

维生素 D₃ 对小鼠支气管哮喘气道炎症和氧化应激反应的作用及其分子机制

贾 斌 梁思敏

摘要 目的 探究维生素 D₃ (VitD₃) 在小鼠支气管哮喘气道炎症和氧化应激反应中的作用和相关分子机制。方法 将 28 只雌性 C57BL/6 小鼠随机分为对照组 (Ctrl) 和模型组。模型组小鼠采用卵清蛋白 (OVA) 致敏法建立哮喘模型后, 将其分为哮喘 (Asthma) 组、VitD₃ 处理 (Asthma + VitD₃) 组和叉头盒 O1 (FOXO1) 抑制剂 AS1842856 处理 (Asthma + AS) 组。测定各组小鼠肺阻力 (LR) 变化。采用 ELISA 法检测肺泡灌洗液 (BALF) 中炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-1 β 和 IL-18 的含量。Western blot 检测肺组织中 FOXO1 和 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸酶-1 (Caspase-1) 和凋亡斑点蛋白 (ASC) 的表达水平。结果 与 Ctrl 组相比, Asthma 组小鼠的 LR 升高 ($P < 0.01$)。与 Asthma 组相比, Asthma + VitD₃ 组和 Asthma + AS 组小鼠的 LR 降低 ($P < 0.05$)。Asthma + VitD₃ 组与 Asthma + AS 组小鼠的 LR 变化差异无统计学意义。与 Ctrl 组相比, Asthma 组、Asthma + VitD₃ 组和 Asthma + AS 组小鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 与 IL-18 含量均增加 ($P < 0.01$)。肺组织中 NLRP3、Caspase-1 和 ASC 蛋白表达水平均升高 ($P < 0.01$)。与 Asthma 组相比, Asthma + VitD₃ 组和 Asthma + AS 组小鼠 BALF 中上述炎症因子含量均减少 ($P < 0.05$)。肺组织中 NLRP3、FOXO1、Caspase-1 和 ASC 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$)。与 Asthma + VitD₃ 组相比, Asthma + AS 组中除 FOXO1 蛋白表达水平升高外 ($P < 0.05$)。上述其他检测指标差异均无统计学意义。结论 VitD₃ 可减轻 OVA 诱导的小鼠哮喘症状, 改善气道炎症程度和降低氧化应激水平, 且其机制可能与 FOXO1/NLRP3 轴的下调有关。

关键词 维生素 D₃; 哮喘; 叉头盒 O1; NOD 样受体家族蛋白 3 炎症小体

中图分类号 R 562.25

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)01-0058-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.010

哮喘的具体发病机制尚未完全阐明, 肺部炎症细胞浸润增加导致的炎症介质过度分泌和随后诱导

的氧化应激被认为是哮喘发病机制中的重要特征^[1]。1,25(OH)₂ 是 VitD₃ 的活性形式, 有研究^[2]表明, 缺乏 VitD₃ 会增加哮喘的发生风险并与疾病严重程度有关。然而, 补充 VitD₃ 并不总是被证明是改善疾病的有效策略^[3]。因此, 有必要深入了解 VitD₃ 在哮喘发病机制中的作用, 以研发出有效的治疗方法。叉头盒 O1 (forkhead box O1, FOXO1) 是一种能参与调节 VitD₃ 对葡萄糖稳态过程的一种重要转录因子^[4-5]。研究^[6-7]表明, 应用 FOXO1 抑制剂 AS1842856 可明显改善哮喘症状, 并提示 FOXO1 可能是控制肺部变应性炎症反应和逆转气道重塑重要靶点。NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (nod-like receptor pyrin domain containing 3, NLRP3) 炎症小体是一种检测环境刺激物和内源性危险信号的细胞内传感器。在哮喘的急性发作中, NLRP3 炎症小体的活化发挥着重要作用^[8]。FOXO1 可通过多种途径促进 NLRP3 的活化, 且 FOXO1/NLRP3 轴在多种呼吸道炎症疾病的发生中发挥促进作用^[9-10]。然而, 在哮喘中 FOXO1/NLRP3 轴是否参与气道炎症反应尚不明确。因此, 该研究通过建立小鼠哮喘模型探究 VitD₃ 的作用及其与 FOXO1/NLRP3 轴的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠 28 只 (5~6 周龄, 体质量 18~22 g) 购自新疆医科大学实验动物中心, 合格证号: SCXK(新)2018-0001。苏木精-伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染色试剂盒 (货号: C021-2-1)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) (货号: C047-1-6)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒 (货号: C026-7-5) 购自南京建成科技有限公司; 卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) (货号: SRP1729)、FOXO1 抑制剂 AS1842856 (货号: SRP0316)、1,25-(OH)₂ 活性 VitD₃ (货号: P1164) 购自美国 Sigma 公司; 白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β (货号: P1205-40)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) (货号: P4059-17) 和 IL-18 (货号:

2023-11-25 接收

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (编号: 2019D01C294)

作者单位: 新疆医科大学第一附属医院呼吸科, 乌鲁木齐 830054

作者简介: 贾 斌, 男, 博士, 副主任医师, 责任作者, E-mail: cafeff2@163.com

PI614-71) 的 ELISA 检测试剂盒购自武汉云克隆科技股份有限公司; 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) (货号: L0088) 检测试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司; 兔抗鼠 NLRP3、半胱氨酸天冬氨酸酶-1 (cysteinyI aspartate specific protease-1, Caspase-1)、FOXO1、凋亡斑点蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein, ASC) 和 GAPDH 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG 二抗 (货号: BE-073-4) 购自江苏碧云天生物技术有限公司。AniRes2005 肺功能仪购自北京北蓝博科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠分组和哮喘模型的建立 所有动物饲养在环境温度为 20 ~ 26 °C、相对湿度 40% 的条件下, 光照/黑暗循环 12 h。适应性饲养 1 周后, 按随机数字表法将 28 只小鼠分为对照组 (Ctrl) 和模型组。模型组小鼠参考文献方法^[11] 建立哮喘模型后, 并将其分为: 哮喘 (Asthma) 组, VitD₃ 处理 (Asthma + VitD₃) 组和 FOXO1 抑制剂 AS1842856 处理 (Asthma + AS) 组。哮喘模型建立方法: 在第 0 天和第 14 天, 通过腹腔注射 200 μ l 致敏液 (含有 100 μ g OVA 和 20 mg 明矾)。从第 21 天开始, 给予小鼠雾化吸入含 2% OVA 雾化溶液 40 ml 作为激发液, 30 min/d, 连续 7 d。对照组小鼠在同一时间给予等体积的生理盐水进行致敏与激发。在给予激发液前 1 h, Asthma + VitD₃ 组小鼠予以 5 μ g/kg 的 VitD₃ 剂量腹腔注射, Asthma + AS 组小鼠予以 5 mg/kg 的剂量 AS1842856 腹腔注射。

1.2.2 气道高反应 (airway hyperactivity, AHR) 检测和肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 收集 上述各组小鼠在最后一次 OVA 雾化吸入后 48 h, 采用肺功能仪测定小鼠 AHR, 方法如下: 气管插管后, 用生理盐水雾化测定肺基础阻力。静息 2 min 后, 分别雾化 5、10、20、40 mg/ml 的乙酰胆碱溶液后, 再次测定肺阻力 (lung resistance, LR)。AHR 检测完成后, 采用戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉小鼠, 暴露于 CO₂ 中安乐死, 并暴露气管。然后用 5 ml 无菌注射器向气管内注射 2 ml 无菌 PBS 进行抽吸 2 ~ 3 次以灌洗右肺, 回收的 PBS 溶液即为 BALF。计数 BALF 的细胞时, 室温下 2 200 r/min 离心 10 min, 收集 BALF 中的细胞沉淀, PBS 溶液重悬后, 将细胞悬液涂在玻片上, 采用吉姆萨染色液对细胞进行染色, 最后在光学显微镜下进行分类与计数。

1.2.3 肺组织病理学观察 取各组小鼠左侧肺组织, 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切成 4 ~ 5 μ m 厚的切片, 使用 HE 染色试剂盒进行染色, 并根据呼吸道炎症进行评分。评分标准^[12] 如下: 0 分, 无炎症细胞浸润; 1 分, 少量炎症细胞浸润; 2 分, 炎症细胞形成环状, 厚度为 1 个细胞; 3 分, 炎症细胞形成环状, 厚度为 2 ~ 3 个细胞; 4 分, 炎症细胞形成环状, 厚度为 5 个细胞; 5 分, 炎症细胞形成环状, 厚度为 $\geq$ 5 个细胞。

1.2.4 ELISA 实验检测炎症因子 取各组小鼠 BALF, 室温下 2 200 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 按照试剂盒说明书方法使用 ELISA 法检测各组小鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-18 的浓度。

1.2.5 肺组织氧化应激评估 取各组小鼠左侧肺组织, 匀浆后, 按照 ROS、SOD 和 MDA 试剂盒检测方法检测组织中的 ROS、SOD 和 MDA 浓度以评估肺组织氧化应激水平。

1.2.6 Western blot 检测肺组织中 FOXO1 和 NLRP3 相关蛋白表达水平 将各组小鼠肺组织在含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液中进行匀浆, 4 °C 下以 3 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。取 35 μ g 的蛋白质样品通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 然后转移到聚偏二氟乙烯膜上。5% 脱脂牛奶在室温下阻断 2 h 后, 将膜与一抗于 4 °C 孵育过夜, 一抗分别为: FOXO1 (1 : 1 000)、NLRP3 (1 : 1 000)、Caspase-1 (1 : 1 000)、ASC (1 : 1 000) 和 GAPDH (1 : 2 000)。次日, 充分洗膜后, 使用 1 : 5 000 的辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG 二抗在室温下孵育 2 h, 最后加入 ECL 试剂显影, 用 Amersham Imager 600 拍照, Image J 软件分析蛋白条带灰度值。以 GAPDH 为内参进行计算: 目标蛋白相对表达量 = 蛋白灰度 / GAPDH 灰度。

1.3 统计学处理 采用统计学软件 GraphPad Prism 7.0 进行统计分析, 计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间两两比较采用 Tukey 事后检验进行分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VitD₃ 对小鼠哮喘症状的影响 各组小鼠一般情况的观察结果显示: 雾化吸入 OVA 后, Asthma 组小鼠出现打喷嚏、易怒、呼吸急促、耳朵瘙痒等症状; 而 Asthma + VitD₃ 组和 Asthma + AS 组小鼠的上

述情况中打喷嚏和搔耳频率减少,呼吸稍有急促,易怒等症状明显减轻;Ctrl 组小鼠无上述相关症状的表现。AHR 的检测结果显示:与 Ctrl 组相比,Asthma 组、Asthma + VitD₃ 组和 Asthma + AS 组小鼠的 LR 随乙酰胆碱浓度的增加而不断升高 ($F = 172.59, P < 0.01$);与 Asthma 组相比,Asthma + VitD₃ 组和 Asthma + AS 组小鼠的 LR 降低 ($F = 86.29, P < 0.05$);Asthma + VitD₃ 组与 Asthma + AS 组小鼠的 LR 差异无统计学意义 ($F = 36.01, P > 0.05$)。见图 1。

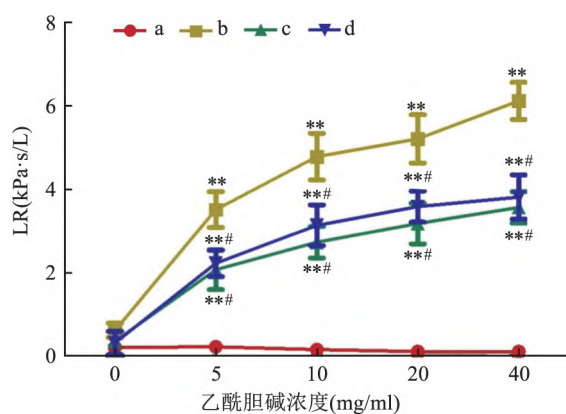


图 1 各组小鼠 AHR 的检测

a: Ctrl 组; b: Asthma 组; c: Asthma + VitD₃ 组; d: Asthma + AS 组;

与 Ctrl 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Asthma 组比较: # $P < 0.05$

2.2 各组小鼠气道炎症的比较 HE 染色结果显示,与 Ctrl 组相比,Asthma 组小鼠的支气管壁增厚,管腔内有黏液塞,气道上皮细胞明显损伤,肺间质和血管周围水肿、炎症细胞浸润增多,而 Asthma + VitD₃ 组和 Asthma + AS 组小鼠肺组织损伤明显减轻(图 2)。炎症评分结果显示,与 Ctrl 组相比,Asthma 组、Asthma + VitD₃ 组和 Asthma + AS 组小鼠肺组织炎症分值均升高 ($F = 145.38, P < 0.01$),而与 Asthma 组相比,Asthma + VitD₃ 组和 Asthma + AS 组小鼠肺组织炎症分值降低 ($F = 227.10, P < 0.05$),Asthma + VitD₃ 组与 Asthma + AS 组小鼠肺组织炎症评分中差异无统计学意义 ($F = 10.23, P > 0.05$) (图 3)。各组小鼠 BALF 中细胞分类计数和炎症因子的 ELISA 检测结果显示,与 Ctrl 组相比,Asthma 组、Asthma + VitD₃ 组和 Asthma + AS 组小鼠 BALF 中巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞数量和 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-18 含量均增加 ($F = 104.29, P < 0.01$);与 Asthma 组相比,Asthma + VitD₃ 组和 Asthma + AS 组小鼠 BALF 中上述各个炎症细胞数

量与炎症因子含量均减少 ($F = 27.84, P < 0.05$),Asthma + VitD₃ 组与 Asthma + AS 组差异无统计学意义 ($F = 46.07, P > 0.05$) (图 4)。

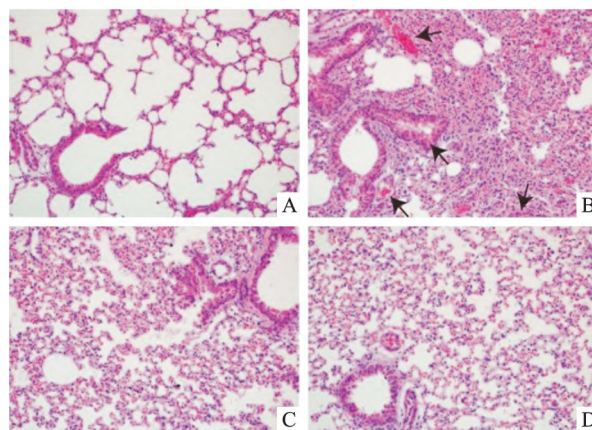


图 2 各组小鼠肺组织病理学改变染色观察 HE $\times 200$

A: Ctrl 组; B: Asthma 组; C: Asthma + VitD₃ 组; D: Asthma + AS

组;黑色箭头:指示炎症细胞浸润

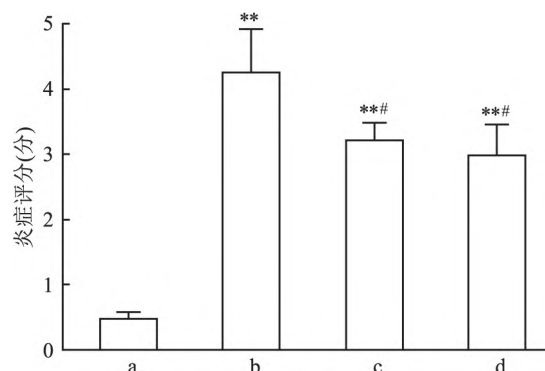


图 3 各组小鼠肺组织炎症评分比较

a: Ctrl 组; b: Asthma 组; c: Asthma + VitD₃ 组; d: Asthma + AS 组;

与 Ctrl 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Asthma 组比较: # $P < 0.05$

2.3 各组小鼠肺组织氧化应激的比较 与 Ctrl 组相比,Asthma 组、Asthma + VitD₃ 组和 Asthma + AS 组小鼠肺组织中 ROS 和 MDA 含量升高 ($F = 336.29, P < 0.05$; $F = 179.25, P < 0.05$),SOD 活性降低 ($F = 95.28, P < 0.05$);与 Asthma 组相比,Asthma + VitD₃ 组和 Asthma + AS 组小鼠肺组织中 ROS 和 MDA 含量降低 ($F = 57.13, P < 0.05$; $F = 62.51, P < 0.05$),SOD 活性升高 ($F = 168.24, P < 0.05$);Asthma + VitD₃ 组与 Asthma + AS 组小鼠肺组织中 ROS 和 MDA 含量、SOD 活性差异无统计学意义 ($F = 224.09, F = 127.54, F = 91.03; P > 0.05$)。见表 1。

2.4 各组小鼠肺组织中 FOXO1 和 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达 与 Ctrl 组小鼠相比,Asthma 组

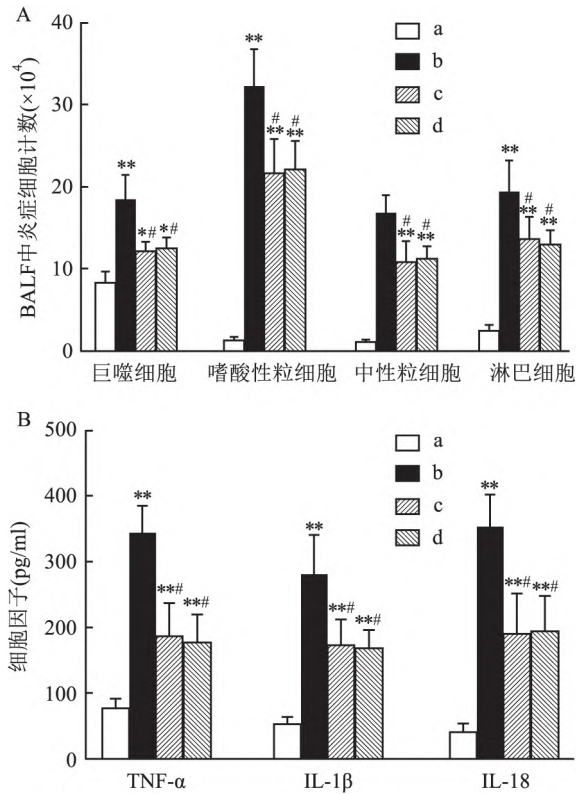


图4 各组小鼠 BALF 中炎症细胞和炎症因子的表达

A: 各组小鼠 BALF 中巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞和淋巴细胞的比较; B: ELISA 检测各组小鼠 BALF 中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-18 含量; a: Ctrl 组; b: Asthma 组; c: Asthma + VitD₃ 组; d: Asthma + AS 组; 与 Ctrl 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 Asthma 组比较: # $P < 0.05$

表1 各组小鼠肺组织中 ROS、SOD 和 MDA 表达水平的比较($n = 5$ $\bar{x} \pm s$)

组别	ROS (RFU/mg)	SOD 活性 (U/mg 蛋白)	MDA (nmol/mg 蛋白)
Ctrl	0.63 $\pm$ 0.02	5.78 $\pm$ 0.62	4.04 $\pm$ 0.29
Asthma	3.81 $\pm$ 0.29*	1.36 $\pm$ 0.45*	22.19 $\pm$ 2.87*
Asthma + VitD ₃	1.62 $\pm$ 0.17* #	3.79 $\pm$ 0.54* #	13.45 $\pm$ 1.06* #
Asthma + AS	1.58 $\pm$ 0.28* #	3.55 $\pm$ 0.86* #	14.71 $\pm$ 2.08* #

与 Ctrl 组比较: * $P < 0.05$; 与 Asthma 组比较: # $P < 0.05$

和 Asthma + VitD₃ 组小鼠肺组织中 NLRP3 炎症小体相关蛋白 NLRP3、ASC 及 Caspase-1 的表达均升高 ($F = 76.12$, $F = 55.19$, $F = 217.66$, $F = 89.24$; $P < 0.05$), Asthma + AS 组中 FOXO1 表达降低 ($F = 150.24$, $P < 0.05$), NLRP3、ASC 及 Caspase-1 的表达水平均升高 ($F = 223.88$, $F = 158.23$, $F = 69.57$; $P < 0.05$); 与 Asthma 组相比, Asthma + VitD₃ 和 Asthma + AS 组中 FOXO1 和 NLRP3 炎症小体相关蛋白 NLRP3、ASC 及 Caspase-1 的表达水平均降低 ($F = 104.17$, $F = 49.02$, $F = 73.58$; $P < 0.05$); 与 Asthma + VitD₃ 组相比, Asthma + AS 组中除 FOXO1 表达降

低外 ($F = 53.69$, $P < 0.05$), 上述其他蛋白的表达差异均无统计学意义 ($F = 48.25$, $F = 21.35$, $F = 19.48$; $P > 0.05$)。见图 5。

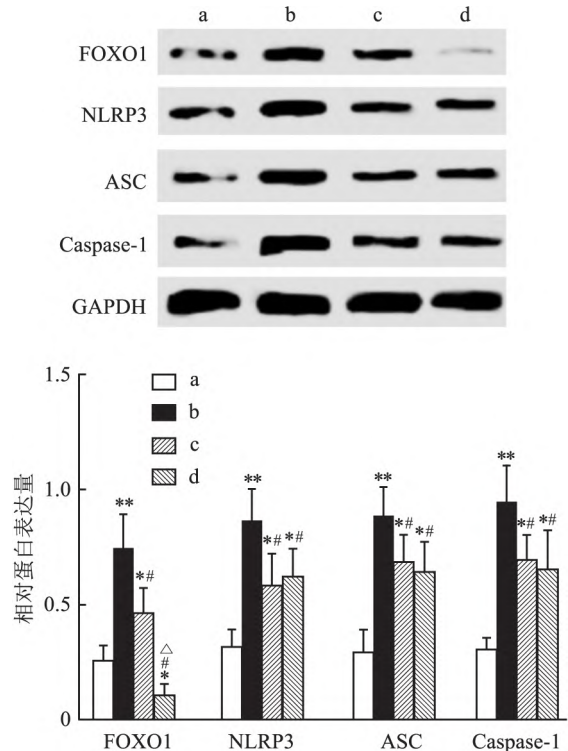


图5 Western blot 检测各组小鼠肺组织中 FOXO1、NLRP3、ASC 和 Caspase-1 蛋白表达水平

a: Ctrl 组; b: Asthma 组; c: Asthma + VitD₃ 组; d: Asthma + AS 组; 与 Ctrl 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 Asthma 组比较: # $P < 0.05$; 与 Asthma + VitD₃ 组比较: Δ $P < 0.05$

3 讨论

本研究通过体内实验探索了 VitD₃ 在哮喘模型中作用及相关机制, 结果表明, VitD₃ 可减轻 OVA 诱导的小鼠变应性气道炎症, 降低肺组织中 ROS、MDA 水平, 升高 SOD 活性, 使氧化应激得到缓解。VitD₃ 的上述作用与 FOXO1 抑制剂 AS1842856 对哮喘的改善作用类似, 这提示 VitD₃ 对哮喘的上述改善作用可能与 FOXO1/NLRP3 轴的下调相关。

慢性呼吸道炎症和气道高反应性作为哮喘的主要特征。这表现为肺部多种炎症细胞浸润和炎症因子的高表达使易感人群的气道对各种刺激因素高度敏感, 并可引起气道狭窄, 表现为反复喘息、呼吸困难、胸闷或咳嗽, 常在夜间和/或发作, 并在清晨加剧^[1]。近年来, 随着社会经济的发展, 哮喘的发病率不减反增(尤其在幼儿和青少年儿童中), 严重影响我国的人口质量^[1]。

本研究采用经典的哮喘建模方法^[11], 用 OVA

和明矾联合腹腔注射致敏小鼠,然后用 2% OVA 激发建立哮喘模型,结果显示,模型组出现打喷嚏、呼吸困难等哮喘样症状,抓鼻等过敏症状明显。随着刺激时间的延长,上述症状变得更加明显。此外,哮喘小鼠的肺组织 HE 染色观察结果显示呼吸道上皮细胞遭到破坏,大量炎症细胞渗入气道内及周围,气道壁增厚,并在支气管腔内形成大量黏液塞。AHR 检测表明,随乙酰胆碱浓度的增加,模型组小鼠 LR 也不断升高,而对照组的 LR 无明显改变。以上提示本研究成功建立了哮喘小鼠模型。

既往研究^[2]表明,VitD₃ 缺陷或不足会增加哮喘的发生风险并与患者发病的严重程度有关,这提示 VitD₃ 可能参与哮喘的发生与进展,但其具体作用机制尚不明确。FOXO1 通过转录调控、信号转导以及与其他转录因子相互作用,可介导多种细胞生物学行为,并直接参与炎症的调节^[13]。如在哮喘中,Chung et al^[6]研究表明,FOXO1 可通过调节肺巨噬细胞的促哮喘表型,参与慢性过敏性气道疾病的发生和进展。AS1842856 抑制 FOXO1 表达可诱导肺巨噬细胞表型转化,下调肺部炎症因子的表达和促纤维化因子的转录,减轻哮喘导致的肺部损伤。Buttrick et al^[7]的研究表明,FOXO1 能促进 CD4⁺ T 细胞向以产生 IL-9 为特征的 Th9 细胞的分化,且后者可直接在肺内诱导类似哮喘症状的发作,上调 BALF 中 IL-4、IL-13 等炎症因子的含量,加重了呼吸道高反应性,而这些症状可通过 FOXO1 抑制剂 AS1842856 改善。上述研究表明,FOXO1 在哮喘发生中发挥重要的促进作用,抑制其表达可能是改善哮喘的有效策略。本研究结果显示,外源予以 FOXO1 抑制剂 AS1842856 处理后,小鼠哮喘症状和肺组织病理损伤和炎症反应及氧化应激水平同样得到明显改善。而在 2 型糖尿病中,VitD₃ 被证实可通过抑制 FOXO1 的表达来刺激胰腺 β 细胞,以产生更多胰岛素,并增加胰岛素敏感性,从而达到维持血糖稳态的作用^[14]。本研究结果与之一致,均表明 VitD₃ 可下调 FOXO1 表达。

NLRP3 炎症小体激活触发天冬氨酸氨基转移酶-1 向半胱氨酸天冬氨酸氨基转移酶-1 的转化,随后介导促炎因子 IL-1 β 和 IL-18 的成熟与释放^[8,15]。在体内和体外研究^[15]均表明,Caspase-1 活性在 OVA 激发的小鼠体内中呈强阳性表达,在脂多糖刺激的正常人支气管上皮细胞中,NLRP3 和 IL-1 β 蛋白表达同样异常升高。Primiano et al^[16]研究表明,NLRP3 特异性抑制剂 MCC950 可以逆转过敏性呼

吸道黏膜中炎性细胞和炎症因子的表达。探究雌激素对哮喘等呼吸道炎症的保护作用中同样发现,在 OVA 诱导的气道炎症中,NLRP3、ASC 和 Caspase-1 的表达和促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-18 的产生增加。这些研究表明,过敏性气道炎症与 NLRP3 小体的激活有关。在探讨虾青素对碘海醇诱导的人近端肾小管上皮细胞保护作用的研究中发现,虾青素可抑制 ROS 产生和表达,以下调 NLRP3 炎症小体的活化,最终发挥改善细胞损伤的作用^[17]。同时,FOXO1 还能调控硫氧还蛋白相互作用蛋白(TX-NIP)的表达,后者可诱导 ROS 产生,进而激活 NLRP3 炎症小体的活化^[17]。此外,FOXO1/NLRP3 轴还在多种呼吸道炎症疾病通过介导炎症反应和氧化应激中发挥促进作用^[9-10]。本研究结果表明,在哮喘小鼠中补充 VitD₃ 可降低哮喘小鼠肺组织中 ROS 和 MDA 水平,升高 SOD 活性。同时,哮喘小鼠中 FOXO1、NLRP3、ASC 和 Caspase-1 的表达水平也同样降低。

综上所述,研究表明外源性补充 VitD₃ 能通过降低气道中炎症反应和氧化应激来改善小鼠的哮喘症状,而其机制可能与 FOXO1/NLRP3 轴的下调有关。

参考文献

- [1] Huang K, Yang T, Xu J, et al. Prevalence, risk factors, and management of asthma in China: a national cross-sectional study [J]. *Lancet*, 2019, 394(10196): 407-18.
- [2] Al-Taghan S S, Alolayan S O, Ahmed S, et al. Impacts of deficiency in vitamin D derivatives on disease severity in adult bronchial asthma patients [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2021, 70: 102073.
- [3] Forno E, Bacharier L B, Phipatanakul W, et al. Effect of vitamin D₃ supplementation on severe asthma exacerbations in children with asthma and low vitamin D levels: The VDKA randomized clinical trial [J]. *JAMA*, 2020, 324(8): 752-60.
- [4] Chen S, Villalta S A, Agrawal D K. FOXO1 mediates vitamin D deficiency-induced insulin resistance in skeletal muscle [J]. *J Bone Miner Res*, 2016, 31(3): 585-95.
- [5] Jiang Y, Luo W, Wang B, et al. 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D₃ ameliorates diabetes-induced bone loss by attenuating FoxO1-mediated autophagy [J]. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100287.
- [6] Chung S, Kim J Y, Song M A, et al. FoxO1 is a critical regulator of M2-like macrophage activation in allergic asthma [J]. *Allergy*, 2019, 74(3): 535-48.
- [7] Buttrick T S, Wang W, Yung C, et al. Foxo1 promotes Th9 cell differentiation and airway allergy [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 818.
- [8] Alvarez-Simon D, Ait Yahia S, de Nadai P, et al. NOD-like receptors in asthma [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 928886.

- [9] Fu Z, Jiang Z, Guo G, et al. rhKGF-2 attenuates smoke inhalation lung injury of rats via activating PI3K/Akt/Nrf2 and repressing FoxO1-NLRP3 inflammasome [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 641308.
- [10] Ding N, Liu D, Duan X, et al. Twist2 reduced NLRP3-induced inflammation of infantile pneumonia via regulation of mitochondrial permeability transition by FOXO1 [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2022, 183(10): 1098–113.
- [11] Song J, Wang J. SIRT3 regulates bronchial epithelium apoptosis and aggravates airway inflammation in asthma [J]. *Mol Med Rep*, 2022, 25(4): 144.
- [12] Gao P C, Chen X W, Chu J H, et al. Antagonistic effect of selenium on mercuric chloride in the central immune organs of chickens: the role of microRNA-183/135b-FOXO1/TXNIP/NLRP3 inflammasome axis [J]. *Environ Toxicol*, 2022, 37(5): 1047–57.
- [13] 陈洁, 耿慧武, 王凤杰, 等. FoxO1 蛋白在癌细胞质中的差异表达及其功能研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(12): 1847–52.
- [14] Xiong Y, Zhang Y, Guo Y, et al. $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D_3 increases implant osseointegration in diabetic mice partly through FoxO1 inactivation in osteoblasts [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 494(3–4): 626–33.
- [15] Sayan M, Mossman B T. The NLRP3 inflammasome in pathogenic particle and fibre-associated lung inflammation and diseases [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2016, 13(1): 51.
- [16] Primiano M J, Lefker B A, Bowman M R, et al. Efficacy and pharmacology of the NLRP3 inflammasome inhibitor CP-456,773 (CRID $_3$) in murine models of dermal and pulmonary inflammation [J]. *J Immunol*, 2016, 197(6): 2421–33.
- [17] 张驰昊, 高冬梅, 郑迪, 等. 虾青素通过 ROS/NLRP3 炎症小体信号通路减轻碘海醇诱导的 HK-2 损伤 [J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(15): 3726–31.

The effects and molecular mechanisms of vitamin D_3 on airway inflammation and oxidative stress response in a mouse model of bronchial asthma

Jia Bin, Liang Simin

(Dept of Respiratory, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054)

Abstract Objective To investigate the role and related molecular mechanisms of vitamin D_3 (Vit D_3) in airway inflammation and oxidative stress response in bronchial asthma mice. **Methods** Twenty-eight female C57BL/6 mice were randomly divided into a control group (Ctrl) and a model group. The model group mice were sensitized using ovalbumin (OVA) to establish an asthma model, and were further divided into an asthma (Asthma) group, Vit D_3 treatment (Asthma + Vit D_3) group, and Forkhead Box O1 (FOXO1) inhibitor AS1842856 treatment (Asthma + AS) group. Lung resistance (LR) changes were measured in each group of mice. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , and IL-18 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Western blot was used to determine the expression levels of FOXO1, NOD-like receptor pyrin domain containing 3 (NLRP3), Caspase-1, and apoptosis-associated speck-like protein (ASC) in lung tissue. **Results** Compared to the Ctrl group mice, LR increased in the Asthma group mice ($P < 0.01$). Compared to the Asthma group, LR decreased in the Asthma + Vit D_3 and Asthma + AS group mice ($P < 0.05$), with no significant difference in LR change between Asthma + Vit D_3 and Asthma + AS group mice. Compared to the Ctrl group, TNF- α , IL-1 β , and IL-18 levels in BALF, as well as NLRP3, Caspase-1, and ASC protein expression levels in lung tissue, increased in the Asthma, Asthma + Vit D_3 , and Asthma + AS group mice ($P < 0.05$). Compared to the Asthma group, the Asthma + Vit D_3 and Asthma + AS group mice showed decreased levels of the mentioned inflammatory factors in BALF and reduced protein expression of NLRP3, FOXO1, Caspase-1, and ASC in lung tissue ($P < 0.05$). Compared to the Asthma + Vit D_3 group, the Asthma + AS group showed increased FOXO1 protein expression ($P < 0.05$), with no statistically significant differences in the other measured indicators. **Conclusion** Vit D_3 can alleviate asthma symptoms induced by OVA in mice, improve the degree of airway inflammation, and reduce oxidative stress levels. The mechanism may be related to the downregulation of the FOXO1/NLRP3 axis.

Key words vitamin D_3 ; asthma; forkhead box O1; NOD-like receptor pyrin domain containing 3 inflammasome