

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.02.015

实验研究

固本防哮饮对支气管哮喘缓解期模型小鼠肺组织氧化应激与 AMPK/Nrf2/HO-1 通路的影响

代晓寒^{1,2}, 赵霞^{1,2}✉, 严花^{1,2}, 单祎文^{1,2}

1. 南京中医药大学附属医院, 江苏省南京市秦淮区汉中路 155 号, 210029; 2. 南京中医药大学中医儿科学研究所/江苏省儿童呼吸疾病(中医药)重点实验室

[摘要] **目的** 探讨固本防哮饮防治支气管哮喘缓解期慢性气道炎症的可能作用机制。**方法** 36 只雌性 Balb/c 小鼠随机分为正常组, 模型组, 固本防哮饮低、中、高剂量组, 孟鲁司特钠组, 每组 6 只。除正常组外, 其余各组小鼠采用卵白蛋白联合呼吸道合胞病毒诱导建立支气管哮喘缓解期小鼠模型。造模后固本防哮饮低、中、高剂量组分别给予固本防哮饮 12、24、36 g/(kg·d) 灌胃, 孟鲁司特钠组给予孟鲁司特钠颗粒 2.6 mg/(kg·d) 灌胃, 正常组、模型组小鼠给予双蒸水 20 ml/(kg·d) 灌胃, 均每天 1 次, 共 28 天。检测小鼠肺组织白细胞介素 4 (IL-4)、白细胞介素 5 (IL-5) 水平; HE 染色观察肺组织病理并进行炎症评分; DHE 染色观察肺组织活性氧 (ROS) 水平; 检测肺组织线粒体呼吸链复合物 I、II、III、IV、V 活性; 检测血清超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、丙二醛 (MDA) 及三磷酸腺苷 (ATP) 水平; Western blot 法检测小鼠肺组织中磷酸化腺苷单磷酸活化蛋白激酶 (p-AMPK)、核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、血红素加氧酶 1 (HO-1) 及 cAMP 应答元件结合蛋白 (CREB) 蛋白表达水平。**结果** 与正常组比较, 模型组小鼠肺组织病理结果显示气道周围炎症细胞增多, 炎症评分升高; DHE 染色显示 ROS 水平升高, 肺组织 IL-4、IL-5 水平升高; 血清 SOD、CAT 及 ATP 水平降低, MDA 水平升高; 肺组织线粒体呼吸链复合物 I、II、III、IV、V 活性降低, p-AMPK、Nrf2、CREB 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, 固本防哮饮各剂量组及孟鲁司特钠组小鼠肺组织炎症细胞减少, 炎症评分降低; 肺组织 ROS 及 IL-4、IL-5 水平降低; 血清 CAT 及 ATP 水平升高, MDA 水平降低; 肺组织线粒体呼吸链复合物 I、II 活性及 CREB 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。与固本防哮饮高剂量组比较, 固本防哮饮中剂量组 MDA 水平降低 ($P<0.05$)。固本防哮饮中剂量组肺组织线粒体呼吸链复合物 V 活性较孟鲁司特钠组升高, 固本防哮饮中、高剂量组肺组织线粒体呼吸链复合物 IV 活性较固本防哮饮低剂量组升高 ($P<0.05$)。**结论** 固本防哮饮能够抑制支气管哮喘缓解期模型小鼠肺组织氧化应激, 改善线粒体功能, 缓解慢性气道炎症, 其作用机制可能与激活肺组织 AMPK/Nrf2/HO-1 信号通路有关。

[关键词] 支气管哮喘; 缓解期; 固本防哮饮; 氧化应激; 线粒体功能; 腺苷单磷酸活化蛋白激酶; 核因子 E2 相关因子 2; 血红素加氧酶 1

支气管哮喘(简称哮喘)是气道慢性炎症性疾病, 气道慢性炎症可导致黏液分泌增加、气道壁重塑和气道高反应性等过程, 引发咳嗽、喘息、呼吸短促、胸闷等症状^[1]。因此, 治疗气道慢性炎症是缓解哮喘症状、控制哮喘发作的关键步骤。研究^[2]表明, 氧化应激水平升高, 大量活性氧 (ROS) 生

成并激活促炎细胞信号转导, 促进炎症细胞因子、趋化因子和黏附因子的表达, 导致组织损伤和气道炎症。吸入型糖皮质激素是儿童哮喘的一线用药, 但其会干扰抗炎基因与抗氧化酶的表达, 不足以控制氧化应激诱导的气道炎症^[3]。

固本防哮饮是中医儿科专家江育仁教授的经验方, 具有补肺固表、健脾化痰的功效。前期临床研究证实, 固本防哮饮治疗哮喘缓解期患儿安全、有效^[4]; 实验研究发现, 其能恢复上皮紧密连接结

基金项目:国家自然科学基金(82074489); 江苏省中医院高峰学术人才培养项目(Y2021rc21); 江苏高校优势学科建设工程

✉ 通讯作者: zhaoxiahy@126.com

构,修复上皮屏障^[5],并通过升高腺苷单磷酸活化蛋白激酶(AMPK)磷酸化水平改善哮喘缓解期小鼠脂质代谢^[6]。AMPK存在于所有真核细胞中,是细胞能量的调节器,可因三磷酸腺苷(ATP)消耗而激活,如氧化应激、代谢中毒等^[7]。AMPK在调节氧化应激中发挥着重要作用,可通过磷酸化等方式上调核因子E2相关因子2(Nrf2),增加抗氧化酶血红素加氧酶1(HO-1)表达水平,减轻氧化应激反应^[8]。Nrf2/HO-1信号通路是对抗氧化损伤的主要防御机制^[9],且Nrf2在氧化应激状态下是支持线粒体结构和功能完整性的关键角色^[10]。因此,本研究拟从氧化应激和AMPK/Nrf2/HO-1信号通路角度探究固本防哮饮对哮喘缓解期模型小鼠气道慢性炎症的潜在作用机制,为其临床应用提供依据。本实验经南京中医药大学动物伦理委员会审核通过(批准编号:202012A054)。

1 材料与方法

1.1 动物及病毒

SPF级雌性Balb/c小鼠36只,4~6周龄,体重16~18 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,实验动物许可证号:SCXK(京)2019-0010。常规饲养于南京中医药大学实验动物中心,温度27℃,湿度50%,自由饮食,12 h昼夜交替。

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)原株购自中国科学院武汉病毒研究所,参照课题组前期实验方法^[11]进行扩增。

1.2 药物及制备

固本防哮饮组成:炙黄芪15 g,党参10 g,白术10 g,茯苓10 g,煅牡蛎15 g,蝉蜕6 g,陈皮6 g,防风3 g,辛夷6 g,五味子6 g,甘草3 g,以上药物均购自江苏省中医院。药物浸泡于8倍量饮水水中30 min,煎煮30 min后滤出;第二煎取6倍水煎煮30 min后滤出,合并2次药液。使用真空旋转蒸发仪在65℃下浓缩,制备含生药量3 g/ml的浓缩药液,4℃储存备用。孟鲁司特钠颗粒(正大丰海制药有限公司,货号100028044651),蒸馏水溶解配制浓度为0.26 mg/ml溶液。

1.3 主要试剂与仪器

卵白蛋白(OVA, Sigma-Aldrich公司, grade II, 货号A5253; grade V, 货号A5503); 4%氢氧化铝凝胶(陕西中晖赫彩生物医药科技有限公司, 货号BA0903); 戊巴比妥钠(中国医药集团上海化学试剂公司, 货号F20020915); 4%多聚甲醛(Macklin公司, 货号BL539A); HE染液(货号G1005)、ROS染

液(货号G1045), Servicebio公司; BCA蛋白浓度测定试剂盒(Thermo公司, 货号23227); 超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(货号A001-3-2)、丙二醛(MDA)测定试剂盒(货号A003-1-2)、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒(货号A007-1-1), 南京建成生物科技有限公司; RIPA裂解液(货号P0013B)、ATP检测试剂盒(货号S0026), 碧云天生物技术有限公司; 白细胞介素5(IL-5) ELISA试剂盒(货号AF2164-A)、白细胞介素4(IL-4) ELISA试剂盒(货号AF0051-A), 湖南艾方生物科技有限公司; 线粒体呼吸链复合物I、II、III、IV、V活性检测试剂盒(武汉亚科因生物科技有限公司, 货号分别为KTB1850、KTB1860、KTB1870、KTB1880、KTB1890); AMPK抗体(货号YT0216)、磷酸化腺苷单磷酸活化蛋白激酶(p-AMPK)抗体(货号YP0575)、HO-1抗体(货号YM33078)、山羊抗兔二抗(货号RS0002)、山羊抗鼠二抗(货号RS0001), Immuno Way公司; Nrf2抗体(货号BF8017)、GAPDH抗体(货号AF7021), Affinity公司; cAMP应答元件结合蛋白(CREB)抗体(Proteintech公司, 货号12208-1-AP); ECL化学发光超敏显色试剂盒(Yeasen公司, 货号36208ES76)。

光学显微镜(日本Olympus公司, 型号BX43F); 旋转蒸发仪(上海Eyela公司, 型号N-1200B); 混合球磨仪(德国Retsch公司, 型号MM400); 高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司, 型号5810R); 多功能酶标仪(瑞士Tecan公司, 型号Infinite M200 pro); PowerPac Basic垂直电泳仪(型号041BR123579)、凝胶成像系统(型号731BR02543), 美国Bio-Rad公司。

1.4 动物分组、造模与给药

小鼠适应性饲养1周后,采用随机数字表法分为正常组,模型组,固本防哮饮低、中、高剂量组,孟鲁司特钠组,每组6只。除正常组外,其余各组小鼠参考前期实验方法^[12]建立哮喘缓解期模型:分别在第1天和第8天给予腹腔注射0.2 ml致敏液(OVA, grade V 100 µg, 氢氧化铝1 mg)致敏,第15天以2.5% OVA (grade II)雾化吸入30 min,每天1次,持续14天。在第29天、42天、55天以RSV 50 µl/只滴鼻各激发1次,第32天起,每隔2天雾化吸入2.5% OVA (grade II) 1次,每次30 min,期间滴鼻激发后间隔2天进行雾化激发,整个过程共雾化吸入激发22次。正常组均以同体积生理盐水代替OVA溶液雾化以及RSV滴鼻。整个造模过程各组小鼠未出现死亡。

第 56 天起, 正常组、模型组小鼠给予双蒸水 20 ml/ (kg·d) 灌胃, 固本防哮饮低、中、高剂量组分别给予固本防哮饮 12、24、36 g/ (kg·d) 灌胃, 其中中剂量为临床等效剂量^[13], 孟鲁司特钠组给予孟鲁司特钠颗粒 2.6 mg/ (kg·d) 灌胃, 每天 1 次, 共 28 天。

1.5 观察指标与方法

1.5.1 血清 SOD、CAT、MDA 及 ATP 水平测定 末次给药 24 h 后, 3 % 戊巴比妥钠 0.6 ml/只腹腔麻醉, 眼球取血约 0.5 ml, 于 4℃、850×g 离心 15 min, 取上清备用。采用抽签法 (下文各指标检测所用随机方法均同此法) 每组随机选择 4 只小鼠血清样本进行检测, 严格按照试剂盒说明书检测小鼠血清 SOD、CAT、MDA 及 ATP 水平。

1.5.2 ELISA 法检测小鼠肺组织 IL-4、IL-5 水平 每组随机选择 4 只小鼠称取 10~12 mg 肺组织, 加入生理盐水, 球磨仪充分研磨, 4℃、16 000×g 离心 30 min, 取上清。使用 BCA 试剂盒检测总蛋白浓度, 将肺组织匀浆液浓度定为 3 μg/μl 进行后续实验。严格按照试剂盒说明书检测小鼠肺组织 IL-4、IL-5 水平。

1.5.3 HE 染色观察小鼠肺组织病理变化 每组随机选择 3 只小鼠肺组织样本进行检测, 小鼠右肺中叶于 4% 多聚甲醛-PBS 中石蜡包埋及固定切片。进行 HE 染色, 在光学显微镜下观察。炎症评分标准参考前期研究^[12] 制定: 0 分, 无炎症; 1 分, 偶尔出现炎症细胞; 2 分, 大多数支气管被 1 或 2 层炎症细胞层包围; 3 分, 大多数支气管被 3~5 层炎症细胞层包围; 4 分, 大多数支气管被 >5 层的炎症细胞层包围。

1.5.4 DHE 染色观察小鼠肺组织 ROS 水平 每组随机选择 3 只小鼠右肺中叶用 OCT 包埋剂固定、切片。进行免疫荧光染色, 在荧光显微镜下观察并采集图像, 采用 Image J 1.51 软件计算图像荧光强度。

1.5.5 小鼠肺组织中线粒体呼吸链复合物 I、II、III、IV、V 活性检测 每组随机选择 3 只小鼠称取 10~12 mg 肺组织, 严格按照各试剂盒说明书检测小鼠肺组织中线粒体呼吸链复合物 I、II、III、IV、V 活性。

1.5.6 Western blot 法检测肺组织 p-AMPK、Nrf2、HO-1、CREB 蛋白表达 每组随机选择 3 只小鼠称取肺组织 10~15 mg, 加入裂解液充分研磨, 冰上裂解 30 min, 4℃、16 000×g 离心 30 min, 取上清。BCA 法测定蛋白浓度, 调整一致后进行蛋白变性, -20℃保存备用。30 μg 蛋白于 8 % 凝胶中进行电泳, 转 PVDF 膜、封闭, 经一抗 (AMPK 1: 1000、p-AMPK 1: 1000、Nrf2 1: 1000、HO-1 1: 1000、CREB 1: 1000、GAPDH 1: 1000) 和二抗 (兔二抗 1: 10 000, 鼠二抗 1: 10 000) 孵育后, ECL 化学发光法曝光, 采用 Image lab 5.1 软件进行蛋白条带分析。p-AMPK 蛋白表达以 AMPK 为对照, Nrf2、HO-1、CREB 蛋白表达以 GAPDH 为对照。

1.6 统计学方法

采用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布及方差齐性, 以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 采用单因素方差分析进行多组间比较。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清中 SOD、CAT、MDA 及 ATP 水平比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组小鼠血清中 SOD、CAT 及 ATP 水平降低, MDA 水平升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 固本防哮饮低、中剂量组及孟鲁司特钠组 SOD、CAT 及 ATP 水平升高, MDA 水平降低 ($P<0.05$); 固本防哮饮高剂量组 CAT、ATP 水平升高, MDA 水平降低 ($P<0.05$)。与固本防哮饮高剂量组比较, 固本防哮饮中剂量组 MDA

表 1 各组小鼠血清中 SOD、CAT、MDA 及 ATP 水平比较

Table 1 Comparison of serum levels of SOD, CAT, MDA and ATP of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	SOD/U·ml ⁻¹	CAT/U·ml ⁻¹	MDA/nmol·ml ⁻¹	ATP/μmol·L ⁻¹
正常组	4	116.5±5.90	15.43±0.81	11.85±1.23	0.20±0.02
模型组	4	103.0±7.74 ^{a)}	9.80±2.09 ^{a)}	16.18±0.64 ^{a)}	0.09±0.02 ^{a)}
固本防哮饮低剂量组	4	114.6±4.82 ^{b)}	14.63±0.92 ^{b)}	10.05±1.23 ^{b)}	0.17±0.02 ^{b)}
固本防哮饮中剂量组	4	113.8±4.69 ^{b)}	14.09±1.04 ^{b)}	7.41±0.43 ^{b) c)}	0.19±0.02 ^{b)}
固本防哮饮高剂量组	4	108.9±4.61	14.42±3.03 ^{b)}	10.51±1.43 ^{b)}	0.18±0.02 ^{b)}
孟鲁司特钠组	4	116.4±8.12 ^{b)}	15.12±1.86 ^{b)}	9.35±0.33 ^{b)}	0.18±0.04 ^{b)}

注: SOD, 超氧化物歧化酶; CAT, 过氧化氢酶; MDA, 丙二醛; ATP, 三磷酸腺苷。

a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与固本防哮饮高剂量组比较, $P<0.05$ 。

水平降低 ($P<0.05$)。

2.2 各组小鼠肺组织中 IL-4、IL-5 水平比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组小鼠肺组织中 IL-4、IL-5 水平升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 固本防哮饮各剂量组及孟鲁司特钠组 IL-4、IL-5 水平降低 ($P<0.05$)。与孟鲁司特钠组比较, 固本防哮饮低、中剂量组 IL-4 水平升高, 固本防哮饮高剂量组 IL-5 水平降低 ($P<0.05$)。与固本防哮饮低剂量组比较, 固本防哮饮高剂量组 IL-4 水平降低, 固本防哮饮中剂量组 IL-5 水平升高 ($P<0.05$)。与固本防哮饮中剂量组比较, 固本防哮饮高剂量组 IL-5 水平降低 ($P<0.05$)。

表 2 各组小鼠肺组织中 IL-4、IL-5 水平比较

Table 2 Comparison of IL-4 and IL-5 levels in lung tissues of mice in each group ($\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}, \bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	IL-4	IL-5
正常组	4	34.85±1.35	39.47±2.13
模型组	4	61.82±5.79 ^{a)}	81.39±7.21 ^{a)}
固本防哮饮低剂量组	4	46.20±3.89 ^{b) c)}	57.05±3.79 ^{b)}
固本防哮饮中剂量组	4	41.57±5.96 ^{b) c)}	69.94±6.74 ^{b) d)}
固本防哮饮高剂量组	4	36.37±3.72 ^{b) d)}	50.79±1.96 ^{b) c) e)}
孟鲁司特钠组	4	30.85±1.28 ^{b)}	65.67±9.79 ^{b)}

注: IL-4, 白细胞介素 4; IL-5, 白细胞介素 5。

a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与孟鲁司特钠组比较, $P<0.05$; d) 与固本防哮饮低剂量组比较, $P<0.05$; e) 与固本防哮饮中剂量组比较, $P<0.05$ 。

2.3 各组小鼠肺组织病理变化及炎症评分比较

图 1 示, 正常组小鼠气道上皮平整, 气道周围无明显炎症细胞浸润, 气管壁未见明显增厚。与正常组比较, 模型组小鼠气道周围可见炎症细胞增

多, 炎性浸润明显, 气管壁增厚明显, 提示模型建立成功^[12]。与模型组比较, 固本防哮饮各剂量组及孟鲁司特钠组小鼠肺组织气道周围炎症细胞减少, 炎性浸润显著改善, 管腔内未见明显炎性分泌物, 气管壁增厚改善明显。固本防哮饮各剂量组及孟鲁司特钠组炎症细胞浸润差异不明显。

表 3 示, 与正常组比较, 模型组小鼠肺组织炎症评分升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 固本防哮饮各剂量组及孟鲁司特钠组小鼠肺组织炎症评分均降低 ($P<0.05$); 固本防哮饮各剂量组及孟鲁司特钠组组间比较, 肺组织炎症评分差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 3 各组小鼠肺组织炎症评分比较

Table 3 Comparison of lung tissue inflammatory scores of mice in each group (分, $\bar{x}\pm s$)

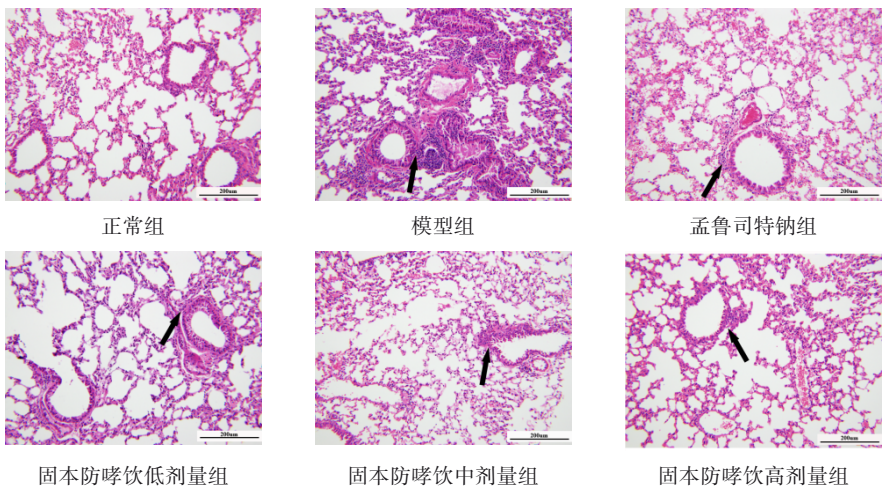
组别	鼠数	炎症评分
正常组	3	0.667±0.58
模型组	3	3.667±0.58 ^{a)}
固本防哮饮低剂量组	3	1.667±0.58 ^{b)}
固本防哮饮中剂量组	3	1.333±0.58 ^{b)}
固本防哮饮高剂量组	3	0.667±0.58 ^{b)}
孟鲁司特钠组	3	1.333±0.58 ^{b)}

注: a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

2.4 各组小鼠肺组织中 ROS 水平比较

上述氧化应激指标已证明各药物组均能缓解氧化应激, 为明确固本防哮饮的作用, 故本研究只对正常组、模型组和固本防哮饮各剂量组进行荧光检测。各组小鼠肺组织 ROS 免疫荧光图见图 2。

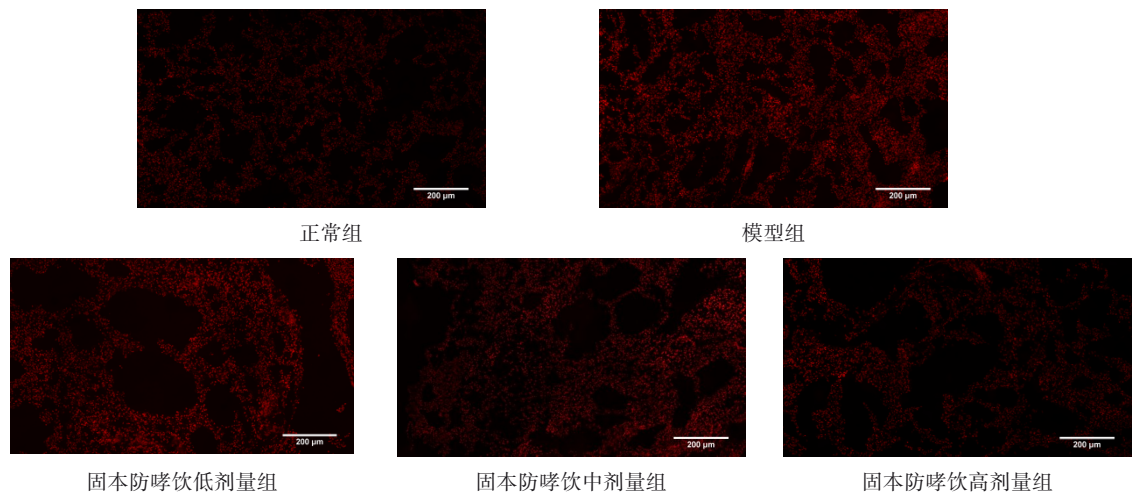
表 4 示, 与正常组比较, 模型组小鼠肺组织



注: 图中黑色箭头指示为气道及其周围炎症细胞浸润。

图 1 各组小鼠肺组织病理学形态图 (HE 染色, $\times 400$)

Figure 1 Histopathological morphology of the lungs of mice in each group (HE staining, $\times 400$)



注：ROS，活性氧；图中红色荧光为 ROS。
图 2 各组小鼠肺组织 ROS 免疫荧光染色图（DHE 染色，×200）

Figure 2 Immunofluorescence staining of ROS in lung tissue of mice in each group (DHE staining, ×200)

ROS 水平升高 ($P<0.05$)。与模型组比较，固本防哮饮各剂量组小鼠肺组织 ROS 水平均降低 ($P<0.05$)。固本防哮饮各剂量组小鼠肺组织 ROS 水平组间比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 4 各组小鼠肺组织 ROS 水平比较

Table 4 Comparison of ROS levels in lung tissues of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	ROS 荧光强度
正常组	3	33.76±2.77
模型组	3	56.27±4.93 ^{a)}
固本防哮饮低剂量组	3	41.20±5.12 ^{b)}
固本防哮饮中剂量组	3	34.67±1.30 ^{b)}
固本防哮饮高剂量组	3	32.26±2.31 ^{b)}

注：ROS，活性氧。
a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

2.5 各组小鼠肺组织中线粒体呼吸链复合物 I、II、III、IV、V 活性比较

表 5 示，与正常组比较，模型组小鼠肺组织中线粒体呼吸链复合物 I、II、III、IV、V 活性均降

低 ($P<0.05$)。与模型组比较，固本防哮饮各剂量组及孟鲁司特钠组线粒体呼吸链复合物 I、II 活性均升高；固本防哮饮低、中剂量组及孟鲁司特钠组线粒体呼吸链复合物 III 活性升高；固本防哮饮中、高剂量组及孟鲁司特钠组线粒体呼吸链复合物 IV 活性升高；固本防哮饮各剂量组线粒体呼吸链复合物 V 活性升高 ($P<0.05$)。与孟鲁司特钠组比较，固本防哮饮低剂量组线粒体呼吸链复合物 IV 活性降低，固本防哮饮中剂量组线粒体呼吸链复合物 V 活性升高 ($P<0.05$)。与固本防哮饮低剂量组比较，固本防哮饮中、高剂量组线粒体呼吸链复合物 IV 活性升高 ($P<0.05$)。

2.6 各组小鼠肺组织中 p-AMPK、Nrf2、HO-1、CREB 蛋白表达比较

表 6 示，与正常组比较，模型组肺组织中 p-AMPK、Nrf2、CREB 蛋白表达均降低 ($P<0.05$)，HO-1 蛋白表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与模型组比较，固本防哮饮中、高剂量组与孟鲁司特钠组

表 5 各组小鼠肺组织中线粒体呼吸链复合物 I、II、III、IV、V 活性比较

Table 5 Comparison of mitochondrial respiratory chain complex I, II, III, IV, and V activities in lung tissues of mice in each group ($U\cdot g^{-1}, \bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	I	II	III	IV	V
正常组	3	2485.0±330.50	515.3±31.88	3473.0±210.20	3197.0±17.74	2459.0±496.80
模型组	3	528.8±332.90 ^{a)}	255.6±54.79 ^{a)}	1877.0±174.20 ^{a)}	2320.0±167.30 ^{a)}	473.3±189.20 ^{a)}
固本防哮饮低剂量组	3	1384.0±146.30 ^{b)}	436.9±63.33 ^{b)}	2937.0±508.90 ^{b)}	2561.0±373.80 ^{c)}	1507.0±118.80 ^{b)}
固本防哮饮中剂量组	3	1245.0±184.00 ^{b)}	491.9±22.64 ^{b)}	3076.0±229.90 ^{b)}	3668.0±798.70 ^{b) d)}	2240.0±801.10 ^{b) c)}
固本防哮饮高剂量组	3	1260.0±193.70 ^{b)}	496.4±22.64 ^{b)}	2310.0±275.10	3696.0±369.30 ^{b) d)}	1896.0±740.40 ^{b)}
孟鲁司特钠组	3	1564.0±151.10 ^{b)}	485.1±38.97 ^{b)}	3060.0±291.40 ^{b)}	3304.0±43.88 ^{b)}	1164.0±499.60

注：a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与孟鲁司特钠组比较， $P<0.05$ ；d) 与固本防哮饮低剂量组比较， $P<0.05$ 。

表6 各组小鼠肺组织中p-AMPK、Nrf2、HO-1、CREB蛋白表达比较

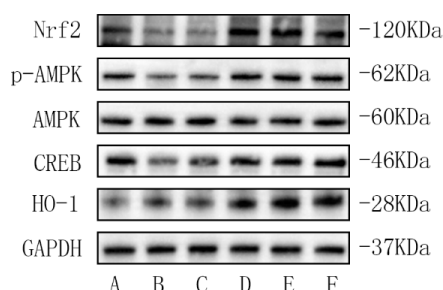
Table 6 Comparison of p-AMPK, Nrf2, HO-1, and CREB protein expression in the lung tissues of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	p-AMPK/AMPK	Nrf2/GAPDH	HO-1/GAPDH	CREB/GAPDH
正常组	3	1	1	1	1
模型组	3	0.587±0.07 ^{a)}	0.622±0.08 ^{a)}	1.310±0.18	0.677±0.03 ^{a)}
固本防哮饮低剂量组	3	0.583±0.08	0.667±0.18	1.597±0.28	0.973±0.16 ^{b)}
固本防哮饮中剂量组	3	1.017±0.34 ^{b) c)}	1.455±0.07 ^{b) c)}	2.117±0.23 ^{b)}	0.918±0.10 ^{b)}
固本防哮饮高剂量组	3	1.003±0.22 ^{b) c)}	1.392±0.16 ^{b) c)}	2.073±0.22 ^{b)}	1.011±0.25 ^{b)}
孟鲁司特钠组	3	1.037±0.15 ^{b) c)}	1.208±0.16 ^{b) c)}	2.163±0.63 ^{b)}	1.000±0.05 ^{b)}

注：p-AMPK，磷酸化腺苷单磷酸活化蛋白激酶；AMPK，腺苷单磷酸活化蛋白激酶；Nrf2，核因子E2相关因子2；HO-1，血红素加氧酶1；CREB，cAMP应答元件结合蛋白。

a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与固本防哮饮低剂量组比较， $P<0.05$ 。

p-AMPK、Nrf2、HO-1、CREB 蛋白表达均升高，固本防哮饮低剂量组 CREB 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。与固本防哮饮低剂量组比较，固本防哮饮中、高剂量组及孟鲁司特钠组 p-AMPK、Nrf2 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。各组小鼠肺组织 p-AMPK、Nrf2、HO-1、CREB 蛋白电泳图见图 3。



注：A，正常组；B，模型组；C，固本防哮饮低剂量组；D，固本防哮饮中剂量组；E，固本防哮饮高剂量组；F，孟鲁司特钠组；Nrf2，核因子E2相关因子2；AMPK，腺苷单磷酸活化蛋白激酶；p-AMPK，磷酸化腺苷单磷酸活化蛋白激酶；CREB，cAMP应答元件结合蛋白；HO-1，血红素加氧酶1。

图3 各组小鼠肺组织中Nrf2、p-AMPK、AMPK、HO-1、CREB蛋白电泳图

Figure 3 Electrophoresis of Nrf2, p-AMPK, AMPK, HO-1, and CREB proteins in lung tissues of mice in each group

3 讨论

中医学认为，哮喘的病机与素体肺脾肾不足，体内痰饮留伏有关。临床上儿童哮喘缓解期以肺脾气虚证为主^[14]。固本防哮饮由玉屏风散合异功散加减而来，方中炙黄芪健脾益气、补肺固表为君药；陈皮、茯苓、党参、白术为臣药，健脾益气、运化水湿、理气化痰；佐以辛夷、防风、蝉蜕、煅牡蛎、五味子，敛肺祛风、固表止汗；甘草健脾益气化痰，调和诸药，为使药。全方共奏补肺固表、健脾化痰之效。

现代研究^[15]显示，哮喘的发生与内源性、外

源性刺激密切相关，空气污染物、香烟烟雾、环境温度变化等损伤气道上皮细胞，诱导嗜酸性粒细胞、肥大细胞等炎症细胞的聚集，促进炎症细胞因子、趋化因子的产生，加重气道炎症。Th2型炎症在哮喘发生发展过程中起着重要作用，IL-4、IL-5作为主要Th2型细胞因子，与嗜酸性粒细胞增多、黏液分泌过剩及支气管高反应性关系密切^[16]。本研究结果表明，固本防哮饮各剂量和孟鲁司特钠均能减轻模型组小鼠气道病理改变，降低肺组织IL-4、IL-5水平，其中固本防哮饮高剂量组IL-4、IL-5水平回调显著。以上结果证明固本防哮饮与孟鲁司特钠均能改善哮喘缓解期慢性气道炎症。

哮喘气道慢性炎症持续存在，氧化应激发生，ROS生成加剧，SOD、CAT等主要抗氧化酶不足以对抗大量ROS的生成，MDA作为脂质过氧化生物标志浓度也随之增加，过量的ROS导致支气管上皮细胞凋亡，进一步加重气道炎症与组织损伤^[17-19]。同时大量ROS的生成，损伤线粒体蛋白质、脂质和DNA，引起线粒体功能障碍^[20]。线粒体呼吸链作为氧化磷酸化合成ATP的主要场所，ROS过量生成引起呼吸链蛋白质损伤，导致ATP生成减少以及更多ROS产生，加重线粒体功能障碍^[21]。线粒体功能障碍与哮喘气道上皮损伤关系密切，是哮喘气道上皮细胞的特征之一^[22]。本研究结果显示，固本防哮饮可降低小鼠升高的ROS表达，同时固本防哮饮与孟鲁司特钠还可降低小鼠MDA水平，且不同程度提高线粒体呼吸链复合物I、II、III、IV、V活性以及ATP、SOD、CAT水平；其中固本防哮饮中剂量与孟鲁司特钠对各项指标的回调作用均有显著性。表明固本防哮饮与孟鲁司特钠可能通过改善线粒体功能，抑制氧化应激，从而改善哮喘缓解期气道慢性炎症。

当氧化应激持续存在，线粒体结构和功能受

损, ATP 生成减少, 激活 AMPK^[23-24]。AMPK 磷酸化刺激 Nrf2 入核, 入核的 Nrf2 需与 CREB 等转录激活剂结合, 进一步激活下游内源性抗氧化酶 HO-1, 发挥调节细胞氧化还原稳态, 对抗机体氧化损伤的作用^[25]。研究发现, Nrf2/HO-1 作为抗氧化的主要防御机制, 能通过抑制氧化应激, 改善气道炎症, 缓解哮喘症状; 同时 Nrf2 的激活还可以保护线粒体免于功能障碍促进线粒体生物的发生, 维持线粒体稳态^[23]。本研究结果表明, 固本防哮饮与孟鲁司特钠可增加模型组中降低的 p-AMPK、Nrf2、CREB 及 HO-1 蛋白表达; 固本防哮饮中、高剂量与孟鲁司特钠回调 p-AMPK、Nrf2 蛋白表达效果显著。以上实验结果提示固本防哮饮与孟鲁司特钠改善线粒体功能可能与其促进 AMPK 磷酸化, 进一步激活 Nrf2/HO-1 信号通路有关。

在研究过程中发现, 模型组小鼠肺组织中 HO-1 水平较正常组轻度上升, 但没有统计学差异。氧化应激发生时, 体内氧化物大量增加, 抗氧化物急剧消耗, 此时 HO-1 mRNA 转录被反馈激活, HO-1 蛋白表达增加, 代偿体内抗氧化物的消耗, 对抗氧化应激损伤^[26]。因此, 模型组中 HO-1 的轻度上升可能是机体对抗氧化/抗氧化失衡的代偿机制, 但 HO-1 的代偿升高并不能对抗氧化物的急剧增加, 无法保护机体免受氧化应激的损伤。

综上, 固本防哮饮能改善线粒体功能障碍, 抑制氧化应激发生, 从而缓解哮喘气道慢性炎症, 其中固本防哮饮中剂量作用较显著, 其作用机制可能与激活肺组织 AMPK/Nrf2/HO-1 信号通路有关。但本研究未进行验证实验, 有待进一步深入探讨。

参考文献

- [1]HAMMAD H, LAMBRECHT BN. The basic immunology of asthma[J]. *Cell*, 2021, 184(6): 1469-1485.
- [2]SAHINER UM, BIRBEN E, ERZURUM S, et al. Oxidative stress in asthma[J]. *World Allergy Organ J*, 2011, 4(10): 151-158.
- [3]DUA K, MALYLA V, SINGHVI G, et al. Increasing complexity and interactions of oxidative stress in chronic respiratory diseases: an emerging need for novel drug delivery systems[J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 299: 168-178. doi: 10.1016/j.cbi. 2018. 12. 009.
- [4]袁雪晶. 固本防哮饮治疗儿童哮喘缓解期肺脾气虚证的临床和实验研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2010.
- [5]姜越, 张宇林, 董盈妹, 等. 固本防哮饮对哮喘缓解期小鼠气道上皮紧密连接蛋白及 CCSP 的影响[J]. *南京中医药大学学报*, 2022, 38(6): 483-489.
- [6]YOU Y, XING Q, ZHAO X, et al. Gu-Ben-Fang-Xiao decoction modulates lipid metabolism by activating the AMPK pathway in asthma remission[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 138: 111403. doi: 10.1016/j.biopha. 2021. 111403.
- [7]HARDIE DG. The AMP-activated protein kinase pathway: new players upstream and downstream[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 23): 5479-5487.
- [8]KOSURU R, KANDULA V, RAI U, et al. Pterostilbene decreases cardiac oxidative stress and inflammation via activation of AMPK/Nrf2/HO-1 pathway in fructose-fed diabetic rats[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2018, 32(2): 147-163.
- [9]LIN Y, YAO J, WU M, et al. Tetrandrine Ameliorates airway remodeling of chronic asthma by interfering TGF-beta1/Nrf-2/HO-1 signaling pathway-mediated oxidative stress[J]. *Can Respir J*, 2019, 2019: 7930396. doi: 10.1155/2019/7930396.
- [10]DINKOVA-KOSTOVA AT, ABRAMOV AY. The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function[J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 88(Pt B): 179-188.
- [11]董盈妹. 基于“肠道菌群-乙酸-调节性T细胞”轴探讨固本防哮饮防治哮喘的机制[D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
- [12]LU Y, XU J, ZHANG X, et al. Gu-Ben-Fang-Xiao decoction attenuates sustained airway inflammation by suppressing ER stress response in a murine asthma remission model of respiratory syncytial virus infection[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 192: 496-509. doi: 10.1016/j.jep. 2016. 09. 039.
- [13]陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [14]赵霞, 秦艳虹, 王有鹏, 等. 儿童哮喘中医诊疗指南(修订)[J]. *南京中医药大学学报*, 2022, 38(6): 476-482.
- [15]SANCHEZ-GLORIA JL, RADA KM, JUAREZ-ROJAS JG, et al. Role of sulfur compounds in garlic as potential therapeutic option for inflammation and oxidative stress in asthma[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 15599.
- [16]LAMBRECHT BN, HAMMAD H, FAHY JV. The cytokines of asthma[J]. *Immunity*, 2019, 50(4): 975-991.
- [17]KLENIIEWSKA P, PAWLICZAK R. The participation of oxidative stress in the pathogenesis of bronchial asthma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 94: 100-108. doi: 10.1016/j.biopha. 2017. 07. 066.
- [18]ALI SS, AHSAN H, ZIA MK, et al. Understanding oxidants and antioxidants: classical team with new players[J]. *J Food Biochem*, 2020, 44(3): e13145.
- [19]王文珊. 线粒体损伤在支气管哮喘发生机制中的作用[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.

- [20]YOULE RJ, VAN DER BLIEK AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress [J]. *Sci*, 2012, 337 (6098): 1062–1065.
- [21]ZIFA E, DANIIL Z, SKOUMI E, et al. Mitochondrial genetic background plays a role in increasing risk to asthma [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(4):4697–4708.
- [22]MABALIRAJAN U, GHOSH B. Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome and asthma [J]. *J Allergy (Cairo)*, 2013, 2013:1–12. doi: 10.1155/2013/340476.
- [23]DENZER I, MÜNCH G, FRIEDLAND K. Modulation of mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases via activation of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 by food-derived compounds [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 103:80–94. doi: 10.1016/j.phrs.2015.11.019.
- [24]PIANTADOSI CA, SULIMAN HB. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and its interface with inflammatory processes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820(4):532–541.
- [25]谢建林,林明宝,侯琦. 核转录因子 Nrf2 与肺部炎症疾病研究进展 [J]. *药理学报*, 2015, 50(9):1080–1087.
- [26]黄琨伦,施婵妹,闵婧琦,等. HO-1 与常见呼吸系统疾病研究进展 [J]. *医学研究杂志*, 2018, 47(12):19–21.

Effects of *Guben Fangxiao Beverage* (固本防哮饮) on Lung Tissue Oxidative Stress and AMPK/Nrf2/HO-1 Pathway in Mice with Bronchial Asthma in Remission

DAI Xiaohan^{1,2}, ZHAO Xia^{1,2}, YAN Hua^{1,2}, SHAN Yiwen^{1,2}

1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210029; 2. Jiangsu Key Laboratory of Pediatric Respiratory Disease, Institute of Pediatrics, Nanjing University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of *Guben Fangxiao Beverage* (固本防哮饮) for the prevention and treatment of chronic airway inflammation during asthma remission. **Methods** Thirty-six female Balb/c mice were randomly divided into normal group, model group, low-, medium-, and high-dose of *Guben Fangxiao Beverage* group and montelukast sodium group, with 6 mice in each group. Except for the normal group, ovalbumin and respiratory syncytial virus were used in other groups to establish a mouse model of bronchial asthma in remission stage. After molding, the low-, medium-, and high-dose groups of *Guben Fangxiao Beverage* were respectively given 12, 24, and 36 g/(kg·d), the montelukast sodium group was given montelukast sodium granule 2.6 mg/(kg·d), and the mice in the normal group and model group were given 20 ml of double-distilled water, all by gavage, once a day for 28 days. The levels of interleukin 4 (IL-4) and interleukin 5 (IL-5) in the lung tissue of mice were detected; HE staining was used to observe the pathology of the lung tissue and to score the inflammation; DHE staining was used to observe the level of reactive oxygen species (ROS) in the lung tissue, and the activities of mitochondrial respiratory chain complexes I, II, III, IV, and V in the lung tissue were detected; the levels of serum superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), malondialdehyde (MDA) and adenosine triphosphate (ATP) were detected; the protein expression levels of phosphorylated adenosine monophosphate-activated protein kinase (p-AMPK), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), haem oxygenase 1 (HO-1) and cAMP responsive element binding protein (CREB) in the lung tissues of the model group were detected by Western blot. **Results** Compared with the normal group, the histopathological results of the lungs of mice in the model group showed an increase in inflammatory cells around the airways and an increase in inflammatory score; DHE staining showed an increase in the level of ROS, and an increase in the levels of IL-4 and IL-5 in the lung tissues; the levels of serum SOD, CAT, and ATP were reduced, and the level of MDA was elevated; the activities of the mitochondrial respiratory chain complexes I, II, III, IV, and V of the lung tissues were reduced, and the activities of p-AMPK, Nrf2, CREB protein expression decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the lung tissue inflammatory cells and inflammation scores of mice in each *Guben Fangxiao Beverage* dose group and montelukast sodium group were reduced; the levels of ROS, IL-4 and IL-5 in the lung tissue were reduced; the levels of CAT and ATP in the serum increased, and the content of MDA was reduced; and the activities of mitochondrial respiratory chain complexes I and II, as well as the expression of CREB protein, were elevated in the lung tissue ($P < 0.05$). Compared with the high-dose group, the MDA level of the medium-dose *Guben Fangxiao Beverage* group decreased ($P < 0.05$). The activity of mitochondrial respiratory chain complex V in the medium-dose group was higher than that in the montelukast sodium group, and the activity of mitochondrial respiratory chain complex IV in the medium- and high-dose groups was higher than that in the low-dose group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Guben Fangxiao Beverage* can inhibit oxidative stress and improve mitochondrial function to relieve chronic airway inflammation in bronchial asthma model mice during asthma remission, and its mechanism may be related to the activation of AMPK/Nrf2/HO-1 signaling pathway.

Keywords bronchial asthma; remission stage; *Guben Fangxiao Beverage* (固本防哮饮); oxidative stress; mitochondrial function; AMPK; Nrf2; HO-1

(收稿日期: 2023-07-14; 修回日期: 2023-09-21)

[编辑: 邓媛]