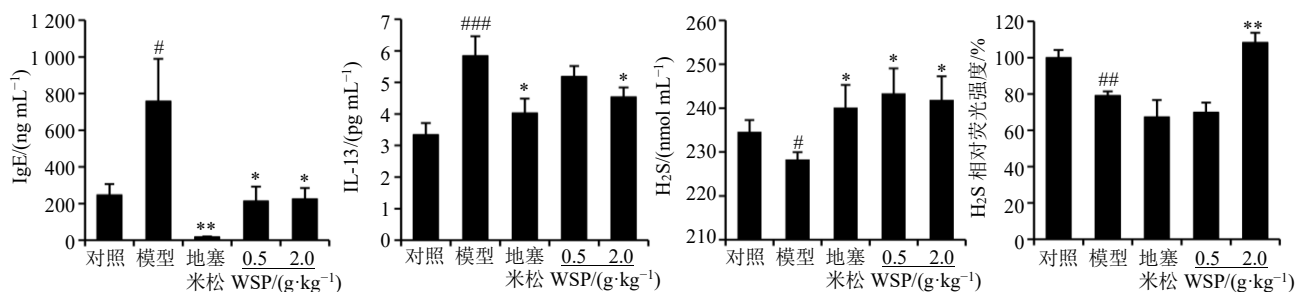
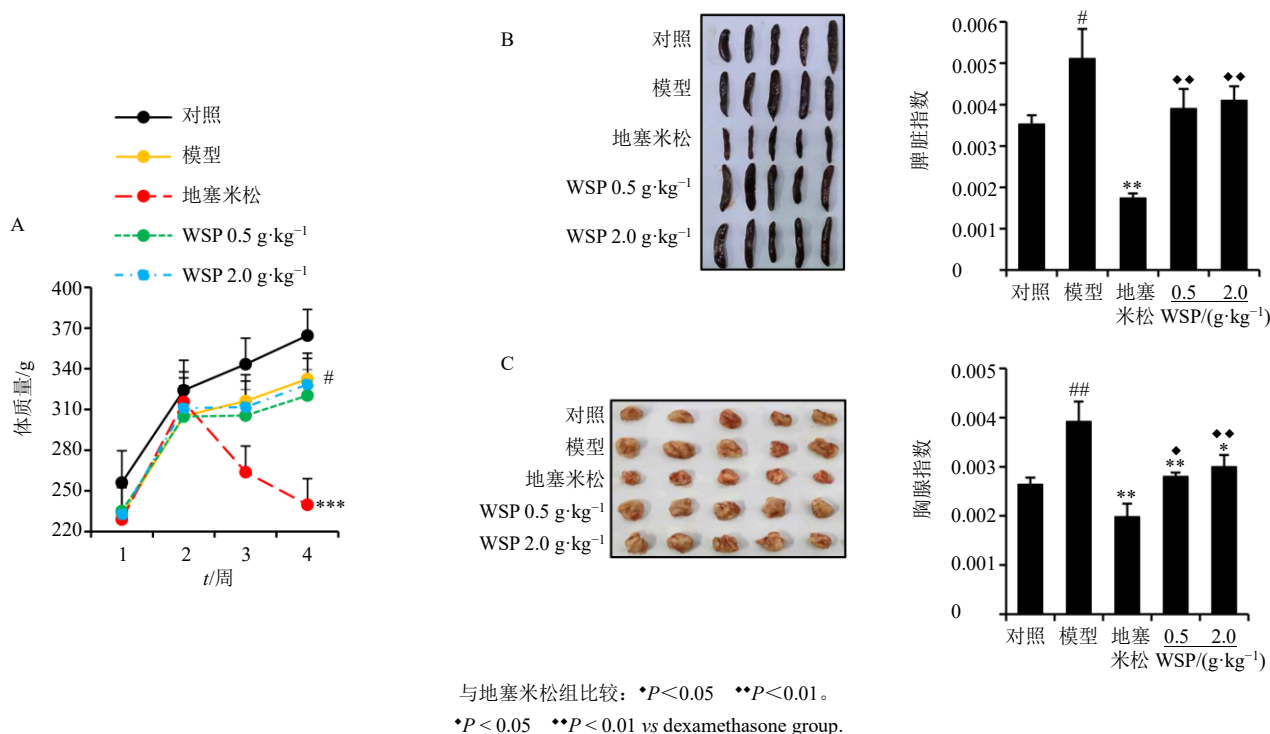


图 3 WSP 对哮喘大鼠血清中 IgE、IL-13 和 H₂S 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 3 Effect of WSP on levels of IgE, IL-13 and H₂S in serum of asthmatic rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)



与地塞米松组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs dexamethasone group.

图 4 WSP 对哮喘大鼠体质量 (A)、脾脏指数 (B) 和胸腺指数 (C) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 4 Effect of WSP on body weight (A), spleen index (B) and thymus index (C) of asthmatic rats ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

良反应。

3.5 WSP 降低哮喘大鼠支气管 Cx43 表达

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠支气管周围 Cx43 表达显著增加 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各给药组 Cx43 表达均明显降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 但仍主要分布于支气管上皮细胞, 表明 WSP

能够降低哮喘大鼠支气管 Cx43 的表达。

3.6 不同体积分数 WSP 含药血清对 BEAS-2B 细胞活性的影响

如图 6 所示, 不同体积分数 (15%、20%、25%、30%) WSP 含药血清刺激 BEAS-2B 细胞 24 h, 均对细胞活性无明显影响。

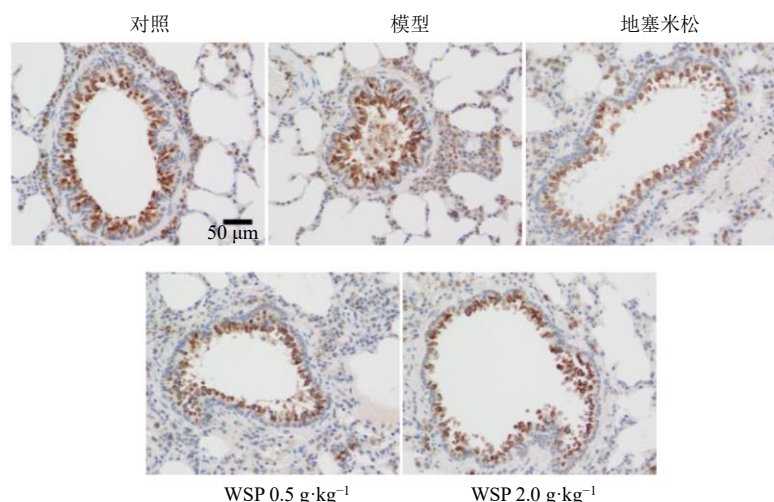


图 5 WSP 对哮喘大鼠支气管中 Cx43 蛋白表达的影响 (免疫组化, $\times 400$)

Fig. 5 Effect of WSP on Cx43 protein expression in bronchus of asthmatic rats (immunohistochemistry, $\times 400$)

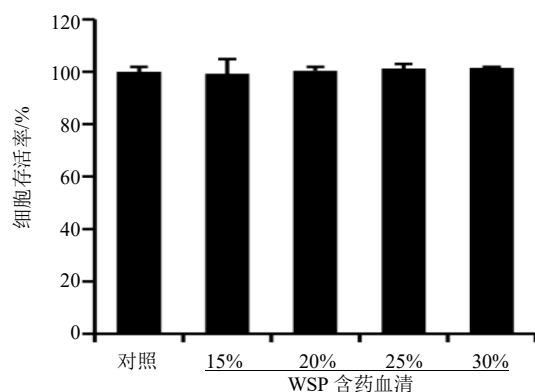
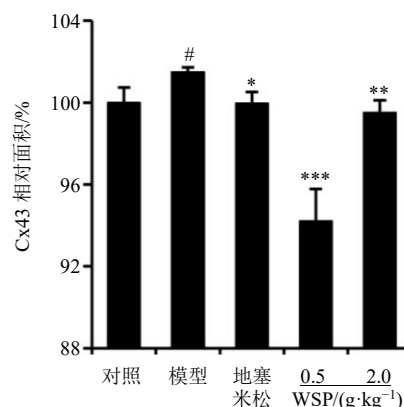


图 6 不同体积分数 WSP 含药血清对 BEAS-2B 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Fig. 6 Effects of different concentrations of WSP drug-containing serum on viability of BEAS-2B cells ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

3.7 不同浓度 CdCl₂ 对 BEAS-2B 细胞活性的影响

如图 7 所示, 25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 刺激 BEAS-2B 细胞 48 h 后, 细胞存活率显著降低 ($P<0.05$ 、 0.001), 呈剂量相关性, 后续选择 100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 建立细胞损伤模型。

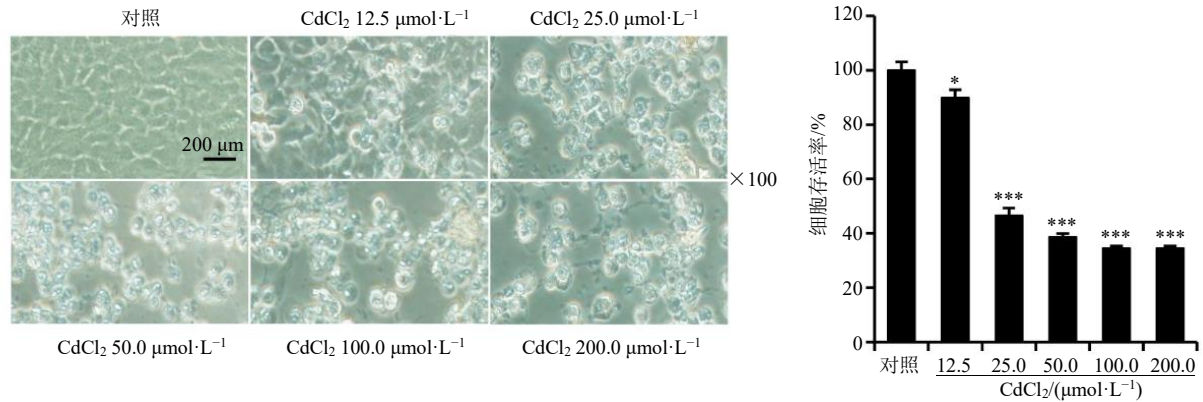
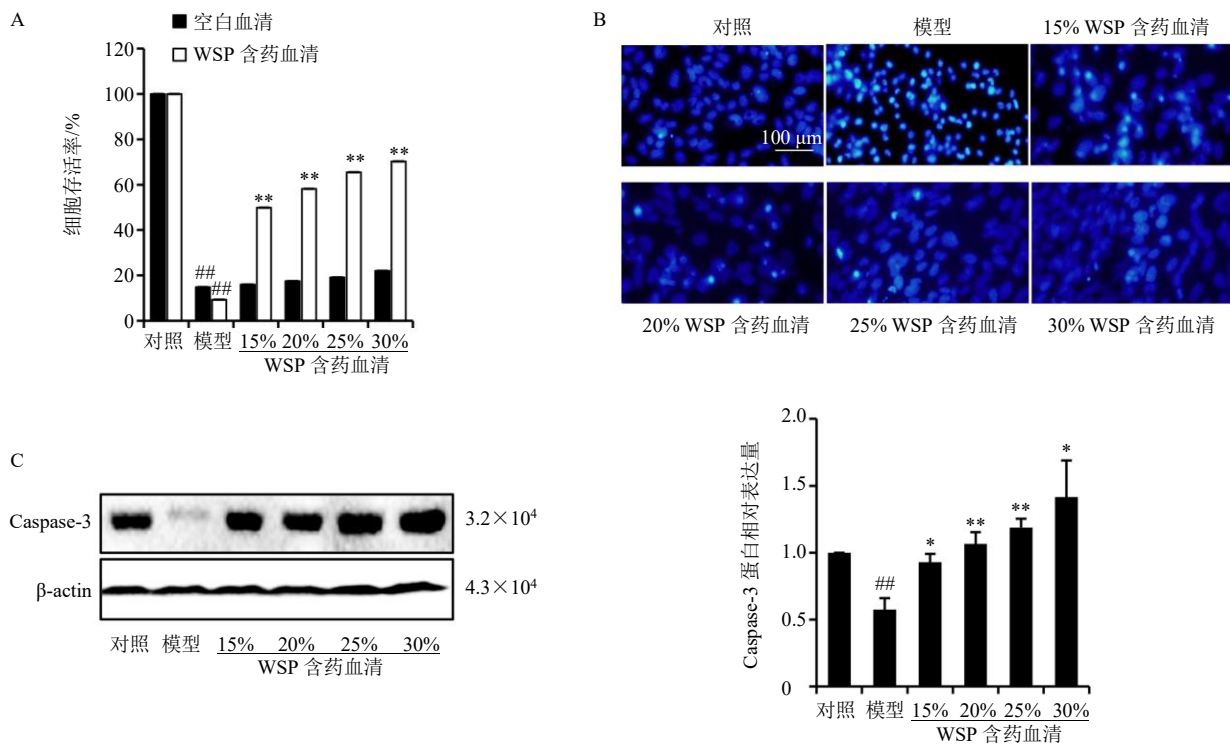
3.8 WSP 含药血清抑制 CdCl₂ 诱导的 BEAS-2B 细胞凋亡

如图 8-A 所示, 与模型组比较, 不同体积分数

WSP 含药血清干预 48 h 后, 细胞存活率显著升高 ($P<0.01$), 且呈剂量相关性。如图 8-B 所示, CdCl₂ 刺激下 BEAS-2B 细胞核形态发生皱缩, 核破碎, 呈月芽状; 加入不同体积分数 WSP 含药血清干预后, 细胞核形态明显改善。如图 8-C 所示, 与模型组比较, WSP 含药血清呈剂量相关性地上调 BEAS-2B 细胞中 Caspase-3 的表达 ($P<0.05$ 、 0.01), 上述结果表明 WSP 含药血清能够抑制 CdCl₂ 诱导的 BEAS-2B 细胞凋亡。

3.9 WSP 含药血清通过调节 Nrf2/Keap1 信号通路降低 mtROS 水平

如图 9-A 所示, 与对照组比较, 模型组细胞 mtROS 荧光强度显著增强 ($P<0.01$); 与模型组比较, 不同体积分数 WSP 含药血清干预后 mtROS 荧光强度明显降低 ($P<0.01$ 、 0.001)。如图 9-B、C 所示, 与对照组比较, 模型组 Nrf2 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$), Keap1 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, WSP 含药血清干预后, Nrf2 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$), Keap1 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$)。表明 WSP 抑制 mtROS 的作用可能与调控 Nrf2/Keap1 氧化还原通路相关。

图 7 不同浓度 CdCl₂ 对 BEAS-2B 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Fig. 7 Effects of different concentrations of CdCl₂ on viability of BEAS-2B cells ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

A-MTT 测定细胞活性; B-Hoechst33342 染色观察细胞凋亡 ($\times 200$); C-Western blotting 检测 Caspase-3 蛋白表达。

A-cell viability detected by MTT; B-cell apoptosis detected by Hoechst33342 staining ($\times 200$); C-Caspase-3 protein expression detected by Western blotting.

图 8 WSP 含药血清抑制 CdCl₂ 诱导的 BEAS-2B 细胞凋亡 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 8 WSP drug-containing serum inhibits CdCl₂-induced apoptosis of BEAS-2B cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

本研究建立大鼠过敏性支气管哮喘和 CdCl₂ 诱导的支气管上皮细胞损伤模型, 体内外研究 WSP 的抗哮喘作用及其机制。结果显示, 模型组大鼠出现喷嚏、躁动不安、搔鼻、口唇和四肢紫绀等现象, 部分大鼠产生哮鸣音; WSP 干预后, 上述现象均有不同程度的改善。HE 染色、Masson 染色和血清中炎症因子检测结果显示, WSP 能够改善大鼠支气管

病理形态, 减少胶原纤维的沉积, 降低血清中 IgE 和 IL-13 水平, 表明 WSP 具有抗哮喘的作用。WSP 能够降低血清 H₂S 水平, 降低 Cx43 的表达和分布, 提示 WSP 的抗哮喘作用可能与 H₂S 和 Cx43 及其相关通路有关。通过建立 CdCl₂ 诱导的支气管上皮细胞损伤模型, 发现 WSP 含药血清能够抑制 CdCl₂ 诱导的细胞死亡, 对 BEAS-2B 细胞有保护作用。Hoechst 33342 染色观察到 WSP 能够抑制细胞核皱

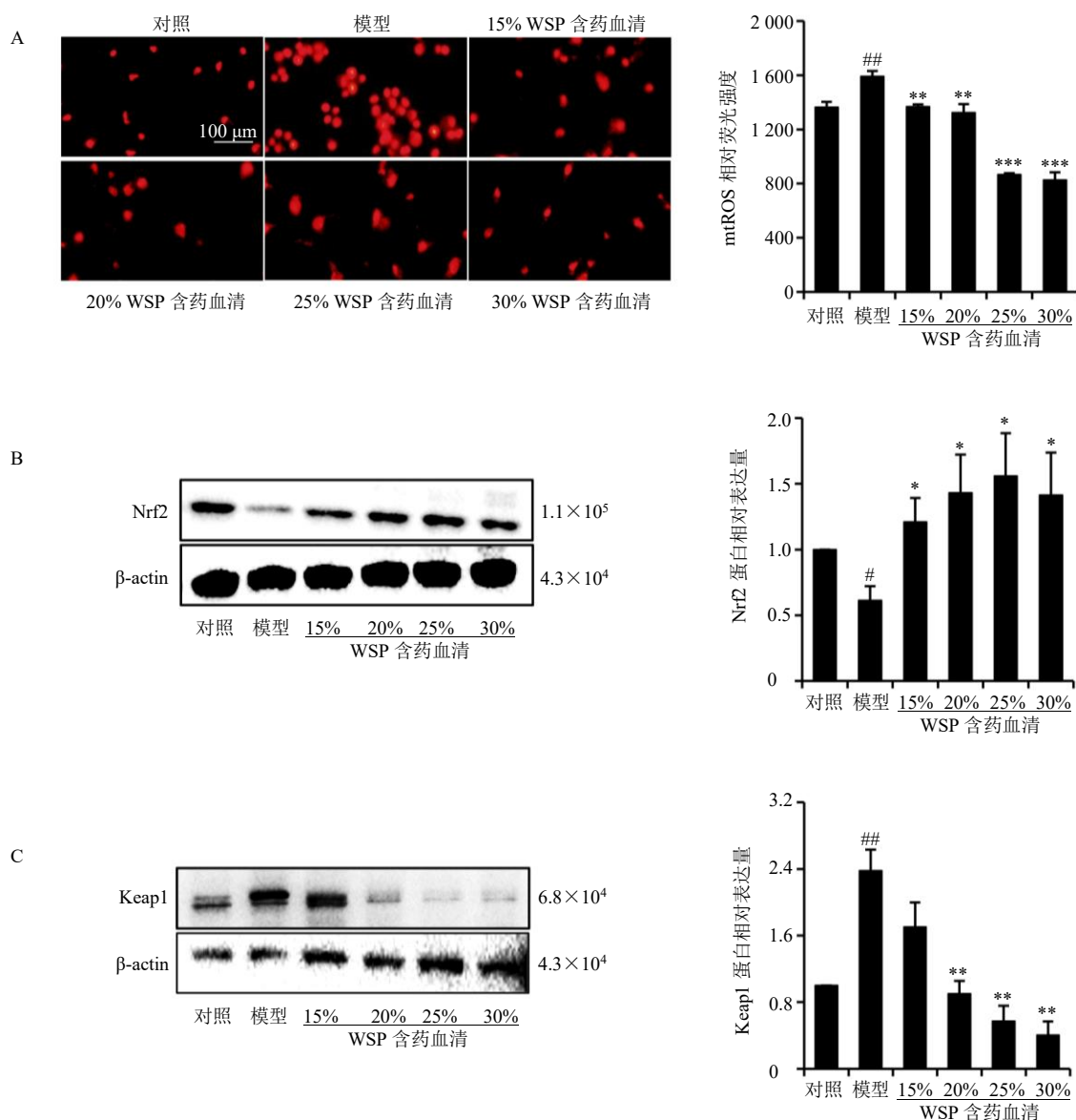


图 9 WSP 含药血清对 BEAS-2B 细胞中 mtROS 水平 (A, $\times 200$) 和 Nrf2/Keap1 信号通路相关蛋白表达 (B、C) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of WSP drug-containing serum on mitochondrial ROS level (A, $\times 200$) and Nrf2/Keap1 pathway related protein expressions (B, C) in BEAS-2B cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

缩和月牙状等现象, 以及 Western blotting 结果显示 WSP 能够上调细胞中 Caspase-3 蛋白的表达, 表明 WSP 含药血清能够抑制 CdCl_2 诱导的细胞凋亡, 进一步研究发现 WSP 含药血清抑制 BEAS-2B 细胞凋亡的作用可能与 Nrf2/Keap1 氧化还原相关通路有关 (图 10)。

糖皮质激素是长期控制哮喘的首选药物, 但具有免疫抑制的不良反应, 可引起体质量、脾脏指数、胸腺指数、T 淋巴细胞增殖、IL-2 水平以及 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ T 细胞比例下降, 继而诱发各种感染性疾病或使潜在的病灶扩散^[10-12]。本研究发现 WSP 具

有抗大鼠支气管哮喘的作用, 尽管阳性药地塞米松在改善支气管上皮细胞脱落、黏液分泌、平滑肌增厚和支气管官腔狭小等方面更强效, 但是 WSP 并没有出现体质量、胸腺和脾脏指数的下降, 不具有地塞米松免疫抑制的不良反应。

过敏性哮喘属 IgE 介导的 I 型变态反应, 血清总 IgE 水平和特异性 IgE 水平的升高, 是早期哮喘的主要特征。IgE 通过高亲和力受体 FcεRI 介导位于支气管平滑肌的肥大细胞脱颗粒, 释放炎性介质, 引起变态反应的症状。因此, 人们常把检测外周血中的 IgE 水平同嗜酸性粒细胞聚集作为诊断和治疗

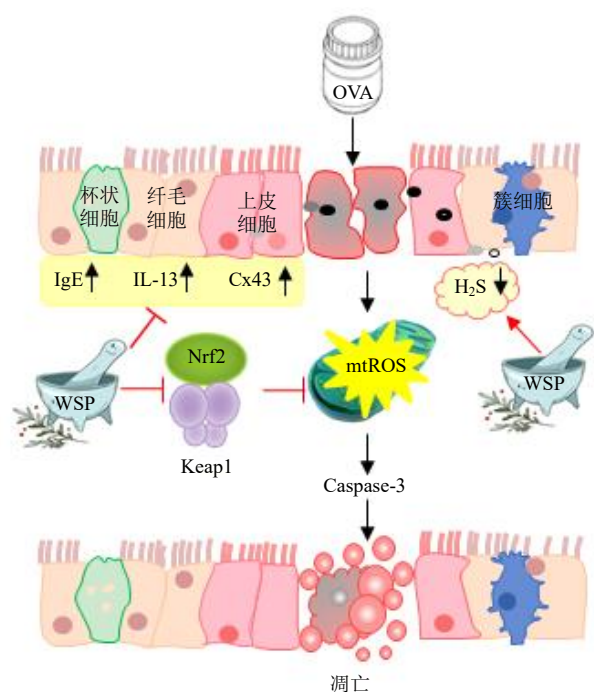


图 10 WSP 对 OVA 诱导的过敏性支气管哮喘大鼠的保护作用及机制

Fig. 10 Protective effect and mechanism of WSP against OVA-induced allergic bronchial asthma in rats

初级阶段哮喘的一个参考指标。IL-13 诱导 B 细胞增殖及合成 IgE 类抗体，在驱动过敏反应中也发挥重要作用^[13-14]。本研究发现 WSP 可显著降低 IgE 和 IL-13 水平，但是 HE 染色中并没有观察到嗜酸性粒细胞的浸润，主要原因是建立的哮喘模型是早期阶段，以 IgE 和 IL-13 为特征，而嗜酸性粒细胞是形成于哮喘的中后期阶段，为研究 WSP 对中后期哮喘的作用，后期研究拟将 10% OVA ip 2 次和持续 1% OVA 滴鼻诱导 14 d 的方法，调整为采用 1% OVA 持续雾化的方式来建立中后期哮喘，在此基础上进一步揭示 WSP 对哮喘作用及机制。

H₂S 在抗炎、抗氧化、降低气道高反应性及抑制气道重塑中均起着重要的作用。哮喘发生时，内源性 H₂S 水平显著下降，升高 H₂S 水平是治疗哮喘的潜在途径^[15]。本研究采用经典的亚甲基蓝法和新的 WSP-1 荧光探针法测定血清中 H₂S 水平，发现 WSP 能够升高大鼠血清 H₂S 水平，经典的亚甲基蓝法虽然没有 WSP-1 荧光探针法灵敏，需要大量的血清样本，但是结果较 WSP-1 荧光探针法稳定且可靠。H₂S 的作用是通过 S-巯基化修饰靶蛋白实现的，而 H₂S 通过 S-巯基化修饰哪些靶蛋白调节其下游信号通路发挥抗哮喘的作用有待进一步研究。

细胞间隙连接或称缝隙连接，是细胞之间重要的通讯通道，广泛分布于肺部及其支气管，在维持肺组织功能中起重要作用^[16]。Cx43 蛋白是主要的间隙连接组成蛋白。研究表明，连接蛋白 Cx43 在哮喘、肺动脉高压、急性肺损伤、肺纤维化或囊性纤维化等肺部炎症疾病中起着重要作用^[17]。研究表明哮喘发生时 Cx43 在小鼠肺中的表达增加，抑制 Cx43 可显著改善哮喘。Yao 等^[18]研究发现，骨髓干充质干细胞在 Cx43 的调节作用下，将其线粒体通过隧道纳米管通道传递到肺泡上皮细胞内，保护哮喘引起的肺泡上皮细胞损伤，提示 Cx43 通过调节细胞之间线粒体的传递从而保护细胞起关键作用。本研究发现 WSP 降低喘大鼠支气管中 Cx43 蛋白的表达水平，但是 WSP 如何调节 Cx43 发挥抗哮喘作用，WSP 对 Cx43 的调节作用是否通过阻断间隙连接通讯介导的细胞损伤信号的传导有关尚不清楚。

支气管上皮细胞是支气管的重要屏障，在启动宿主防御和控制免疫反应中起重要作用^[19]。正常机体内，上皮细胞形成紧密连接屏障，病原体和过敏原被阻止在外，无法进入其他细胞和器官。但是当哮喘发生时，支气管上皮细胞的大量凋亡，导致紧密连接屏障功能受损，病原体更容易进入黏膜下层，与免疫细胞相互作用而释放大量炎症因子，导致哮喘加重^[20]。病理结果分析发现 WSP 治疗后，支气管上皮细胞缺失有所改善，说明 WSP 治疗对支气管上皮细胞具有保护作用。据文献报道，CdCl₂ 可诱导支气管上皮细胞的凋亡^[21]，并且镉离子是环境中常见重金属毒物，可引起哮喘加重^[22]，因此采用 CdCl₂ 建立 BEAS-2B 细胞凋亡模型，研究 WSP 对支气管上皮细胞的保护作用及机制。结果显示，WSP 含药血清干预后，WSP 对 CdCl₂ 诱导的 BEAS-2B 细胞凋亡具有保护作用。进一步探究 WSP 含药血清如何抑制 CdCl₂ 诱导的细胞凋亡，首先分析与凋亡信号通路密切相关的 mtROS^[23]，发现不同体积分数 WSP 含药血清能够抑制 mtROS 的产生。Nrf2 是细胞氧化还原平衡的关键调控因子，在机体的抗氧化应答中起着重要作用，Keap1 是 Nrf2 的抑制因子，Keap1 与 Nrf2 结合，阻止 Nrf2 进入细胞核发挥其抗氧化作用，当 Nrf2 表达升高，Keap1 表达降低，ROS 水平降低，发挥抗氧化作用，反之亦然^[24]。采用 Western blotting 分析 WSP 含药血清抑制 CdCl₂ 诱导的细胞凋亡是否与 Nrf2/Keap1 信号通路有关，结果显示 WSP 能够升高 Nrf2 表达并降低 Keap1 表

达, 提示 WSP 含药血清通过调节 Nrf2/Keap1 通路抑制 mtROS, 进而抑制 CdCl₂ 诱导的细胞凋亡。

综上, WSP 具有抗大鼠过敏性支气管哮喘的作用, 且没有地塞米松免疫抑制作用, 可能用于具有免疫缺陷或免疫低下的哮喘患者以及轻症哮喘患者的辅助治疗。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hammad H, Lambrecht B N. The basic immunology of asthma [J]. *Cell*, 2021, 184(6): 1469-1485.
- [2] Papi A, Brightling C, Pedersen S E, *et al.* Asthma [J]. *Lancet*, 2018, 391(10122): 783-800.
- [3] 于水, 文娟, 美丽, 等. 蒙药五味沙棘散的研究进展 [J]. 中国民族医药杂志, 2022, 28(9): 76-80.
- [4] 王全巧, 孙宝. UPLC 法同时测定五味沙棘散中 7 个成分的含量 [J]. 中国药师, 2020, 23(5): 975-979.
- [5] 段立峰. 藏药五味沙棘散联合无创正压通气治疗慢性阻塞性肺疾病的临床疗效 [J]. 中国民族医药杂志, 2021, 27(7): 39-41.
- [6] 王慧, 樊会英, 孙亚茹. 藏药十六味杜鹃丸联合五味沙棘散治疗慢性阻塞性肺疾病的疗效 [J]. 中国民族医药杂志, 2022, 28(2): 26-27.
- [7] 包桂兰, 王秀枝, 梁凤娟, 等. 蒙药五味沙棘散对吸烟致小鼠肺部炎症的改善作用及机制研究 [J]. 中国药房, 2017, 28(31): 4411-4414.
- [8] 包桂兰, 于丽君, 翟景波, 等. 五味沙棘散对慢性支气管炎模型抗炎和免疫作用的研究 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(5): 172-175.
- [9] 包桂兰, 杜智敏, 赵中华, 等. 五味沙棘散止咳祛痰平喘作用的实验研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(3): 243-244.
- [10] Si S Y, Guo Y C, Xu B X, *et al.* Protective effects of collagen peptides on the dexamethasone-induced immunosuppression in mice [J]. *Int J Pept Res Ther*, 2021, 27(2): 1493-1499.
- [11] Giles A J, Hutchinson M N D, Sonnemann H M, *et al.* Dexamethasone-induced immunosuppression: Mechanisms and implications for immunotherapy [J]. *J Immunother Cancer*, 2018, 6(1): 51.
- [12] Li Y H, Zheng B, Tian H J, *et al.* Yupingfeng Powder relieves the immune suppression induced by dexamethasone in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 200: 117-123.
- [13] McGregor M C, Krings J G, Nair P, *et al.* Role of biologics in asthma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 199(4): 433-445.
- [14] Akar-Ghbiril N, Casale T, Custovic A, *et al.* Allergic endotypes and phenotypes of asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2020, 8(2): 429-440.
- [15] Suzuki Y, Saito J, Munakata M, *et al.* Hydrogen sulfide as a novel biomarker of asthma and chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Allergol Int*, 2021, 70(2): 181-189.
- [16] Totland M Z, Rasmussen N L, Knudsen L M, *et al.* Regulation of gap junction intercellular communication by connexin ubiquitination: Physiological and pathophysiological implications [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(4): 573-591.
- [17] Yao Y, Zeng Q X, Deng X Q, *et al.* Connexin 43 upregulation in mouse lungs during ovalbumin-induced asthma [J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144106.
- [18] Yao Y, Fan X L, Jiang D, *et al.* Connexin 43-mediated mitochondrial transfer of iPSC-MSCs alleviates asthma inflammation [J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 11(5): 1120-1135.
- [19] Park J A, Fredberg J J. Cell jamming in the airway epithelium [J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2016, 13(Suppl 1): S64-S67.
- [20] Calvén J, Ax E, Rådinger M. The airway epithelium-a central player in asthma pathogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 8907.
- [21] Cao X Y, Fu M Y, Bi R C, *et al.* Cadmium induced BEAS-2B cells apoptosis and mitochondria damage via MAPK signaling pathway [J]. *Chemosphere*, 2021, 263: 128346.
- [22] Wang W J, Lu X, Li Z, *et al.* Early-life cadmium exposure elevates susceptibility to allergic asthma in ovalbumin-sensitized and challenged mice [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 255: 114799.
- [23] Yamamoto M, Kensler T W, Motohashi H. The KEAP1-NRF2 system: A thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis [J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(3): 1169-1203.
- [24] Ulasov A V, Rosenkranz A A, Georgiev G P, *et al.* Nrf2/Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation [J]. *Life Sci*, 2022, 291: 120111.

[责任编辑 李亚楠]