吴茱萸碱对哮喘模型大鼠炎症及上皮细胞凋亡的影响及机制Δ

雷　俊[1*]，卢丽君[1#]，罗玲艳[1]，乔　松[1]，童亚男[1]，郑　洋[1]，姚　蕾[2]（1.武汉市中医医院肺系病科，武汉　430014；2.武汉市第三医院（武汉大学附属同仁医院）急诊医学科，武汉　430014）

中图分类号　R965；R285.5　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）11-1351-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.11.12

摘　要　目的　探究吴茱萸碱对哮喘模型大鼠炎症反应及上皮细胞凋亡的影响及潜在机制。**方法**　将SD大鼠分为对照组、模型组、吴茱萸碱低剂量组（10 mg/kg）、吴茱萸碱高剂量组（20 mg/kg）、地塞米松组（阳性对照，0.5 mg/kg）、表皮细胞生长因子（EGF）组[丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）激活剂，10 μg]、吴茱萸碱高剂量+EGF组（20 mg/kg吴茱萸碱+10 μg EGF），每组10只。除对照组外，其余各组大鼠以10%卵白蛋白（OVA）-氢氧化铝混合液3点注射致敏联合2%OVA雾化液吸入激发的方式建立哮喘模型。检测各组大鼠支气管肺泡灌洗液（BALF）中的炎症细胞（巨噬细胞、淋巴细胞）数，观察大鼠肺组织的病理变化，检测大鼠肺组织中气道上皮细胞凋亡情况、血清炎症因子（肿瘤坏死因子α、白细胞介素6、白细胞介素4）水平、通路相关蛋白[p38 MAPK、磷酸化p38 MAPK（p-p38 MAPK）、信号转导及转录激活因子1（STAT1）]及凋亡相关蛋白[B细胞淋巴瘤2（Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bax）]的表达水平。**结果**　与对照组比较，模型组大鼠肺组织可见支气管黏膜水肿、肺泡间隔增厚和大量炎症细胞浸润，炎症细胞数显著增多；气道上皮细胞凋亡率、炎症因子水平、p-38 MAPK/p-38 MAPK和Bax、STAT1蛋白表达水平均显著升高，Bcl-2蛋白表达水平和Bcl-2/Bax均显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，吴茱萸碱低、高剂量组和地塞米松组大鼠肺组织病理改变均有不同程度缓解，上述各指标均显著逆转，而EGF组上述指标的变化趋势则相反（$P<0.05$）；EGF能显著减弱高剂量吴茱萸碱对哮喘大鼠炎症反应的改善作用（$P<0.05$）。**结论**　吴茱萸碱可减轻哮喘大鼠炎症反应并减少气道上皮细胞凋亡，其作用机制可能与抑制p38 MAPK/STAT1信号通路有关。

关键词　吴茱萸碱；哮喘；炎症反应；气道上皮细胞；凋亡；p38 MAPK/STAT1信号通路

Effects of evodiamine on inflammation and apoptosis of airway epithelial cells in asthma model rats and its mechanism

LEI Jun[1], LU Lijun[1], LUO Lingyan[1], QIAO Song[1], TONG Yanan[1], ZHENG Yang[1], YAO Lei[2]（1. Dept. of Pulmonary Diseases, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430014, China; 2. Dept. of Emergency Medicine, Wuhan Third Hospital (Tongren Hospital of Wuhan University), Wuhan 430014, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To explore the effects and potential mechanism of evodiamine on inflammatory response and apoptosis of epithelial cells in asthma model rats. **METHODS** SD rats were separated into control group, model group, evodiamine low-dose group (10 mg/kg), evodiamine high-dose group (20 mg/kg), dexamethasone group (positive control, 0.5 mg/kg), epidermal growth factor (EGF) group [mitogen-activated protein kinase (MAPK) activator, 10 μg], evodiamine high-dose+EGF group (20 mg/kg evodiamine+10 μg EGF), with 10 rats in each group. Except for the control group, the other groups were sensitized by 3-point injection of 10% ovalbumin (OVA)-aluminium hydroxide mixture and stimulated by inhalation of 2%OVA nebulized liquid to establish an asthma model. The count of inflammatory cells (macrophages and lymphocytes) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was detected in each group; pathological changes of lung tissue in rats were observed; the apoptosis of airway epithelial cells, the levels of serum inflammatory factors [tumor necrosis factor-α, interleukin-6 (IL-6) and IL-4], the expressions of pathway-related proteins p38 MAPK, phosphorylated p38 MAPK (p-p38 MAPK), signal transduction and transcription activating factor 1 (STAT1)] and apoptosis-related proteins [B cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax)] were all detected in lung tissue. **RESULTS** Compared with the control group, bronchial mucosal edema, thickening of alveolar septa and extensive infiltration of inflammatory cells were observed in the lung tissue of rats in the model group; the number of inflammatory cells, apoptosis rate of airway epithelial cells, the levels of inflammatory factors, p-38 MAPK/p-38 MAPK, and the protein expressions of Bax and STAT1 were increased significantly; the expressions of Bcl-2 protein and Bcl-2/Bax were reduced significantly ($P<0.05$). Compared with the model group, the pathological changes in lung tissues were alleviated to varying degrees in evodiamine low-dose and high-dose groups, and dexamethasone groups, and the above indicators were significantly reversed. However, the change trends of corresponding indicators in the EGF group were opposite to the above ($P<0.05$). EGF could significantly attenuate the effect of high-dose evodiamine on inflammatory response in asthmatic rats ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Evodiamine can relieve inflammatory reactions and inhibit the apoptosis of

Δ**基金项目** 武汉市医学科研项目（No.WZ21C57）

＊**第一作者** 主治医师，硕士。研究方向：中医药防治呼吸系统疾病。E-mail：leijlj@163.com

＃**通信作者** 副主任医师，硕士。研究方向：中医药防治呼吸系统疾病。E-mail：xiah46581@163.com

airway epithelial cells in asthmatic rats, the mechanism of which may be associated with inhibiting p38 MAPK/STAT1 signaling pathway.

KEYWORDS evodiamine; asthma; inflammation; airway epithelial cells; apoptosis; p38 MAPK/STAT1 signaling pathway

哮喘主要由遗传和环境两种因素引发，主要症状包括气急、胸闷等，其临床治疗以药物治疗为主，但无法根治，多数患者的预后并不理想[1]。因此，探究哮喘病理机制、开发新的治疗药物，对于改善哮喘患者的预后具有重要意义。研究指出，炎症反应可导致患者肺损伤反复，并引发不正常的气道修复和重塑，从而影响肺功能，且炎症因子会导致气道上皮细胞损伤、凋亡，破坏气道的正常结构和功能，故抑制气道炎症可能是控制哮喘的有效策略之一[2]。丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）/信号转导及转录激活因子1（signal transducer and activator of transcription 1，STAT1）信号通路在炎症反应中具有重要作用[3]。MAPK是一类丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶，主要有3个亚家族：p38、c-Jun氨基端激酶（c-Jun N-terminal kinase，JNK）和胞外信号调节激酶（extracellular signal-regulated kinase，ERK），其中p38 MAPK是重要的炎症信号通路[4]。STAT1是p38 MAPK的下游因子，受p38 MAPK激活[5]。据报道，抑制MAPK/STAT1信号通路的激活可降低卵白蛋白（ovalbumin，OVA）诱导的哮喘小鼠炎症细胞浸润和炎症因子分泌，减轻肺损伤，延缓哮喘进展[6]。

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸的干燥近成熟果实，是具有抗哮喘活性的中药之一[7]。吴茱萸碱是从吴茱萸中分离出的一种生物碱，可用于减轻炎症反应和治疗心血管疾病等。蹇强等[8]研究表明，吴茱萸碱可通过调控Notch通路来抑制S期激酶相关蛋白2（S-phase kinase-associated protein 2，Skp2）的表达，从而改善哮喘小鼠气道重塑并减轻炎症反应；此外有研究显示，嗜酸性粒细胞的迁移可加剧该细胞在哮喘患者支气管黏膜中的过度积累，而抑制Notch信号通路可抑制MAPK途径激活，进而抑制嗜酸性粒细胞的跨内皮迁移[9]。可见，MAPK/STAT1信号通路可能是吴茱萸碱抗炎的潜在途径之一。基于此，本研究拟探究吴茱萸碱对哮喘大鼠气道炎症反应及上皮细胞凋亡的影响及可能机制，旨在为哮喘的治疗和吴茱萸碱的进一步应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括iMark680型多功能酶标仪（美国Bio-Rad公司）、BX61型电动显微镜（日本Olympus公司）、E-Gel Imager型凝胶成像仪（美国Invitrogen公司）、DYY-7C型电泳仪电源和DYCZ-40D型转膜仪（北京六一生物科技有限公司）等。

1.2 主要药品与试剂

吴茱萸碱对照品（批号518-17-2，纯度99.59%）购自西安凯萌生物技术股份有限公司；OVA（批号9006-59-1，纯度≥80%）购自美国Sigma公司；大鼠表皮细胞生长因子（epidermal growth factor，EGF）重组蛋白（MAPK激活剂，批号abs01077，纯度＞97%）购自爱必信（上海）生物科技有限公司；地塞米松片（阳性对照，批号211024，规格0.75 mg）购自福州海王福药制药有限公司；兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）、B细胞淋巴瘤2（B cell lymphoma-2，Bcl-2）一抗和辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗兔IgG二抗（批号分别为ab181602、ab194583、ab205718）均购自英国Abcam公司；兔源Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）、STAT1一抗和瑞氏染色液（批号分别为K008076P、K002420P、G1040）均购自北京索莱宝科技有限公司；苏木精-伊红（HE）染色试剂盒、TUNEL染色试剂盒、超敏ECL化学发光试剂盒和兔源p38 MAPK、磷酸化p38 MAPK（phosphorylated p38-MAPK，p-p38 MAPK）一抗（批号分别为C0105S、C1098、P0018S、AF7668、AF5884）均购自上海碧云天生物技术有限公司；肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、白细胞介素6（interleukin-6，IL-6）、IL-4酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（批号分别为ml002859、ml064292、ml102825）均购自上海酶联生物科技有限公司。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠70只，体重（200±10）g，购自三峡大学动物实验中心，生产许可证号为SCXK（鄂）2022-0012。所有大鼠均饲养于温度（23±1）℃、相对湿度（55±5）%、12 h光/暗循环的环境下，自由摄食、饮水。本研究所涉及动物实验方案获得武汉华联科生物技术有限公司动物伦理委员会审批，批准号为HLK-202305332。

2 方法

2.1 造模与分组

实验第1、8天，大鼠腹腔注射10%OVA-氢氧化铝混合液（10 mg OVA、100 mg氢氧化铝加入生理盐水，总体积为1 mL）0.5 mL，并同时于两侧腹股沟皮下注射上述混合液各0.25 mL，进行3点注射致敏；从实验第15天开始，将大鼠放入自制玻璃雾化箱中，自由吸入2%OVA雾化液（2 mg OVA加入生理盐水，总体积为1 mL），每次30 min，每天1次，持续14 d，进行哮喘激发。若大鼠出现精神萎靡、情绪躁动、毛发缺乏光泽、口唇发绀、点头呼吸、呼吸频率加快症状，且支气管、肺组织可见哮喘样病变，即表示模型复制成功[10-11]。

将SD大鼠按照随机数字表法分为对照组、模型组、吴茱萸碱低剂量组、吴茱萸碱高剂量组、地塞米松组、EGF组、吴茱萸碱高剂量+EGF组，每组10只。除对照组外，其余各组大鼠均按上述方法建立哮喘模型；对照组大鼠以生理盐水代替致敏、激发药物，其余操作相同。

从激发第7天开始，吴茱萸碱低、高剂量组大鼠于激发前30 min（下同）分别灌胃10、20 mg/kg吴茱萸碱（以0.5%羧甲基纤维素钠溶液为溶剂）[12]，并同时腹腔注射等体积生理盐水；地塞米松组大鼠灌胃0.5 mg/kg地塞米松（以0.5%羧甲基纤维素钠溶液为溶剂）[10]，并腹腔注射等体积生理盐水；EGF组大鼠腹腔注射10 μg EGF（以生理盐水为溶剂）[13]，并灌胃等体积0.5%羧甲基纤维素钠溶液；吴茱萸碱高剂量+EGF组大鼠腹腔注射10 μg EGF，并灌胃20 mg/kg吴茱萸碱；对照组和模型组大鼠灌胃0.5%羧甲基纤维素钠溶液，并腹腔注射等体积生理盐水；每天1次，连续14 d。

2.2 标本收集

末次给药后12 h，对各组大鼠腹腔注射2%戊巴比妥钠（40 mg/kg）进行麻醉，采集其颈动脉血4 mL，离心后取上层血清，于－80 ℃下冻存，备用。采血后，将大鼠以仰卧位固定于手术台上，在其颈部中央处做一切口，游离气管并插管，从气管插管处注入生理盐水（2 mL）灌洗左肺，30 s后回收支气管肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid，BALF），重复3次；取BALF，离心后取上清液，合并，混匀，于－80 ℃下冻存，备用。随后，各组大鼠以脊椎脱臼法处死，分离肺组织，其中右肺组织固定于4%多聚甲醛中约6 h，用于HE和TUNEL染色实验；左肺组织于－80 ℃下冻存，用于Western blot检测。

2.3 大鼠BALF中炎症细胞数检测

采用瑞氏染色法检测。取“2.2”项下各组大鼠BALF适量，进行瑞氏染色，使用显微镜观察巨噬细胞和淋巴细胞并计数。

2.4 大鼠肺组织病理变化观察

采用HE染色法观察。取“2.2”项下各组大鼠固定好的肺组织适量，经脱水（室温）、石蜡包埋后切片（厚约5 μm）。取上述切片，进行HE染色，使用显微镜观察大鼠肺组织病理变化并拍照。

2.5 大鼠肺组织中气道上皮细胞凋亡检测

采用TUNEL染色法检测。取“2.4”项下各组大鼠的肺组织切片，按照相应试剂盒说明书方法进行TUNEL染色，使用显微镜观察大鼠肺组织中气道上皮细胞的凋亡情况（阳性染色细胞呈棕黄色）并拍照，按下式计算细胞凋亡率：细胞凋亡率（%）＝TUNEL阳性染色细胞数/细胞总数×100%。

2.6 大鼠血清中TNF-α、IL-6、IL-4水平检测

采用ELISA法检测。取“2.2”项下各组大鼠的血清适量，按照相应试剂盒说明书操作，以酶标仪检测TNF-α、IL-6、IL-4水平。

2.7 大鼠肺组织中通路及凋亡相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.2”项下各组大鼠冻存的肺组织适量，剪碎后，加入RIPA裂解缓冲液1 mL提取总蛋白，充分裂解后离心，取上清液，经蛋白定量后，加入适量loading buffer，加热变性。取变性蛋白适量，经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后以半干法转膜（90 min），以脱脂奶粉封闭1 h；洗膜后，加入通路相关蛋白（p-p38 MAPK、p38 MAPK、STAT1）、凋亡相关蛋白（Bcl-2、Bax）、内参（GAPDH）一抗（稀释比例均为1∶1 500），4 ℃下孵育过夜；洗膜后，加入相应二抗（稀释比例为1∶3 000），室温下孵育4 h。以ECL曝光显色并成像后，使用Image Lab 5.2.1软件进行灰度值分析，以GAPDH为内参计算目的蛋白的表达水平（即目的蛋白与内参蛋白的条带灰度值比值），并计算p-p38 MAPK与p38 MAPK表达水平的比值（即p-p38 MAPK/p38 MAPK）以及Bcl-2与Bax表达水平的比值（即Bcl-2/Bax）。

2.8 统计学方法

采用GraphPad Prism 9.0软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量数据以$\bar{x}\pm s$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 各组大鼠BALF中炎症细胞计数比较

与对照组比较，模型组大鼠BALF中巨噬细胞数、淋巴细胞数均显著增多（$P<0.05$）。与模型组比较，吴茱萸碱低、高剂量组和地塞米松组大鼠BALF中上述细胞数均显著减少，且吴茱萸碱高剂量组、地塞米松组均显著少于吴茱萸碱低剂量组（$P<0.05$）；而EGF组大鼠BALF中上述细胞数均显著增多（$P<0.05$）。与吴茱萸碱高剂量组比较，吴茱萸碱高剂量+EGF组大鼠BALF中上述细胞数均显著增多（$P<0.05$）。结果见表1。

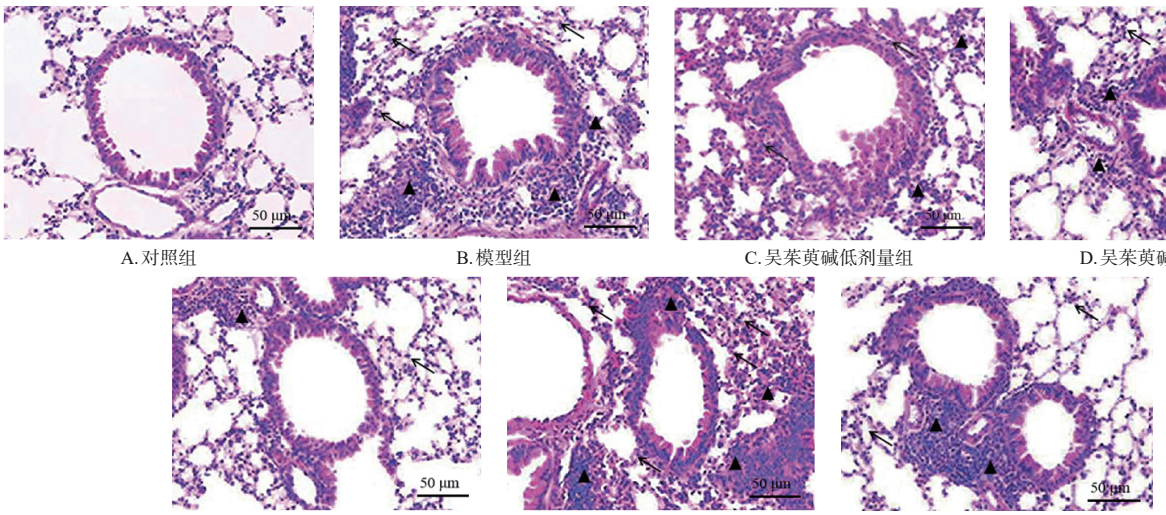
表1 各组大鼠BALF中炎症细胞数比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$，个/mL）

组别	巨噬细胞（×10⁶）	淋巴细胞（×10⁶）
对照组	13.25±1.09	5.13±0.41
模型组	62.32±5.63[a]	59.67±4.96[a]
吴茱萸碱低剂量组	37.26±3.05[b]	28.54±2.31[b]
吴茱萸碱高剂量组	19.42±1.32[bc]	14.11±1.23[bc]
地塞米松组	18.71±1.27[bc]	14.56±1.31[bc]
EGF组	81.81±6.25[b]	78.92±5.89[b]
吴茱萸碱高剂量+EGF组	31.15±2.84[d]	27.89±2.45[d]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与吴茱萸碱低剂量组比较，$P<0.05$；d：与吴茱萸碱高剂量组比较，$P<0.05$。

3.2 各组大鼠肺组织病理变化比较

与对照组比较，模型组大鼠肺组织可见支气管黏膜水肿、肺泡间隔增厚、气道管腔狭窄、部分气道上皮细胞脱落，且黏膜和气管周围有大量炎症细胞浸润。与模型组比较，吴茱萸碱低、高剂量组和地塞米松组大鼠肺组织上述病理损伤显著改善，且吴茱萸碱高剂量组、地塞米松组大鼠肺组织上述病理损伤的改善程度均明显优于吴茱萸碱低剂量组；而EGF组大鼠肺组织的病理损伤明显加重。与吴茱萸碱高剂量组比较，吴茱萸碱高剂量+EGF组大鼠肺组织的病理损伤明显加重。结果见图1。



A. 对照组　B. 模型组　C. 吴茱萸碱低剂量组　D. 吴茱萸碱高剂量组

E. 地塞米松组　F. EGF 组　G. 吴茱萸碱高剂量+EGF 组

→：肺泡间隔增厚；▲：炎症细胞浸润。

图 1　各组大鼠肺组织病理变化的显微图（HE 染色）

3.3　各组大鼠肺组织中气道上皮细胞凋亡率比较

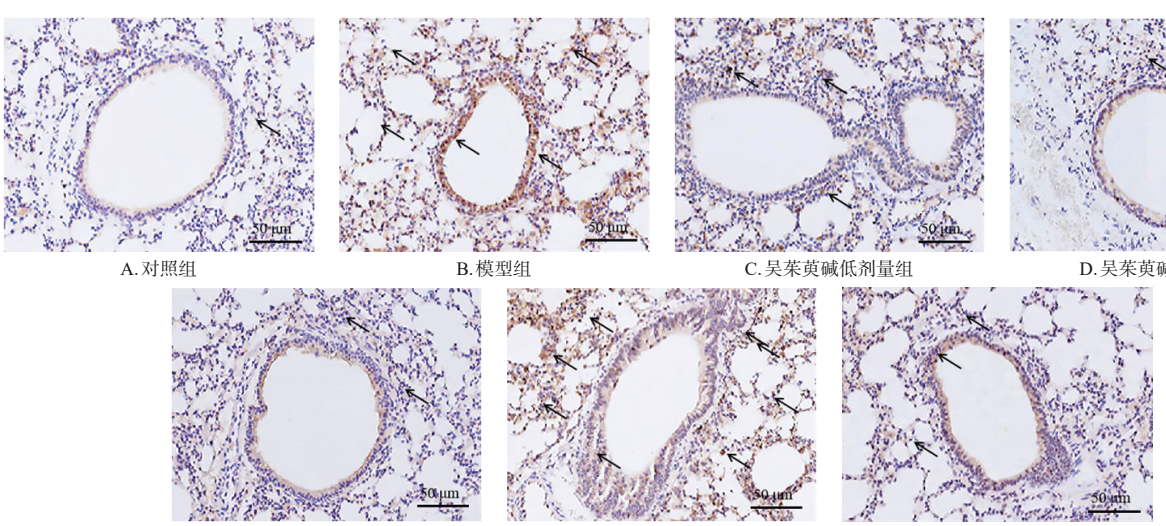
与对照组[(3.17±0.21)%]比较，模型组大鼠肺组织中 TUNEL 阳性染色细胞明显增多，气道上皮细胞凋亡率[(44.52±3.56)%]显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，吴茱萸碱低、高剂量组和地塞米松组大鼠肺组织中 TUNEL 阳性染色细胞有所减少，气道上皮细胞凋亡率[分别为(25.13±1.63)%、(10.86±0.95)%、(11.13±0.10)%]均显著降低，且吴茱萸碱高剂量组、地塞米松组均显著低于吴茱萸碱低剂量组（$P<0.05$）；而 EGF 组大鼠肺组织中 TUNEL 阳性染色细胞有所增多，气道上皮细胞凋亡率[(55.25±4.11)%]显著升高（$P<0.05$）。与吴茱萸碱高剂量组比较，吴茱萸碱高剂量+EGF 组大鼠肺组织中 TUNEL 阳性染色细胞明显增多，气道上皮细胞凋亡率[(24.57±1.56)%]显著升高（$P<0.05$）。结果见图 2。

3.4　各组大鼠血清中 TNF-α、IL-6、IL-4 水平比较

与对照组比较，模型组大鼠血清中 TNF-α、IL-6、IL-4 水平均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，吴茱萸碱低、高剂量组和地塞米松组大鼠血清中上述指标水平均显著降低，且吴茱萸碱高剂量组、地塞米松组均显著低于吴茱萸碱低剂量组（$P<0.05$）；而 EGF 组大鼠血清中上述指标水平均显著升高（$P<0.05$）。与吴茱萸碱高剂量组比较，吴茱萸碱高剂量+EGF 组大鼠血清中上述指标水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见表 2。

3.5　各组大鼠肺组织中通路及凋亡相关蛋白表达情况比较

与对照组比较，模型组大鼠肺组织中 STAT1、Bax 蛋白表达水平和 p-p38 MAPK/p38 MAPK 均显著升高，Bcl-2 蛋白表达水平和 Bcl-2/Bax 均显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，吴茱萸碱低、高剂量组和地塞米松组上述指标均显著逆转，且吴茱萸碱高剂量组、地塞米松组



A. 对照组　B. 模型组　C. 吴茱萸碱低剂量组　D. 吴茱萸碱高剂量组

E. 地塞米松组　F. EGF 组　G. 吴茱萸碱高剂量+EGF 组

→：TUNEL 阳性染色细胞。

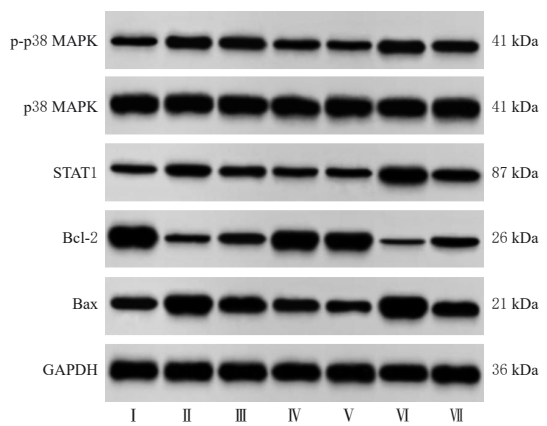
图 2　各组大鼠肺组织中气道上皮细胞凋亡情况的显微图（TUNEL 染色）

表2　各组大鼠血清中TNF-α、IL-6、IL-4水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$，pg/mL）

组别	TNF-α	IL-6	IL-4
对照组	7.82±0.61	6.45±0.54	10.01±1.53
模型组	22.05±1.72[a]	23.17±1.75[a]	60.52±2.44[a]
吴茱萸碱低剂量组	16.26±1.31[b]	17.34±1.42[b]	42.38±1.95[b]
吴茱萸碱高剂量组	9.43±0.83[bc]	8.76±0.73[bc]	23.27±1.70[bc]
地塞米松组	8.78±0.74[bc]	7.41±0.62[bc]	21.50±2.01[bc]
EGF组	27.31±1.98[b]	28.83±2.03[b]	83.46±2.93[b]
吴茱萸碱高剂量+EGF组	15.12±1.29[d]	14.65±1.14[d]	40.30±1.87[d]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与吴茱萸碱低剂量组比较，$P<0.05$；d：与吴茱萸碱高剂量组比较，$P<0.05$。

的改变均较吴茱萸碱低剂量组明显（$P<0.05$）；而EGF组大鼠肺组织中STAT1、Bax蛋白表达水平和p-p38 MAPK/p38 MAPK均显著升高，Bcl-2蛋白表达水平和Bcl-2/Bax均显著降低（$P<0.05$）。与吴茱萸碱高剂量组比较，吴茱萸碱高剂量+EGF组大鼠肺组织中STAT1、Bax蛋白表达水平和p-p38 MAPK/p38 MAPK均显著升高，Bcl-2蛋白表达水平和Bcl-2/Bax均显著降低（$P<0.05$）。结果见图3、表3。



Ⅰ：对照组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：吴茱萸碱低剂量组；Ⅳ：吴茱萸碱高剂量组；Ⅴ：地塞米松组；Ⅵ：EGF组；Ⅶ：吴茱萸碱高剂量+EGF组。

图3　各组大鼠肺组织中通路及凋亡相关蛋白表达的电泳图

表3　各组大鼠肺组织中通路及凋亡蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	p-p38 MAPK/p38 MAPK	STAT1	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax
对照组	0.45±0.05	0.61±0.06	1.55±0.12	0.73±0.07	2.05±0.11
模型组	0.82±0.08[a]	1.35±0.11[a]	0.37±0.04[a]	1.47±0.12[a]	0.27±0.05[a]
吴茱萸碱低剂量组	0.71±0.07[b]	0.92±0.09[b]	0.72±0.07[b]	1.01±0.09[b]	0.69±0.08[b]
吴茱萸碱高剂量组	0.52±0.05[bc]	0.69±0.07[bc]	1.31±0.11[bc]	0.79±0.08[bc]	1.61±0.09[bc]
地塞米松组	0.49±0.04[bc]	0.71±0.08[bc]	1.27±0.11[bc]	0.77±0.07[bc]	1.60±0.10[bc]
EGF组	0.91±0.08[b]	1.62±0.13[b]	0.24±0.02[b]	1.69±0.14[b]	0.15±0.03[b]
吴茱萸碱高剂量+EGF组	0.66±0.07[d]	0.98±0.08[d]	0.67±0.07[d]	0.91±0.09[d]	0.74±0.07[d]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与吴茱萸碱低剂量组比较，$P<0.05$；d：与吴茱萸碱高剂量组比较，$P<0.05$。

4　讨论

哮喘是一种气道慢性炎症性呼吸系统疾病，主要表现为由支气管炎症、肺气肿等因素导致的反复喘息、胸闷和咳嗽等症状。研究指出，哮喘的发生与气道内炎症细胞释放的炎症因子有关，且后者与气道上皮细胞凋亡密切相关：当哮喘患者接触到过敏原或其他刺激因素时，气道中的炎症细胞会被激活，释放大量的炎症因子（如TNF-α、IL-6、IL-4等），这些炎症因子会导致气道上皮细胞损伤、凋亡，从而破坏气道的正常结构和功能；此外，气道上皮细胞的凋亡也会进一步加剧气道的炎症反应，最终形成恶性循环[14]。Bcl-2和Bax在细胞凋亡调控过程中具有重要作用，当Bcl-2/Bax上升时，细胞凋亡受到抑制；当Bcl-2/Bax下降时，细胞凋亡得以增加[15]。本研究采用OVA注射致敏联合雾化吸入激发的方式建立哮喘大鼠模型，结果显示，与对照组比较，模型组大鼠BALF中炎症细胞（巨噬细胞、淋巴细胞）数、血清炎症因子（TNF-α、IL-6、IL-4）水平、细胞凋亡率及Bax蛋白表达水平均显著增多或升高，Bcl-2蛋白表达水平和Bcl-2/Bax均显著降低，大鼠肺组织中可见支气管黏膜水肿、肺泡间隔增厚和气道管腔狭窄，气道黏膜和气管周围有大量炎症细胞浸润，提示哮喘大鼠模型复制成功。

吴茱萸碱是吴茱萸的主要生物碱活性成分，是其抗炎活性单体之一。据报道，吴茱萸碱可减轻脂多糖诱导的肺部炎症和纤维化，可作为人类肺部疾病治疗药物的候选物[16]。本研究结果显示，与模型组比较，吴茱萸碱低、高剂量组大鼠炎症细胞数、炎症因子水平、细胞凋亡率及Bax蛋白表达水平均显著减少或降低，Bcl-2蛋白表达水平和Bcl-2/Bax均显著升高，大鼠肺组织病理损伤有所改善，且吴茱萸碱高剂量组的改善效果优于吴茱萸碱低剂量组。地塞米松为临床治疗哮喘的常用药物，本研究将其作为阳性对照药物，结果显示，地塞米松减轻哮喘大鼠气道炎症的作用与高剂量吴茱萸碱相当。以上结果提示吴茱萸碱有望成为治疗哮喘的潜在有效成分。

p38 MAPK是MAPK家族的主要成员，p38 MAPK信号通路主要通过上调炎症因子表达来参与炎症反应[4]。有研究报道，在过敏性哮喘中，p38 MAPK可被多种炎症因子激活，活化的p38 MAPK可激活炎症因子表达，加重炎症反应，还可进一步促进血管平滑肌增生，导致气道黏膜增厚，加重气道重塑[17]。STAT1在炎症性疾病中亦有重要作用，已有研究表明，集落刺激因子1（colony stimulating factor 1，CSF1）在支气管哮喘患者气道上皮细胞中呈异常高表达，其可通过激活STAT1信号通路来参与气道嗜酸性粒细胞炎症反应的发生，而敲低CSF1可显著降低STAT1蛋白的磷酸化水平，从而减轻气道炎症[18]。MO等[6]研究发现，抑制MAPK/STAT1信号通路的激活可减轻OVA诱导的哮喘小鼠的炎症反应和肺损伤，减缓哮喘进展。以上研究提示，p38 MAPK/STAT1信号通路可能是哮喘抗炎治疗的潜在靶点。本研究结果显示，与对照组比较，模型组大鼠肺组织中p38 MAPK/MAPK和STAT1蛋白表达水平均显著升高；与模型组比较，吴茱萸碱低、高剂量组和地塞米松组大鼠肺组织中p38 MAPK/MAPK和STAT1蛋白表达水平

均显著降低，提示p38 MAPK/STAT1信号通路可能参与了哮喘大鼠的炎症反应过程，抑制p38 MAPK/STAT1信号通路可能是吴茱萸碱改善哮喘大鼠炎症反应的潜在作用机制。为验证该推测，本研究在高剂量吴茱萸碱的基础上加用EGF，结果显示，EGF可减弱高剂量吴茱萸碱对哮喘大鼠炎症反应的改善作用，说明吴茱萸碱对哮喘大鼠炎症反应的抑制作用可能是通过抑制p38 MAPK/STAT1信号通路来实现的。

综上所述，吴茱萸碱可减轻哮喘大鼠炎症反应并减少气道上皮细胞凋亡，其作用可能与抑制p38 MAPK/STAT1信号通路有关。吴茱萸碱改善支气管哮喘所涉及的其他途径及其最优干预剂量仍需进一步探索。

参考文献

[1] BUSSE W W. Consequences of severe asthma exacerbations[J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol，2023，23(1)：44-50.

[2] HEIALY S A，RAMAKRISHNAN R K，HAMID Q. Recent advances in the immunopathogenesis of severe asthma[J]. J Allergy Clin Immunol，2022，149(2)：455-465.

[3] CHENG Y T，SUN F，WANG L Y，et al. Virus-induced p38 MAPK activation facilitates viral infection[J]. Theranostics，2020，10(26)：12223-12240.

[4] COLIC E，PATEL P U，KENT O A. Aberrant MAPK signaling offers therapeutic potential for treatment of ovarian carcinoma[J]. Onco Targets Ther，2022，15：1331-1346.

[5] FAN Z W，DONG J J，MU Y D，et al. Nesfatin-1 protects against diabetic cardiomyopathy in the streptozotocin-induced diabetic mouse model via the p38-MAPK pathway[J]. Bioengineered，2022，13(6)：14670-14681.

[6] MO S Y，DENG H，XIE Y，et al. Chryseriol attenuates the progression of OVA-induced asthma in mice through NF-κB/HIF-1α and MAPK/STAT1 pathways[J]. Allergol Immunopathol，2023，51(1)：146-153.

[7] 乔连生，郭亦然，张燕玲. 基于片段搜索和相似性搜索的抗哮喘中药发现研究[J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19(12)：310-314.
QIAO L S，GUO Y R，ZHANG Y L. Fragment and similarity based on virtual screening for anti-asthma traditional Chinese medicine[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae，2013，19(12)：310-314.

[8] 蹇强，李明月，安建峰，等. 吴茱萸碱通过调控Notch通路抑制Skp2的表达对哮喘小鼠气道重塑和炎症反应的影响[J]. 吉林中医药，2023，43(4)：445-450.
JIAN Q，LI M Y，AN J F，et al. Effects of evodialine on the airway remodeling and inflammatory reactions in mice with asthma by regulating the Notch pathway to inhibit the expression of Skp2[J]. Jilin J Chin Med，2023，43(4)：445-450.

[9] LIU L Y，WANG H，XENAKIS J J，et al. Notch signaling mediates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor priming-induced transendothelial migration of human eosinophils[J]. Allergy，2015，70(7)：805-812.

[10] 徐增梅，丁伟伟，李泽庚. 麻芍平喘汤对哮喘模型大鼠气道重塑的干预作用[J]. 中医药导报，2020，26(5)：23-26.
XU Z M，DING W W，LI Z G. Intervention effect of Mashao pingchuan decoction on airway remodeling in asthmatic model rats[J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm，2020，26(5)：23-26.

[11] 梁磊，张宇婧，李淑娣，等. 搜风愈喘方抑制哮喘大鼠气道重塑的作用机制研究[J]. 中药新药与临床药理，2022，33(1)：50-56.
LIANG L，ZHANG Y J，LI S D，et al. The mechanism of Soufeng yuchuan recipe on inhibiting airway remodeling in asthmatic rats[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol，2022，33(1)：50-56.

[12] 杨哲，孙荣蔚，王赛男，等. 吴茱萸碱对DSS诱导小鼠急性溃疡性结肠炎的保护作用研究[J]. 中国野生植物资源，2021，40(1)：1-8，14.
YANG Z，SUN R W，WANG S N，et al. The protective effects research of evodiamine on acute ulcerative colitis induced by DSS in mice[J]. Chin Wild Plant Resour，2021，40(1)：1-8，14.

[13] 矫永倩，蒙臣，曾文，等. 表皮生长因子在ARDS小鼠肺组织修复中的作用[J]. 中华麻醉学杂志，2022，42(3)：347-353.
JIAO Y Q，MENG C，ZENG W，et al. Role of epidermal growth factor in repair of lung tissues in mice with acute respiratory distress syndrome[J]. Chin J Anesthesiol，2022，42(3)：347-353.

[14] CHEN Y H，MEI Y，YANG L，et al. Taxifolin improves inflammatory injury of human bronchial epithelial cells by inhibiting matrix metalloproteinase（MMP）10 via Wnt/β-catenin pathway[J]. Bioengineered，2022，13(1)：1198-1208.

[15] SPITZ A Z，GAVATHIOTIS E. Physiological and pharmacological modulation of BAX[J]. Trends Pharmacol Sci，2022，43(3)：206-220.

[16] YE C，ZHANG N，ZHAO Q，et al. Evodiamine alleviates lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation and fibrosis by activating apelin pathway[J]. Phytother Res，2021，35(6)：3406-3417.

[17] 李俊峰，王重阳，徐畅，等. 隐丹参酮通过抑制p38 MAPK/NF-κB通路改善哮喘气道炎症[J]. 中药新药与临床药理，2020，31(1)：15-20.
LI J F，WANG C Y，XU C，et al. Cryptotanshinone alleviates asthmatic airway inflammation by inhibiting p38 MAPK/NF-κB pathway[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol，2020，31(1)：15-20.

[18] DU L J，TANG L，XIAO L S，et al. Increased expression of CSF1 in patients with eosinophilic asthma[J]. Immun Inflamm Dis，2023，11(5)：e847.

（收稿日期：2023-10-26　修回日期：2024-03-19）
（编辑：张元媛）