苍艾挥发油调节 TRPC1 信号通路对哮喘小鼠内质网应激与气道重塑的影响

王天资[1,2]，郑佳琳[1,2]，黄会惠[1,2]，卢盈竹[1,2]，李卓群[1,2]，司曼真[1,2]，贺喜盈[1,2]，王紫薇[2]，边　际[2]，明　溪[1,2*]

1. 云南中医药大学第一附属医院，云南 昆明　650021
2. 云南中医药大学，云南 昆明　650500

摘　要：目的　探讨苍艾挥发油（Cangai volatile oil，CAVO）干预哮喘小鼠经典瞬时受体电位通道 1（transient receptor potential canonical channel 1，TRPC1）信号通路介导内质网应激对气道重塑的影响。**方法**　将 36 只 Balb/c 小鼠随机分对照组、模型组、地塞米松（1.50 mg/kg）组及 CAVO 高、中、低剂量（3.86、1.93、0.97 mg/kg）组。除对照组外，其余各组小鼠采用卵清蛋白（ovalbumin，OVA）致敏、激活建立小鼠哮喘模型，各给药组分别 ig 相应药物（20 mL/kg），对照组、模型组 ig 等体积生理盐水，1 次/d，连续给药 6 周后，处死小鼠剖取肺组织，Western blotting 检测蛋白激活转录因子 6（activating transcription factor 6，ATF6）、蛋白激酶 RNA 样内质网激酶（protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase，PERK）、C/EBP 同源蛋白（C/EBP homologous protein，CHOP）、I 型胶原蛋白（Collagen type I，Collagen I）、Collagen III 的表达水平。选取 SD 大鼠 20 只制备含药血清，按照体表面积计算给药剂量，2 次/d，连续给药 7 d，于末次给药 1 h 后处死大鼠，取血、处理备用；收集哮喘小鼠肺泡灌洗液并纯化分离肺泡巨噬细胞，随机分为对照组、5% CAVO 含药血清组、5% CAVO 含药血清＋空载组、5% CAVO 含药血清＋TRPC1 过表达组，与人支气管上皮样细胞 16HBE 共培养，收集细胞，采用 Western blotting 检测各组细胞 ATF6、PERK、CHOP、Collagen I、Collagen III、TRPC1 的蛋白表达，采用定量逆转录聚合酶链反应（quantitative reverse transcription polymerase chain reaction，qRT-PCR）比较各组 *Collagen I*、*Collagen III*、*TRPC1* 的表达。**结果**　体内实验发现，与对照组比较，模型组的 ATF6、PERK、CHOP、Collagen I 及 Collagen III 的表达显著上升（$P<0.01$）；与模型组比较，CAVO 高、中、低剂量组 ATF6、PERK、CHOP、Collagen I、Collagen III蛋白表达水平显著下降（$P<0.05$）。体外实验发现，与对照组比较，5% CAVO 含药血清组、5% CAVO 含药血清＋空载组中的 ATF6、PERK、CHOP、Collagen I、Collagen III、TRPC1 的表达水平显著下降（$P<0.01$）；与 5% CAVO 含药血清＋空载组比较，5% CAVO 含药血清+TRPC1 过表达组中的 ATF6、PERK、CHOP、Collagen I、Collagen III、TRPC1 的表达水平显著上升（$P<0.05$）。**结论**　CAVO 对哮喘小鼠气道重塑和气道炎症有改善作用，这可能与调节 TRPC1 信号通路，影响内质网应激反应，改善哮喘气道重塑有关。

关键词：苍艾挥发油；支气管哮喘；内质网应激反应；TRPC1 信号通路；气道重塑；丁香酚；1,8-桉叶素；β-石竹烯；乙酸丁香酚酯

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2025)03 - 0895 - 10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.03.016

Effect of Cangai volatile oil on endoplasmic reticulum stress and airway remodeling in asthmatic mice by regulating TRPC1 signaling pathway

WANG Tianzi[1, 2], ZHENG Jialin[1, 2], HUANG Huihui[1, 2], LU Yingzhu[1, 2], LI Zhuoqun[1, 2], SI Manzhen[1, 2], HE Xiying[1, 2], WANG Ziwei[2], BIAN Ji[2], MING Xi[1, 2]

1. The First Affiliated Hospital of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650021, China
2. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

Abstract: Objective　To investigate the effect of Cangai volatile oil (CAVO) on airway remodelling mediated by endoplasmic

收稿日期：2024-09-30

基金项目：国家自然科学基金资助项目（82060884）；云南省基础研究计划重点项目（202401AS070809）；云南省兴滇英才支持计划-医疗卫生人才专项（XDYC-YLWS-2023-0092）；云南省万人计划青年拔尖人才专项（YNWR-QNBJ-2019-196）；国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目（ZYYZDXK-2023190）；熊磊全国名老中医药专家传承工作室项目

作者简介：王天资，女，硕士研究生，中医儿科学专业。E-mail: 1054047355@qq.com

***通信作者：**明　溪，女，博士研究生，副主任医师，副教授，硕士研究生导师，从事小儿肺系疾病及中医芳香疗法的临床及基础研究。E-mail: 863455756@qq.com

reticulum stress in asthmatic mice by intervening in the classical transient receptor potential canonical channel 1 (TRPC1) signalling pathway. **Methods** A total of 36 Balb/c mice were randomly divided into control group, model group, dexamethasone (1.50 mg/kg) group, and CAVO high-, medium- and low-dose (3.86, 1.93, 0.97 mg/kg) groups. In addition to control group, the rest of the groups of mice were sensitised by ovomucoid protein (OVA) to establish an asthma model. Each group ig corresponding drug (20 mL/kg) respectively, and control group and model group ig an equal amount of saline, once a day, for six weeks. After six weeks of administration, lung tissues were dissected for Western blotting to observe protein activating transcription factor 6 (ATF6), protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), C/EBP homologous protein (CHOP), Collagen type I (Collagen I), Collagen III expression levels. A total of 20 SD rats were selected to prepare drug-containing serum, and the dosage of drug administered to SD rats was calculated according to the body surface area, and the drug was administered by gavage for 7 d, twice a day, and the rats were executed 1 h after the last administration, and the blood was taken and processed for spare parts. The alveolar lavage fluid of asthmatic mice was collected and purified to isolate alveolar macrophages, which were co-cultured with human bronchial epithelial cells 16HBE, and randomly divided into control group, 5% CAVO-containing serum group, 5% CAVO-containing serum + null-loaded group, and 5% CAVO-containing serum + TRPC1-overexpression group. Cells were collected and protein expression of ATF6, PERK, CHOP, Collagen I, Collagen III and TRPC1 were detected by Western blotting, the expression of *Collagen I*, *Collagen III* and *TRPC1* in each group were detected by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** *In vivo* experiments revealed that the expression of ATF6, PERK, CHOP, Collagen I and Collagen III in the model group was significantly increased compared with the control group ($P < 0.01$), compared with the model group, the protein expression levels of ATF6, PERK, CHOP, Collagen I, and Collagen III in the CAVO high-, medium-, and low-dose group were significantly decreased ($P < 0.05$). *In vitro* experiments revealed that the expression levels of ATF6, PERK, CHOP, Collagen I, Collagen III, and TRPC1 were significantly decreased in the 5% CAVO-containing serum group and the 5% CAVO-containing serum + null group compared with the control group ($P < 0.01$), and in the 5% CAVO-containing serum + TRPC1-overexpression group, the expression levels of expression levels of ATF6, PERK, CHOP, Collagen I, Collagen III, and TRPC1 were significantly increased compared with 5% CAVO-containing serum + null-loaded group ($P < 0.05$). **Conclusion** CAVO treatment of asthma may be related to regulating the TRPC1 signaling pathway, affecting the endoplasmic reticulum stress response, and improving asthma airway remodeling.

Key words: Cangai volatile oil; bronchial asthma; endoplasmic reticulum stress response; TRPC1 signaling pathway; airway remodeling; eugenol; 1,8-cineole; β-caryophyllene; eugenol acetate

支气管哮喘（bronchial asthma，BA），是儿科最为常见的慢性炎症性气道疾病之一。据《中国卫生统计年鉴》的调查结果显示，近 10 年来，我国儿童和青少年 BA 的发病率呈现显著增长态势[1]，BA 的致病原因错综复杂，临床表现多样，其发病机制至今尚未被完全揭示。然而，越来越多的研究表明[2]，多种免疫细胞群介导的气道免疫紊乱与 BA 的发生密切相关，由此导致的慢性气道炎症和气道重塑构成了 BA 的核心病理特征，早期预防和治疗气道重塑并有效控制气道炎症，是提高 BA 疾病控制水平及改善预后的关键所在[3]。

哮喘属中医“哮病”范畴，正如《症因脉治·哮病》所述：“哮病之因，痰饮留伏，结成窠臼，潜伏于内……则哮喘之症作矣。”哮喘成因责于宿痰伏肺的学术观点由来已久；由于肺主气、朝百脉、主治节，瘀血致喘也越加受到临床医家的重视；而以活血化瘀药配伍祛痰理气药治哮，可取得较好疗效。从痰瘀之间的关系来看，“痰挟瘀血，遂结巢囊”是“宿根”的病理本质，“痰瘀互结于内”是哮证反复发作，迁延不愈的根本原因，因此“化痰湿”与“祛瘀血”不能分而治之，需痰瘀同治。“痰湿、气滞、瘀血”构成本病的核心病理因素，与现代医学中哮喘的三大基本病理特征“气道炎症、气道高反应性与气道重塑”，形成内在对应关系。

卵清蛋白（optical variable attenuator，OVA）诱导的过敏性 BA 会显著激发肺组织内质网应激（endoplasmic reticulum stress，ERS）。研究表明[4]抑制 ERS 可以有效减缓气道炎症，从而缓解 BA 的发作。激活转录因子 6（activating transcription factor 6，ATF6）和蛋白激酶 R 样内质网激酶（protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase，PERK）是 ERS 的调控过程中的经典标志物，并可诱导下游 C/EBP 同源蛋白（C/EBP homologous protein，CHOP）的生成。伴随着内质网应激的产生，CHOP 在 BA 患者和动物过敏性气道炎症模型中呈现出高表达的状态[5]，这进一步加剧了 BA 的气道重塑及炎症反应，

加重 BA 的病情。

中医芳香疗法是指用气味芳香中药制成适当的剂型，作用于全身或局部以防治疾病的疗法。《神农本草经百种录》[6]记载：“香者气之正，正气盛，则自能除邪辟秽也”，《外科精要》称：“气血闻香则行”，芳香中药及制剂中的挥发油为主要活性成分，具有“芳香开窍、芳香化湿、芳香温通、芳香理气”多重协同作用。芳香化湿，能化哮喘之有形、无形之痰；辛香通络，可以通过抗血小板聚集、抗血栓和改善血管内皮功能障碍作用，对血管起保护作用[7-8]；此外，香药辛香走窜，能通关开窍、促进药物吸收。以上特性均对哮喘“痰湿、瘀血、气滞”的病机状态有综合靶向干预作用，故芳香中药在儿科肺系疾病的防治有广泛运用。团队创制的苍艾挥发油（Cangai volatile oil，CAVO）具有“芳香开窍”的特性，具备芳香化浊、避秽防疫的功效。

CAVO（专利号 ZL201310388088.4）是中医芳香疗法代表性复方挥发油制剂，组方由岐黄学者熊磊教授治疗肺系疾病的临床效用方化裁而来，临床用方中含苍术、艾叶、藿香、丁香、石菖蒲、红景天等药物，其气味清香，具有抗菌谱广、提高免疫力的特征[9]。前期研究表明[10]，CAVO 经鼻及 ig 给药后，可改善肺气虚型大鼠的气道粘膜免疫功能，并可抑制多种细菌的产生[11]，有抑制炎细胞浸润、维持肺泡和支气管的正常结构的作用[12]，能调节机体的免疫，有效缓解 BA 小鼠肺部的瘀血状态，进而优化局部微循环并改善气道重塑[9]。本研究通过体内实验评估 CAVO 的疗效和安全性，体外实验探究 CAVO 治疗 BA 的作用机制，为 CAVO 的临床应用提供实验数据。

1 材料

1.1 动物与细胞株

SPF 级雄性 Balb/c 小鼠 56 只（36 只用于动物实验、20 只用于细胞实验），4～6 周龄，体质量 18～22 g，购自上海伊莱博生物科技有限公司，生产许可证号 SYXK（沪）2021-0006。研究发现，BA 患病率存在明显性别差异，以中国为例，1～9 岁和≥65 岁人群中，男性 BA 疾病负担显著高于女性，且女性 BA 患者性激素变化可能对 BA 症状有不同程度的影响[13-14]。故本研究为排除激素对实验结果的干扰，全部选取雄性 Balb/c 小鼠开展实验。SPF 级 SD 大鼠 20 只，8～10 周龄，体质量 200～220 g，购自上海西普尔必凯实验动物有限公司，生产许可证号 SCXK（沪）2018-0006。所有实验动物于温度 24 ℃、湿度 50%～70%的 SPF 级环境中饲养。本研究已获云南中医药大学第一附属医院伦理委员会批准（伦理号 R-062020G058）。

哮喘肺泡巨噬细胞由 BA 小鼠肺泡灌洗液中分离得到；人支气管上皮样细胞 16HBE 购自普诺赛生物科技有限公司。

1.2 药品与试剂

通过本课题组前期方法[15]提取 CAVO，质控标准[16]，CAVO 中丁香酚、1,8-桉叶素、β-石竹烯、3,3′-二氨基-4,4′-联苯二醇、乙酸丁香酚酯的质量分数分别为 67.32%、5.99%、5.76%、5.05%、4.99%。

醋酸地塞米松片（批号 061002，国药准字号 H37021898，规格 0.75 mg/片）购自上海通用药业股份有限公司；OVA（批号 A5503-5G）购自美国 Sigma 公司；无水硫酸钠（批号 10040-45-6）购自湖北成丰化工有限公司；聚山梨酯-80（批号 P-1754）购自美国 Sigma-Aldrich 公司；石蜡（批号 69018961）、中性甲醛（批号 10010018）、二甲苯（批号 10023418）、无水乙醇（批号 10092680）、氨水（批号 10002118）、异丙醇（批号 40064360）、三氯甲烷（批号 10006818）均购自上海国药集团；苏木素（批号 714094）、PBS 缓冲液（批号 P1020）购自北京雷根生物技术有限公司；伊红（批号 BA4099）、中性树脂（批号 G8590）均购自北京索莱宝科技有限公司；BCA 蛋白定量试剂盒（批号 A65453）、Trizol 总 RNA 抽提试剂（批号 15596018CN）均购自美国 ThermoFisher Scientific 公司；丙烯酰胺（批号 ST003）购自上海碧云天公司；ECL 发光液（批号 WBKLS0100）购自德国默克公司；蛋白预染 Marker（批号 20351ES90）购自翌圣生物科技（上海）股份有限公司；HRP 标记的山羊抗鼠二抗（批号 ZB-2305）购自北京中杉金桥生物技术有限公司；甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH，批号 60004-1-Ig）、III 型胶原蛋白（Collagen type III，Collagen III，批号 22734-1-AP）抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司；ATF6（批号 ab122897）、PERK（批号 ab79483）、CHOP（批号 ab11419）Collagen I（批号 ab6308）均购自艾博抗（上海）贸易有限公司。

1.3 仪器

ECLIPSE Ni 型正置显微镜、DS-Ri2 型显微图象分析系统（日本 NIKON 公司）；DHG-9023A 型恒温烘箱（上海恒一科学仪器有限公司）；SQ2125

型石蜡切片机、PPTHK-21B 型摊片机（湖北徕克医疗仪器有限公司）；5417R 型台式高速冷冻离心机（德国 EPPENDORF 公司）；E1515 型掌上离心机（碧云天生物技术有限公司）；SYNERGYH1 型酶标检测仪（美国 BioTek 公司）；CG-05 型荧光定量 PCR 仪（杭州晶格科学仪器有限公司）；OneDrop 型超微量分光光度计（五义科技股份有限公司）。

2 方法

2.1 溶液的制备

通过本课题组前期方法[15]提取 CAVO，经 0.5% 聚山梨酯-80 溶液配制使用；用纯水将醋酸地塞米松片配制成 75 μg/mL 的地塞米松溶液。

2.2 动物实验

2.2.1 动物分组、造模与给药 36 只小鼠随机分对照组、模型组、地塞米松（1.50 mg/kg）组及 CAVO 高、中、低剂量（3.86、1.93、0.97 mg/kg）组，每组 6 只。参照文献方法[9, 17]构建 BA 小鼠模型，Balb/c 小鼠在适应喂养 3 d 后，分别于造模第 0、7、14 天 ip 1 mL 10%致敏液（100 mL 无菌生理盐水溶解 10 g OVA 和 1 g 氢氧化铝），从造模的第 15 天起，通过雾化吸入方式给予 5% OVA，1 次/d，每次 30 min，连续 14 d；从第 29 天起，每 2 天雾化激发 1 次，每次 30 min，连续 4 周。对照组 ip、雾化吸入等量蒸馏水。剖取左侧肺组织（含支气管部分），用 4% 多聚甲醛固定，乙醇脱水，石蜡包埋。模型组与对照组进行比较，根据小鼠行为表现及肺部病理切片变化情况对造模结果进行判断，肺部病理组织切片进行苏木素-伊红（hematoxylin-eosin，HE）、Masson 染色。于末次致敏雾化吸入后开始给药，各给药组 ig 相应药物，对照组和模型组 ig 等量蒸馏水，给药时间以中医 BA 临床治疗策略[18]及实际为依据，连续给药 6 周。

2.2.2 HE 染色 取对照组与模型组小鼠肺组织样本，用 10%甲醛水溶液进行固定后流水冲洗，梯度乙醇脱水。组织块置入乙醇与二甲苯的混合液中浸泡 2 h，再转入二甲苯中浸泡 2 次，2 h/次。经熔化石蜡混合液及纯石蜡液浸渍后在石蜡中包埋、冷却、切片，用恒温烤片 30 min 及二甲苯 I、II 中各浸泡 15 min，切片脱蜡并在苏木素溶液中染色 5 min，氨水分色处理，水洗及脱水后将切片进行伊红染色，使用中性树胶封片。显微镜对染色后切片进行拍照，以采集并分析样本相关部位的图像信息。

2.2.3 Masson 染色 10%甲醛水固定对照组与模型组小鼠肺组织样本，进行脱水包埋、切片、脱蜡至水处理，切片浸染后，流水冲洗切片 10 min，天青石蓝染色液滴染切片 2 min，Mayer 苏木素染色液滴染切片 2 min，酸性乙醇分化液对切片分化处理，流水冲洗切片 10 min。以丽春红品红染色液滴染切片 10 min，磷钼酸溶液处理切片 10 min，滴加苯胺蓝染色液染至切片 5 min，滴加弱酸工作液覆盖切片 2 min，经过 95%乙醇、无水乙醇脱水后，用二甲苯透明切片，最后用中性树胶封固切片，显微镜拍照后采集分析样本相关部位观察蓝、红、蓝褐色分布区域进行描述。

2.2.4 Western blotting 检测各组肺组织中 ATF6、PERK、CHOP、Collagen I、Collagen III 的蛋白表达 各组分别取 10 mg 肺组织加入适量含蛋白酶、磷酸酶抑制剂裂解液，匀浆，4 ℃、12 000 r/min，离心 15 min，吸取上清液，采用 BCA 法检测各组蛋白浓度，统一蛋白浓度，加入蛋白上样缓冲液，100 ℃金属浴变性 5 min。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h，一抗 4 ℃孵育过夜，TBST 清洗后，二抗室温孵育 2 h，TBST 清洗后，加入 ECL 发光液进行显影，使用 Image-J 软件分析灰度值，以 GAPDH 为内参，计算 ATF6、PERK、CHOP、Collagen I、Collagen III 的蛋白表达水平。

2.2.5 显微镜下观察 CAVO 对肺泡巨噬细胞的影响 收集各组小鼠肺泡灌洗液，1 000 r /min，离心 5 min，弃上清，所得细胞沉淀用 RPMI-1640 培养液重悬，培养体系于 37 ℃培养 3 h 后，洗去未贴壁细胞，余下的贴壁细胞即为小鼠肺泡巨噬细胞。与显微镜下观察 CAVO 对肺泡巨噬细胞的影响并拍照。

2.3 细胞实验

2.3.1 细胞分组与给药 随机选取 20 只小鼠按“2.2.1”项下方法构建 BA 模型，收集肺泡灌洗液，1 000 r /min，离心 5 min，弃上清，所得细胞沉淀用 RPMI-1640 培养液重悬，培养体系于 37 ℃培养 3 h 后，洗去未贴壁细胞，余下的贴壁细胞即为小鼠肺泡巨噬细胞。参考文献方法[16]，制备 CAVO 大鼠含药血清。按照体表面积计算 SD 大鼠给药剂量，2 次/d，连续 7 d，于末次给药 1 h 后处死大鼠，取血、处理备用，依据预实验结果，采用 5%的含药血清。PCR 扩增获得经典瞬时受体电位通道 1（transient receptor potential canonical channel 1，TRPC1）全长序列和体外合成 shRNA 序列，插入腺

病毒载体 AAV6，构建 TRPC1 腺病毒表达载体，包被腺病毒颗粒；将病毒感染巨噬细胞，获得 TRPC1 过表达颗粒。将 BA 肺泡巨噬细胞随机分为对照组、5% CAVO 含药血清组、5% CAVO 含药血清＋空载组、5% CAVO 含药血清＋TRPC1 过表达组，各组细胞分别与 16HBE 细胞共培养 24 h。

2.3.2 Western blotting 检测 ATF6、PERK、CHOP、Collagen I、Collagen III 的蛋白表达　收集各组 BA 肺泡巨噬细胞，加入适量蛋白酶、磷酸酶抑制剂裂解液冰上裂解 30 min，其余操作步骤同“2.2.4”项下方法。

2.3.3 qRT-PCR 法检测 *Collagen I*、*Collagen III*、*TRPC1* mRNA 相对表达水平　使用 Trizol 试剂提取各组细胞的总 RNA，按照总 RNA 快速提取试剂盒说明书提取总 RNA，逆转录合成 cDNA，采用 RT-qPCR 扩增各目的基因，以 GAPDH 为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组细胞 *Collagen I*、*Collagen III*、*TRPC1* 的 mRNA 表达水平，引物序列见表 1。

表 1　引物序列

Table 1　Primer sequences

基因名称	引物序列 (5’-3’)
GAPDH	F:CTGCCCAGAACATCATCC R:CTCAGATGCCTGCTTCAC
Collagen I	F:TTCTCCTGGCAAAGACGGAC R:CTCAAGGTCACGGTCACGAA
Collagen III	F:ATGCCCACAGCCTTCTACAC R:CGGATAGCCACCCATTCCTC
TRPC1	F:TTGGACTACGGTTGTCAGAAACT R:AAGACGAAACCTGGAATGTCTGAGG

2.4　统计学分析

数据分析采用 GraphPad 9.0 软件进行科研绘图，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采取单因素 ANOVA 方法，两两样本组间比较根据方差齐性检验结果进行 LSD-*t* 或 Tamhane 检验。

3　结果

3.1　BA 小鼠模型造模成功的判断

如图 1 所示，对照组小鼠肺组织结构清晰，肺泡形态饱满且均匀一致，细支气管结构规整，气道壁边缘平滑，气管黏膜上皮层保持完整，平滑肌细胞排列有序；胶原纤维结构正常，无显著增厚迹象，管腔内部洁净，未见粘液积聚或炎性细胞浸润现象。模型组小鼠肺内细支气管形状扭曲，内壁不平整，伴有局部膨大和皱褶增多；气管壁显著增厚，平滑肌细胞排列杂乱无章。肺泡大小不一，局部可见小面积橘红色密集小血管及大量炎性细胞浸润和粘液分泌，伴淡粉色胶原纤维和亮粉色弹力胶原的增厚与聚集。对照组小鼠在行为学上表现为正常的生理状态，包括良好的运动能力和正常的呼吸节律，无明显的呼吸困难或咳嗽症状；模型组小鼠的行为学表现为活动能力下降且呼吸困难加剧，偶有咳嗽和喘息，甚至出现呼吸急促和喘息。

3.2　CAVO 对 BA 小鼠肺组织中相关蛋白表达的影响

如图 2 所示，与对照组比较，模型组中 ATF6、PERK、CHOP、Collagen I、Collagen III蛋白表达水平显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，CAVO 高、中、低剂量组中 ATF6、PERK、CHOP、Collagen I、Collagen III蛋白表达水平显著下降（$P<0.05$），具有剂量相关性。

3.3　CAVO 对肺泡巨噬细胞影响

如图 3 所示，对照组细胞形态为圆形或卵圆形，边界清晰，胞质丰富，胞质内含大量吞噬物质。模型组细胞形态不规则，可见明显的异型性变化，细胞核双核或多核，伪足明显。与模型组比较，CAVO 高、

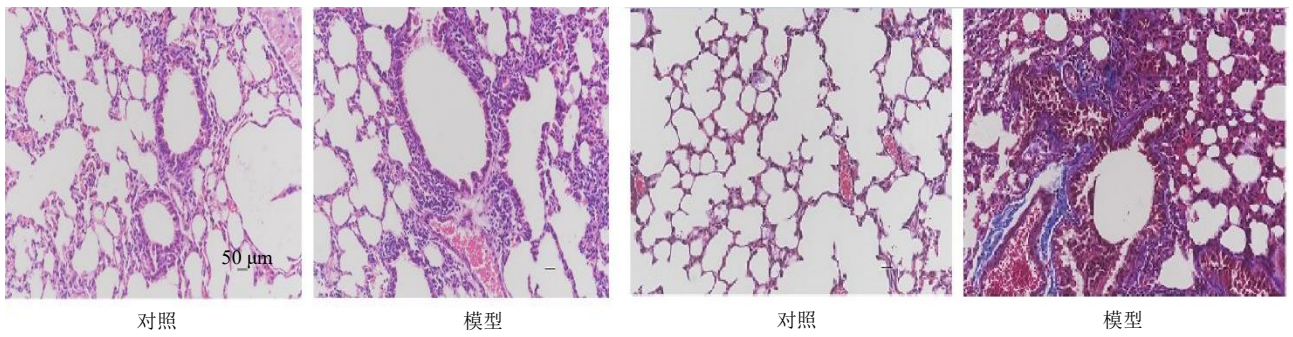
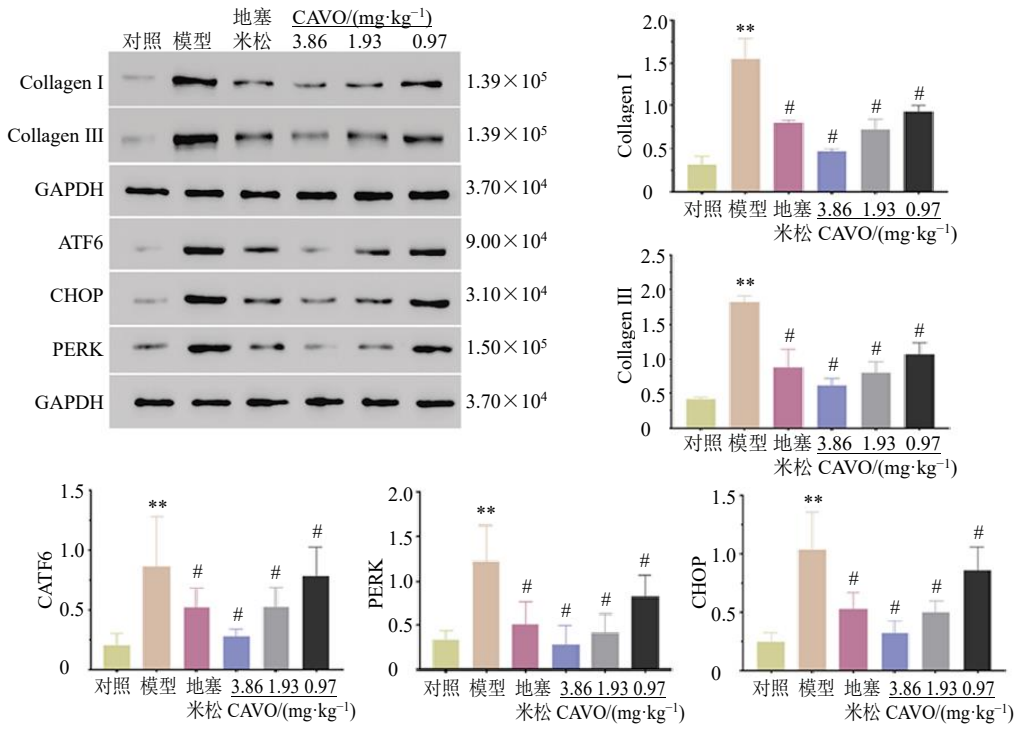


图 1　HE 染色 (A) 和 Masson 染色 (B) 对比图 (×200)

Fig. 1　HE staining (A) and Masson staining (B) contrast diagram (× 200)



与对照组比较：$^{**}P<0.01$；与模型组比较：$^{\#}P<0.05$。

$^{**}P < 0.01$ *vs* control group; $^{\#}P < 0.05$ *vs* model group.

图 2　CAVO 对 BA 小鼠肺组织中相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 2　Effect of CAVO on expression of related proteins in lung tissue of BA mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

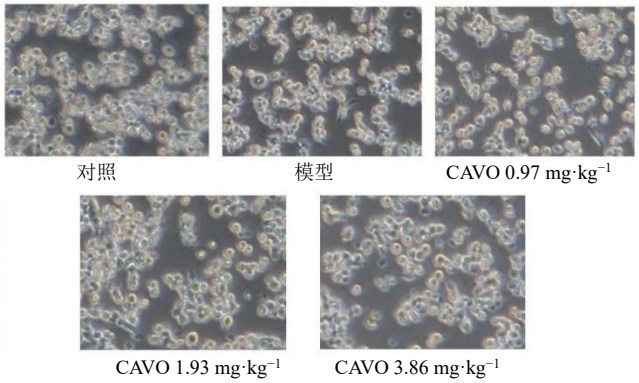


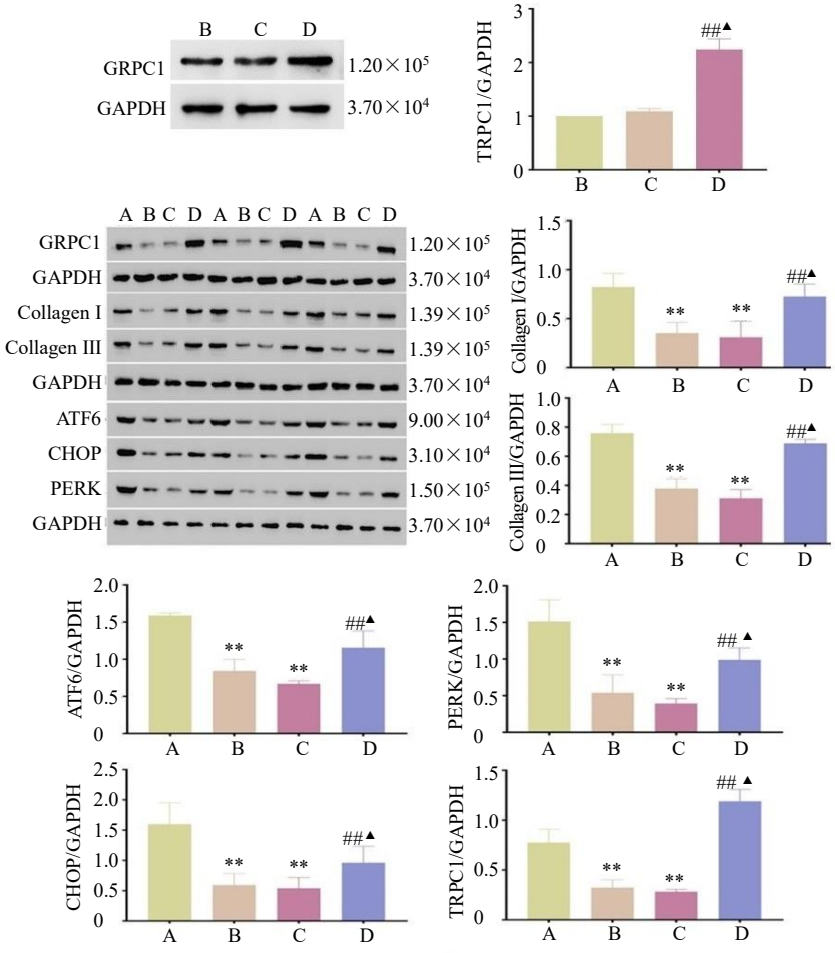
图 3　CAVO 对肺泡巨噬细胞形态的影响

Fig. 3　Effect of CAVO on morphology of alveolar macrophages

中、低剂量组细胞形状为圆形或卵圆形，伪足减少，细胞核多为单核，且随着 CAVO 剂量的增加，细胞伪足数量减少，形态更加规则，说明 CAVO 可减轻肺泡巨噬细胞异型性变化，具有剂量相关性。

3.4　CAVO 对肺泡巨噬细胞中相关蛋白表达的影响

如图 4 所示，与 5%CAVO 含药血清＋空载组比较，TRPC1 过表达组细胞 TRPC1 蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$），表明 TRPC1 过表达成功。与对照组比较，5% CAVO 含药血清组、5%CAVO 含药血清＋空载组细胞 ATF6、PERK、CHOP、Collagen I、Collagen III蛋白表达水平均显著降低（$P<0.01$）；与 5% CAVO 含药血清＋空载组比较，5% CAVO 含药血清＋TRPC1 过表达组细胞 ATF6、PERK、CHOP、Collagen I、Collagen III蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$），以上结果表明，CAVO 对肺泡巨噬细胞中相关蛋



A-对照组；B-5% CAVO 含药血清组；C-5%CAVO 含药血清＋空载组；D-5% CAVO 含药血清＋TRPC1 过表达组；与对照组比较：$^{**}P<0.01$；与 5% CAVO 含药血清组比较：$^{\#\#}P<0.01$；与 5% CAVO 含药血清组＋空载组比较：$^{▲}P<0.05$，下图同。

A-control group; B-5% CAVO-containing serum group; C-5% CAVO-containing serum + null-loaded group; D-5% CAVO-containing serum + TRPC1-overexpression group; $^{**}P<0.01$ *vs* control group; $^{\#\#}P<0.01$ *vs* 5% CAVO-containing serum group; $^{▲}P<0.05$ *vs* 5% CAVO-containing serum + null-loaded group, same as below figures.

图 4　CAVO 对肺泡巨噬细胞中相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 4　Effect of CAVO on expression of related proteins in alveolar macrophages ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

白表达的影响可能与 TRPC1 信号通路相关。

3.5　CAVO 对肺泡巨噬细胞中相关基因表达的影响

如图 5 所示，与 5%CAVO 含药血清＋空载组比较，TRPC1 过表达组细胞 *TRPC1* 基因表达水平显著升高（$P<0.05$），表明 *TRPC1* 过表达成功。与对照组比较，5% CAVO 含药血清组、5%CAVO 含药血清＋空载组细胞中 *Collagen I*、*Collagen III*基因表达水平显著降低（$P<0.01$）；与 5% CAVO 含药血清＋空载组比较，5% CAVO 含药血清＋TRPC1 过表达组细胞 *Collagen I*、*Collagen III*基因表达水平显著升高（$P<0.05$），以上结果表明，CAVO 对肺泡巨噬细胞中相关基因表达的影响可能与 TRPC1 信号通路相关。

4　讨论

肺泡巨噬细胞分布广泛，约占免疫细胞总数 90%以上[19]。作为免疫系统的“前哨”，巨噬细胞在抗原呈递、炎症因子释放和招募中发挥了核心作用，同时在清理坏死细胞、组织碎片、结束炎症进程及修复组织方面也至关重要[20-22]。巨噬细胞快速处理凋亡细胞，能有效防止胞内抗原外泄引发的炎症反应或自身免疫风暴，从而维持内环境稳态，这一机制是维持组织健康的关键[23-26]。本研究结果表明，模型组肺泡巨噬细胞见双核或多核，伪足明显，表明在炎症刺激下，巨噬细胞向促炎 M1 型转化，

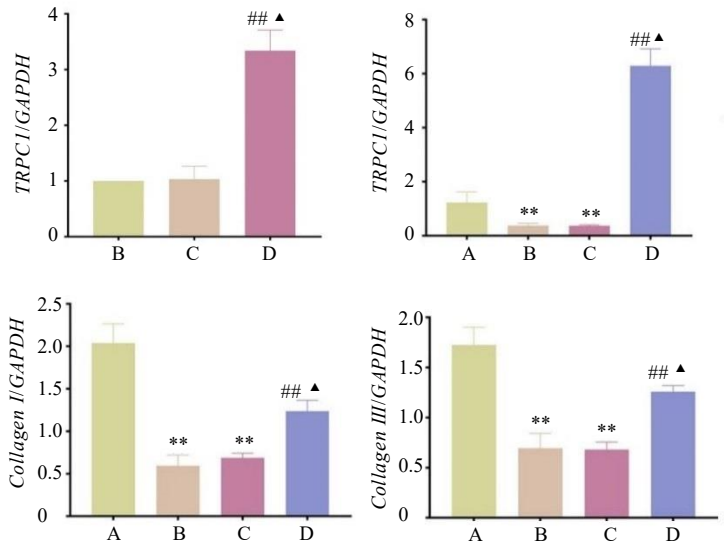


图 5　CAVO 对肺泡巨噬细胞中相关基因表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 5　Effect of CAVO on expression of related genes in alveolar macrophages ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

吞噬活性增强，而 CAVO 干预后巨噬细胞形态恢复为圆形或卵圆形，伪足减少，说明 CAVO 可以善巨噬细胞炎症反应。

ERS 是细胞本身的一种自我保护机制，受多种信号反应通路系统及基因的表达调控[27]，当 BA 发作时，气道上皮细胞过敏原、冷空气等刺激，导致细胞内环境失衡，进而引发 ERS。Hoffman 等[5]指出，ERS 通过激活 ATF6 和 PERK 途径，进一步导致 CHOP 表达升高，加剧气道细胞的凋亡和纤维化反应，从而影响气道重塑，加重 BA 的发生。ATF6 作为转录因子，在 ERS 时被激活并从内质网膜上释放到细胞质中，随后进入细胞核，并启动一系列基因的转录，这些基因编码的蛋白质有助于恢复内质网的功能和稳态[26]。PERK 可以促进 ATF6 的合成与运输[18]，PREK 能够磷酸化真核翻译起始因子 eIF2α，减缓整体的蛋白质翻译，从而减轻内质网的负担[28]。因此，持久或过激的 ERS，ATF6 与 PERK 的调节难以保持细胞稳态，而通过抑制 ERS 可以有效减少气道重塑，从而改善 BA 症状[4]。本研究结果显示，CAVO 能通过降低 ERS 相关蛋白（ATF6、PERK、CHOP）表达，缓解 BA 小鼠的气道重塑状态，这进一步验证了 CAVO 对 ERS 的调控作用。此外，TRPC1 信号通路与 ERS 存在重要关联，其激活可能通过钙离子稳态调控 ERS 水平[29]。结合本研究结果发现 TRPC1 的过表达显著减弱了 CAVO 对 ERS 的调控作用，这一发现为 ERS 与 TRPC1 之间的内在联系提供了新的证据。

Collagen I、Collagen III 是气道重塑的重要分子标志，它们构成了气道壁的主要结构成分。在 BA 气道重塑过程中，由于气道反复炎症反应，使胶原蛋白的表达和沉积增加，导致气道内网状基底膜增厚，限制了气道的正常扩张和收缩，出现持续性气流阻塞，加重气道重塑，最终导致 BA 程度加重[30-31]。本研究结果表明，BA 小鼠经 CAVO 干预后，肺泡灌洗液中 *Collagen I*、*Collagen III* 表达水平显著下降，提示 CAVO 能通过抑制 ERS 进程，改善气道重塑，并缓解 BA 病理状态。

TRPC1 通道作为瞬时受体电位非选择性阳离子通道家族的一员，广泛分布于血管平滑肌细胞，对平滑肌细胞的多种生理功能具有调节作用。研究表明，TRPC1 通道的激活与 BA 气道平滑肌细胞的异常收缩密切相关[32]，此外，TRPC1 不仅与钙稳态相关，还可能参与气道炎症信号通路的调节[33]。BA 发作时，ERS 被激活，TRPC1 可能通过其通道活性直接或间接地影响 ERS。本研究运用 BA 小鼠肺泡灌洗液分离提纯 BA 肺泡巨噬细胞，将 BA 肺泡巨噬细胞与气道上皮细胞共培养，并过表达 TRPC1，发现当 *TRPC1* 被过表达后 CAVO 对哮喘中升高的 *ATF6*、*CHOP*、*PERK*、*Collagen I* 和 *Collagen III* 的抑制能力明显下降，表明 TRPC1 介导了 CAVO 对 ERS 的抑制作用。

综上，本研究采用不同浓度的 CAVO 干预 BA 动物模型，发现 CAVO 干预后可呈剂量相关性地降低胶原沉积，同时降低内质网应激关键通路的蛋白

表达。此外，通过过表达 TRPC1 检测 CAVO 对 BA 内质网应激相关分子的影响，结果表明，CAVO 缓解内质网应激，改善 BA 气道重塑和气道炎症状态，其作用机制可能与调节 TRPC1 抑制 ERS 相关蛋白 ATF6、PERK、CHOP 的表达，从而降低 Collagen I 和 Collagen III 蛋白表达水平有关。这一发现不仅为理解 CAVO 的药理作用提供了新视角，也为开发针对 BA 等气道炎症性疾病的新型治疗药物提供了有力的实验依据和理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 苏楠. 支气管哮喘领域研究进展回顾 2023 [J]. 国际呼吸杂志, 2024, 44(4): 373-382.

[2] Aghasafari P, George U, Pidaparti R. A review of inflammatory mechanism in airway diseases [J]. *Inflamm Res*, 2019, 68(1): 59-74.

[3] Malmström K, Malmberg L P, O'Reilly R, *et al*. Lung function, airway remodeling, and inflammation in infants: Outcome at 8 years [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2015, 114(2): 90-96.

[4] Fu T, Wang L, Zeng Q, *et al*. Ghrelin ameliorates asthma by inhibiting endoplasmic reticulum stress [J]. *Am J Med Sci*, 2017, 354(6): 617-625.

[5] Hoffman S M, Tully J E, Nolin J D, *et al*. Endoplasmic reticulum stress mediates house dust mite-induced airway epithelial apoptosis and fibrosis [J]. *Respir Res*, 2013, 14(1): 141.

[6] 李文静, 毛秋月, 张冰, 等. 《神农本草经》"控疫"药物研究 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(6): 3282-3289.

[7] 宋文娟, 顾伟. 芳香中药的药理学研究概况与展望 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(6): 2609-2611.

[8] 王胜煌. 宽胸气雾剂快速缓解胸痹症的启示 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(2): 193-194.

[9] 喻星竹. 苍艾挥发油对 TRPC1 介导的哮喘气道重塑小鼠肺泡巨噬细胞 M1/M2 表型极化的影响 [D]. 昆明: 云南中医药大学, 2023.

[10] 徐新建, 宋海, 韩玉琦, 等. 艾叶挥发油化学成分的气相色谱-质谱联用分析 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(11): 2657-2658.

[11] 明溪, 何晓山, 陈柏君, 等. 苍艾香熏油体外抑菌作用研究 [J]. 云南中医学院学报, 2011, 34(1): 10-13.

[12] 解宇环, 莫愁, 李刚, 等. 苍艾挥发油对肺气虚大鼠肺组织病理形态和 T 细胞亚群的影响 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(8): 1845-1847.

[13] Postma D S. Gender differences in asthma development and progression [J]. *Gend Med*, 2007, 4(Suppl B): S133-S146.

[14] 蒋雷服, 殷凯生, 孙丽洲. 围月经期哮喘诊治进展 [J]. 中华哮喘杂志: 电子版, 2010, 4(2): 150-152.

[15] 明溪, 熊磊. 苍艾香薰油的制备工艺研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2014, 35(5): 77-78.

[16] 高家菊, 梅佳华, 普娟, 等. 不同产地苍艾挥发油的 GC-MS 指纹图谱研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(3): 269-273.

[17] 任雪交, 黄巍, 邱菲菲, 等. 支气管哮喘动物模型研究的文献分析与评价 [J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(1): 74-80.

[18] 赵霞, 秦艳虹, 王有鹏, 等. 儿童哮喘中医诊疗指南(修订) [J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(6): 476-482.

[19] Lugg S T, Scott A, Parekh D, *et al*. Cigarette smoke exposure and alveolar macrophages: Mechanisms for lung disease [J]. *Thorax*, 2022, 77(1): 94-101.

[20] Byrne A J, Mathie S A, Gregory L G, *et al*. Pulmonary macrophages: Key players in the innate defence of the airways [J]. *Thorax*, 2015, 70(12): 1189-1196.

[21] Bazzan E, Turato G, Tinè M, *et al*. Dual polarization of human alveolar macrophages progressively increases with smoking and COPD severity [J]. *Respir Res*, 2017, 18(1): 40.

[22] Dewhurst J A, Lea S, Hardaker E, *et al*. Characterisation of lung macrophage subpopulations in COPD patients and controls [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7143.

[23] Savill J, Dransfield I, Gregory C, *et al*. A blast from the past: Clearance of apoptotic cells regulates immune responses [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(12): 965-975.

[24] Jacobson M D, Weil M, Raff M C. Programmed cell death in animal development [J]. *Cell*, 1997, 88(3): 347-354.

[25] Hengartner M O. Apoptosis: Corralling the corpses [J]. *Cell*, 2001, 104(3): 325-328.

[26] Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death [J]. *Nature*, 2000, 407: 784-788.

[27] 陈树林, 李育良. 内关、心俞与心脏相关的神经基础 [J]. 中国针灸, 1996, 16(12): 33-35.

[28] Li X F, Su L K, Zhang X J, *et al*. Ulinastatin downregulates TLR4 and NF-kB expression and protects mouse brains against ischemia/reperfusion injury [J]. *Neurol Res*, 2017, 39(4): 367-373.

[29] Li N, He Y, Yang G, *et al*. Role of TRPC1 channels in pressure-mediated activation of airway remodeling [J]. *Respir Res*, 2019, 20(1): 91.

[30] Ferreira D S, Carvalho-Pinto R M, Gregório M G, *et al*.

Airway pathology in severe asthma is related to airflow obstruction but not symptom control [J]. *Allergy*, 2018, 73(3): 635-643.

[31] Chakir J, Shannon J, Molet S, *et al*. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: Effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 111(6): 1293-1298.

[32] Gonzalez-Cobos J C, Trebak M. TRPC channels in smooth muscle cells [J]. *Front Biosci*, 2010, 15(3): 1023-1039.

[33] Barennes H, Sayavong E, Pussard E. High mortality risk in hypoglycemic and dysglycemic children admitted at a referral hospital in a non malaria tropical setting of a low income country [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0150076.

[责任编辑 罗 曦]