

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research雷公藤红素调控 Notch 途径对慢阻肺大鼠
肺成纤维细胞气道影响的研究

Research on the effects of celastrol regulating the Notch pathway on the airway of lung fibroblasts in rats with chronic obstructive pulmonary disease

李莎莎, 邱日皇

(赣州市人民医院 呼吸与危重症医学科, 江西
赣州 341000)

LI Sha-sha, QIU Ri-huang

(Department of Respiratory and Critical
Care Medicine, Ganzhou People's
Hospital, Ganzhou 341000, Jiangxi
Province, China)

基金项目: 江西省自然科学基金面上基金
资助项目 (20171BAB205004); 赣州
市科技计划基金资助项目 (2022 -
YB1282)

作者简介: 李莎莎 (1990 -), 女, 主治医师, 主要
从事慢阻肺方面的研究

通信作者: 邱日皇, 副主任医师

MP: 18779097625

E-mail: 18779097625@163.com

摘要:目的 研究雷公藤红素 (Cel) 调控神经源性基因 Notch 同源蛋白 (Notch) 途径对慢阻肺 (COPD) 大鼠肺成纤维细胞气道重塑因子、胶原合成和降解的影响。**方法** 30 只大鼠随机分成动物对照组 (正常饲养)、动物模型组 (用烟熏结合脂多糖气管滴入法建立 COPD 大鼠模型) 和动物试验组 (造模成功后腹腔注射 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cel)。取动物模型组大鼠, 分离支气管成纤维 (BF) 细胞, 随机分为细胞对照组 (不做任何处理)、细胞实验组 ($2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cel) 和抑制剂组 [$1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丙戊酸 (VPA)]。用有创式肺功能检测法检测大鼠的肺功能; 用蛋白质印迹法检测各组细胞内 Notch 信号通路相关蛋白的表达; 用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 法检测各组细胞气道重塑相关因子和胶原合成相关指标 mRNA 表达; 用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测各组细胞中基质金属蛋白酶-1 (MMP-1) 和蛋白酶组织抑制因子-1 (TIMP-1) 的含量。**结果** 动物对照组、动物模型组和动物试验组大鼠的用力肺活量 (FVC) 分别为 (6.74 ± 0.87)、(3.28 ± 0.51) 和 (4.94 ± 0.83) mL, 0.1 s 用力呼气容积 (FEV_{0.1}) 分别为 (3.94 ± 0.45)、(1.05 ± 0.16) 和 (2.41 ± 0.37) mL, 呼气峰值流速 (PEF) 分别为 (28.09 ± 4.60)、(16.63 ± 3.21) 和 (21.55 ± 4.02) $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 动物对照组与动物模型组相比、动物模型组与动物试验组相比, 上述指标在统计学上差异均有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。细胞对照组、细胞实验组和抑制剂组的 Notch1 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.19 、 0.12 ± 0.02 和 0.38 ± 0.06 , Notch1 受体胞内结合域 (NICD1) 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.17 、 0.72 ± 0.12 和 0.85 ± 0.13 , 锯齿状典型 Notch 配体 1 (Jagged1) 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 、 0.71 ± 0.11 和 0.84 ± 0.12 , 发状分裂相关增强子 1 (Hes1) 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.11 、 0.69 ± 0.08 和 0.81 ± 0.09 ; MMP-9 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.16 、 0.59 ± 0.08 和 0.73 ± 0.11 , I 型胶原 (Col I) mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.14 、 0.67 ± 0.09 和 0.86 ± 0.14 , α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.16 、 0.41 ± 0.07 和 0.78 ± 0.13 , 转化生长因子- β (TGF- β) mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.18 、 0.53 ± 0.09 和 0.75 ± 0.14 , MMP-1 含量分别为 (1.19 ± 0.17)、(0.80 ± 0.15) 和 (1.06 ± 0.15) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, TIMP-1 分别为 (219.78 ± 30.24)、(131.94 ± 18.15) 和 (167.51 ± 21.01) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 细胞对照组与细胞实验组相比、细胞实验组与抑制剂组相比, 上述指标在统计学上差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。**结论** Cel 能够有效改善 COPD 大鼠的肺功能和肺部病理损伤, 降低炎症细胞及炎症因子的水平、改善 BF 细胞气道重塑相关因子水平及胶原合成和降解失衡, 可能与其抑制 Notch 信号的激活有关。

关键词: 雷公藤红素; 慢性阻塞性肺病; 神经源性基因 Notch 同源蛋白途径; 气道重塑; 成纤维细胞; 胶原合成和降解

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.05.011

中图分类号: R28

文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2026)05-0657-07

Abstract: Objective To investigate the effects of celastrol (Cel) on airway remodeling factors, collagen synthesis and degradation in lung fibroblasts of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) rats by regulating the neurogenic locus notch homolog protein (Notch) pathway. **Methods** A total of 30 rats were randomly divided into 3 groups: animal control group (normal feeding), animal model group (COPD rat model established by smoke exposure combined with lipopolysaccharide tracheal instillation) and animal experimental group (intraperitoneal injection of $0.01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cel after successful modeling). The bronchial fibroblasts (BF) cells were isolated from rats in the animal model group and randomly divided into cell control group (no treatment), cell experimental group ($2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cel) and inhibitor group [$1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ valproic acid (VPA)]. Pulmonary function was assessed in rats using invasive pulmonary function testing methods; Western blot was used to detect the expression of Notch signaling pathway-related proteins in each group of cells; real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect mRNA expression of airway remodeling-related factors; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the contents of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in each group of cells. **Results** The forced vital capacity (FVC) of rats in animal control group, animal model group and animal experimental group were (6.74 ± 0.87), (3.28 ± 0.51) and (4.94 ± 0.83) mL, respectively; the forced expiratory volume in 0.1 second (FEV_{0.1}) were (3.94 ± 0.45), (1.05 ± 0.16) and (2.41 ± 0.37) mL, respectively; the peak expiratory flow (PEF) were (28.09 ± 4.60), (16.63 ± 3.21) and (21.55 ± 4.02) $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, respectively. Significant differences were observed in the above indicators between animal control group and animal model group, and between animal model group and animal experimental group ($P < 0.01$, $P < 0.001$). The relative expression levels of (Notch1) protein in cell control group, cell experimental group and inhibitor group were 1.00 ± 0.19 , 0.12 ± 0.02 and 0.38 ± 0.06 , respectively; the relative expression levels of Notch1 receptor intracellular binding domain (NICD1) protein were 1.00 ± 0.17 , 0.72 ± 0.12 and 0.85 ± 0.13 , respectively; the relative expression levels of serrated typical Notch ligand 1 (Jagged1) protein were 1.00 ± 0.15 , 0.71 ± 0.11 and 0.84 ± 0.12 , respectively; the relative expression levels of hair and enhancer of split 1 (Hes1) protein were 1.00 ± 0.11 , 0.69 ± 0.08 and 0.81 ± 0.09 , respectively; the relative expression levels of MMP-9 mRNA were 1.00 ± 0.16 , 0.59 ± 0.08 and 0.73 ± 0.11 , respectively; the relative expression levels of type I collagen (Col I) mRNA were 1.00 ± 0.14 , 0.67 ± 0.09 and 0.86 ± 0.14 , respectively; the relative expression levels of α -smooth muscle actin (α -SMA) mRNA were 1.00 ± 0.16 , 0.41 ± 0.07 and 0.78 ± 0.13 , respectively; the relative expression levels of transforming growth factor- β (TGF- β) mRNA were 1.00 ± 0.18 , 0.53 ± 0.09 and 0.75 ± 0.14 , respectively; the contents of MMP-1 were (1.19 ± 0.17), (0.80 ± 0.15) and (1.06 ± 0.15) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the contents of tissue inhibitor of protease-1 (TIMP-1) were (219.78 ± 30.24), (131.94 ± 18.15) and (167.51 ± 21.01) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. There were all statistically significant differences in the above indicators between cell control group and cell experimental group, as well as between cell experimental group and inhibitor group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion** Celastrol can effectively improve lung function and pulmonary pathological damage in COPD rats, reduce the levels of inflammatory cells and inflammatory factors, and improve the imbalance of airway remodeling-related factors and collagen synthesis/degradation in BF cells, which may be related to its inhibition of Notch signaling activation.

Key words: celastrol; chronic obstructive pulmonary disease; neurogenic locus notch homolog protein pathway; airway remodeling; fibroblast; collagen synthesis and degradation

慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种以持续性气流受限为主要特征的常见慢性肺部疾病, 可能导致严重的肺功能受损, 显著增加患者死亡的风险^[1]。临床上通常用抗生素、支气管舒张药等药品来缓解患者的症状并延缓病情

进展, 但长期应用疗效往往不理想, 常伴有多种药物不良反应^[2-3]。因此, 积极研发 COPD 治疗药物对于改善患者预后至关重要。雷公藤红素 (celastrol, Cel) 是一种从卫矛科植物雷公藤的根皮部位中提取的有效成分, 具有抗炎、免疫调节、心脑血管保护等多重功

效^[4],相关研究发现,雷公藤红素可以减轻 COPD 的炎症反应与氧化应激^[5-6],但关于 Cel 在 COPD 中的应用仍需进一步研究。神经源性基因 Notch 同源蛋白(neurogenic locus notch homolog protein, Notch)途径是调控 T 细胞分化的一种重要信号通路,与气道重塑密切相关,研究显示,其可能是治疗咳嗽变异性哮喘的有效策略^[7]。因此,本研究旨在探讨 Cel 是否能够通过调控 Notch 途径在 COPD 中发挥治疗作用及其对肺成纤维细胞气道重塑因子表达、胶原合成和降解的影响,为 COPD 的临床治疗提供基础支持。

材料与方法

1 材料

动物 30 只 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 300 ~ 320 g,均由江西中医药大学实验动物科技中心提供。动物许可证号:SCXK(赣)2023-0001。本实验经赣州市人民医院动物伦理委员会批准(伦理批号:PJD2025-031-01)。

药品与试剂 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),规格:5 mg,纯度: 3.0×10^6 EU · mg⁻¹,批号:0000301580,美国 Sigma-Aldrich 公司生产;Cel,规格:25 mg,纯度:99.48%,批号:09223、Notch1 激活剂丙戊酸(valproic acid, VPA),规格:5 g,纯度:98.40%,批号:123000,均由美国 MedChemExpress 公司生产;波形蛋白(Vimentin)抗体和 Notch1 抗体,均由美国 Research Products Inc 公司生产;铁死亡抑制蛋白(ferroptosis suppressor protein1, FSP1)抗体,湖北武汉三鹰生物技术有限公司生产;锯齿状典型 Notch 配体 1(jagged canonical notch ligand1, Jagged1)抗体、发状分裂相关增强子 1(hairy and enhancer of split1, Hes1)抗体、辣根过氧化物酶标记的免疫球蛋白 G、Alexa Fluor®488 荧光标记的免疫球蛋白 G 和 Alexa Fluor®594 荧光标记的免疫球蛋白 G,均由英国 Abcam 公司生产;Notch1 受体胞内结合域(notch1 intracellular domain, NICD1),沈阳万类生物科技有限公司生产;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)试剂盒,上海碧云天生物技术股份有限公司生产;白介素(interleukin, IL)-5、IL-8、IL-17、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-1 和蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitors of metalloproteinase-1, TIMP-1)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒,均由上海酶研生物科技有限公司生产;一氧化氮(nitric oxide, NO) ELISA 试剂盒,南京森贝伽生物科技有限公司生产;引物序

列由上海吉玛公司提供。

仪器 VentStar 小动物呼吸机,广东深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司产品;V5800 荧光显微镜,天津微仪光学仪器有限公司产品;DYCZ-MINI2 双板垂直电泳仪,北京六一生物科技有限公司产品;iBright™ FL1500 成像系统和 QuantStudio™ 5 实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)系统,均为美国赛默飞世尔科技公司产品。

2 实验方法

2.1 动物造模、分组及处理方法^[8]

用烟熏结合 LPS 气管滴入的方法建立 COPD 大鼠模型,于造模第 1 和 14 d,气管内滴入 LPS 200 μL (1 g · L⁻¹);第 2 ~ 13 d 及 15 ~ 28 d 每日上午将大鼠置于密封的 1 m³ 烟室中,持续吸入香烟烟雾 30 min,每天 1 次,每次 15 支,4 w 后大鼠出现流鼻涕打喷嚏、咳嗽、眼角有血样分泌物、呼吸有啰音等症状说明造模成功。把 30 只大鼠随机分成动物对照组、动物模型组和动物试验组,每组 10 只。动物对照组正常饲养;动物模型组按以上方法构建大鼠 COPD 模型;动物试验组在模型构建成功后,开始腹腔注射 0.01 mg · kg⁻¹ Cel (根据细胞半数抑制浓度的 2.2 μmol · L⁻¹,换算成灌胃剂量为 0.01 mg · kg⁻¹),每天 1 次,连续 3 w,动物对照组和动物模型组在相同时间内腹腔注射等量生理盐水。

2.2 有创式肺功能检测法检测各组大鼠的肺功能^[9]

麻醉大鼠并固定,切开皮肤暴露气管并行气管插管,用动物呼吸机测定各组大鼠的用力肺活量(forced vital capacity, FVC)、0.1 s 用力呼气容积(forced expiratory volume in 0.1 second, FEV_{0.1})和呼气峰值流速(peak expiratory flow, PEF)。

2.3 HE 染色法检测各组大鼠肺组织病理变化^[9]

取各组大鼠的肺组织置于 4% 中性甲醛中固定,进行常规脱水、石蜡包埋、切片,并对切片进行 HE 染色、封片处理,再用显微镜观察各组大鼠肺组织病理变化。

2.4 对支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中炎症细胞计数^[10]

将大鼠麻醉,气管插管后将右主支气管结扎,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)溶液灌洗左肺,收集 BALF,离心弃去上清液后加入 PBS 重悬,用血细胞计数板对 BALF 中各种形态炎症细胞(淋巴细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和巨噬细胞)进行计数。

2.5 ELISA 法检测各组大鼠 BALF 中炎症因子的含量^[10]

收集 BALF 上清液,严格按照相应 ELISA 试剂盒说

说明书检测 BALF 中 NO、IL-5、IL-8 和 IL-17 的含量。

2.6 支气管成纤维细胞 (bronchial fibroblasts, BF) 的分离、培养及细胞分组与处理方法^[11]

动物模型组 SD 大鼠处死后,取出完整的气管与肺组织,浸泡在含有 1% 青链霉素的 PBS 溶液中,剥离支气管组织,并将其剪碎,用酶联合消化法 + 组织块贴壁法于 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养,之后每 3 d 换液 1 次,细胞长满后传代并鉴定。鉴定成功后,取培养至对数生长期的 BF 细胞,随机分为细胞对照组、细胞实验组和抑制剂组。细胞对照组为不做任何处理的 BF 细胞;细胞实验组用 2 μmol · L⁻¹ Cel 处理 BF 细胞(通过预实验确定 2 μmol · L⁻¹ Cel 效果最佳);抑制剂组用 1 mmol · L⁻¹ VPA 处理细胞实验组细胞。

2.7 免疫荧光法检测细胞中 Vimentin 和 FSP1 阳性表达^[12]

取肺支气管分离培养的 BF 细胞,加入 4% 多聚甲醛固定 20 min、0.1% Triton X-100 室温透化 5 min,再室温封闭 1 h,加入 Vimentin 和 FSP1 一抗(均为 1:500),4 ℃ 孵育过夜,洗涤,加入荧光标记的二抗(1:1 000),避光孵育 1 h,洗涤后用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚进行核染,封片,再用显微镜进行观察。

2.8 蛋白质印迹法检测各组细胞内 Notch 信号通路相关蛋白的表达^[12]

取各组 BF 细胞加入裂解液提取总蛋白,进行蛋白浓度测定,取样本 20 μg 进行电泳、转膜、封闭,加入 Notch1、NICD1、Jagged1 和 Hes1 一抗(均为 1:1 000),在 4 ℃ 孵育过夜,洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000),室温孵育 2 h,洗涤,化学发光液显影,再用 Image J 软件对目的蛋白条带的灰度值进行分析。

2.9 qRT-PCR 法检测各组细胞气道重塑相关因子和胶原合成相关指标 mRNA 表达^[12]

用 Trizol 总 RNA 提取试剂提取各组 BF 细胞中的总 RNA,再将其合成 cDNA 进行扩增反应。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶为内部对照,通过 2^{-ΔΔC_t} 法计算成纤维细胞生长因子 4 (fibroblast growth factor 4, FGF-2)、MMP-2、MMP-9、I 型胶原蛋白(collagen type I, Col I)、Col III、α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)和转化生长因子-β(transforming growth factor-beta, TGF-β) mRNA 的相对表达水平。FGF-2:上游 5'-CTCTGTGGACTGTAGGTTCCG-3',下游 5'-GAGGCGTATGTGTTGTAGCC-3';MMP-2:上游 5'-TGTCTTGCGTCTGACACTGC-3',下游 5'-CTCCTTTGGGCTAGGTATCTCT-3';MMP-9:上游 5'-GCAGAG-

GCATACTTGTACCG-3',下游 5'-TGATGTTATGATGGTCCCACTTG-3';Col I:上游 5'-GCTCCTCTTAGGGGCCACT-3',下游 5'-ATTGGGGACCCTTAGGCCAT-3';Col III:上游 5'-CTGTAACATGGAAACTGGGAAA-3',下游 5'-CCATAGCTGAACTGAAAACCACC-3';α-SMA:上游 5'-CCCAGACATCAGGGAGTAATGG-3',下游 5'-TCTATCGGATACTTCAGCGTCA-3';TGF-β:上游 5'-CTTCGACGTGACAGCGCT-3',下游 5'-GCAGGGGCAGTGTAACCTATT-3';甘油醛-3-磷酸脱氢酶:上游 5'-AATGGATTTGGACGCATTGGT-3',下游 5'-TTTGCACTGGTACGTGTTGAT-3'。

2.10 ELISA 法检测各组细胞中 MMP-1 和 TIMP-1 的含量^[12]

分组培养 BF 细胞后,收集细胞培养液,离心后取上清液,根据相应 ELISA 试剂盒说明书步骤检测细胞中 MMP-1 和 TIMP-1 的含量。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用最小显著性差异 *t* 检验 (*LSD-t*)。

结 果

1 雷公藤红素对 COPD 大鼠肺功能及肺组织病理状态的影响

动物对照组、动物模型组及动物试验组的 FVC 分别为 (6.74 ± 0.87)、(3.28 ± 0.51) 和 (4.94 ± 0.83) mL, FEV_{0.1} 分别为 (3.94 ± 0.45)、(1.05 ± 0.16) 和 (2.41 ± 0.37) mL, PEF 分别为 (28.09 ± 4.60)、(16.63 ± 3.21) 和 (21.55 ± 4.02) L · min⁻¹。与动物对照组相比,动物模型组大鼠的 FVC、FEV_{0.1} 和 PEF 均显著下降(均 *P* < 0.001);与动物模型组相比,动物试验组大鼠的 FVC、FEV_{0.1} 和 PEF 均显著上升(*P* < 0.01, *P* < 0.001)。

HE 染色显示:对照组大鼠肺组织无明显炎性细胞浸润,细胞排列整齐支气管管壁未见增厚;动物模型组大鼠气管壁明显增厚,管腔变形,肺泡结构被破坏,支气管壁周围有大量炎性细胞浸润;动物试验组大鼠肺部病理损伤有明显改善,支气管管壁轻度增厚,管腔轻度变形,部分肺泡融合,见图 1。

2 雷公藤红素对 COPD 大鼠 BALF 中炎症细胞及炎症因子的影响

与动物对照组相比,动物模型组大鼠 BALF 中淋巴细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、NO、

IL-5、IL-8 和 IL-17 的含量均显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.001$); 与动物模型组相比, 动物试验组大鼠 BALF 中淋巴细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、NO、IL-5、IL-8 和 IL-17 的含量均显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), 见表 1。

3 原代支气管成纤维细胞的鉴定

用免疫荧光法鉴定动物模型组大鼠肺支气管分离培养的 BF 细胞, 可以观察到 Vimentin 和 FSP1 蛋白呈阳性, Vimentin 蛋白在细胞质中呈阳性表达, 发出绿色荧光; FSP1 蛋白也在细胞质中呈现阳性染色, 发出红色荧光, 说明 BF 细胞培养成功。

4 雷公藤红素对 BF 细胞 Notch 信号的影响

细胞对照组、细胞实验组及抑制剂组中 Notch1 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.19 、 0.12 ± 0.02 和 0.38 ± 0.06 , NICD1 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.17 、 0.72 ± 0.12 和 0.85 ± 0.13 , Jagged1 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 、 0.71 ± 0.11 和 0.84 ± 0.12 , Hes1 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.11 、 0.69 ± 0.08 和 0.81 ± 0.09 。与细胞对照组相比, 细胞实验组细胞中 Notch1、NICD1、Jagged1 和 Hes1 蛋白相对表达水平均显著降低 (均 $P < 0.001$), 与细胞实验组相比, 抑制剂组细胞中 Notch1、NICD1、Jagged1 和 Hes1 蛋白相对表达水平均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

5 雷公藤红素对 BF 细胞气道重塑相关因子的影响

qRT-PCR 显示: 细胞对照组、细胞实验组及抑制剂组的 *FGF-2* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 、 0.67 ± 0.09 和 0.84 ± 0.13 , *MMP-2* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.12 、

0.74 ± 0.09 和 0.84 ± 0.10 , *MMP-9* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.16 、 0.59 ± 0.08 和 0.73 ± 0.11 。与细胞对照组相比, 细胞实验组细胞中 *FGF-2*、*MMP-2* 和 *MMP-9* mRNA 相对表达水平均显著降低 (均 $P < 0.001$); 与细胞实验组相比, 抑制剂组细胞中 *FGF-2*、*MMP-2* 和 *MMP-9* mRNA 相对表达水平均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

6 雷公藤红素对 BF 细胞胶原合成和降解的影响

qRT-PCR 及 ELISA 显示: 与细胞对照组相比, 细胞实验组的细胞中 *Col I*、*Col III*、 α -SMA 和 *TGF- β* mRNA 相对表达水平及 *MMP-1*、*TIMP-1* 的含量均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.001$); 与细胞实验组相比, 抑制剂组的细胞中 *Col I*、*Col III*、 α -SMA 和 *TGF- β* mRNA 相对表达水平及 *MMP-1*、*TIMP-1* 的含量均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), 见表 2。

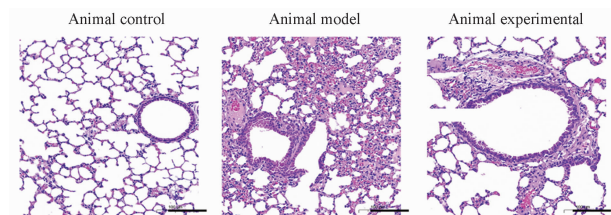


图 1 苏木精-伊红 (HE) 染色法检测各组大鼠肺组织病理变化 ($\times 100$)

Figure 1 Pathological changes in lung tissues of rats in each group detected by hematoxylin and eosin (HE) staining ($\times 100$) Animal control group: Normal conditions; Animal model group: Established a rat COPD model; Animal experimental group: Received intraperitoneal injections of $0.01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cel.

表 1 各组大鼠支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中炎症细胞计数及炎症因子含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the counts of inflammatory cells and the contents of inflammatory factors in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of each group of rats ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Lymphocytes ($\times 10^7 \text{ cell} \cdot \text{L}^{-1}$)	Neutrophils ($\times 10^7 \text{ cell} \cdot \text{L}^{-1}$)	Eosinophils ($\times 10^7 \text{ cell} \cdot \text{L}^{-1}$)	Macrophages ($\times 10^7 \text{ cell} \cdot \text{L}^{-1}$)
Animal control	10	2.08 ± 0.31	3.47 ± 0.47	0.29 ± 0.04	5.91 ± 0.86
Animal model	10	$5.89 \pm 1.14^{***}$	$6.59 \pm 1.35^{***}$	$2.38 \pm 0.32^{***}$	$13.76 \pm 2.29^{***}$
Animal experimental	10	$4.26 \pm 0.72^{##}$	$4.47 \pm 0.71^{###}$	$1.09 \pm 0.16^{###}$	$9.27 \pm 1.77^{###}$

Group	<i>n</i>	NO ($\mu\text{M} \cdot \text{L}^{-1}$)	IL-5 ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	IL-8 ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	IL-17 ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)
Animal control	10	26.19 ± 3.21	38.49 ± 6.02	417.79 ± 52.10	63.80 ± 6.98
Animal model	10	$65.41 \pm 9.83^{***}$	$49.95 \pm 8.17^{**}$	$771.57 \pm 132.04^{***}$	$81.78 \pm 10.56^{***}$
Animal experimental	10	$49.83 \pm 8.62^{##}$	$42.39 \pm 7.25^{\#}$	$542.08 \pm 88.27^{###}$	$71.24 \pm 9.45^{\#}$

NO: Nitric oxide; IL: Interleukin; Compared with animal control group, $^{**} P < 0.01$, $^{***} P < 0.001$; Compared with animal model group, $^{\#} P < 0.05$,

$^{##} P < 0.01$, $^{###} P < 0.001$.

表2 各组细胞中胶原合成相关指标 mRNA 相对表达水平及基质金属蛋白酶(MMP) - 1 和蛋白酶组织抑制因子 - 1(TIMP - 1)含量的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of mRNA relative expression levels of collagen synthesis - related indicators and the concentration of matrix metalloproteinase(MMP) - 1 and tissue inhibitors of metalloproteinase - 1(TIMP - 1) in each group of cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	<i>Col</i> I	<i>Col</i> III	α - <i>SMA</i>	<i>TGF</i> - β	MMP - 1 (ng · mL ⁻¹)	TIMP - 1 (ng · mL ⁻¹)
Cell control	10	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.18	1.19 ± 0.17	219.78 ± 30.24
Cell experiment	10	0.67 ± 0.09***	0.82 ± 0.14*	0.41 ± 0.07***	0.53 ± 0.09***	0.80 ± 0.15***	131.94 ± 18.15***
Inhibitor	10	0.86 ± 0.14##	0.96 ± 0.15#	0.78 ± 0.13###	0.75 ± 0.14###	1.06 ± 0.15##	167.51 ± 21.01###

Cell control group: Consisted of BF cells without any treatment; Cell experiment group: Treated with 2 μmol · L⁻¹ Cel; Inhibitor group: Treated with 1 mmol · L⁻¹ VPA based on the cell experiment group; *Col* I: Collagen type I; *Col* III: Collagen type III; α - *SMA*: α - smooth muscle actin; *TGF* - β : Transforming growth factor - β ; Compared with cell control group, **P* < 0.05, ****P* < 0.001; Compared with cell experiment group, #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01, ###*P* < 0.001.

讨 论

COPD 是一种常见的临床疾病,患者表现出咳嗽、呼吸困难等,该病病程迁延且反复发作,严重降低患者生活质量^[13]。目前,尚无有效根治 COPD 的方法,长期药物治疗容易导致耐药性及药物不良反应^[14]。近年来,中医药在缓解 COPD 临床症状、改善肺部炎症等方面具有其独特优势,为该病的防治提供了新思路^[15]。Cel 作为一种萜类化合物,可以治疗慢性炎症、肥胖等疾病,临床应用价值高^[16]。本研究发现,经过 Cel 干预后,COPD 大鼠的肺功能指标 FVC、FEV0.1 和 PEF 均显著上升,且肺部病理损伤有显著改善,推测 Cel 可以有效治疗 COPD,改善 COPD 大鼠的肺功能,减轻肺部病理损伤。研究表明,炎症是 COPD 发生与发展的核心机制,涉及多种炎症细胞和炎症因子^[17]。在感染、吸烟、空气污染等危险因素的刺激下,上皮细胞产生过量活性氧,导致炎症细胞浸润气道,引发慢性炎症,促使 COPD 进展^[18-19]。本研究发现,经过 Cel 干预后,COPD 大鼠 BALF 中淋巴细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、NO、IL - 5、IL - 8 和 IL - 17 的含量均显著下降,猜测 Cel 能够降低炎症细胞及炎症因子的水平,减轻气道炎症反应。这与 SHI 等^[5]研究中 Cel 通过抑制内皮素受体 B/ 激肽原 1 信号通路的激活来抑制肺组织细胞凋亡、改善炎症及减少 COPD 小鼠的肺损伤来治疗 COPD 的结果相似。

Notch 信号在肺稳态、损伤和修复过程中扮演着关键角色,其失调可能导致肺动脉高压、COPD 等呼吸系统疾病的发生^[20]。研究表明,COPD 炎症刺激下激活 Notch1 信号,Notch1 受体与相邻细胞间的配体 Jagged1 相互结合,经金属蛋白酶、 γ - 分泌酶途径释放 Notch1 胞内域(notch1 intracellular domain, NICD)入

核,形成 NICD - CBF1/Suppressor of Hairless/Lag - 1 复合物[CBF1/Su(H)/Lag - 1, CSL]复合物,激活 Hes1 并促进 IL - 5、IL - 6 等炎性介质的释放,形成正反馈,加重炎症损伤,推动 COPD 进展^[21-22]。马若飞等^[23]研究发现,芪蛭皱肺颗粒能够改善 COPD 大鼠的肺功能及减轻肺组织和气道炎症,与其抑制 Notch 信号通路的过度表达,平衡辅助性 T 细胞 1 (T helper 1 cell, Th1)/Th2 功能有关,本研究结果与其类似,经过 Cel 干预后,BF 细胞 Notch1、NICD1、Jagged1 和 Hes1 蛋白相对表达水平均显著降低,猜测 Cel 可能通过抑制 Notch 信号的激活来发挥 COPD 治疗作用。气道重塑是 COPD 特征改变,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中胶原纤维合成与降解失衡是其主要原因^[24]。ECM 沉积减少时,*Col* I、*Col* III 和 α - *SMA* 表达会降低^[25]; *TGF* - β 的增加会导致 ECM 过度沉积^[26]。*FGF* - 2 参与 COPD 气道重塑过程^[27]。MMPs 过度表达破坏上皮完整性,损害肺泡及小气道,导致气道重塑^[28-29];而 TIMP - 1 是 MMPs 的抑制剂,抑制 MMPs 降解 ECM 的活性,减轻 ECM 过度降解所致的组织损伤^[30]。陈聪等^[31]研究发现,龟鹿补肾丸能够显著降低肺组织中 *Col* I、*TGF* - β 1、 α - *SMA* 及 BALF 中 TIMP - 1、MMP - 12 等的表达,减轻 COPD 大鼠的气道炎症并改善其肺功能,本研究与其类似,经过 Cel 干预后,BF 细胞 *FGF* - 2、*MMP* - 2、*MMP* - 9、*Col* I、*Col* III、 α - *SMA* 和 *TGF* - β mRNA 水平及 MMP - 1、TIMP - 1 的含量均显著降低,这提示 TIMP - 1 的下调减轻了对 MMP - 1 的抑制作用,从而有助于恢复 MMP - 1/TIMP - 1 的平衡,增强局部胶原降解能力,且经 Notch1 激活剂处理后结果相反,推测 Cel 可能是通过抑制 Notch 信号的激活,重塑胶原合成与降解的动态平衡,避免胶原过度沉积,进而改善 COPD 大鼠气道重塑。

本研究提示: Cel 能够有效改善 COPD 大鼠的肺

功能和肺部病理损伤、降低炎症细胞及炎症因子的水平、改善 BF 细胞气道重塑相关因子水平,重塑胶原合成与降解的动态平衡,可能与其抑制 Notch 信号的激活有关。本研究每组 10 只大鼠,主要指标的功效统计分析把握度有限,可能增加假阴性风险;此外,动物模型与人体存在固有差异,结果外推需谨慎。后续应开展临床相关研究,以推动成果的转化医学应用。

参考文献:

- [1] 江丽慧. 基于健康商数的分层式健康教育对慢阻肺患者疾病认知、健康行为及睡眠质量的影响[J]. 世界睡眠医学杂志, 2023, 10(11): 2733—2735.
- [2] 刘四清, 张齐武, 杨龙江. 长效 β_2 受体激动剂联合异丙托溴铵雾化吸入对 COPD 肺功能的影响[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2021, 14(4): 456—458.
- [3] 何权, 马小梅, 封伟奇, 等. 生脉地黄汤联合西药吸入治疗肺肾气虚型 COPD 稳定期的临床研究及对 PI3K/AKT 通路相关因子表达的影响[J]. 中医药学报, 2024, 52(11): 98—102.
- [4] 屠雯妍, 叶利群, 李牧阳, 等. 中医药调节冠状结构治疗肥胖型多囊卵巢综合征的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(13): 296—307.
- [5] SHI K, CHEN X, XIE B, et al. Celastrol alleviates chronic obstructive pulmonary disease by inhibiting cellular inflammation induced by cigarette smoke via the Ednrb/Kng1 signaling pathway [J/OL]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9. 2018 - 11 - 15 [2025 - 04 - 20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30498444/>.
- [6] CHEN X, ZHANG B, LI J, et al. Celastrol attenuates incision - induced inflammation and pain associated with inhibition of the NF - κ B signalling pathway via SARM [J/OL]. *Life Sciences*, 2018: S0024320518302807. 2018 - 07 - 15 [2024 - 04 - 20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29750991/>.
- [7] 陈宇航, 张宁宇, 徐方蔚, 等. 加味六安煎对咳嗽变异性哮喘豚鼠气道重塑关键通路及因子的影响[J]. 世界中医药, 2023, 18(23): 3342—3347, 3352.
- [8] 屈飞, 黄小婷, 崔艳茹, 等. 清肺化痰汤对慢性阻塞性肺疾病大鼠模型气道炎症和黏液分泌的调控作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(9): 2064—2067, 2305.
- [9] 冷安明, 杨静, 张葵. 桑色素通过抑制 MMP9 表达改善慢性阻塞性肺疾病[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(12): 1987—1994.
- [10] 许颖, 吴腾飞, 宫玉杰. 马鞭草苷通过 JAK3 - STAT6 信号通路缓解哮喘大鼠气道炎症[J]. 解剖科学进展, 2023, 29(2): 181—183, 187.
- [11] 姚培学, 杨胜红, 陈杰, 等. 白介素 - 17A 通过自噬调控支气管成纤维细胞胶原降解[J]. 实用医学杂志, 2021, 37(4): 423—427.
- [12] 吴旭, 季爽, 郭燕, 等. NAC/RvD1 抑制 H2O2 诱导的 COPD 患者气道上皮细胞炎症性黏液高分泌的作用及机制研究[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(12): 1853—1859.
- [13] 张一乐, 陈旋, 张艺宝, 等. 补肾益肺方治疗慢性阻塞性肺疾病合并骨质疏松症临床观察[J]. 山东中医杂志, 2024, 43(9): 949—956.
- [14] 马若飞, 苏苗, 李金田, 等. 中医药调节 Th1/Th2 免疫平衡治疗慢性阻塞性肺疾病研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(19): 235—242.
- [15] 阮欢荣, 张海龙, 韩伟红. 基于网络药理学的中药治疗慢性阻塞性肺疾病作用机制研究进展[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2022, 24(10): 3926—3931.
- [16] 吴慧, 胡清霞, 宋萍, 等. 内生真菌对雷公藤组培苗生长、生理及药用成分含量的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2024, 33(1): 67—76.
- [17] 崔志红, 林雪芳, 姚根琴, 等. 参芪补肺汤治疗慢性阻塞性肺疾病的作用机制研究[J]. 浙江医学, 2024, 46(14): 1487—1492, 1570—1572.
- [18] CHEN Y T, MIAO K, ZHOU L, et al. Stem cell therapy for chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2021, 134(13): 1535—1545.
- [19] 吴晓娟, 贾宝林, 罗晓斌, 等. TRPC1 对慢性阻塞性肺疾病慢性气道炎症的影响[J]. 临床肺科杂志, 2020, 25(4): 514—519.
- [20] 王子含, 阿基业, 王广基, 等. Notch 信号通路及其与疾病间关系研究进展[J]. 药物评价研究, 2023, 46(9): 2006—2013.
- [21] 尚立芝, 季书, 李耀洋, 等. 二陈汤加味通过 Jagged1/Notch1/Hes1 信号通路对慢性阻塞性肺疾病的抗炎机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(9): 109—118.
- [22] 陈玉茹, 王璐, 裴可, 等. 中医药调控 Notch 信号通路治疗结直肠癌作用机制研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2024, 26(9): 96—102.
- [23] 马若飞, 苏苗, 李金田, 等. 基于 Notch 信号通路探讨芪蛭皱肺颗粒对慢性阻塞性肺疾病大鼠 Th1/Th2 免疫平衡的调节机制[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2024, 26(1): 179—189.
- [24] 林丹霞, 罗志雄, 赵竞秀, 等. 补肺益肾祛痰纳气法联合布地格福治疗阳虚痰阻型 COPD 稳定期患者疗效观察[J/OL]. 中华中医药学刊, 1—12. 2024 - 10 - 11 [2024 - 12 - 12]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20241010.1944.004.html>.
- [25] HOU H H, SU C C, HONG L L, et al. Platycodin D alleviates proliferation and extracellular matrix accumulation in TGF - β 1 induced pulmonary fibroblasts [J]. *Bratisl Lek Listy*, 2021, 122(2): 145—151.
- [26] 舒俊森, 王琨皓, 郭伶俐. 巨噬细胞极化对瘢痕疙瘩成纤维细胞的作用及机制研究[J]. 解放军医学院学报, 2024, 45(11): 1176—1183.
- [27] 陈灿, 白燕, 伍永升. 血清促血管生成和促纤维化因子与老年 COPD 患者肺功能降低和急性加重的关系[J]. 东南大学学报(医学版), 2023, 42(4): 500—506.
- [28] 张胜碧, 刘燕玲, 李岚. 地龙提取液对卵清蛋白诱导哮喘小鼠气道重塑及肺组织 MMP2、MMP9、TIMP - 1 表达的影响[J]. 中国新药与临床杂志, 2021, 40(7): 523—530.
- [29] 焦姣, 范金, 李清, 等. 基于网络药理学探讨宣白承气汤抗慢性阻塞性肺疾病急性加重的作用机制[J/OL]. 沈阳药科大学学报, 1—18. 2023 - 10 - 10 [2024 - 12 - 12]. <https://doi.org/10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2022.0292>.
- [30] CABRAL - PACHECO G A, GARZA - VELOZ I, CASTRUITA - DE LA ROSA C, et al. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24): 9739.
- [31] 陈聪, 陈志钊, 李志强, 等. 基于 TGF - β 1/Smads 通路探讨龟鹿补肾丸对 COPD 大鼠气道重塑的影响[J]. 广东药科大学学报, 2024, 40(3): 25—32.

(本文编辑:马凌云 投稿日期:2025 - 06 - 22)