

# 芥子碱通过抑制 Notch2/Notch3-Hes1 信号通路 改善哮喘小鼠肺组织炎症和黏液高分泌

唐红梅<sup>1</sup>,王孝芸<sup>1</sup>,王 剑<sup>2</sup>,张 沅<sup>1,3</sup>,王志彬<sup>1</sup>,袁谢芳<sup>1</sup>,王 星<sup>1</sup>,徐国锋<sup>1</sup>,覃 纲<sup>4</sup>,李月蛟<sup>1</sup>  
(西南医科大学附属医院<sup>1</sup> 炎症与变态反应实验室、<sup>2</sup> 健康管理中心、  
<sup>3</sup>呼吸与危重症医学科、<sup>4</sup>耳鼻喉头颈外科,泸州 646000)

**摘要** 目的 探讨芥子碱对哮喘小鼠肺组织炎症和黏液分泌的影响。方法 8周龄的雌性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照 (Control) 组、卵清蛋白 (OVA) 组、芥子碱 (Sinapine) 组和 Sinapine + OVA 组。采用 OVA + 氢氧化铝 [Al(OH)<sub>3</sub>] 混悬液腹腔注射致敏和 OVA 滴鼻激发制备哮喘小鼠模型;滴鼻前 1 h 对 Sinapine + OVA 组和 Sinapine 组小鼠腹腔注射 Sinapine 溶液, OVA 组和 Control 组小鼠给予等量 0.9% 氯化钠溶液。最后一次 OVA 滴鼻激发 24 h 后, HE 染色观察肺组织炎症情况; PAS 染色评估肺组织黏液分泌情况; 荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测肺组织白细胞介素 (IL)-4、IL-5、IL-13、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、黏蛋白 5ac (Muc5ac) 以及 Notch 通路关键基因缺口受体 (Notch) 1、Notch2、Notch3 和 hes 家族 bHLH 转录因子 1 (Hes1) mRNA 表达水平; Western blot 法检测 Notch1、Notch2、Notch3 和 Hes1 蛋白表达水平。结果 与 Control 组比较, OVA 组小鼠肺组织炎症评分和 PAS 评分升高 ( $P < 0.001$ ), IL-4、IL-5、IL-13、TNF- $\alpha$  和 Muc5ac mRNA 表达水平增加 ( $P < 0.05$ ), Notch 通路中 Notch2、Notch3 和 Hes1 的 mRNA 和蛋白表达水平升高 ( $P < 0.001$ ), 而 Notch1 mRNA 和蛋白表达水平差异无统计学意义; 与 OVA 组比较, Sinapine + OVA 组小鼠肺组织炎症评分和 PAS 评分降低 ( $P < 0.001$ ), IL-4、IL-5、IL-13、TNF- $\alpha$  和 Muc5ac mRNA 表达下降 ( $P < 0.05$ ), Notch 通路中 Notch2、Notch3 和 Hes1 的 mRNA 和蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ ), 而 Notch1 mRNA 和蛋白表达水平差异无统计学意义。结论 芥子碱可改善哮喘小鼠肺组织炎症和黏液高分泌, 其作用机制可能与抑制 Notch2/Notch3-Hes1 信号通路有关。

**关键词** 芥子碱; 哮喘; Notch 通路; 促炎细胞因子; 黏蛋白 5ac; 气道炎症; 黏液高分泌

**中图分类号** R 562.2

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2025)02-0286-07

**doi**: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.02.014

哮喘的全球患病人数已超过 3.58 亿<sup>[1]</sup>, 且呈不断上升趋势, 已严重威胁公众健康。现有治疗药物包括  $\beta_2$  受体激动剂、茶碱类、抗胆碱类和激素类, 虽能缓解症状, 但存在不良反应和停药后易复发的问題<sup>[2]</sup>。因此, 寻找安全有效的哮喘药物至关重要。芥子碱是治疗哮喘不良反应较少的中药白芥子的主要活性成分。目前, 芥子碱治疗哮喘的研究主要聚焦于不同穴位给药方式的药效学研究, 尚不清楚其治疗哮喘的分子机制。Notch 信号通路在调节哮喘炎症和黏液分泌中起着关键作用, 其抑制剂可降低哮喘小鼠肺泡灌洗液中白细胞介素 (interleukin,

IL)-4、IL-5 和 IL-13 表达并减少肺组织黏液分泌<sup>[3]</sup>; 此外, 研究<sup>[4]</sup>发现 Notch 通路下游基因 hes 家族 bHLH 转录因子 1 (hes family bHLH transcription factor 1, Hes1) 也可直接调控黏蛋白 5ac (mucin 5ac, Muc5ac) 的表达。因此, 该研究旨在探讨芥子碱是否通过调控 Notch 信号通路改善哮喘小鼠肺组织炎症和黏液高分泌, 为哮喘的治疗提供新策略。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 24 只体质量 18~22 g 的 8 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雌性小鼠购于重庆腾鑫生物有限公司, 动物使用许可证号: SYXK(川)2018-065, 饲养于西南医科大学实验动物中心 SPF 级动物房。饲养温度为 (25  $\pm$  2)  $^{\circ}$ C, 湿度为 40%~60%, 人工照明, 光照和黑暗各 12 h 循环交替, 并供给实验小鼠充足的食物和水。本研究已通过西南医科大学实验动物伦理委员会审查批准 (批准号: 20231017-031)。

**1.1.2 主要试剂与仪器** 芥子碱 (货号: HY-

2024-09-26 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 82100021); 四川省科技厅自然科学基金项目 (编号: 2022NSFSC1306); 四川省科技厅重点研发计划项目 (编号: 2022YFS0629); 西南医科大学校级科研项目 (编号: 2023QN043)

作者简介: 唐红梅, 女, 助理研究员;

李月蛟, 女, 博士, 助理研究员, 通信作者, E-mail: liyuejiao.123@163.com

N5077) 购自美国 MedChemExpress 公司, 卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) (货号: A5503) 和氢氧化铝 [Al(OH)<sub>3</sub>] (货号: 239186) 购自美国 Sigma 公司, 缺口受体 1 (notch receptor 1, Notch1) 抗体 (货号: 3608S)、Notch2 抗体 (货号: 5732S)、Hes1 抗体 (货号: 11988S) 和辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (货号: 7074S) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司, Notch3 抗体 (货号: 55114-1-AP) 和 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (货号: 10494-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司, BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号: P0012S)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (货号: P0012A) 和 RNAeasy™ 动物 RNA 抽提试剂盒 (货号: R0026) 购自上海碧云天生物技术有限公司, 高敏型 ECL 化学发光检测试剂盒 (货号: E412-01)、HiScript® III RT SuperMix for qPCR 试剂盒 (货号: R323-01) 和 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒 (货号: Q711-02) 购自南京诺维赞生物技术有限公司。梯度 PCR 仪 (型号: Mastercycler X50a) 购自德国 Eppendorf 公司, 荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR, RT-qPCR) 仪 (型号: LightCycler® 480 II) 购自瑞士 Roche 公司, 电泳仪 (型号: DYCP-31DN)、垂直电泳转印系统 (型号: Mini-Trans Blot) 和化学发光成像系统 (型号: ChemiDoc™ Touch) 购自美国 Bio-Rad 公司, 全波长酶标仪 (型号: SpectraMax® Plus384) 购自美国 Molecular Devices 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验分组与处理** 实验小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为对照 (Control) 组、OVA 组、芥子碱 (Sinapine) 组和 Sinapine + OVA 组, 每组 6 只。OVA 组和 Sinapine + OVA 组小鼠在实验第 1 天和第 8 天用 50 μg OVA 联合 2.5 mg Al(OH)<sub>3</sub> 混悬液腹腔注射致敏; 从第 15 天到第 21 天连续 7 d, OVA 组和 Sinapine + OVA 组小鼠每天 1 次用 20 μg OVA 滴鼻激发哮喘; Control 组和 Sinapine 组给予同等剂量的 0.9% 氯化钠溶液进行腹腔注射和滴鼻。Sinapine + OVA 组和 Sinapine 组小鼠在每次滴鼻前 1 h 腹腔注射 20 mg/kg Sinapine 溶液, OVA 组和 Control 组在滴鼻前 1 h 腹腔注射等量 0.9% 氯化钠溶液。

**1.2.2 HE 染色观察小鼠肺组织炎症情况** 最后一次 OVA 激发 24 h 后麻醉小鼠, 取小鼠左肺组织置于 4% 多聚甲醛中固定, 依次进行乙醇梯度脱水、

石蜡包埋、切片 (4 μm 厚) 和 HE 染色, 最后在显微镜下观察肺组织炎症情况并进行炎症评分。每只小鼠的肺组织切片选取 8 个区域, 进行炎症评分: 0 分, 无炎症细胞; 1 分, 偶见炎症细胞; 2 分, 支气管和血管周围 1~3 层炎症细胞; 3 分, 支气管和血管周围 4~5 层炎症细胞; 4 分, 支气管和血管周围 >5 层炎症细胞。计算每只小鼠的平均炎症评分。

### 1.2.3 PAS 染色评估小鼠肺组织黏液分泌情况

制备 4 μm 厚的小鼠肺组织石蜡切片, 进行 PAS 染色, 显微镜下观察黏液分泌情况。每只小鼠的肺组织切片选取 8 个区域进行 PAS 评分, 并计算平均得分以评估黏液分泌情况。PAS 评分采用半定量法: 0 分, 无 PAS 阳性杯状细胞; 1 分, PAS 阳性杯状细胞 ≤25%; 2 分, PAS 阳性杯状细胞占 >25%~50%; 3 分, PAS 阳性杯状细胞占 >50%~75%; 4 分, PAS 阳性杯状细胞 >75%。

**1.2.4 RT-qPCR 法检测小鼠肺组织中 IL-4、IL-5、IL-13、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、Muc5ac、Notch1、Notch2、Notch3 和 Hes1 mRNA 表达水平** 用动物 RNA 抽提试剂盒提取各组小鼠肺组织中总 RNA, 测定总 RNA 浓度。以 2 μg RNA 为模板, 采用 HiScript® III RT SuperMix for qPCR 试剂盒进行逆转录, 合成 cDNA。将 cDNA 作为模板, 用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行 RT-qPCR 反应。反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 10 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 10 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 为内参, 采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 IL-4、IL-5、IL-13、TNF-α、Muc5ac、Notch1、Notch2、Notch3 和 Hes1 mRNA 表达水平。以上引物序列均由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 引物序列见表 1。

**1.2.5 Western blot 法检测小鼠肺组织中 Notch1、Notch2、Notch3 和 Hes1 蛋白表达水平** 将小鼠肺组织置于已添加 1% 磷酸酶抑制剂和 1% 苯甲基磺酰氟的 RIPA 裂解液中, 低温下研磨裂解提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。取 20 μg 样品用 10% 和 12% 的 SDS-PAGE 凝胶分离蛋白, 电转至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。封闭后分别用 Notch1 抗体 (1:1 000)、Notch2 抗体 (1:1 000)、Notch3 抗体 (1:1 000)、Hes1 抗体 (1:1 000) 和内参 GAPDH 抗体 (1:10 000) 4 °C 孵育过夜, 次日再加入 HRP 标记的 IgG 抗体 (1:2 000) 于室温孵育 2 h。TBST 洗涤膜后加入 ECL 显影, 用化学发光成像系统采集蛋白条带图像, Image J 软件分析其灰度

表1 RT-qPCR 引物序列

Tab.1 Primer sequences of RT-qPCR

Gene	Primer sequence (5'-3')
GAPDH	Forward: CATCACTGCCACCCAGAAGACTG
	Reverse: ATGCCAGTGAGCTTCCCCTTCAG
IL-4	Forward: ATCATCGGCATTTTGAACGAGGTC
	Reverse: ACCTTGAAGCCCTACAGACGA
IL-5	Forward: GATGAGGCTTCCCTGTCCCTACT
	Reverse: TGACAGGTTTTTGAATAGCATTTCC
IL-13	Forward: AACGGCAGCATGGTATGGAGTG
	Reverse: TGGGTCTGTAGATGCCATTGC
TNF-α	Forward: GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT
	Reverse: GCCATAGAAGTATGAGAGGGAG
Muc5ac	Forward: CCACTTTCTCCTTCCACACC
	Reverse: GGTTGTCGATGCAGCCTTGCTT
Notch1	Forward: GCTGCCTCTTTGATGGCTTCGA
	Reverse: CACATTGGGCACTGTTACAGCC
Notch2	Forward: CCACCTGCAATGACTTCATCGG
	Reverse: TCGATGCAGGTGCCTCCATTCT
Notch3	Forward: GGTAATCACTGTGAACACGAGG
	Reverse: CAACTGTCACCAGCATAGCCAG
Hes1	Forward: GGAAATGACTGTGAAGCACCTCC
	Reverse: GAAGCGGGTCACCTCGTTCATG

值,并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/GAPDH 条带灰度值。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Tukey HSD-*t* 检验,所有数值均以  $\bar{x} \pm s$  表示。用 GraphPad Prism 8.0 进行统计图绘制, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 小鼠肺组织炎症情况** 与 Control 组比较,OVA 组小鼠支气管壁增厚,气道和血管周围可见大量炎症细胞浸润,炎症评分明显升高( $P < 0.001$ )。与 OVA 组比较,Sinapine + OVA 组小鼠肺组织气道和血管周围炎症细胞浸润明显减少,炎症评分明显降低( $P < 0.001$ )。见图 1 和表 2。

**2.2 小鼠肺组织黏液分泌情况** 与 Control 组比较,OVA 组小鼠黏液分泌明显增多,PAS 评分明显升高( $P < 0.001$ )。与 OVA 组比较,Sinapine + OVA 组小鼠黏液分泌明显减少,PAS 评分明显降低( $P < 0.001$ )。见图 2 和表 2。

**2.3 小鼠肺组织中炎症因子和黏蛋白 mRNA 表达水平** 与 Control 组比较,OVA 组小鼠肺组织中炎症因子 IL-4 ( $P < 0.001$ )、IL-5 ( $P < 0.01$ )、IL-13 ( $P < 0.05$ )、TNF-α ( $P < 0.001$ ) 和黏蛋白 Muc5ac ( $P < 0.001$ ) mRNA 表达水平明显升高。与 OVA 组比较,

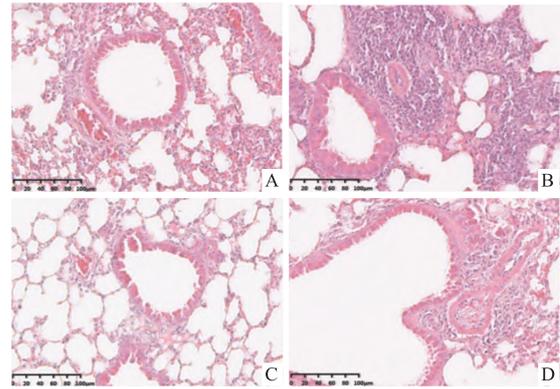


图1 各组小鼠肺组织 HE 染色结果 ×200

Fig.1 HE staining images of lung tissue in each group ×200

A: Control group; B: OVA group; C: Sinapine group; D: Sinapine + OVA group.

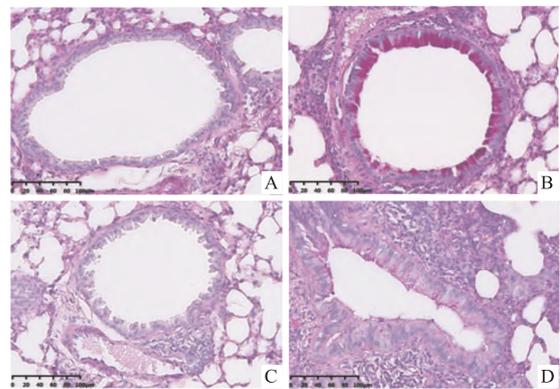


图2 各组小鼠肺组织 PAS 染色结果 ×200

Fig.2 PAS staining images of lung tissue of mice in each group ×200

A: Control group; B: OVA group; C: Sinapine group; D: Sinapine + OVA group.

表2 各组小鼠肺组织炎症评分和 PAS 评分 ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

Tab.2 Inflammation score and PAS score of lung tissue of mice in each group ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

Group	Inflammation score	PAS score
Control	0.90 ± 0.17	0.04 ± 0.06
OVA	3.58 ± 0.22***	3.00 ± 0.34***
Sinapine	0.92 ± 0.19	0.02 ± 0.05
Sinapine + OVA	1.67 ± 0.53###	1.02 ± 0.27###
F value	98.253	246.594
P value	< 0.001	< 0.001

\*\*\*  $P < 0.001$  vs Control group; ###  $P < 0.001$  vs OVA group.

Sinapine + OVA 组小鼠肺组织中 IL-4 ( $P < 0.001$ )、IL-5 ( $P < 0.01$ )、IL-13 ( $P < 0.05$ )、TNF-α ( $P < 0.05$ ) 和 Muc5ac ( $P < 0.001$ ) mRNA 表达水平显著降低。见图 3。

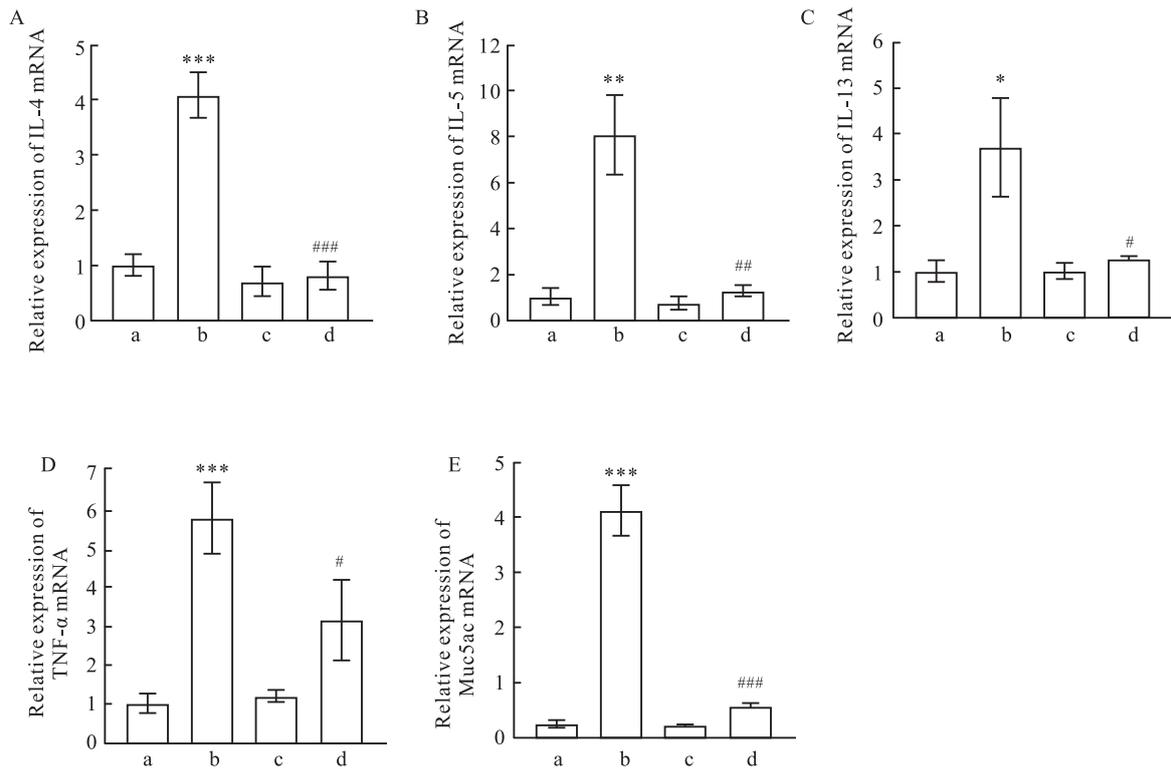


图3 各组小鼠肺组织中 IL-4、IL-5、IL-13、TNF- $\alpha$  和 Muc5ac mRNA 表达水平

Fig.3 The expression levels of IL-4, IL-5, IL-13, TNF- $\alpha$ , and Muc5ac mRNA in lung tissue of mice in each group

A: The expression levels of IL-4 mRNA in lung tissue of mice in each group; B: The expression levels of IL-5 mRNA in lung tissue of mice in each group; C: The expression levels of IL-13 mRNA in lung tissue of mice in each group; D: The expression levels of TNF- $\alpha$  mRNA in lung tissue of mice in each group; E: The expression levels of Muc5ac mRNA in lung tissue of mice in each group; a: Control group; b: OVA group; c: Sinapine group; d: Sinapine + OVA group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs Control group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  vs OVA group.

**2.4 小鼠肺组织中 Notch 信号通路关键基因 mRNA 表达水平** 与 Control 组比较, OVA 组小鼠肺组织中 Notch1 mRNA 表达水平比较差异无统计学意义, Notch2 ( $P < 0.001$ )、Notch3 ( $P < 0.001$ ) 和 Hes1 ( $P < 0.001$ ) mRNA 表达水平明显升高。与 OVA 组比较, Sinapine + OVA 组小鼠肺组织中 Notch1 mRNA 表达水平比较差异无统计学意义, Notch2 ( $P < 0.001$ )、Notch3 ( $P < 0.001$ ) 和 Hes1 ( $P < 0.01$ ) mRNA 表达水平明显降低。见图 4。

**2.5 小鼠肺组织中 Notch 信号通路关键蛋白表达水平** 与 Control 组比较, OVA 组小鼠肺组织中 Notch1 蛋白表达水平比较差异无统计学意义, 而 Notch2 ( $P < 0.001$ )、Notch3 ( $P < 0.001$ ) 和 Hes1 ( $P < 0.001$ ) 蛋白表达水平明显升高。与 OVA 组比较, Sinapine + OVA 组小鼠肺组织中 Notch1 蛋白表达水平比较差异无统计学意义, 而 Notch2 ( $P < 0.01$ )、Notch3 ( $P < 0.05$ ) 和 Hes1 ( $P < 0.001$ ) 蛋白表达水平明显降低。见图 5。

### 3 讨论

哮喘的典型特征为 Th2 细胞因子介导的炎症反应、黏液高分泌、气道高反应等。本研究中 OVA 组小鼠在 OVA 滴鼻后出现抓眼、挠鼻、打喷嚏等行为, 并且日常活动减少, 皮毛趋于粗糙。此外, 病理切片显示 OVA 组小鼠气道和血管周围有大量炎症细胞浸润, 且气道黏液分泌增加, 表明哮喘模型建模成功。药效学研究显示, 芥子碱可减轻哮喘大鼠的肺组织炎症细胞浸润<sup>[5]</sup>。本研究也发现, 芥子碱可明显减少哮喘小鼠肺组织中炎症细胞浸润和黏液分泌, 提示芥子碱可改善哮喘小鼠肺组织炎症反应和黏液高分泌, 但其具体作用机制尚不清楚。

IL-4、IL-5 和 IL-13 均为促炎性 Th2 细胞因子, 在哮喘炎症反应中起着关键作用。研究<sup>[6]</sup>显示, 哮喘小鼠肺泡灌洗液中细胞因子 IL-4、IL-5 和 IL-13 含量升高, 且支气管周围炎性细胞浸润严重。此外, TNF- $\alpha$  作为嗜酸性粒细胞和中性粒细胞趋化因子,

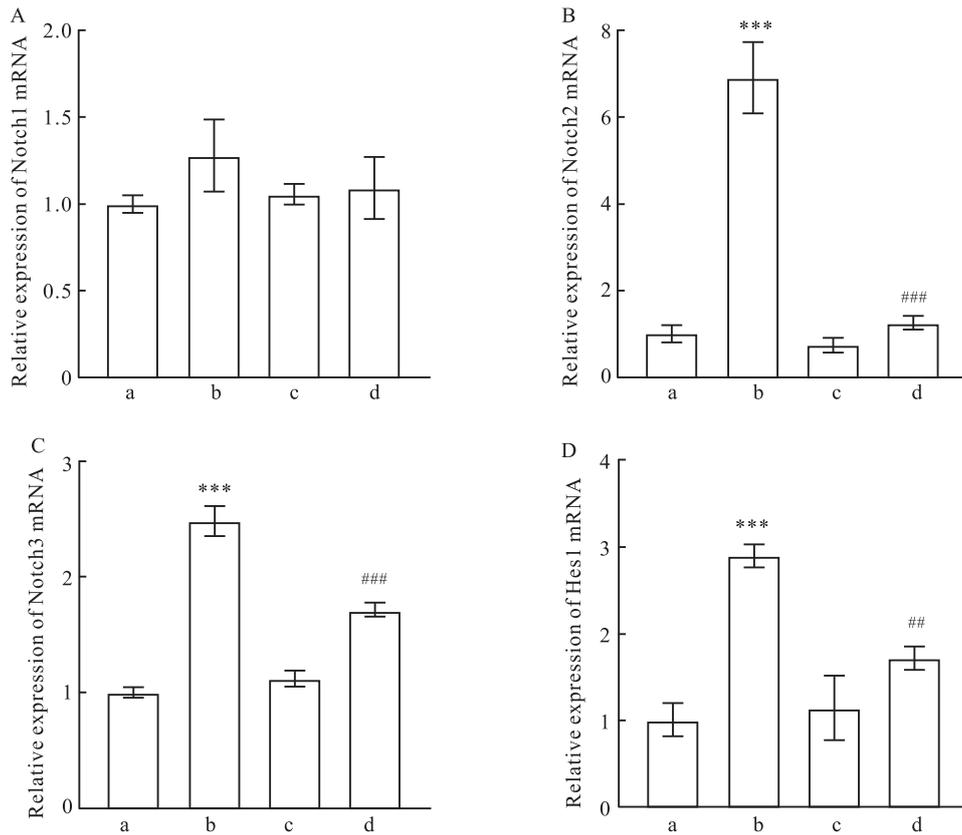


图4 各组小鼠肺组织中 Notch1、Notch2、Notch3 和 Hes1 mRNA 表达水平

Fig. 4 The expression levels of Notch1, Notch2, Notch3, and Hes1 mRNA in lung tissue of mice in each group

A: The expression levels of Notch1 mRNA in lung tissue of mice in each group; B: The expression levels of Notch2 mRNA in lung tissue of mice in each group; C: The expression levels of Notch3 mRNA in lung tissue of mice in each group; D: The expression levels of Hes1 mRNA in lung tissue of mice in each group; a: Control group; b: OVA group; c: Sinapine group; d: Sinapine + OVA group; \*\*\*  $P < 0.001$  vs Control group; ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  vs OVA group.

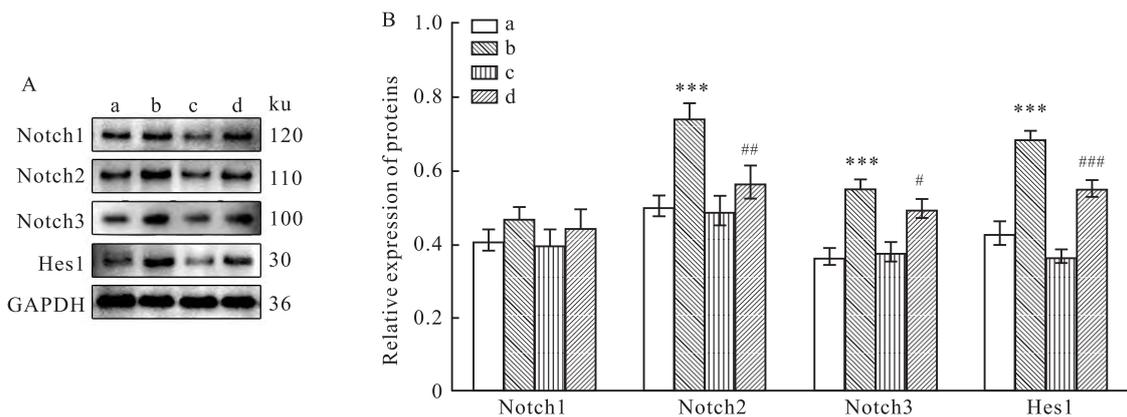


图5 各组小鼠肺组织中 Notch1、Notch2、Notch3 和 Hes1 蛋白表达水平

Fig. 5 The expression levels of Notch1, Notch2, Notch3, and Hes1 proteins in lung tissue of mice in each group

A: Western blot results; B: Relative expression of Notch1, Notch2, Notch3, and Hes1 proteins in lung tissue of mice in each group; a: Control group; b: OVA group; c: Sinapine group; d: Sinapine + OVA group; \*\*\*  $P < 0.001$  vs Control group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  vs OVA group.

其增加也将导致哮喘气道炎症加重<sup>[7]</sup>。但是,目前尚不明确芥子碱对上述促炎因子的影响。本研究结

果显示,芥子碱干预可降低哮喘小鼠肺组织中 IL-4、IL-5、IL-13 和 TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平,表明芥子碱

可通过减少哮喘小鼠肺组织中 IL-4、IL-5、IL-13 和 TNF- $\alpha$  的表达减轻炎症反应。Muc5ac 是哮喘发作时气道黏液中的主要黏蛋白,其高表达将导致哮喘黏液高分泌。本研究结果显示,OVA 组小鼠肺组织中 Muc5ac mRNA 表达水平明显升高,芥子碱干预后哮喘小鼠肺组织中 Muc5ac mRNA 表达水平显著降低,提示芥子碱可通过减少哮喘小鼠肺组织中 Muc5ac 表达减轻气道黏液高分泌。然而,芥子碱改善哮喘肺组织炎症反应和黏液高分泌的机制尚不清楚。

Notch 通路可调控免疫细胞的分化、增殖和发育,参与免疫信号的传递,在先天免疫和炎症中起着重要的作用。研究发现,哮喘小鼠肺组织中 Notch2 表达水平增加而 Notch1 表达水平无差异<sup>[8]</sup>,Notch 通路下游靶基因 Hes1 表达水平也升高<sup>[9]</sup>。此外,研究<sup>[10]</sup>显示 Notch3 可通过促进气道上皮杯状细胞的分化来增加气道黏液分泌。因此推测,Notch2、Notch3 和 Hes1 可能在哮喘肺组织炎症和黏液高分泌中起着关键作用。另有文献<sup>[11]</sup>报道,同时敲除 Notch1 和 Notch2 基因可明显降低哮喘小鼠中 IL-4、IL-5 和 IL-13 的表达,减轻肺组织炎症反应。并且,单独抑制 Notch2 表达可降低哮喘小鼠肺组织中 Muc5ac 的含量<sup>[8]</sup>,抑制 Notch3 可减少哮喘患者肺上皮细胞中 Muc5ac 的产生<sup>[12]</sup>。最新研究<sup>[4]</sup>也发现,Hes1 可通过结合 Muc5ac 的启动子区域直接调控 Muc5ac 的表达。上述研究提示,抑制 Notch 通路的 Notch1、Notch2、Notch3 和 Hes1 均有可能改善哮喘肺组织炎症和黏液高分泌。本研究结果显示,OVA 组小鼠肺组织中 Notch2、Notch3 和 Hes1 mRNA 与蛋白表达水平明显升高,Notch1 mRNA 与蛋白表达水平差异无统计学意义;芥子碱干预后明显抑制哮喘小鼠肺组织中 Notch2、Notch3 和 Hes1 的表达,而对 Notch1 表达无影响。提示芥子碱可能通过抑制 Notch2/Notch3-Hes1 信号通路改善哮喘肺组织炎症反应和黏液高分泌。

综上所述,芥子碱能减轻哮喘小鼠肺组织中炎症细胞浸润和黏液分泌,减少促炎因子 IL-4、IL-5、IL-13 和 TNF- $\alpha$  以及黏蛋白 Muc5ac mRNA 的表达,并降低 Notch2、Notch3 和 Hes1 mRNA 以及蛋白的表达。表明,芥子碱可以改善哮喘小鼠肺组织炎症和黏液高分泌,其机制可能与抑制 Notch2/Notch3-Hes1 信号通路有关。本研究为哮喘的治疗提供了新思路,但具体作用机制需进一步结合细胞和临床实验进行探讨。

## 参考文献

- [1] Adam I F, Alomary S A, Althagafi W A. The global asthma report 2022[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2022, 26 (Supp 1): 1 - 104. doi:10.5588/ijtld.22.1010.
- [2] Peters M C, Wenzel S E. Intersection of biology and therapeutics: type 2 targeted therapeutics for adult asthma[J]. Lancet, 2020, 395(10221): 371 - 83. doi:10.1016/S0140-6736(19)33005-3.
- [3] Tong Y, Wang L, Wang L, et al. Allergen immunotherapy combined with Notch pathway inhibitors improves HDM-induced allergic airway inflammation and inhibits ILC2 activation[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1264071. doi:10.3389/fimmu.2023.1264071.
- [4] Marui S, Nishikawa Y, Shiokawa M, et al. Context-dependent roles of Hes1 in the adult pancreas and pancreatic tumor formation[J]. Gastroenterology, 2022, 163(6): 1613 - 29. doi:10.1053/j.gastro.2022.08.048.
- [5] 石佳楠, 宋信莉, 刘兴德, 等. 芥子碱硫氰酸盐可溶性微针穴位给药抗支气管哮喘的药效学研究[J]. 中国药房, 2022, 33(22): 2728 - 32. doi:10.6039/j.issn.1001-0408.2022.22.08.
- [5] Shi J N, Song X L, Liu X D, et al. Pharmacodynamic study of sinapine thiocyanate dissolvable microneedle for acupoint administration against bronchial asthma[J]. China Pharm, 2022, 33(22): 2728 - 32. doi:10.6039/j.issn.1001-0408.2022.22.08.
- [6] 范慧慧, 任玉梅, 田新磊, 等. 麻黄碱调控 TGF- $\beta$ 1/Smads 通路对支气管哮喘小鼠气道重塑的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(8): 1398 - 404. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.016.
- [6] Fan H H, Ren Y M, Tian X L, et al. Effect of ephedrine on airway remodeling in bronchial asthma mice by regulating TGF- $\beta$ 1/Smads pathway[J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59(8): 1398 - 404. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.016.
- [7] Liu X, Yu Y, Wu Y, et al. A systematic pharmacology-based *in vivo* study to reveal the effective mechanism of Yupingfeng in asthma treatment[J]. Phytomedicine, 2023, 114: 154783. doi:10.1016/j.phymed.2023.154783.
- [8] Wuniquemu T, Teng F, Qin J, et al. Iristectorigenin A exerts novel protective properties against airway inflammation and mucus hypersecretion in OVA-induced asthmatic mice: iristectorigenin A ameliorates asthma phenotype[J]. Phytomedicine, 2022, 104: 154252. doi:10.1016/j.phymed.2022.154252.
- [9] Wang Z, Li L, Wang C, et al. Recombinant pyrin domain protein attenuates airway inflammation and alleviates epithelial-mesenchymal transition by inhibiting crosstalk between TGF $\beta$ 1 and Notch1 signaling in chronic asthmatic mice[J]. Front Physiol, 2020, 11: 559470. doi:10.3389/fphys.2020.559470.
- [10] Liu Y, Zhou L, Wu H, et al. Role of Notch signaling pathway in Muc5ac secretion induced by atmospheric PM<sub>2.5</sub> in rats[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2022, 229: 113052. doi:10.1016/j.ecoenv.2021.113052.

- [11] Tindemans I, Van Schoonhoven A, KleinJan A, et al. Notch signaling licenses allergic airway inflammation by promoting Th2 cell lymph node egress[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(7): 3576–91. doi:10.1172/JCI128310.
- [12] Reid A T, Nichol K S, Veerati P C, et al. Blocking Notch3 signaling abolishes Muc5ac production in airway epithelial cells from individuals with asthma[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2020, 62(4): 513–23. doi:10.1165/rcmb.2019-00690C.

## Sinapine alleviates lung tissue inflammation and mucus hypersecretion in asthmatic mice by inhibiting Notch2/Notch3-Hes1 signal pathway

Tang Hongmei<sup>1</sup>, Wang Xiaoyun<sup>1</sup>, Wang Jian<sup>2</sup>, Zhang Yun<sup>1,3</sup>, Wang Zhibin<sup>1</sup>,  
Yuan Xiefang<sup>1</sup>, Wang Xing<sup>1</sup>, Xu Guofeng<sup>1</sup>, Qin Gang<sup>4</sup>, Li Yuejiao<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>*Inflammation and Allergic Diseases Research Unit*, <sup>2</sup>*Health Management Center*,

<sup>3</sup>*Dept of Respiratory and Critical Care Medicine*, <sup>4</sup>*Dept of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000)

**Abstract Objective** To investigate the effects of sinapine on lung tissue inflammation and mucus hypersecretion in asthmatic mice. **Methods** Eight-week-old female C57BL/6J mice were randomly divided into Control group, ovalbumin (OVA) group, Sinapine group, and Sinapine + OVA group. The asthmatic mice model were established by intraperitoneal injection of OVA combined with aluminum hydroxide [Al(OH)<sub>3</sub>] suspension and OVA nasal stimulation. One hour before OVA nasal stimulation, the mice in Sinapine + OVA group and Sinapine group were intraperitoneally injected with sinapine solution, and the mice in OVA group and Control group were treated with the same dose of 0.9% sodium chloride solution. 24 hours after the last OVA stimulation, the inflammation of lung tissue of mice were observed by HE staining; the mucus secretion were evaluated by PAS staining; the mRNA expression levels of Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5), Interleukin-13 (IL-13), tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), Mucin 5ac (Muc5ac), and the mRNA of the key genes of Notch pathway such as Notch receptor 1 (Notch1), Notch receptor 2 (Notch2), Notch receptor 3 (Notch3), and hes family bHLH transcription factor 1 (Hes1) in lung tissues were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR); the expression levels of Notch1, Notch2, Notch3 and Hes1 proteins were determined by Western blot. **Results** Compared with Control group, the inflammation score and PAS score of lung tissues of mice in OVA group increased ( $P < 0.001$ ); the mRNA expression levels of IL-4, IL-5, IL-13, TNF-α, and Muc5ac of mice in OVA group were enhanced ( $P < 0.05$ ); the mRNA and protein expression levels of Notch2, Notch3, and Hes1 of mice in OVA group significantly increased ( $P < 0.001$ ), while there was no significant difference in the mRNA and protein expression levels of Notch1. Compared with OVA group, the inflammation score and PAS score of lung tissues of mice in Sinapine + OVA group decreased ( $P < 0.001$ ); the mRNA expression levels of IL-4, IL-5, IL-13, TNF-α, and Muc5ac of mice in Sinapine + OVA group were reduced ( $P < 0.05$ ); the mRNA and protein expression levels of Notch2, Notch3, and Hes1 of mice in Sinapine + OVA group were downregulated ( $P < 0.05$ ), while there was no significant difference in the mRNA and protein expression levels of Notch1. **Conclusion** Sinapine can alleviate the lung tissue inflammation and mucus hypersecretion in asthmatic mice, and its mechanism may be related to the inhibition of Notch2/Notch3-Hes1 signal pathway.

**Key words** sinapine; asthma; Notch pathway; proinflammatory cytokine; Muc5ac; airway inflammation; mucus hypersecretion

**Fund programs** National Natural Science Foundation of China (No. 82100021); Natural Science Foundation of Sichuan Provincial Department of Science and Technology (No. 2022NSFSC1306); Key Research and Development Program of Sichuan Provincial Department of Science and Technology (No. 2022YFS0629); Scientific Research Project of Southwest Medical University (No. 2023QN043)

**Corresponding author** Li Yuejiao, E-mail: liyuejiao.123@163.com