异钩藤碱对哮喘小鼠气道炎症的影响Δ

蔡　金[1*]，华诏召[2]，张昌容[2]，黄　丹[1]，张淇华[1]，王　毅[1]，周素芳[3]，刘　莲[4]，龚　安[5#]（1.贵州中医药大学第一附属医院中医经典科，贵阳　550001；2.贵州中医药大学第二附属医院产科，贵阳　550002；3.贵州中医药大学微生态研究中心，贵阳　550001；4.贵州医科大学临床微生物与免疫学教研室，贵阳　550001；5.江西中医药大学岐黄国医书院，南昌　330025）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）22-2740-05
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.22.09

摘　要　目的　探讨异钩藤碱（IRN）调节单核细胞趋化蛋白1（MCP-1）/CC趋化因子受体2（CCR2）信号通路对哮喘小鼠气道炎症的影响。**方法**　通过注射和吸入卵清蛋白的方法建立哮喘小鼠模型，将造模成功后的小鼠随机分为哮喘组、IRN低剂量组（IRN-L组，灌胃10 mg/kg IRN）、IRN高剂量组（IRN-H组，灌胃20 mg/kg IRN）、IRN-H+CCL2组[灌胃20 mg/kg IRN+腹腔注射7.5 ng CC趋化因子配体（CCL2）]、阳性对照组（腹腔注射2 mg/kg地塞米松），并以注射和吸入无菌磷酸盐缓冲液的小鼠为空白对照组，每组10只。各药物组小鼠每天给予相应药物1次，连续给药2周。检测各组小鼠气道高反应指标——呼吸间歇（Penh）值，血清中肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素13（IL-13）、IL-4水平，支气管肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞（EOS）、淋巴细胞（LYM）和中性粒细胞（NEU）数量，肺组织中MCP-1、CCR2蛋白表达水平；观察肺组织病理学变化并进行炎症细胞浸润评分。**结果**　与空白对照组比较，哮喘组小鼠肺组织炎症细胞浸润较明显，并有细胞肿胀、脱落现象发生；炎症细胞浸润评分，Penh值，IL-4、IL-13、TNF-α水平，EOS、NEU、LYM数量和MCP-1、CCR2蛋白表达水平均显著增加或升高（$P<0.05$）；与哮喘组比较，IRN-L组、IRN-H组、阳性对照组小鼠肺组织病理损伤得到改善，上述定量指标均显著降低（$P<0.05$）；与IRN-L组比较，IRN-H组、阳性对照组上述定量指标均显著降低（$P<0.05$）；IRN-H组与阳性对照组比较，上述定量指标差异均无统计学意义（$P>0.05$）；与IRN-H组比较，IRN-H+CCL2组上述定量指标均显著增加或升高（$P<0.05$），CCL2逆转了高剂量IRN对哮喘小鼠的保护作用。**结论**　IRN可能通过抑制MCP-1/CCR2信号通路的激活来减少哮喘小鼠气道炎症因子的释放，从而达到改善哮喘的目的。

关键词　异钩藤碱；哮喘；单核细胞趋化蛋白1/CC趋化因子受体2信号通路；气道炎症

Impacts of isorhynchophylline on airway inflammation in asthmatic mice

CAI Jin[1], HUA Zhaozhao[2], ZHANG Changrong[2], HUANG Dan[1], ZHANG Qihua[1], WANG Yi[1], ZHOU Sufang[3], LIU Lian[4], GONG An[5]（1. Dept. of Classic TCM, the First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China; 2. Dept. of Obstetrics, the Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China; 3. Research Center of Microecology, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China; 4. Clinical Microbiology and Immunology Teaching and Research Office, Guizhou Medical University, Guiyang 550001, China; 5. Qihuang Academy of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330025, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the impacts of isorhynchophylline (IRN) on airway inflammation in asthmatic mice by regulating the monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)/CC chemokine receptor 2 (CCR2) signaling pathway. **METHODS** The asthmatic mice model was established by injecting and inhaling ovalbumin. The successfully modeled mice were randomly grouped into asthma group, IRN low-dose group (IRN-L, intragastric administration of 10 mg/kg IRN), IRN high-dose group (IRN-H, intragastric administration of 20 mg/kg IRN), IRN-H+CCL2 group [intragastric administration of 20 mg/kg IRN+intraperitoneal injection of 7.5 ng CC chemokine ligand 2 (CCL2)] and positive control group (intraperitoneal injection of 2 mg/kg dexamethasone). The mice injected and inhaled with sterile phosphate-buffered solution were included in the blank control group, with 10 mice in each group. The mice in administration groups were given relevant medicine once a day, for consecutive 2 weeks. The levels of airway hyperreactivity indexes such as enhanced pause (Penh) value, tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-13 (IL-13) and IL-4 in serum, the number of eosinophil (EOS), lymphocyte (LYM) and neutrophils (NEU) in alveolar lavage fluid and the protein expressions of MCP-1 and CCR2 in lung tissue were observed in each group; the pulmonary histopathological changes were observed, and

Δ **基金项目** 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题（No.QZYY-2023-038）；贵州省卫生健康委科学技术基金项目（No.gzwkj2023-139）

＊ **第一作者** 主治医师，硕士。研究方向：内科杂病的中医药治疗和干预。E-mail：277787161@qq.com

\# **通信作者** 讲师，硕士。研究方向：中医药诊治内科杂病。E-mail：307357997@qq.com

inflammatory cell infiltration score was evaluated. **RESULTS** Compared with the blank control group, the infiltration of inflammatory cells in the lung tissue of mice was more significant in the asthma group, and there was swelling and shedding of cells; inflammatory infiltration score, Penh value, the levels of IL-4, IL-13 and TNF-α, the number of EOS, NEU and LYM, the protein expressions of MCP-1 and CCR2 were increased significantly ($P<0.05$). Compared with the asthma group, the pathological injuries of the IRN-L group, IRN-H group and positive control group were improved, and the above quantitative indexes were decreased significantly ($P<0.05$). Compared with the IRN-L group, the above quantitative indexes of the IRN-H group and positive control group were decreased significantly ($P<0.05$). There was no statistical significance in the above quantitative indexes between the IRN-H group and the positive control group ($P>0.05$). Compared with the IRN-H group, the above quantitative indexes of the IRN-H+CCL2 group were increased significantly ($P<0.05$). CCL2 reversed the protective effect of high-dose IRN on asthmatic mice. **CONCLUSIONS** IRN may reduce the release of airway inflammatory factors in asthmatic mice by inhibiting the activation of the MCP-1/CCR2 signaling pathway, so as to achieve the purpose of improving asthma.

KEYWORDS isorhynchophylline; asthma; monocyte chemotactic protein-1/CC chemokine receptor 2 signaling pathway; airway inflammation

哮喘是一种常见的以气道高反应性和气道炎症为特征的疾病，以咳嗽、喘息、胸闷和呼吸困难为主要症状，无法治愈。除了避免接触过敏原，只能使用β肾上腺素受体激动剂、吸入性皮质类固醇或白三烯D4受体拮抗剂治疗哮喘，但长期使用上述药物容易引发白内障、骨质疏松等不良反应，故寻找新的治疗方案至关重要[1]。异钩藤碱（isorhynchophylline，IRN）是钩藤的主要活性成分之一，具有抗高血压、保护神经、抗增殖和抗炎等多种生物学效应[2]，主要用于治疗心血管和中枢神经系统疾病[3]。Zhu等[4]研究发现，IRN能抑制炎症因子的产生以及气道平滑肌细胞的增殖并诱导其凋亡，具有治疗哮喘的潜在作用。单核细胞趋化蛋白1（monocyte chemotactic protein-1，MCP-1）也被称为CC趋化因子配体2（CC chemokine ligand 2，CCL2），是CC趋化因子家族的成员，可与CC趋化因子受体2（CC chemokine receptor 2，CCR2）结合，在单核巨噬细胞和T细胞的迁移中起关键作用，是治疗慢性炎症性疾病和急性肺损伤的潜在靶点[5-6]。基于以上文献，本研究拟探讨IRN调节MCP-1/CCR2信号通路对哮喘小鼠气道炎症反应的影响，旨在为寻找治疗哮喘新药提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

402AI型超声雾化器购自江苏鱼跃医疗设备股份有限公司；CX43型光学显微镜购自日本Olympus公司；elx808型多功能酶标仪购自美国BioTek公司；IC1000型全自动细胞计数器购自北京众力挽生物科技有限公司；RM2235型石蜡切片机购自德国Leica公司。

1.2 主要药品与试剂

IRN对照品（货号Ⅱ0310，纯度≥98%）、苏木精-伊红（hematoxylin and eosin，HE）染色液（货号G1120）均购自北京索莱宝科技有限公司；醋酸地塞米松片（货号02621，规格0.75 mg）购自浙江仙琚制药股份有限公司；卵清蛋白（货号9006-59-1）购自美国Sigma Aldrich公司；MCP-1/CCR2信号通路激活剂CCL2蛋白[货号JN-(Ea)-02244]购自美国R&D Systems公司；肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、白细胞介素13（interleukin-13，IL-13）、IL-4酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（货号分别为ml002095、ml063123、ml0631556）均购自上海酶联生物科技有限公司；BCA蛋白定量试剂盒（货号P0012）、RIPA缓冲液（货号P0013）均购自上海碧云天生物技术有限公司；小鼠MCP-1、CCR2、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG二抗（货号分别为ab308522、ab273050、ab8245、ab205719）均购自英国Abcam公司。

1.3 实验动物

SPF级雌性BALB/c小鼠，7周龄，体重（18±2）g，由陆军军医大学医学实验动物中心提供，生产许可证号为SCXK（渝）2022-0011。小鼠饲养在单独通风的无菌笼里，室温为22 ℃，相对湿度控制在（50±5）%，12 h昼夜交替，并随时获得标准食物和正常饮用水。本研究所有动物实验均经贵州中药大学动物实验伦理委员会批准（伦理编号20220006）。

2 方法

2.1 哮喘小鼠模型的建立、分组与给药

参照文献方法[7]建立哮喘小鼠模型：随机选取50只小鼠，分别在第1、7、14天腹膜内注射20 μg卵清蛋白和2 mg氢氧化铝佐剂，在第21至27天通过超声雾化器吸入3%卵清蛋白溶液（每天1次，每次30 min）。另取10只小鼠，分别在第1、7、14天腹膜内注射等剂量的无菌磷酸盐缓冲液（PBS），在第21至27天通过超声雾化器吸入3%无菌PBS（每天1次，每次30 min），标记为空白对照组。当造模小鼠出现烦躁不安、脾气躁动、张口喘息并伴有饮水、喷嚏增多等现象，标志着哮喘小鼠模型建立成功。将50只造模成功的小鼠随机分为哮喘组、IRN低剂量（IRN-L）组、IRN高剂量（IRN-H）组、IRN-H+CCL2组、阳性对照组，每组10只。其中，阳性对照组小鼠腹腔注射2 mg/kg地塞米松，同时灌胃生理盐水[8]；IRN-L组、IRN-H组小鼠分别灌胃10、20 mg/kg IRN[9]，同时腹腔注

射生理盐水；IRN-H+CCL2组小鼠灌胃20 mg/kg IRN，同时腹腔注射7.5 ng CCL2[10]；哮喘组及空白对照组小鼠分别灌胃及腹腔注射等体积的生理盐水，每天1次，连续2周。

2.2 小鼠呼吸间歇值的检测

干预结束后，小鼠按50 mg/kg腹腔注射2%戊巴比妥钠，麻醉成功后，切开气管进行插管。将小鼠放入与呼吸机相连的空腔中，待其呼吸稳定后，分别以3.125、6.25、12.5 mg/mL乙酰甲胆碱激发，以分析气道高反应指标——呼吸间歇（enhanced pause，Penh）值。

2.3 标本采集

气道高反应指标检测结束后，摘除小鼠眼球，取血0.3～0.5 mL，在室温下静置2 h后，以2 500 r/min离心20 min，收集血清储存在－80 ℃下备用；然后，处死小鼠进行组织分离并暴露气管，用0.5 mL预冷的PBS冲洗左肺，收集支气管肺泡灌洗液，在4 ℃下以1 500 r/min离心10 min，收集上清液储存在－80 ℃下备用；分离右肺组织，部分固定在4%甲醛溶液中，用于病理学检测，另一部分储存在－80 ℃下备用。

2.4 小鼠血清中IL-4、IL-13、TNF-α水平的检测

取“2.3”项下血清样本，按照试剂盒说明书进行操作，利用多功能酶标仪检测吸光度值，然后根据标准曲线计算小鼠血清中IL-4、IL-13、TNF-α水平。

2.5 小鼠支气管肺泡灌洗液中炎症细胞的检测

取“2.3”项下支气管肺泡灌洗液上清液，以PBS重悬，在细胞沉降前将细胞悬液移入离心管中，并进行瑞氏染色，将混合物孵育5 min，采用全自动细胞计数器对炎症细胞[嗜酸性粒细胞（eosinophil，EOS）、淋巴细胞（lymphocyte，LYM）和中性粒细胞（neutrophil，NEU）]进行分类计数。

2.6 小鼠肺组织病理学变化及炎症细胞浸润评分的检测

取“2.3”项下固定在4%甲醛溶液的小鼠肺组织，经石蜡包埋、切片（5 μm）后用HE染色。使用光学显微镜下观察肺组织病理学变化，参照文献方法[11]评估炎症细胞浸润评分，评分标准如下：0分，无炎症细胞浸润；1分，少量炎症细胞浸润；2分，层厚为1个细胞，炎症细胞构成环状；3分，层厚为2～4个细胞，炎症细胞构成环状；4分，层厚大于4个细胞，炎症细胞构成环状。

2.7 小鼠肺组织中MCP-1、CCR2蛋白表达水平的检测

取“2.3”项下冻存的小鼠右肺组织，加入RIPA缓冲液研磨后于冰上裂解，离心后（4 ℃，3 000 r/min，15 min）取上清液，采用BCA蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度，沸水煮10 min使蛋白变性；每个样品取40 μg变性蛋白，经过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离（电压90 V），并在冰上转移到聚偏二氟乙烯膜上，加入5%脱脂奶粉，室温下封闭2 h；将封闭液稀释的MCP-1、CCR2、GAPDH一抗（稀释比均为1∶500）加至聚偏二氟乙烯膜上，摇床孵育30 min，4 ℃静置过夜；以TBST缓冲液洗膜，室温下加入二抗（稀释比为1∶1 000），摇床孵育2 h；TBST缓冲液洗膜，将膜浸泡在ECL化学发光液中进行显色、成像。使用Image J软件对蛋白条带进行量化，以目标蛋白与内参蛋白（GAPDH）条带的灰度值比值表示目标蛋白的表达水平。

2.8 统计学方法

采用SPSS 27.0软件对实验数据进行统计分析，并以GraphPad Prism 8.0软件作图。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用*SNK-q*检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 IRN对小鼠Penh值的影响

小鼠分别用3.125、6.25、12.5 mg/mL乙酰甲胆碱激发后，与空白对照组比较，哮喘组小鼠Penh值均显著增加（$P<0.05$）；与哮喘组比较，IRN-L组、IRN-H组、阳性对照组小鼠Penh值均显著降低（$P<0.05$）；与IRN-L组比较，IRN-H组、阳性对照组小鼠Penh值均显著降低（$P<0.05$）；IRN-H组与阳性对照组比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）；与IRN-H组比较，IRN-H+CCL2组小鼠Penh值均显著增加（$P<0.05$）。结果见表1。

表1 各组小鼠气道高反应指标Penh值的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	3.125 mg/mL剂量下Penh值	6.25 mg/mL剂量下Penh值	12.5 mg/mL剂量下Penh值
空白对照组	0.11±0.01	0.86±0.09	2.07±0.21
哮喘组	0.65±0.07[a]	2.14±0.22[a]	6.54±0.66[a]
IRN-L组	0.45±0.05[b]	1.57±0.16[b]	3.85±0.39[b]
IRN-H组	0.21±0.03[bc]	1.02±0.11[bc]	2.27±0.23[bc]
IRN-H+CCL2组	0.52±0.06[d]	1.66±0.17[d]	4.48±0.45[d]
阳性对照组	0.18±0.02[bc]	0.92±0.10[bc]	2.11±0.22[bc]

a：与空白对照组比较，$P<0.05$；b：与哮喘组比较，$P<0.05$；c：与IRN-L组比较，$P<0.05$；d：与IRN-H组比较，$P<0.05$。

3.2 IRN对小鼠血清中IL-4、IL-13、TNF-α水平的影响

与空白对照组比较，哮喘组小鼠血清中IL-4、IL-13、TNF-α水平均显著升高（$P<0.05$）；与哮喘组比较，IRN-L组、IRN-H组、阳性对照组小鼠血清中IL-4、IL-13、TNF-α水平均显著降低（$P<0.05$）；与IRN-L组比较，IRN-H组、阳性对照组小鼠血清中IL-4、IL-13、TNF-α水平均显著降低（$P<0.05$）；IRN-H组与阳性对照组比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）；与IRN-H组比较，IRN-H+CCL2组小鼠血清中IL-4、IL-13、TNF-α水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见表2。

3.3 IRN对小鼠支气管肺泡灌洗液中EOS、LYM和NEU数量的影响

与空白对照组比较，哮喘组小鼠支气管肺泡灌洗液中EOS、LYM、NEU数量均显著增加（$P<0.05$）；与哮喘组比较，IRN-L组、IRN-H组、阳性对照组小鼠支气管肺

表2　各组小鼠血清中IL-4、IL-13、TNF-α水平的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$，pg/mL）

组别	TNF-α	IL-13	IL-4
空白对照组	21.85±2.19	52.34±5.27	10.27±1.05
哮喘组	75.64±7.58[a]	162.04±16.24[a]	58.61±5.88[a]
IRN-L组	53.21±5.36[b]	104.28±12.46[b]	34.58±3.47[b]
IRN-H组	29.52±2.97[bc]	75.62±7.66[bc]	19.77±1.99[bc]
IRN-H+CCL2组	62.34±6.24[d]	128.53±12.86[d]	38.59±3.88[d]
阳性对照组	24.25±2.44[bc]	60.27±6.11[bc]	16.53±1.68[bc]

a：与空白对照组比较，$P<0.05$；b：与哮喘组比较，$P<0.05$；c：与IRN-L组比较，$P<0.05$；d：与IRN-H组比较，$P<0.05$。

泡灌洗液中EOS、LYM、NEU数量均显著降低（$P<0.05$）；与IRN-L组比较，IRN-H组、阳性对照组小鼠支气管肺泡灌洗液中EOS、LYM、NEU数量均显著降低（$P<0.05$）；IRN-H组与阳性对照组比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）；与IRN-H组比较，IRN-H+CCL2组小鼠支气管肺泡灌洗液中EOS、LYM、NEU数量均显著增加（$P<0.05$）。结果见表3。

表3　各组小鼠炎症细胞数量的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$，$\times10^4$ mL^{-1}）

组别	EOS	LYM	NEU
空白对照组	0.55±0.06	2.55±0.27	0.78±0.08
哮喘组	2.08±0.21[a]	6.85±0.69[a]	2.88±0.29[a]
IRN-L组	1.53±0.16[b]	3.86±0.39[b]	2.17±0.23[b]
IRN-H组	0.81±0.09[bc]	2.89±0.29[bc]	1.27±0.13[bc]
IRN-H+CCL2组	1.66±0.17[d]	4.55±0.46[d]	2.26±0.23[d]
阳性对照组	0.72±0.08[bc]	2.75±0.28[bc]	1.14±0.12[bc]

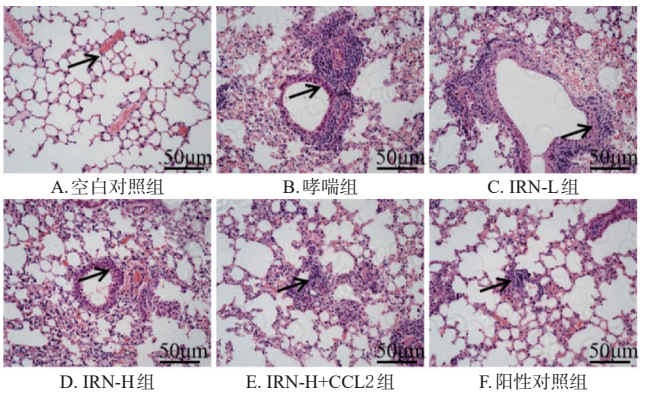
a：与空白对照组比较，$P<0.05$；b：与哮喘组比较，$P<0.05$；c：与IRN-L组比较，$P<0.05$；d：与IRN-H组比较，$P<0.05$。

3.4　IRN对小鼠肺组织病理学变化及炎症细胞浸润评分的影响

与空白对照组（炎症细胞浸润评分为0.78±0.08）比较，哮喘组小鼠肺组织炎症细胞浸润较明显，并有细胞肿胀、脱落现象发生，炎症细胞浸润评分（3.37±0.35）显著升高（$P<0.05$）；与哮喘组比较，IRN-L组、IRN-H组、阳性对照组小鼠气道及支气管周围炎症细胞浸润减少，病理损伤得到改善，炎症细胞浸润评分（2.27±0.13、1.07±0.11、0.86±0.09）均显著降低（$P<0.05$）；与IRN-L组比较，IRN-H组、阳性对照组小鼠病理损伤进一步得到改善，炎症细胞浸润评分均显著降低（$P<0.05$）；IRN-H组与阳性对照组比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）；与IRN-H组比较，IRN-H+CCL2组小鼠病理损伤加重，出现细胞肿胀、脱落现象，炎症细胞浸润评分（2.46±0.25）显著增加（$P<0.05$）。具体显微图见图1。

3.5　IRN对小鼠肺组织中MCP-1、CCR2蛋白表达水平的影响

与空白对照组比较，哮喘组小鼠肺组织中MCP-1、CCR2蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）；与哮喘组比较，IRN-L组、IRN-H组、阳性对照组小鼠肺组织中MCP-1、CCR2蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）；与IRN-L组比较，IRN-H组、阳性对照组小鼠肺组织中MCP-1、CCR2蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）；与IRN-H组比较，IRN-H+CCL2组小鼠肺组织中MCP-1、CCR2蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见图2、表4。



→：炎症细胞浸润。

图1　各组小鼠肺组织病理学形态显微图（HE染色）

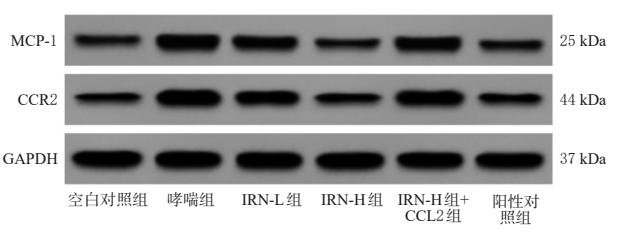


图2　各组小鼠肺组织中MCP-1、CCR2蛋白表达的电泳图

表4　各组小鼠肺组织中MCP-1、CCR2蛋白表达水平的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	MCP-1/GAPDH	CCR2/GAPDH
空白对照组	0.21±0.03	0.34±0.04
哮喘组	0.86±0.19[a]	1.18±0.12[a]
IRN-L组	0.55±0.06[b]	0.75±0.08[b]
IRN-H组	0.24±0.03[bc]	0.42±0.05[bc]
IRN-H+CCL2组	0.66±0.07[d]	0.88±0.09[d]
阳性对照组	0.23±0.03[bc]	0.38±0.04[bc]

a：与空白对照组比较，$P<0.05$；b：与哮喘组比较，$P<0.05$；c：与IRN-L组比较，$P<0.05$；d：与IRN-H组比较，$P<0.05$。

4　讨论

本研究通过注射和吸入卵清蛋白的方法建立哮喘小鼠模型，当小鼠出现烦躁不安、脾气躁动、张口喘息并伴有饮水、喷嚏增多等现象，标志着哮喘小鼠模型建立成功，可进入下一步研究。IRN是一种四环氧吲哚生物碱，具有抗炎、神经保护及抗氧化作用[9]。IRN可以减轻吸入二氧化硅导致的肺部炎症反应和纤维化[12]。此外，Li等[13]通过体内外实验研究发现，IRN可能通过抑制自噬来减轻哮喘症状，可成为治疗哮喘的潜在药物。基于以上调研，笔者推测IRN可能具有改善哮喘的作用。本研究结果显示，哮喘小鼠经IRN干预后，病理损伤得到改善；炎症细胞浸润评分，Penh值，IL-4、IL-13、TNF-α水平以及EOS、NEU、LYM数量均明显降低；且IRN高剂量

干预效果与阳性对照药相当。这表明IRN可通过抑制气道炎症反应来发挥改善哮喘的作用，与文献调研结果基本吻合，但其作用机制仍需深入探索。

趋化因子是一类能诱导反应细胞定向趋化的细胞因子，能引导表达趋化因子受体的细胞迁移到局部趋化因子配体浓度高的位点，从而导致炎症反应。作为趋化因子家族的成员，MCP-1（又称CCL2）与其受体CCR2参与了多种炎症和神经退行性疾病的发生[14]。研究表明，CCL2与哮喘儿童的炎症反应密切相关，研究其相关机制可为儿童特应性哮喘的诊断标志物挖掘提供方向[15]。本研究发现，哮喘小鼠肺组织中MCP-1、CCR2蛋白表达水平均显著升高，提示哮喘发生可能与MCP-1/CCR2信号通路激活有关；经IRN干预后，MCP-1、CCR2蛋白表达水平均显著降低，哮喘小鼠的炎症反应也显著减弱，病理损伤也得到改善，推测IRN可能通过抑制MCP-1/CCR2信号通路的激活来减轻哮喘小鼠的气道炎症。为证明上述推测，本研究以MCP-1/CCR2信号通路激活剂CCL2进行验证，结果发现，CCL2逆转了高剂量IRN对哮喘小鼠的保护作用，表明IRN对哮喘小鼠的气道炎症具有抑制作用，可能与抑制MCP-1/CCR2信号通路的激活有关。

综上所述，IRN可能通过抑制MCP-1/CCR2信号通路的激活来减少哮喘小鼠气道炎症因子的释放，从而达到改善哮喘的目的；但由于哮喘发病机制复杂，后续将进一步深入研究。

参考文献

[1] LEE J E, IM D S. Suppressive effect of carnosol on ovalbumin-induced allergic asthma[J]. Biomol Ther, 2021, 29(1): 58-63.

[2] WANG L H, GU Z W, LI J, et al. Isorhynchophylline inhibits inflammatory responses in endothelial cells and macrophages through the NF-κB/NLRP3 signaling pathway[J]. BMC Complement Med Ther, 2023, 23(1): 80.

[3] WANG C, ZHU M H, SUN N, et al. Isorhynchophylline ameliorates stress-induced emotional disorder and cognitive impairment with modulation of NMDA receptors[J]. Front Neurosci, 2022, 16: 1071068.

[4] ZHU J Y, WANG W Q, WU X. Isorhynchophylline exerts anti-asthma effects in mice by inhibiting the proliferation of airway smooth muscle cells: the involvement of miR-200a-mediated FOXC1/NF-κB pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 521(4): 1055-1060.

[5] DANSEREAU M A, MIDAVAINE É, BÉGIN-LAVALLÉE V, et al. Mechanistic insights into the role of the chemokine CCL2/CCR2 axis in dorsal root ganglia to peripheral inflammation and pain hypersensitivity[J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 79.

[6] LI T, XIAO G, TAN S P, et al. HSF1 attenuates LPS-induced acute lung injury in mice by suppressing macrophage infiltration[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 1936580.

[7] HUANG X, YU H, XIE C, et al. Louki zupa decoction attenuates the airway inflammation in acute asthma mice induced by ovalbuminthrough IL-33/ST2-NF-κB/GSK3β/mTOR signalling pathway[J]. Pharm Biol, 2022, 60(1): 1520-1532.

[8] 李秀茹，张毅，李凤，等. 金莲花胶囊对卵清蛋白诱导的过敏性哮喘小鼠气道炎症的作用研究[J]. 扬州大学学报（农业与生命科学版），2023，44(2)：39-46.
LI X R, ZHANG Y, LI F, et al. Effects of Jinlianhua capsules on airway inflammation in ovalbumin-induced allergic asthma mice[J]. J Yangzhou Univ Agric Life Sci Ed, 2023, 44(2): 39-46.

[9] 陈晓，李泽朋，何晓伟，等. 异钩藤碱调控ERK/p27^{Kip1}信号通路改善博莱霉素诱导的小鼠肺纤维化[J]. 天然产物研究与开发，2022，34(5)：750-760.
CHEN X, LI Z P, HE X W, et al. Isorhynchophylline alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by regulating ERK/p27^{Kip1} signaling pathway in mice[J]. Nat Prod Res Dev, 2022, 34(5): 750-760.

[10] 龙江宜，陈健民，廖苑君，等. 柚皮苷改善CCL2所致大鼠学习记忆障碍及其机制[J]. 中国药理学通报，2020，36(3)：372-379.
LONG J Y, CHEN J M, LIAO Y J, et al. Naringin improves learning and memory impairment induced by CCL2 in rats and its mechanism[J]. Chin Pharmacol Bull, 2020, 36(3): 372-379.

[11] WANG J R, GAO S N, ZHANG J Y, et al. Interleukin-22 attenuates allergic airway inflammation in ovalbumin-induced asthma mouse model[J]. BMC Pulm Med, 2021, 21(1): 385.

[12] QIU M, YANG Z, BIAN M N, et al. Protective effects of isorhynchophylline against silicon-dioxide-induced lung injury in mice[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2020, 48(1): 1125-1134.

[13] LI H, BI Q Y, CUI H X, et al. Suppression of autophagy through JAK2/STAT3 contributes to the therapeutic action of rhynchophylline on asthma[J]. BMC Complement Med Ther, 2021, 21(1): 21.

[14] BAO X B, CHEN C, YUAN L Y. Triptolide attenuates neuropathic pain by regulating microglia polarization through the CCL2/CCR2 axis[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 8985721.

[15] CHEN R, PIAO L Z, LIU L, et al. DNA methylation and gene expression profiles to identify childhood atopic asthma associated genes[J]. BMC Pulm Med, 2021, 21(1): 292.

（收稿日期：2023-05-15　修回日期：2023-10-20）
（编辑：曾海蓉）