

# 麻黄碱通过调控 TGF- $\beta$ 1/NF- $\kappa$ B 信号通路抑制小鼠的气道炎症反应

徐莉\*, 廖赵妹, 苏小燕, 吕华龙, 陈剑标

(海南医学院第二附属医院 儿科一区, 中国海南 海口 570311)

**摘要:** 为了研究麻黄碱通过调控转化生长因子  $\beta$ 1/核因子  $\kappa$ B (transforming growth factor- $\beta$ 1/nuclear factor- $\kappa$ B, TGF- $\beta$ 1/NF- $\kappa$ B) 信号通路对哮喘小鼠气道炎症和气道重塑的影响, 将 BALB/c 小鼠随机分为空白对照组、哮喘模型组、麻黄碱低剂量组、麻黄碱高剂量组和地塞米松组, 并利用卵清白蛋白 (ovalbumin, OVA) 联合氢氧化铝腹腔注射法构建小鼠哮喘模型。药物处理 14 d 后, 通过无创性肺功能检测法测量小鼠气道反应性, 采用苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, HE staining) 观察小鼠肺组织病理情况, 采用瑞氏-吉姆萨染色法分析小鼠支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中的炎症细胞比例, 利用酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测小鼠血清 OVA 特异性免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE) 的表达水平及 BALF 中炎症因子的表达水平, 利用免疫印迹法检测小鼠肺组织 TGF- $\beta$ 1/NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白质的表达水平。结果显示, 麻黄碱可以降低哮喘小鼠血清中 OVA 特异性 IgE 及 BALF 中白细胞介素 (interleukin, IL)-4、IL-5、IL-6、IL-13、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 的表达水平, 并显著抑制肺组织中 TGF- $\beta$ 1/NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白质的表达, 从而显著抑制由 OVA 诱导的小鼠气道高反应性, 并改善哮喘小鼠的肺部炎症。

**关键词:** 麻黄碱; 哮喘; 气道炎症; 抗炎; TGF- $\beta$ 1/NF- $\kappa$ B 通路

中图分类号: Q471, R285.5, R562.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2024)01-0026-07

## Ephedrine Inhibits Airway Inflammatory Responses in Mice Through Modulation of the TGF- $\beta$ 1/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway

XU Li\*, LIAO Zhaomei, SU Xiaoyan, LÜ Hualong, CHEN Jianbiao

(Department of Paediatrics I, Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570311, Hainan, China)

**Abstract:** To investigate the effects of ephedrine on airway inflammation and airway remodeling through transforming growth factor- $\beta$ 1/nuclear factor- $\kappa$ B (TGF- $\beta$ 1/NF- $\kappa$ B) signaling pathway, mice were randomly divided into control group, asthma model group, low-dose ephedrine group, high-dose ephedrine group and dexamethasone group, and the mouse model of asthma was constructed by intraperitoneal injection with combination of ovalbumin (OVA) and aluminum hydroxide. Fourteen days after the drug treatment, the airway reactivity of mice was measured by non-invasive pulmonary function tests. The lung histopathology of mice and the proportion of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured by hematoxylin-eosin (HE) staining and Wright-Giemsa staining, respectively. The expression levels of serum OVA-specific immunoglobulin E (IgE) and inflammatory factors in BALF were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and the expression levels of TGF- $\beta$ 1/NF- $\kappa$ B pathway-related proteins in lung tissues were analyzed by immunoblot. The results showed that, in asthmatic mice, ephedrine reduced the OVA-specific IgE antibody levels in sera and interleukin (IL)-4, IL-5, IL-6, IL-13 and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) levels in BALF, and significantly inhibited the expression of TGF- $\beta$ 1/NF- $\kappa$ B pathway-related proteins in

收稿日期: 2023-02-27; 修回日期: 2023-05-31; 网络首发日期: 2023-09-20

基金项目: 海南省卫生健康行业科研项目(22A200267)

作者简介: \* 通信作者: 徐莉(1978—), 女, 海南海口人, 副主任医师, 主要从事儿科呼吸系统(哮喘)研究, E-mail: xuli7804@163.com

lung tissues. The drug could therefore significantly reduce OVA-induced airway hyperresponsiveness and ameliorate lung inflammation.

**Key words:** ephedrine; asthma; airway inflammation; antiinflammation; TGF- $\beta$ 1/NF- $\kappa$ B pathway

(*Life Science Research*, 2024, 28(1): 026-032)

麻黄碱(ephedrine, Eph)提取自麻黄科植物草麻黄、中麻黄或木贼麻黄的干燥草质茎<sup>[1]</sup>, 在中医药学方面具有重要的研究价值<sup>[2]</sup>, 是中医发汗解表第一要药, 善宣肺气、开腠理、透毛窍, 也是宣肺平喘的要药, 常用于肺热壅盛、高热喘急。现代药理研究表明, 麻黄碱具有广泛的生物活性, 如发汗、利尿、镇咳、平喘、抗过敏、升高血压、兴奋中枢神经系统、解热、抗病毒及影响神经肌肉传递等<sup>[3]</sup>。研究报道, 麻黄碱主要通过结合肾上腺素受体, 激活转化生长因子  $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) 相关通路<sup>[4-5]</sup>, 在血管平滑肌细胞迁移、动脉的炎症细胞浸润、血管壁的氧化应激和动脉壁脂质沉积等血管生物学行为中发挥重要的调控作用。然而, 由于其功能复杂, 麻黄碱的具体作用机制至今尚未完全阐明。

支气管哮喘是一种由多种细胞和细胞组分参与的气道慢性炎症<sup>[6]</sup>。尽管已有研究报道了麻黄碱舒张支气管的作用及机制<sup>[7]</sup>, 但麻黄碱对哮喘气道炎症的作用机制目前尚未阐明。为了评价麻黄碱对哮喘气道炎症的调控作用, 并进一步探索其分子机制, 本实验采用卵清白蛋白(ovalbumin, OVA)诱导建立小鼠哮喘气道炎症反应模型, 并基于 TGF- $\beta$ 1/核因子  $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 通路, 研究麻黄碱对哮喘气道炎症的作用机制。研究结果可为哮喘的临床治疗提供新思路和新方向。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雄性 BALB/c 小鼠, 3~4 周龄, 体重(21 $\pm$ 2) g, 购自广东省医学实验动物中心, 许可证号 SCXK(湘)2011-0003。本次实验通过海南医学院第二附属医院实验动物福利与伦理委员会审批(伦理审批号: LW-2020-012)。

其他主要实验材料包括: 98.7% 盐酸伪麻黄碱(广州市齐云生物技术有限公司); 98% 地塞米松(北京索莱宝科技有限公司); OVA 和氢氧化铝(Merck 公司, 美国); 小鼠 OVA 特异性免疫球蛋白

E (immunoglobulin E, IgE)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒(睿信生物科技有限公司); 小鼠细胞因子 ELISA 检测试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司); 瑞氏-吉姆萨(Wright-Giemsa)复合染色液(雷根生物技术有限公司); 裂解液 RIPA (上海碧云天生物技术有限公司); BCA 蛋白质检测试剂盒(ThermoFisher Scientific 公司, 美国); TGF- $\beta$ 1 抗体、转化生长因子激酶 1 (TGF beta-activated kinase 1, TAK1) 抗体、核因子  $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$  (inhibitor of NF- $\kappa$ B  $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ ) 抗体、p-I $\kappa$ B $\alpha$  抗体、p-NF- $\kappa$ B p65 抗体、NF- $\kappa$ B p65 抗体、 $\beta$ -actin 抗体、组蛋白 H3 抗体、鼠二抗、兔二抗(CST 公司, 美国)。

### 1.2 溶液的配制

盐酸伪麻黄碱储存液: 称取盐酸伪麻黄碱粉剂, 用生理盐水配制成质量浓度为 5 mg/L 和 20 mg/L 的盐酸伪麻黄碱储存液, 过滤除菌, 于 4  $^{\circ}$ C 冰箱储存备用。

OVA 储存液: 称取 OVA 粉剂, 用生理盐水配制成质量浓度为 80  $\mu$ g/mL 的 OVA 储存液, 过滤除菌, 于 4  $^{\circ}$ C 冰箱储存备用。

氢氧化铝储存液: 称取氢氧化铝粉剂, 用生理盐水配制成质量浓度为 4 mg/mL 的氢氧化铝储存液, 过滤除菌, 于 4  $^{\circ}$ C 冰箱储存备用。

地塞米松储存液: 称取地塞米松粉剂, 用生理盐水配制成质量浓度为 81  $\mu$ g/mL 的地塞米松储存液, 过滤除菌, 于 4  $^{\circ}$ C 冰箱储存备用。

### 1.3 哮喘模型建立与分组

将 50 只 BALB/c 小鼠随机分为: 1) 空白对照组; 2) 哮喘模型组; 3) 麻黄碱低剂量组; 4) 麻黄碱高剂量组; 5) 地塞米松组(阳性对照)。构建哮喘模型的方式如下: 在第 0 天和第 7 天腹腔注射 500  $\mu$ L 的 OVA 和氢氧化铝 1:1 混合溶液, 诱导小鼠致敏; 在第 14~18 天, 让小鼠每天 30 min 雾化吸入 5% 的 OVA, 以诱发哮喘。造模成功率约为 90%。空白对照组给予等量的生理盐水。在每次雾化前 1 h, 麻黄碱低剂量组和高剂量组分别腹腔注射 5 mg/kg 和 20 mg/kg 麻黄碱; 地塞米松组腹腔注射 0.405 mg/kg 地塞米松; 空白对照组及哮喘

模型组腹腔注射等体积的生理盐水。小鼠的给药剂量经预实验确定。

#### 1.4 气道反应性检测

末次刺激 24 h 后, 通过腹腔注射 90 mg/kg 的戊巴比妥钠对小鼠进行麻醉, 呼吸频率调整为 90 次/min, 潮气量 0.15 mL, 然后经尾静脉给予不同剂量的乙酰胆碱(12.5 mg/mL、25 mg/mL、50 mg/mL、100 mg/mL), 利用全身体积描记系统记录给药后肺阻力最大值。肺阻力最大值通常是指在呼气过程中测得的最大阻力, 而气道狭窄指数则是对呼吸道狭窄程度的一个评估指标。这两者之间的关系在临床上用于评估患者的肺功能和可能存在的呼吸道问题。气道狭窄指数(airway stenosis index,  $I$ )计算公式:  $I = (t_e/t_i - 1) \times (v_{PEF}/v_{PIF})$ ,  $t_e$ : 呼气时间;  $t_i$ : 松弛时间;  $v_{PEF}$ : 呼气时的峰值流速;  $v_{PIF}$ : 吸气时的峰值流速。

#### 1.5 样品收集

从小鼠眼眶采集 0.2 mL 血液样本, 以 3 500g 的速度离心 10 min, 分离血清, 保存在 -20 °C。灌胃 200 mg/kg 戊巴比妥钠处死小鼠后, 取仰卧位固定, 以暴露气管。注射生理盐水冲洗肺部 3 次, 收集支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)标本离心, 收集上清, 部分用于测定细胞因子水平, 其余保存于 -80 °C。采集 BALF 后, 收集各组小鼠的肺组织, 取一部分固定在 4% 的多聚甲醛溶液中, 另一部分加入裂解液并保存于 -80 °C。

#### 1.6 肺组织病理学观察

小鼠处死后, 取未经支气管肺泡灌洗的肺叶, 并用 4% 的多聚甲醛固定 24 h。样本经脱水、石蜡包埋和组织切片后, 于 70 °C 烘箱中烤片 2 h。随后, 将切片依次置于二甲苯、梯度乙醇、蒸馏水、苏木精、1% 盐酸乙醇和伊红染液中进行脱蜡及染色操作, 再依次置于梯度乙醇和二甲苯中进行脱水。最后, 利用中性树脂封片, 于光学显微镜下观察并拍照。参考文献[8], 观察小鼠肺组织的病理变化和气道上皮的炎症浸润程度, 并进行支气管及周围炎症的病理评分。根据病变由轻到重的程度, 依次定量为 0~4 分: 0 分表示气道周围无实质浸润; 1 分表示轻度浸润(浸润 0~20% 气道, 浸润 < 50% 血管周长); 2 分表示中度浸润(浸润 0~20% 气道, 浸润 > 50% 血管周长); 3 分表示广泛浸润(20%~70% 的大气道被细胞浸润包围); 4 分表示浸润较大(70%~100% 的大、小气道被浸润包围, 浸润区域远远超过气道和血管周围)。

#### 1.7 OVA 特异性 IgE 和细胞因子的 ELISA 检测

取收集的小鼠血清和 BALF, 根据 ELISA 试剂盒操作说明在微量反应板每孔加入待检标本 50  $\mu$ L, 设阳性、阴性对照各 2 孔, 每孔加入阳性或阴性对照 1 滴, 并设空白对照 1 孔。随后, 每孔加入酶结合物 1 滴, 充分混匀, 封板, 于 37 °C 孵育 30 min。弃去孔内液体, 加入洗涤液后静置 5 s, 重复洗涤 5 次。每孔加显色剂 A 液、B 液, 充分混匀, 封板, 于 37 °C 孵育 15 min。加终止液 1 滴并充分混匀。最后, 用酶标仪读取波长 450 nm 的光密度(optical density, OD)值, 以测定小鼠血清中 OVA 特异性 IgE 的水平 and BALF 中细胞因子白细胞介素(interleukin, IL)-4、IL-5、IL-6、IL-13、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )的含量。

#### 1.8 BALF 中炎症细胞的检测

用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)重悬 BALF 细胞并制备细胞涂片, 涂片干燥后置于甲醇中固定 15 min。待甲醇完全挥发后, 于瑞氏-吉姆萨复合染色液中染色 30 min。染色完成后, 用 PBS 洗去多余染色剂, 于阴凉处晾干, 并利用中性树脂进行封片。在光学显微镜下对不同炎症细胞进行分类和计数, 嗜酸性粒细胞为橙色, 巨噬细胞为灰蓝色, 淋巴细胞为蓝紫色, 中性粒细胞为淡紫色。

#### 1.9 免疫印迹分析

取 50 g 肺组织, 加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的裂解液 RIPA, 用眼科剪将组织剪碎后研磨, 于冰上静置 30 min, 随后进行超声裂解。裂解物以 12 000g 离心 10 min 后, 取上清液, 用 BCA 法测定蛋白质浓度。加入适量上样缓冲液并于 100 °C 变性 5 min。用 10.5% 的 SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离, 随后将蛋白质转至 PVDF 膜上; 用 5% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭液封闭 1 h; 加入待检测蛋白质的特异性抗体, 于 4 °C 孵育过夜; TBST 洗 3 次后, 分别用鼠二抗或兔二抗室温孵育 1 h; TBST 洗涤后, 加入化学发光液显影, 并采用 Tanon 5200 全自动化学发光图像分析系统拍照。实验重复 3 次。

#### 1.10 数据处理

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 实验独立重复 3 次, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。使用 GraphPad Prism 8.0.1 绘图。多组间比较采用单因素方差分析。病理炎症评分采用 Ridit 分析。显著性水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 麻黄碱可改善哮喘小鼠模型的气道高反应性

为了研究麻黄碱对哮喘小鼠气道反应性的影响,在末次刺激 24 h 后,利用无创性肺功能检测法测量了各组小鼠的气道反应性。结果显示,与空白对照组相比,哮喘模型组小鼠的肺组织气道阻力显著增加,而麻黄碱可显著降低 OVA 诱导的小鼠肺组织气道阻力( $P<0.05$ ),且具有剂量依赖性(图 1)。以上结果表明,麻黄碱治疗可以缓解哮喘小鼠的气道高反应性。

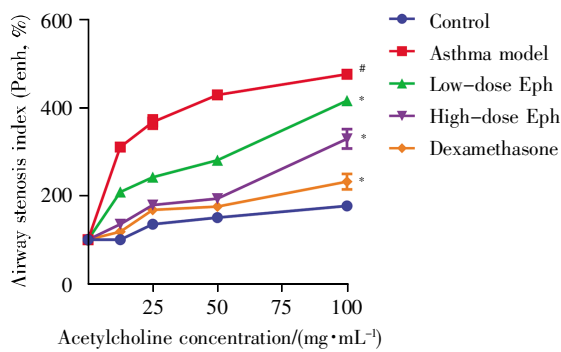


图 1 各组小鼠在梯度乙酰胆碱诱导下的气道狭窄指数变化

<sup>#</sup>:  $P<0.05$  vs.空白对照组; <sup>\*</sup>:  $P<0.05$  vs.哮喘模型组。图 2~5 的统计分析同此图。

Fig.1 Changes of airway stenosis index in mice induced by concentration gradients of acetylcholine

<sup>#</sup>:  $P<0.05$  vs. control group; <sup>\*</sup>:  $P<0.05$  vs. asthma model group. The same statistical analysis is used in the following Figs.2~5.

### 2.2 麻黄碱可缓解哮喘小鼠模型的肺部炎症

为了考察麻黄碱对哮喘小鼠肺部炎症和组织

病理的影响,我们对不同组别的小鼠肺组织进行了切片和苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色。显微镜观察结果显示,与空白对照组相比,哮喘模型组小鼠肺组织切片的气道平滑肌增厚,支气管及血管周围可见大量炎症细胞浸润,黏液细胞增多,黏液分泌增多,杯状细胞肥大,炎症评分增加( $P<0.05$ );而与哮喘模型组相比,麻黄碱干预后哮喘小鼠肺组织切片的炎症细胞浸润明显减少,气道结构相对完整,黏液分泌和杯状细胞增殖得到缓解,炎症评分有所下降( $P<0.05$ ),并且具有剂量依赖性(图 2)。以上结果表明,麻黄碱可以显著缓解哮喘小鼠模型的肺部炎症,降低肺损伤。

### 2.3 麻黄碱降低了哮喘小鼠 OVA 特异性 IgE 和炎症细胞水平

为了考察麻黄碱对哮喘小鼠血清中 OVA 特异性 IgE 水平及 BALF 中炎症细胞数目的影响,我们分别采用 ELISA 技术和瑞氏-吉姆萨复合染色对各组样品进行了检测。ELISA 结果显示, OVA 诱导可显著增加小鼠血清中 OVA 特异性 IgE 水平,而麻黄碱干预可显著降低小鼠血清中 OVA 特异性 IgE 水平( $P<0.05$ ) (图 3A)。瑞氏-吉姆萨染色结果显示,相比于空白对照组,哮喘模型组小鼠 BALF 中总细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的数量显著增加(图 3B~F) ( $P<0.05$ );而与哮喘模型组相比,麻黄碱组小鼠 BALF 中总细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的数量有所减少( $P<0.05$ ) (图 3B~F),并且具有剂量依赖性。以上结果表明,麻黄碱显著降低了哮喘小鼠血清中 OVA 特异性 IgE 的水平,并显著减少了炎症细胞的产生。

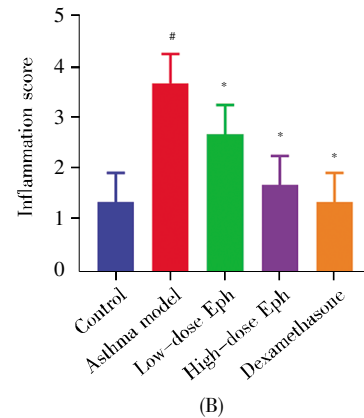
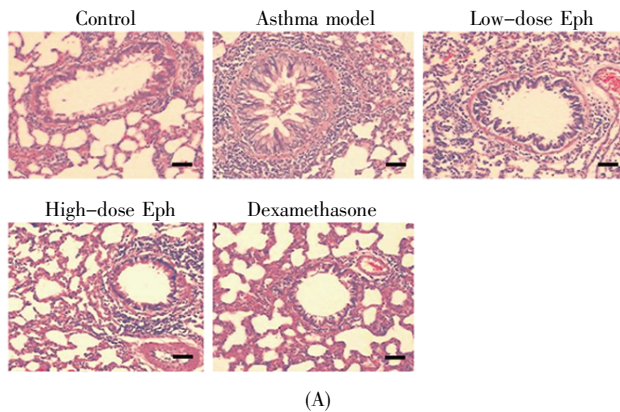


图 2 各组小鼠肺组织 HE 染色图及炎症评分

(A) HE 染色( $\times 200$ ), 标尺: 10  $\mu\text{m}$ ; (B) 炎症评分定量。

Fig.2 HE staining images and inflammation scores of lung tissues from various groups of mice

(A) HE staining ( $\times 200$ ), scale bar: 10  $\mu\text{m}$ ; (B) Quantification of inflammation scores.

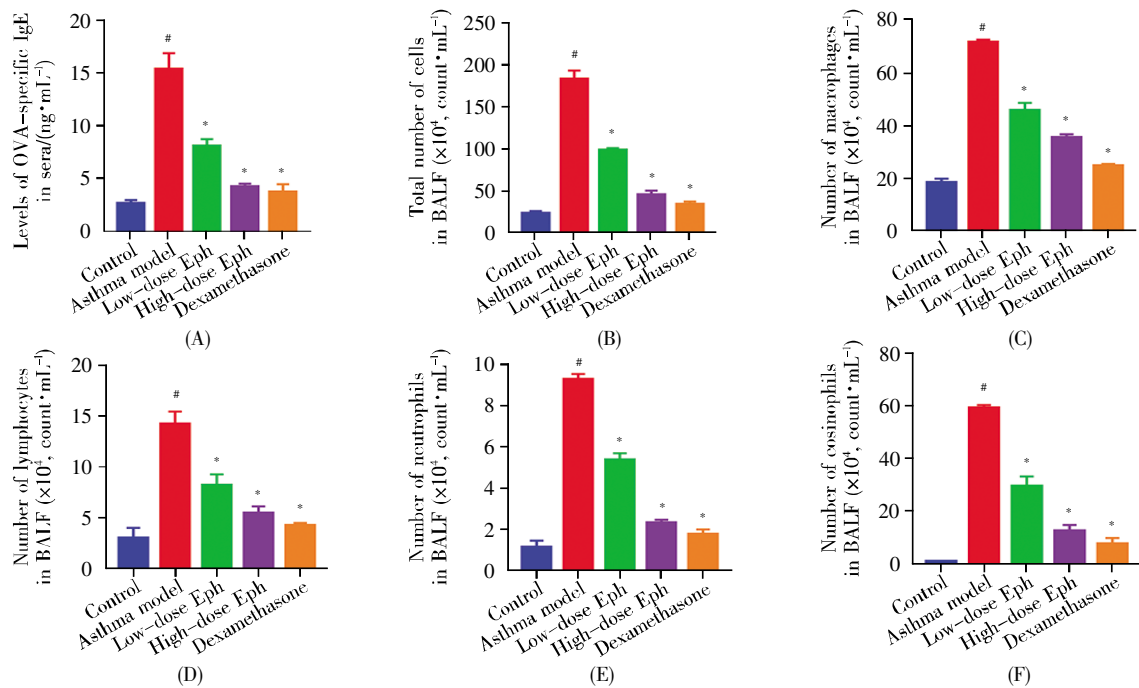


图3 各组小鼠血清和 BALF 中炎症指标的变化

Fig.3 Changes of inflammatory indicators in sera and BALF of mice in each group

#### 2.4 麻黄碱降低了哮喘小鼠模型的肺部炎症细胞因子水平

为了进一步考察麻黄碱对哮喘小鼠肺部炎症水平的影响,我们收集了各组小鼠的 BALF,并通过 ELISA 技术检测了炎症因子的分泌水平。

ELISA 结果显示, OVA 刺激后,小鼠肺组织 IL-4、IL-5、IL-6、IL-13、TNF- $\alpha$  水平显著上调( $P<0.05$ ),而麻黄碱治疗显著抑制了炎症因子的分泌水平( $P<0.05$ ),并且具有剂量依赖性(图 4)。以上结果表明,麻黄碱显著抑制了哮喘小鼠模型的肺部炎症

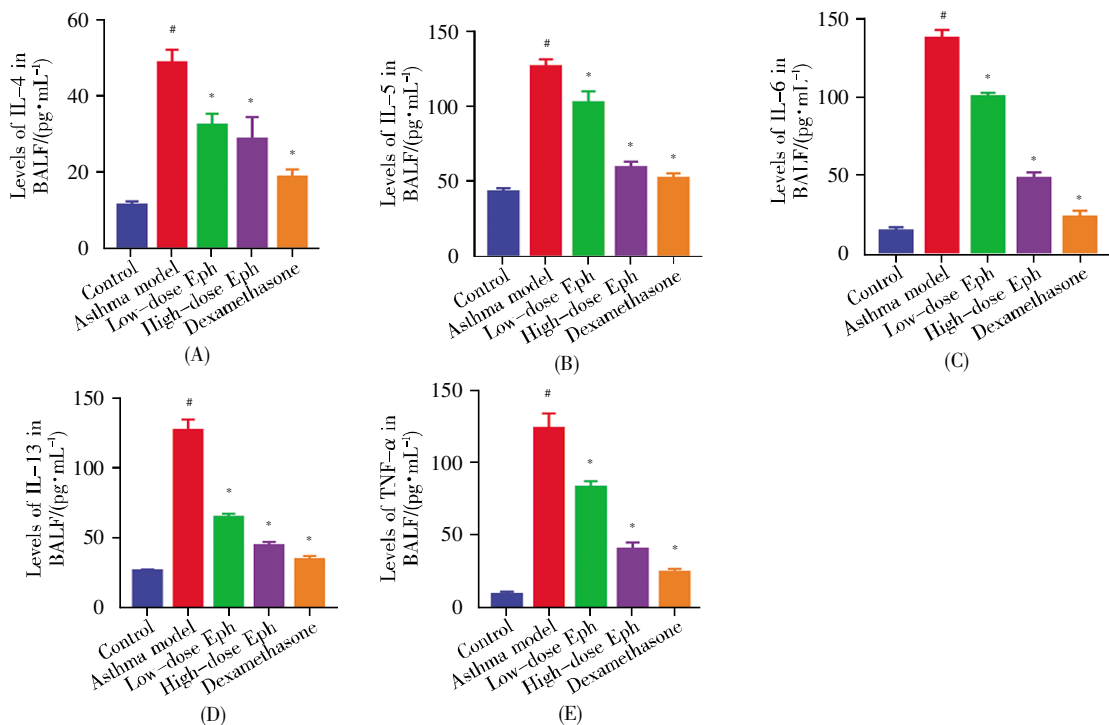


图4 各组小鼠 BALF 中炎症细胞因子的含量

Fig.4 Levels of inflammatory cytokine in BALF from various groups of mice

细胞因子分泌。

### 2.5 麻黄碱通过 TGF-β1/NF-κB 信号通路缓解 OVA 诱导的小鼠肺部炎症

为了进一步考察麻黄碱对小鼠肺部 TGF-β1/NF-κB 信号通路的影响,我们收集了各组小鼠的肺组织,并通过免疫印迹技术分析了 TGF-β1/NF-κB 信号通路关键蛋白质的表达水平。实验结果显示,与空白对照组相比,哮喘模型组小鼠肺组织 TGF-β1、TAK1、NF-κB p65 和 p-NF-κB p65 的蛋白质水平显著上调,而麻黄碱治疗干预下的小鼠肺组织 TGF-β1、TAK1、NF-κB p65 和 p-NF-κB p65 的蛋白质水平相较于哮喘模型组明显下调(图 5)。与此同时,相对于空白对照组,哮喘模型组小鼠肺组织 IκBα 蛋白的表达水平降低, p-IκBα 蛋白的表达水平升高,而麻黄碱治疗可升高 OVA 诱导小鼠肺组织的 IκBα 蛋白表达水平,并降低 p-IκBα 蛋白表达水平(图 5)。以上结果提示,麻黄碱可以显著抑制 TGF-β1/NF-κB 信号通路的活性,并发挥抗炎作用。

### 3 讨论

哮喘作为一种常见的呼吸系统疾病,近年来在世界范围内的发病率和患病率不断上升<sup>[9]</sup>。哮喘以气道慢性变态反应性炎症和气道高反应性为特征,对患者的生活质量造成了严重影响<sup>[10]</sup>。麻黄碱主要提取自麻黄科植物,是中药麻黄的主要成分。近年来研究发现,麻黄碱可以减轻肺损伤和肺纤维化,从而对肺心病具有显著的治疗作用,

其作用机理被认为是抑制血管炎症<sup>[4]</sup>。除此之外,麻黄碱还被报道可以调控 PI3K/Akt 通路,促进抗炎细胞因子 IL-10 的释放,并抑制促炎细胞因子 IL-1B、IL-6、IL-12 和 TNF-α 的表达,从而发挥抗炎功能,抑制炎症反应;在脂多糖诱导的内毒素休克小鼠模型中,麻黄碱可以调控 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)信号通路,并可通过调节促炎和抗炎细胞因子的平衡,调控免疫稳态,从而发挥抗炎作用<sup>[11]</sup>。然而,麻黄碱在哮喘治疗中的具体分子机制并未完全阐明。基于此,本研究建立了哮喘小鼠模型,并以此考察了麻黄碱对气道炎症和气道高反应性的影响。研究结果表明,麻黄碱可以显著缓解由 OVA 诱导所致的小鼠气道高反应性(图 1)。此外,哮喘模型组小鼠肺部组织病理改变明显,表现为与哮喘患者一样的炎症细胞浸润和杯状细胞增生,而麻黄碱治疗可以缓解这些症状。这些实验结果暗示麻黄碱可以缓解哮喘的炎症反应。

除严重的肺部炎症反应之外, Th1 和 Th2 细胞的失衡也是过敏性哮喘的主要临床病理特征之一<sup>[12]</sup>。大量研究显示, Th2 细胞释放的细胞因子水平升高,包括 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-13 等,可诱发炎症细胞向肺组织的浸润<sup>[13-14]</sup>。此外,有研究报道, Th2 细胞相关的细胞因子可以直接影响哮喘特异性免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)和 IgE 的产生<sup>[15]</sup>。现有的研究认为, IL-4 可促进 B 细胞增殖、分化和激活,并诱导肺组织炎症细胞浸润;而且, IL-4 的激活可显著促进哮喘患者 IgG 和

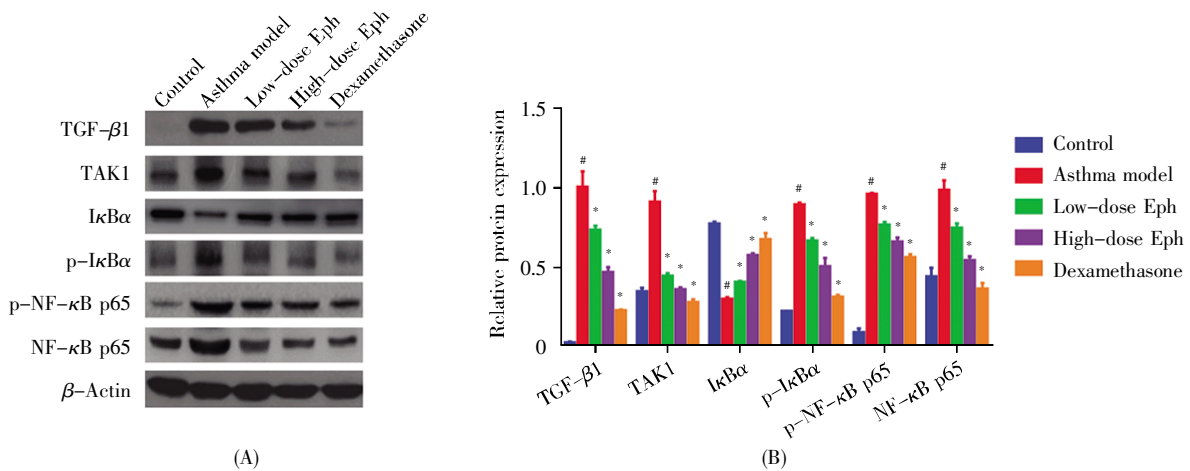


图 5 各组小鼠肺组织 TGF-β1、TAK1、IκBα、p-IκBα、p-NF-κB p65 和 NF-κB p65 蛋白表达水平 (A) 免疫印迹分析; (B) 蛋白质表达定量。

Fig.5 Expression levels of TGF-β1, TAK1, IκBα, p-IκBα, p-NF-κB p65 and NF-κB p65 proteins in lung tissues of mice

(A) Immunoblot analysis; (B) Quantitation of protein expression.

IgE 的生成<sup>[16]</sup>。IL-5 能够调控嗜酸性粒细胞的形成和增殖,并能显著增强 IL-4 引起的哮喘中 IgE 的分泌<sup>[17]</sup>。IL-6 发挥促进 IL-4 生成的作用,并调节 Th1/Th2 向 Th2 平衡,从而促进 Th2 细胞分化,减少 Th1 细胞分化<sup>[18]</sup>。IL-13 作为一种经典的炎症细胞因子,有利于 B 细胞分化,在哮喘小鼠肺组织中直接诱导炎症反应和气道高反应性<sup>[19]</sup>。有研究报道,IL-13 的过度分泌会导致人类哮喘患者的气道高反应性加重<sup>[20]</sup>。研究表明,抑制 Th2 细胞因子的分泌可用于哮喘的临床治疗<sup>[21]</sup>。本研究发现,麻黄碱可以有效抑制哮喘小鼠的 OVA 特异性 IgE 水平,巨噬细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞等炎症细胞的浸润(图 3),以及炎症细胞因子 IL-4、IL-5、IL-6、IL-13、TNF- $\alpha$  的表达(图 4),提示麻黄碱可能是一种潜在的治疗哮喘的药物。

另外,本研究还初步探究了麻黄碱在减轻哮喘气道炎症中的潜在机制。有研究报道,NF- $\kappa$ B 是炎症的关键调节因子,其激活在哮喘患者气道炎症中发挥重要作用<sup>[22]</sup>。在机制上,NF- $\kappa$ B 激活促进 T 细胞向 Th2 细胞的转化,并诱导 Th2 细胞因子(包括 IL-13、IL-5 和 IL-4 等)的产生<sup>[23]</sup>。现有研究认为,I $\kappa$ B $\alpha$  是 NF- $\kappa$ B 的细胞质调节因子,其通过与 NF- $\kappa$ B p65 结合,抑制 NF- $\kappa$ B p65 的激活;在病理因素的刺激下,I $\kappa$ B $\alpha$  能被 I $\kappa$ B 激酶(I $\kappa$ B kinase, IKK)磷酸化,并进一步被泛素化降解,从而导致 NF- $\kappa$ B p65 释放并向细胞核易位,发挥诱导基因转录的作用<sup>[24]</sup>。在本研究中,我们证实了 NF- $\kappa$ B 通路在哮喘小鼠中被激活,而麻黄碱治疗有效调节了 OVA 诱导的小鼠肺部 TGF- $\beta$ 1/NF- $\kappa$ B 通路(包括 p-NF- $\kappa$ B p65 和 I $\kappa$ B $\alpha$ )的激活(图 5),这与麻黄碱治疗后小鼠肺组织炎症因子水平下降、肺部炎症改善的结果一致。这些结果为证实麻黄碱降低 OVA 诱发的哮喘与调节 TGF- $\beta$ 1/NF- $\kappa$ B 信号通路激活有关提供了依据。已有研究报道,TGF- $\beta$ 1/NF- $\kappa$ B 信号通路抑制剂可以减轻哮喘气道炎症<sup>[25-26]</sup>,我们的研究结果为麻黄碱联用 TGF- $\beta$ 1/NF- $\kappa$ B 信号通路抑制剂治疗哮喘患者这一潜在的策略提供了依据。

综上所述,本研究揭示了麻黄碱通过 TGF- $\beta$ 1/NF- $\kappa$ B 信号通路抑制哮喘小鼠气道炎症的分子机制,为哮喘的临床治疗提供了新思路和新方向。

#### 参考文献(References):

[1] 田楠楠,杨茜和,朱雅暄,等.麻黄的化学成分及其药效作用

- 和药代特征[J].中国中药杂志(TIAN Nannan, YANG Qianhe, ZHU Yaxuan, *et al.* Mahuang (herbaceous stem of *Ephedra* spp.): chemistry, pharmacodynamics, and pharmacokinetics[J]. China Journal of Chinese Materia Medica), 2022, 47(13): 3409-3424.
- [2] ZHANG Y B, JIN L M, LIU H Y, *et al.* Ephedrine vs. phenylephrine effect on sublingual microcirculation in elderly patients undergoing laparoscopic rectal cancer surgery[J]. *Frontiers in Medicine*, 2022, 9: 969654.
- [3] TANG S Y, REN J L, KONG L, *et al.* Ephedrae Herba: a review of its phytochemistry, pharmacology, clinical application, and alkaloid toxicity[J]. *Molecules*, 2023, 28(2): 663.
- [4] WANG Q, CUI Y B, WU X F, *et al.* Riparin II potentials the effect of ephedrine on inflammation and remodelling in the airway of rats suffering from asthma by regulating transforming growth factor- $\beta$ /Smad3 signalling pathway[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 90: 107116.
- [5] WEN S, LIAO T. Ephedrine causes liver toxicity in SD rats via oxidative stress and inflammatory responses[J]. *Human & Experimental Toxicology*, 2021, 40(1): 16-24.
- [6] MANDLIK D S, MANDLIK S K. New perspectives in bronchial asthma: pathological, immunological alterations, biological targets, and pharmacotherapy[J]. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2020, 42(6): 521-544.
- [7] ANDERSON S D. Repurposing drugs as inhaled therapies in asthma[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2018, 133: 19-33.
- [8] LIU Y, ZHANG M Q, ZHANG H J, *et al.* Anthocyanins inhibit airway inflammation by downregulating the NF- $\kappa$ B pathway via the miR-138-5p/SIRT1 axis in asthmatic mice[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2022, 183(5): 539-551.
- [9] BOONPIYATHAD T, SÖZENER Z C, SATITSUKSANO A P, *et al.* Immunologic mechanisms in asthma[J]. *Seminars in Immunology*, 2019, 46: 101333.
- [10] SONG Y L, WANG Z G, JIANG J Z, *et al.* DEK-targeting aptamer DTA-64 attenuates bronchial EMT-mediated airway remodelling by suppressing TGF- $\beta$ 1/Smad, MAPK and PI3K signalling pathway in asthma[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020, 24(23): 13739-13750.
- [11] ZHENG Y J, GUO Z Y, HE W G, *et al.* Ephedrine hydrochloride protects mice from LPS challenge by promoting IL-10 secretion and inhibiting proinflammatory cytokines[J]. *International Immunopharmacology*, 2012, 13(1): 46-53.
- [12] LUO W H, HU J D, XU W F, *et al.* Distinct spatial and temporal roles for Th1, Th2, and Th17 cells in asthma[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 974066.
- [13] WALSH G M. Biologics for asthma and allergy[J]. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 2017, 25(3): 231-234.
- [14] WALSH G M. Biologics targeting IL-5, IL-4 or IL-13 for the treatment of asthma - an update[J]. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2017, 13(2): 143-149.
- [15] PATEL T R, SUR S. IgE and eosinophils as therapeutic targets in asthma[J]. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 2017, 17(1): 42-49.
- [16] CONDE E, BERTRAND R, BALBINO B, *et al.* Dual vaccination against IL-4 and IL-13 protects against chronic allergic asthma in mice[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 2574.
- [17] IFTIKHAR I H, SCHIMMEL M, BENDER W, *et al.* Comparative efficacy of anti IL-4, IL-5 and IL-13 drugs for treatment of eosinophilic asthma: a network meta-analysis[J]. *Lung*, 2018, 196(5): 517-530.
- [18] DIENZ O, RINCON M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses[J]. *Clinical Immunology*, 2009, 130(1): 27-33.

- [27] HALL C R, ROBERTSON L P, CARROLL A R, *et al.* The effect of *Psephodiplosis rubi* (Diptera: Cecidomyiidae) leaf galls on the secondary metabolite profiles of two congeneric host plants[J]. *Austral Entomology*, 2018, 57(2): 228–237.
- [28] DE OLIVEIRA PINTO I, SARMENTO M I, MARTINS A O, *et al.* Cell death and changes in primary metabolism: the onset of defence in *Eucalyptus* in the war against *Leptocybe invasa*[J]. *Pest Management Science*, 2022, 78(4): 1721–1728.
- [29] RANI D D, PEDADA S, SINGH R. Hessian fly: new insights to develop a gall nutritive tissue[J]. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2018, 6(1): 720–728.
- [30] COMPSON Z G, LARSON K C, ZINKGRAF M S, *et al.* A genetic basis for the manipulation of sink–source relationships by the galling aphid *Pemphigus batae*[J]. *Oecologia*, 2011, 167(3): 711–721.
- [31] MARTINSON E O, WERREN J H, EGAN S P. Tissue-specific gene expression shows a cynipid wasp repurposes oak host gene networks to create a complex and novel parasite-specific organ[J]. *Molecular Ecology*, 2022, 31(11): 3228–3240.
- [32] KARIÑO-BETANCOURT E, HERNÁNDEZ-SOTO P, RENDÓN-ANAYA M, *et al.* Differential expression of genes associated with phenolic compounds in galls of *Quercus castanea* induced by *Amphibolips michoacensis*[J]. *Journal of Plant Interactions*, 2019, 14(1): 177–186.
- [33] ZHU C C, SHI F H, CHEN Y, *et al.* Transcriptome analysis of Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume) in response to *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu infestation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(4): 855.
- [34] YANG X H, LI X M, ZHU D H, *et al.* The diversity and dynamics of fungi in *Dryocosmus kuriphilus* community[J]. *Insects*, 2021, 12(5): 426.
- [35] TANAKA Y, OKADA K, ASAMI T, *et al.* Phytohormones in Japanese mugwort gall induction by a gall-inducing gall midge[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2013, 77(9): 1942–1948.
- [36] TAKEI M, YOSHIDA S, KAWAI T, *et al.* Adaptive significance of gall formation for a gall-inducing aphids on Japanese elm trees[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2015, 72: 43–51.
- [37] MAPES C C, DAVIES P J. Cytokinins in the ball gall of *Solidago altissima* and in the gall forming larvae of *Eurosta solidaginis*[J]. *New Phytologist*, 2001, 151(1): 203–212.
- [38] KAI S, KUMASHIRO S, ADACHI S, *et al.* Life history of *Stenopsylla nigricornis* (Hemiptera: Psylloidea: Trioziidae) and phytohormones involved in its gall induction[J]. *Arthropod–Plant Interactions*, 2017, 11(1): 99–108.
- [39] TOKUDA M, JIKUMARU Y, MATSUKURA K, *et al.* Phytohormones related to host plant manipulation by a gall-inducing leafhopper[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62350.
- [40] YAMAGUCHI H, TANAKA H, HASEGAWA M, *et al.* Phytohormones and willow gall induction by a gall-inducing sawfly[J]. *New Phytologist*, 2012, 196(2): 586–595.
- [41] TOOKER J F, DE MORAES C M. Feeding by hessian fly (*Mayetiola destructor* [Say]) larvae on wheat increases levels of fatty acids and indole-3-acetic acid but not hormones involved in plant–defense signaling[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2011, 30(2): 158–165.
- [42] DI D W, ZHANG C G, LUO P, *et al.* The biosynthesis of auxin: how many paths truly lead to IAA?[J]. *Plant Growth Regulation*, 2016, 78(3): 275–285.
- [43] GIRON D, GLEVAREC G. Cytokinin-induced phenotypes in plant–insect interactions: learning from the bacterial world[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2014, 40(7): 826–835.
- [44] TOOKER J F, DE MORAES C M. A gall-inducing caterpillar species increases essential fatty acid content of its host plant without concomitant increases in phytohormone levels[J]. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 2009, 22(5): 551–559.
- [45] TREUTTER D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2006, 4(3): 147–157.
- [46] HALL C R, CARROLL A R, KITCHING R L. A meta-analysis of the effects of galling insects on host plant secondary metabolites[J]. *Arthropod–Plant Interactions*, 2017, 11(4): 463–473.
- [47] SINGH S, KAUR I, KARIYAT R. The multifunctional roles of polyphenols in plant–herbivore interactions[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(3): 1442.
- [48] 刘平. 植物源杀虫剂的主要种类及应用前景[J]. 青海农林科技(LIU Ping. The main types of application and prospects of botanical pesticides[J]. *Science and Technology of Qinghai Agriculture and Forestry*), 2019(4): 57–60, 68.
- [49] 黄占华, 方桂珍. 植物单宁的应用及研究进展[J]. 林产化工通讯(HUANG Zhanhua, FANG Guizhen. Application and research progresses of vegetable tannin[J]. *Journal of Chemical Industry of Forest Products*), 2005, 39(5): 39–43.
- [50] IKAI N, HIJII N. Manipulation of tannins in oaks by galling cynipids[J]. *Journal of Forest Research*, 2007, 12(4): 316–319.
- [51] 李香妹, 杨筱慧. 栗瘿蜂幼虫虫瘿与寄主植物部分营养和防御物质含量或活性的比较[J]. 生命科学研究(LI Xiangmei, YANG Xiaohui. Comparison of the contents or activities of nutritional and defensive substances between the larval galls and host plants of *Dryocosmus kuriphilus*[J]. *Life Science Research*), 2019, 23(3): 214–218, 252.

(上接第 32 页)

- [19] KARO-ATAR D, BITTON A, BENHAR I, *et al.* Therapeutic targeting of the interleukin-4/interleukin-13 signaling pathway: in allergy and beyond[J]. *BioDrugs*, 2018, 32(3): 201–220.
- [20] NTONTSI P, PAPATHANASSIOU E, LOUKIDES S, *et al.* Targeted anti-IL-13 therapies in asthma: current data and future perspectives[J]. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2018, 27(2): 179–186.
- [21] NGUYEN T H T, CASALE T B. Immune modulation for treatment of allergic disease[J]. *Immunological Reviews*, 2011, 242(1): 258–271.
- [22] HWANG Y P, JIN S W, CHOI J H, *et al.* Inhibitory effects of L-theanine on airway inflammation in ovalbumin-induced allergic asthma[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 99: 162–169.
- [23] DAS J, CHEN C H, YANG L, *et al.* A critical role for NF- $\kappa$ B in GATA3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation[J]. *Nature Immunology*, 2001, 2(1): 45–50.
- [24] BARNES P J, KARIN M. Nuclear factor- $\kappa$ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases[J]. *The New England Journal of Medicine*, 1997, 336(15): 1066–1071.
- [25] KARIYAWASAM H H, GANE S B. Allergen-induced asthma, chronic rhinosinusitis and transforming growth factor- $\beta$  superfamily signaling: mechanisms and functional consequences[J]. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2019, 15(11): 1155–1170.
- [26] TIRPUDE N V, SHARMA A, JOSHI R, *et al.* *Vitex negundo* Linn. extract alleviates inflammatory aggravation and lung injury by modulating AMPK/PI3K/Akt/p38–NF- $\kappa$ B and TGF- $\beta$ /Smad/Bcl2/caspase/LC3 cascade and macrophages activation in murine model of OVA–LPS induced allergic asthma[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 271: 113894.