

枇杷叶提取物对卵清蛋白诱导的哮喘小鼠气道炎症和气道重塑的影响

胡蔚¹, 李岚^{2*} (1.中国科学院大学宁波华美医院, 浙江 宁波 315010; 2.浙江中医药大学附属第一医院, 杭州 310006)

摘要: 目的 探究枇杷叶提取物对哮喘小鼠的治疗效果。方法 60只BALB/c小鼠随机分为6组,空白组,模型组,枇杷叶提取物低、中、高剂量组(50, 100, 150 mg·kg⁻¹),地塞米松组(0.5 mg·kg⁻¹,阳性对照)。卵清蛋白(ovalbumin, OVA)诱导哮喘小鼠模型,各组小鼠分别灌胃给予相应药物。末次OVA造模后24 h吸入乙酰甲胆碱溶液检测小鼠气道高反应性。瑞氏-吉姆萨染色分类计数支气管肺泡灌洗液中炎症细胞数;ELISA检测Eotaxin、IL-4、IL-5、IL-13和OVA特异性IgE(OVA-specific IgE, OVA-sIgE)的水平;HE和AB-PAS染色观察小鼠肺组织的病理学改变;Western blotting检测肺组织中AKT、p-AKT、PI3K、Cyclin D1的蛋白表达。**结果** 枇杷叶提取物(100, 150 mg·kg⁻¹)能有效减少炎性细胞包括嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞的数量;降低Eotaxin、IL-4、IL-5、IL-13和OVA-sIgE的表达水平;抑制哮喘小鼠肺组织炎症细胞的浸润和黏液分泌;抑制哮喘模型中AKT、p-AKT、PI3K、Cyclin D1的蛋白表达。**结论** 枇杷叶提取物对OVA诱导的哮喘气道炎症有良好的抑制效果,可为枇杷叶治疗哮喘的研究提供参考。

关键词: 枇杷叶提取物;哮喘;气道炎症;气道重塑;Th2型细胞因子

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)01-0020-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.01.004

引用本文: 胡蔚, 李岚. 枇杷叶提取物对卵清蛋白诱导的哮喘小鼠气道炎症和气道重塑的影响[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(1): 20-27.

Effects of Loquat Leaf Extract on Airway Inflammation and Airway Remodeling Induced by Ovalbumin in Asthmatic Mice

HU Wei¹, LI Lan^{2*} (1.Hwa Mei Hospital, University of Chinese Academy of Science, Ningbo 315010, China; 2.The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the therapeutic effect of Loquat leaf extract on asthma mice model. **METHODS** Sixty BALB/c mice were randomly divided into 6 groups, blank group, model group, Loquat leaf extract low, medium and high dose groups(50, 100, 150 mg·kg⁻¹), dexamethasone group(0.5 mg·kg⁻¹, positive control). Ovalbumin(OVA) induced asthma mouse model, each group of mice were gavaged with corresponding drugs. The airway hyperresponsiveness of mice was detected 24 h after the last OVA modelling. The number of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid was counted by Wright-Giemsa staining classification. The levels of Eotaxin, IL-4, IL-5, IL-13 and OVA-specific IgE(OVA-sIgE) were detected by ELISA. HE and AB-PAS staining were used to observe the pathological changes of mice lung tissue. Western blotting was used to detect the expression of AKT, p-AKT, PI3K and Cyclin D1 in lung tissue. **RESULTS** Loquat leaf extract(100, 150 mg·kg⁻¹) could effectively reduce the number of inflammatory cells including eosinophils, macrophages, lymphocytes, and neutrophils; reduce the expression levels of Eotaxin, IL-4, IL-5, IL-13 and OVA-sIgE; inhibit the infiltration and mucus secretion of inflammatory cells in the lung tissue of asthmatic mice; inhibit the protein expression of AKT, p-AKT, PI3K and Cyclin D1 in asthma models. **CONCLUSION** Loquat leaf extract has a good inhibitory effect on OVA-induced airway inflammation in asthma, which can provide a reference for the study of Loquat leaf in the treatment of asthma.

KEYWORDS: Loquat leaf extract; asthma; airway inflammation; airway remodeling; Th2 cytokines

枇杷叶为蔷薇科枇杷属植物枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.的干燥叶,为中国传统医学常用中草药,始载于《名医别录》,味苦,性微寒,归肺、胃二经,可润肺止咳、降逆止呕、气逆喘急,药用历史悠久^[1]。枇杷叶在临床常用于治疗急慢性呼吸道疾病如支气管哮喘、支气管炎、

咳嗽等,现代药理研究发现枇杷叶中含有丰富的挥发油、萜类、黄酮类、酚酸类、糖苷类等活性成分,具有抗炎、止咳、平喘、增强机体免疫等广泛的药理活性^[2-3]。此外,动物实验研究发现枇杷叶水提取物较醇提取物有更好的止咳化痰平喘效果^[4]。

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY15H270006)

作者简介: 胡蔚,女,主管中药师 Tel: (0574)83870838 E-mail: qiuqiyuan222@163.com *通信作者: 李岚,女,博士,副教授,副主任中医师 Tel: (0571)86620265 E-mail: lilan99hz@163.com

哮喘是一种慢性气道疾病,其特征主要表现为气道高反应性、气道炎症和气道重塑。2014 年世界卫生组织调查结果显示全球约有 3 亿人患有哮喘,儿童的哮喘发病率在 3.3%~29%^[5]。Th2 型细胞因子在气道炎症中起着关键作用,哮喘发作时, Th2 细胞过量释放 IL-4、IL-5、IL-13 等促炎因子,会介导一些病理反应,如促进炎症细胞嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、肥大细胞的活化增殖以及血清卵清蛋白(ovalbumin, OVA)特异性 IgE (OVA-specific IgE, OVA-sIgE)水平的升高^[6]。而 PI3K/AKT 信号通路能够抑制炎症反应和嗜酸性肺浸润,改善气道高反应性及气道重塑,与哮喘的疾病进展联系密切^[7-8]。枇杷叶在防治哮喘方面有着长久的临床有效经验,但是目前关于枇杷叶对于哮喘的相关实验研究则相对较少。本研究旨在探讨枇杷叶提取物对哮喘的治疗作用及可能机制,通过建立 OVA 诱导的哮喘小鼠模型探讨枇杷叶提取物对哮喘小鼠气道炎症和气道重塑的影响。

1 材料

1.1 枇杷叶提取物的制备

枇杷叶购自浙江中医药大学中药饮片厂,由浙江中医药大学药学院副教授周桂芬鉴定为蔷薇科植物枇杷 [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.] 的干燥叶,清洗晒干后备用。称取一定量粉碎过的枇杷叶,100 °C 蒸馏水煎煮 2 次,每次 1.5 h,纱布过滤后合并滤液,利用旋转蒸发仪减压浓缩后即得枇杷叶提取物,真空干燥后备用^[4]。

1.2 动物

BALB/c 小鼠,♀♂各半,体质量 18~20 g,购自上海斯莱克动物实验有限公司,动物生产许可证号: SCXK(沪)2017-0015,饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心,实验动物使用许可证号: SYXK(浙)2018-0012。动物饲养环境为温度 (23±3)°C,湿度 50%~70%,12 h 间隔明暗光照交替,自由进食饮水。

1.3 药品与试剂

OVA(美国 Sigma 公司,批号: A6303-08F);地塞米松(上海源叶生物科技有限公司,批号: H03N5S43119); Eotaxin、IL-4、IL-5、IL-13、IgE ELISA 试剂盒(批号分别为 201904,201903,201903,201903,201908)均购自江苏酶免实业有限公司; AKT、p-AKT、PI3K、Cyclin D1、 β -actin 抗体(批号分别为 6, 2, 3, 10, 4)均购自美国 CST 公司。

1.4 仪器

CMax Plus 酶标仪(Thermo Scientific); AE2000 倒置荧光显微镜(MOTIC); EMKA-WBP 动物肺功能检测系统(法国 EMKA); VE 180C 电泳槽、VE186 转膜仪均来自上海天能科技有限公司。

2 方法

2.1 慢性哮喘模型建立

60 只 BALB/c 小鼠适应性喂养 1 周后随机分为 6 组,每组 10 只,分别为空白组,模型组,枇杷叶提取物低、中、高剂量组,地塞米松组(阳性对照)。用 4%的氢氧化铝凝胶配制质量浓度为 2 mg·mL⁻¹的 OVA 溶液。除空白组外,其余各组所有小鼠均在实验第 1 天两后足、腹股沟、背部皮下、颈部皮下及腹腔注射 OVA 共计每只 0.5 mL。致敏第 14 天,腹腔注射 0.2 mL 含 OVA 的氢氧化铝凝胶加强致敏。第 23 天开始雾化吸入 10 mg·mL⁻¹ OVA 生理盐水溶液 30 min,每周 3 次,连续 8 周。空白组在相同时间点给予等量生理盐水注射。

2.2 分组及给药

小鼠致敏第 23 天,枇杷叶提取物各给药组每天灌胃给予药物,如有 OVA 造模,则造模前 1 h 灌胃给予药物,连续 8 周。参照相关文献^[9],枇杷叶提取物低、中、高剂量组的给药剂量分别为 50, 100, 150 mg·kg⁻¹。地塞米松组每周给药 3 次,连续 8 周,给药剂量为 0.5 mg·kg⁻¹。空白组和模型组灌胃等体积生理盐水。

2.3 小鼠气道高反应性测定

小鼠末次 OVA 造模后 24 h,将清醒状态的小鼠放入肺功能检测系统,待小鼠呼吸稳定后,依次吸入生理盐水,6.25, 12.5, 25, 50, 100 mg·mL⁻¹ 乙酰甲胆碱溶液 50 μ L。记录小鼠肺动态顺应性和气道阻力。

2.4 样本收集

小鼠末次 OVA 造模后 24 h,10%水合氯醛麻醉小鼠,气管插管,结扎左肺上叶,行肺泡灌洗得支气管肺泡灌洗液(BALF)。BALF 离心,上清液置于-80 °C冻存备用,沉淀用于细胞计数。心脏采血,离心取上清液,冻存备用。肺泡灌洗之后,取右肺组织于 4%多聚甲醛中固定,左肺组织置于液氮冻存,备用。

2.5 炎性细胞计数

BALF 经离心后的沉淀用于细胞涂片瑞氏-吉姆萨染色分类计数细胞总数、嗜酸性粒细胞、巨

噬细胞、淋巴细胞和中性粒细胞数。

2.6 促炎因子及 IgE 水平检测

采用 ELISA 参照相关试剂盒说明测定 BALF 中 Eotaxin、IL-4、IL-5、IL-13 的含量和血清中 OVA-sIgE 的水平。

2.7 HE 和 AB-PAS 染色

取右肺组织，4%多聚甲醛固定，脱水包埋，切片，分别行 HE 染色，观察气道周围炎症细胞的浸润情况，AB-PAS 染色观察黏液分泌情况测定小鼠杯状细胞增生。

2.8 Western blotting 测定蛋白相对表达

取冻存的肺组织，剪碎匀浆后加入适量 RIPA 裂解液，冰浴 10 min 后离心收集上清液，参照 BCA 试剂盒说明测定总蛋白浓度。取 50 μg 蛋白样品，在 SDS-PAGE 进行电泳，电泳结束后转 PVDF 膜，5%脱脂牛奶封闭膜 1 h，用 TBST 洗涤 3 次。随后，用相应一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜：抗体 AKT (1 : 2 000)、p-AKT(1 : 2 000)、PI3K(1 : 1 000)、Cyclin D1(1 : 1 000)、 β -actin(1 : 1 000)。随后用 TBST 洗涤 3 次后，在室温下将膜进一步与 5%脱脂奶粉封闭液稀释的二抗一起室温下孵育 1 h。最后将膜取出，TBST 洗膜 3 次后 ECL 显色，拍照，FluorChen E 型凝胶成像仪扫描成像，图像分析系统 Image J 计算各条带灰度值，以 β -actin 作内参。

2.9 统计学方法

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 19.0 进行统计学分析，采用 One-way ANOVA 进行方差检验，方差齐时采用 t 检验，方差不齐时采用 Games-Howell 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 枇杷叶提取物对气道高反应性的影响

为了探讨枇杷叶提取物对 OVA 致过敏哮喘小鼠气道高反应性的影响，通过吸入不同剂量的乙酰甲胆碱来检测各组小鼠的肺顺应性和气道阻力。结果表明，OVA 致过敏哮喘后，小鼠的肺顺应性与空白组相比显著减弱($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。但是给予枇杷叶提取物治疗后，与模型组相比，枇杷叶提取物高剂量组的小鼠在吸入 25, 50, 100 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的乙酰甲胆碱条件下肺顺应性得到显著提高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，中剂量组在吸入 50 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的乙酰甲胆碱条件下能有效提高肺顺应性($P < 0.05$)，低剂量组与模型组相比效果不显著。哮喘模型组的小鼠气道阻力与空白组相比显

著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，而给予枇杷叶提取物高剂量治疗后，与模型组相比，小鼠气道阻力有效降低，且在吸入 25, 50, 100 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的乙酰甲胆碱浓度下差异具有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。给予阳性药物地塞米松治疗后，与模型组相比，肺顺应性和气道阻力均得到显著改善($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，但仍未恢复至正常水平。结果见图 1。

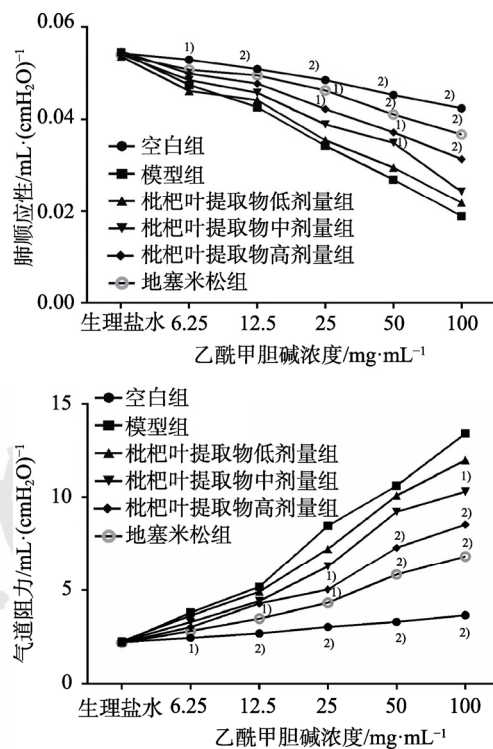


图1 枇杷叶提取物对OVA致过敏哮喘小鼠气道高反应性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

与模型组相比, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ 。

Fig. 1 Effect of Loquat leaf extract on airway hyperreactivity in OVA induced allergic asthma mice($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Compared with the model group, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$.

3.2 枇杷叶提取物对BALF中炎性细胞数量的影响

各组BALF中炎性细胞结果显示，OVA处理后与空白组相比，可显著增加小鼠BALF中炎性细胞总数、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和中性粒细胞数($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，而枇杷叶提取物低、中、高剂量治疗后可不同程度地降低炎性细胞的数量。且枇杷叶提取物中剂量组的炎性细胞总数、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞和中性粒细胞数量与模型组相比显著降低($P < 0.05$)，枇杷叶提取物高剂量组的炎性细胞总数、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和中性粒细胞数量与模型组相比均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见图2。

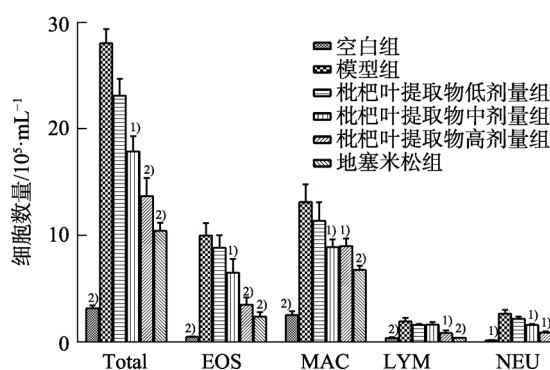


图2 各组小鼠BALF中炎症细胞计数($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Total-炎性细胞总数; EOS-嗜酸性粒细胞; MAC-巨噬细胞; LYM-淋巴细胞; NEU-中性粒细胞数; 与模型组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。
Fig. 2 Number of inflammatory cells in each group of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Total-total number of inflammatory cells; EOS-eosinophil; MAC-macrophage; LYM-lymphocyte; NEU-neutrophil; compared with the model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

3.3 枇杷叶提取物对BALF中细胞因子水平的影响

哮喘气道炎症与促炎因子的过量产生有关,因此采用ELISA检测枇杷叶提取物对OVA所致哮喘的小鼠BALF中Th2型促炎因子水平的影响。与空白组相比,OVA造模后的小鼠BALF中IL-4、IL-5、IL-13、Eotaxin水平显著升高($P<0.01$)。但

是升高的促炎因子IL-5、IL-13、Eotaxin的水平在枇杷叶提取物中、高剂量组显著降低,IL-4的水平在枇杷叶提取物高剂量组显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图3。

3.4 枇杷叶提取物对血清OVA-sIgE的影响

哮喘所导致的气道炎症与IgE的产生有密切的联系,因此检测枇杷叶提取物对血清中OVA-sIgE的影响。OVA处理后的模型组OVA-sIgE水平与空白组相比显著增加,差异倍数达2倍以上($P<0.01$)。枇杷叶提取物中剂量能显著降低OVA处理所增加的IgE水平($P<0.05$),而枇杷叶提取物高剂量组能极显著降低哮喘小鼠的IgE水平($P<0.01$)。结果见图4。

3.5 枇杷叶提取物对OVA致哮喘小鼠肺部炎症细胞浸润的影响

为了进一步探究枇杷叶提取物对哮喘气道炎症的影响,采用HE染色观察药物治疗对肺部组织的病理学改变。与空白组相比,OVA诱发的哮喘模型组肺组织结构明显受损,气道皮层增厚,可观察到大量炎性细胞聚集、浸润到支气管和血管周围,与“3.2”项下检测到模型组炎性细胞数量大量增加相一致;与模型组相比,枇杷叶提取物

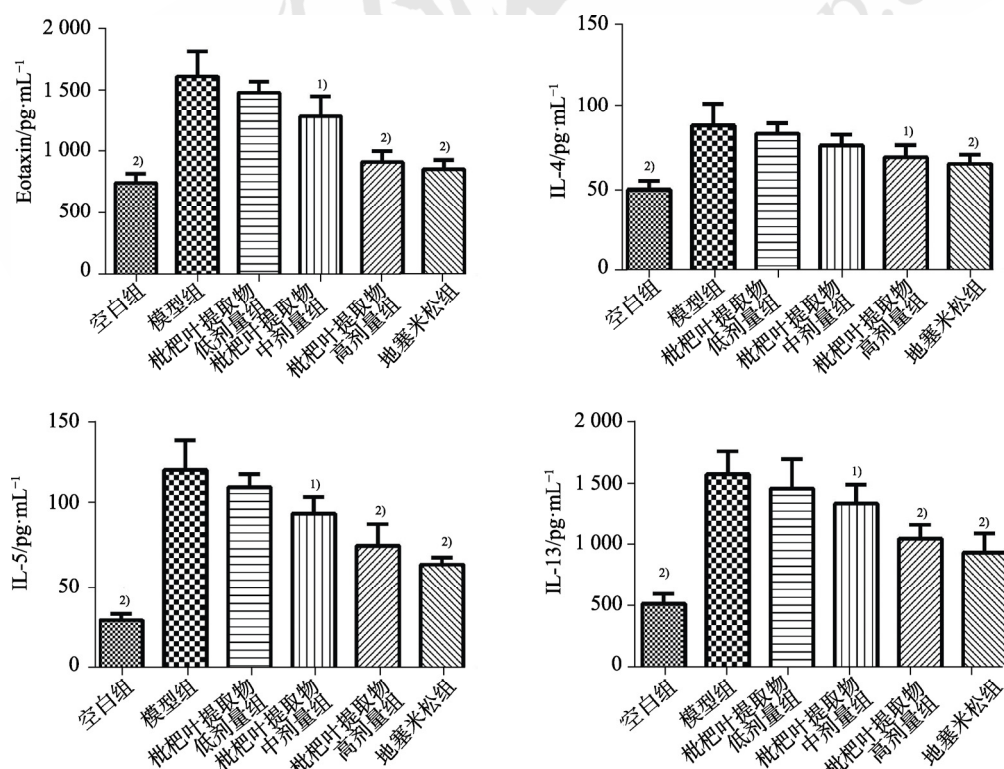


图3 枇杷叶提取物对小鼠BALF中Eotaxin、IL-4、IL-5、IL-13水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
与模型组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effect of Loquat leaf extract on Eotaxin, IL-4, IL-5, IL-13 levels in BALF of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Compared with the model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

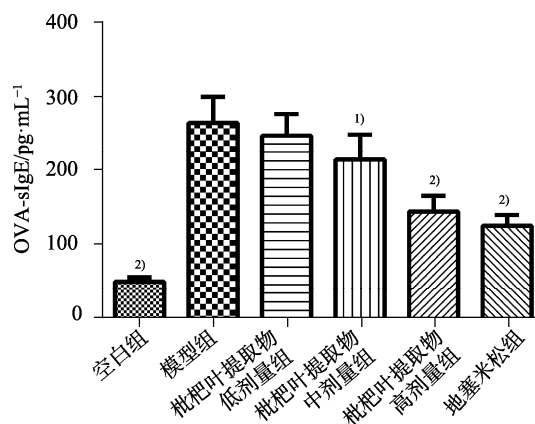


图 4 枇杷叶提取物对小鼠血清 OVA-sIgE 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

与模型组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effect of Loquat leaf extract on OVA-sIgE levels in serum of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Compared with the model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

中、高剂量组和地塞米松组可有效降低炎症细胞的数量,改善炎症浸润,对气道皮层增厚也有一定的抑制效果。对各组炎性细胞浸润至肺组织进行的评分结果也与上述描述一致,枇杷叶提取物中、高剂量组和地塞米松组的炎症评分与模型组相比均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图 5。

3.6 枇杷叶提取物对 OVA 致哮喘小鼠肺部杯状细胞增生和黏液分泌的影响

肺部组织同样行 AB-PAS 染色观察药物处理对 OVA 致哮喘小鼠肺部杯状细胞增生和黏液分泌

的影响。与空白组相比,模型组的肺组织可观察到杯状细胞过度增生并伴有肥大,黏液分泌增加。而枇杷叶提取物中、高剂量对杯状细胞增生肥大有很好的抑制效果,同时也能显著抑制黏液分泌($P<0.05$)。结果见图 6。

3.7 枇杷叶提取物对 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达的影响

Western blotting 检测了枇杷叶提取物对 PI3K/AKT 通路相关蛋白 AKT、p-AKT、PI3K、Cyclin D1 表达的影响。OVA 诱导的模型组 p-AKT、PI3K、Cyclin D1 蛋白表达水平与空白组相比显著增加($P<0.01$)。而枇杷叶提取物药物治疗后 p-AKT、PI3K、Cyclin D1 蛋白表达水平有不同程度的降低,中剂量组的 p-AKT、PI3K、Cyclin D1 蛋白表达水平以及高剂量组的 Cyclin D1 蛋白表达水平与模型组相比有显著差异($P<0.05$),高剂量组的 p-AKT、PI3K 的蛋白表达水平与模型组相比有极显著差异($P<0.01$)。结果见图 7。

4 讨论

哮喘,又称为支气管哮喘,临床表现以胸闷、喘息、咳嗽和呼吸困难为主要症状,是一种常见的慢性呼吸系统疾病。哮喘的发病受多种因素影响,其中环境污染、吸烟、过敏、遗传因素、肥胖等是诱发哮喘的主要危险因素。目前,吸入糖皮质激素被推荐作为哮喘的一线治疗药物,可明

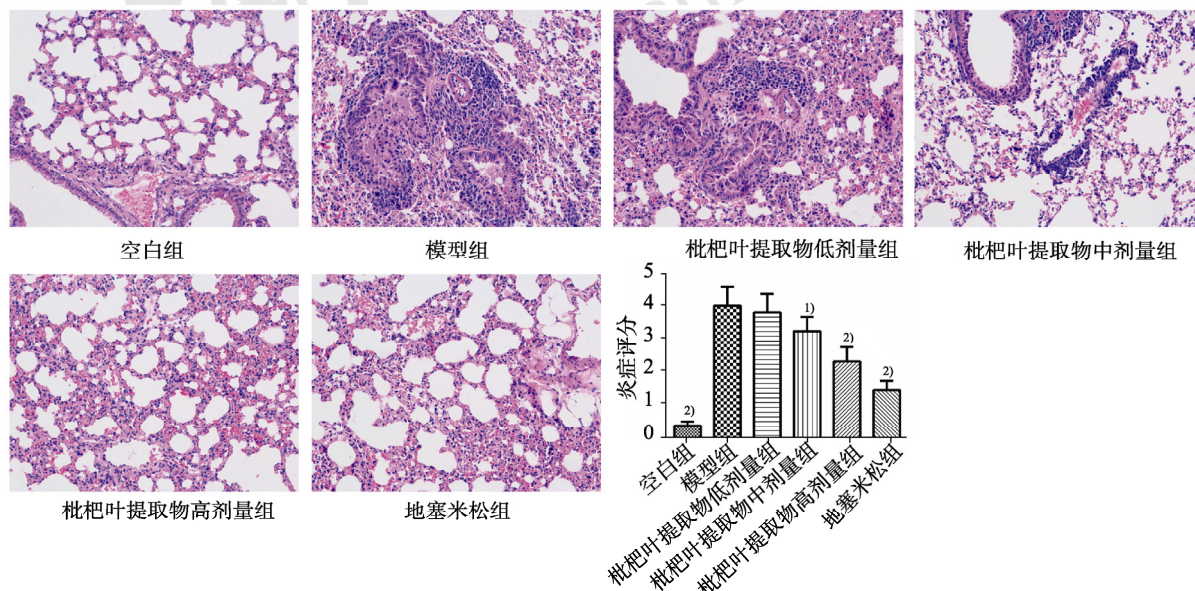


图 5 枇杷叶提取物对哮喘小鼠肺部炎症细胞浸润的影响(HE, 200×)

与模型组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 5 Effect of Loquat leaf extract on lung inflammatory cells infiltration in asthma mice(HE, 200×)

Compared with the model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

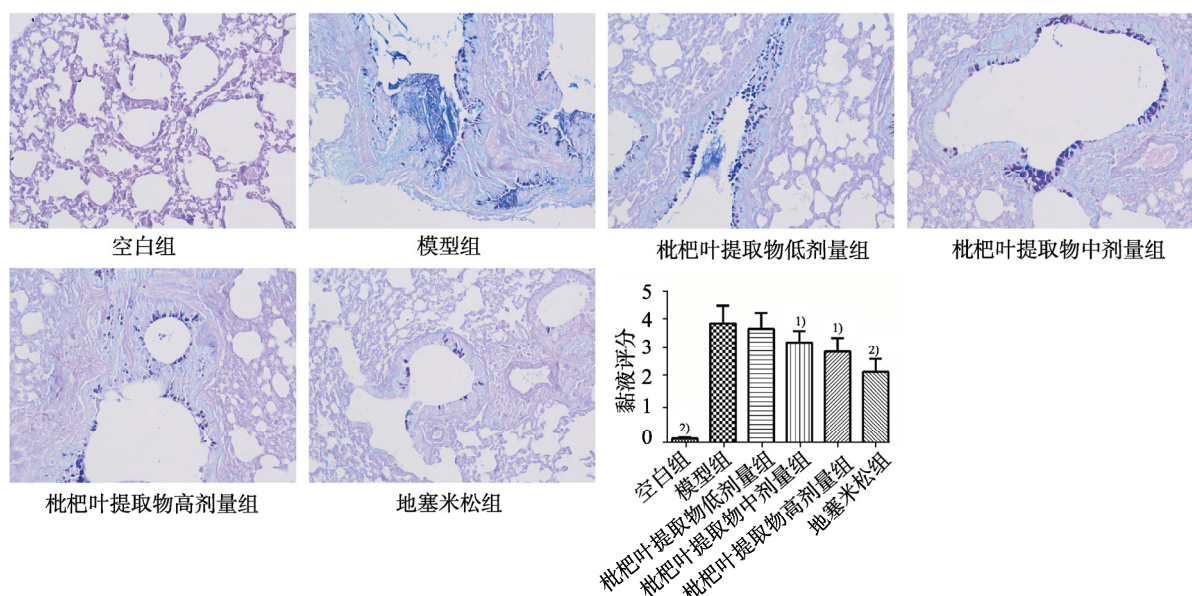


图 6 枇杷叶提取物对哮喘小鼠肺部黏液分泌的影响(AB-PAS, 200×)

与模型组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 6 Effect of Loquat leaf extract on lung mucus secretion in asthma mice(AB-PAS, 200×)

Compared with the model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

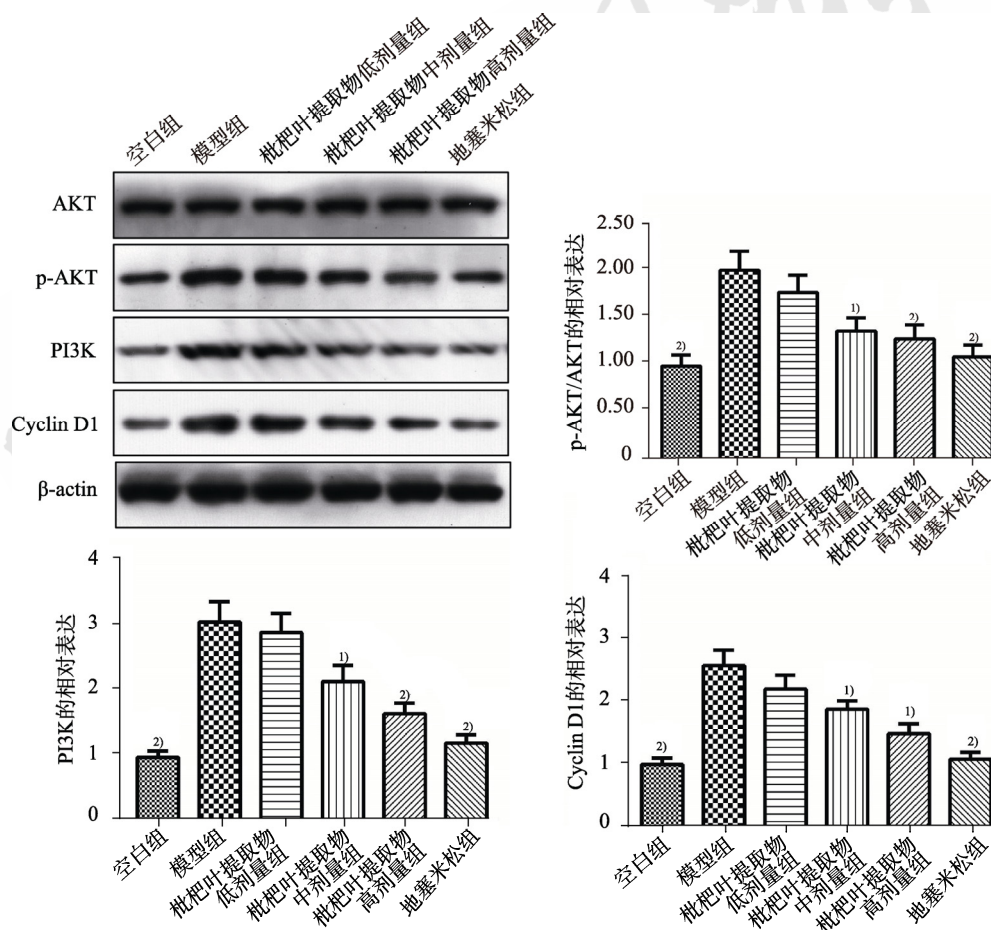


图 7 枇杷叶提取物对 PI3K/AKT 通路的影响

与模型组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 7 Effect of Loquat leaf extract on PI3K/AKT signaling pathway

Compared with the model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

显改善哮喘患者症状,降低气道高反应性,但是长期大量使用糖皮质激素也会导致激素依赖和诸多不良反应,且儿童哮喘患者长期服用会对生长发育造成一定影响^[10]。因此,选择合适有效的药物是哮喘治疗的发展方向。

哮喘发作时,机体会产生炎症反应,导致嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等多种炎症细胞的活化和向炎症部位的募集浸润,释放炎症介质损伤气道上皮细胞,加重气道炎症反应。其中关键的效应细胞为嗜酸性粒细胞,研究发现血清中嗜酸性粒细胞炎症是哮喘的独立关联因素,其高计数与哮喘发作风险和恶化程度相关,在气道炎症和气道重塑中发挥重要作用^[11]。而嗜酸性粒细胞趋化因子 Eotaxin 可以促进调节嗜酸性粒细胞向气道炎症部位的运输和募集,并通过配体途径激活嗜酸性粒细胞,促进气道炎症进展^[12]。此外,哮喘疾病的进展也与 Th1/Th2 细胞因子失衡有着密切的联系。Th1 型细胞因子包括 TNF- α 、IFN- γ ; Th2 型细胞因子包括 IL-4、IL-5、IL-13 等,在哮喘过程中, Th2 型细胞因子的产生占主导地位。IL-4 是驱动免疫球蛋白转化为 IgE 所必需的,而 IL-5 是嗜酸性粒细胞增多所必需的,这些细胞因子是引起哮喘炎症反应和气道损伤的重要因子^[6]。在哮喘患者中,可观察到 Th2 细胞的数量明显增加,且与气道嗜酸性粒细胞增多的严重程度密切相关^[13]。研究发现在大鼠过敏性皮炎模型中,枇杷叶提取物给药可显著降低损伤皮肤中 Th2 型细胞因子 IL-4 水平,增加 IL-10 水平,同时逆转较低水平的 Th1 型细胞因子 IFN- γ 和 IL-2,调节 Th1/Th2 免疫平衡,同时还能够降低损伤皮肤中 IgE 的水平,从而改善大鼠过敏性皮炎^[14]。枇杷叶提取物还可以改善白血病毒(MuLV)诱导的免疫缺陷 LP-BM5 鼠模型中 Th1/Th2 细胞因子的失衡,抑制 T 细胞、B 细胞的增殖和促炎因子的产生^[15]。

本研究中, OVA 诱导的哮喘小鼠 BALF 中炎症细胞总数和嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞的数量均显著增加, BALF 中的 Eotaxin、IL-4、IL-5、IL-13 和血清中的 IgE 处于高表达水平,病理染色也发现支气管周围有大量炎性细胞的聚集和浸润,表明 OVA 攻击诱导了哮喘小鼠模型的建立,引发了哮喘小鼠的气道炎症。而枇杷叶提取物给药治疗后,实验结果显示中剂量组和高剂量组能显著降低嗜酸性粒细胞等炎症

细胞的数量,降低 OVA 诱导的哮喘小鼠 IgE 和 BALF 中 Eotaxin、Th2 型细胞因子的表达水平, HE 染色也提示枇杷叶提取物对肺部炎症细胞浸润的抑制作用。表明枇杷叶提取物可通过抑制炎性细胞浸润、调节 Th1/Th2 型细胞因子的表达水平,降低 IgE 的水平,发挥对哮喘小鼠气道炎症的改善效果。

气道炎症还可能导致气道结构的变化,包括气道平滑肌厚度增加,细胞黏液分泌增加,气道上皮纤维化和血管生成,导致气道重塑。谢强敏等^[16]研究发现枇杷膏对致敏豚鼠抗原攻击后引起的肺阻力增加和动态肺顺应性降低有抑制效果,有松弛气道平滑肌和支气管扩张的作用。本研究中, OVA 诱导的哮喘小鼠吸入不同剂量的乙酰甲胆碱实验显示,哮喘小鼠的肺顺应性降低和气道阻力增加,表现出气道高反应性;病理染色也提示气道皮层增厚,杯状细胞增生和细胞黏液分泌的增加,表明 OVA 攻击诱导哮喘小鼠模型建立引发了哮喘小鼠的气道重塑及气道高反应性。而枇杷叶提取物给药治疗后,实验结果显示中剂量组和高剂量组肺顺应性和气道阻力均得到改善, AB-PAS 染色也提示枇杷叶提取物对肺部杯状细胞增生及黏液分泌的抑制作用,表明枇杷叶提取物对哮喘引发的气道重塑也有一定的改善效果。

最近的研究表明, PI3K/AKT 信号通路及下游信号因子在慢性炎症中炎症介质的表达和活化,炎症细胞募集,免疫细胞功能,气道重塑和皮质类固醇不敏感中起着至关重要的作用。来自动物模型,原代细胞和其他疾病临床研究的数据表明, PI3K/Akt 抑制剂可作为潜在的治疗炎症性呼吸系统疾病包括哮喘的新疗法^[17]。气管内给予 PI3K 抑制剂 LY294002 能显著抑制 OVA 诱导的哮喘 BALF 中炎症细胞总数和嗜酸性细胞数的增多,降低 IL-5、IL-13 的水平,抑制气道黏液的产生和气道高反应性^[18]。此外, PI3K/AKT 通路还参与 T 细胞和 B 细胞的活化,可通过 PI3K-Akt-NF- κ B 信号途径调节 T 细胞 IL-4 和 IL-12 的应答来进一步调控 Th1/Th2 平衡^[19]。研究发现枇杷叶提取物中的总黄酮可以通过调节 IRS-1/Akt 和 CYP2E1/JNK 途径减轻 PM 2.5 诱导的非酒精性脂肪肝损伤^[20]。枇杷叶中的主要活性成分熊果酸能够抑制瘦素诱导的大鼠 HSC-T6 细胞 PI3K 的蛋白表达和 AKT、P38MAPK 蛋白磷酸化,且抑制效果与 LY294002

无显著差异^[21]。本实验中, OVA 诱导的哮喘模型中可观察到 PI3K/AKT 信号通过相关蛋白的表达与空白组相比显著增加, 而枇杷叶提取物给药治疗后能一定程度抑制 PI3K/AKT 信号相关蛋白的表达, 表明枇杷叶提取物可能是通过调控 PI3K/AKT 途径发挥对哮喘的治疗作用。

综上所述, 枇杷叶提取物可通过改善气道高反应, 减少炎症细胞数量和浸润, 调节 Th1/Th2 型细胞因子和 IgE 的生成, 抑制杯状细胞增生和细胞黏液分泌来改善 OVA 致哮喘小鼠的气道炎症和气道重塑, 且其作用机制可能与对 PI3K/AKT 信号通路的调控有关。

REFERENCES

- [1] XIAO S X, WANG H H, RUAN H S. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of Pipaye (*Eriobotryae Folium*)[J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm(中医药导报), 2019, 25(21): 60-66.
- [2] SONG X, WANG T T, YANG X D, et al. Purification and hypoglycemic effect of *Eriobotrya japonica* leaves extract containing corosolic acid[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2017, 26(2): 214-219.
- [3] LIU Y L, ZHANG W N, XU C J, et al. Biological activities of extracts from loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.): A review[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(12): 1983.
- [4] YE G Y, LI S Y, CHEN Y F, et al. Comparative study of different extracts of Loquat leaf in antitussive and expectorant and antiasthmatic effects[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床), 2013, 29(2): 100-102.
- [5] HORAK F, DOBERER D, EBER E, et al. Diagnosis and management of asthma-statement on the 2015 GINA Guidelines[J]. Wien Klin Wochenschr, 2016, 128(15/16): 541-554.
- [6] TAN H T, SUGITA K, AKDIS C A. Novel biologicals for the treatment of allergic diseases and asthma[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2016, 16(10): 70.
- [7] CHENG C, HO W E, GOH F Y, et al. Anti-malarial drug artesunate attenuates experimental allergic asthma via inhibition of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway[J]. PLoS One, 2011, 6(6): e20932.
- [8] ZOU W J, DING F X, NIU C, et al. Brg1 aggravates airway inflammation in asthma via inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(4): 3212-3218.
- [9] 朱敏芳, 张捷, 冯丽, 等. 枇杷叶提取物对中性粒细胞弹性蛋白酶的抑制作用[J]. 中成药, 2017, 39(1): 177-180.
- [10] WU R, MIAO M S, LI X M. Association rules for traditional Chinese medicine treating allergic asthma on data mining[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(17): 2183-2186.
- [11] MOGENSEN I, ALVING K, JACINTO T, et al. Simultaneously elevated FeNO and blood eosinophils relate to asthma morbidity in asthmatics from NHANES 2007-12[J]. Clin Exp Allergy, 2018, 48(8): 935-943.
- [12] GARCIA G, GODOT V, HUMBERT M. New chemokine targets for asthma therapy[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2005, 5(2): 155-160.
- [13] BRIGHTLING C E, SYMON F A, BIRRING S S, et al. TH2 cytokine expression in bronchoalveolar lavage fluid T lymphocytes and bronchial submucosa is a feature of asthma and eosinophilic bronchitis[J]. J Allergy Clin Immunol, 2002, 110(6): 899-905.
- [14] SUN G, LIU Y, ZHU J, et al. Immunomodulatory effect of *Eriobotrya japonica* seed extract on allergic dermatitis rats[J]. J Nutr Sci Vitaminol(Tokyo), 2010, 56(2): 145-149.
- [15] KIM O K, NAM D E, JUN W, et al. Effects of standardized *Eriobotrya japonica* extract in LP-BM5 murine leukemia viruses-induced murine immunodeficiency syndrome[J]. Immunol Investig, 2016, 45(2): 148-160.
- [16] XIE Q M, SHEN W H, CHEN J Q, et al. Effect of Liangyuan Pipagao on bronchoconstriction and inflammation in the sensitized Guinea pig[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2002, 19(6): 454-456.
- [17] ITO K, CARAMORI G, ADCOCK I M. Therapeutic potential of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in inflammatory respiratory disease[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2007, 321(1): 1-8.
- [18] DUAN W, AGUINALDO DATILES A M K, LEUNG B P, et al. An anti-inflammatory role for a phosphoinositide 3-kinase inhibitor LY294002 in a mouse asthma model[J]. Int Immunopharmacol, 2005, 5(3): 495-502.
- [19] WU X, GOWDA N M, KAWASAWA Y I, et al. a malaria protein factor induces IL-4 production by dendritic cells via PI3K-Akt-NF- κ B signaling independent of MyD88/TRIF and promotes Th2 response[J]. J Biol Chem, 2018, 293(27): 10425-10434.
- [20] JIAN T Y, DING X Q, WU Y X, et al. Hepatoprotective effect of loquat leaf flavonoids in PM_{2.5}-induced non-alcoholic fatty liver disease via regulation of IRS-1/Akt and CYP2E1/JNK pathways[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 3005.
- [21] SHI F, HE W H, ZHU X, et al. Effects of ursolic acid(UA) on NADPH oxidase(NOX) subunit and its regulation on downstream signaling pathways in rat activated hepatic stellate cells(HSC)[J]. Fudan Univ J Med Sci(复旦学报: 医学版), 2014, 41(3): 328-334, 339.

收稿日期: 2020-02-24
(本文责编: 沈倩)