基于Notch信号通路探讨牡荆素对哮喘模型小鼠的改善作用Δ

费园园[1*]，葛明坤[2#]，卞庆平[2]（1.东南大学附属中大医院江北院区感染科，南京 210044；2.东南大学附属中大医院江北院区呼吸科，南京 210044）

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2024）15-1849-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.15.09

摘 要 目的 基于Notch信号通路探究牡荆素对哮喘模型小鼠的改善作用及机制。**方法** 采用卵清蛋白与氢氧化铝混悬液腹腔注射和卵清蛋白雾化激发的方法构建哮喘小鼠模型。将哮喘小鼠随机分为模型组、牡荆素组（40 mg/kg）、Notch激活剂组（1 mg/kg Jagged1）、牡荆素+Notch激活剂组（40 mg/kg牡荆素+1 mg/kg Jagged1），每组12只；另取12只小鼠设为对照组。各组小鼠灌胃/腹腔注射相应药物或生理盐水，每天1次，连续14 d。末次给药后，检测小鼠静息每分钟通气量（VE）、呼气峰流速（PEF），观察肺组织病理形态并检测纤维化变性情况，测定外周血中辅助性T细胞17（Th17）、调节性T细胞（Treg）比例并计算Th17/Treg值，测定血清中白细胞介素18（IL-18）、IL-6、IL-17、IL-10水平，检测肺组织中Notch1、Delta样配体4（DLL4）、发状分裂相关增强子1（Hes1）蛋白表达。**结果** 与对照组比较，模型组小鼠肺组织发生严重病理损伤及炎症细胞浸润；VE、PEF、外周血中Treg细胞比例、血清中IL-10水平均显著降低（$P<0.05$）；肺组织中胶原容积分数（CVF），外周血中Th17细胞比例、Th17/Treg值，血清中IL-18、IL-6、IL-17水平，肺组织中Notch1、DLL4、Hes1蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，牡荆素组小鼠肺组织病理损伤明显改善，上述指标变化趋势被显著逆转（$P<0.05$），且Notch激活剂Jagged1可显著逆转牡荆素对哮喘小鼠的上述药理功效（$P<0.05$）。**结论** 牡荆素可通过抑制Notch信号通路，改善哮喘小鼠肺功能、Th17/Treg免疫失衡及炎症反应，减轻肺组织病理损伤及纤维化。

关键词 牡荆素；Notch信号通路；哮喘；肺纤维化；Th17/Treg免疫失衡；炎症

Improvement effects of vitexin on asthmatic model mice based on Notch signaling pathway

FEI Yuanyuan[1], GE Mingkun[2], BIAN Qingping[2] (1. Dept. of Infectious Diseases, Jiangbei Campus, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210044, China; 2. Dept. of Respiratory Medicine, Jiangbei Campus, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210044, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To explore the improvement effect and mechanism of vitexin on asthmatic model mice based on Notch signaling pathway. **METHODS** Asthma model of mice was established by intraperitoneal injection of ovalbumin and aluminum hydroxide suspension and nebulization stimulation of ovalbumin, and randomly divided into model group, vitexin group (40 mg/kg), Notch activator group (1 mg/kg Jagged1), vitexin+Notch activator group (40 mg/kg vitexin+1 mg/kg Jagged1), with 12 mice in each group. Another 12 mice were selected as the control group. Each group received intragastric/intraperitoneal injection of relevant medicine or normal saline, once a day, for consecutive 14 days. After the last medication, minute ventilation at rest (VE) and peak expiratory flow (PEF) were detected in mice; the pathological morphology of lung tissue and fibrosis degeneration were observed and determined. The proportion of T helper cell 17 (Th17) and T regulatory cell (Treg) in peripheral blood were detected, and the Th17/Treg ratio was calculated. The levels of serum inflammatory factors interleukin (IL)-18, IL-6, IL-17 and IL-10 were determined, and the expressions of Notch1, Delta-like ligand 4 (DLL4), hairy and enhancer of split 1 (Hes1) in lung tissue were detected. **RESULTS** Compared with the control group, serious pathological injury and inflammatory cell infiltration occurred in the lung tissue of mice in the model group, while VE, PEF, the proportion of Treg cells in peripheral blood and serum level of IL-10 were significantly reduced ($P<0.05$); collagen volume fraction (CVF) in lung tissue, Th17 cells proportion and Th17/Treg ratio in peripheral blood, serum levels of IL-18, IL-6 and IL-17, and the protein expressions of Notch1, DLL4 and Hes1 in lung tissue were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the pathological injury of lung tissue in vitexin group was significantly improved compared with model group, and the changing trend of the above indexes was reversed ($P<0.05$); Notch activator Jagged1 could significantly reverse the pharmacological effects of vitexin on asthmatic mice ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Vitexin can

Δ**基金项目** 江苏省卫生健康委科研项目（No.H2022039）

＊**第一作者** 医师。研究方向：哮喘等感染性疾病诊治。E-mail：feiyuanyuan5286@163.com

\# **通信作者** 主治医师。研究方向：肺部感染性疾病诊治。E-mail：114647748@qq.com

improve lung function, Th17/Treg immune imbalance and inflammatory response, and alleviate pathological injury and fibrosis of lung tissue in asthmatic mice by inhibiting the Notch signaling pathway.

KEYWORDS vitexin; Notch signaling pathway; asthma; lung fibrosis; Th17/Treg immune imbalance; inflammation

哮喘是支气管哮喘的简称，作为一种慢性气道炎症疾病，其可引起气道高反应及呼吸气流受限，导致胸闷气短、咳嗽喘息等症状。近年来，全球范围内哮喘发生率与病死率均逐渐升高，已成为当前公共健康的主要威胁之一[1]。研究表明，多种炎症细胞、细胞组分、细胞信号共同参与哮喘的发病过程，其中辅助性T细胞17（T helper cell 17，Th17）/调节性T细胞（T regulatory cell，Treg）免疫失衡引发的强烈炎症是哮喘的重要致病基础[2]。而Notch信号通路可调节免疫功能，介导免疫T细胞分化，影响Th17/Treg免疫平衡[3]。由此可知，Notch信号通路是哮喘的一个重要治疗靶点。

吸入糖皮质激素、行支气管热成形术、给予靶向生物制剂为哮喘的临床常用治疗手段，但其疗效不够确切，且部分患者对糖皮质激素不敏感[4]。因此，探寻哮喘的中医药治疗手段具有重要的临床意义。牡荆素是一种天然黄酮类化合物，提取自牡荆叶和牡荆子，具有较好的消炎止痛、祛痰止咳功效，其不仅可通过抑制细胞外调节蛋白激酶信号通路的激活而减弱脂多糖诱导的人牙髓干细胞炎症因子[如白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）、IL-6、IL-8]的表达、释放，还可舒张气管平滑肌，对哮喘小鼠具有明显的平喘作用[5-6]。但牡荆素是否可通过调节Notch信号通路发挥上述药理功效，目前尚未有明确报道。鉴于此，本研究通过建立哮喘小鼠模型，探究牡荆素是否可通过调控Notch信号通路调节Th17/Treg免疫失衡，从而改善哮喘小鼠症状，为阐明牡荆素治疗哮喘的机制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

WBP型动物肺功能检测仪购自上海赞德医疗器械有限公司；NIB900-FL型光学显微镜、Sunrise型酶标仪均购自江苏睿捷生物科技有限公司；CtoFLEX S型流式细胞仪购自上海新领生物科技发展有限公司；Mini-PROTEAN型蛋白电泳仪、SH-Compact 523型化学发光成像系统均购自美国Bio-Rad公司。

1.2 主要药品与试剂

牡荆素原料药（批号D0956，纯度≥98%）购自上海宝曼生物科技有限公司；Notch激活剂Jagged1标准品（批号HY-P1846，纯度≥99%）购自美国MedChemExpress公司；卵清蛋白（ovalbumin，OVA；批号A8041）、氢氧化铝（批号A7130）、高效RIPA裂解液（批号R0010）、苏木素-伊红（HE）染色试剂盒（批号G1120）、红细胞裂解液（批号R1010）、二喹啉甲酸（BCA）试剂盒（批号PC0050）、Masson染色试剂盒（批号G1340）均购自北京索莱宝科技有限公司；异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）标记的抗小鼠CD4抗体（批号11-0041-82）、藻红蛋白（phycoerythrin，PE）标记的抗小鼠IL-17抗体（批号12-9171-80）均购自美国Invitrogen公司；小鼠IL-18酶联免疫吸附检测（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（批号ab216165）、IL-6 ELISA试剂盒（批号ab222503）、IL-17 ELISA试剂盒（批号ab100702）、IL-10 ELISA试剂盒（批号ab255729）、兔源Notch1一抗（批号ab52627）、兔源Delta样配体4（Delta-like ligand 4，DLL4）一抗（批号ab245848）、兔源发状分裂相关增强子1（hairy and enhancer of split 1，Hes1）一抗（批号ab108937）、兔源β-肌动蛋白（β-actin）一抗（批号ab115777）、羊抗兔二抗（批号ab150077）均购自美国Abcam公司。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级雄性BALB/c小鼠，共60只，6～8周龄，体重19～22 g，购自常州卡文斯实验动物有限公司，生产许可证号为SCXK（苏）2021-0013。小鼠饲养于本院动物实验房内，环境为12 h明/12 h暗交替、温度（20±3）℃、湿度（54±4）%。本研究经东南大学附属中大医院伦理委员会批准，批准号为动物伦理2023-07-08号。

2 方法

2.1 哮喘模型建立及动物分组、给药

参照文献[7]方法建立哮喘模型：将100 μg OVA和1 mg氢氧化铝配制成0.2 mL的混悬液，实验第0、7、14天，对小鼠分别腹腔注射上述混悬液；自第21天起将小鼠置于雾化箱中，向其中充入50 g/L的OVA雾化液进行激发，隔天进行1次，每次30 min，持续6周后，若小鼠出现呼吸急促、呼吸困难、喘息、烦躁不安、抓耳挠鼻等症状时，表明哮喘模型构建成功[7]。将48只哮喘模型小鼠随机分为模型组、牡荆素组、Notch激活剂组、牡荆素+Notch激活剂组，每组12只。另取12只小鼠，在第0、7、14天腹腔注射等量生理盐水，并自第21天起以等量生理盐水雾化激发，持续相同时间，设为对照组。

用生理盐水将牡荆素、Notch激活剂Jagged1溶解成质量浓度分别为4、0.1 mg/mL的溶液。建模成功后，牡荆素组小鼠灌胃40 mg/kg的牡荆素[8]（灌胃体积10 mL/kg），同时腹腔注射10 mL/kg生理盐水；Notch激活剂组小鼠灌胃10 mL/kg生理盐水，同时腹腔注射1 mg/kg的Jagged1[9]（注射体积10 mL/kg）；牡荆素+Notch激活剂组小鼠灌胃40 mg/kg的牡荆素，同时腹腔注射1 mg/kg的Jagged1；模型组和对照组小鼠灌胃和腹腔注射10 mL/kg生理盐水。每天给药1次，连续14 d。

2.2 肺功能检测

末次给药后24 h，采用动物肺功能检测仪测定小鼠静息每分钟通气量（minute ventilation at rest，VE）、呼气峰流速（peak expiratory flow，PEF），以评测肺功能。

2.3 标本采集及肺组织病理形态观察、纤维化变性检测

肺功能检测结束后，以戊巴比妥钠（30 mg/kg）腹腔注射麻醉小鼠，使用注射器刺入小鼠颈总动脉，采集血液2 mL。其中每组选出6份血液经离心（4 ℃，3 000 r/min，15 min）后，将血清置于－80 ℃冰箱中冻存备用；各组剩余的6份血液经枸橼酸钠抗凝后进行Th17/Treg值检测。

以颈椎脱臼法处死小鼠，开腹，解剖取出双肺，每组切下约0.6 g肺组织，剪碎后转移至含有适量高效RIPA裂解液的试管中，经电动匀浆器匀浆后离心（4 ℃，3 000 r/min，20 min），将获得的蛋白样品液转移到分组标记好的干净EP管中，采用BCA法测出蛋白浓度后调至各组浓度等同，然后置于－80 ℃冰箱中冻存备用；剩余肺组织置于生理盐水中漂洗干净，以二甲苯透明后进行脱水、包埋、切片（4 μm），选出完整的肺组织切片，经脱蜡、水化后，使用试剂盒分别进行HE（3张切片）和Masson染色（3张切片），以生理盐水漂洗后，再次脱水、透明后小心铺开在载玻片上，封片，镜下观察并拍照（任意选5个视野观察）。Masson染色的图像以Image J软件分析，计算出胶原容积分数（collagen volume fraction，CVF）。CVF＝胶原阳性的蓝色面积/组织总面积×100%。

2.4 外周血Th17/Treg值检测

向“2.3”项下外周血中加入适量红细胞裂解液，混匀后置于冰水浴中30 min，离心（4 ℃，1 000 r/min，5 min），以预冷的磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline，PBS）洗涤细胞沉淀1次后重悬，测出其细胞密度后调至1×10^6个/mL。取1 mL细胞悬液，依次加入FITC标记的抗小鼠CD4抗体（标记Treg细胞）、PE标记的抗小鼠IL-17抗体（标记Th17细胞），混匀，避光孵育（4 ℃，20 min），离心（4 ℃，1 000 r/min，5 min），以预冷的PBS洗涤细胞沉淀后重悬混匀，上机通过流式细胞仪测定Treg、Th17细胞比例，并计算出Th17/Treg值。

2.5 血清中炎症因子水平检测

取出“2.3”项下冻存的血清，于4 ℃下提前缓慢解冻，采用ELISA法测定其中炎症因子（IL-18、IL-6、IL-17、IL-10）水平，具体步骤参照各自试剂盒说明书进行。

2.6 肺组织中Notch信号通路相关蛋白表达检测

取出“2.3”项下各组小鼠肺组织蛋白样品液，于4 ℃下提前缓慢解冻，100 ℃煮沸变性后，各组均取60 μg进行电泳（电压110 V，电泳时间85 min），然后湿转（电流300 mA，转膜时间90 min）至聚偏二氟乙烯膜上，用5%脱脂奶粉封闭膜上蛋白。加入Notch1、DLL4、Hes1、β-actin一抗（稀释比例分别为1∶1 060、1∶1 160、1∶1 190、1∶1 050），在4 ℃下孵育12 h；洗膜（3次，5 min/次），然后加入羊抗兔二抗（稀释比例1∶4 500），在37.5 ℃下孵育2 h；洗膜（3次，5 min/次），经化学发光剂显色后拍照。运用Image J软件分析得到各组蛋白条带灰度值，各待测蛋白相对表达水平＝待测蛋白（Notch1、DLL4、Hes1）条带灰度值/内参蛋白（β-actin）条带灰度值。

2.7 统计学方法

运用SPSS 26.0软件处理数据。经Shapiro-Wilk检验计量资料均符合正态分布，以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两之间进一步比较行SNK-q检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 牡荆素对哮喘小鼠肺功能的影响

与对照组比较，模型组小鼠VE、PEF均显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，牡荆素组小鼠VE、PEF均显著升高（$P<0.05$），Notch激活剂组小鼠VE、PEF均显著降低（$P<0.05$）；与牡荆素组比较，牡荆素+Notch激活剂组小鼠VE、PEF均显著降低（$P<0.05$）；与Notch激活剂组比较，牡荆素+Notch激活剂组小鼠VE、PEF均显著升高（$P<0.05$）。结果见表1。

表1 各组小鼠肺功能指标比较（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

组别	VE/mL	PEF/(mL/s)
对照组	159.83±24.09	4.55±0.71
模型组	108.41±16.15[a]	2.91±0.42[a]
牡荆素组	151.16±22.53[b]	4.17±0.68[b]
Notch激活剂组	81.59±13.76[b]	1.93±0.34[b]
牡荆素+Notch激活剂组	106.93±15.04[cd]	2.85±0.39[cd]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与牡荆素组比较，$P<0.05$；d：与Notch激活剂组比较，$P<0.05$。

3.2 牡荆素对哮喘小鼠肺组织病理形态的影响

对照组小鼠肺组织形态结构完整、无损伤；模型组小鼠肺泡间隙变大，肺泡部分萎缩融合，气道黏膜及肺

泡壁增厚，肺泡间质可见大量炎症细胞浸润，肺组织发生严重病理损伤；牡荆素组小鼠肺组织上述病理损伤得到明显改善；Notch激活剂组小鼠肺组织上述病理损伤进一步加重；牡荆素+Notch激活剂组小鼠肺组织病理形态与模型组相似。结果见图1。

3.3 牡荆素对哮喘小鼠肺组织纤维化变性的影响

对照组、模型组、牡荆素组、Notch激活剂组、牡荆素+Notch激活剂组小鼠肺组织CVF分别为0、(31.18±6.05)%、(10.02±1.79)%、(59.26±11.03)%、(35.27±6.47)%($\bar{x}\pm s$，$n=12$)。

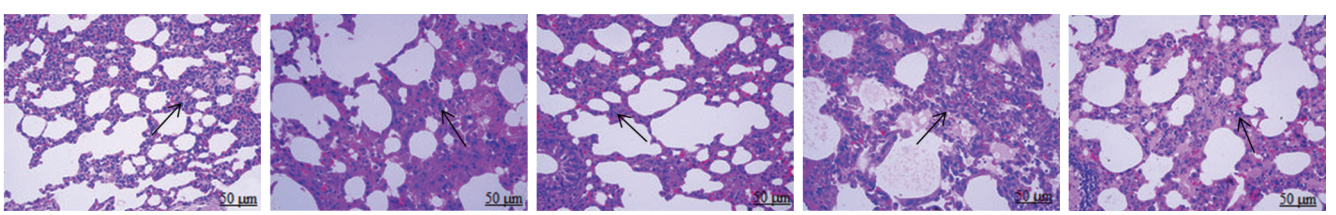
对照组小鼠肺组织无蓝色胶原纤维出现。与对照组比较，模型组小鼠肺组织蓝色胶原纤维明显增多，肺组织CVF显著升高($P<0.05$)。与模型组比较，牡荆素组小鼠肺组织蓝色胶原纤维明显减少，肺组织CVF显著降低($P<0.05$)；Notch激活剂组小鼠肺组织蓝色胶原纤维明显增多，肺组织CVF显著升高($P<0.05$)。与牡荆素组比较，牡荆素+Notch激活剂组小鼠肺组织蓝色胶原纤维明显增多，肺组织CVF显著升高($P<0.05$)。与Notch激活剂组比较，牡荆素+Notch激活剂组小鼠肺组织蓝色胶原纤维明显减少，肺组织CVF显著降低($P<0.05$)。结果见图2。

3.4 牡荆素对哮喘小鼠外周血中Th17/Treg免疫平衡的影响

与对照组比较，模型组小鼠外周血中Th17细胞比例、Th17/Treg值均显著升高($P<0.05$)，Treg细胞比例显著降低($P<0.05$)。与模型组比较，牡荆素组小鼠外周血中Th17细胞比例、Th17/Treg值均显著降低($P<0.05$)，Treg细胞比例显著升高($P<0.05$)；Notch激活剂组外周血中Th17细胞比例、Th17/Treg值均显著升高($P<0.05$)，Treg细胞比例显著降低($P<0.05$)。与牡荆素组比较，牡荆素+Notch激活剂组小鼠外周血中Th17细胞比例、Th17/Treg值均显著降低($P<0.05$)，Treg细胞比例显著升高($P<0.05$)。结果见图3、表2。

3.5 牡荆素对哮喘小鼠血清中炎症因子水平的影响

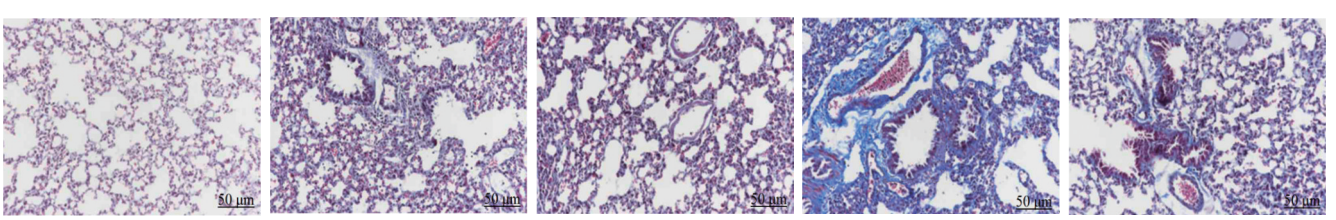
与对照组比较，模型组小鼠血清中IL-18、IL-6、IL-17水平均显著升高($P<0.05$)，IL-10水平显著降低($P<0.05$)。与模型组比较，牡荆素组小鼠血清中IL-18、IL-6、IL-17水平均显著降低($P<0.05$)，IL-10水平显著升高($P<0.05$)；Notch激活剂组小鼠血清中IL-18、IL-6、IL-17



A.对照组　B.模型组　C.牡荆素组　D. Notch激活剂组　E.牡荆素+Notch激活剂组

注：黑色箭头所指为肺泡。

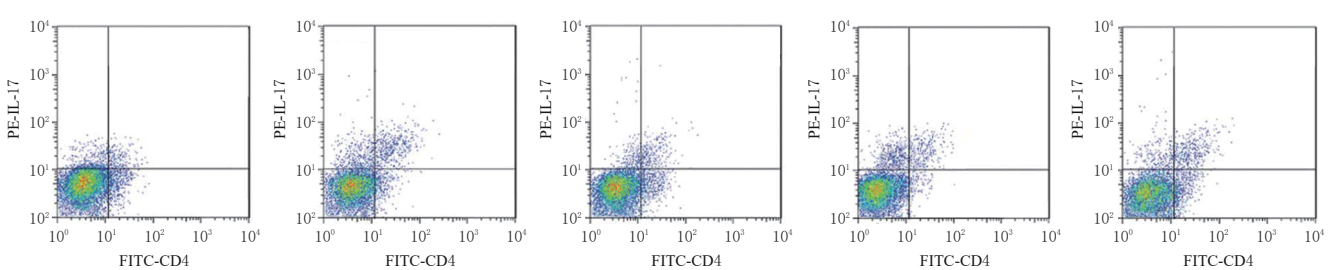
图1　各组小鼠肺组织病理形态观察显微图(HE染色)



A.对照组　B.模型组　C.牡荆素组　D. Notch激活剂组　E.牡荆素+Notch激活剂组

注：蓝色胶原纤维即代表肺组织纤维化。

图2　各组小鼠肺组织纤维化情况观察显微图(Masson染色)



A.对照组　B.模型组　C.牡荆素组　D. Notch激活剂组　E.牡荆素+Notch激活剂组

图3　各组小鼠外周血中Th17、Treg细胞比例检测的流式细胞图

表2　各组小鼠外周血中Th17、Treg细胞比例和Th17/Treg值比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	Th17细胞比例/%	Treg细胞比例/%	Th17/Treg值
对照组	0.87±0.09	4.83±0.53	0.18±0.03
模型组	1.39±0.15[a]	1.83±0.11[a]	0.76±0.14[a]
牡荆素组	0.90±0.07[b]	4.74±0.49[b]	0.19±0.04[b]
Notch激活剂组	1.63±0.22[b]	1.35±0.12[b]	1.21±0.22[b]
牡荆素+Notch激活剂组	1.38±0.13[cd]	1.86±0.15[cd]	0.74±0.13[cd]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与牡荆素组比较，$P<0.05$；d：与Notch激活剂组比较，$P<0.05$。

水平均显著升高（$P<0.05$），IL-10水平显著降低（$P<0.05$）。与牡荆素组比较，牡荆素+Notch激活剂组小鼠血清中IL-18、IL-6、IL-17水平均显著升高（$P<0.05$），IL-10水平显著降低（$P<0.05$）。与Notch激活剂组比较，牡荆素+Notch激活剂组小鼠血清中IL-18、IL-6、IL-17水平均显著降低（$P<0.05$），IL-10水平显著升高（$P<0.05$）。结果见表3。

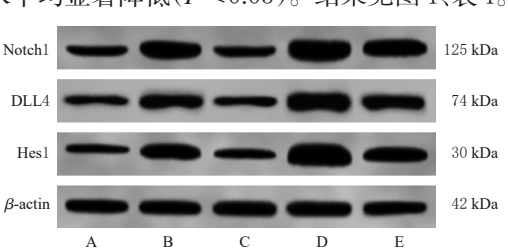
表3　各组小鼠血清中IL-18、IL-6、IL-17、IL-10水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$，pg/mL）

组别	IL-18	IL-6	IL-17	IL-10
对照组	51.82±6.23	96.62±10.42	50.62±7.01	48.85±9.10
模型组	116.75±18.48[a]	353.64±24.76[a]	178.27±26.24[a]	21.76±4.12[a]
牡荆素组	58.39±7.06[b]	108.75±14.12[b]	56.04±6.43[b]	42.92±9.83[b]
Notch激活剂组	159.87±21.54[b]	419.87±32.28[b]	259.53±30.61[b]	14.45±2.09[b]
牡荆素+Notch激活剂组	114.41±17.75[cd]	350.10±26.04[cd]	175.85±25.37[cd]	22.05±4.03[cd]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与牡荆素组比较，$P<0.05$；d：与Notch激活剂组比较，$P<0.05$。

3.6　牡荆素对哮喘小鼠肺组织中Notch信号通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较，模型组小鼠肺组织中Notch1、DLL4、Hes1蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，牡荆素组小鼠肺组织中Notch1、DLL4、Hes1蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$），Notch激活剂组小鼠肺组织中Notch1、DLL4、Hes1蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。与牡荆素组比较，牡荆素+Notch激活剂组小鼠肺组织中Notch1、DLL4、Hes1蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。与Notch激活剂组比较，牡荆素+Notch激活剂组小鼠肺组织中Notch1、DLL4、Hes1蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见图4、表4。



A：对照组；B：模型组；C：牡荆素组；D：Notch激活剂组；E：牡荆素+Notch激活剂组。

图4　各组小鼠肺组织中Notch1、DLL4、Hes1蛋白表达电泳图

表4　各组小鼠肺组织中Notch1、DLL4、Hes1蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

组别	Notch1/β-actin	DLL4/β-actin	Hes1/β-actin
对照组	0.71±0.13	0.46±0.08	0.65±0.09
模型组	1.64±0.32[a]	0.99±0.13[a]	1.43±0.28[a]
牡荆素组	0.74±0.15[b]	0.48±0.09[b]	0.69±0.11[b]
Notch激活剂组	2.21±0.37[b]	1.56±0.15[b]	2.17±0.42[b]
牡荆素+Notch激活剂组	1.63±0.34[cd]	0.96±0.12[cd]	1.42±0.30[cd]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与牡荆素组比较，$P<0.05$；d：与Notch激活剂组比较，$P<0.05$。

4　讨论

哮喘作为一种呼吸系统疾病，具有高反应性、气道重塑等特征，其发病是多种免疫炎症细胞及信号通路共同作用的结果[10]。哮喘患者体内存在严重的Th17/Treg免疫失衡，进而引发促炎因子IL-6、IL-17等过量表达，抑炎因子IL-10等表达降低，导致剧烈的免疫炎症反应，这是哮喘的主要发病机制[11]。本研究采用OVA与氢氧化铝混悬液腹腔注射外加OVA雾化液激发的方法构建哮喘小鼠模型。结果显示，哮喘模型小鼠肺泡间隙变大，肺泡部分萎缩融合，气道黏膜及肺泡壁增厚，肺泡间质可见大量炎症细胞浸润，肺组织出现严重病理损伤、纤维化变性明显，VE、PEF、外周血中Treg细胞比例、血清中IL-10水平均显著降低，肺组织CVF、外周血中Th17细胞比例和Th17/Treg值以及血清中IL-18、IL-6、IL-17水平均显著升高。这表明OVA与氢氧化铝可引发小鼠Th17/Treg免疫失衡，导致Th17细胞中促炎因子IL-18、IL-6、IL-17分泌增加，Treg细胞中抑炎因子IL-10分泌减少，诱导剧烈的炎症反应，造成严重肺损伤，损害非正常通换气功能。该结果提示哮喘模型构建成功。

研究显示，Notch作为机体调控免疫细胞平衡及免疫炎症的重要信号通路，对哮喘的发病及进展具有关键的调控作用[12]。抑制Notch信号通路激活，可干扰下游Hes1信号传导，抑制Th17细胞分化及促炎因子分泌，促进Treg细胞分化及抑炎因子分泌，改善Th17/Treg免疫失衡，阻止肺部炎症的发生发展，延缓哮喘发作及进展[13]。DLL4作为Notch信号通路的下游因子，可参与细胞的增殖行为[14]。本研究结果显示，牡荆素可减轻哮喘小鼠肺组织病理损伤与纤维化变性，升高VE、PEF、外周血中Treg细胞比例、血清中IL-10水平，降低肺组织CVF以及外周血中Th17细胞比例、Th17/Treg值和血清中IL-18、IL-6、IL-17水平，并下调肺组织中Notch1、DLL4及Hes1蛋白表达。这表明牡荆素可促使Th17细胞向Treg细胞转化，抑制促炎因子分泌，促进抑炎因子分泌，减轻Th17/Treg免疫失衡，缓解肺组织炎症损伤、纤维化及气道重塑，改善肺功能，并抑制Notch信号通路相关蛋白表达。有研究发现，Notch激活剂Jagged1可增强

Notch信号通路活性，加重肥胖小鼠胰岛素分泌缺陷[15]。本研究单独使用Notch激活剂Jagged1干预哮喘小鼠，发现激活Notch通路可使哮喘小鼠肺组织病理损伤和纤维化进一步恶化，肺功能、Th17/Treg免疫失衡及炎症反应进一步加重，证实了Notch信号通路活性增强可加重哮喘模型小鼠病情进展。本研究将牡荆素和Notch激活剂联合使用干预哮喘小鼠，结果发现，Notch激活剂可逆转牡荆素对哮喘小鼠的上述药理功效。这提示牡荆素可通过抑制Notch信号而减轻哮喘小鼠Th17/Treg免疫失衡，进而改善肺功能障碍及炎症。

综上所述，牡荆素可通过抑制Notch信号通路，改善哮喘小鼠肺功能、Th17/Treg免疫失衡及炎症反应，减轻肺组织病理损伤及纤维化。

参考文献

[1] CHEN M L, NOPSOPON T, AKENROYE A. Incidence of anti-drug antibodies to monoclonal antibodies in asthma: a systematic review and meta-analysis[J]. J Allergy Clin Immunol Pract, 2023, 11(5): 1475-1484.e20.

[2] JIN X L, WANG J. Down-regulation of INSR restores Th17/Treg immune balance and alleviates airway hyperviscosity in asthmatic mice via inactivation of STAT3 pathway[J]. Discov Med, 2024, 36(181): 372-384.

[3] HAMMAD H, LAMBRECHT B N. Wnt and Hippo pathways in regulatory T cells: a NOTCH above in asthma[J]. Nat Immunol, 2020, 21(11): 1313-1314.

[4] CHIPPS B E, ISRAEL E, BEASLEY R, et al. Albuterol-budesonide pressurized metered dose inhaler in patients with mild-to-moderate asthma: results of the DENALI double-blind randomized controlled trial[J]. Chest, 2023, 164(3): 585-595.

[5] 牛晨光，李佳洋，於丽明，等. 牡荆素对脂多糖诱导牙髓干细胞表达炎症因子的影响[J]. 上海口腔医学，2020，29(5)：462-465.
NIU C G, LI J Y, YU L M, et al. Influence of vitexin on the expression of inflammatory cytokines in dental pulp stem cells induced by lipopolysaccharide[J]. Shanghai J Stomatol, 2020, 29(5): 462-465.

[6] TIRPUDE N V, SHARMA A, KUMARI M, et al. Vitexin restores lung homeostasis by targeting vicious loop between inflammatory aggravation and autophagy mediated via multiple redox cascade and myeloid cells alteration in experimental allergic asthma[J]. Phytomedicine, 2022, 96: 153902.

[7] 彭国茹，张沄，王宋平. 大蒜素抑制TGF-β_1/SMAD2通路减轻哮喘小鼠气道炎症并调节气道重塑[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2021，37(5)：385-390.
PENG G R, ZHANG Y, WANG S P. Allicin inhibits TGF-β_1/SMAD2 pathway to reduce airway inflammation and regulate airway remodeling in asthmatic mice[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2021, 37(5): 385-390.

[8] 张泽鹏，徐兴军，刘佳人，等. 牡荆素对1型糖尿病小鼠体内抗氧化酶活性及相关基因表达的影响[J]. 天然产物研究与开发，2022，34(4)：623-629.
ZHANG Z P, XU X J, LIU J R, et al. Effects of vitexin on antioxidant enzyme activity and related gene expression in type 1 diabetic mice[J]. Nat Prod Res Dev, 2022, 34(4): 623-629.

[9] 吴琳琳，梁东阁，何倩倩，等. 黄芩苷通过Notch通路纠正细支气管炎模型小鼠Th17/Treg失衡[J]. 中国病理生理杂志，2021，37(9)：1673-1678.
WU L L, LIANG D G, HE Q Q, et al. Baicalin corrects Th17/Treg imbalance in mice with bronchiolitis through Notch signaling pathway[J]. Chin J Pathophysiol, 2021, 37(9): 1673-1678.

[10] CAO T B T, QUOC Q L, JANG J H, et al. Immune cell-mediated autoimmune responses in severe asthma[J]. Yonsei Med J, 2024, 65(4): 194-201.

[11] THOMAS R, QIAO S, YANG X. Th17/Treg imbalance: implications in lung inflammatory diseases[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(5): 4865.

[12] ZHANG X M, QIAO H X, LI M, et al. Effects of simvastatin on immunoreaction and inflammation in rats with asthma by regulating NOTCH signaling pathway[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2023, 69(15): 230-234.

[13] WU J R, HE Z, BAO H R, et al. Study on the mechanism of $PM_{2.5}$ affecting Th1/Th2 immune imbalance through the Notch signaling pathway in asthmatic mice[J]. Toxicol Res (Camb), 2023, 12(4): 675-684.

[14] YUAN C C, WU C C, XUE R, et al. Suppression of human colon tumor by EERAC through regulating Notch/DLL4/Hes pathway inhibiting angiogenesis *in vivo*[J]. J Cancer, 2021, 12(19): 5914-5922.

[15] SUDA N N, BARTOLOMÉ A, LIANG J N, et al. β-cell Jagged1 is sufficient but not necessary for islet Notch activity and insulin secretory defects in obese mice[J]. Mol Metab, 2024, 81: 101894.

（收稿日期：2024-04-08　修回日期：2024-06-24）
（编辑：林　静）