

伍爽,李微,黎达,等. 黄芪皂苷 II 对哮喘幼年大鼠 IL-21/STAT3 通路及气道炎症反应的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(12): 53-59.

Wu S, Li W, Li D, et al. Effects of astragaloside II on the IL-21/STAT3 pathway and airway inflammation in young asthmatic rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(12): 53-59.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 12. 008

黄芪皂苷 II 对哮喘幼年大鼠 IL-21/STAT3 通路及 气道炎症反应的影响

伍爽^{1*}, 李微², 黎达¹, 辛迪¹, 陈晓凤¹, 李雪¹

(1. 齐齐哈尔市第一医院新生儿科, 黑龙江 齐齐哈尔 161000;

2. 哈尔滨市道里区人民医院儿科, 哈尔滨 150000)

【摘要】 目的 探究黄芪皂苷 II 对哮喘幼年大鼠白细胞介素-21 (IL-21)/信号转导和转录活化因子 3 (STAT3) 通路及气道炎症反应的影响。**方法** 将幼年大鼠随机分成对照组、模型组、黄芪皂苷 II 低、中、高剂量组和地塞米松组, 每组 12 只, 除对照组外, 其余各组采用卵清蛋白 (OVA) 激发制备幼年大鼠哮喘模型, 各组幼年大鼠分别给予相应药物治疗, 检测气道反应性 (Penh 值), 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测血清和肺泡灌洗液 (BALF) 上清液中白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-21 (IL-21)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 含量; 苏木素-伊红 (HE) 染色观察幼年大鼠肺组织病理变化; 蛋白免疫印迹 (Western blot) 法检测幼年大鼠肺组织中 IL-21、磷酸化-STAT3 (p-STAT3)、STAT3 蛋白表达情况。**结果** 与对照组相比, 模型组幼年大鼠可见肺组织中支气管上皮结构紊乱, 上皮细胞水肿脱落, 炎性细胞浸润等病变, 不同浓度乙酰胆碱 (Ach) 激发后 Penh 值、BALF 中白细胞总数、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞数、BALF 上清液和血清中 IL-6、IL-21 和 TGF- β 1 含量、肺组织炎症评分、肺组织中 IL-21、p-STAT3 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 黄芪皂苷 II 各处理组和地塞米松组幼年大鼠肺组织结构逐渐完整, 不同浓度 Ach 激发后 Penh 值、BALF 中白细胞总数、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞数、BALF 上清液和血清中 IL-6、IL-21 和 TGF- β 1 含量、肺组织炎症评分、肺组织中 IL-21、p-STAT3 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。且随着黄芪皂苷 II 剂量的增加, 幼年大鼠不同浓度 Ach 激发后 Penh 值、BALF 中白细胞总数、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞数、BALF 上清液和血清中 IL-6、IL-21 和 TGF- β 1 含量、肺组织炎症评分、肺组织中 IL-21、p-STAT3 蛋白表达依次降低 ($P < 0.05$)。**结论** 黄芪皂苷 II 可能通过抑制 IL-21/STAT3 通路, 减轻哮喘幼年大鼠气道炎症反应, 修复肺组织结构, 改善哮喘症状。

【关键词】 黄芪皂苷 II; 哮喘幼年大鼠; 白细胞介素-21; 信号转导和转录活化因子 3; 气道炎症

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 12-0053-07

Effects of astragaloside II on the IL-21/STAT3 pathway and airway inflammation in young asthmatic rats

WU Shuang^{1*}, LI Wei², LI Da¹, XIN Di¹, CHEN Xiaofeng¹, LI Xue¹

(1. Department of Neonatology, the First Hospital of Qiqihar, Qiqihar 161000, China.

2. Department of Pediatrics, Daoli District People's Hospital Harbin City, Harbin 150000)

【基金项目】 黑龙江省卫生计生委科研课题 (2018277)。

【作者简介】 伍爽 (1983—), 女, 本科, 主治医师, 研究方向: 新生儿及婴幼儿呼吸道疾病。E-mail: wushuangshuang3847@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of astragaloside II on the interleukin (IL)-21/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway and airway inflammation in young asthmatic rats. **Methods** Young rats were randomly divided into control, model, astragaloside II low-dose, astragaloside II medium-dose, astragaloside II high-dose, and dexamethasone groups with 12 rats in each group. Except for the control group, the groups were challenged with ovalbumin to prepare asthma models and the rats in each group were treated with corresponding drugs. Airway reactivity (Penh value) was measured and the levels of IL-6, IL-21, and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured by enzyme-linked immunosorbent assays. HE staining was used to observe pathological changes in lung tissues. Western blot was used to detect protein expression of IL-21, phosphorylated STAT3 (p-STAT3), and STAT3 in lung tissues of the rats. **Results** Compared with the control group, the structure of bronchial epithelial tissue was disordered, pulmonary epithelial cells were edematous and exfoliated, and inflammatory cells had infiltrated in the model group. After stimulation with acetylcholine (Ach) at various concentrations, the Penh value, total number of leukocytes, numbers of eosinophils, neutrophils, lymphocytes, and macrophages in BALF, the contents of IL-6, IL-21, and TGF- β 1 in BALF and serum, the lung tissue inflammation score, and protein expression of IL-21 and p-STAT3 in lung tissues were increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, the lung tissue structure of young rats in astragaloside II treatment groups and dexamethasone group was gradually complete, after stimulation with Ach at various concentrations, the Penh value, total number of leukocytes, numbers of eosinophils, neutrophils, lymphocytes, and macrophages in BALF, contents of IL-6, IL-21, and TGF- β 1 in BALF and serum, the lung tissue inflammation score, and protein expression of IL-21 and p-STAT3 in lung tissues were decreased significantly ($P < 0.05$), which were dependent on the dose. **Conclusions** Astragaloside II alleviates airway inflammation in young asthmatic rats, repairs lung tissue and the bronchial structure, and improves asthmatic symptoms by inhibiting the IL-21/STAT3 pathway.

【Keywords】 astragaloside II; young asthmatic rats; interleukin-21; signal transducer and activator of transcription 3; airway inflammation

哮喘是婴幼儿常见的呼吸系统疾病之一,是由多种免疫活性细胞及炎症介质参与的慢性疾病^[1-3]。其主要特征是气道炎症、气道高反应性、黏液生成增加和嗜酸性粒细胞浸润^[4]。黄芪是补益中药,具有健脾补中、升阳举陷、托毒生肌之功效,《本草纲目》记载“可治一切气衰血虚之症”^[5]。其中,黄芪皂苷Ⅱ是黄芪重要的生物活性成分,具有免疫调节、抗肿瘤等生物活性^[6-7]。白细胞介素 21 (interleukin-21, IL-21) 可介导多种生物学效应,与其受体 IL-21R 结合后可通过信号传导途径 Janus 激酶 (Janus kinase, JAK)/信号转导和转录活化因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 传递活化信号^[8-9]。He 等^[10]研究发现,麻黄汤在大鼠哮喘模型中可有效缓解气道炎症并调节 IL-21/STAT3 信号通路。但目前,关于黄芪皂苷Ⅱ是否可通过 IL-21/STAT3 信号通路,改善哮喘症状尚未见报道。因此,本研究以哮喘幼年大鼠为研究对象,探讨黄芪皂苷Ⅱ对哮喘幼年大鼠 IL-21/STAT3 通路及气道炎症反应的影响,为黄芪皂苷Ⅱ为在临床幼儿哮喘中的应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

72 只新生 SD 幼年大鼠,雌雄兼有,SPF 级,3~4 周龄,体重 70~100 g,购自吉林大学实验动物中心 [SCXK(吉)2019-0001],大鼠饲养于齐齐哈尔医学院动物实验中心 [SYXK(黑)2019-0017]。饲养环境:温度(25±2)℃,湿度 50%,正常饮食,光照明/暗(12/12)h。实验严格遵循 3R 原则。本研究经齐齐哈尔市第一医院伦理委员会批准(IACUC-2019 伦审第 89 号)。

1.2 主要试剂与仪器

黄芪皂苷Ⅱ(原料药,纯度 98%,北京索莱宝科技有限公司,批号 SA8620);地塞米松(原料药,纯度 99%,武汉贝尔卡生物医药有限公司,批号 50-02-2);卵清蛋白(ovalbumin, OVA)、乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)(美国 sigma 公司,批号 A5253、A6904);白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-21(interleukin-21, IL-21)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号 RC0067、

RK0947、RK1007);蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白定量测定试剂盒、聚偏二氟乙烯(PVDF)、超敏 ECL 化学发光试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 SF-1397、DK-0993、FFP32、P0018 S);IL-21、STAT3、磷酸化-STAT3(phosphorylation-stat3, p-STAT3)、GAPDH 抗体、羊抗鼠二抗(美国 Abcam 公司,批号 ab178694、ab5904、ab5916、ab00134、ab0788)。402AI 型超声雾化器(江苏鱼跃医疗设备有限公司);FinePointe NAM 型动物肺功能检测仪(美国 Buxco 公司);MM800 型光学显微镜(日本 Nikon 公司);1703940 型蛋白电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);GIS-500 型凝胶成像仪购自杭州米欧仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及哮喘模型建立

将 72 只幼年大鼠按随机数表法分成:对照组、模型组、黄芪皂苷 II 低、中、高剂量组和地塞米松组,每组 12 只。参考文献^[11]进行幼年大鼠哮喘模型构建:各造模组(除对照组外)在建模第 1 天,大鼠腹腔注射 OVA 混悬液(0.2 mL)致敏,OVA 混悬液的组成为 OVA(20 μ g)和氢氧化铝凝胶(2 mg),此后在第 8 天和第 15 天各进行此致敏操作 1 次,于建模第 16 天,大鼠给予 4% OVA 的生理盐水雾化吸入激发,持续进行 7 d。对照组将致敏药物换成生理盐水也按照上述方法进行处理。每次激发完成后 1 h,黄芪皂苷 II 低、中、高剂量组、地塞米松组分别腹腔注射 0.3 mg/kg 黄芪皂苷 II、0.6 mg/kg 黄芪皂苷 II、0.9 mg/kg 黄芪皂苷 II^[12]、0.2 mg/kg 地塞米松^[13],对照组和模型组腹腔注射生理盐水,注射体积 10 mL/kg。

1.3.2 气道反应性测定

末次 OVA 刺激 24 h 后,各组幼年大鼠分别吸入 6.25、12.5、25、50 mg/mL 的 Ach 溶液 50 μ L,每个剂量连续记录 3 min 的增强呼气间歇(Penh)值,测定其气道反应性^[14]。

1.3.3 样本采集

麻醉大鼠,取血,收集血清,-80℃ 保存备用。取 1 mL 生理盐水进行肺部灌洗,收集肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF),离心后收集上清液,置于-80℃ 中保存备用,将底部细胞涂片后,Diff-Quik 染色,高倍镜下进行细胞分类计数。

解剖大鼠,取左肺置于甲醛溶液(10%)固定,

取右肺剪碎,液氮速冻,-80℃ 保存。

1.3.4 BALF 中炎症因子测定

取 1.3.3 收集的 BALF 上清液和血清,采用 ELISA 试剂盒检测 IL-6、IL-21、TGF- β 1 含量。

1.3.5 幼年大鼠肺组织病理学检测

将固定在甲醛中的肺组织制成石蜡组织切片,苏木素-伊红(HE)染色后光学显微镜下观察。参照 Henderson 等^[15]方法对肺组织周围炎症因子进行浸润评分,0 分:无炎症细胞;1 分:少许炎症细胞;2 分:炎症细胞较多分布不均;3 分:大量炎症细胞,可见成团分布;4 分:大量炎症细胞聚集成团。

1.3.6 蛋白免疫印迹(Western blot)法检测幼年大鼠 IL-21、STAT3 蛋白表达水平测定

取出部分冻存在-80℃ 中的肺组织,匀浆化,提取总蛋白,检测蛋白质浓度,取 40 μ g 蛋白上样,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后转移到 PVDF 膜上,用 5%脱脂牛奶室温下封闭 2 h,将膜在 4℃ 下与 IL-21(1:1000)、STAT3(1:1000)、p-STAT3(1:1000)、GAPDH(1:2000)一抗孵育过夜,磷酸缓冲液洗涤膜,然后加入羊抗鼠二抗(1:5000)37℃ 室温孵育 2 h,使用超敏 ECL 化学发光试剂盒将蛋白质可视化,凝胶成像仪观察条带并拍照。以 GAPDH 为内参蛋白。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析,计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪皂苷 II 对幼年大鼠气道反应性测定的影响

不同浓度 Ach 激发后,与对照组相比,模型组幼年大鼠 Penh 值显著升高($P<0.05$);与模型组相比,黄芪皂苷 II 各处理组幼年大鼠 Penh 值显著降低($P<0.05$);且随着黄芪皂苷 II 剂量的增加,幼年大鼠 Penh 值依次降低($P<0.05$)。见表 1。

2.2 黄芪皂苷 II 对 BALF 中炎症细胞数量的影响

与对照组相比,模型组幼年大鼠 BALF 中白细胞总数和嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、巨噬细胞数显著升高($P<0.05$);与模型组相比,黄芪皂苷 II 各处理组幼年大鼠 BALF 中白细胞总数和嗜

酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、巨噬细胞数显著降低 ($P < 0.05$); 且随着黄芪皂苷 II 剂量的增加, 幼年大鼠 BALF 中白细胞总数和嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、巨噬细胞数依次降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 黄芪皂苷 II 对各组幼年大鼠 BALF 上清液和血清中 IL-6、IL-21 和 TGF- β 1 含量的影响

与对照组比, 模型组各组幼年大鼠 BALF 上清

液和血清中 IL-6、IL-21 和 TGF- β 1 含量显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比, 黄芪皂苷 II 各处理组幼年大鼠 BALF 上清液和血清中 IL-6、IL-21 和 TGF- β 1 含量显著降低 ($P < 0.05$); 且随着黄芪皂苷 II 剂量的增加, 幼年大鼠 BALF 上清液和血清中 IL-6、IL-21 和 TGF- β 1 含量依次降低 ($P < 0.05$)。见表 3、表 4。

表 1 各组幼年大鼠不同浓度 Ach 激发后 Penh 值的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Comparison of Penh values after Ach stimulation at different concentrations in each group of young rats

分组 Groups	不同浓度 Ach 激发后 Penh 值 Penh values of different concentrations of Ach after excitation			
	6.25 mg/mL	12.5 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL
对照组 Control group	1.14 $\pm$ 0.18	1.58 $\pm$ 0.09	1.97 $\pm$ 0.13	2.56 $\pm$ 0.25
模型组 Model group	3.04 $\pm$ 0.37 ^a	3.53 $\pm$ 0.29 ^a	3.95 $\pm$ 0.31 ^a	4.61 $\pm$ 0.41 ^a
黄芪皂苷 II 低剂量组 Astragaloside II low-dose group	2.61 $\pm$ 0.15 ^b	3.10 $\pm$ 0.25 ^b	3.67 $\pm$ 0.12 ^b	4.15 $\pm$ 0.34 ^b
黄芪皂苷 II 中剂量组 Astragaloside II medium-dose group	1.95 $\pm$ 0.25 ^{bc}	2.47 $\pm$ 0.17 ^{bc}	3.13 $\pm$ 0.19 ^{bc}	3.69 $\pm$ 0.28 ^{bc}
黄芪皂苷 II 高剂量组 Astragaloside II high-dose group	1.38 $\pm$ 0.16 ^{bed}	1.89 $\pm$ 0.21 ^{bed}	2.54 $\pm$ 0.22 ^{bed}	3.27 $\pm$ 0.26 ^{bed}
地塞米松组 Dexamethasone group	1.32 $\pm$ 0.19 ^{bed}	1.82 $\pm$ 0.18 ^{bed}	2.31 $\pm$ 0.17 ^{bed}	3.17 $\pm$ 0.22 ^{bed}

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与模型组相比, ^b $P < 0.05$; 与黄芪皂苷 II 低剂量组相比, ^c $P < 0.05$; 与黄芪皂苷 II 中剂量组相比, ^d $P < 0.05$ 。下同。

Note. Compared with the control group, ^a $P < 0.05$. Compared with the model group, ^b $P < 0.05$. Compared with the Astragaloside II low-dose group, ^c $P < 0.05$. Compared with the Astragaloside II medium-dose group, ^d $P < 0.05$. The same as below.

表 2 各组幼年大鼠 BALF 中细胞分类及计数结果 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Cell classification and counting results in BALF of young rats in each group

分组 Groups	白细胞总数 ($\times 10^4$ cells/mL) Total white blood cell count	嗜酸性粒细胞 ($\times 10^4$ cells/mL) Eosinophils	中性粒细胞 ($\times 10^4$ cells/mL) Neutrophils	淋巴细胞 ($\times 10^4$ cells/mL) Lymphocyte	巨噬细胞 ($\times 10^4$ cells/mL) Macrophage
对照组 Control group	17.85 $\pm$ 2.14	0.00 $\pm$ 0.12	0.00 $\pm$ 0.16	0.27 $\pm$ 0.18	4.5 $\pm$ 0.84
模型组 Model group	277.34 $\pm$ 20.51 ^a	178.36 $\pm$ 7.47 ^a	4.75 $\pm$ 0.49 ^a	52.38 $\pm$ 5.97 ^a	38.41 $\pm$ 1.42 ^a
黄芪皂苷 II 低剂量组 Astragaloside II low-dose group	189.42 $\pm$ 21.18 ^b	132.95 $\pm$ 11.34 ^b	3.84 $\pm$ 0.73 ^b	39.81 $\pm$ 8.43 ^b	35.31 $\pm$ 1.25 ^b
黄芪皂苷 II 中剂量组 Astragaloside II medium-dose group	137.68 $\pm$ 18.35 ^{bc}	91.83 $\pm$ 8.57 ^{bc}	2.15 $\pm$ 0.58 ^{bc}	26.65 $\pm$ 5.51 ^{bc}	31.76 $\pm$ 1.17 ^{bc}
黄芪皂苷 II 高剂量组 Astragaloside II high-dose group	73.54 $\pm$ 14.62 ^{bed}	62.19 $\pm$ 7.62 ^{bed}	1.03 $\pm$ 0.34 ^{bed}	19.72 $\pm$ 3.27 ^{bed}	30.15 $\pm$ 1.03 ^{bed}
地塞米松组 Dexamethasone group	68.43 $\pm$ 10.45 ^{bed}	56.51 $\pm$ 5.29 ^{bed}	0.93 $\pm$ 0.47 ^{bed}	17.98 $\pm$ 2.18 ^{bed}	28.67 $\pm$ 1.05 ^{bed}

2.4 黄芪皂苷 II 对各组幼年大鼠肺组织病理损伤的影响

HE 染色后,光学显微镜下可观察到:对照组幼年大鼠肺组织细胞排列整齐,结构完整,支气管平滑肌厚度正常,未见明显的炎性细胞浸润;模型组肺组织可见幼年大鼠肺组织结构异常,支气管上皮细胞脱落、水肿,管壁增厚,管腔狭窄,腔内有大量炎性细胞和黏液浸润;黄芪皂苷 II 各处理组和地塞米松组幼年大鼠支气管上皮组织结构较为整齐清晰,管腔内炎性细胞浸润减小,管壁厚度趋于正常。与对照组相比,模型组幼年大鼠肺组织炎症评分显著升高($P<0.05$);与模型组相比,黄芪皂苷 II 各处

理组幼年大鼠肺组织炎症评分显著降低($P<0.05$);且随着黄芪皂苷 II 剂量的增加,幼年大鼠肺组织炎症评分依次降低($P<0.05$)。见表 5、图 1。

2.5 黄芪皂苷 II 对各组幼年大鼠肺组织 IL-21、STAT3 蛋白水平的影响

与对照组相比,模型组幼年大鼠肺组织 IL-21、p-STAT3 蛋白水平显著升高($P<0.05$);与模型组相比,黄芪皂苷 II 各处理组幼年大鼠肺组织 IL-21、p-STAT3 蛋白水平显著降低($P<0.05$);且随着黄芪皂苷 II 剂量的增加,幼年大鼠肺组织 IL-21、p-STAT3 蛋白水平依次降低($P<0.05$)。见图 2、表 6。

表 3 各组幼年大鼠 BALF 上清液中炎性细胞因子含量比较($\bar{x}\pm s, n=12$)
Table 3 Comparison of inflammatory cytokines in BALF supernatant of each group

分组 Groups	白细胞介素-6 (ng/L) IL-6	白细胞介素-21 (ng/L) IL-21	转化生长因子- β 1 (ng/L) TGF- β 1
对照组 Control group	14.36 $\pm$ 1.84	17.93 $\pm$ 1.03	15.43 $\pm$ 1.48
模型组 Model group	83.72 $\pm$ 6.34 ^a	97.56 $\pm$ 4.63 ^a	78.62 $\pm$ 5.31 ^a
黄芪皂苷 II 低剂量组 Astragaloside II low-dose group	64.97 $\pm$ 7.12 ^b	71.42 $\pm$ 4.87 ^b	69.91 $\pm$ 3.28 ^b
黄芪皂苷 II 中剂量组 Astragaloside II medium-dose group	56.43 $\pm$ 5.82 ^{bc}	59.14 $\pm$ 2.98 ^{bc}	53.49 $\pm$ 4.09 ^{bc}
黄芪皂苷 II 高剂量组 Astragaloside II high-dose group	38.77 $\pm$ 3.49 ^{bed}	42.35 $\pm$ 2.13 ^{bed}	38.47 $\pm$ 2.56 ^{bed}
地塞米松组 Dexamethasone group	36.84 $\pm$ 2.19 ^{bed}	37.73 $\pm$ 1.56 ^{bed}	30.15 $\pm$ 2.08 ^{bed}

表 4 各组幼年大鼠血清中炎性细胞因子含量比较($\bar{x}\pm s, n=12$)
Table 4 Comparison of inflammatory cytokines in serum of young rats in each group

分组 Groups	白细胞介素-6 (ng/L) IL-6	白细胞介素-21 (ng/L) IL-21	转化生长因子- β 1 (ng/L) TGF- β 1
对照组 Control group	11.83 $\pm$ 1.53	13.94 $\pm$ 1.62	15.64 $\pm$ 1.17
模型组 Model group	85.46 $\pm$ 7.01 ^a	76.32 $\pm$ 5.95 ^a	83.29 $\pm$ 6.54 ^a
黄芪皂苷 II 低剂量组 Astragaloside II low-dose group	74.25 $\pm$ 5.26 ^b	58.46 $\pm$ 4.33 ^b	61.47 $\pm$ 4.21 ^b
黄芪皂苷 II 中剂量组 Astragaloside II medium-dose group	47.64 $\pm$ 4.68 ^{bc}	41.75 $\pm$ 4.02 ^{bc}	49.38 $\pm$ 3.86 ^{bc}
黄芪皂苷 II 高剂量组 Astragaloside II high-dose group	28.31 $\pm$ 2.54 ^{bed}	36.82 $\pm$ 3.28 ^{bed}	35.61 $\pm$ 4.03 ^{bed}
地塞米松组 Dexamethasone group	23.86 $\pm$ 3.05 ^{bed}	34.34 $\pm$ 2.81 ^{bed}	32.75 $\pm$ 2.59 ^{bed}

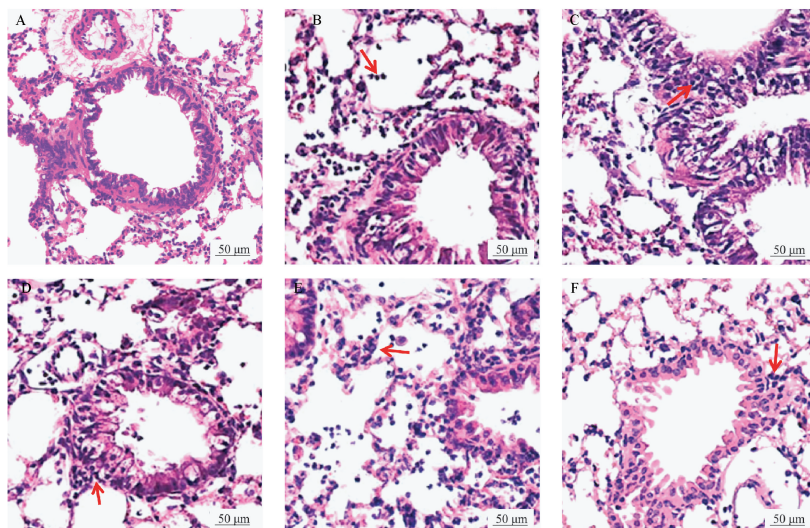
表 5 各组幼年大鼠肺组织炎症评分($\bar{x}\pm s, n=12$)
Table 5 Lung inflammation score of young rats in each group

分组 Groups	炎症评分(分) Inflammation score
对照组 Control group	0.00 $\pm$ 0.00
模型组 Model group	3.95 $\pm$ 0.24 ^a
黄芪皂苷 II 低剂量组 Astragaloside II low-dose group	2.54 $\pm$ 0.31 ^b
黄芪皂苷 II 中剂量组 Astragaloside II medium-dose group	1.39 $\pm$ 0.28 ^{bc}
黄芪皂苷 II 高剂量组 Astragaloside II high-dose group	0.85 $\pm$ 0.22 ^{bed}
地塞米松组 Dexamethasone group	0.69 $\pm$ 0.14 ^{bed}

表 6 各组幼年大鼠肺组织 IL-21、STAT3 蛋白表达水平检测结果($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 6 Detection results of IL-21 and STAT3 protein expression in lung tissue of young rats in each group

分组 Groups	IL-21/GAPDH	p-STAT3/STAT3
对照组 Control group	0.18 $\pm$ 0.04	0.25 $\pm$ 0.05
模型组 Model group	2.03 $\pm$ 0.43 ^a	1.98 $\pm$ 0.37 ^a
黄芪皂苷 II 低剂量组 Astragaloside II low-dose group	1.15 $\pm$ 0.27 ^b	1.07 $\pm$ 0.29 ^b
黄芪皂苷 II 中剂量组 Astragaloside II medium-dose group	0.84 $\pm$ 0.19 ^{bc}	0.74 $\pm$ 0.15 ^{bc}
黄芪皂苷 II 高剂量组 Astragaloside II high-dose group	0.39 $\pm$ 0.06 ^{bed}	0.46 $\pm$ 0.08 ^{bed}
地塞米松组 Dexamethasone group	0.25 $\pm$ 0.09 ^{bed}	0.38 $\pm$ 0.07 ^{bed}

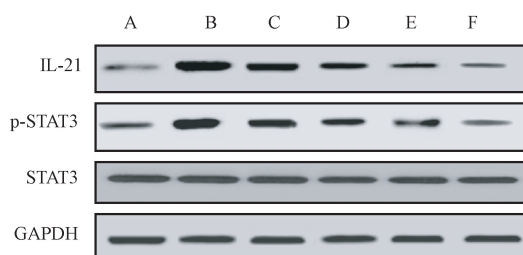


注:A:对照组;B:模型组;C:黄芪皂苷Ⅱ低剂量组;D:黄芪皂苷Ⅱ中剂量组;E:黄芪皂苷Ⅱ高剂量组;F:地塞米松组。

图1 各组肺组织 HE 染色结果

Note. A, Control group. B, Model group. C, Astragaloside Ⅱ low-dose group. D, Astragaloside Ⅱ medium-dose group. E, Astragaloside Ⅱ high-dose group. F, Dexamethasone group.

Figure 1 HE staining results of lung tissue in each group



注:A:对照组;B:模型组;C:黄芪皂苷Ⅱ低剂量组;D:黄芪皂苷Ⅱ中剂量组;E:黄芪皂苷Ⅱ高剂量组;F:地塞米松组。

图2 各组幼年大鼠肺组织蛋白印迹图

Note. A, Control group. B, Model group. C, Astragaloside Ⅱ low-dose group. D, Astragaloside Ⅱ medium-dose group. E, Astragaloside Ⅱ high-dose group. F, Dexamethasone group.

Figure 2 Western blot of lung tissue of young rats in each group

3 讨论

哮喘是一种以气道炎症、支气管高敏感性为特征的慢性疾病^[16]。哮喘气道炎症反应往往伴随各种炎症因子如 IL-6、TGF- β 1 等水平上调。研究发现,地塞米松对哮喘具有明显的治疗作用^[13],因此我们选用地塞米松作为本研究的阳性对照药物。血清中炎症因子 IL-6、IL-21 和 TGF- β 1 及 BALF 上清液中白细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细

胞和巨噬细胞数量的检测可用来观察哮喘大鼠血液中及肺组织中的炎症因子及炎症细胞水平。因此,在本研究中,我们利用 OVA 诱导建立哮喘幼年大鼠模型,结果发现哮喘幼年大鼠呼吸急促,口唇发绀,明显烦躁不安,镜下可见肺组织结构损坏严重,炎症细胞大量浸润,且炎症评分升高,幼年大鼠在吸入不同浓度的 Ach 激发后,其 Penh 值显著升高,BALF 上清液和血清中 IL-6、IL-21 和 TGF- β 1 含量显著升高,BALF 上清液中白细胞总数、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞数显著升高,表明哮喘可引起幼年大鼠肺组织炎症反应,呼吸障碍,揭示模型建立成功。

黄芪是临床重用的中药材,黄芪皂苷Ⅱ是该药活性成分,具有免疫调节、抗炎、抗肿瘤等多种生物活性。研究发现,黄芪可以调节呼吸道、消化道以及胃粘膜分泌功能,增强人体第一道防线,黄芪活性成分黄芪多糖能显著抑制 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的分泌,治疗炎症反应^[17-18]。本研究采用黄芪皂苷Ⅱ对哮喘幼年大鼠进行药效学分析,研究结果显示,哮喘幼年大鼠经黄芪皂苷Ⅱ处理后,幼年大鼠肺组织结构较为正常,支气管腔内炎症细胞浸润明显减少,黏膜水肿改善,无明显脱落,肺组织炎症评分降低。Ach 激发后 Penh 值显著降低,BALF 上清液和血清中 IL-6、IL-21 和 TGF- β 1 含量显著降低,BALF

上清液中白细胞总数、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞数显著降低,表明黄芪皂苷 II 能明显抑制哮喘幼年大鼠的炎症反应,降低幼年大鼠气道反应性,减轻肺组织病理损伤,且随着药物剂量增大,效果更加显著。

气道炎症是哮喘的典型特征,缓解炎症反应可有效控制哮喘症状。近年来发现,在多种与免疫有关的疾病中,IL-21 表达明显上调^[19-20]。STAT3 蛋白是 IL-21 的主要信号传导因子,其磷酸化活化后可参与多种自身免疫性疾病产生和进展过程^[10]。本研究结果说明在哮喘幼年大鼠体内,IL-21/STAT3 通路被激活,可能与炎症反应与免疫反应增强,肺组织受损有关。吴爱祥^[21]研究发现黄芪甲苷可通过抑制 STAT3 通路,减轻炎症因子 MCP-1 水平。

本研究中黄芪皂苷 II 可下调哮喘幼年大鼠体内 IL-21 蛋白表达及 STAT3 磷酸化水平,表明黄芪皂苷 II 可调节 IL-21/STAT3 信号通路,因此我们推测黄芪皂苷 II 减轻幼年大鼠哮喘症状,减少炎症反应等功能可能与抑制 IL-21/STAT3 通路活化有关。

综上所述,黄芪皂苷 II 可能通过抑制 IL-21/STAT3 通路,减轻哮喘幼年大鼠哮喘症状及气道炎症,修复肺组织功能,为临床治疗哮喘提供了新思路,但具体机制仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Landeo-Gutierrez J, Han YY, Forno E, et al. Risk factors for atopic and nonatopic asthma in Puerto Rican children [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2020, 55(9): 2246-2253.
- [2] Schoos AM, Hansen BR, Stokholm J, et al. Parent-specific effects on risk of developing allergic sensitization and asthma in childhood [J]. *Clin Exp Allergy*, 2020, 50(8): 915-921.
- [3] Roach DJ, Ruagnapa K, Fleck RJ, et al. Structural lung abnormalities on computed tomography correlate with asthma inflammation in bronchoscopic alveolar lavage fluid [J]. *J Asthma*, 2020, 57(9): 968-979.
- [4] 张春晶,李淑艳,赵容杰,等.人参皂苷 Rh1 对哮喘模型小鼠炎症因子表达的抑制作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(1): 163-167.
- [5] 李彦荣,刘光伟,赵晶.我国黄芪药理学研究的文献学分析 [J]. *西部中医药*, 2019, 32(2): 86-89.
- [6] Zeng Y, Zhang B, Liu X, et al. Astragaloside IV alleviates puromycin aminonucleoside-induced podocyte cytoskeleton injury through the Wnt/PCP pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(7): 3512-3521.
- [7] He Q, Han C, Huang L, et al. Astragaloside IV alleviates mouse slow transit constipation by modulating gut microbiota profile and promoting butyric acid generation [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(16): 9349-9361.
- [8] Ahmad SF, Ansari MA, Nadeem A, et al. Inhibition of tyrosine kinase signaling by tyrphostin AG126 downregulates the IL-21/IL-21R and JAK/STAT pathway in the BTBR mouse model of autism [J]. *Neurotoxicology*, 2020, 77(1): 1-11.
- [9] Paidipally P, Tripathi D, Van A, et al. Interleukin-21 regulates natural killer cell responses during mycobacterium tuberculosis infection [J]. *J Infect Dis*, 2018, 217(8): 1323-1333.
- [10] He Y, Lou X, Jin Z, et al. Mahuang decoction mitigates airway inflammation and regulates IL-21/STAT3 signaling pathway in rat asthma model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 224(1): 373-380.
- [11] 邹华,王颖,秦晓宇,等.木犀草素通过抗氧化应激和抑制 COX-2 信号通路抑制哮喘幼鼠气道炎症 [J]. *解剖科学进展*, 2019, 25(6): 634-636.
- [12] 王敏,郑喜,祁燕,等.黄芪皂苷 II 抗肝癌转移效应及作用机理的研究 [J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(6): 41-45.
- [13] 傅炎,陈一强,温红侠,等.支气管哮喘大鼠 CD4⁺CD25⁺T 细胞的变化及地塞米松干预作用的研究 [J]. *国际呼吸杂志*, 2010, 30(11): 656-660.
- [14] 王植嘉,尚云晓.神经激肽 1 受体拮抗剂对哮喘小鼠气道炎症和高反应性的影响 [J]. *中国小儿急救医学*, 2020, 27(2): 105-109.
- [15] Henderson WR, Tang LO, Chu SJ, et al. A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 165(1): 108-116.
- [16] Pike KC, Levy ML, Moreiras J, et al. Managing problematic severe asthma: beyond the guidelines [J]. *Arch Dis Child*, 2018, 103(4): 392-397.
- [17] 韩琳,王洪新,鲁美丽.黄芪多糖通过抑制 NF- κ B 和 JNK 信号通路减轻 LPS 诱导的小鼠心肌细胞凋亡 [J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(2): 243-249.
- [18] 周龙云,田子睿,刘书芬,等.黄芪对中枢神经系统的药理作用及毒理研究现状 [J]. *中草药*, 2018, 49(20): 4935-4944.
- [19] Long D, Chen Y, Wu H, et al. Clinical significance and immunobiology of IL-21 in autoimmunity [J]. *J Autoimmun*, 2019, 99(1): 1-14.
- [20] Wang K, Wen S, Jiao J, et al. IL-21 promotes myocardial ischaemia/reperfusion injury through the modulation of neutrophil infiltration [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(8): 1329-1343.
- [21] 吴爱祥.黄芪甲苷对重症急性胰腺炎小鼠胰腺的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(18): 2065-2067.

[收稿日期] 2020-10-21