

研究报告

别克参多糖对哮喘小鼠氧化应激的影响

高珊珊¹,周悦¹,冯悦²,闫淑静¹,靳瑾³,杨雅¹,陈春丽¹(1. 新疆医科大学药学院,新疆乌鲁木齐 830011; 2. 新疆乌鲁木齐海关,新疆乌鲁木齐 830011;
3. 新疆医科大学基础医学院,新疆乌鲁木齐 830011)

摘要:目的 探究别克参多糖(ESBP)对哮喘的影响及作用机制。方法 50只雌性 Balb/c 小鼠随机分为阴性对照组、哮喘模型组、地塞米松阳性给药组、ESBP 高剂量组和 ESBP 低剂量组。除阴性对照组外,均以鸡卵清蛋白(OVA)致敏激发以建立哮喘模型。采用全自动血液分析仪对肺泡灌洗液(BALF)中的炎症细胞进行分类及计数;苏木素-伊红(HE)、过碘酸希夫(PAS)和马松(Masson)染色观察哮喘小鼠肺组织病理情况;比色法检测血清中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性;免疫组化和实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)检测小鼠肺组织核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)、血红素加氧酶-1(HO-1)和血管内皮生长因子(VEGF)的蛋白表达量及 mRNA 丰度。结果 与阴性对照组比较,模型组 BALF 中炎症细胞总数、中性粒细胞数、单核细胞数量及嗜酸性粒细胞数量均显著上升($P<0.05$),肺部炎症浸润明显,胶原沉积增多,黏液分泌增多,杯状细胞明显增生,同时模型组小鼠血清中 MDA 含量上升($P<0.05$),SOD 活性下降($P<0.05$),肺组织中 Nrf2、HO-1 和 VEGF 的蛋白表达和 mRNA 丰度均有所增加($P<0.05$)。与哮喘模型组比较,ESBP 高剂量组 BALF 中的炎症细胞总数、中性粒细胞、单核细胞和嗜酸性粒细胞数量均显著降低($P<0.05$),ESBP 高、低剂量组肺部病理状况均有所改善,肺组织中 Nrf2 和 HO-1 的蛋白表达量和 mRNA 丰度均增加($P<0.05$),VEGF 的蛋白表达量和 mRNA 丰度被显著下调($P<0.05$)。结论 别克参多糖可减轻哮喘小鼠气道炎症并缓解气道重塑,其机制可能是通过干预体内氧化应激,激活 Nrf2/HO-1 通路和抑制 VEGF 表达实现。

关键词:别克参;多糖;哮喘;氧化应激;Nrf2/HO-1 通路;血管内皮生长因子(VEGF)

中图分类号:R155

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2022)02-0217-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.02.005

Effects of *Erythronium sibiricum* bulb polysaccharides on oxidative stress in asthmatic miceGAO Shanshan¹, ZHOU Yue¹, FENG Yue², YAN Shujing¹, JIN Jin³, YANG Ya¹, CHEN Chunli¹

(1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Xinjiang Urumqi 830011, China;

2. Urumqi Customs District P. R., Xinjiang Urumqi 830011, China;

3. College of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Xinjiang Urumqi 830011, China)

Abstract: Objective To explore the effect of *Erythronium sibiricum* bulb polysaccharides on asthma and its mechanism based on oxidative stress. **Methods** Fifty female BALB/c mice were randomly divided into the negative control group, asthma model group, dexamethasone group, low and high-dose *Erythronium sibiricum* bulb polysaccharides groups. Except the negative control group, the asthma model was established by sensitizing with chicken egg albumin (OVA). The number and classification of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined by a whole blood analyzer. Hematoxylin-eosin (HE), Periodate acid-Schiff (PAS) and Masson staining were used to observe the lung pathology of asthmatic mice. The contents of malondialdehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD) in serum were detected by colorimetry. Determination of protein expression and mRNA abundance of nuclear factor erythroid2-related factor 2(Nrf2), Hemeoxygenase1 (HO-1) and Vascular endothelial growth factor (VEGF) in the lung were detected by immunohistochemistry and real-time fluorescence determination polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Compared with the negative control group, the numbers of total inflammatory cells, neutrophils, monocytes and eosinophils in the BALF of the model group were significantly increased ($P<0.05$), as well as the inflammatory infiltration of lung tissue was obvious. Meanwhile, the collagen deposition and mucus secretion increased along with the hyperplasia

收稿日期:2022-01-05

基金项目:新疆医科大学博士科研启动金(2019-12);新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室(XJDX1713)

作者简介:高珊珊 女 在读研究生 研究方向为新疆特色药材研究 E-mail:1907158065@qq.com

通信作者:陈春丽 女 副教授 研究方向为新疆特色药材研究 E-mail:z2212008@xjmu.edu.cn

of the cup cell. The MDA content was increased ($P < 0.05$) while the SOD activity was inhibited ($P < 0.05$) in the serum of asthmatic mice. The protein expression and mRNA abundance of Nrf2, HO-1 and VEGF in lung tissues were increased ($P < 0.05$) in the model group. Compared with the model group, after administration of *Erythronium sibiricum* bulb polysaccharides, the results of inflammatory cell classification and counting indicated that the total number of inflammatory cells, neutrophils, monocytes and eosinophils were significantly decreased ($P < 0.05$), and the pathological lung conditions were improved. The protein expression levels and mRNA abundance of Nrf2 and HO-1 in lung tissues were increased ($P < 0.05$) while the protein expression and mRNA abundance of VEGF were significantly down-regulated ($P < 0.05$) compared to the model group. **Conclusion** *Erythronium sibiricum* bulb polysaccharides can relieve airway inflammation and airway remodeling in asthma, which may take effect by activating the Nrf2/HO-1 pathway and inhibiting the expression of VEGF.

Key words: *Erythronium Sibiricum*; polysaccharides; asthma; oxidative stress; Nrf-2/HO-1 signaling pathway; vascular endothelial growth factor

哮喘是以炎症反应为主要特征的慢性呼吸系统疾病,目前治疗哮喘最有效的药物仍为糖皮质激素类药物。地塞米松即为临床上治疗哮喘的药物之一^[1],又因其价格较低,被广泛用作哮喘试验研究中的阳性对照药。多项研究显示,氧化应激在哮喘中发挥着重要作用^[2-3],甚至严重性哮喘的无效治疗多归因于氧化应激^[4]。因此,通过抑制氧化应激反应来治疗哮喘或是一种有效的治疗策略。

哮喘的发生通常伴随肺部炎症浸润、气道黏液堆积及胶原沉积等病理改变,因此,苏木素-伊红(Hematoxylin-eosin, HE)、过碘酸希夫(Periodic acid Schiff, PAS)和马松(Masson)作为经典的病理切片染色技术,常被用于观察肺部病理形态改变,直观地反应哮喘的严重程度。核因子 E2 相关因子 2 (Nuclear factor erythroid2-related factor 2, Nrf2)和血红素加氧酶-1(Hemeoxygenase1, HO-1)是氧化应激过程中重要的调节因子,它们在参与身体各部分氧化应激反应的同时,也被证明与哮喘的发生发展有重要关系^[5-6]。血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)不仅是哮喘患者中血管再生和呼吸道杯状细胞增生的重要参与者^[7],也是评估气道上皮炎性损伤的敏感指标^[8]。

多糖作为具有广泛活性的大分子物质,已有多篇文章报道其可通过抑制氧化应激反应起到缓解哮喘的作用^[9-10]。新疆猪牙花[*Erythronium sibiricum* (Fisch. et. Mey.) Kry]是新疆特色药材,也是备受哈萨克民族青睐的药食两用植物之一,其鳞茎(别克参)、嫩叶和花因营养价值颇高,常被烹饪成家常美食或地方特色小吃^[11]。据《哈萨克药志》记载^[12],其鳞茎别克参可用于缓解疼痛和治疗肺部疾病等。本课题组前期研究表明,别克参中所含的多糖成分(*Erythronium sibiricum* bulb polysaccharides, ESBP)具有显著的免疫调节活性^[13-14]、抗炎效果以及一定的抗氧化作用^[15]。哮喘与免疫、炎症及氧化应激均

相关,为了探讨 ESBP 是否可通过影响氧化-抗氧化平衡来治疗哮喘,本试验建立了鸡卵清蛋白(Ovalbumin, OVA)诱导的 Balb/c 哮喘小鼠模型,首次探讨了别克参多糖对哮喘的治疗作用及对 Nrf2/HO-1/VEGF 信号通路的影响,以期能够为别克参的进一步开发利用、尤其是开发为功能性或保健食品奠定试验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物

雌性 Balb/c 小鼠^[16]50 只,体质量 18~22 g, SPF 级,均购于新疆医科大学实验动物中心(许可证号:SYXK(新)2018-0003)。

1.1.2 主要仪器与试剂

402A 超声雾化器(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司),BC-5000 全自动血液分析仪(深圳迈瑞医疗生物电子股份有限公司),Thermo Fisher 全波长酶标仪 1510(赛默飞世尔(中国)仪器有限公司),QuantStudio 型实时荧光定量聚合酶链式反应仪(赛默飞世尔(中国)仪器有限公司),NanoDrop2000 型超微量分光光度计(Thermo Fisher)。

别克参药材产自新疆阿勒泰,经新疆医科大学药学院帕丽达·阿不力孜教授鉴定为百合科猪牙花属新疆猪牙花[*Erythronium sibiricum* (Fisch. et. Mey.) Kry]的鳞茎,鸡卵清蛋白(OVA,美国 Sigma 公司,批号为 SLCB8249),氢氧化铝(美国 Sigma 公司,批号 WXBB1151V),地塞米松磷酸钠注射液(河南润弘制药股份有限公司,批号 2003252),Trizol(Thermo Fisher,批号 15596026),反转录试剂盒(Takara,货号 RR047A),PCR 荧光定量试剂盒(Takara,货号 RR820A),伊红(Hematoxylin and eosin, HE)染液(南京森贝伽生物科技有限公司,批号 200509),糖原 PAS 染色试剂盒(南京森贝伽生物科技有限公司,批

号 191113),超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号 BC0175),丙二醛(Malondialdehyde, MDA)测试盒(南京建成生物工程研究所,货号 A003-1),Nrf2、HO-1 和 VEGF 抗体(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab92946, ab52947, ab32152),免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 ZB-2305)。

1.2 方法

1.2.1 多糖的提取

按照本课题组前期方法获得别克参多糖^[15]。具体操作为:精密称取别克参粗粉,脱脂后取药渣晾干,经热水提取后收集上清液,将上清液浓缩至小体积,加 4 倍体积无水乙醇醇沉过夜,抽滤,取醇沉物于 50 °C 抽真空干燥至恒重,得到别克参多糖(ESBP)。

1.2.2 建模与给药

采用 OVA 致敏法建立哮喘小鼠气道重塑模型^[17-18],将 50 只 Balb/c 小鼠分为阴性对照组、哮喘模型组、地塞米松阳性给药组以及 ESBP 高、低剂量组,每组 10 只。除阴性对照组外,各组小鼠于第 1、7 和 14 天每只腹腔注射致敏液 200 μL(100 μg OVA 和 1 mg 氢氧化铝溶于 200 μL 生理盐水中制成)进行致敏,阴性对照组以生理盐水代替。第 18 天起,除阴性对照组外,其余各组用 5% OVA 超声雾化吸入 30 min,连续 8 周,每周 3 次。第 18 天起,每天给予各组小鼠相应药物灌胃干预。阴性对照及哮喘模型组用相同体积生理盐水灌胃;阳性给药组给予 0.5 mg/kg BW 地塞米松灌胃;根据《哈萨克药志》中别克参给药量(10~30 g/kg BW)、多糖得率以及体表面积换算计算得 ESBP 小鼠给药量,即 ESBP 高、低剂量组分别为 3.6 和 1.8 g/kg BW。末次激发 24 h 后,麻醉处死小鼠,收集血清,半数小鼠取肺泡灌洗液(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF),而另一半取肺组织。

1.2.3 肺组织病理改变

小鼠肺组织于 10% 中性甲醛中充分固定后脱水,行石蜡包埋并制成约 4 μm 厚的切片。将制成的切片脱蜡至水,分别进行 HE、Masson 和 PAS 染色。在光学显微镜下观察,以 HE 染色评价各组小鼠肺部病理改变和炎性细胞浸润情况,Masson 染色评价肺部胶原沉积状况,PAS 染色评价肺部气道黏液分泌及其储存量。

1.2.4 BALF 和血清中的指标检测

用 0.8 mL 冷 PBS 行双肺灌洗并回收洗液,重复灌洗三次,回收率>80%。灌洗液过 200 目细胞筛后离心,轻轻倾倒入 BALF 上清。细胞沉淀经 200 μL PBS 重悬后,采用全自动血液分析仪对其中炎性细胞进行分类及计数。全血分析仪开机后预热 30 min 以上,待全血质控物测试达标后检测待测样本。分别取血清 50 μL 用于测 MDA 含量或 SOD 活性,试验操作严格按照相关指标的试剂盒说明书进行。

1.2.5 肺组织中 Nrf2、HO-1 和 VEGF 的蛋白表达量的测定

肺组织切片经脱蜡至水后清洗,按照免疫组化试剂盒说明书进行抗原修复,消除内源性过氧化物酶,封闭,孵育抗体等。在 200 倍光学显微镜下采图,用医学图像分析软件 Image Pro-plus6.0 测定并分析每张图片中阳性结果的平均光密度值。

1.2.6 肺组织中 Nrf2、HO-1 和 VEGF 的 mRNA 丰度的测定

取小鼠肺组织,在 Trizol 中充分匀浆后提取 RNA 并检测其纯度及浓度。将检测合格的 RNA 去 DNA 后逆转录为 cDNA,RT-PCR 法检测肺组织中 Nrf2、HO-1 和 VEGF 的 mRNA 丰度。PCR 反应参数:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,56 °C 延伸 34 s,40 个循环,反应体系为 10 μL。采用 PCR 仪自带图像分析软件分析相应转录因子的 2^{-ΔΔCt} 值。目的基因及内参基因均由上海生物工程公司设计合成,具体信息如表 1 所示。

表 1 RT-PCR 引物序列
Table 1 Primer sequence of RT-PCR

序号	引物名称	序列	长度/bp
1	GAPDH	上游: CCAATGTGTCCGTCGTGGATC	149
		下游: GTTGAAGTCGCAGGAGACAA	
2	Nrf2	上游: TCTTGGAGTAAGTCGAGAAGTGT	140
		下游: GTTGAAACTGAGCGAAAAAGGC	
3	HO-1	上游: CACAGCACTATGTAAAGCGTCT	80
		下游: GTAGCGGGTATATGCGTGGG	
4	VEGF	上游: GTCATGGATCCAGATGAATTGC	163
		下游: TCTTGTCAATTCCAAAAGCGTC	

1.3 统计学分析

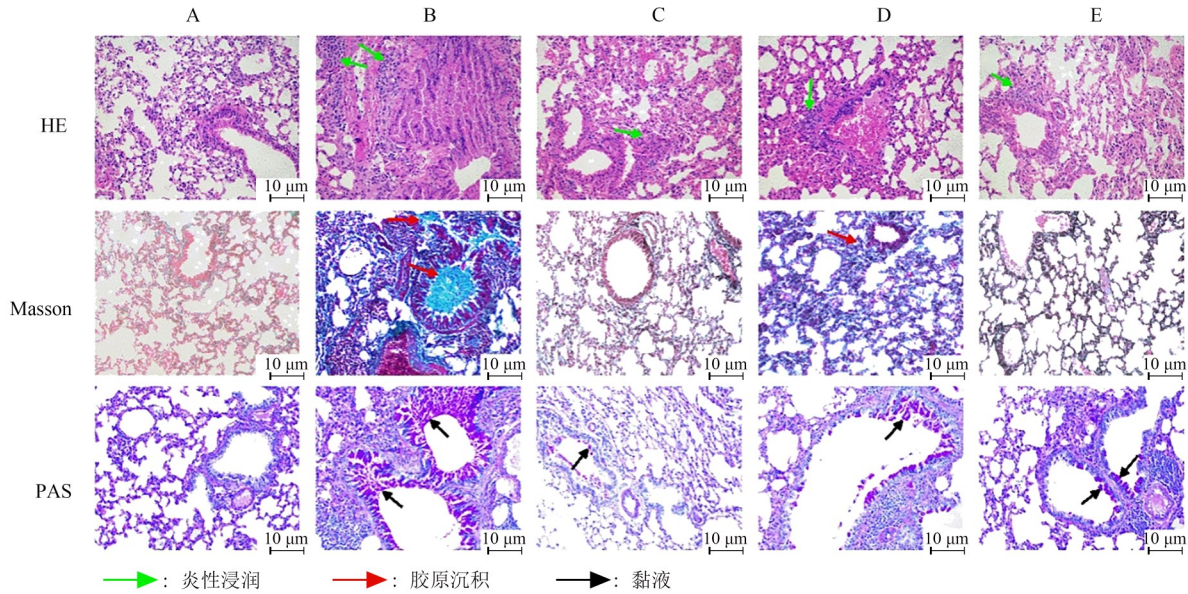
计量资料以“平均值±标准差”表示。数据的统计分析采用 SPSS 23.0 软件,任意两组均数的比较采用单因素方差分析法,方差齐者采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。用 Origin 2018 绘制图片。

2 结果

2.1 ESBP对哮喘小鼠肺部病理状况的影响

肺组织病理学结果如图 1 所示。HE 染色显示阴性对照组气道结构及细胞排列正常,肺泡壁薄、完整且未见变性坏死,气道壁光滑且管壁黏膜规整;与阴性对照组相比,模型组肺组织气道壁明显增生,气管内见粘液分泌物,血管和气道周围均伴有炎性浸润,周围肺泡塌陷结构紊乱,肺泡壁增

厚;与模型组相比,各给药组炎性浸润情况均有所改善,肺泡相对完整,其中 ESBP 高剂量组改善效果明显。Masson 染色结果中,肺部胶原沉积被染为绿色。阴性对照组肺组织结构正常,气道及血管周围伴少量胶原沉积;哮喘模型组小鼠肺组织结构紊乱并伴有较明显条状或大片胶原沉积;各给药组小鼠肺组织结构相对模型组有所改善,但仍可见散在绿色胶原沉积,其中以阳性给药组和 ESBP 高剂量组小鼠肺组织胶原沉积减少明显。PAS 染色主要用于检测细胞中的黏蛋白,结果如图 1 所示,与阴性对照组相比,模型组气道黏蛋白分泌及储存明显增多,气道因而狭窄甚至堵塞;与模型组相比,给药组气道黏液分泌量均有所减少,气道相对较宽,其中阳性给药组和 ESBP 高剂量组改善较显著。



注:A. 阴性对照组;B. 模型组;C. 阳性给药组;D. ESBP 低剂量组;E. ESBP 高剂量组
图 1 ESBP对哮喘小鼠肺组织病理变化的影响(HE, Masson, PAS, ×200)

Figure 1 Effect of ESBP on pathological changes of lung tissue in allergic asthma model mice (HE, Masson, PAS, ×200)

2.2 ESBP对哮喘小鼠肺部炎症情况的影响

BALF 中炎性细胞分类与计数结果如表 2 所示。与阴性对照组相比,模型组小鼠 BALF 中的炎性细胞总数以及淋巴细胞、单核细胞和粒细胞(包括嗜酸、嗜碱、中性)的数量都有所升高,其中炎性细胞总数、中性粒细胞数、单核细胞数量及嗜酸性粒细胞数量的上升量具统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组小鼠相比较,ESBP 高剂量组 BALF 中的炎性细胞总数、中性粒细胞、单核细胞和嗜酸性粒细胞数量都有所降低,差异具有显著性 ($P < 0.05$),多糖低剂量组也可降低哮喘小鼠 BALF 中各类炎性细胞数量,但未显示显著性差异。该试验结果表明 ESBP 可通过减轻肺部炎症

反应缓解哮喘症状。

2.3 ESBP对哮喘小鼠氧化应激的影响

血清中 MDA 水平和 SOD 活性如表 3 所示。与阴性对照组相比,模型组 MDA 含量显著上升 ($P < 0.05$) 的同时 SOD 活性被显著抑制 ($P < 0.05$);与模型组相比,阳性给药组和 ESBP 低、高剂量组 MDA 含量均被显著下调 ($P < 0.05$),而 SOD 活性有所增强,其中阳性给药组和 ESBP 高剂量组差异显著 ($P < 0.05$)。该试验结果显示 ESBP 可抑制哮喘小鼠体内的 MDA 水平,同时增强 SOD 活性。

2.4 ESBP对哮喘小鼠肺组织 Nrf2、HO-1 和 VEGF 的蛋白表达量的影响

免疫组化结果如图 2,由图可见 Nrf2、HO-1 和

表2 BALF中的炎症细胞分类及计数($10^9/L$, $\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 The classification and count of inflammatory cells in BALF ($10^9 \cdot L^{-1}$, $\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量	总细胞数	淋巴细胞	中性粒细胞	单核细胞	嗜酸性粒细胞	嗜碱性粒细胞
阴性对照组	—	0.25±0.07	0.08±0.04	0.06±0.03	0.02±0.02	0.1±0.01	0.00±0.00
模型组	—	1.92±1.75 ^a	0.45±0.65	0.48±0.39 ^a	0.21±0.18 ^a	0.67±0.43 ^a	0.04±0.04
阳性给药组	0.000 5 g/kg	1.52±0.88	0.43±0.60	0.59±0.31 ^a	0.12±0.07	0.35±0.14 ^b	0.03±0.02
ESBP组	低剂量组	1.49±0.72	0.30±0.11	0.41±0.27 ^a	0.17±0.11 ^a	0.48±0.25 ^a	0.00±0.01
	高剂量组	0.30±0.11 ^b	0.09±0.04	0.04±0.02 ^b	0.04±0.03 ^b	0.10±0.05 ^b	0.00±0.00
F(P)值	—	2.87(0.05)	3.88(0.02)	2.91(0.05)	2.89(0.05)	2.63(0.08)	2.31(0.10)

注:^a为与阴性对照组比较, $P<0.05$;^b为与模型组比较, $P<0.05$

表3 ESBP对哮喘小鼠血清MDA和SOD水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

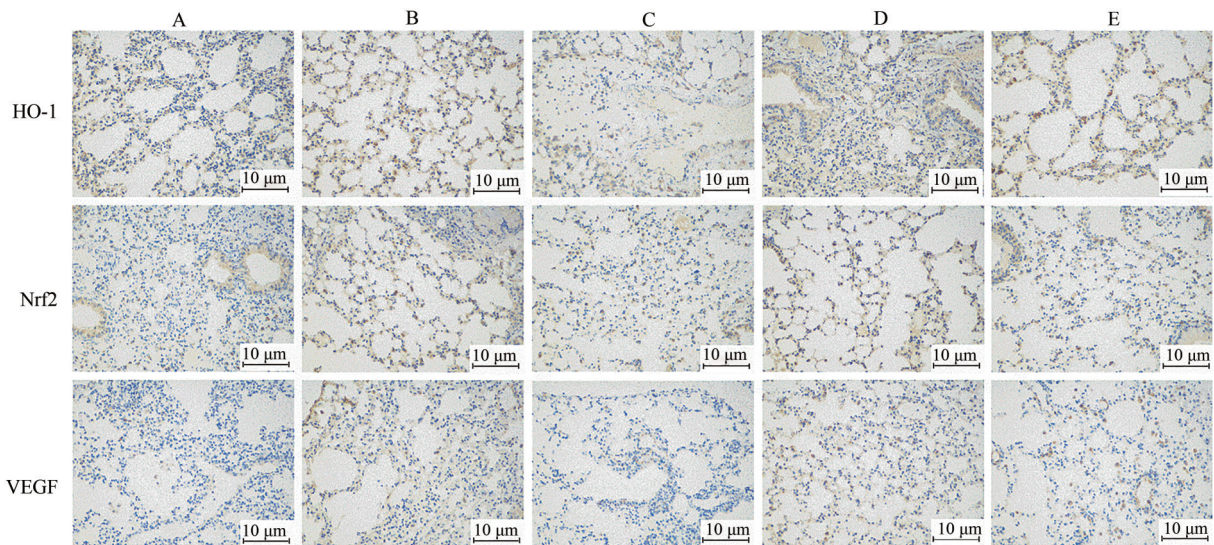
Table 3 Effects of ESBP on levels of MDA and SOD in mice serum ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量	MDA/(mmol/mL)	SOD/(U/mL)
阴性对照组	—	18.54±0.93	10.37±1.34
模型组	—	22.78±0.95 ^a	7.08±0.63 ^a
阳性给药组	0.000 5 g/kg	19.19±0.96 ^b	9.01±1.01 ^b
ESBP组	低剂量组	18.86±1.11 ^b	8.79±0.34
	高剂量组	16.90±1.23 ^b	10.06±1.08 ^b
F(P)值	—	0.85(0.57)	2.16(0.08)

注:^a为与阴性对照组比较, $P<0.05$;^b为与模型组比较, $P<0.05$

VEGF的蛋白表达位置均在肺间质中。表4为免疫组化阳性结果的量化数据。由图2和表4可见,Nrf2蛋白表达量在模型组肺组织中相比阴性对照组显著上升

($P<0.05$),阳性给药组相对模型组下调Nrf2蛋白表达量($P<0.05$),ESBP组低、高剂量组相对模型组均上调了Nrf2蛋白表达量,但仅高剂量组上调差异显著($P<0.05$);另外,模型组肺部HO-1蛋白表达水平相对阴性对照组明显上升($P<0.05$),与模型组比较,阳性给药组HO-1表达量下降,但ESBP低、高剂量组在哮喘模型组基础上进一步显著上调HO-1表达量($P<0.05$);最后,模型组相对阴性对照组VEGF表达量显著上升($P<0.05$),经ESBP或阳性对照药干预后,肺部VEGF蛋白表达量均显著减少($P<0.05$)。以上试验结果表明,ESBP可增加Nrf2和HO-1蛋白表达量并降低VEGF蛋白表达量,而地塞米松(阳性给药组)则同时降低哮喘小鼠Nrf2、HO-1和VEGF的蛋白表达量。



注:A.阴性对照组;B.模型组;C.阳性给药组;D.ESBP低剂量组;E.ESBP高剂量组

图2 ESBP对哮喘小鼠肺组织Nrf2、HO-1和VEGF蛋白表达的影响(免疫组化,×200)

Figure 2 Effect of *Erythronium sibiricum* bulb polysaccharides on expression of Nrf2、HO-1 and VEGF in lung tissue of asthmatic mice (IHC, ×200)

2.5 ESBP对肺组织Nrf2、HO-1和VEGF的mRNA丰度的影响

mRNA丰度数据如表5所示。与阴性对照组相比,模型组Nrf2、HO-1和VEGF mRNA丰度均显著上升($P<0.05$);哮喘小鼠经ESBP干预后,Nrf2 mRNA丰度进一步上调,低、高剂量组上调量均有显著性差异($P<0.05$);与模型组相比,ESBP低、高剂量组HO-1 mRNA丰度进一步上调,但仅高剂量组上

调量有显著性差异($P<0.05$);哮喘小鼠经地塞米松(阳性给药组)干预后,肺部Nrf2和HO-1 mRNA丰度下调,差异具统计学意义($P<0.05$);VEGF mRNA丰度经ESBP或地塞米松(阳性给药组)干预后均被下调($P<0.05$)。该部分试验结果与免疫组化试验结果趋势相同,说明ESBP可促进哮喘小鼠肺部Nrf2和HO-1的表达并抑制VEGF的表达,而地塞米松则同时抑制Nrf2、HO-1和VEGF的表达。

表4 ESBP对哮喘小鼠肺组织Nrf2、HO-1和VEGF蛋白表达量的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)Table 4 Effect of *Erythronium sibiricum* bulb polysaccharides on protein expressions of Nrf2、HO-1 and VEGF in lung tissue of asthma mice($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量	Nrf2	HO-1	VEGF
阴性对照组	—	6.79±0.50	5.76±0.67	4.42±0.55
模型组	—	8.95±0.76 ^a	8.43±1.56 ^a	9.95±1.17 ^a
阳性给药组	0.000 5 g/kg	6.72±0.24 ^b	7.79±0.96 ^a	3.75±0.48 ^b
ESBP组	低剂量组	11.24±0.60 ^a	8.52±2.01 ^a	6.74±0.74 ^b
	高剂量组	12.73±1.11 ^{ab}	13.71±0.67 ^{ab}	5.94±0.55 ^b
F(P)值	—	3.57(0.05)	1.00(0.45)	1.57(0.26)

注:^a为与阴性对照组比较, $P<0.05$;^b为与模型组比较, $P<0.05$

表5 ESBP对哮喘小鼠肺组织Nrf2、HO-1和VEGF mRNA丰度的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)Table 5 Effect of *Erythronium sibiricum* bulb polysaccharides on mRNA abundance of Nrf2、HO-1 and VEGF in lung tissue of asthma mice($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量	Nrf2	HO-1	VEGF
阴性对照组	—	1.00±0.08	1.00±0.19	1.00±0.07
模型组	—	1.13±0.26 ^a	1.27±0.09 ^a	1.68±0.08 ^a
阳性给药组	0.000 5 g/kg	1.00±0.10 ^b	0.91±0.16 ^{ab}	0.31±0.07 ^{ab}
ESBP组	低剂量组	1.14±0.04 ^{ab}	1.34±0.09 ^a	0.56±0.18 ^{ab}
	高剂量组	1.59±0.04 ^{ab}	1.85±0.53 ^{ab}	0.51±0.24 ^{ab}
F(P)值	—	1.28(0.34)	1.77(0.20)	3.10(0.06)

注:^a为与阴性对照组比较, $P<0.05$;^b为与模型组比较, $P<0.05$

3 讨论

气道炎症是哮喘发病的基础,当哮喘患者接触到过敏原后,体内淋巴细胞被迅速激活并引起炎性细胞募集,进而发生气道炎性细胞渗出。同时,气道胶原沉积、杯状细胞增生及黏液分泌增多也是哮喘的典型症状,且该类病变可直接促进气道高反应性的发生及气道重塑的发展。本试验中,与阴性对照组相比,哮喘模型组BALF中炎性细胞总数明显上升,HE染色结果显示模型组小鼠肺部出现多处炎性浸润及气道结构损坏等现象,这表明哮喘小鼠肺部发生气道炎症。Masson染色结果显示,相对阴性对照组,模型组小鼠肺部气道黏膜下、肺泡壁和肺间质有大量胶原沉积,肺纤维化严重;PAS染色结果提示模型组气道中含大量黏液分泌物,杯状细胞明显增生导致气道狭窄甚至堵塞,发生气道重塑。上述结果表明OVA诱发的哮喘建模成功。ESBP在OVA诱发哮喘的基础上,减少了BALF中炎性细胞总数以及中性粒细胞、单核细胞和嗜酸性粒细胞的数量;ESBP给药组小鼠肺部炎性浸润、胶原纤维沉积及黏液分泌等病理状态得到明显改善,这说明ESBP可缓解哮喘引发的气道炎症并改善肺部的气道重塑。

氧化应激是哮喘的一个重要组成部分,哮喘中的氧化应激可导致氧化-抗氧化失衡。机体氧化-抗氧化失衡又可引发一系列应激反应进而加重哮喘,如组织损伤、气道炎症加重、气道高反应增强等^[19]。因此,抑制机体氧化应激、调节机体氧化-抗氧化的平衡对哮喘的治疗至关重要^[20]。研究表明氧化应

激与脂质过氧化程度密切相关,MDA含量即可反应机体内脂质过氧化的程度,而抗氧化酶SOD的活力间接反应了机体清除氧自由基的能力^[21]。本试验从抗氧化应激的角度研究了ESBP对哮喘的治疗作用,结果表明ESBP可下调MDA含量并增强SOD的活力,即抑制机体氧化应激的同时增强抗氧化能力,提示ESBP可通过调节机体氧化-抗氧化平衡来缓解哮喘症状。

进一步考察ESBP抗氧化应激反应潜在的分子机制。Nrf2/HO-1通路可通过抗氧化方式干预机体氧化应激。当Nrf2受到外来刺激时,Nrf2被激活进而调节炎症相关的基因转录并进一步激活下游因子HO-1^[21-22]。HO-1能够抑制哮喘中的气道炎症和氧化应激并且减少气道内黏液的分泌^[23]。由此,Nrf2和HO-1表达的上调有利于减轻哮喘过程中的氧化应激及炎症反应。而哮喘中炎症的反复可直接导致气道重塑的发生,VEGF作为气道重塑的经典标志物,具有促进气道血管内皮因子增殖,增加血管通透性,促进炎症因子活化等作用,在哮喘发作时呈现高表达。本试验考察了各组哮喘小鼠肺组织Nrf2、HO-1和VEGF蛋白表达量和mRNA丰度,试验结果显示各指标蛋白表达量和mRNA丰度的趋势一致。与阴性对照组相比,模型组小鼠肺部Nrf2和HO-1表达量明显增加,说明哮喘激发了小鼠肺部氧化应激反应,其相应抗氧化作用也有所增加。ESBP在模型组的基础上,进一步上调哮喘小鼠肺部Nrf2和HO-1的表达量,即进一步增强了哮

喘小鼠抗氧化能力,该研究结果与枸杞多糖、当归多糖的作用机制一致^[24]。最后,ESBP抑制了哮喘小鼠肺组织中 VEGF 的表达,这可能是 ESBP 缓解气道重塑的机制之一。

地塞米松是本试验中的阳性对照药,由 BALF 炎性细胞分类计数及病理切片的结果可知,地塞米松可显著抑制哮喘小鼠肺部炎症反应、胶原沉积和黏液堆积,起到了明显抗哮喘作用。在 MDA 和 SOD 的检测中,地塞米松同样降低了 MDA 水平并增强了 SOD 活性,说明地塞米松亦可缓解哮喘过程中的氧化-抗氧化失衡,该试验结果与蔡梓民等^[10, 25]研究报道相一致。但在分子机制方面,地塞米松下调了哮喘小鼠肺部 Nrf2 和 HO-1 的表达量,即抑制了哮喘小鼠肺部的抗氧化作用,这也和已有报道结果一致^[26]。有学者认为地塞米松等糖皮质激素抑制机体的抗氧化能力,机制可能与糖皮质激素受体能够通过减少 Nrf2 依赖的组蛋白乙酰化来降低 Nrf2 的转录激活有关^[27]。也有学者报道地塞米松缓解机体氧化-抗氧化失衡与激活雄甾烷受体有关^[28]。

综上所述,本研究表明别克参多糖 ESBP 可通过抑制肺部炎症和缓解气道重塑发挥抗哮喘的作用,其相关机制可能与调节体内氧化-抗氧化平衡,激活 Nrf2/HO-1 通路并抑制 VEGF 表达有关,其作用机制与地塞米松略有不同。

参考文献

- [1] 翟建宾,赵亮,于士昌,等.桑苏饮调控TLR4通路抑制哮喘大鼠气道炎症[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(14):21-28.
- ZHAI J B, ZHAO L, YU S C, et al. Inhibitory effect of sangsuyin on airway inflammation in asthmatic rats by regulating TLR4 pathway [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2021, 27(14): 21-28.
- [2] WU D, LI S Q, LIU X, et al. Alpinetin prevents inflammatory responses in OVA-induced allergic asthma through modulating PI3K/AKT/NF- κ B and HO-1 signaling pathways in mice [J]. International Immunopharmacology, 2020, 89: 107073.
- [3] JAMES B N, OYENIRAN C, STURGILL J L, et al. Ceramide in apoptosis and oxidative stress in allergic inflammation and asthma [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2021, 147(5): 1936-1948.e9.
- [4] MISHRA V, BANGA J, SILVEYRA P. Oxidative stress and cellular pathways of asthma and inflammation: therapeutic strategies and pharmacological targets [J]. Pharmacology & Therapeutics, 2018, 181: 169-182.
- [5] 延光海,孙天一,咸哲民,等.朝医麻黄定喘汤对支气管哮喘模型小鼠 p38MAPK/Nrf2/HO-1 信号通路的影响[J].中医杂志,2019,60(10):881-886.
- YAN G H, SUN T Y, XIAN Z M, et al. Effects of traditional korean medicine mahuang dingchuan decoction on p38 MAPK/Nrf2/HO-1 signaling pathway in bronchial asthma model mice [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2019, 60(10): 881-886.
- [6] 赵雨喆,姜京植,叶晶,等.虎杖苷通过 p38 MAPK/Nrf2/HO-1 通路减轻小鼠哮喘模型气道炎症[J].中国药理学通报,2018,34(6):851-856.
- ZHAO Y Z, JIANG J Z, YE J, et al. Polydatin attenuates airway inflammation in asthmatic mouse model via p38 MAPK/Nrf2/HO-1 pathway [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2018, 34(6): 851-856.
- [7] 孟泳.肥胖对哮喘大鼠呼吸道粘蛋白 Muc5ac 与 VEGF 的影响[J].医药论坛杂志,2020,41(12):9-13.
- MENG Y. Effect of obesity on MUC5ac and VEGF in respiratory tract of asthmatic rats [J]. Journal of Medical Forum, 2020, 41(12): 9-13.
- [8] 付群,郭迪,赵文飞.哮喘-慢阻肺重叠、哮喘和慢性阻塞性肺病患者诱导痰 VEGF、ICAM-1、IL-13、呼出气一氧化氮水平的变化及临床意义[J].临床荟萃,2021,36(6):513-516.
- FU Q, GUO D, ZHAO W F. VEGF, ICAM-1, IL-13, FeNO level of induced sputum on asthma, asthma-copd overlap, and chronic obstructive pulmonary disease in patients: clinical changes and significance [J]. Clinical Focus, 2021, 36(6): 513-516.
- [9] LU Y, XING Q Q, XU J Y, et al. Astragalus polysaccharide modulates ER stress response in an OVA-LPS induced murine model of severe asthma [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 93: 995-1006.
- [10] SHU D, SHI G, GUO J. Lyciumbarbarum polysaccharide pretreatment mitigates cigarette smoke extract-induced oxidative stress in normal human bronchial epithelial cells through regulating Nrf2/Bach1 pathway [J]. International Journal Of Clinical And Experimental Medicine, 2019, 12(2): 1622-1630.
- [11] 古丽江·贾曼拜,何春霞,古力西拉·沙普西,等.新疆猪牙花的应用价值与影响开发利用的因素[J].新疆林业,2012(3):32-33.
- JIABAIMAN G, HE C X, SHAPUXI G, et al. Xinjiang zhu ya hua de ying yong jia zhi yu ying xiang kai fa li yong de yin su [J]. Forestry of Xinjiang, 2012(3): 32-33.
- [12] 徐新,巴哈尔古丽·黄尔汗.哈萨克药志(第一册)[M].北京:民族出版社,2009:397-399
- XU X and HUANGERHAN B. Hasakey Aoyongzhiwuzhi (Volume One) [M]. Beijing: The Ethnic Publishing House, 2009: 397-399
- [13] CHEN C L, XIE X Y, LI X. Immunomodulatory effects of four polysaccharides purified from *Erythronium sibiricum* bulb on macrophages [J]. Glycoconjugate Journal, 2021, 38(4): 517-525.
- [14] ZHOU Y, YAN S J, GAO S S, et al. Optimization of the composite enzyme extraction of polysaccharide from *Erythronium sibiricum* bulb and its immunoregulatory activities [J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2021: 1-10.
- [15] CHEN C L, KASIMU R, XIE X Y, et al. Optimised extraction of *Erythronium sibiricum* bulb polysaccharides and evaluation of their bioactivities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 82: 898-904.
- [16] 郑凌霄,于芬芳,刘曼曼,等.哮喘小鼠动物模型的建立与评价[J].热带病与寄生虫学,2017,15(4):244-247.

- ZHENG L X, YU F F, LIU M M, et al. Xiao chuan xiao shu mo xing de jian li yu ping jia [J]. Journal of Tropical Diseases and Parasitology, 2017, 15(4): 244-247.
- [17] 姚欢欢, 陈吉, 李岚. 桔梗多糖对哮喘小鼠气道炎症和气道重塑的影响 [J]. 中国中医药科技, 2020, 27(5): 701-707.
YAO H H, CHEN J, LI L. Effects of *Platycodon grandiflorum* polysaccharide (PGP) on airway inflammation and remodeling in asthmatic mice [J]. Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology, 2020, 27(5): 701-707.
- [18] 张胜碧, 刘燕玲, 李岚. 地龙提取液对卵清蛋白诱导哮喘小鼠气道重塑及肺组织 MMP2、MMP9、TIMP-1 表达的影响 [J]. 中国新药与临床杂志, 2021, 40(7): 523-530.
ZHANG S B, LIU Y L, LI L. Effects of earthworm extract on airway remodeling and expression of MMP2, MMP9 and TIMP-1 in lung tissues of asthmatic mice induced by ovalbumin [J]. Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies, 2021, 40(7): 523-530.
- [19] 王斐, 车春莉. 氧化应激机制在支气管哮喘中的研究进展 [J]. 临床肺科杂志, 2021, 26(9): 1443-1447.
WANG F, CHE C L. Yang hua ying ji ji zhi zai zhi qi guan xiao chuan zhong de yan jiu jin zhan [J]. Journal of Clinical Pulmonary Medicine, 2021, 26(9): 1443-1447.
- [20] 章成伟, 林瑾. 孟鲁司特联合维生素 D 制剂对支气管哮喘患儿肺功能、氧化-抗氧化失衡和生活质量的影响 [J]. 儿科学杂志, 2021, 27(1): 30-35.
ZHANG C W, LIN J. Effects of montelukast combined with vitamin D preparations on pulmonary function, oxidation-antioxidant imbalance and quality of life in children with bronchial asthma [J]. Journal of Pediatric Pharmacy, 2021, 27(1): 30-35.
- [21] 楚荷莹, 王峰, 白勇, 等. 金雀异黄酮对幼龄哮喘大鼠 TGF- β /Nrf2/HO-1 信号通路及气道重塑的影响 [J]. 热带医学杂志, 2021, 21(5): 580-585, 673.
CHU H Y, WANG F, BAI Y, et al. Effects of genistein on TGF- β /Nrf2/HO-1 signaling pathway and airway remodeling in young asthmatic rats [J]. Journal of Tropical Medicine, 2021, 21(5): 580-585, 673.
- [22] 徐畅, 宋艺兰, 姜京植, 等. 川芎嗪通过 AMPK/NF- κ B 和 Nrf-2/HO-1 途径减轻过敏性气道炎症和氧化应激的实验研究 [J]. 免疫学杂志, 2021, 37(2): 100-106.
XU C, SONG Y L, JIANG J Z, et al. Ligustrazine reduces allergic airway inflammation and oxidative stress through AMPK/NF- κ B and Nrf-2/HO-1 pathways [J]. Immunological Journal, 2021, 37(2): 100-106.
- [23] 宋冬梅, 牛英豪, 于磊, 等. 乌司他丁通过 Nrf2/HO-1 抗氧化途径在 OVA 诱导的支气管哮喘小鼠中发挥治疗作用 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(12): 1713-1720.
SONG D, NIU Y, YU L, et al. Ulinastatin induces Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress in ovalbumin-induced murine asthma model [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2014, 30(12): 1713-1720.
- [24] 张艳, 陈丽, 李金娟, 等. 当归多糖对哮喘幼龄小鼠抗氧化系统的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(17): 2312-2315.
ZHANG Y, CHEN L, LI J J, et al. Effect of angelica sinensis polysaccharide on antioxidant system in asthmatic young mice [J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2021, 37(17): 2312-2315.
- [25] 蔡梓民, 彭剑青, 陈艺, 等. 艳山姜挥发油肺部定量给药用于缓解肺气肿的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(3): 91-97.
CAI Z M, PENG J Q, CHEN Y, et al. Quantitative pulmonary administration of essential oil from *alpinia zerumbet* fructus for treatment of emphysema [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2022, 28(3): 91-97.
- [26] 薛坤娇, 阮玲瑛, 胡婕, 等. 糖皮质激素调控 Keap1-Nrf2 通路减轻哮喘小鼠肺氧化应激反应的作用研究 [J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(8): 807-814.
XUE K J, RUAN L Y, HU J, et al. Glucocorticoid regulates Keap1-Nrf2 pathway to relieve pulmonary oxidative stress in asthmatic mice [J]. Journal of Third Military Medical University, 2020, 42(8): 807-814.
- [27] ALAM M M, OKAZAKI K, NGUYEN L T T, et al. Glucocorticoid receptor signaling represses the antioxidant response by inhibiting histone acetylation mediated by the transcriptional activator NRF2 [J]. Journal of Biological Chemistry, 2017, 292(18): 7519-7530.
- [28] GABBIA D, POZZO L, ZIGIOTTO G, et al. Dexamethasone counteracts hepatic inflammation and oxidative stress in cholestatic rats via CAR activation [J]. PLoS One, 2018, 13(9): e0204336.