

· 基础医学 ·

葛根素抑制支气管哮喘小鼠气道炎症和 TSLP 介导的 Th2 免疫作用的研究

王文璐^{1,2}, 何 权², 周林福^{2*}

¹南京大学医学院附属泰康仙林鼓楼医院发热门诊, 江苏 南京 210093; ²南京医科大学第一附属医院呼吸与危重症医学科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的: 研究葛根素对慢性哮喘小鼠模型气道炎症和 Th2 免疫的影响及其机制。方法: 将 BALB/c 小鼠 32 只随机均分为正常组、哮喘组、葛根素组和布地奈德组, 每组 8 只。除正常组外, 其余各组采用卵白蛋白(ovabumin, OVA)致敏和激发, 连续 12 周, 建立慢性哮喘小鼠模型。末次激发 24 h 后, 使用小鼠肺功能仪进行气道反应性测定, 苏木精-伊红(HE)染色观察肺组织炎性细胞浸润情况, 过碘酸雪夫(PAS)染色观察杯状细胞增生情况, 用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测 4 组小鼠血清总 IgE 和支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中 Th2 细胞因子(白介素-4、白介素-13)水平。Western blot 观察肺组织胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)的蛋白表达。结果: 与正常组比较, 葛根素组、布地奈德组、哮喘组气道阻力、气道炎症, 血清总 IgE, BALF 中白介素-4、白介素-13 以及肺组织 TSLP 蛋白表达明显增高($P < 0.05$)。与哮喘组比较, 葛根素组、布地奈德组各项观测指标均明显降低($P < 0.05$)。葛根素组和布地奈德组气道 PAS 阳性上皮细胞数/支气管较哮喘组下降($P < 0.05$)。结论: 葛根素抑制慢性哮喘小鼠气道炎症、气道高反应性和 Th2 免疫, 这可能与抑制 TSLP 的表达有关。

[关键词] 葛根素; 哮喘; 气道炎症; Th2 免疫; 胸腺基质淋巴细胞生成素

[中图分类号] R562.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2022)10-1371-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20221004

The inhibitory effects of puerarin on airway inflammation and TSLP-induced Th2 immunity in a murine model of chronic asthma

WANG Wenlu^{1,2}, HE Quan², ZHOU Linfu^{2*}

¹Fever Clinic, Affiliated Taikang Xianlin Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210093; ²Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effects of puerarin on airway inflammation and Th2 immunity in a murine model of chronic asthma. **Methods:** Thirty-two female BALB/c mice were randomly divided into four groups, including the control group, the ovabumin (OVA) group, the puerarin group, and the budesonide group, 8 mice in each group. In the latter three groups, chronic asthmatic models were established by OVA allergy and activation for 12 weeks. Twenty-four hours after the last airway provocation, acetylcholine (Ach) was administered via caudalis vein to measure airway resistance by pulmonary function detector. The airway inflammation and hypersecretion in the lung were assessed by hematoxylin & eosin (HE) and periodic acid Schiff (PAS) staining, respectively. The levels of interleukin (IL)-4 and IL-13 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and total immunoglobulin E (IgE) in serum were measured by ELISA. The protein expression of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) was determined by Western blot. **Results:** As compared with the control group, the airway hyperreactivity, airway inflammation, cell count and eosinophil percentage in

[基金项目] 国家重点研发计划(2018YFC1313600); 国家自然科学基金重点国际(地区)合作研究(81820108001); 国家自然科学基金(81670029); 江苏省医学重点人才项目(ZDRCA2016018); 江苏省“333”高层次人才工程第二层次培养对象(BRA2019078)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lfzhou@njmu.edu.cn

BALF, levels of total serum IgE and BALF IL-4 and IL-13, and TSLP expression in the lung were significantly increased in the asthma group ($P < 0.05$). As compared with the asthma group, all the above indices mentioned in the puerarin group and the budesonide group were decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Puerarin alleviates the airway inflammation, hyperresponsiveness, and Th2 immunity by down-regulating the expression levels of TSLP in a chronic experimental asthma.

[Key words] puerarin; asthma; airway inflammation; Th2 immunity; thymic stromal lymphopoietin

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(10): 1371-1375, 1408]

支气管哮喘(哮喘)是多基因参与的具有遗传易感性的慢性气道炎症性疾病,其发病涉及多种炎症细胞、炎症介质和复杂的细胞因子网络,以血清IgE增高、肺组织嗜酸性粒细胞(eosinophils, EOS)浸润和气道高反应性为显著的临床特征^[1]。来源于上皮细胞的胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)在哮喘患者体内高表达^[2],并在Th1/Th2免疫失衡中起重要作用。哮喘患者气道活检显示,TSLP和Th2细胞因子在哮喘患者气道上皮细胞和固有层高表达,尤其见于气道阻塞性疾病病情较重的患者^[3]。原位杂交发现TSLP在哮喘气道高表达,与疾病的严重程度和Th2炎症趋化因子表达密切相关^[9]。上皮源性TSLP在变应性哮喘的发生发展中起着重要作用^[4-5]。TSLP基因多态性与哮喘和过敏症相关联。靶向抑制TSLP信号通路有助于阻断哮喘发展^[4]。

葛根素是从豆科植物葛根的根部提取的一种异黄酮,它的主要化学成分为4,7-二羟基-8甲-D葡萄糖基异黄酮,是葛根中含量较多的异黄酮之一。葛根素作为一种中草药,据《神农本草经》记载,有解肌退热、透发麻疹、生津止渴、升阳止泻等功效。葛根素已用于治疗多种疾病,具有保护神经、降糖、抗氧化应激、抗过敏、改善血循环及抗骨质疏松作用^[6]。近来,国内学者研究发现葛根素可以通过抑制核因子(nuclear factor, NF)- κ B、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 信号通路减轻抗原诱导的气道炎症和气道高反应性^[7]。本研究通过建立哮喘小鼠模型,观察葛根素对气道炎症、气道高反应性和Th2免疫以及TSLP表达的影响,旨在从分子水平探讨葛根素治疗哮喘的可能作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

6~8周龄SPF级BALB/c雌性小鼠32只,体重(20 \pm 2)g,购自北京维通利华实验动物有限公司,交由南京医科大学动物实验中心饲养[动物许可证编

号:SYXK(苏)2013-0016]。该方案经南京医科大学动物实验伦理委员会批准,实验动物在麻醉下进行所有手术,并尽一切努力最大限度减少其疼痛、痛苦和死亡。葛根素(南京中医药大学心血管药理实验室提供);吸入性布地奈德混悬液(Astra Zeneca公司,英国);TSLP多克隆抗体(Abcam公司,美国);IL-4和IL-13 ELISA试剂盒(R&D公司,美国);IgE ELISA试剂盒(BPB公司,美国); β -actin多克隆抗体(南京凯基生物公司)。小鼠肺功能仪(北京鑫澳成科技有限公司);低温高速离心机(Eppendorf公司,德国);勃林格殷格翰超声雾化器(南京道森科技有限公司);自制小鼠雾化吸入箱。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和哮喘模型建立

BALB/c雌性小鼠随机分为4组,每组8只,即正常组、哮喘组、葛根素组和布地奈德组。模型建立参照文献的方法^[8]。布地奈德组雾化吸入布地奈德混悬液6 mL,30 min后予卵白蛋白(ovabumin, OVA)雾化。正常组予生理盐水腹腔注射及雾化。葛根素组激发前30 min给予50 mg/kg葛根素溶液(溶解于生理盐水)灌胃,每天1次,连续9 d。正常组和哮喘组分别在激发前30 min给予腹腔注射1% DMSO。

1.2.2 呼气阻力测定

小鼠最后次雾化24 h后,在戊巴比妥钠70 mg/kg麻醉下行气管插管,设置呼吸机潮气量6 mL/kg,呼吸频率为90次/min,吸呼比为1:1。静注氯化乙酰胆碱(ACh,剂量分别为10、30、90、270 μ g/kg,泵入),连续记录激发前、后的呼气阻力(Re)值。

1.2.3 酶联免疫吸附实验

OVA末次激发24 h后,处死小鼠,立即摘眼球取血,4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min离心15 min获取血清。用1 mL PBS液行支气管肺泡灌洗,回收率均 $>$ 85%。BALF 4 $^{\circ}$ C、1 500 r/min离心10 min,收集上清。ELISA法检测血清总IgE、BALF液中白介素(interleukin, IL)-4和IL-13含量,具体步骤按试剂盒说明书进行。在

酶标仪波长 450 nm 上读取吸光度值,通过标准曲线换算成相应浓度,结果以 pg/mL 表示。IgE、IL-4、IL-13 测定的最小限值分别为 1、4、7 pg/mL。

1.2.4 肺组织病理学检查

用颈椎脱臼方法处死小鼠后,取小鼠左上肺,予 4% 多聚甲醛固定,HE 染色观察气道炎症浸润情况。瑞氏染色计数细胞总数和 EOS 百分比。

PAS 染色方法:取小鼠右上肺,切片常规脱蜡入水,予 3% 醋酸液洗 2 min,加入 1% 阿利新兰醋酸液 (pH2.5) 10~20 min,蒸馏水洗,予 0.5% 过碘酸水溶液 5 min,蒸馏水洗,70% 酒精洗,Schiff 氏液 15~30 min (Schiff 氏液从冰箱取出升至室温使用),流水冲洗 10 min,苏木素淡染 2~3 min,水洗,常规脱水、封片。观察杯状细胞增生情况。

1.2.5 肺组织 TSLP 蛋白表达水平测定

从肺组织中提取细胞总蛋白,测蛋白总浓度。用 10% SDS-PAGE 电泳,分离蛋白质经电转印将蛋白质转移到 PVDF 膜上,4 °C 封闭过夜,分别加一抗,平摇,洗膜,加二抗,化学发光显影。计算 TSLP 相对表达量作为肺组织 TSLP 表达水平。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。计量数据用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 葛根素对哮喘小鼠肺功能的影响

各组小鼠均分别予 Ach 10、30、90、270 $\mu\text{g/mL}$ 激发,气道反应性检测结果显示,哮喘组、葛根素组、布地奈德组平均 Re 值均高于正常组 ($P < 0.05$),并随 Ach 浓度增加而增高。葛根素组和布地奈德组较哮喘组降低 ($P < 0.05$),葛根素组和布地奈德组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$,表 1)。

2.2 葛根素对血清总 IgE 及 BALF IL-4、IL-13 的影响

哮喘组血清总 IgE、BALF IL-4 和 IL-13 水平较正常组升高 ($P < 0.05$)。葛根素组和布地奈德组较哮喘组降低 ($P < 0.05$),葛根素组和布地奈德组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$,表 2)。

2.3 各组小鼠 BALF 炎症细胞计数和分类计数比较

哮喘组 BALF 细胞总数和 EOS 较正常组显著增加 ($P < 0.01$)。葛根素组和布地奈德组 BALF 总细胞数和 EOS 较哮喘组显著减少 ($P < 0.05$)。葛根素组和布地奈德组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$,表 3)。

2.4 葛根素对哮喘小鼠气道炎症的抑制作用

HE 染色显示,正常组无炎症细胞浸润,而哮喘组小鼠气道炎症细胞浸润显著增多,葛根素组、布地奈德组气道炎症和 BALF 炎症细胞募集均显著低于哮喘组 ($P < 0.05$,表 3、图 2)。

表 1 各组小鼠在不同浓度乙酰胆碱刺激后的气道阻力比较

Table 1 Comparison of airway resistance of mice treated with different concentrations of acetylcholine in four groups

[$\text{cmH}_2\text{O}/(\text{mL}\cdot\text{s}), \bar{x} \pm s, n = 8$]

组别	基础值	乙酰胆碱浓度			
		10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	30 $\mu\text{g}/\text{kg}$	90 $\mu\text{g}/\text{kg}$	270 $\mu\text{g}/\text{kg}$
正常组	1.36 ± 0.17	3.24 ± 0.19	3.92 ± 1.19	4.53 ± 1.34	7.16 ± 1.83
哮喘组	1.42 ± 0.23	3.39 ± 0.16	7.22 ± 1.86*	11.20 ± 2.40*	22.78 ± 4.77*
葛根素组	1.38 ± 0.17	3.37 ± 0.16	5.32 ± 1.18 [#]	8.27 ± 1.67 [#]	13.67 ± 2.22 [#]
布地奈德组	1.45 ± 0.13	3.37 ± 0.22	4.63 ± 1.57 [#]	7.38 ± 2.00 [#]	12.35 ± 3.00 [#]

与哮喘组相比,* $P < 0.05$;与正常组相比,[#] $P < 0.01$ 。

表 2 各组小鼠 BALF IL-4、IL-13 和血清总 IgE 水平比较

Table 2 Comparison of BALF IL-4, IL-13 and serum total IgE levels in four groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	BALF (pg/mL)		血清总 IgE (ng/mL)
	IL-4	IL-13	
正常组	21.96 ± 4.28	11.02 ± 2.82	120.76 ± 33.14
哮喘组	123.80 ± 28.36*	45.44 ± 7.04*	656.83 ± 73.12*
葛根素组	49.86 ± 8.43 [#]	23.66 ± 5.02 [#]	223.64 ± 69.82 [#]
布地奈德组	47.20 ± 8.20 [#]	21.16 ± 5.38 [#]	278.29 ± 64.87 [#]

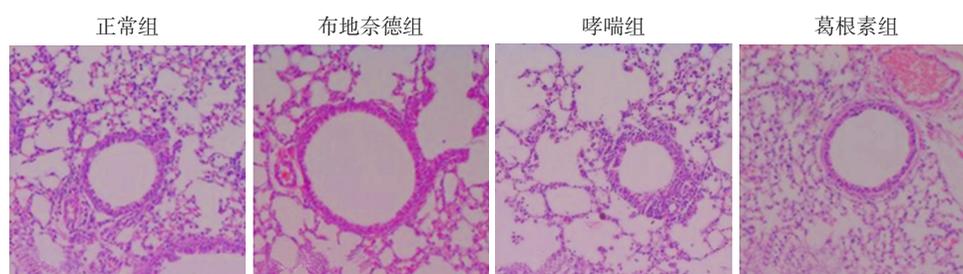
与哮喘组相比,* $P < 0.05$;与正常组相比,[#] $P < 0.01$ 。

表3 各组小鼠BALF总细胞数及细胞分类

Table 3 Total cell number and cell classification of BALF in four groups

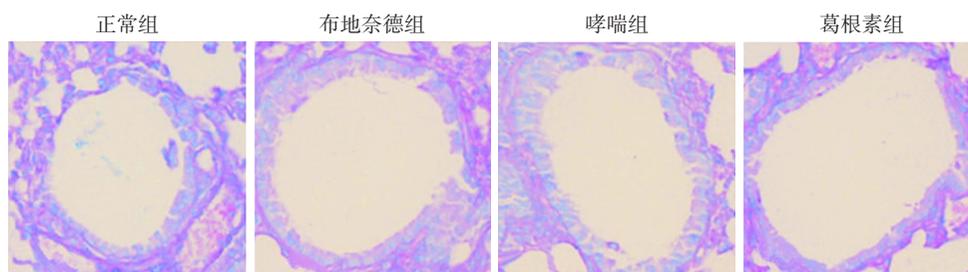
组别	($\times 10^4$ 个/mL, $\bar{x} \pm s, n = 8$)				
	细胞总数	巨噬细胞	嗜酸性粒细胞	淋巴细胞	中性粒细胞
正常组	20.0 \pm 4.0	17.7 \pm 2.2	0.4 \pm 0.1	0.5 \pm 0.2	0.5 \pm 0.1
哮喘组	135.4 \pm 20.0*	30.5 \pm 4.0	49.5 \pm 7.1*	40.8 \pm 5.5	11.6 \pm 3.1
葛根素组	50.2 \pm 8.5#	13.0 \pm 2.2	15.1 \pm 2.4#	11.4 \pm 1.6	6.1 \pm 1.4
布地奈德组	43.5 \pm 5.9#	15.4 \pm 2.2	12.3 \pm 1.8#	9.3 \pm 1.4	6.8 \pm 0.8

与哮喘组相比,* $P < 0.05$;与正常组相比,# $P < 0.01$ 。

图2 HE染色($\times 100$)Figure 2 HE staining($\times 100$)

PAS染色显示,正常组小鼠气道内PAS阳性上皮细胞极少,哮喘组与正常组小鼠相比,可见气道黏液高分泌,气管壁PAS阳性上皮细胞明显增加,杯状细胞增生($P < 0.01$);葛根素组和布地奈德治

疗组与哮喘组相比,杯状细胞增生减轻,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明药物干预均有效;葛根素组和布地奈德治疗组之间差异无统计学意义($P > 0.05$,图3)。

图3 PAS染色($\times 200$)Figure 3 PAS staining($\times 200$)

2.5 葛根素对肺组织TSLP蛋白表达水平的影响

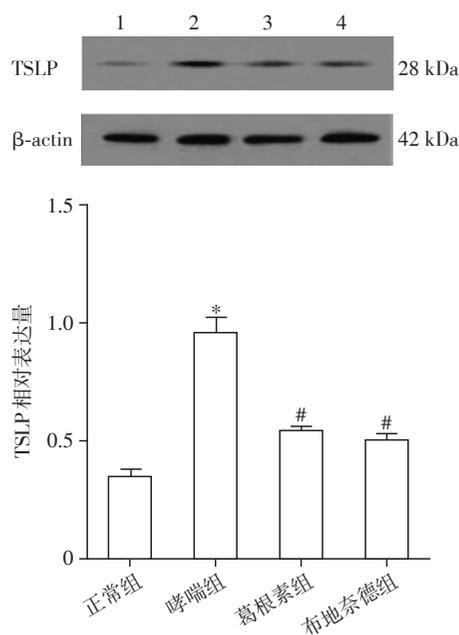
正常组TSLP低表达,哮喘组TSLP表达较正常组增加($P < 0.05$),葛根素组和布地奈德组TSLP表达较哮喘组降低($P < 0.05$),葛根素组和布地奈德组之间差异无统计学意义($P > 0.05$,图4)。

3 讨论

支气管哮喘是一种以气道高反应性、可逆性气流阻塞、黏液高分泌和血清IgE增高为主要特征的气道慢性炎症性疾病,其中嗜酸性粒细胞、Th2淋巴细胞、树突状细胞和肥大细胞等炎性细胞浸润是哮

喘气道炎症的实质。虽然近年来调节性T细胞(Treg)和Th17细胞对哮喘的免疫学发病机制做了有益补充,但是Th1/Th2免疫失衡仍是哮喘最重要的免疫学异常发病机制,即Th2亚群数目增多和功能亢进、Th1亚群数目减少和功能降低^[9-10]。

TSLP的表达通常为炎症刺激因素所诱导,包括细胞因子IL-1、TNF以及Toll样受体2(TLR2)、TLR8和TLR9配体^[11-12]。TSLP广泛存在于肺、扁桃体和肠道上皮细胞。当受到外源性抗原刺激(如细菌、病毒、寄生虫、TLR激动剂)后,上皮细胞通过表达模式识别受体(包括TLR、蛋白酶激活受体和Nod样受



1: 正常组;2:哮喘组;3:葛根素组;4:布地奈德组。与正常组比较,* $P < 0.05$,与哮喘组比较,# $P < 0.05(n=3)$ 。

图4 TSLP 蛋白表达比较

Figure 4 TSLP protein expression levels in different groups

体)来激活病原体相关分子模式受体,激活固有免疫防御,导致血 TSLP 速增,并促进局部和全身 Th2 免疫,介导 Th2 细胞因子(IL-4、IL-5、IL-13)和 IgE 水平升高。而且,TSLP 浓度与 Th2 免疫、哮喘严重程度呈正比^[13]。TSLP 受体基因敲除的小鼠则难以复制哮喘模型气道炎症^[1,11]。

Th2 细胞因子增高在哮喘发病机制中起重要作用。IL-4 和 IL-13 是最重要的 Th2 细胞因子。IL-13 调节嗜酸性粒细胞性炎症反应、黏液高分泌和气道高反应性^[14-15]。本研究中,哮喘组小鼠气道炎症、气道阻力、血清总 IgE、BALF 中 IL-4 和 IL-13、肺组织 TSLP 均较正常组显著升高,支持 TSLP 在哮喘 Th2 优势免疫中起重要作用。

泰泽培单抗是 TSLP 单克隆抗体。研究表明,泰泽培单抗治疗轻度过敏性哮喘患者 3 个月后,血液和痰液嗜酸性粒细胞和呼出一氧化氮值均降低,这说明 TSLP 在调节释放 Th2 细胞因子中发挥上调作用。泰泽培单抗还可减轻早发相和迟发相哮喘反应,这说明气道肥大细胞释放的早期介质和 Th2 细胞因子释放的晚期介质,抑制嗜酸性粒细胞的募集和激活。随后,安慰剂对照的临床试验显示,约 52 周的中度至重度未控制哮喘患者,予泰泽培单抗治疗后,Th2 型哮喘患者(血嗜酸性粒细胞 > 250 个/ μL)病情的年恶化率下降高达 71%,非典型 Th2 型哮喘

患者亦是如此^[16]。

据报道,葛根素抑制哮喘患者外周血单个核细胞 NF- κ B 通路激活和 TNF- α 产生,彰显葛根素对过敏症的保护作用^[7]。通过小鼠过敏性哮喘模型实验,最近研究表明,葛根素可通过调节 Eotaxin-3 来减轻 OVA 诱导的气道炎症,提示葛根素在哮喘和过敏症中具有潜在应用价值^[17]。

总之,本研究结果显示,葛根素抑制慢性哮喘小鼠模型气道炎症、气道高反应性和 Th2 免疫,这可能与抑制 TSLP 表达有关。今后,进一步研究葛根素干预 TSLP 介导的 Th2 免疫的分子靶标,并开展葛根素治疗哮喘的临床试验研究,有望为防治哮喘等炎症性疾病带来新的思路和策略。

[参考文献]

- [1] 王文璐,李红岩,苗伟伟,等. 布地奈德抑制支气管哮喘小鼠 TSLP 及 Th2 优势免疫作用的研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2012,32(9):1207-1210
- [2] 王文璐,李红岩,周林福,等. 胸腺基质淋巴细胞生成素在哮喘 Th2 优势免疫中的作用[J]. 中国呼吸与危重监护杂志,2011,10(1):91-93
- [3] SHIKOTRA A, CHOY D F, OHRI C M, et al. Increased expression of immunoreactive thymic stromal lymphopoietin in patients with severe asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2012, 129(1):104-111
- [4] DEMEHRI S, MORIMOTO M, HOLTZMAN M J, et al. Skin-derived TSLP triggers progression from epidermal-barrier defects to asthma [J]. PLoS Biol, 2009, 7(5): e1000067
- [5] ZHANG Z, HENER P, FROSSARD N, et al. Thymic stromal lymphopoietin overproduced by keratinocytes in mouse skin aggravates experimental asthma [J]. PNAS, 2009, 106(5):1536-1541
- [6] 陈 超. 葛根素抗炎作用研究进展[J]. 宁德师专学报(自然科学版),2010,22(3):225-229
- [7] LIU X J, ZHAO J, GU X Y. The effects of genistein and puerarin on the activation of nuclear factor- κ B and the production of tumor necrosis factor- α in asthma patients[J]. Pharmazie, 2010, 65(2):127-131
- [8] MCMILLAN S J, LLOYD C M. Prolonged allergen challenge in mice leads to persistent airway remodelling [J]. Clin Exp Allergy, 2004, 34(3):497-507
- [9] ROCHMAN Y, LEONARD W J. Thymic stromal lymphopoietin: a new cytokine in asthma [J]. Curr Opin Pharmacol, 2008, 8(3):249-254
- [10] ZHOU B, COMEAU M R, DE SMEDT T, et al. Thymic

(下转第 1408 页)