

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research桑色素通过调节 MDM2 维持上皮细胞结构
完整减轻哮喘气道炎症的机制研究Research of mechanism of morin alleviating airway inflammation in asthma by
regulating MDM2 to maintain the integrity of epithelial cell structure赵 凌, 蔡峻鹏, 周小敏,
吕晓江(川北医学院附属医院 儿科, 四川南充
637000)ZHAO Ling, CAI Jun - peng,
ZHOU Xiao - min, LV Xiao - jiang(Department of Pediatrics, Affiliated
Hospital of North Sichuan Medical
College, Nanchong 637000, Sichuan
Province, China)基金项目: 四川省医学会肿瘤/麻醉/放射/
慢病/神经病(恒瑞-一行)专项科研
基金资助项目(2024HR148)作者简介: 赵凌(1988-), 男, 住院医师, 主要从
事儿童消化、呼吸疾病方面的工作和
研究

通信作者: 吕晓江, 副主任医师

MP: 13890877675

E-mail: zlnsmc@163.com

摘要:目的 探讨桑色素改善哮喘气道炎症的潜在作用机制。方法 在动物实验中,大鼠随机分为动物对照组、动物模型组[卵清蛋白(OVA)诱导]、动物低剂量实验组(OVA诱导+10 mg·kg⁻¹桑色素)、动物中剂量实验组(OVA诱导+30 mg·kg⁻¹桑色素)和高剂量实验组(OVA诱导+100 mg·kg⁻¹桑色素),每组10只,治疗4周后,收集支气管肺泡灌洗液(BALF)、血清备用及取肺组织,用蛋白质印迹法检测鼠双微体基因2(MDM2)蛋白表达,用酶联免疫吸附法测定(ELISA)检测BALF炎症因子表达,用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)法检测肿瘤蛋白53(p53)、BCL-2相关X蛋白(Bax)mRNA表达。在细胞实验中,将16HBE细胞随机分为细胞空白组、细胞模型组[50 μg·L⁻¹的白细胞介素(IL)-13]、细胞实验组(65 μmol·L⁻¹的桑色素+IL-13)、si-NC组(转染si-NC+65 μmol·L⁻¹的桑色素+IL-13)和si-MDM2组(转染si-MDM2+65 μmol·L⁻¹的桑色素+IL-13),处理48 h后,用原位末端转移酶标记法(Tunel)检测细胞凋亡率,用蛋白质印迹法检测蛋白表达和P53泛素化水平。结果 在动物实验中,动物对照组、动物模型组、动物低、中、高剂量实验组的MDM2蛋白相对表达水平分别为0.65±0.05、0.32±0.03、0.41±0.06、0.46±0.04和0.51±0.05;BALF-IL-13水平分别为(15.44±1.19)、(55.43±3.90)、(48.79±4.88)、(37.25±4.59)和(25.64±1.64)pg·mL⁻¹;p53 mRNA相对表达水平分别为1.00±0.14、1.75±0.13、1.51±0.12、1.44±0.09和1.24±0.14;Bax mRNA相对表达水平分别为1.00±0.14、1.94±0.16、1.75±0.17、1.62±0.17和1.39±0.09;上述指标,动物模型组与动物对照组比较,动物低、中、高剂量组分别与动物模型组比较,差异均具有统计学意义(P<0.05, P<0.01)。在细胞实验中,细胞空白组、细胞模型组、细胞实验组、si-NC组和si-MDM2组细胞凋亡率分别为(3.94±0.27)、(31.76±2.39)、(19.93±1.91)、(18.14±2.50)和(25.97±1.74)%;MDM2蛋白相对表达水平分别为0.91±0.09、0.44±0.05、0.66±0.08、0.68±0.05和0.21±0.04;上述指标,细胞模型组与空白组比较,细胞实验组与细胞模型组比较,si-MDM2组与si-NC组比较,在统计学上差异均具有统计学意义(均P<0.01)。结论 桑色素可能通过上调MDM2泛素化调节p53减轻哮喘气道炎症及细胞凋亡。

关键词:桑色素;哮喘;支气管上皮细胞;炎症反应;鼠双微体基因2;凋亡;泛素化

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.08.011

中图分类号:R28

文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2026)08-1114-08

Abstract: Objective To explore the potential mechanism of morin in improving airway inflammation in asthma. **Methods** In animal experiments, rats were randomly divided into four groups, with 10 rats in each group: animal control group, animal model group [ovalbumins

(OVA) - induced], animal experimental - L group (OVA - induced + $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ morin), animal experimental - M (OVA - induced + $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ morin) and the experimental - H group (OVA - induced + $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ morin). After 4 weeks of treatment, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and serum were collected for subsequent use, and lung tissues were harvested. Western blot assay was used to detect the expression of murine double minute 2 (MDM2) protein; enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) assay was employed to determine the expression of inflammatory factors in BALF; and real - time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT - qPCR) assay was applied to measure the mRNA expressions of tumor protein 53 (*p53*) and BCL - 2 associated X protein (*Bax*). In cell experiments, 16HBE cells were randomly assigned to four groups: cell blank group, cell model group [treated with $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ interleukin (IL) - 13], cell experimental group (treated with $65 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ morin + IL - 13), si - NC group (transfected with si - NC, then treated with $65 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ morin + IL - 13) and si - MDM2 group (transfected with si - MDM2, then treated with $65 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ morin + IL - 13). After 48 hours of treatment, TdT mediated dUDP nick end labeling (Tunel) assay was used to detect the cell apoptosis rate; Western blot assay was performed to determine protein expression and P53 ubiquitination level. **Results** In animal experiments, the levels of MDM2 protein in the animal control group, animal model group, animal experimental - L group, animal experimental - M and animal experimental - H group were 0.65 ± 0.05 , 0.32 ± 0.03 , 0.41 ± 0.06 , 0.46 ± 0.04 and 0.51 ± 0.05 , respectively; the levels of BALF - IL - 13 were (15.44 ± 1.19), (55.43 ± 3.90), (48.79 ± 4.88), (37.25 ± 4.59) and (25.64 ± 1.64) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the relative expression levels of *p53* mRNA were 1.00 ± 0.14 , 1.75 ± 0.13 , 1.51 ± 0.12 , 1.44 ± 0.09 and 1.24 ± 0.14 , respectively; the relative expression levels of *Bax* mRNA were 1.00 ± 0.14 , 1.94 ± 0.16 , 1.75 ± 0.17 , 1.62 ± 0.17 and 1.39 ± 0.09 , respectively; when comparing the animal model group with the animal control group, and the animal experimental - L, - M, - H groups with the animal model group respectively, the differences of the above indicators were all statistically significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In cell experiment, the apoptosis rates of cells in cell blank group, cell model group, cell experimental group, si - NC group and si - MDM2 group were (3.94 ± 0.27), (31.76 ± 2.39), (19.93 ± 1.91), (18.14 ± 2.50) and (25.97 ± 1.74)%, respectively; the relative expression levels of MDM2 protein were 0.91 ± 0.09 , 0.44 ± 0.05 , 0.66 ± 0.08 , 0.68 ± 0.05 and 0.21 ± 0.04 , respectively; when comparing the cell model group with the cell blank group, the cell experimental group with the cell model group, the si - MDM2 group with the si - NC group, the differences of the above indicators were all statistically significant (all $P < 0.01$). **Conclusion** Morin may alleviate asthmatic airway inflammation and cell apoptosis by upregulating MDM2 ubiquitination to regulate *p53*.

Key words: morin; asthma; bronchial epithelial cell; inflammatory response; murine double minute 2; apoptosis; ubiquitination

哮喘是一种慢性呼吸道炎症性疾病,已成为严重的全球公共卫生问题之一,对患者的健康和生活质量造成了严重影响,同时也给全球卫生系统带来了巨大的经济负担^[1]。吸入皮质类固醇治疗哮喘已取得重大进展,然而,在严重哮喘和以中性粒细胞浸润为特征的哮喘中,皮质类固醇的使用通常受到限制^[2-3],因此寻找新的治疗药物和治疗靶点以改善哮喘的治疗效果尤为重要。据报道,在包括哮喘在内的过敏性疾病的临床试验中,中药具有改善哮喘的效果^[4],桑色素是从桑科植物中提取的一种黄酮类化合物,研究表明桑色素具有明显的抗炎活性,在包括哮喘在内的过敏性炎症疾病中发挥重要作用^[5-6]。气道上皮

细胞结构完整性收到破坏被认为是触发和加剧哮喘气道炎症的关键起始环节,基于此,本研究旨在通过体内、外实验探究桑色素维持气道上皮细胞结构完整性减轻哮喘气道炎症的潜在作用机制,以期寻找治疗哮喘新策略提供思路。

材料与方法

1 材料

动物 6周龄的雄性 SPF 级别 SD 大鼠,体质量: 200 ~ 230 g,购自西南医科大学,动物生产许可证号: SCXK(川)2024 - 0046,动物使用许可证号: SYXK(川)2023 - 0065;所有动物均饲养在动物房中(12 h/

12 h 明/暗交替,温度:22 ~ 24 ℃,湿度:45% - 50%),自由进食和饮水。本研究已获得川北医学院附属医院医学伦理委员会的批准(伦理批号:2022ER512-1)。

细胞 人支气管上皮细胞 16HBE,人胚肾细胞 293 T,均购自美国型培养菌种集(American Type Culture Collection, ATCC)公司。

药品与试剂 桑色素,规格:每支 20 mg,纯度:≥ 98%,批号:20241210,上海源叶生物科技有限公司生产;卵清蛋白(ovalbumins, OVA),规格:每瓶 100 mg,纯度:98.1%,批号:20250111,美国 MedChemExpress 公司生产;重组白细胞介素(interleukin, IL)-13,规格:每瓶 100 μg,纯度:95%,批号:20241218,北京百普赛斯生物科技股份有限公司生产;3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒,上海贝博生物科技有限公司生产;苏木精伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色液,江西南昌雨露实验器材有限公司生产;鼠双微体基因 2(murine double minute 2, MDM2)、肿瘤蛋白 53(tumor protein 53, p53)、BCL2 相关 X 蛋白(BCL2-associated X protein, Bax)及同种属二抗,均由美国 Abcam 公司生产;白细胞介素(interleukin, IL)-13、IL-5、IL-4 酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒,均由上海沪震实业有限公司生产;免疫球蛋白 E(immunoglobulin E, IgE)试剂盒,上海抚生实业有限公司生产;杜尔贝科改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's medium, DMEM),广东环凯微生物科技有限公司生产;Lipofectamine 3000 转染试剂、逆转录试剂盒,均由北京杰辉博高生物技术有限公司生产;原位末端转移酶标记法(TdT mediated dUDP nick end labeling, TUNEL)试剂盒,上海碧云天生物有限公司生产;His 标签单克隆抗体、Flag 标签单克隆抗体,均由湖北武汉三鹰生物技术公司生产;引物合成、V5-Ubiquitin 及质粒合成,均有上海吉玛制药技术有限公司完成。

RT-6100 型酶标仪,深圳雷杜生命科学股份有限公司产品;NIB900-FL 型荧光显微镜,中国 Nexcope 公司产品;NanoDrop One 型紫外分光光度计,美国 Thermo Fisher 公司产品;PikoReal 型五通道实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)仪,美国 Thermo Scientific 公司产品;Bolt TM Bis-Tris Plus 型预制凝胶蛋白电泳系统,美国 Life Tech 公司产品。

2 方法

2.1 动物实验

2.1.1 动物模型构建^[7]

所有大鼠适应性饲养 1 周后使用 OVA 诱导法进行造模:在开始造模的第 1、14 d 腹腔注射 OVA 混合液(含 1% OVA 生理盐水和 160 mg 的氢氧化铝)1 mL,对照组注射等剂量的生理盐水;在造模的第 21 d 起,用 5% 的 OVA 进行雾化激发:大鼠每次雾化吸入 OVA 30 min,一天 2 次,连续 7 d。结束后连续 2 次 1 g · L⁻¹ 的 OVA 滴鼻激发试验阳性则视为造模成功,本研究所有大鼠均造模成功。

2.1.2 动物分组处理及样本收集

将大鼠随机分为动物对照组、动物模型组、动物低剂量实验组、中剂量实验组、高剂量实验组,每组 10 只,除动物对照组外其余组大鼠均按照“2.1.1”中方法进行造模,其中,低、中、高剂量实验组大鼠造模后分别口服 10、30、100 mg · kg⁻¹ 的桑色素,对照组和模型组大鼠均口服等剂量的生理盐水,1 天 1 次,连续 4 周。给药结束后,麻醉大鼠,取眼眶静脉血备用,并剪开皮肤分离器官,气管插管后结扎右主支气管,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)10 mL 灌洗左肺,收集支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)备用;然后处死大鼠取肺组织备用。

2.1.3 免疫组化法检测肺组织 MDM2 蛋白表达水平^[8]

取各组大鼠肺组织并用 4% 多聚甲醛固定 24 h,用乙醇梯度脱水后二甲苯渗透,然后经石蜡浸蜡和包埋后制片;用柠檬酸钠溶液进行抗原修复后滴加过氧化氢(3%),避光孵育 10 min, PBS 清洗后用山羊血清封闭 20 min,滴加 MDM2 一抗(1:100),4 ℃ 下孵育过夜, PBS 清洗,然后滴加二抗试剂,37 ℃ 下孵育 30 min, PBS 清洗后用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物试剂孵育 20 min,然后使用 DAB 显色 5 min,流水冲洗 5 min,苏木素染色 1 min 后流水冲洗,再用酸性分化液处理 10 s, PBS 清洗后乙醇梯度脱水、二甲苯透明,中性树胶封片并用显微镜观察。并用半定量评分法量化炎症程度。

2.1.4 HE 染色法检测肺组织炎症损伤^[9]

取各组大鼠肺组织并用 4% 多聚甲醛固定 24 h,用乙醇梯度脱水后二甲苯渗透,然后经石蜡浸蜡和包埋后制片;取肺组织石蜡切片浸入二甲苯 10 min,乙醇梯度脱水,然后用苏木素染色 5 min,流水冲洗,分化液分化 30 s 后用伊红试剂染色 2 min,流水冲洗;经乙醇脱水和而基本处理后中性树胶封片并用显微镜

观察。

2.1.5 蛋白质印迹(Western blot, WB)法检测蛋白表达水平^[10]

收集肺组织,加入放射免疫沉淀裂解液,冰上裂解 30 min 后,离心($12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min)收集上清液(即总蛋白),检测总蛋白浓度;取适量蛋白样品进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,并转至聚偏二氟乙烯膜(用脱脂奶粉封闭 120 min);滴加一抗[MDM2(1:1 000)、p53(1:1 000)、Bax(1:2 000)]后,4℃孵育过夜,次日滴加二抗稀释液(1:5 000)室温下结合 120 min,滴加电化学发光液并曝光成像,用 Image J 软件分析灰度值。

2.1.6 ELISA 法检测炎症因子表达^[9]

取大鼠 BALF 和血清样本,离心后收集上清液,然后严格按照 ELISA 试剂盒操作步骤检测 BALF 中 IL-13、IL-5、IL-4 及血清 IgE 水平。

2.1.7 RT-qPCR 法检测相关基因表达^[11]

收集各组肺组织,用 TRIzol 方法提取总 RNA,并用紫外分光光度计检测 260 nm 和 280 nm 处 RNA 吸光值用以检测提取的 RNA 纯度;根据逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,并进行实时荧光定量 PCR 扩增,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析目的基因相对表达量,引物序列见表 1。

表 1 各基因引物序列

Table 1 The primer sequences of each gene

Gene	Forward(5' - 3')	Reverse(5' - 3')
p53	TAGCGACTACAGTTAGGGGGT	CTCCTATCGGCTTCCAGTCTT
p21	CACGAAACAGGCTCAGGAGT	GCATCGTCAACACCCTGTCT
Bax	CTCAAGGCCCTGTGCACTAA	GGAAAGGAGGCCATCCAG
Noxa	GAGCCCCAGACTCCAGATTG	GAATTCAGCGGTAACCTCTGC
GAPDH	GCGAGATCCCGCTAACATCA	ATTCGAGAGAAGGGAGGGCT

p53: Tumor protein p53; Bax: BCL2-associated X protein; Noxa: Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

2.2 细胞实验

2.2.1 细胞培养^[12]

16 HBE 细胞培养在 DMEM 培养基中,培养基中含有 10% 优质胎牛血清和 1% 双抗,并置于培养箱(37℃, 5% 二氧化碳)中培养,每隔一天更换一次培养液,细胞融合至 75% 左右时进行消化传代。

2.2.2 细胞分组与处理

将 16HBE 细胞随机分为细胞空白组、细胞模型组、细胞实验组、si-NC 组和 si-MDM2 组,细胞空白组细

胞进行常规培养,模型组细胞用 $50\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的人重组 IL-13 刺激细胞 48 h,实验组细胞使用 $65\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的桑色素(预实验显示该剂量为对 16HBE 无细胞毒性的最大剂量)及 IL-13 处理细胞 48 h,si-NC 组细胞使用 Lipofectamine 3000 转染试剂将 si-NC 质粒转染至细胞 24 h 后再用桑色素和 IL-13 继续处理 48 h,si-MDM2 组细胞将 si-MDM2 质粒转染至细胞 24 h 后再用桑色素和 IL-13 继续处理 48 h。

2.2.3 Tunel 实验检测细胞凋亡^[13]

将细胞接种在 6 孔板中(每孔接种 2×10^5 个细胞),分组处理后用 4% 多聚甲醛固定,PBS 清洗干净,使用 0.1% Triton X-100 试剂(用 0.1% 柠檬酸钠溶液配制)通透细胞 10 min;然后根据 Tunel 试剂盒滴加 TdT 混合液避光孵育 60 min,PBS 清洗细胞后加入二脒基苯基吡啶试剂进行核染 5 min,PBS 清洗后用抗荧光淬灭封片液滴在载玻片上用荧光显微镜观察。

2.2.4 WB 法检测蛋白表达

收集各组细胞,加入 RIPA 裂解液,离心后根据“2.1.5”中方法检测 MDM2、P53、Bax 蛋白相对表达水平。

2.2.5 RT-qPCR 法检测相关基因表达

收集各组细胞,用 TRIzol 方法提取总 RNA,然后根据 2.1.7 方法检测 p53、p21、Bax、佛波酯-12-肉豆蔻酸-13-乙酸酯诱导蛋白 1(phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1, Noxa) mRNA 相对表达量。

2.2.6 免疫共沉淀检测 MDM2 与 p53 相互作用^[14]

取 293T 细胞,加入 IP 裂解液裂解 30 min,离心收集蛋白上清;准备 ProteinA/G-Agarose 珠并清洗后加入样品孵育 2 h,离心收集沉淀;EP 管中加入蛋白样品并分别标记为 IP、Input、IgG,其中 IP 管根据抗体说明加入适量抗体,IgG 管加入与 IP 管同种属的 IgG 抗体,Input 管不做处理,然后置于 4℃摇床孵育过夜;次日在 IgG 管和 IP 管中加入清洗后的磁珠孵育 2 h 后清洗保留沉淀,然后加入蛋白上样缓冲液在 95℃下变性蛋白质并离心收集上清(免疫共沉淀得到的蛋白质),然后进行 WB 分析。

2.2.7 p53 泛素化检测^[14]

将 293T 细胞接种在 6 孔板中,融合至 80% 左右时,用转染试剂将相应的 His-MDM2、Flag-p53 及 V5-Ubiquitin(V5-Ub)质粒转染至 293T 细胞,转染 48 h 后用 MG132($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理细胞 12 h,然后用 WB 实验检测 p53 泛素化水平。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用 $LSD - t$ 检验。

结 果

1 MDM2 在哮喘大鼠中低表达

免疫组化实验检测 MDM2 在哮喘大鼠肺组织中的表达,动物对照组和模型组组织学评分分别为 (2.60 ± 0.49) 和 (1.50 ± 0.50) 分,相比对照组,模型组 MDM2 蛋白相对表达水平显著降低($P < 0.01$),见图 1。

2 桑色素上调 MDM2 减轻哮喘大鼠肺部炎症

与对照组比较,模型组大鼠肺组织 MDM2 蛋白相对表达水平显著降低,BALF 中 IL - 13、IL - 5、IL - 4 及血清 IgE 水平均显著升高(均 $P < 0.01$);

相比模型组,低、中、高剂量实验组 MDM2 蛋白水平均显著升高,BALF 中 IL - 13、IL - 5、IL - 4 及血清 IgE 水平均显著降低(均 $P < 0.01$),见图 2 和表 2。

HE 染色结果显示,对照组大鼠黏膜上皮细胞排列整齐,支气管管壁结构完整,周围无炎性细胞浸润;与对照组比较,模型组大鼠气道上皮细胞排列紊乱,由大量炎症细胞浸润;相比模型组,低、中、高剂量实验组炎症细胞细胞浸润程度减轻,其中高剂量实验组减轻最为明显,见图 3。

3 桑色素介导 MDM2 减少体内细胞凋亡相关基因表达

与动物对照组比较,动物模型组大鼠肺组织 $p53$ 、 $p21$ 、 Bax 和 $Noxa$ mRNA 相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.01$);相比动物模型组,动物低、中、高剂量实验组 $p53$ 、 $p21$ 、 Bax 和 $Noxa$ mRNA 水平均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表 3。

表 2 各组大鼠鼠双微体基因 2(MDM2)蛋白和炎症因子水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of murine double minute (2MDM2) protein and inflammatory factor levels in each group of rats ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	MDM2 protein	BALF - IL - 13 (pg · mL ⁻¹)	BALF - IL - 5 (pg · mL ⁻¹)	BALFIL - 4 (pg · mL ⁻¹)	Serum - IgE (ng · mL ⁻¹)
Animal control	10	0.65 ± 0.05	15.44 ± 1.19	34.30 ± 2.21	29.54 ± 1.67	4.38 ± 0.32
Animal model	10	0.32 ± 0.03 **	55.43 ± 3.90 **	122.78 ± 10.74 **	110.28 ± 9.91 **	43.59 ± 2.77 **
Animal experiment - L	10	0.41 ± 0.06 ##	48.79 ± 4.88 ##	102.90 ± 10.74 ##	90.67 ± 12.27 ##	38.66 ± 3.77 ##
Animal experiment - M	10	0.46 ± 0.04 ##Δ	37.25 ± 4.59 ##ΔΔ	84.31 ± 8.82 ##ΔΔ	72.00 ± 7.57 ##ΔΔ	31.73 ± 3.36 ##ΔΔ
Animal experiment - H	10	0.51 ± 0.05 ##ΔΔ&	25.64 ± 1.64 ##ΔΔ&&	63.54 ± 8.34 ##ΔΔ&&	54.45 ± 5.71 ##ΔΔ&&	25.43 ± 2.44 ##ΔΔ&&

Compared with animal control group, ** $P < 0.01$, Compared with animal model group, ## $P < 0.01$; Compared with animal experiment - L group, Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$; Compared with animal experiment - M group, & $P < 0.05$, && $P < 0.01$.

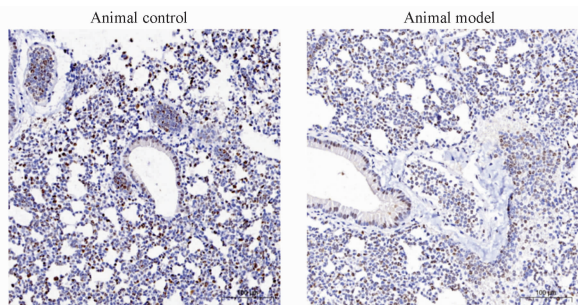


图 1 免疫组化检测鼠双微体基因 2(MDM2)在哮喘大鼠肺组织中的表达

Figure 1 Immunohistochemical detection of murine double minute (2MDM2) expression in lung tissues of asthmatic rats
Animal control group: Treated with normal saline; Animal model group: Induced by ovalbumins

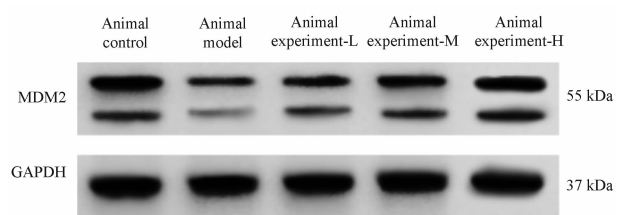


图 2 蛋白质印迹实验(WB)法检测肺组织 MDM2 蛋白相对表达

Figure 2 The relative expression levels of MDM2 protein in lung tissue was detected by Western blot (WB) experiment
Animal experiment - L group: Administered 10 mg · kg⁻¹ morin by gavage after modeling; Animal experiment - M group: Administered 30 mg · kg⁻¹ morin by gavage after modeling; Animal experiment - H group: administered 100 mg · kg⁻¹ morin by gavage after modeling.

4 桑色素上调 MDM2 减少体外细胞凋亡及 p53 下游基因表达

与细胞空白组比较,细胞模型组细胞凋亡率及 p53、p21、Bax、Noxa 相对表达水平均显著升高,MDM2 蛋白相对表达水平显著降低(均 $P < 0.01$);相比细胞模型组细胞,细胞实验组细胞凋亡率及 p53、p21、Bax、Noxa 表达水平均显著降低,MDM2 蛋白相对表达水平显著升高(均 $P < 0.01$);相比 si-NC 组细胞,si-MDM2 组细胞凋亡率及 p53、p21、Bax、Noxa 相对表达水平均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),MDM2 蛋白相对表达水平显著降低($P < 0.01$),见图 4 和表 4。

5 MDM2 泛素化调节 p53

免疫共沉淀结果显示,MDM2 与 p53 具有相互作用,见图 4。在 293 T 细胞中,过表达 MDM2 可明显增强 p53 泛素化水平,见图 5。

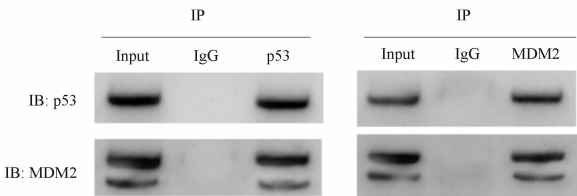


图 4 免疫共沉淀检测 MDM2 与 p53 相互作用
Figure 4 The interaction between MDM2 and p53 was detected by immunoprecipitation

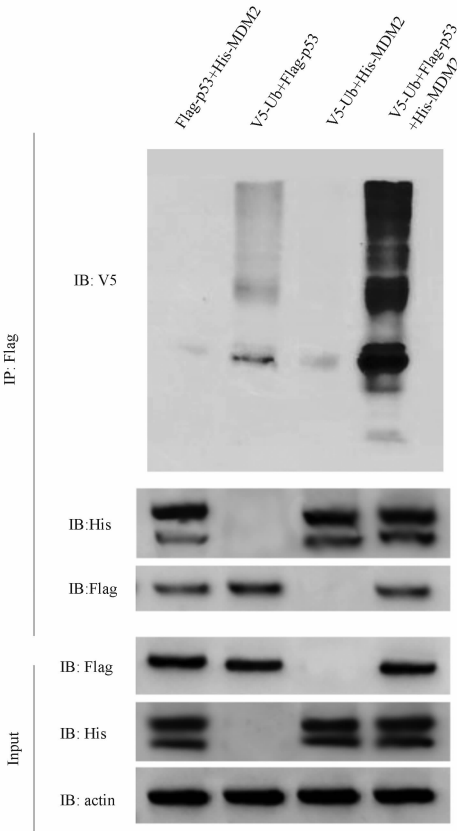


图 5 WB 法检测 MDM2 使 p53 泛素化
Figure 5 WB experiment detected that MDM2 ubiquitinated p53

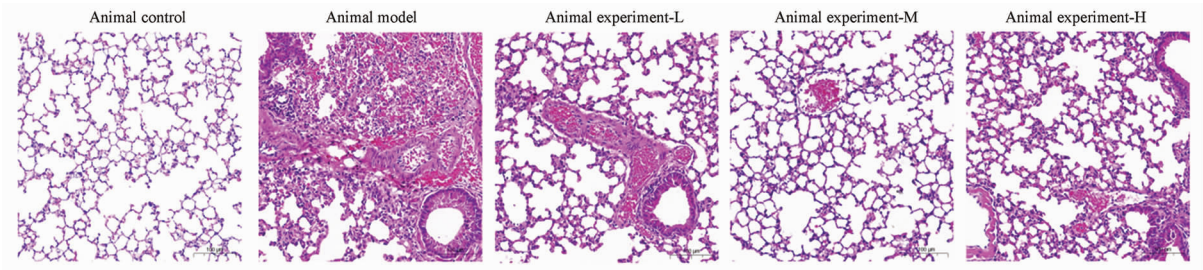


图 3 苏木精伊红(HE)染色检测各组大鼠肺组织病理学损伤(×400)
Figure 3 Detection of the pathological damage of lung tissues in each group of rats by hematoxylin eupatorium (HE) staining (×400)

表 3 各组大鼠肺组织凋亡相关基因表达的比较($\bar{x} \pm s$)

Group	p53 mRNA	p21 mRNA	Bax mRNA	Noxa mRNA
Animal control	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.13
Animal model	1.75 ± 0.13 ^{**}	1.82 ± 0.15 ^{**}	1.94 ± 0.16 ^{**}	1.55 ± 0.16 ^{**}
Animal experiment-L	1.51 ± 0.12 ^{##}	1.64 ± 0.16 [#]	1.75 ± 0.17 [#]	1.41 ± 0.09 [#]
Animal experiment-M	1.44 ± 0.09 ^{##}	1.42 ± 0.19 ^{##Δ}	1.62 ± 0.17 ^{##}	1.28 ± 0.12 ^{##Δ}
Animal experiment-H	1.24 ± 0.14 ^{###Δ&&}	1.29 ± 0.11 ^{###ΔΔ}	1.39 ± 0.09 ^{###ΔΔ&&}	1.13 ± 0.14 ^{###ΔΔ&}

Compared with animal control group, ^{**} $P < 0.01$; Compared with animal model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; Compared with animal experiment-L group, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$; Compared with animal experiment-M group, [&] $P < 0.05$, ^{&&} $P < 0.01$

表4 各组细胞凋亡率及相关基因相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)Table 4 Comparison of apoptosis rates and related gene expressions in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Tunel positive rate(%)	Protein			mRNA			
			MDM2	p53	Bax	p53	p21	Bax	Noxa
Cell blank	10	3.94 ± 0.27	0.91 ± 0.09	0.44 ± 0.05	0.22 ± 0.04	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.09
Cell model	10	31.76 ± 2.39**	0.44 ± 0.05**	0.78 ± 0.09**	0.64 ± 0.06**	2.17 ± 0.17**	1.76 ± 0.22**	1.66 ± 0.20**	1.99 ± 0.16**
Cell experimental	10	19.93 ± 1.91 ^{##}	0.66 ± 0.08 ^{##}	0.54 ± 0.05 ^{##}	0.35 ± 0.06 ^{##}	1.65 ± 0.10 ^{##}	1.42 ± 0.16 ^{##}	1.34 ± 0.14 ^{##}	1.55 ± 0.17 ^{##}
si-NC	10	18.14 ± 2.50	0.68 ± 0.05	0.51 ± 0.06	0.34 ± 0.04	1.69 ± 0.15	1.43 ± 0.15	1.32 ± 0.15	1.59 ± 0.20
si-MDM2	10	25.97 ± 1.74 ^{ΔΔ}	0.21 ± 0.04 ^{ΔΔ}	0.67 ± 0.06 ^{ΔΔ}	0.48 ± 0.10 ^{ΔΔ}	2.01 ± 0.11 ^{ΔΔ}	1.69 ± 0.14 ^{ΔΔ}	1.51 ± 0.14 ^{ΔΔ}	1.77 ± 0.12 ^Δ

Cell blank group: Without any treatment; Cell model group: 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ IL-13 treatment; Cell experimental group: 65 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Morin; si-NC group: 65 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Morin + transfected with si-NC; si-MDM2 group: 65 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Morin + transfected with si-MDM2. Compared with cell blank group,

** $P < 0.01$, Compared with cell model group, ^{##} $P < 0.01$; Compared with si-NC group, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$.

讨 论

哮喘是一种异质性疾病,以慢性气道炎症为特征,常伴有喘息、呼吸短促、胸闷等症状。近年来,尽管哮喘药物与免疫治疗策略不断丰富,但如何开发出既有效又安全的长期治疗方法,仍是当前医学研究领域亟待解决的重要课题^[15]。中医治疗通常被用作日常保健的维护或传统西医的补充治疗,中药对哮喘、特应性皮炎等疾病具有一定的治疗效果^[16-17]。桑色素是一类具有显著抗炎作用的天然黄酮类化合物,研究表明其能改善肺组织病理变化,减轻肺组织炎症反应,最近有研究报道,桑色素可有效抑制哮喘大鼠炎症反应,提示桑色素在改善哮喘气道炎症中具有较大潜力^[6, 18],但其潜在作用机制仍未被完全阐明。

在本研究中观察到,桑色素可改善 OVA 诱导大鼠肺组织炎症病理改变,同时降低模型大鼠 BALF 中 IL-13、IL-5、IL-4 及血清 IgE 水平,多个研究已经证实,在哮喘的慢性气道炎症中,2 型辅助 T 细胞(T helper 2 cell, Th)介导的免疫反应是驱动疾病发生、发展的核心病理生理过程,而 Th2 细胞分泌的 IL-4、IL-5、IL-13 则是该反应中发挥关键作用的效应分子,这 3 种细胞因子通过协同作用,分别调控气道上皮功能、炎症细胞活化与募集、气道结构重塑等环节,共同推动哮喘的典型病理特征^[19-20]。IgE 是人体内含量最低的免疫球蛋白,但具有极强的生物学活性,其产生与哮喘的 Th2 型免疫反应高度耦合,其核心驱动因素是 Th2 型免疫反应的过度激活。本研究提示,桑色素可改善过敏性哮喘大鼠炎症反应,这与前人研究^[6, 18]一致。同时,本研究结果与国内外同类研究形

成了有效呼应:既往研究证实,黄酮类化合物可通过调控 Th2 型炎症因子、降低 IgE 水平发挥抗哮喘作用^[21],本研究中桑色素对 IL-4、IL-5、IL-13 及 IgE 的抑制效应,进一步验证了黄酮类化合物在哮喘治疗中的抗炎价值,为桑色素的临床转化提供了实验依据。

MDM2 是一种 E3 泛素连接酶,能够与 100 多种蛋白质相互作用,不同的蛋白质通过与 MDM2 的特定位置结合形成复合物,这些复合物决定了 MDM2 在不同信号通路中的活性,有研究表明,调控 MDM2 介导的 IL-33 的泛素化可有效抑制 II 型肺部疾病如哮喘的炎症反应^[22],这提示,MDM2 可能是治疗哮喘的潜在靶点。本研究发现,在哮喘大鼠肺组织中,MDM2 低表达,而桑色素治疗后明显上调了 MDM2 的表达水平,提示,MDM2 可能是桑色素抑制哮喘大鼠肺部炎症的有效靶点。研究证实,p53 是与 MDM2 相互作用的主要伙伴,p53 主要功能是作为肿瘤抑制因子,抑制多种器官的肿瘤发展,p53 也是细胞生长周期中的调节因子,与细胞周期调控、细胞凋亡等途径相关,细胞凋亡主要由 p53 通过上调 p53 调控基因如 Noxa、Bax 来诱导,p53 还可以上调 p21 表达以诱导细胞周期阻滞^[23-24]。基于此本研究检测了哮喘大鼠 p53 相关下游基因表达,大鼠肺组织中 p53、p21、Bax、Noxa mRNA 水平均低表达,但桑色素治疗后这些基因表达均有不同程度的恢复;此外,体外细胞实验也观察到,抑制 MDM2 的表达可明显削弱桑色素对 16HBE 细胞凋亡及 p53 相关凋亡因子表达的抑制作用,提示,桑色素可能通过 MDM2 调控 p53 介导的凋亡稳定上皮细胞功能发挥抗炎作用。该结果与既往研究中“MDM2 通过泛素化降解 p53 调控细胞凋亡”的经典通路高度一致^[25],同时在哮喘模型中验证了该通路的抗炎效应,补充了 MDM2-p53

轴在气道上皮细胞稳态中的作用,为哮喘的靶向治疗提供了新的分子基础。本研究重点关注 p53/MDM2 通路对凋亡相关蛋白的调控,因此对 p21 仅检测了 mRNA 水平。该指标的 mRNA 变化可反映 p53 通路的转录激活趋势,但缺乏蛋白水平验证是本研究的不足,后续将完善相关实验,深入探讨 p21 在其中的作用。

MDM2 与 p53 之间的负反馈关系已被广泛报道,在应激条件下, p53 经过一系列蛋白质翻译过程后被激活,在非应激的哺乳动物细胞中, p53 通常通过持续的泛素化以及 26S 蛋白酶体系统的降解而维持在低水平^[26]。为了验证 MDM2 与 p53 的相互作用,我们检测了 MDM2 催化的 p53 泛素化,在 293T 细胞中过表达 MDM2、p53 和泛素,证实了 MDM2 能够在体外泛素化 p53,然而 293T 细胞为工具细胞,其泛素化调控特征与 16HBE 存在差异,结论外推存在一定局限性。本研究结果表明哮喘大鼠中 MDM2 的低表达可能通过减少 p53 的降解,导致 p53 在细胞内积累,从而激活下游的凋亡相关基因破坏细胞结构完整性。

综上所述,桑色素可能通过上调 MDM2 泛素化调节 p53 维持上皮细胞结构完整减轻哮喘气道炎症。

参考文献:

- [1] GBD 2021 ASTHMA AND ALLERGIC DISEASES COLLABORATORS. Global, regional, and national burden of asthma and atopic dermatitis, 1990 – 2021, and projections to 2050: A systematic analysis of the global burden of disease study 2021 [J]. *Lancet Respir Med*, 2025, 13(5):425–446.
- [2] CHETTA A, CALZETTA L. Bronchial asthma: An update [J]. *Minerva Med*, 2022, 113(1):1–3.
- [3] HASEGAWA K, CRAIG S S, TEACH S J, et al. Management of asthma exacerbations in the emergency department [J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2021, 9(7):2599–2610.
- [4] 陈丽平, 韩立, 卞华, 等. 射干麻黄汤与定喘汤治疗支气管哮喘寒热证候的药理学分析 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(16):2413–2417.
- [5] 吕宁, 张培培, 吴丽娜, 等. 桑色素的药理作用研究进展 [J]. *山东化工*, 2022, 51(16):84–88.
- [6] 陈洋洋, 马鸿琦, 杨静, 等. 桑色素调节 mTOR/STAT3 信号通路对哮喘幼年大鼠炎症反应的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2025, 41(6):1394–1400.
- [7] 王艳梅, 梁彦昌, 甘德堃, 等. 青蒿素基于 PI3K/Akt 信号通路减轻卵清蛋白哮喘大鼠的气道炎症和重塑的分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(13):114–119.
- [8] 刘婷婷. NLRP3 炎症小体介导 M2 型巨噬细胞极化在哮喘小鼠气道重塑中的作用及机制研究 [D]. 贵州 遵义:遵义医科大学, 2024.
- [9] 冉颖. 七氟烷经 $\beta 2AR - TAS2R$ 改善发育期哮喘气道损伤作用的研究 [D]. 贵州 遵义:遵义医科大学, 2024.
- [10] KODERA Y, CHIBA H, KONNO T, et al. HMGB1 – downregulated angulin – 1/LSR induces epithelial barrier disruption via claudin – 2 and cellular metabolism via AMPK in airway epithelial Calu – 3 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 527(2):553–560.
- [11] 林红, 张华, 张颖, 等. 核激素受体家族在皮肤鳞状细胞癌细胞中的表达 [J]. *皮肤病与性病*, 2021, 43(4):459–462.
- [12] 刘淑玲. 黄芩甲苷 IV 通过 SIRT1/NRF2 通路减轻 PM_{2.5} 诱导的气道上皮细胞衰老 [D]. 广东 广州:广州医科大学, 2024.
- [13] 陈洁, 林凌桑, 李思广, 等. miR – 873 通过靶向 Beclin1 基因调控细胞自噬促进支气管上皮细胞炎症与凋亡 [J]. *海南医学院学报*, 2023, 29(15):1144–1150.
- [14] 费晓斌. E3 泛素连接酶 PELI1 调控 RPS3 泛素化促进胰腺癌的增殖、侵袭和转移 [D]. 贵州 贵阳:贵州医科大学, 2024.
- [15] OLSTHOORN S E M, VAN KRIMPEN A, HENDRIKS R W, et al. Chronic inflammation in asthma: Looking beyond the Th2 cell [J/OL]. *Immunol Rev*, 2025, 330(1):e70010. 2025 – 02 – 27 [2026 – 01 – 12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40016948/>.
- [16] 尹小梅, 袁珂, 晁爽. 槐杞黄颗粒辅助治疗幼儿及学龄前儿童支气管哮喘的临床研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 3(10):1371–1375.
- [17] 陈晓丽, 郭宝仁, 王顺民. 中药调控自噬治疗哮喘研究进展 [J]. *实用中医药杂志*, 2025, 41(2):431–434.
- [18] 杨小平, 严宏, 尚蓉, 等. 桑色素对支气管哮喘小鼠炎症反应的影响及其机制 [J]. *成都医学院学报*, 2025, 20(2):207–211, 260.
- [19] 王岚, 吴琳, 宋春涵, 等. 翠云草黄酮类化合物对哮喘大鼠模型中卵清蛋白诱导的气道炎症的改善作用 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(6):2806–2812.
- [20] 王飞, 季涛云, 王亚军, 等. 咳嗽变异性哮喘患儿血清总 IgE、VEGF、IL – 4、IL – 5、IL – 13 及外周血 EOS 表达水平与临床意义 [J]. *临床肺科杂志*, 2019, 24(2):266–270.
- [21] 刘硕, 薛萍, 李小琴, 等. IgE、IL – 4、IL – 1 β 、FeNO 动态水平对小儿支气管哮喘急性发作的疗效评估价值 [J]. *中南医学科学杂志*, 2025, 53(2):338–340, 344.
- [22] 朱送玲. 维生素 B6 调控 MDM2 介导的 IL – 33 泛素化修饰抑制 II 型肺部炎症的作用机制研究 [D]. 安徽 合肥:中国科学技术大学, 2022.
- [23] GOTTLIEB T M, OREN M. p53 and apoptosis [J]. *Semin Cancer Biol*, 1998, 8(5):359–368.
- [24] ENGELAND K. Cell cycle regulation: p53 – p21 – RB signaling [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29(5):946–960.
- [25] HAUPT Y, MAYA R, KAZAZ A, et al. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53 [J]. *Nature*, 1997, 387(6630):296–299.
- [26] CHEN L, LIU S, TAO Y. Regulating tumor suppressor genes: Post – translational modifications [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1):90. (本文编辑:崔兰卿 收稿日期 2026 – 01 – 12)