

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.10.019

黄芩总黄酮对支气管哮喘大鼠的治疗作用及 miR-133a-3p/
NOX4/NLRP3 信号轴表达的影响*王立琼, 黄娟, 张芳霞, 赵红玲, 李雯[△]

湖北省咸宁市中心医院/湖北科技学院附属第一医院儿内科, 湖北咸宁 437100

摘要:目的 黄芩总黄酮对支气管哮喘大鼠的治疗作用及 miR-133a-3p/NOX4/NLRP3 信号轴表达的影响。方法 清洁级 SD 大鼠 100 只分为正常对照组、模型组、地塞米松组(200 mg/kg)、黄芩总黄酮低剂量组(100 mg/kg)、黄芩总黄酮高剂量组(200 mg/kg), 每组 20 只。除正常对照组外, 模型组、地塞米松组、黄芩总黄酮低剂量组通过卵清蛋白(OVA)建立支气管哮喘模型, 并予以相应药物干预。实验结束后, 检测肺泡灌洗液淋巴细胞百分比、中性粒细胞百分比、白细胞计数, 以及肺/体比值、肺损伤评分、动脉血氧分压(PaO₂)水平; 反逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)及蛋白印迹法检测肺支气管组织微小 RNA-133a-3p(miR-133a-3p)、NADPH 氧化酶 4 (NOX4)、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3)水平。结果 与正常对照组比较, 模型组肺泡灌洗液淋巴细胞百分比、中性粒细胞百分比、白细胞计数、肺/体比值、肺损伤评分, 以及支气管组织中 NOX4、NLRP3 蛋白和 mRNA 表达水平升高, PaO₂ 水平、支气管组织中 miR-133a-3p 表达水平降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 地塞米松组、黄芩总黄酮低剂量组和黄芩总黄酮高剂量组肺泡灌洗液淋巴细胞百分比、中性粒细胞百分比、白细胞计数、肺/体比值、肺损伤评分, 以及支气管组织中 NOX4、NLRP3 蛋白和 mRNA 表达水平降低, PaO₂ 水平、支气管组织中 miR-133a-3p 表达水平升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与地塞米松组比较, 黄芩总黄酮低剂量组、黄芩总黄酮高剂量组肺泡灌洗液淋巴细胞百分比、中性粒细胞百分比、白细胞计数、肺/体比值、肺损伤评分, 以及支气管组织中 NOX4、NLRP3 蛋白和 mRNA 表达水平升高, PaO₂ 水平、支气管组织中 miR-133a-3p 表达水平降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与黄芩总黄酮低剂量组比较, 黄芩总黄酮高剂量组肺泡灌洗液淋巴细胞百分比、中性粒细胞百分比、白细胞计数、肺/体比值、肺损伤评分, 支气管组织中 NOX4、NLRP3 蛋白和 mRNA 表达水平升高, PaO₂ 水平、支气管组织中 miR-133a-3p 表达水平降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 黄芩总黄酮对大鼠支气管哮喘具有明显治疗作用, 其机制可能与黄芩总黄酮促进 miR-133a-3p 的表达进而抑制 NOX4/NLRP3 信号轴的激活相关。

关键词: 黄芩总黄酮; miR-133a-3p/NOX4/NLRP3 信号轴; 支气管哮喘; 大鼠; 地塞米松**中图分类号:** R446.9**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-9455(2024)10-1436-07Therapeutic effect of total flavonoids of scutellaria baicalensis on bronchial
asthma rats and influence on expression of miR-133a-3p/NOX4/NLRP3 signal axis*WANG Liqiong, HUANG Juan, ZHANG Fangxia, ZHAO Hongling, LI Wen[△]Department of Pediatrics Medicine, Xianning Central Hospital/the First Affiliated Hospital of Hubei
University of Science and Technology, Xianning, Hubei 437100, China

Abstract: Objective To explore the therapeutic effect of total flavonoids of scutellaria baicalensis on bronchial asthma rats and influence on expression of miR-133a-3p/ 3P /NLRP3 signal axis. **Methods** A total of 100 clean grade SD rats were divided into normal control group, model group, dexamethasone group (200 mg/kg), total flavonoids of scutellaria baicalensis low-dose group (100 mg/kg), total flavonoids of scutellaria baicalensis high-dose group (200 mg/kg), with 20 rats in each group. Except for the normal control group, the model group, dexamethasone group, total flavonoids of scutellaria baicalensis low-dose group and total flavonoids of scutellaria baicalensis high-dose group were established by ovalbumin (OVA), and the corresponding drug intervention was given. At the end of the experiment, the lymphocytes percentage, neutrophils percentage, the white blood cell count in bronchoalveolar lavage fluid, the lung/body ratio, lung injury score and PaO₂ level were detected. Reverse transcription-polymerase (RT-PCR) and Western blot were used to detect the levels of miR-133a-3p, NOX4 and NLRP3 in lung bronchial tissues. **Results** Compared with the normal

* 基金项目: 湖北省咸宁市科技计划项目(2022ZRKX072)。

作者简介: 王立琼, 女, 副主任医师, 主要从事儿童呼吸系统疾病的诊治研究。 [△] 通信作者, E-mail: 448075769@qq.com。

control group, lymphocytes percentage in bronchoalveolar lavage fluid, neutrophils percentage, the white blood cell count, the lung/body ratio, the lung injury score, the expression levels of NOX4 and NLRP3 protein and mRNA in the bronchus tissues increased, the PaO₂ level and the expression level of miR-133a-3p in the bronchus tissues decreased in the model group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with the model group, the lymphocytes percentage, neutrophils percentage, white blood cell count, lung/body ratio, lung injury score, the expression levels of NOX4 and NLRP3 protein and mRNA in the bronchus tissues decreased in the total flavonoids of scutellaria baicalensis low-dose group and total flavonoids of scutellaria baicalensis high-dose group, the PaO₂ level and the expression level of miR-133a-3p in the bronchus increased, the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with the dexamethasone group, the lymphocytes percentage, neutrophils percentage, white blood cell count, lung/body ratio, lung injury score, the expression of NOX4 and NLRP3 protein and mRNA in the bronchus tissues increased in the total flavonoids of scutellaria baicalensis low-dose group and total flavonoids of scutellaria baicalensis high-dose group, the PaO₂ level and the expression level of miR-133a-3p in the bronchus tissues decreased significantly, the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with the total flavonoids of scutellaria baicalensis low-dose group, the percentage of lymphocytes, percentage of neutrophils, white blood cell count, lung/body ratio, lung injury score, and the expression of NOX4 and NLRP3 protein and mRNA in bronchial tissue increased in the total flavonoids of scutellaria baicalensis high-dose group, the PaO₂ level and the expression level of miR-133a-3p in bronchial tissue decreased, the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Total flavonoids of scutellaria baicalensis have obvious therapeutic effect on bronchial asthma in rats, and the mechanism may be related to the promotion of miR-133a-3p expression and inhibition of NOX4/NLRP3 signal axis.

Key words: total flavonoids of scutellaria baicalensis; miR-133a-3p/NOX4/NLRP3 signal axis; bronchial asthma; rat; dexamethasone

支气管哮喘是一种慢性炎症性呼吸系统疾病,其特征是炎症细胞浸润、可逆性支气管收缩,以及气道炎症、阻塞和高反应性^[1-2]。而 NADPH 氧化酶 4 (NOX4)/NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3)信号通路的激活在慢性阻塞性肺疾病和哮喘等炎症性肺病中起着重要作用,其基因表达上调在炎症过程中会诱导肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素(IL)-6 等炎症因子水平升高^[3]。微小 RNA(miRNA)调节许多生物过程,包括细胞生长和细胞炎症,越来越多的报道揭示了哮喘患者气道上皮细胞中 miRNA 的异常表达,且 miRNA 可调节支气管上皮细胞的生物学功能^[3-4]。一项针对严重哮喘患者的研究发现 miR-19a 在支气管上皮细胞中上调,并且通过靶向转化生长因子 β 受体 2(TGF β R2)加速细胞增殖;上皮细胞中 miR-181b-5p 的减少与哮喘中气道嗜酸性粒细胞的炎症有关;miR-135a 参与哮喘支气管上皮细胞损伤^[5-7]。传统中药可以在哮喘炎症介质的调节中发挥关键作用。中医理论中,支气管哮喘由寒湿毒素引起,最容易累及脾脏,引起脾阳被滞,发展为乏力、恶心呕吐、胸闷、气短、四肢酸痛等症状。黄芩可以解湿调理机体,清除瘟疫,诱导解毒。黄芩是传统中药植物,其在多种疾病中显示出临床疗效,包括癌症、心血管疾病和神经退行性疾病。黄芩总黄酮是一种从黄芩中提取的活性黄酮,经鉴定具有抗氧化和抗炎特性。研究发现,黄芩总黄酮可以减轻脂多糖(LPS)诱导的慢性阻塞性肺疾病中的炎症;黄芩总黄

酮通过抑制过度炎症和氧化应激来减轻大鼠膝骨性关节炎。目前,鲜有黄芩总黄酮对支气管哮喘的治疗作用及机制研究报道。因此,本研究拟探讨黄芩总黄酮对支气管哮喘大鼠的治疗作用及其对 miR-133a-3p/NOX4/NLRP3 信号轴表达的影响,以期为支气管哮喘的治疗提供依据,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物喂养及分组 清洁级 SD 大鼠 100 只,体重 300~320 g,14~20 月龄,均由重庆第三军医大学动物实验中心提供[许可证编号 SCXK(渝)2020-0019];根据体质量将大鼠按照分层随机分组表法分为正常对照组、模型组、地塞米松组(200 mg/kg)、黄芩总黄酮低剂量组(100 mg/kg)、黄芩总黄酮高剂量组(200 mg/kg),每组 20 只,均为雌鼠。大鼠饲养于以下环境:温度 19~24 ℃;湿度 55%~60%;昼夜循环(12/12 h,6:00—18:00 和 18:00—6:00)。本研究已获得本院动物护理和医学伦理委员会批准(伦理审批号:202103112)。

1.2 仪器与试剂 主要仪器包括希森美康 IX-2000 全自动血细胞分析仪(日本希森美康公司)、GEM Premier 3000 血气分析仪(美国通用公司)、DF-41 徕卡共聚焦显微镜(德国索尔姆斯公司)、FX-97 实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(Thermo Fisher Scientific 公司)、Image J 软件(美国国立卫生研究院)。主要试剂包括地塞米松(广东华南药业集团有限公司,批号:BI-263659),黄芩总黄酮(上海朝晖药业有限公

司,批号:63659),卵清蛋白(OVA, Sigma 公司,Ⅱ级,批号:514586),氢氧化铝[Al(OH)₃, 贵阳天利和化工有限公司,批号:515966)],热灭活百日咳博德特氏杆菌(中国国家药品检定所,批号:021596),磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4, 中国碧云天生物技术股份有限公司,批号:20213215),苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(上海赛培森生物科技有限公司,批号:65985),RNAeasy RNA 分离试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司,批号:102696),BeyoRT 第一链 cDNA 合成试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司,批号:102696),放射免疫沉淀试剂盒(RIPA, 美国赛默飞世公司,批号:202636),双辛可宁酸试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司,批号:3659665),10%聚丙烯酰胺凝胶、硝酸纤维素膜(美国 Bio-Rad 公司,批号:KH-56963、85475),小鼠 NOX4、NLRP3、GAPDH 一抗(Cell Signaling Technology 公司,批号:20269、58954、20159),山羊抗兔、辣根过氧化物酶偶联的二抗(Sigma 公司,批号:59659455),增强化学发光试剂(Millipore 公司,MA, USA,批号:2012596),IL-4、IL-12、TNF-α 酶联免疫吸附试验试剂盒(上海恒远生物科技有限公司,批号:3265、8541、9652)。

1.3 方法

1.3.1 各组模型的建立 正常对照组不做任何处理,正常喂养。模型组、地塞米松组、黄芩总黄酮低剂量组、黄芩总黄酮高剂量组通过 OVA 建立支气管哮喘模型。第 1 天大鼠腹腔内注射 1 mL 含 100 mg OVA 及 100 mg Al(OH)₃ 的生理盐水,同时每只大鼠腹腔注射 1 mL 含有 6×10^9 个热灭活的百日咳博德特氏杆菌作为第 2 佐剂。7 d 后进行加强致敏,第 2 次腹腔内注射 1 mL 含 100 mg OVA 及 100 mg Al(OH)₃ 的生理盐水。致敏后(第 15 天),连续 7 d 用 1% OVA 气溶胶对致敏大鼠进行 30 min 的暴露。暴露程序结束后,地塞米松组、黄芩总黄酮低剂量组、黄芩总黄酮高剂量组给予相应剂量药物灌胃,治疗周期为 4 周。

1.3.2 肺泡灌洗液(BALF)血细胞检测 在全身麻醉下,结扎大鼠右肺并将气管导管插入气管。通过气管导管将 PBS 轻轻滴入左肺,灌洗左肺。以 5 mL PBS 为总体积重复该过程 3 次。收集支气管 BALF 后,采用希森美康 IX-2000 全自动血细胞分析仪对 BALF 中的淋巴细胞百分比、中性粒细胞百分比、白细胞计数进行检测。

1.3.3 动脉血氧分压(PaO₂)检测及肺/体比值计算、肺损伤评分 处死大鼠前 6 h 从 5 组大鼠收集外周动脉血液标本。使用 GEM Premier 3000 分析血液标本的 PaO₂。处死大鼠,取右肺组织,测定湿肺/体质量;随后取右侧部分肺支气管组织进行常规染色切片,镜下阅片,对肺支气管间质水肿、肺支气管泡水肿、中性粒细胞浸润和肺支气管泡内充血情况进行评分,无改变或非常轻微为 0 分,轻度改变为 1 分,中度改变为 2

分,重度改变为 3 分,极重度改变为 4 分,累计 4 项的总分即为肺支气管损伤评分。

1.3.4 各组大鼠肺支气管组织 HE 染色比较 将肺支气管组织标本用 PBS 洗涤,并用 10% 甲醛固定过夜。将标本包埋在石蜡中,切成 4 μm 的切片。肺支气管组织用 HE 染色 15 min,并使用 DF-41 徕卡共聚焦显微镜放大 200 倍检查组织病变。

1.3.5 肺支气管组织 miR-133a-3p 及 NOX4、NLRP3 基因表达水平检测 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 miR-133a-3p 及 NOX4、NLRP3 基因表达水平,使用带有旋转柱的 RNAeasy RNA 分离试剂盒提取肺支气管组织的总 RNA 并检测。使用分光光度计在 280 nm 处测量 RNA 的浓度和纯度。使用 BeyoRT 第一链 cDNA 合成试剂盒将 RNA 反转录为互补 DNA(cDNA)。所有 cDNA 样品均配备 PCR 系统。将制备好的 PCR 反应液用实时荧光定量 PCR 进行扩增,反应条件:93 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,共 40 个循环。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。miR-133a-3p、NOX4、NLRP3、GAPDH 引物由上海生工生物有限公司合成,序列如下,miR-133a-3p: 5'-TCGGCGCTAGCTAGGCTAGCTAGCTAGT CGACTGTCGCTC-3'和 5'-GGGGT CGT CGT CGT AGCTGATCGATGCTAGTCGTCC-3'; NOX4: 5'-GGGGCGTAGCTAGTCGGGCTAGTCGATGCTG ATGCTCA-3' 和 5'-GGGTGTGTCGTAGCTGATCG ATGCTAGCTGATGCAC-3'; NLRP3: 5'-GTGTGTGCTGATCGTA GCTAGTCGATGCTAGTCGC A-3' 和 5'-G TGTGTCGTAGCTAGTCGATGCT AGTC GTGTGCA-3'; GAPDH: 5'-GTGTGTAGCTGAT CGATGCTGTAGTGAC-3'和 5'-GTGTAGT CGATGCTAGTCGTAGCTGATCGTAGCC-3'。GAPDH 作为内参基因,miR-133a-3p、NOX4、NLRP3 mRNA 表达水平通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法定量。

1.3.6 肺支气管组织中 NOX4、NLRP3 蛋白表达水平检测 在冰上使用放射免疫沉淀法裂解缓冲液提取总蛋白质 30 min,并使用双辛可宁酸试剂盒估算蛋白质的浓度。在 10% 聚丙烯酰胺凝胶上分离出 60 μg 的总蛋白质,并转移到硝酸纤维素膜上。膜在室温下用 TBST 缓冲液(含有 0.1% Tween-20 的 Tris 缓冲液)中的 1% 牛血清清蛋白封闭 1 h,随后与针对 NOX4、NLRP3、GAPDH 的抗体孵育,并在 4 ℃ 下过夜。用 TBST 缓冲液彻底洗涤后,将印迹与山羊抗兔、辣根过氧化物酶偶联的二抗在室温下孵育 1 h。通过增强化学发光法检测蛋白质条带,并使用 Image J 软件分析条带的强度。

1.3.7 肺支气管组织中 IL-4、IL-12、TNF-α 蛋白表达水平检测 采用酶联免疫吸附试验检测肺支气管组织中 IL-4、IL-12、TNF-α 蛋白表达水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 25.0 统计软件进行数

据处理及统计分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,多组间中的两两组间比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠 BALF 血细胞比较 与正常对照组比较,模型组 BALF 淋巴细胞百分比、中性粒细胞百分比、白细胞计数明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,地塞米松组、黄芩总黄酮低剂量组和黄芩总黄酮高剂量组 BALF 淋巴细胞百分比、中性粒细胞百分比、白细胞计数明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与地塞米松组比较,黄芩总黄酮低剂量组和黄芩总黄酮高剂量组 BALF 淋巴细胞百分比、中性粒细胞百分比、白细胞计数明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),与黄芩总黄酮低剂量组比较,黄芩总黄酮高剂量组 BALF 淋巴细胞百分比、中性粒细胞百分比、白细胞计数明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠 BALF 血细胞比较($\bar{x}\pm s$)

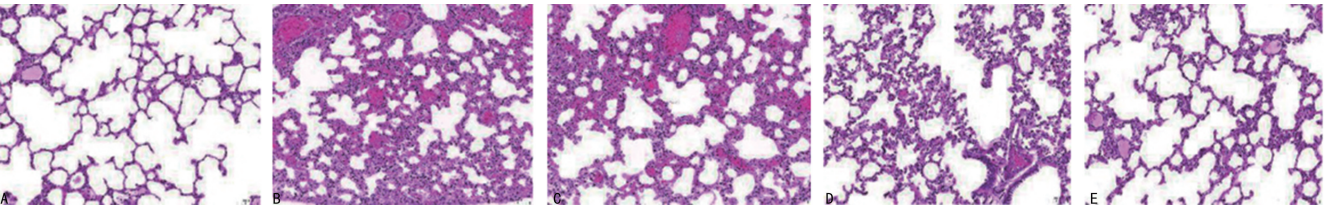
组别	<i>n</i>	淋巴细胞百分比(%)	中性粒细胞百分比(%)	白细胞计数($\times 10^7/L$)
正常对照组	20	3.60 $\pm$ 0.63	1.52 $\pm$ 0.26	1.82 $\pm$ 0.31
模型组	20	10.25 $\pm$ 1.25 ^a	31.36 $\pm$ 5.12 ^a	10.05 $\pm$ 1.55 ^a
地塞米松组	20	4.29 $\pm$ 0.72 ^b	6.58 $\pm$ 1.05 ^b	2.99 $\pm$ 0.48 ^b
黄芩总黄酮低剂量组	20	6.88 $\pm$ 0.98 ^{bc}	15.25 $\pm$ 2.35 ^{bc}	6.56 $\pm$ 1.08 ^{bc}
黄芩总黄酮高剂量组	20	5.81 $\pm$ 0.92 ^{bcd}	10.32 $\pm$ 1.53 ^{bcd}	4.12 $\pm$ 0.61 ^{bcd}
<i>F</i>		53.373	69.042	39.128
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与地塞米松组比较,^c $P<0.05$;与黄芩总黄酮低剂量组比较,^d $P<0.05$ 。

表 2 各组 PaO₂、大鼠肺/体比值、肺损伤评分比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	肺/体比值	肺损伤评分(分)	PaO ₂ (mmHg)
正常对照组	20	4.28 $\pm$ 0.70	0.00 $\pm$ 0.00	126.52 $\pm$ 20.32
模型组	20	10.75 $\pm$ 1.25 ^a	8.75 $\pm$ 1.02 ^a	59.25 $\pm$ 9.25 ^a
地塞米松组	20	4.86 $\pm$ 0.85 ^b	2.35 $\pm$ 0.42 ^b	109.42 $\pm$ 14.25 ^b
黄芩总黄酮低剂量组	20	7.39 $\pm$ 0.98 ^{bc}	6.58 $\pm$ 1.05 ^{bc}	75.25 $\pm$ 11.47 ^{bc}
黄芩总黄酮高剂量组	20	6.25 $\pm$ 0.87 ^{bcd}	3.96 $\pm$ 0.52 ^{bcd}	96.47 $\pm$ 13.57 ^{bcd}
<i>F</i>		37.102	41.229	53.921
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与地塞米松组比较,^c $P<0.05$;与黄芩总黄酮低剂量组比较,^d $P<0.05$ 。



注:A 为正常对照组;B 为模型组;C 为地塞米松组;D 为黄芩总黄酮低剂量组;E 为黄芩总黄酮高剂量组。

图 1 地塞米松、黄芩总黄酮对大鼠肺病理组织的影响(HE,×200)

2.4 各组大鼠肺支气管 miR-133a-3p、NOX4、NL- RP3 mRNA 表达水平比较 与正常对照组比较,模

型组 miR-133a-3p 表达水平降低, NOX4、NLRP3 mRNA 表达水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 地塞米松组、黄芩总黄酮低剂量组和黄芩总黄酮高剂量组 miR-133a-3p 表达水平升高, NOX4 mRNA、NLRP3 mRNA 表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与地塞米松组比较, 黄芩总黄酮低剂量组、黄芩总黄酮高剂量组 miR-133a-3p 表达水平降低, NOX4 mRNA、NLRP3 mRNA 表达水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与黄芩总黄酮低剂量组比较, 黄芩总黄酮高剂量组 miR-133a-3p 表达水平降低, NOX4 mRNA、NLRP3 mRNA 表达水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠肺支气管 miR-133a-3p、NOX4、NLRP3 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	miR-133a-3p	NOX4 mRNA	NLRP3 mRNA
正常对照组	20	5.25±0.85	0.38±0.06	0.89±0.13
模型组	20	0.83±0.12 ^a	5.71±0.89 ^a	4.94±0.81 ^a
地塞米松组	20	3.39±0.51 ^b	1.43±0.24 ^b	1.39±0.21 ^b
黄芩总黄酮低剂量组	20	2.75±0.42 ^{bc}	2.43±0.40 ^{bc}	2.49±0.45 ^{bc}
黄芩总黄酮高剂量组	20	1.55±0.20 ^{bcd}	3.15±0.50 ^{bcd}	3.29±0.51 ^{bcd}
<i>F</i>		21.023	18.327	15.177
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与地塞米松组比较, ^c $P < 0.05$; 与黄芩总黄酮低剂量组比较, ^d $P < 0.05$ 。

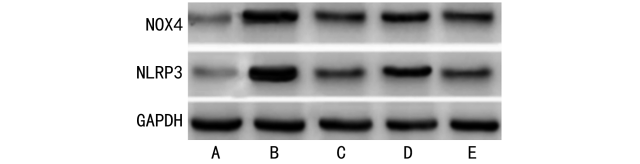
表 4 各组大鼠肺支气管组织中 NOX4、NLRP3 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	NOX4	NLRP3
正常对照组	20	0.16±0.03	0.19±0.03
模型组	20	1.09±0.16 ^a	1.12±0.17 ^a
地塞米松组	20	0.32±0.05 ^b	0.33±0.06 ^b
黄芩总黄酮低剂量组	20	0.69±0.12 ^{bc}	0.72±0.13 ^{bc}
黄芩总黄酮高剂量组	20	0.43±0.07 ^{bcd}	0.41±0.07 ^{cd}
<i>F</i>		33.281	27.056
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与地塞米松组比较, ^c $P < 0.05$; 与黄芩总黄酮低剂量组比较, ^d $P < 0.05$ 。

2.7 各组大鼠肺支气管 IL-4、IL-12、TNF-α 蛋白表达水平比较 与正常对照组比较, 模型组肺支气管组织中 IL-4、IL-12、TNF-α 蛋白表达水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 地塞米松组、

2.5 各组大鼠肺支气管组织中 NOX4、NLRP3 蛋白表达水平比较 与正常对照组比较, 模型组 NOX4、NLRP3 蛋白表达水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 地塞米松组、黄芩总黄酮低剂量组和黄芩总黄酮高剂量组 NOX4、NLRP3 蛋白表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与地塞米松组比较, 黄芩总黄酮低剂量组、黄芩总黄酮高剂量组 NOX4、NLRP3 蛋白表达水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与黄芩总黄酮低剂量组比较, 黄芩总黄酮高剂量组 NOX4、NLRP3 蛋白表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4、图 2。

黄芩总黄酮低剂量组和黄芩总黄酮高剂量组肺支气管组织中 IL-4、IL-12、TNF-α 蛋白表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与地塞米松组比较, 黄芩总黄酮低剂量组、黄芩总黄酮高剂量组肺支气管组织中 IL-4、IL-12、TNF-α 蛋白表达水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与黄芩总黄酮低剂量组比较, 黄芩总黄酮高剂量组肺支气管组织中 IL-4、IL-12、TNF-α 蛋白表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 5。



注: A 为正常对照组; B 为模型组; C 为地塞米松组; D 为黄芩总黄酮低剂量组; E 为黄芩总黄酮高剂量组。

图 2 各组大鼠肺支气管 NOX4、NLRP3 蛋白免疫印迹图

表 5 各组大鼠肺支气管 IL-4、IL-12、TNF-α 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/g)				
组别	<i>n</i>	IL-4	IL-12	TNF-α
正常对照组	20	166.89±38.69	142.47±34.25	159.85±32.25
模型组	20	654.38±126.36 ^a	788.85±165.82 ^a	614.88±122.32 ^a
地塞米松组	20	288.85±55.89 ^b	265.99±50.81 ^b	228.96±42.75 ^b
黄芩总黄酮低剂量组	20	485.85±98.39 ^{bc}	598.25±119.69 ^{bc}	550.32±102.29 ^{bc}

续表 5 各组大鼠肺支气管 IL-4、IL-12、TNF-α 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$, ng/g)

组别	<i>n</i>	IL-4	IL-12	TNF-α
黄芩总黄酮高剂量组	20	358.89 ± 72.42 ^{bcd}	352.65 ± 74.56 ^{bcd}	352.36 ± 71.58 ^{bcd}
<i>F</i>		78.482	89.163	81.046
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,^a*P*<0.05;与模型组比较,^b*P*<0.05;与地塞米松组比较,^c*P*<0.05;与黄芩总黄酮低剂量组比较,^d*P*<0.05。

3 讨 论

支气管哮喘是一种慢性气道疾病,涉及多种细胞和炎症因子,其长期复发会损伤患者的气道壁,并导致气道结构和功能改变,以及不可逆的气道气流受限。目前,普遍认为炎症细胞参与了哮喘患者的气道重塑,气道重塑是一个渐进的过程,是气道慢性炎症反复损伤和修复的结果,包括肺组织黏膜下部或支气管周围大量炎症细胞(中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和白细胞)滤过血管、上皮细胞化生、杯状细胞增生、上皮组织纤维化、黏膜下细胞外基质(ECM)沉积、基底膜不规则增厚、成纤维细胞增生肥大、肌成纤维细胞和平滑肌增生肥大、血管增生。根据《黄帝内经》,十二经络贯穿人体,对于维持免疫系统平衡和身体健康起着举足轻重的作用。根据中医表里相关理论,肺经与大肠功能相通,是控制津液(水)的最重要的经络。肺经与大肠经相通,使两脏腑之间形成表里关系。大肠被称为“交通之官”,其控制消化废物从液态到固态的转变,并将其运输至直肠向外排泄,它在体液平衡中发挥着重要作用,并通过控制皮肤的毛孔和排汗来协助肺部的呼吸功能。这种古老的中医理论可以用人体生理学来解释,其中水分子在肺细胞进行氧气和二氧化碳交换时充当润滑剂,而大肠则充当人体的水库。祛痰通便是治疗肺部疾病的常用方法。因此,保持通道的畅通是肺经线的重要功能。既往研究表明,黄芩总黄酮不仅能有效改善支气管哮喘患者的肠梗阻,还能有效改善呼吸困难和气体交换功能。因此,治疗支气管哮喘的首要指导理论是排出上呼吸系统的湿毒。本研究中,哮喘大鼠 BALF 中淋巴细胞百分比、中性粒细胞百分比、白细胞计数增加,气道壁和气道平滑肌明显增厚,支气管周围有大量炎症细胞浸润,表明大鼠哮喘模型建立成功。与模型大鼠相比,不同剂量黄芩总黄酮干预后淋巴细胞百分比、中性粒细胞百分比、白细胞计数明显降低。同时,随着黄芩总黄酮剂量的增加,肺组织气道壁增厚呈下降趋势,相关炎症细胞浸润明显减轻。以上结果表明,黄芩总黄酮对大鼠支气管哮喘具有明显治疗作用,其机制可能与黄芩总黄酮抑制炎症细胞浸润有关。

本研究结果显示,与正常对照组比较,模型组 miR-133a-3p 表达水平降低,NOX4 mRNA、NLRP3 mRNA 表达水平升高,差异有统计学意义(*P*<0.05);与模型组比较,地塞米松组、黄芩总黄酮低剂量组和黄芩总黄酮高剂量组 miR-133a-3p 表达水平

升高,NOX4 mRNA、NLRP3 mRNA 表达水平降低,差异有统计学意义(*P*<0.05);与地塞米松组比较,黄芩总黄酮低剂量组、黄芩总黄酮高剂量组 miR-133a-3p 表达水平降低,NOX4 mRNA、NLRP3 mRNA 表达水平升高,差异有统计学意义(*P*<0.05),与黄芩总黄酮低剂量组比较,黄芩总黄酮高剂量组 miR-133a-3p 表达水平降低,NOX4 mRNA、NLRP3 mRNA 表达水平升高,差异有统计学意义(*P*<0.05)。这说明,黄芩总黄酮可促进 miR-133a-3p 的表达进而抑制 NOX4/NLRP3。miR-133a-3p 与细胞周期、增殖和分化有关,相关研究已经描述了 miR-133a-3p 细胞类型和靶标特异性效应^[8]。在胃腺癌细胞中,miR-133a-3p 通过降低干扰素调节因子 1 的表达来促进其增殖,而在血管平滑肌细胞中,它会改变表型并抑制其增殖^[9]。从哮喘患者获得的外周血 CD4⁺T 淋巴细胞中发现 miR-133a-3p 下调^[10]。在缺乏 miR-133a-3p 的小鼠中,T 淋巴细胞水平明显升高^[12]。本研究结果显示,miR-133a-3p 可能对哮喘有一定抑制作用。NOX4、NLRP3 是 miR-133a-3p 下游调控的细胞因子,同时也是细胞炎症小体的重要调控器^[13]。

细胞炎症小体是感知到病原微生物感染后启动的一种免疫防御反应,对拮抗和清除病原微生物感染及内源性危险信号具有重要作用。炎症小体是一种聚集在细胞质中的多蛋白复合物,由模式识别受体(PRRs)、pro-Caspase-1 和凋亡相关斑点样蛋白(ASC)组成,NOX4 蛋白是一类由 N 端和 C 端结构域组成的双链体蛋白效应分子。Caspase-1 和 Caspase-4/-5/-11 可以通过切割,激活 NOX4 蛋白的 N 端。后者可聚集在磷脂膜上形成直径为 12~24 nm 的孔隙,为 IL-1β 和 IL-18 的释放提供条件。细胞炎症小体过度激活免疫反应会导致细胞和组织损伤,并引发疾病。现有研究表明,细胞炎症小体参与多种肺部疾病,如肺纤维化、急性肺损伤、支气管发育不良、慢性阻塞性肺疾病和哮喘^[14-15]。炎症小体介导反应的过度激活可能导致肺部炎症和哮喘症状明显恶化^[16]。这些研究表明,细胞炎症小体引起的 NOX4 激活与哮喘的发展有关。NOX4 的干预可以改善哮喘的发展。NLRP3 炎症小体可以识别真菌、细菌和病毒等病原体相关分子模式和损伤相关分子模式^[17]。以革兰阴性杆菌的脂肪酶(LPS)为例,LPS 作为第一信号,通过 NOX4 被巨噬细胞特异识别,结合第二信号 ATP, LPS 诱导 NLRP3 炎性体的组装,然后激活 Caspase-

1,后者进一步切割并激活其他下游 Caspase 执行蛋白(小鼠的 Caspase-11)以促进 IL-1 β 和 IL-18 加工,同时,更多的 Caspase-1 被激活,实现级联放大效应^[18-20]。本研究发现模型组支气管哮喘大鼠 miR-133a-3p 低表达,而 NOX4、NLRP3 表达上调;黄芩总黄酮处理后,逆转了上述情况。说明黄芩总黄酮促进 miR-133a-3p 的表达进而抑制 NOX4/NLRP3 信号轴的激活。本研究还发现黄芩总黄酮处理后,NOX4/NLRP3 信号轴下游细胞炎症因子 IL-4、IL-12、TNF- α 水平也明显降低,这归因于黄芩总黄酮对 NOX4/NLRP3 信号轴的抑制。在 OVA 致敏和攻击模型(模型组)中,大鼠的肺总提取物表现出增强的 NLRP3 活性。

综上所述,黄芩总黄酮对大鼠支气管哮喘具有明显治疗作用,其机制可能与黄芩总黄酮促进 miR-133a-3p 的表达进而抑制 NOX4/NLRP3 信号轴的激活相关。

参考文献

[1] BAO C, LIU C, LIU Q, et al. Liproxstatin-1 alleviates LPS/IL-13-induced bronchial epithelial cell injury and neutrophilic asthma in mice by inhibiting ferroptosis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 109: 108770.

[2] ROFFEL M P, BOUDEWIJN I M, VAN NIJNATTEN J L L, et al. Identification of asthma-associated microRNAs in bronchial biopsies [J]. *Eur Respir J*, 2022, 59 (3): 2101294.

[3] FEI Z D, ZHANG L, WANG L, et al. Montelukast ameliorated pemetrexed-induced cytotoxicity in hepatocytes by mitigating endoplasmic reticulum (ER) stress and nucleotide oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) activation[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3): 7894-7903.

[4] PAUL S, RUIZ-MANRIQUEZ L M, LEDESMA-PACHECO S J, et al. Roles of microRNAs in chronic pediatric diseases and their use as potential biomarkers: a review[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2021, 699: 108763.

[5] ELKASHEF S M M, AHMAD S E A, SOLIMAN Y M, et al. Role of microRNA-21 and microRNA-155 as biomarkers for bronchial asthma[J]. *Innate Immun*, 2021, 27 (1): 61-69.

[6] KYIALY M A, VOROBEOVA E V, KOTHALAWALA D M, et al. microRNAs-a promising tool for asthma diagnosis and severity assessment: a systematic review[J]. *J Pers Med*, 2022, 12(4): 543.

[7] GUO Y, CHEN Z, LI N, et al. SRSF1 promotes ASMC proliferation in asthma by competitively binding CCND2 with miRNA-135a[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2022, 77: 102173.

[8] 刘大凯, 郑希福, 李安石. 黄芩总黄酮对大鼠膝骨性关节炎

炎软组织 Camk2d、Ppp3r2 表达的影响[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2022, 32(3): 241-245.

[9] 杨江明, 王红芝, 石庆新, 等. 黄芩总黄酮对慢性阻塞性肺疾病大鼠炎症和氧化应激的影响及机制研究[J]. *中国药师*, 2020, 23(6): 1069-1072.

[10] 梁敏, 李弯, 熊诗思, 等. miR-133a-3p 靶向调控 CD2AP 基因减轻 RSV 感染的人支气管上皮细胞系 16-HBE 损伤[J]. *基础医学与临床*, 2021, 41(10): 1463-1469.

[11] BIAN Y, PANG P, LI X, et al. CircHelz activates NLRP3 inflammasome to promote myocardial injury by sponging miR-133a-3p in mouse ischemic heart[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2021, 158: 128-139.

[12] GUO H, WANG Y, JIA W, et al. miR-133a-3p relieves the oxidative stress induced trophoblast cell apoptosis through the BACH1/Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *Physiol Res*, 2021, 70(1): 67-78.

[13] LI Q, WANG Y M, HE J D. miR-133a-3p attenuates resistance of non-small cell lung cancer cells to gefitinib by targeting SPAG5 [J]. *J Clin Lab Anal*, 2021, 35 (7): e23853.

[14] LIU X L, SONG W, ZHANG X M, et al. Downregulating LncRNA XIST attenuated contrast-induced nephropathy injury via regulating miR-133a-3p/NLRP3 axis [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2021, 52(2): 440-453.

[15] LI X F, HU W, LI L, et al. miR-133a-3p/Sirt1 epigenetic programming mediates hypercholesterolemia susceptibility in female offspring induced by prenatal dexamethasone exposure[J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 206: 115306.

[16] LIANG P Q, WANG L X, YANG S S, et al. 5-Methoxyflavone alleviates LPS-mediated lung injury by promoting Nrf2-mediated the suppression of NOX4/TLR4 axis in bronchial epithelial cells and M1 polarization in macrophages[J]. *J Inflamm*, 2022, 19(1): 24.

[17] FU P F, RAMCHANDRAN R, SUDHADEVI T, et al. NOX4 mediates pseudomonas aeruginosa-Induced nuclear reactive Oxygen species Generation and chromatin remodeling in lung epithelium[J]. *Antioxidants(basel)*, 2021, 10(3): 477.

[18] HOFMANN A, FRANK F, WOLK S, et al. NOX4 mRNA correlates with plaque stability in patients with carotid artery stenosis[J]. *Redox Biol*, 2022, 5: 102473.

[19] CHAN A H, BURGNER S S, VEZYRGIANNIS K, et al. Caspase-4 dimerisation and D289 auto-processing elicit an interleukin-1 β -converting enzyme [J]. *Life Sci Alliance*, 2023, 6(10): e202301908.

[20] EXCONDE P M, HERNANDEZ-CHAVEZ C, BRAY M B, et al. The tetrapeptide sequence of IL-1 β regulates its recruitment and activation by inflammatory caspases[J]. *bioRxiv*, 2023, 2023: 528859.