

## 欧前胡素对支气管哮喘小鼠气道重塑的改善作用及其机制

阎煜<sup>1</sup>, 黄丹丹<sup>2</sup>, 洪春玲<sup>2</sup>, 魏博雯<sup>2</sup>, 杨媛媛<sup>2</sup>, 延光海<sup>2</sup>, 宋艺兰<sup>2</sup>, 咸哲民<sup>1</sup>

(1. 延边大学附属医院 延边医院儿科, 吉林 延吉 133000; 2. 延边大学吉林省常见过敏性疾病免疫与靶向研究重点实验室, 吉林 延吉 133000)

**[摘要]** **目的:** 探讨欧前胡素 (IMP) 对支气管哮喘小鼠气道重塑的影响, 并阐明其可能的机制。**方法:** 40只 SFP 级雄性 BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组、低剂量 IMP 组 (IMP-L 组)、高剂量 IMP 组 (IMP-H 组) 和地塞米松组, 每组 8 只。除对照组外, 其余各组小鼠腹腔注射卵清蛋白 (OVA) 混悬液构建小鼠哮喘模型。造模 1 周后观察各组小鼠每日哮喘症状并进行评分, 8 周后检测各组小鼠增强呼吸间歇 (Penh) 值以评估气道反应性, 流式细胞术检测各组小鼠肺泡灌洗液 (BALF) 中嗜酸性粒细胞百分率, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测各组小鼠血清 IgE 和 BALF 中白细胞介素 (IL)-13、IL-5、IL-4 及  $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 水平, HE、PAS 和 Masson 染色法观察各组小鼠肺组织病理形态表现、杯状细胞数量及胶原沉积情况, 免疫组织化学染色法观察各组小鼠肺组织中  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 和无翅型小鼠乳腺肿瘤病毒 (MMTV) 整合位点家族成员 5A (Wnt5A) 蛋白表达情况, Western blotting 法检测各组小鼠肺组织中 Wnt5A、细胞髓细胞瘤基因 (c-Myc)、 $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平, 免疫荧光法检测各组小鼠肺组织中  $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平。**结果:** 与对照组比较, 模型组小鼠哮喘症状评分升高 ( $P < 0.01$ ), Penh 值明显升高 ( $P < 0.01$ ), 血清 IgE 水平及 BALF 中嗜酸性粒细胞百分率和 IL-13、IL-5 及 IL-4 水平均明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), IFN- $\gamma$  水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), 肺组织中  $\alpha$ -SMA 和 Wnt5A 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ ), Wnt/ $\beta$ -catenin 通路相关蛋白表达明显升高 ( $P < 0.01$ ); 免疫荧光法检测, 肺组织中  $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, IMP-L 组、IMP-H 组和地塞米松组小鼠哮喘症状评分降低 ( $P < 0.01$ ), IMP-H 组小鼠 Penh 值降低 ( $P < 0.05$ ), IMP-L 组、IMP-H 组和地塞米松组小鼠血清 IgE 水平及 BALF 中嗜酸性粒细胞百分率和 IL-13、IL-5 及 IL-4 水平降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), IFN- $\gamma$  水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), 肺组织中  $\alpha$ -SMA 和 Wnt5A 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), Wnt/ $\beta$ -catenin 通路相关蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 免疫荧光法检测, 肺组织  $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。**结论:** IMP 对支气管哮喘小鼠气道重塑具有改善作用, 并可抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路相关蛋白表达水平。

**[关键词]** 欧前胡素; 哮喘; 气道重塑; Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号通路;  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白

**[中图分类号]** R562.25 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2024-11-19 [录用日期] 2025-01-11

[基金项目] 吉林省教育厅科学技术研究项目 (JJKH20210582KJ)

[作者简介] 阎煜 (1996-), 男, 四川省雅安市人, 在读硕士研究生, 主要从事儿童呼吸疾病基础和临床方面的研究。

[通信作者] 咸哲民, 主治医师, 硕士研究生导师 (E-mail: xianzhemin@126.com)

© 《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

## Improvement effect of imperatorin on airway remodeling in bronchial asthma mice and its mechanism

YAN Yu<sup>1</sup>, HUANG Dandan<sup>2</sup>, HONG Chunling<sup>2</sup>, WEI Bowen<sup>2</sup>, YANG Yuanyuan<sup>2</sup>, YAN Guanghai<sup>2</sup>,  
SONG Yilan<sup>2</sup>, XIAN Zhemin<sup>1</sup>

(1. Department of Pediatrics, Yanbian Hospital, Affiliated Hospital, Yanbian University, Yanji 133000, China; 2. Jilin Provincial Key Laboratory of Immunization and Targeting of Common Allergic Diseases, Yanbian University, Yanji 133000, China)

**ABSTRACT** **Objective:** To explore the effects of imperatorin (IMP) on airway remodeling in the bronchial asthma mice, and to elucidate the possible mechanisms. **Methods:** Forty SFP male BALB/c mice were randomly divided into control group, model group, low dose of IMP group (IMP-L group), high dose of IMP group (IMP-H group) and dexamethasone group, with 8 mice in each group. Except for control group, the mice in the other groups were injected with an ovalbumin (OVA) suspension intraperitoneally to induce the asthma models. After one week, the daily asthma symptoms of the mice were observed and scored. After 8 weeks, the enhanced pause (Penh) values of the mice in various groups were detected to evaluate the airway reactivities. The percentages of eosinophils in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of the mice in various groups were detected by flow cytometry. The levels of serum IgE, interleukin interferon-gamma (IL)-13, IL-5, IL-4 and interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) in BALF of the mice in various groups were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. HE, PAS and Masson staining were applied to observe the pathomorphology, the number of goblet cells and collagen deposition of the lung tissue of the mice in various groups. Immunohistochemistry method was applied to detect the expressions of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and mouse mammary tumor virus (MMTV) wingless type MMTV intergration site family member 5A (Wnt5A) proteins in lung tissue of the mice in various groups. The expression levels of Wnt5A, cellular myelocytomatosis oncogene (c-Myc),  $\beta$ -catenin and  $\alpha$ -SMA in lung tissue of the mice in various groups were detected by Western blotting method. The expression levels of  $\alpha$ -SMA protein in lung tissue of the mice in various groups were detected by immunofluorescence method. **Results:** Compared with control group, the score of asthma symptoms of the mice in model group was increased ( $P < 0.01$ ); the Penh value was significantly increased ( $P < 0.01$ ); the serum IgE levels and the levels of IL-13, IL-5, IL-4 in BALF, as well as the percentage of eosinophils (EOS) in BALF were significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and the level of IFN- $\gamma$  was reduced ( $P < 0.05$ ); the expression levels of  $\alpha$ -SMA and Wnt5A proteins in lung tissue were markedly increased ( $P < 0.01$ ); the expression levels of proteins associated with the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in the lung tissue were significantly increased ( $P < 0.01$ ); the immunofluorescence method results showed the expression level of  $\alpha$ -SMA protein in lung tissue was significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, the scores of asthma symptoms of the mice in IMP-L group, IMP-H group, and dexamethasone group were decreased ( $P < 0.01$ ), and the Penh values of the mice in IMP-H group were decreased ( $P < 0.05$ ); the serum IgE levels and the levels of IL-13, IL-5, IL-4 in BALF, as well as the percentages of EOS in BALF of the mice in IMP-L group, IMP-H group, and dexamethasone group were decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and the levels of IFN- $\gamma$  were increased ( $P < 0.05$ ); the expression levels  $\alpha$ -SMA and Wnt5A proteins in lung tissue were decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); the expression levels of proteins related to the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in the lung tissue were decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); the immunofluorescence method results showed that expression levels of the  $\alpha$ -SMA protein in the lung tissue were reduced ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** IMP has an improving effect on airway remodeling in

the asthmatic mice and can inhibit the expression levels of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway-related proteins.

**KEYWORDS** Imperatorin; Asthma; Airway remodeling; Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway;  $\alpha$ -smooth muscle actin

哮喘是一种慢性异质性气道疾病,是全球范围内存在的健康问题<sup>[1]</sup>,其以气道重塑、炎症、阻塞和高反应性为主要特征。目前研究<sup>[2-3]</sup>主要聚焦于气道炎症,而对气道重塑的研究较少。哮喘的治疗药物主要是皮质类激素、白三烯调节剂和 $\beta_2$ 受体激动剂等,但相关治疗药物主要针对气道炎症而非气道重塑,也尚无对气道重塑治疗十分有效的药物。因此,研究哮喘气道重塑的发病机制,确定新的治疗靶点并开发新的药物,对哮喘的控制和治疗有重要意义<sup>[3]</sup>。

Wnt蛋白广泛存在于哺乳动物中,在细胞分化、凋亡和干细胞增殖方面发挥重要作用,而 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)是经典Wnt/ $\beta$ -catenin通路的核心转录因子,具有双向调控功能<sup>[4]</sup>。研究<sup>[5-6]</sup>发现:气道平滑肌细胞(airway smooth muscle cells, ASMC)异常增殖是导致哮喘气道重塑形成的关键因素之一,而Wnt/ $\beta$ -catenin通路在ASMC增殖过程中发挥重要作用,同时能导致杯状细胞化生、肺泡损伤、肺血管重塑和机械传导引起的收缩力增加,进而造成气道重塑。因此,Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路在气道重塑形成过程中发挥着重要作用。

欧前胡素(imperatorin, IMP)是一种呋喃香豆素,主要存在于白芷、羌活、当归、红景天和小茴香等中草药中,具有抗癌、抗炎和神经保护等多种功效<sup>[7]</sup>。本课题组前期研究<sup>[8-9]</sup>显示:IMP能通过抑制转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ )/Smad3和磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)信号通路改善气道重塑。但目前关于IMP在哮喘小鼠气道重塑模型中对Wnt/ $\beta$ -catenin通路影响的相关研究较少。因此,本研究通过建立小鼠哮喘模型,探讨IMP对哮喘小鼠气道重塑和对Wnt/ $\beta$ -catenin通路的影响,为哮喘患者气道重塑的研究提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物、主要试剂和仪器** SFP级雄性BALB/c小鼠40只,体质量(20 $\pm$ 5)g,购自延边大学实验动物中心,动物使用许可证号:SYXK(吉)2020-0009。动物饲养于延边大学动物实

验中心,室温为20 $^{\circ}$ C~22 $^{\circ}$ C,湿度为55%~60%,正常光照,动物自由饮水摄食。本研究已获得延边大学医学院伦理委员会的批准,伦理批准号为:YD20240620006,整个实验进程中遵守《实验动物管理条例》。IMP购自中国上海源叶有限公司,鸡卵清蛋白(ovalbumin, OVA)购自美国Sigma公司,二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)、免疫组织化学染色试剂盒和酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒均购自北京中杉金桥公司,无翅型小鼠乳腺肿瘤病毒(mouse mammary tumor virus, MMTV)整合位点家族成员5A(wingless type MMTV integration site family member 5A, Wnt5A)和细胞髓细胞瘤基因(cellular myelocytomatosis oncogene, c-Myc)抗体购自武汉爱博泰克公司, $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)购自美国Cell Signaling公司, $\beta$ -actin、GAPDH、 $\beta$ -catenin抗体和IgG-HRP标记二抗均购自美国Abcam公司,二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自北京索莱宝科技有限公司,氢氧化铝粉购自赛默飞世尔科技公司。2135型轮转式切片机购自德国徕卡公司,U219雾化器购自大连医疗器械厂,15K高速冷冻台式离心机购自美国Sigma公司,RT-2100C酶联免疫检测仪购自美国雷杜公司,TXD3细胞涂片离心机购自广州沪瑞明仪器有限公司,Western blotting转膜仪购自美国Bio-Rad公司。

**1.2 实验分组和小鼠支气管哮喘模型制备** 40只SFP级雄性BALB/c小鼠饲养7d适应环境,随机分为对照组、模型组、低剂量IMP组(IMP-L组)、高剂量IMP组(IMP-H组)和地塞米松组,每组8只。模型制备:实验开始第1、8和15天,对照组小鼠采用0.9% NaCl腹腔注射,每只200 $\mu$ L,剩余4组小鼠每只腹腔注射配置的混悬液200 $\mu$ L(生理盐水200 $\mu$ L、10mg OVA和1mg氢氧化铝)。实验开始第17天,除对照组外其余4组小鼠采用1%OVA(OVA 0.1g+0.9% NaCl 10mL)雾化吸入,对照组小鼠采用0.9% NaCl 10mL雾化,每次30min,每周雾化3次,共8周。持续雾化1周后,每日观察小鼠行为并记录,以小鼠出现打

喷嚏、抓鼻、烦躁不安和喘息等哮喘样症状作为判断造模成功的标准<sup>[10]</sup>。从实验第17天开始,每次激发前1 h,对照组和模型组小鼠腹腔注射DMSO,每只200  $\mu\text{L}$ 。IMP稀释于DMSO中,IMP-L和IMP-H组小鼠分别按照30和60  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  IMP进行腹腔注射,地塞米松组小鼠腹腔注射1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  地塞米松,每只200  $\mu\text{L}$ 。

**1.3 各组小鼠支气管哮喘症状评分方法** 于实验开始第56天,在治疗前后和OVA雾化结束后10 min内对各组小鼠哮喘行为记录并进行评分,观察小鼠打喷嚏、抓鼻、喘息和哮喘发作症状等表现:小鼠未打喷嚏为0分,打喷嚏1~3个为1分,4~10个为2分,超过10个为3分;不抓鼻为0分,偶尔抓鼻为1分,频繁抓鼻为2分,持续抓鼻为3分;无喘息症状为0分,呼吸急促,轻微喘息为1分,喘息症状严重为2分,喘息致死为3分;评分总分最高为9分<sup>[11]</sup>。记录并汇总各组小鼠支气管哮喘症状评分并进行统计学分析。

**1.4 各组小鼠气道反应性测定** 哮喘症状评分结束后进行最后1次OVA雾化激发,激发结束24 h内,将小鼠放入体积描记箱,3 min内记录平均基线读数,依次用2.5、5.0、10.0、25.0和50.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酰甲胆碱进行雾化,时间3 min,记录平均值。使用小鼠无创体积描记系统和标准雾化设备测定,并按照说明书计算增强呼吸间歇(enhanced pause, Penh)值,结果以百分率表示<sup>[12]</sup>。以Penh值代表小鼠气道反应性, Penh值越大,气道反应性越强。

**1.5 各组小鼠血清、支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)和肺组织标本制备** 气道高反应性检测结束后,于各组小鼠眼眶后静脉丛采集血液并离心,3 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,分离得到血清并置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。然后采用乙醚处死小鼠,切开颈部皮肤打开胸腔并充分暴露气管,结扎右主支气管,生理盐水1 mL灌洗左主支气管和肺泡,反复灌洗3次,收集BALF,3 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min后取上清液,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存以备后续实验。取出的右肺组织放置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存,取出的左肺组织置于10%甲醛中固定。

**1.6 流式细胞术检测各组小鼠BALF中嗜酸性粒细胞百分率** 离心后的小鼠BALF中加入固定剂,避光孵育15 min,3 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min后弃上清液。加入荧光标记的嗜酸性粒细胞抗体(APC-CD45.2和PE-siglec-F)后混匀,避光孵育30 min,

加入1.5 mL磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤后离心,弃上清液,加入400  $\mu\text{L}$  PBS缓冲液上机检测,计算各组小鼠BALF中嗜酸性粒细胞百分率。嗜酸性粒细胞百分率=(嗜酸性粒细胞数/有核细胞数) $\times 100\%$ 。

**1.7 ELISA法检测各组小鼠血清中总IgE和OVA特异性IgE水平及BALF中白细胞介素(interleukin, IL)-13、IL-5、IL-4和 $\gamma$ 干扰素(interferon-gamma, IFN- $\gamma$ )水平** 将收集的小鼠血清和BALF严格按ELISA试剂盒说明书进行操作。采用酶标仪于波长450 nm处检测吸光度(A)值,绘制标准曲线,根据标准曲线计算各组小鼠血清中总IgE和OVA特异性IgE水平及BALF中IL-13、IL-5、IL-4和IFN- $\gamma$ 水平,单位为 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**1.8 HE、PAS和Masson染色观察各组小鼠肺组织病理形态表现、杯状细胞数量和胶原沉积情况**

将取出的小鼠左肺放置于甲醛溶液中固定,脱水、浸蜡后用石蜡包埋,将蜡块切成厚度约4  $\mu\text{m}$ 薄片后进行染色,将切片置于烘箱中1~2 h,二甲苯进行脱蜡后置于梯度乙醇中脱水,清水冲洗。分别按照HE、Masson和PAS染色试剂盒说明书操作,进行HE、Masson和PAS染色。待染色完成后依次用梯度乙醇脱水和二甲苯进行透明,最后待二甲苯挥发后用中性树脂胶封片,显微镜下观察并拍照。HE染色观察各组小鼠肺组织病理形态表现;PAS染色观察肺组织气道管壁周围杯状细胞数量,红色区域为杯状细胞;Masson染色观察肺组织胶原沉积情况,支气管周围可见淡蓝色的胶原纤维沉积。

**1.9 免疫组织化学染色法检测各组小鼠肺组织中 $\alpha$ -SMA和Wnt5A蛋白表达情况** 取石蜡切片置于烘箱中2 h后,依次进行脱蜡和脱水处理,加入10%山羊血清封闭30 min,加入枸橼酸缓冲液高温修复40 min后,PBS缓冲液洗涤3次,每次5 min,随后加入稀释后的 $\alpha$ -SMA和Wnt5A一抗,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h,然后回收一抗,PBS缓冲液洗涤3次,每次5 min,然后加入二抗孵育1 h,PBS缓冲液洗涤3次,每次5 min,DAB染色和苏木精复染后,梯度乙醇脱水,最后树脂胶封片,显微镜下观察。 $\alpha$ -SMA和Wnt5A蛋白阳性表达呈棕黄色,采用Image Proplus软件分析其阳性表达情况,测量阳性表达区域的积分光密度(IOD)值和视野内细胞所占面积(Area),取3个视野平均光密度(AOD)值的平均值作为每张切片的AOD值,以AOD值代表各

组小鼠肺组织中 $\alpha$ -SMA和Wnt5A蛋白表达水平。 $AOD=IOD \times 100\% / Area \times 100\%$ 。

### 1.10 Western blotting法检测各组小鼠肺组织中 $\alpha$ -SMA、Wnt5A、c-Myc和 $\beta$ -catenin蛋白表达水平

取小鼠右肺组织,提取总蛋白,BCA法检测蛋白浓度。配制10%的SDS-PAGE胶用于蛋白上样,然后依次电泳、转膜和封闭。加入 $\alpha$ -SMA(1:1 000)、Wnt5A(1:1 000)、c-Myc(1:1 000)、 $\beta$ -catenin(1:1 000)、 $\beta$ -actin(1:1 000)和GAPDH(1:2 500)一抗,4℃过夜,第2天洗膜后加入二抗(1:2 000)孵育2 h。ECL显影剂显影并成像。以GAPDH或 $\beta$ -actin作为内参,采用Image J软件分析蛋白条带灰度值,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

**1.11 免疫荧光法检测各组小鼠肺组织中 $\alpha$ -SMA蛋白表达水平** 将小鼠肺组织石蜡切片熔蜡、脱蜡和脱水处理后,采用微波加热进行抗原修复,加入一抗孵育过夜,洗涤后荧光二抗孵育,最后加入DAPI进行封片,微孔成像仪下拍照并分析。采用Image Proplus软件分析 $\alpha$ -SMA蛋白荧光强度,以荧光强度代表 $\alpha$ -SMA蛋白表达水平。

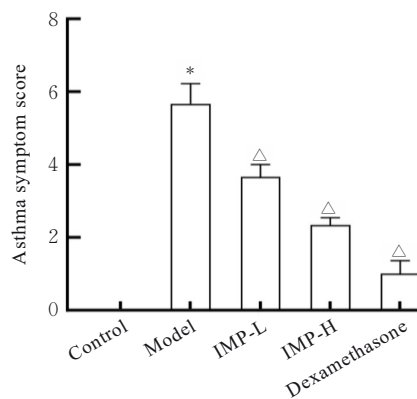
**1.12 统计学分析** 采用SPSS 17.0统计软件进行统计学分析,GraphPad Prism 10.0软件绘制图像。各组小鼠哮喘症状评分和Penh值,各组小鼠BALF中嗜酸性粒细胞百分率,各组小鼠血清中IgE和BALF中IL-13、IL-5、IL-4和IFN- $\gamma$ 水平,各组小鼠肺组织中 $\alpha$ -SMA、Wnt5A、c-Myc和 $\beta$ -catenin蛋白表达水平均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用LSD- $t$ 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组小鼠支气管哮喘症状评分** 与对照组比较,模型组小鼠哮喘症状评分明显升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,IMP-L组、IMP-H组和地塞米松组小鼠哮喘症状评分均明显降低( $P < 0.01$ ),其中地塞米松组评分最低。见图1。

**2.2 各组小鼠气道反应性** 乙酰甲胆碱剂量为10.0、25.0和50.0  $g \cdot L^{-1}$ 时,与对照组比较,模型组小鼠Penh值均明显升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,IMP-H组小鼠Penh值均明显降低( $P < 0.05$ );IMP-L组小鼠Penh值有下降趋势,地塞米

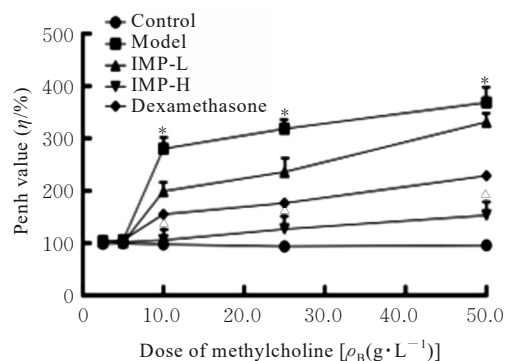
松组小鼠Penh值无明显变化,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图2。



\* $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.01$  vs model group.

图1 各组小鼠支气管哮喘症状评分

Fig. 1 Scores of bronchial asthma symptom of mice in various groups



\* $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$  vs model group.

图2 各组小鼠气道反应性

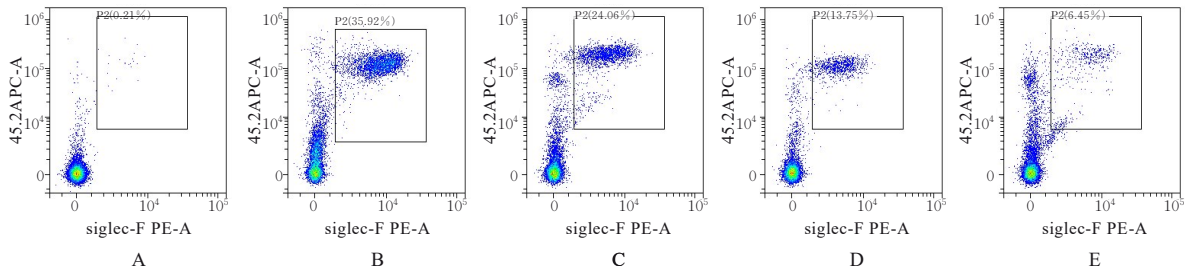
Fig. 2 Airway reactivities of mice in various groups

**2.3 各组小鼠BALF中嗜酸性粒细胞百分率** 与对照组比较,模型组小鼠BALF中嗜酸性粒细胞百分率明显升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,IMP-L组、IMP-H组和地塞米松组小鼠BALF中嗜酸性粒细胞百分率均明显降低( $P < 0.01$ ),其中IMP-H组降低最明显。见图3和4。

### 2.4 各组小鼠血清中总IgE和OVA特异性IgE水平

与对照组比较,模型组小鼠总IgE和OVA特异性IgE水平均明显升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,IMP-L组、IMP-H组和地塞米松组小鼠总IgE和OVA特异性IgE水平均明显降低( $P < 0.05$ )。见表1。

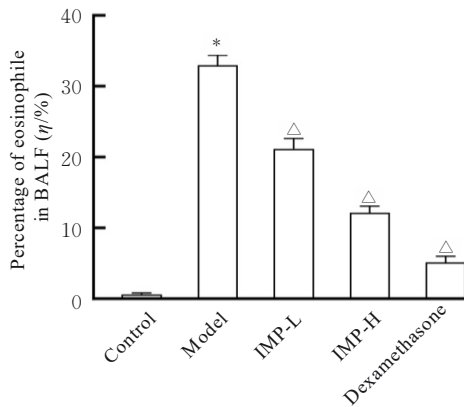
**2.5 各组小鼠BALF中IL-13、IL-5、IL-4和IFN- $\gamma$ 水平** 与对照组比较,模型组小鼠BALF中IL-13、IL-5和IL-4水平均明显升高( $P < 0.05$ ),IFN- $\gamma$ 水



A: Control group; B: Model group; C: IMP-L group; D: IMP-H group; E: Dexamethasone group.

图3 流式细胞术检测各组小鼠BALF中嗜酸性粒细胞百分率

Fig. 3 Percentage of eosinophils in BALF of mice in various groups detected by flow cytometry



\* $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.01$  vs model group.

图4 各组小鼠BALF中嗜酸性粒细胞百分率

Fig. 4 Percentages of eosinophils in BALF of mice in various groups

表1 各组小鼠血清中总IgE和OVA特异性IgE水平

Tab. 1 Levels of total IgE and OVA specific IgE in serum of mice in various groups [ $n=8, \bar{x} \pm s, \rho_B / (\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$ ]

Group	Total IgE	OVA specific IgE
Control	95.03 ± 2.51	2.16 ± 1.34
Model	389.36 ± 9.46*	193.24 ± 3.05*
IMP-L	309.57 ± 8.08 $\Delta$	178.32 ± 3.52 $\Delta$
IMP-H	295.10 ± 6.88 $\Delta$	176.48 ± 3.95 $\Delta$
Dexamethasone	281.51 ± 6.56 $\Delta$	170.44 ± 6.25 $\Delta$

\* $P < 0.05$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$  vs model group.

平明显降低 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, IMP-L组、IMP-H组和地塞米松组小鼠BALF中IL-13、IL-5和IL-4水平均明显降低 ( $P < 0.05$ ), IFN- $\gamma$ 水平明显升高 ( $P < 0.05$ )。见表2。

表2 各组小鼠BALF中IL-13、IL-5、IL-4和IFN- $\gamma$ 水平

Tab. 2 Levels of IL-13, IL-5, IL-4 and IFN- $\gamma$  in BALF of mice in various groups [ $n=8, \bar{x} \pm s, \rho_B / (\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$ ]

Group	IL-13	IL-5	IL-4	IFN- $\gamma$
Control	23.37 ± 2.99	20.70 ± 2.51	15.61 ± 1.52	82.24 ± 8.41
Model	85.24 ± 9.01*	63.69 ± 6.84*	79.91 ± 8.99*	20.61 ± 2.64*
IMP-L	64.82 ± 7.51 $\Delta$	44.90 ± 8.55 $\Delta$	60.82 ± 8.08 $\Delta$	40.30 ± 2.64 $\Delta$
IMP-H	46.95 ± 9.01 $\Delta$	35.60 ± 6.01 $\Delta$	41.61 ± 8.53 $\Delta$	61.25 ± 4.40 $\Delta$
Dexamethasone	37.10 ± 7.23 $\Delta$	28.85 ± 4.16 $\Delta$	32.77 ± 6.80 $\Delta$	71.18 ± 2.59 $\Delta$

\* $P < 0.05$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$  vs model group.

**2.6 各组小鼠肺组织病理形态表现、杯状细胞数量和胶原沉积情况** HE染色结果显示: 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织支气管和血管周围有大量炎症细胞浸润, 气道平滑肌和管壁明显增厚; 与模型组比较, IMP-L组、IMP-H组和地塞米松组小鼠肺组织中炎症细胞浸润明显减少, 气道平滑肌和管壁病理改变减轻。PAS染色结果显示: 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织支气管壁见大量杯状细胞;

与模型组比较, IMP-L组、IMP-H组和地塞米松组小鼠肺组织中杯状细胞数量明显减少。Masson染色结果显示: 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织支气管周围胶原蛋白大量沉积; 与模型组比较, IMP-L组、IMP-H组和地塞米松组小鼠肺组织支气管周围胶原蛋白沉积明显减少。见图5。

**2.7 各组小鼠肺组织中 $\alpha$ -SMA和Wnt5A蛋白表达水平** 免疫组织化学染色结果显示: 与对照组比

较,模型组小鼠肺组织中 $\alpha$ -SMA和Wnt5A蛋白表达水平均明显升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,IMP-L组、IMP-H组和地塞米松组小鼠肺组织中

$\alpha$ -SMA和Wnt5A蛋白表达水平均明显降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。见图6和7。

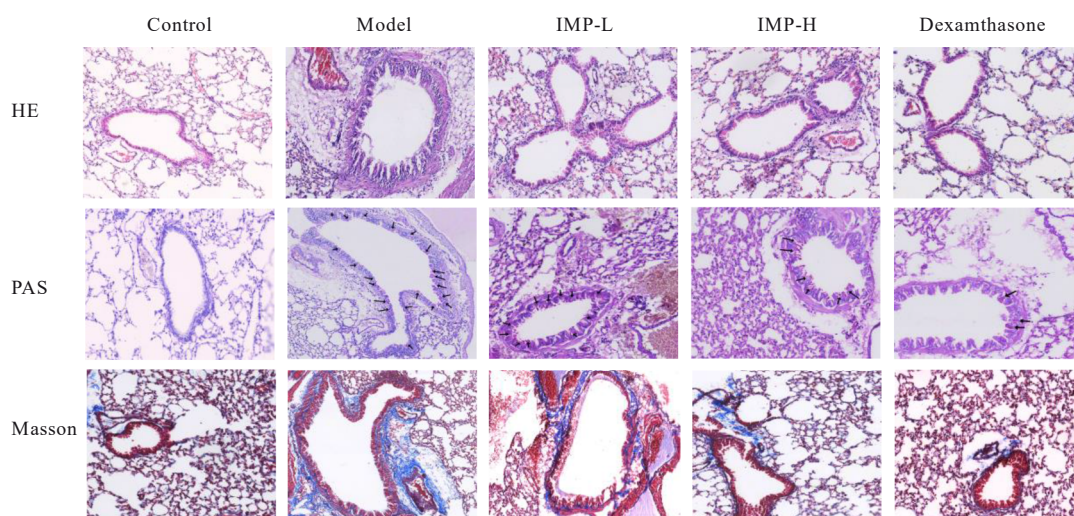


图5 各组小鼠肺组织病理形态表现、杯状细胞数量和胶原沉积情况( $\times 200$ )

Fig. 5 Pathomorphology of lung tissue, number of cup cells and collagen deposition in lung tissue of mice in various groups( $\times 200$ )

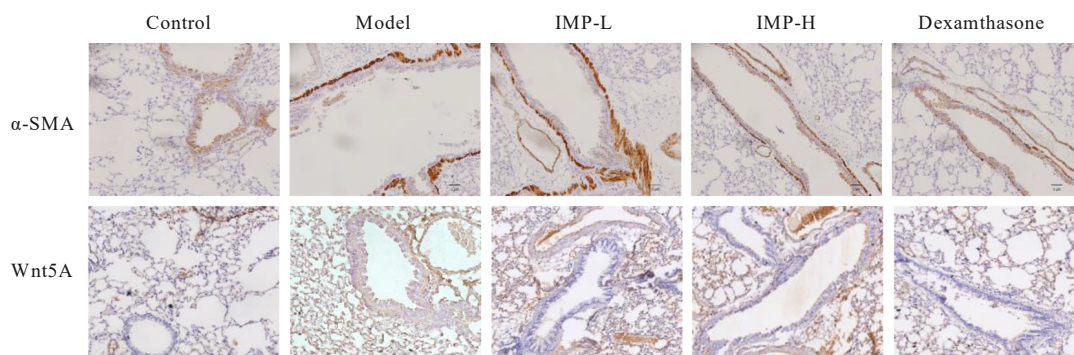


图6 免疫组织化学染色法检测各组小鼠肺组织中 $\alpha$ -SMA和Wnt5A蛋白性表达情况( $\times 200$ )

Fig. 6 Expressions of  $\alpha$ -SMA and Wnt5A proteins in lung tissues of mice in various groups detected by immunohistochemical staining( $\times 200$ )

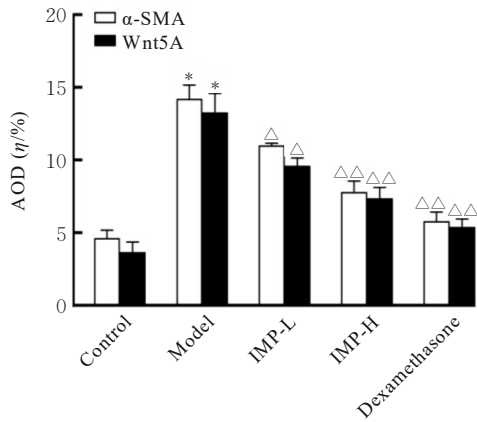
**2.8 各组小鼠肺组织中 $\alpha$ -SMA、Wnt5A、c-myc和 $\beta$ -catenin蛋白表达水平** Western blotting法检测结果显示:与对照组比较,模型组小鼠肺组织中 $\alpha$ -SMA、Wnt5A、c-Myc和 $\beta$ -catenin蛋白表达水平均明显升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,IMP-L组、IMP-H组和地塞米松组小鼠肺组织中 $\alpha$ -SMA、Wnt5A、c-Myc和 $\beta$ -catenin蛋白表达水平均明显降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),其中地塞米松组降低最明显。见图8。

**2.9 各组小鼠肺组织中 $\alpha$ -SMA蛋白表达水平** 免疫荧光法检测结果显示:与对照组比较,模型组小

鼠肺组织中 $\alpha$ -SMA蛋白表达水平明显升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,IMP-L组、IMP-H组和地塞米松组小鼠肺组织中 $\alpha$ -SMA蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。见图9和10。

### 3 讨论

哮喘作为一种复杂的慢性呼吸道疾病,其机制主要包括气道重塑和气道炎症,二者密切相关<sup>[13]</sup>。气道重塑是长期反复的气道炎症反应所引起的气道管壁结构和功能改变,是哮喘发展至后期的一个重要特征,包括气道平滑肌细胞增殖、基底膜的增

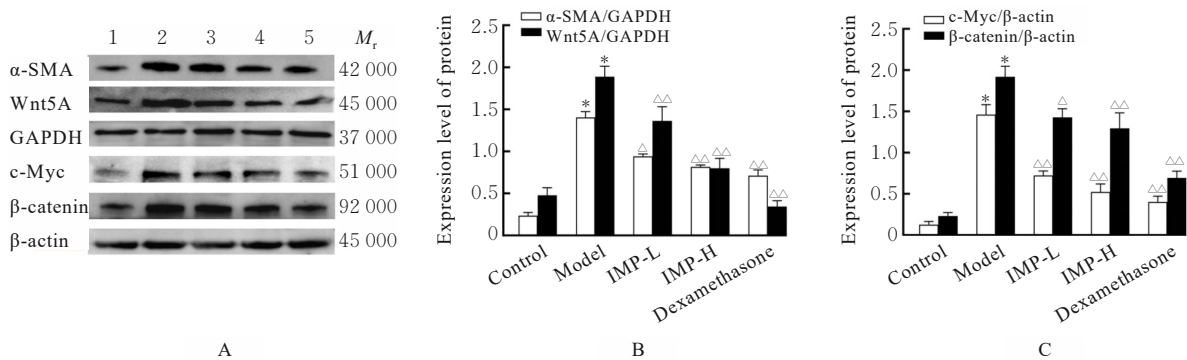


\* $P < 0.01$  vs control group;  $^{\Delta}P < 0.05$ ,  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$  vs model group.

图7 各组小鼠肺组织中α-SMA和Wnt5A蛋白表达水平  
Fig. 7 Expression levels of α-SMA and Wnt5A protein in lung tissue of mice in various groups

厚、大量胶原沉积和炎性细胞浸润等，会不可逆地降低气道弹性和加重气道高反应，且伴随着肺功能逐渐下降<sup>[14]</sup>。辅助型T细胞1 (T helper 1 cell, Th1) / 辅助型T细胞2 (T helper 2 cell, Th2) 细胞比例失衡是气道重塑的重要机制。Th1型细胞因子IFN-γ可抑制IgE和嗜酸性粒细胞的生成，Th2型细胞因子(如IL-13、IL-5和IL-4等)可诱导嗜酸性粒细胞在气管壁大量聚集，以上改变都可促使

气道管壁增厚，引起气道重塑<sup>[15]</sup>。此外，IgE由B淋巴细胞产生，主要介导炎症反应，OVA特异性IgE水平是评估炎症反应的重要指标，其水平高低与哮喘严重程度呈正相关关系，同时也在气道重塑中发挥了重要作用<sup>[16]</sup>。以上这些指标均可以作为气道重塑模型成功建立的依据。本研究造模期间，与对照组比较，模型组小鼠出现明显打喷嚏、抓鼻和喘息等哮喘样症状，初步证实成功构建小鼠哮喘模型。此外，模型组小鼠气道反应性增大，肺组织病理染色可见气道平滑肌和管壁增厚、杯状细胞数量增多和大量胶原沉积，同时模型组小鼠血清中IgE及BALF中IL-4、IL-5和IL-13水平明显升高，BALF中IFN-γ水平明显降低，BALF中有大量嗜酸性粒细胞，以上结果进一步证实成功复制小鼠哮喘气道重塑模型。而造模成功的小鼠经IMP治疗后，哮喘样症状减轻，气道反应性降低，气道平滑肌和管壁增厚、杯状细胞增殖和胶原沉积情况得到改善，血清中IgE水平及BALF中IL-4、IL-5和IL-13水平降低，BALF中IFN-γ水平升高，提示IMP能够抑制BALF中IL-4、IL-5和IL-13产生和促进IFN-γ的生成。BALF中嗜酸性粒细胞细胞数量减少，提示IMP能够抑制炎症反应减轻小鼠哮喘并改善小鼠气道重塑。



Lane 1: Control group; Lane 2: Model group; Lane 3: IMP-L group; Lane 4: IMP-L group; Lane 5: Dexamethasone group. \* $P < 0.01$  vs control group;  $^{\Delta}P < 0.05$ ,  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$  vs model group.

图8 各组小鼠肺组织中α-SMA、Wnt5A、c-Myc和β-catenin蛋白表达电泳图(A)及直条图(B和C)

Fig. 8 Electrophoregram(A) and histograms(B, C) of α-SMA, Wnt5A, c-Myc and β-catenin proteins in lung tissue of mice in various groups

研究<sup>[17]</sup>显示：Wnt信号通路包括经典依赖β-catenin蛋白和非经典不依赖β-catenin蛋白2类。β-catenin作为典型的核蛋白，在转录过程中，其在细胞质或细胞核内大量积聚进而激活Wnt反应基因。支气管过度扩张或收缩均可激活β-catenin，

而c-Myc作为β-catenin下游的关键蛋白之一，当β-catenin被激活后与c-Myc共同参与调控气道平滑肌细胞增殖、分化和迁移，进而参与气道重塑的形成<sup>[18-19]</sup>。同时，研究<sup>[20-21]</sup>证实：抑制β-catenin表达可以阻断上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal

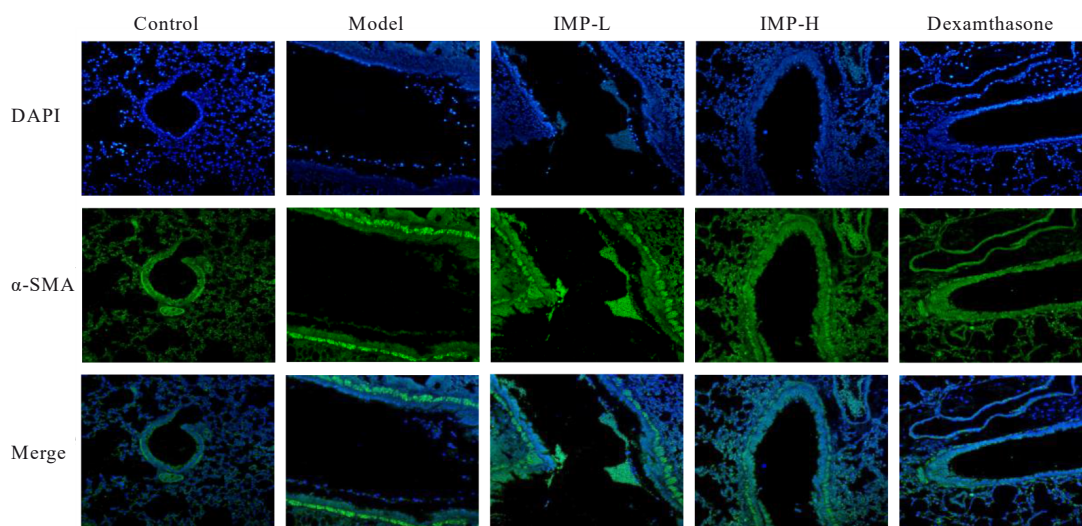
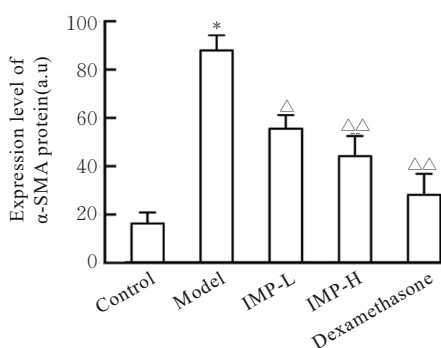


图9 免疫荧光法检测各组小鼠肺组织中 $\alpha$ -SMA蛋白表达情况( $\times 200$ )

Fig. 9 Expressions of  $\alpha$ -SMA protein in lung tissue of mice in various groups detected by immunofluorescence method( $\times 200$ )



\* $P < 0.01$  vs control group;  $\triangle P < 0.05$ ,  $\triangle\triangle P < 0.01$  vs model group.

图10 各组小鼠肺组织中 $\alpha$ -SMA蛋白表达水平

Fig. 10 Expression levels of  $\alpha$ -SMA protein in lung tissue of mice in various groups

transition, EMT) 形成和抑制纤维化,使促炎和抗炎细胞因子达到平衡状态以减轻哮喘气道重塑。Wnt5A 作为非经典 Wnt 通路配体,在气道平滑肌细胞中大量分布。Wnt5A 可通过诱导  $\alpha$ -SMA 表达促进气道平滑肌收缩,同时使胶原纤维和纤连蛋白增多,导致气道变窄,引发气道重塑<sup>[22-23]</sup>。其中, $\alpha$ -SMA 作为气道平滑肌细胞的特征性标记,在气道平滑肌收缩和 EMT 过程中有十分重要作用,其表达水平的变化直接反映了气道重塑程度<sup>[24]</sup>。而免疫荧光实验是检测气道平滑肌中  $\alpha$ -SMA 表达的有效方法。本研究结果显示:与对照组比较,模型组小鼠肺组织气道平滑肌中  $\alpha$ -SMA 免疫荧光强度明显增强,肺组织中  $\alpha$ -SMA 和 Wnt5A 蛋白阳性区域明显扩大,肺组织中  $\beta$ -catenin、c-Myc、Wnt5A 和

$\alpha$ -SMA 蛋白表达水平明显升高,表明模型组小鼠在炎症刺激下,气道重塑加重与 Wnt 经典和非经典通路有关。而与模型组比较,经 IMP 治疗的哮喘小鼠其肺组织气道平滑肌中  $\alpha$ -SMA 免疫荧光强度降低,肺组织中  $\alpha$ -SMA 和 Wnt5A 蛋白阳性区域减小,肺组织中  $\beta$ -catenin、c-Myc、Wnt5A 和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平降低,表明 IMP 可通过抑制 Wnt 经典和非经典通路改善小鼠气道重塑。

综上所述,IMP 对支气管哮喘小鼠气道重塑具有改善作用,并可抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路相关蛋白表达水平,但 IMP 治疗哮喘气道重塑的具体机制仍需进一步研究。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

阎煜参与论文撰写,黄丹丹、洪春玲和魏博雯参与实验操作,杨媛媛参与统计学分析,延光海和宋艺兰参与实验数据整理,咸哲民参与论文审阅和修订。

#### [参考文献]

- [1] SAVIN I A, ZENKOVA M A, SEN' KOVA A V. Bronchial asthma, airway remodeling and lung fibrosis as successive steps of one process[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(22): 16042.
- [2] 刘健. 支气管哮喘气道重塑机制的研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2022, 32(12): 51-54.
- [3] TIOTIU A, STEIROPOULOS P, NOVAKOVA S,

- et al. Airway remodeling in asthma: mechanisms, diagnosis, treatment, and future directions[J]. Arch De Bronconeumología, 2025, 61(1): 31-40.
- [4] HAYAT R, MANZOOR M, HUSSAIN A. Wnt signaling pathway: a comprehensive review[J]. Cell Biol Int, 2022, 46(6): 863-877.
- [5] LIU Y L, LI J N, CHEN R C, et al. Airway epithelial cells promote *in vitro* airway smooth muscle cell proliferation by activating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [J]. Respir Physiol Neurobiol, 2025, 331: 104368.
- [6] HUSSAIN M, XU C Y, LU M P, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling links embryonic lung development and asthmatic airway remodeling[J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Basis Dis, 2017, 1863(12): 3226-3242.
- [7] DENG M, XIE L, ZHONG L, et al. Imperatorin: a review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 879: 173124.
- [8] 李晓强, 谭余庆, 李慧杰, 等. 欧前胡素药理作用及机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(18): 196-201.
- [9] LIU F, SHANG Y X. Sirtuin 6 attenuates epithelial-mesenchymal transition by suppressing the TGF- $\beta$ 1/Smad3 pathway and c-Jun in asthma models [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 82: 106333.
- [10] 何婷, 钱佩瑶, 洪敏, 等. 诱发支气管哮喘动物模型气道重塑特征的方法和评价[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 117-123.
- [11] 杨昆, 龚新月, 伍文彬, 等. 三子养亲汤对支气管哮喘模型大鼠的作用机制研究[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(2): 21-24.
- [12] 袁欣, 王安琪, 王思宇, 等. 痰瘀互结证哮喘大鼠模型的建立及评价[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(10): 1243-1251.
- [13] HABIB N, PASHA M A, TANG D D. Current understanding of asthma pathogenesis and biomarkers[J]. Cells, 2022, 11(17): 2764.
- [14] HAMMAD H, LAMBRECHT B N. The basic immunology of asthma[J]. Cell, 2021, 184(6): 1469-1485.
- [15] 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]. Front Immunol, 2022, 13: 974066.
- [16] JI T F, LI H Q. T-helper cells and their cytokines in pathogenesis and treatment of asthma [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1149203.
- [17] KOOPMANS T, HESSE L, NAWIJN M C, et al. Smooth-muscle-derived WNT5A augments allergen-induced airway remodelling and Th2 type inflammation[J]. Sci Rep, 2020, 10: 6754.
- [18] YAO L, ZHAO H, TANG H, et al. Blockade of  $\beta$ -catenin signaling attenuates toluene diisocyanate-induced experimental asthma[J]. Allergy, 2017, 72(4): 579-589.
- [19] ZHANG T, HUANG H, LIANG L H, et al. Long non-coding RNA (LncRNA) non-coding RNA activated by DNA damage (NORAD) knockdown alleviates airway remodeling in asthma *via* regulating miR-410-3p/RCC2 and inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [J]. Heliyon, 2024, 10(1): e23860.
- [20] FANG Y N, JIN W W, GUO Z, et al. Quercetin alleviates asthma-induced airway inflammation and remodeling through downregulating periostin *via* blocking TGF- $\beta$ 1/smad pathway [J]. Pharmacology, 2023, 108(5): 432-443.
- [21] XU T T, WU Z Z, YUAN Q, et al. Proline is increased in allergic asthma and promotes airway remodeling[J]. JCI Insight, 2023, 8(16): e167395.
- [22] 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]. J Cellular Molecular Medi, 2020, 24(23): 13739-13750.
- [23] REN Y, ZHONG X H, WANG H Y, et al. Chloroquine attenuates asthma development by restoring airway smooth muscle cell phenotype *via* the ROS-AKT pathway[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 916508.
- [24] BRADDING P, PORSBJERG C, CÔTÉ A, et al. Airway hyperresponsiveness in asthma: The role of the epithelium[J]. J Allergy Clin Immunol, 2024, 153(5): 1181-1193.