

麻黄碱调控 TGF- β 1/Smads 通路对 支气管哮喘小鼠气道重塑的影响

范慧慧¹, 任玉梅², 田新磊¹, 张凯¹, 李晓丽¹

摘要 目的 探究麻黄碱对支气管哮喘小鼠气道重塑的影响及对转化生长因子 β 1 (TGF- β 1)/Smads 通路的调控作用。方法 将所有小鼠随机分为对照组、模型组、地塞米松组、麻黄碱低剂量组、麻黄碱高剂量组、麻黄碱高 + TGF- β 1 激活剂组, 每组 12 只。除对照组, 其余组小鼠腹腔注射含有 40 μ g 卵清蛋白 (OVA) 和 2 mg 10% 氢氧化铝的致敏液诱导哮喘模型。8 周后, 检测各组小鼠气道高反应性; 对支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中嗜酸性粒细胞进行计数; ELISA 检测 BALF 中白细胞介素 (IL) 4、IL-5 和 IL-13 的水平; 苏木精-伊红 (HE) 染色和 Masson 染色观察小鼠肺组织的病理学变化及胶原纤维面积; 免疫组织化学检测小鼠肺组织中 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 表达; Western blot 检测小鼠肺组织中 TGF- β 1/Smads 通路相关蛋白的表达。结果 与对照组相比, 模型组小鼠不同乙酰甲胆碱剂量下的气道高反应性、气道壁的总面积 (Wat)/基底膜的周长 (Pbm) 比值、胶原纤维面积、嗜酸性粒细胞及 IL-4、IL-5、IL-13 含量、 α -SMA、TGF- β 1 表达及 p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 比值均升高 ($P < 0.05$), Smad7 表达降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 地塞米松组和麻黄碱低、高剂量组小鼠不同乙酰甲胆碱剂量下的气道高反应性、Wat/Pbm 比值、胶原纤维面积、嗜酸性粒细胞及 IL-4、IL-5、IL-13 含量、 α -SMA、TGF- β 1 表达及 p-Smad2/

Smad2、p-Smad3/Smad3 比值均降低 ($P < 0.05$), Smad7 表达升高 ($P < 0.05$); 与麻黄碱高剂量组相比, 麻黄碱高 + TGF- β 1 激活剂组小鼠不同乙酰甲胆碱剂量下的气道高反应性、Wat/Pbm 比值、胶原纤维面积、嗜酸性粒细胞及 IL-4、IL-5、IL-13 含量、 α -SMA、TGF- β 1 表达及 p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 比值均升高 ($P < 0.05$), Smad7 表达降低 ($P < 0.05$)。结论 麻黄碱可以改善支气管哮喘小鼠的气道重塑, 其机制与调控 TGF- β 1/Smads 信号通路有关。

关键词 麻黄碱; 支气管哮喘; 转化生长因子 β 1; Smad 蛋白; 气道重塑

中图分类号 R 285.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)08-1398-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.016

哮喘是一种慢性炎症性疾病, 其发病特征是慢性气道炎症、重塑和高反应性, 其中由气道重塑引起的肺功能恶化是哮喘频繁发作的主因^[1]。目前, 皮质类固醇和 β 肾上腺素能激动剂或白三烯被认为是治疗哮喘的有效选择, 但仍有患者症状难以控制^[2]。因此, 了解哮喘气道重塑的机制对寻找治疗哮喘的药物非常重要。转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 是调节哮喘气道重塑的主要因子之一, 可影响气道壁的胶原沉积, Smad 是 TGF- β 信号途径的重要成员^[3]。抑制 TGF- β 1/Smads 通路可调节哮喘小鼠的气道重塑^[4]。麻黄碱是麻黄属植物中提取的一种化合物, 通常被用作肾上腺素能药物, 调节各种疾病的炎症反应^[5]。如麻黄碱可通过抑制炎症反应减轻肺损伤, 提高呼

2024-04-25 接收

基金项目: 河南省中医药科学研究专项(编号: 20-21ZY2057)

作者单位: ¹ 河南省中医院(河南中医药大学第二附属医院) 儿科, 郑州 450000

² 河南中医药大学儿科医学院, 郑州 450000

作者简介: 范慧慧, 女, 硕士研究生;

任玉梅, 女, 硕士, 副教授, 责任作者, E-mail: xiaoxiannv800@163.com

and M2 M ϕ s ($P < 0.05$), and the relative expression of IL-10 and TGF- β in M2 M ϕ s were higher than those in M0 and M1 M ϕ s ($P < 0.05$); Western blot showed the expression of RUNX2 and ALP proteins in PDLSCs in M0 and M2 groups was higher than those in the NC group ($P < 0.05$), Alizarin Red staining showed increased calcified nodule deposition in PDLSCs in M0, M1 and M2 groups compared to the NC group; MTT assay showed the proliferation of PDLSCs in the M0 and M1 groups was suppressed compared to the NC group ($P < 0.05$); and scratch experiment showed the migratory capacity of PDLSCs in the M1 and M2 groups was stronger than that in the NC group. **Conclusion** M0 and M1 M ϕ s inhibit PDLSCs proliferation, M1 and M2 M ϕ s promote PDLSCs migration, and all types of M ϕ s promote osteogenic differentiation of PDLSCs.

Key words macrophages; periodontal ligament stem cells; proliferation; migration; osteogenic differentiation

吸道感染小鼠的免疫功能;且其联合利肝素 II 可通过调节 TGF- β 1/Smad3 来改善哮喘小鼠的气道重塑^[6-7]。但关于麻黄碱在哮喘中的作用了解甚少。该研究旨在探讨麻黄碱对哮喘小鼠气道重塑的作用以及该过程中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 85 只 SPF 级 BALB/c 雄性小鼠,8 周龄,22~26 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2021-0011。所有小鼠饲养在光暗交替(12 h/12 h)、温度 26 °C、湿度 60% 的环境中。本研究经河南省中医院动物伦理委员会批准(批准号:2021-0566)。

1.1.2 主要试剂 盐酸麻黄碱片(国药准字 H51022745,规格 15 mg/片)购自成都第一制药有限公司;卵清蛋白(ovalbumin, OVA)(货号:YT0233,规格 10 g/支)购自北京伊塔生物科技有限公司;氢氧化铝(货号:S30353)购自上海源叶生物科技有限公司;SRI-011381 hydrochloride(TGF- β 1 激活剂,货号:HY-400347A)购自美国 MedChemExpress;瑞氏-姬姆萨复合染液(货号:G1020)购自北京索莱宝科技有限公司;白细胞介素(interleukin, IL)-4、IL-5 和 IL-13 ELISA 试剂盒(货号:M25969、M25970、M25938)购自广州博辉生物科技有限公司;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染液和 Masson 三色染色液(货号:abs9217、abs9348)购自上海爱必信生物科技有限公司; α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、TGF- β 1、Smad2、p-Smad2、Smad3、p-Smad3 兔单抗及 Smad7、GAPDH 兔多抗(货号:ab7817、ab179695、ab40855、ab280888、ab40854、ab52903、ab216428、ab9485)购自于英国 Abcam 公司;山羊抗兔 IgG(H+L)(货号:WLA023)购自沈阳万类生物科技有限公司。

1.1.3 仪器 小动物无创肺功能检测系统(型号:DSI BUXCO)购自北京普升达科贸有限公司;奥林巴斯倒置显微镜(型号:CKX53)购自北京赛百奥科技有限公司;荧光酶标仪(型号:SpectraMax Gemini EM)购自上海美谷分子仪器有限公司;蛋白凝胶成像系统(型号:iBright CLI1000)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠模型的建立及分组 将所有小鼠随机分为对照组、模型组、地塞米松组、麻黄碱低剂量组、

麻黄碱高剂量组、麻黄碱高+TGF- β 1 激活剂组。除了对照组,其余小鼠均参照文献^[8]在第 1、7 和 14 天通过腹腔注射 200 μ l 用 PBS 配制的含有 40 μ g OVA 和 2 mg 10% 氢氧化铝的致敏液。从第 21~56 天将小鼠置于超声雾化器装置中,每天用含有 1% OVA 的 PBS 雾化致敏小鼠 20 min。对照组用不含 OVA 的 PBS 雾化。从第 15~56 天,地塞米松组小鼠按 5 mg/kg 剂量灌胃^[9],麻黄碱低、高剂量组小鼠按 12.5、25 mg/kg 剂量进行腹腔注射^[7],麻黄碱高+TGF- β 1 激活剂组小鼠腹腔注射 25 mg/kg 麻黄碱 30 min 后,再以 10 mg/kg 的剂量腹腔注射 TGF- β 1 激活剂 SRI-011381 hydrochloride^[10]。对照组和模型组均以相同方式给予等量的生理盐水,每天给药 1 次,且在小鼠雾化刺激 1 h 前给药。在造模及给药期间剔除死亡小鼠,并保证给药结束后每组均有 12 只小鼠进行后续实验。

1.2.2 检测各组小鼠气道高反应性 在最后一次 OVA 雾化后 24 h 内,通过动物肺功能系统测试小鼠气道高反应性。将小鼠放在体描箱中,依次给予剂量为 6.25、12.5、25、50 g/L 的乙酰甲胆碱,每次给药间隔 5 min,每次给药 1 min 后,记录不同乙酰甲胆碱剂量下小鼠增强呼吸间歇值(enhanced pause, Penh),以反映小鼠气道反应性的增高情况, Penh = (呼气时间/松弛时间 - 1) \times 呼气流量峰值/吸气流量峰值 \times 100%。

1.2.3 支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中嗜酸性粒细胞的计数 气道高反应性检测结束后,腹腔注射 1% 戊巴比妥(30 mg/kg)麻醉小鼠,结扎左侧支气管,并将灌洗管插入右支气管中,通过灌洗管将 0.5 ml 冰冷的 PBS 缓慢注入右肺中,灌洗 6 次以收集 BALF。随后,将收集到的 1.8 ml BALF 在 4 °C 下以 1 500 r/min 离心 10 min,收集上清液并在 -80 °C 下保存。将细胞沉淀物用 200 μ l PBS 重悬,取 10 μ l 滴至载玻片上,用瑞氏-姬姆萨试剂染色,并通过光学显微镜对嗜酸性粒细胞进行计数。

1.2.4 ELISA 检测 BALF 中 IL-4、IL-5 和 IL-13 的水平 将 1.2.3 中收集的 BALF 上清液置于冰上溶解,然后根据相应的 ELISA 试剂盒的操作步骤检测 BALF 中 IL-4、IL-5 和 IL-13 的水平。

1.2.5 HE 染色和 Masson 染色观察小鼠肺组织的病理学变化及胶原纤维面积 收集 BALF 后,将小鼠处死并分离右肺组织,每组取 5 个右肺组织样品置于 4% 多聚甲醛中固定过夜,石蜡包埋,剩余组织

冻存于 -80 °C。将石蜡包埋的标本切成 5 μm 的薄片,在二甲苯中脱蜡,并在梯度乙醇中再水化。然后将切片用 HE 或 Masson 染色,清水冲洗后用中性树脂封片,在倒置显微镜下观察肺组织病理变化及胶原纤维化沉积情况,每个切片随机选取 5 个视野观察,并利用 Image Pro Plus 软件量化气道壁的总面积(total area of airway wall , Wat)、基底膜的周长(perimeter of the basement membrane , Pbm) 及胶原纤维(蓝色)面积。

1.2.6 免疫组织化学检测小鼠肺组织中 α-SMA 蛋白表达 取 1.2.5 项中的石蜡切片脱蜡后用 0.02% Triton X-100 透化,10% 山羊血清和 2% BSA 封闭,枸橼酸盐缓冲液高温修复抗原。然后在 4 °C 下将切片与 α-SMA 一抗(1 : 1 000) 孵育过夜,用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1 : 150) 在室温下孵育 1 h,并用 DAB 染色。然后将切片用苏木精复染、乙醇脱水、树脂封片,最后在显微镜下观察蛋白阳性表达(棕色),并利用 Image Pro Plus 软件分析阳性表达的积分吸光度。

1.2.7 Western blot 检测小鼠肺组织中 TGF-β1 / Smads 通路相关蛋白的表达 取 1.2.5 项中冻存的右肺组织解冻,加入含有 1% 蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液匀浆,并使用 BCA 方法测定蛋白浓度。然后加入 5 倍上样缓冲液稀释并煮沸变性,将 20 mg 总蛋白质样品加到 SDS-PAGE 凝胶中,在 100 V 下电泳 90 min 后,将凝胶转移到 PVDF 膜上,在 220 mA 下湿转 90 min。在用 5% 脱脂乳封闭 1 h 后,使用 TGF-β1、Smad2、p-Smad2、Smad3(均 1 : 1 000)、p-Smad3(1 : 2 000)、Smad7(1 : 500) 一抗于 4 °C 孵育过夜,再使用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1 : 3 000) 在室温孵育 1 h,用 ECL 试剂显影。在凝胶成像系统中成像并拍照,以 GAPDH 为内参,通过 Image J 软件进行蛋白质条带的吸光度分

析,蛋白质表达水平变化的结果表示为目标蛋白质与参照蛋白质的相对比率。

1.3 统计学处理 使用 Graphpad prism 9.0 软件进行数据统计分析,计量资料表示为 $\bar{x} \pm s$,多组间比较用单因素方差分析,两两组间比较用 Tukey 事后检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 麻黄碱对各组小鼠气道高反应性的影响 不同乙酰甲胆碱剂量下,与对照组相比,模型组小鼠气道高反应性均升高($P < 0.05$);与模型组相比,地塞米松组和麻黄碱低、高剂量组小鼠气道高反应性均降低($P < 0.05$),且麻黄碱高剂量组和地塞米松组差异无统计学意义;与麻黄碱高剂量组相比,麻黄碱高 + TGF-β1 激活剂组小鼠气道高反应性均升高($P < 0.05$),见表 1。

2.2 麻黄碱对各组小鼠 BALF 中嗜酸性粒细胞的影响 与对照组 [(0.12 ± 0.01) × 10⁶/L]相比,模型组小鼠 BALF 中嗜酸性粒细胞数量 [(3.65 ± 0.28) × 10⁶/L]增多($P < 0.05$);与模型组 [(3.65 ± 0.28) × 10⁶/L]相比,地塞米松组和麻黄碱低、高剂量组小鼠 BALF 中嗜酸性粒细胞数量 [(1.53 ± 0.13) × 10⁶/L、(2.74 ± 0.21) × 10⁶/L、(1.47 ± 0.11) × 10⁶/L]减少($P < 0.05$),且麻黄碱高剂量组和地塞米松组差异无统计学意义;与麻黄碱高剂量组 [(1.47 ± 0.11) × 10⁶/L]相比,麻黄碱高 + TGF-β1 激活剂组 [(3.49 ± 0.25) × 10⁶/L]小鼠 BALF 中嗜酸性粒细胞数量增多($P < 0.05$)。

2.3 麻黄碱对各组小鼠 BALF 中 IL-4、IL-5 和 IL-13 水平的影响 与对照组相比,模型组小鼠 BALF 中 IL-4、IL-5 和 IL-13 水平升高($P < 0.05$);与模型组相比,地塞米松组和麻黄碱低、高剂量组小鼠 BALF 中 IL-4、IL-5 和 IL-13 水平均降低($P < 0.05$),且麻

表 1 各组不同乙酰甲胆碱剂量下小鼠 Penh 比较(% $n = 12 \bar{x} \pm s$)

组别	乙酰甲胆碱(g/L)			
	6.25	12.5	25	50
对照	62.71 ± 5.38	121.73 ± 10.64	211.64 ± 18.59	233.36 ± 20.93
模型	189.34 ± 16.27*	235.19 ± 20.37*	326.71 ± 25.35*	362.41 ± 26.72*
地塞米松	89.17 ± 6.92#	168.39 ± 14.26#	239.52 ± 21.46#	274.92 ± 23.17#
麻黄碱低剂量	134.61 ± 11.46# ^Δ	197.48 ± 18.21# ^Δ	281.92 ± 23.73# ^Δ	314.67 ± 24.80# ^Δ
麻黄碱高剂量	87.85 ± 6.34#	165.82 ± 15.13#	237.43 ± 20.84#	270.73 ± 22.61#
麻黄碱高 + TGF-β1 激活剂	178.38 ± 15.65 ^Δ [▲]	227.53 ± 19.75 ^Δ [▲]	312.56 ± 14.75 ^Δ [▲]	354.18 ± 25.86 ^Δ [▲]
F 值	258.649	78.111	57.021	54.115
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与地塞米松组比较: ^Δ $P < 0.05$; 与麻黄碱高剂量组比较: [▲] $P < 0.05$

黄碱高剂量组和地塞米松组差异无统计学意义; 与麻黄碱高剂量组相比, 麻黄碱高 + TGF-β1 激活剂组小鼠 BALF 中 IL-4、IL-5 和 IL-13 水平均升高 ($P < 0.05$) , 见表 2。

表 2 各组小鼠 BALF 中 IL-4、IL-5 和 IL-13 水平的比较 (pg/ml $n = 12 \bar{x} \pm s$)

组别	IL-4	IL-5	IL-13
对照	18.96 ± 1.12	47.58 ± 2.65	54.82 ± 4.69
模型	52.25 ± 3.25*	142.64 ± 8.38*	117.65 ± 8.97*
地塞米松	27.61 ± 1.83 [#]	59.73 ± 3.51 [#]	65.25 ± 5.73 [#]
麻黄碱低剂量	39.74 ± 2.68 ^{#Δ}	91.26 ± 6.34 ^{#Δ}	89.38 ± 7.65 ^{#Δ}
麻黄碱高剂量	25.27 ± 1.91 [#]	56.82 ± 3.73 [#]	63.41 ± 5.62 [#]
麻黄碱高 + TGF-β1 激活剂	49.56 ± 2.64 ^{Δ▲}	137.95 ± 7.76 ^{Δ▲}	112.52 ± 8.38 ^{Δ▲}
F 值	409.154	627.555	175.432
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与地塞米松组比较: ^Δ $P < 0.05$; 与麻黄碱高剂量组比较: [▲] $P < 0.05$

2.4 麻黄碱对各组小鼠肺组织病理变化及胶原纤维面积的影响 对照组小鼠肺组织结构正常; 与对照组相比, 模型组小鼠肺组织中支气管周围发现严重的炎性浸润, 气道壁明显增厚, Wat/Pbm 比值及胶原纤维面积增大 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 地塞米松组和麻黄碱低、高剂量组小鼠肺组织中支气管周围炎性浸润减少, 气道壁变薄, Wat/Pbm 比值及胶原纤维面积减小 ($P < 0.05$); 与麻黄碱高剂量组相比, 麻黄碱高 + TGF-β1 激活剂组小鼠肺组织炎性浸润明显, 气道壁增厚, Wat/Pbm 比值及胶原纤维面积增大 ($P < 0.05$) , 见图 1、2 和表 3。

表 3 各组小鼠肺组织 Wat/Pbm 比值及胶原纤维面积的比较 ($n = 6 \bar{x} \pm s$)

组别	Wat/Pbm ($\mu\text{m}^2 / \mu\text{m}$)	胶原纤维面积 (%)
对照	13.63 ± 1.48	2.69 ± 0.15
模型	32.81 ± 2.65*	49.93 ± 5.54*
地塞米松	19.35 ± 1.73 [#]	12.37 ± 1.53 [#]
麻黄碱低剂量	24.96 ± 2.14 ^{#Δ}	22.65 ± 1.97 ^{#Δ}
麻黄碱高剂量	18.21 ± 1.57 [#]	13.78 ± 1.62 [#]
麻黄碱高 + TGF-β1 激活剂	30.78 ± 2.42 ^{Δ▲}	36.82 ± 4.34 ^{Δ▲}
F 值	104.943	68.506
P 值	<0.001	<0.001

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与地塞米松组比较: ^Δ $P < 0.05$; 与麻黄碱高剂量组比较: [▲] $P < 0.05$

2.5 麻黄碱对各组小鼠肺组织中 α-SMA 蛋白表达的影响 与对照组 (2.86 ± 0.32) 相比, 模型组小鼠肺组织中 α-SMA 蛋白阳性表达 (26.75 ± 1.96) 升高 ($P < 0.05$); 与模型组 (26.75 ± 1.96) 相比, 地塞

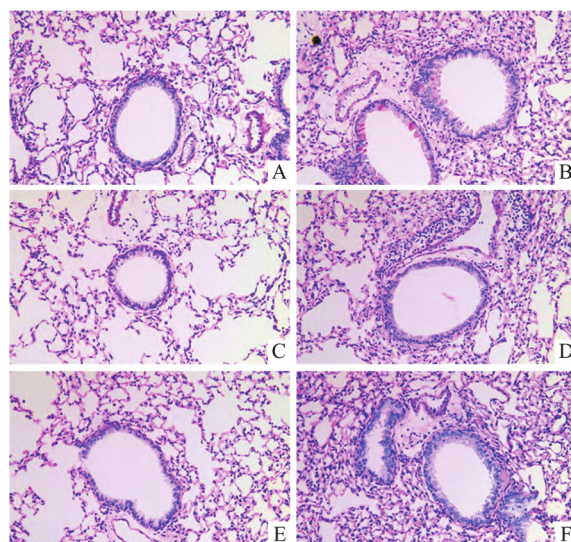


图 1 各组小鼠肺组织的病理学形态 HE 染色 ×200

A: 对照组; B: 模型组; C: 地塞米松组; D: 麻黄碱低剂量组; E: 麻黄碱高剂量组; F: 麻黄碱高 + TGF-β1 激活剂组

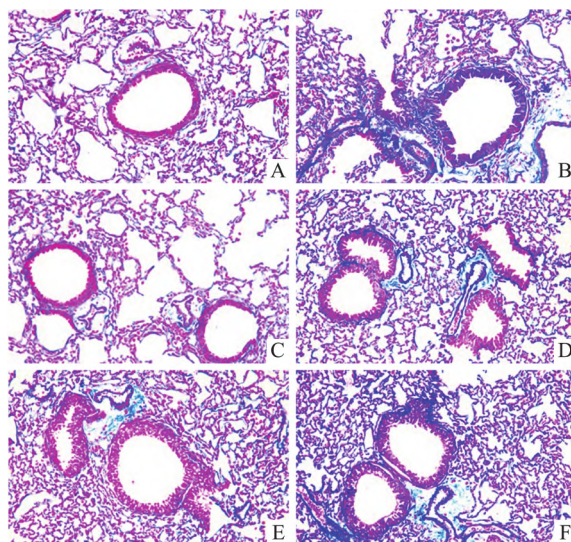


图 2 各组小鼠肺组织胶原纤维 Masson 染色 ×200

A: 对照组; B: 模型组; C: 地塞米松组; D: 麻黄碱低剂量组; E: 麻黄碱高剂量组; F: 麻黄碱高 + TGF-β1 激活剂组

米松组和麻黄碱低、高剂量组小鼠肺组织中 α-SMA 蛋白阳性表达 [(8.37 ± 0.95)、(17.62 ± 1.53)、(8.16 ± 0.87)] 降低 ($P < 0.05$) , 且麻黄碱高剂量组和地塞米松组差异无统计学意义; 与麻黄碱高剂量组 (8.16 ± 0.87) 相比, 麻黄碱高 + TGF-β1 激活剂组小鼠肺组织中 α-SMA 蛋白阳性表达 (24.93 ± 1.72) 升高 ($P < 0.05$) , 见图 3。

2.6 麻黄碱对各组小鼠肺组织中 TGF-β1/Smads 通路相关蛋白表达的影响 与对照组相比, 模型组小鼠肺组织中 TGF-β1 表达和 p-Smad2/Smad2、

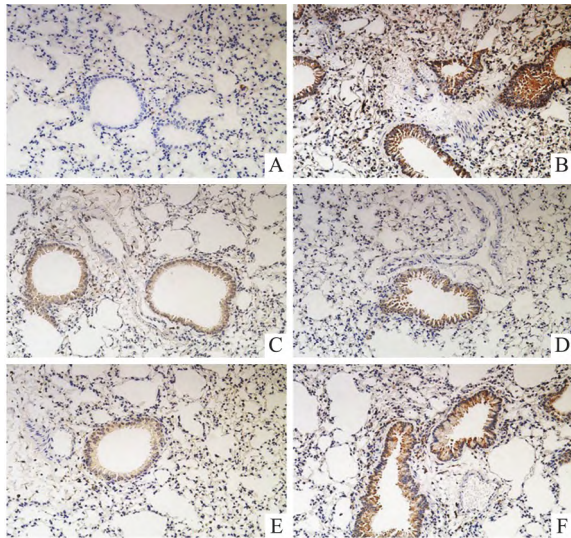


图3 各组小鼠肺组织中 α -SMA 蛋白的表达 免疫组化染色 $\times 200$
A: 对照组; B: 模型组; C: 地塞米松组; D: 麻黄碱低剂量组; E: 麻黄碱高剂量组; F: 麻黄碱高 + TGF- β 1 激活剂组

p-Smad3/Smad3 的比值升高, Smad7 表达降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 地塞米松组和麻黄碱低、高剂量组小鼠肺组织中 TGF- β 1 表达和 p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 的比值降低, Smad7 表达升高 ($P < 0.05$), 且麻黄碱高剂量组和地塞米松组差异无统计学意义; 与麻黄碱高剂量组相比, 麻黄碱高 + TGF- β 1 激活剂组小鼠肺组织中 TGF- β 1 表达和 p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 的比值升高, Smad7 表达降低 ($P < 0.05$), 见图 4 和表 4。

3 讨论

气道重塑被认为是哮喘气道高反应性和肺功能障碍的主要原因, 其特征是气道壁增厚、上皮胶原沉积和黏液分泌过多等^[11]。本研究通过 OVA 诱导小鼠哮喘模型, 结果显示, 模型组小鼠不同乙酰甲胆碱剂量下的气道高反应性明显升高, 且肺组织支气

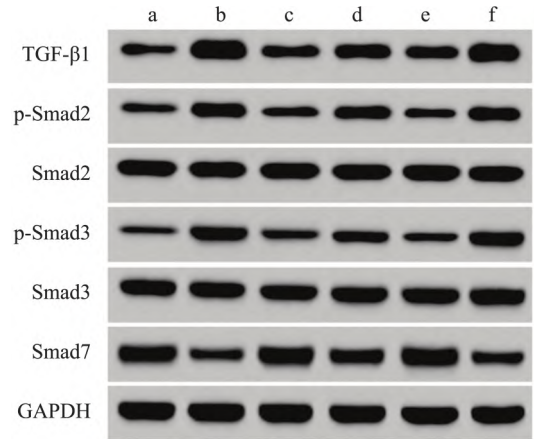


图4 各组小鼠肺组织中 TGF- β 1/Smads 通路相关蛋白的表达
a: 对照组; b: 模型组; c: 地塞米松组; d: 麻黄碱低剂量组; e: 麻黄碱高剂量组; f: 麻黄碱高 + TGF- β 1 激活剂组

管周围炎性细胞浸润严重, 气道壁增厚, 胶原纤维面积增大, 表明哮喘模型复制成功。近年来, 中药被广泛用于治疗支气管炎和支气管哮喘, 麻黄碱作为中药麻黄的活性成分, 可用于治疗或预防低血压、哮喘、肥胖症和嗜睡症等。有研究^[12]证明, 麻黄碱可以改善香烟烟雾提取物刺激的人支气管上皮细胞凋亡、氧化应激和炎症反应, 对慢性阻塞性肺病发挥保护作用。因此, 本研究利用不同剂量的麻黄碱干预哮喘模型小鼠, 结果发现, 小鼠不同乙酰甲胆碱剂量下的气道高反应性降低, 同时肺组织中支气管周围炎性细胞浸润减少, 气道壁变薄, 胶原纤维面积也减小, 且麻黄碱高剂量组与阳性药物地塞米松组差异无统计学意义, 提示了麻黄碱可以减轻哮喘小鼠的气道高反应性和肺组织病理性损伤, 抑制气道重塑。

2 型免疫应答是哮喘发病机制之一, 其特征是气道嗜酸性粒细胞增多和 Th2 细胞相关细胞因子 IL-4、IL-5 和 IL-13 的升高, 持续和复发性炎症通常可诱发哮喘患者气道结构变化, 导致气道重塑^[13]。

表4 各组小鼠肺组织中 TGF- β 1/Smads 通路相关蛋白表达的比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	TGF- β 1	p-Smad2/Smad2	p-Smad3/Smad3	Smad7
对照	0.30 \pm 0.02	0.23 \pm 0.02	0.26 \pm 0.02	1.19 \pm 0.08
模型	1.24 \pm 0.10*	0.87 \pm 0.06*	0.79 \pm 0.05*	0.38 \pm 0.02*
地塞米松	0.45 \pm 0.03#	0.36 \pm 0.03#	0.37 \pm 0.02#	1.05 \pm 0.07#
麻黄碱低剂量	0.81 \pm 0.06 Δ	0.62 \pm 0.04 Δ	0.54 \pm 0.04 Δ	0.69 \pm 0.04 Δ
麻黄碱高剂量	0.43 \pm 0.03#	0.34 \pm 0.03#	0.35 \pm 0.02#	1.07 \pm 0.07#
麻黄碱高 + TGF- β 1 激活剂	1.18 \pm 0.09 $\Delta\blacktriangle$	0.85 \pm 0.06 $\Delta\blacktriangle$	0.76 \pm 0.05 $\Delta\blacktriangle$	0.41 \pm 0.03 $\Delta\blacktriangle$
F 值	247.677	248.564	230.292	236.764
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与地塞米松组比较: Δ $P < 0.05$; 与麻黄碱高剂量组比较: $\Delta\blacktriangle$ $P < 0.05$

作为成纤维细胞的标志和参与上皮细胞分化为肌成纤维细胞的因子, α -SMA 的表达水平升高表明上皮纤维化的形成, 其已被报道为哮喘气道重塑的重要生物标志物^[14]。本研究结果显示, 模型组小鼠 BALF 中嗜酸性粒细胞及细胞因子 IL-4、IL-5 和 IL-13 的含量均增多, 肺组织中 α -SMA 蛋白表达升高, 而地塞米松组和麻黄碱低、高剂量组小鼠 BALF 中嗜酸性粒细胞及细胞因子 IL-4、IL-5 和 IL-13 的含量均减少, 肺组织中 α -SMA 蛋白表达降低, 提示了麻黄碱可以抑制哮喘小鼠的炎症反应及肺组织上皮纤维化, 并可能以此来预防气道重塑的发生。

研究^[3]已经证明 TGF- β 1 是一种促纤维化细胞因子, 可通过促进肌成纤维细胞增殖, 引起气道上皮的复发性上皮损伤和修复, 被认为在慢性哮喘中发挥关键作用。Smad 蛋白家族是 TGF- β 1 的下游信号分子, 在多种相关因素的刺激下, TGF- β 1 先与细胞膜的 TGF- β 1 受体 II 结合激活受体 I, 磷酸化 Smad2/3, 并与 Smad4 形成三聚体并转运至细胞核来调控相应靶基因的转录^[15]。而 Smad7 是一种抑制性 Smad 蛋白, 其通过阻止 Smad 磷酸化来阻断 TGF- β 1 信号过度激活^[3]。研究^[16]报道, 薯蓣皂苷通过抑制 TGF- β 1/Smad2/3 和 AKT 信号通路对 OVA 诱导的哮喘小鼠发挥保护作用。本研究结果显示, 模型组小鼠 TGF- β 1 表达及 p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 的比值均升高, Smad7 表达降低, 地塞米松组和麻黄碱组小鼠 TGF- β 1 表达及 p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 的比值降低, Smad7 表达升高, 提示麻黄碱可以促进 Smad7 的表达, 抑制 TGF- β 1/Smad2/3 信号通路的激活。为进一步验证 TGF- β 1/Smads 通路在该过程中的作用, 本研究利用 TGF- β 1 激活剂进行回补实验, 结果显示麻黄碱高 + TGF- β 1 激活剂组小鼠不同乙酰甲胆碱剂量下的气道高反应性, Wat/Pbm 比值、胶原纤维面积、嗜酸性粒细胞及 IL-4、IL-5、IL-13 含量、 α -SMA、TGF- β 1 表达及 p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 比值均升高, Smad7 表达降低。揭示了麻黄碱改善哮喘小鼠的气道重塑和炎症反应的作用机制可能与调控 TGF- β 1/Smads 信号通路有关。

综上所述, 麻黄碱可以改善支气管哮喘小鼠的气道重塑, 其机制与调控 TGF- β 1/Smads 信号通路有关。该研究进一步证明了麻黄碱对哮喘的治疗作用, 并为哮喘气道重塑的预防提供了新的理论依据。

参考文献

[1] Huo R, Tian X, Chang Q, et al. Targeted inhibition of β -catenin

alleviates airway inflammation and remodeling in asthma *via* modulating the profibrotic and anti-inflammatory actions of transforming growth factor- β 1 [J]. *Ther Adv Respir Dis*, 2021, 15: 1753466620981858.

- [2] Shakerinasab N, Bejeshk M A, Pourghadamyari H, et al. The hydroalcoholic extract of nasturtium officinale reduces lung inflammation and oxidative stress in an ovalbumin-induced rat model of asthma [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 5319237.
- [3] Yao Z, Fu Y. Glycyrrhizic acid restrains airway inflammation and remodeling in asthma *via* the TGF- β 1/Smad signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(5): 461.
- [4] 彭国茹, 张 运, 王宋平. 大蒜素抑制 TGF- β 1/SMAD2 通路减轻哮喘小鼠气道炎症并调节气道重塑 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2021, 37(5): 385-90.
- [5] Tian H, Wang L, Fu T. Ephedrine alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibiting epithelial-mesenchymal transition and restraining NF- κ B signaling [J]. *J Toxicol Sci*, 2023, 48(10): 547-56.
- [6] Wei W, Du H, Shao C, et al. Screening of antiviral components of ma huang tang and investigation on the ephedra alkaloids efficacy on influenza virus type A [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 961.
- [7] Wang Q, Cui Y, Wu X, et al. Riparin II potentials the effect of ephedrine on inflammation and remodelling in the airway of rats suffering from asthma by regulating transforming growth factor- β /Smad3 signalling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 90: 107116.
- [8] Dong L, Wang Y, Zheng T, et al. Hypoxic hUCMSC-derived extracellular vesicles attenuate allergic airway inflammation and airway remodeling in chronic asthma mice [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 4.
- [9] 徐 凤, 张 岩, 商 华, 等. 麻杏石甘汤对哮喘模型小鼠气道重塑及肺组织 MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(2): 353-9.
- [10] 赵 博, 彭建军, 李广平, 等. 灯盏花素通过 TGF- β 1/Smads 通路减轻急性心肌梗死大鼠心室重构 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(4): 410-4.
- [11] 王志霞, 罗 湘, 王利江, 等. 组蛋白去甲基化酶 KDM2A 在支气管哮喘大鼠气道炎症和气道重塑中的作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(4): 610-5.
- [12] Wang H L, Chen F Q, Wu L J. Ephedrine ameliorates chronic obstructive pulmonary disease (COPD) through restraining endoplasmic reticulum (ER) stress *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 103: 107842.
- [13] Yi L, Zhou Y, Song J, et al. A novel iridoid glycoside leonuride (ajugol) attenuates airway inflammation and remodeling through inhibiting type-2 high cytokine/chemokine activity in OVA-induced asthmatic mice [J]. *Phytomedicine*, 2022, 105: 154345.
- [14] Cui H, Cheng Y, He Y, et al. The AKT inhibitor MK2206 suppresses airway inflammation and the premodeling pathway in a TDI-induced asthma mouse model [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22

(5) : 3723 – 34.

[15] Ding N , Zheng C. Jiangtang Tongmai prescription reduced diabetic lung injury through SnoN and TGF- β 1/Smads signaling pathway [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)* , 2022 , 13: 846583.

[16] Shang Q , Zhu L , Shang W , et al. Dioscin exhibits protective effects on *in vivo* and *in vitro* asthma models *via* suppressing TGF- β 1/Smad2/3 and AKT pathways [J]. *J Biochem Mol Toxicol* , 2022 , 36(8) : e23084.

Effect of ephedrine on airway remodeling in bronchial asthma mice by regulating TGF- β 1/Smads pathway

Fan Huihui¹ , Ren Yumei² , Tian Xinlei¹ , Zhang Kai¹ , Li Xiaoli¹

(¹Dept of Pediatrics , Henan Hospital of Traditional Chinese Medicine the Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine , Zhengzhou 450000; ²College of Pediatrics , Henan University of Chinese Medicine , Zhengzhou 450000)

Abstract Objective To explore the effect of ephedrine on airway remodeling and its regulation effect on transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) /Smads pathway in asthmatic mice. **Methods** All mice were randomly separated into control group , model group , dexamethasone group , ephedrine low-dose group , ephedrine high-dose group , and ephedrine high-dose + TGF- β 1 activator group , with 12 mice in each group. Except for the control group , mice in other groups were intraperitoneally injected with 40 μ g ovalbumin (OVA) and 2 mg 10% aluminium hydroxide sensitizer to induce asthma models. After 8 weeks , the airway hyperresponsiveness of mice in each group was detected; eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were counted; ELISA was applied to detect the levels of interleukin (IL) -4 , IL-5 , and IL-13 in BALF; hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson staining were applied to observe the pathological changes and collagen fiber area of mouse lung tissue; immunohistochemistry was applied to detect the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) protein in mouse lung tissue; Western blot was applied to detect the expression of TGF- β 1/Smads pathway related proteins in mouse lung tissue. **Results** Compared with the control group , the airway hyperreactivity at different doses of methacholine , total area of airway wall (Wat) / perimeter of the basement membrane (Pbm) ratio , collagen fiber area , eosinophil , the contents of IL-4 , IL-5 , IL-13 , the expression of α -SMA , TGF- β 1 , the ratios of p-Smad2/Smad2 and p-Smad3/Smad3 in the model group increased ($P < 0.05$) , the expression of Smad7 decreased ($P < 0.05$) ; compared with the model group , the airway hyperreactivity at different doses of methacholine , Wat/Pbm ratio , collagen fiber area , eosinophil , the contents of IL-4 , IL-5 , IL-13 , the expression of α -SMA , TGF- β 1 , the ratios of p-Smad2/Smad2 and p-Smad3/Smad3 in the dexamethasone group , the ephedrine low-dose and high-dose groups decreased ($P < 0.05$) , the expression of Smad7 increased ($P < 0.05$) ; compared with the ephedrine high-dose group , the airway hyperreactivity at different doses of methacholine , Wat/Pbm ratio , collagen fiber area , eosinophil , the contents of IL-4 , IL-5 , IL-13 , the expression of α -SMA , TGF- β 1 , the ratios of p-Smad2/Smad2 and p-Smad3/Smad3 in the ephedrine high-dose + TGF- β 1 activator group increased ($P < 0.05$) , the expression of Smad7 decreased ($P < 0.05$) . **Conclusion** Ephedrine can improve airway remodeling in asthmatic mice , and its mechanism is related to the regulation of TGF- β 1/Smads signaling pathway.

Key words ephedrine; bronchial asthma; transforming growth factor- β 1; Smad protein; airway remodeling