

鼠尾草酚通过调控 TAK1 活性影响慢性阻塞性肺疾病小鼠的炎症反应

吴玉^{1,4}, 欧国春², 阿的曲古¹, 李兴玲³, 蔡竹清⁴, 王述红², 黄玉芳², 邱容²

(1. 川北医学院临床医学院, 四川 南充 637000; 2. 遂宁市中心医院呼吸与危重症医学科, 四川 遂宁 629000; 3. 西南医科大学附属医院呼吸与危重症医学科, 四川 泸州 646000; 4. 遂宁市中心医院全科医学科, 四川 遂宁 629000)

【摘要】目的: 探讨鼠尾草酚对慢性阻塞性肺疾病(COPD)小鼠肺部炎症反应及肺纤维化的影响, 验证其是否通过调控 TAK1 活性发挥作用。**方法:** 将 30 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为正常对照组、COPD 模型组、鼠尾草酚低剂量组(2.5 mg/kg)、鼠尾草酚高剂量组(5 mg/kg)及地塞米松阳性对照组(1 mg/kg), 每组各 6 只。采用脂多糖(LPS)气管滴注、香烟烟熏联合香烟烟雾提取物(CSE)腹腔注射法构建 COPD 小鼠模型, 建模同时给予相应药物干预, 连续 7 d。末次给药 24 h 后, 收集血清、支气管肺泡灌洗液(BALF)及肺组织, HE 染色观察肺组织病理损伤, Masson 染色检测肺组织胶原沉积, ELISA 检测血清及 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 水平, Western blot 检测肺组织 p-TAK1、p-P38、p-P65、p-JNK 和 I κ B α 蛋白表达, RT-qPCR 检测 TAK1 mRNA 表达。**结果:** 与正常对照组比较, COPD 模型组小鼠肺组织病理损伤严重、炎症细胞大量浸润、胶原纤维显著沉积, 肺泡平均截距(MLI)变长($P < 0.001$), 血清及 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 水平升高($P < 0.001$), 肺组织 p-TAK1、p-P38、p-P65、p-JNK 蛋白及 TAK1 mRNA 表达水平升高($P < 0.001$), I κ B α 蛋白表达水平降低($P < 0.001$)。与模型组比较, 低剂量鼠尾草酚可改善肺组织病理损伤, 减少炎症细胞浸润, 减轻胶原沉积($P < 0.05$), MLI 变短($P < 0.05$), 血清及 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 水平无明显变化($P > 0.05$), p-TAK1、p-P38 蛋白表达水平下降($P < 0.01$), I κ B α 蛋白表达水平升高($P < 0.01$), p-JNK、p-P65 蛋白表达水平无统计学差异($P > 0.05$), TAK1 mRNA 表达水平下调($P < 0.01$); 高剂量鼠尾草酚组进一步改善肺组织病理损伤, 减少炎症细胞浸润, 减轻胶原沉积($P < 0.001$), MLI 进一步变短($P < 0.001$), 血清及 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 水平下降($P < 0.05$), p-TAK1、p-JNK、p-P38、p-P65 蛋白表达水平下降($P < 0.01$), I κ B α 蛋白表达水平升高($P < 0.001$), TAK1 的 mRNA 水平下调($P < 0.001$)。与低剂量鼠尾草酚组相比, 高剂量鼠尾草酚组肺部病理损伤更轻, 炎症细胞浸润不明显, 胶原沉积更少($P < 0.01$), MLI 更短($P < 0.05$), 血清及 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 水平无统计学差异($P > 0.05$), p-TAK1、p-P38、p-P65 蛋白表达水平下降($P < 0.05$), p-JNK、I κ B α 蛋白表达水平无统计学差异($P > 0.05$), TAK1 的 mRNA 水平下调($P < 0.001$); 地塞米松组改善肺组织病理损伤, 减少炎症细胞浸润及胶原沉积, 降低促炎因子水平, 抑制 TAK1 活性及下游 NF- κ B/MAPK 通路活化的效果与高剂量鼠尾草酚组相当, 两组 MLI 和 TAK1 mRNA 水平无统计学差异($P > 0.05$)。**结论:** 鼠尾草酚可通过抑制 TAK1 的转录水平及磷酸化活性, 阻断下游 NF- κ B/MAPK 通路传导, 剂量依赖性减轻 COPD 小鼠肺部炎症反应及肺纤维化, 改善肺组织病理损伤。

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病; 鼠尾草酚; TAK1; NF- κ B; MAPK

【中图分类号】 R563 **【文献标志码】** A

Carnosol influences the inflammatory response in mice suffering from chronic obstructive pulmonary disease through the regulation of TAK1 activity

WU Yu^{1,4}, OU Guo-chun², A Di-qu-gu¹, LI Xing-ling³, CAI Zhu-qing⁴, WANG Shu-hong², HUANG Yu-fang², QIU Rong²

(1. Clinical Medical College, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000; 2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Suining Central Hospital, Suining 629000; 3. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000; 4. Department of General Practice, Suining Central Hospital, Suining 629000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of carnosol on pulmonary inflammation and fibrosis in a murine model of

chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and to elucidate whether these effects are mediated through the regulation of TAK1 activity. **Methods:** 30 male C57BL/6 mice were randomly allocated into five groups: normal control, COPD model, low-dose carnosol (2.5 mg/kg), high-dose carnosol (5 mg/kg), and dexamethasone positive control (1 mg/kg), with 6 mice in each group. The COPD model was established through intratracheal lipopolysaccharide (LPS) instillation combined with cigarette smoke exposure and intraperitoneal injection of cigarette smoke extract (CSE). Modeling was accompanied by drug intervention, which was administered over a consecutive 7-day period. 24 hours following the final administration, serum, bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and lung tissues were collected. Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to evaluate pulmonary histopathological changes, while Masson's trichrome staining was utilized to assess collagen deposition. Serum and BALF levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blot analysis was conducted to determine the protein expression levels of phosphorylated TAK1 (p-TAK1), phosphorylated P38 (p-P38), phosphorylated P65 (p-P65), phosphorylated c-Jun N-terminal kinase (p-JNK), and inhibitor of NF- κ B α (I κ B α) in lung tissues. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was employed to measure TAK1 mRNA expression. **Results:** Compared with the normal control group, the COPD model group exhibited severe pulmonary histopathological damage characterized by massive inflammatory cell infiltration and substantial collagen fiber deposition, and an increase in mean linear intercept (MLI) ($P < 0.001$). Serum and BALF levels of TNF- α and IL-1 β were elevated ($P < 0.001$). Furthermore, the protein expression levels of p-TAK1, p-P38, p-P65, and p-JNK, along with the TAK1 mRNA expression in lung tissues, were upregulated ($P < 0.001$). Meanwhile, the I κ B α protein expression was down-regulated ($P < 0.001$). Compared with the model group, low-dose carnosol attenuated histopathological injury in lung tissue, suppressed inflammatory cell infiltration, and mitigated collagen deposition ($P < 0.05$), the MLI was reduced ($P < 0.05$). No significant differences were observed in the concentrations of TNF- α and IL-1 β in serum or BALF ($P > 0.05$). At the protein level, p-TAK1 and p-P38 was downregulated ($P < 0.01$), whereas I κ B α expression was upregulated ($P < 0.01$). In contrast, no statistically significant changes were detected in the p-JNK or p-P65 ($P > 0.05$), the mRNA expression level of TAK1 was down-regulated ($P < 0.01$). In the high-dose carnosol group, histopathological lung injury, inflammatory cell infiltration, and collagen deposition were further attenuated ($P < 0.001$), and MLI was further decreased ($P < 0.001$). TNF- α and IL-1 β levels in both serum and BALF were lowered ($P < 0.05$). The levels of p-TAK1, p-JNK, p-P38, and p-P65 were all downregulated ($P < 0.01$), I κ B α protein expression was further enhanced ($P < 0.001$), and TAK1 mRNA expression was markedly suppressed ($P < 0.001$). Relative to the low-dose carnosol group, the high-dose group exhibited significantly milder histopathological alterations, less pronounced inflammatory infiltration, and reduced collagen accumulation ($P < 0.01$), along with a shorter MLI ($P < 0.05$). No intergroup differences were observed in serum or BALF TNF- α and IL-1 β levels ($P > 0.05$). The levels of p-TAK1, p-P38 and p-P65 were further diminished ($P < 0.05$), there was no difference in the expression levels of p-JNK and total I κ B α protein ($P > 0.05$). TAK1 mRNA expression was also lower in the high-dose group ($P < 0.001$). The dexamethasone group demonstrated therapeutic efficacy comparable to that of the high-dose carnosol group across all major endpoints—including attenuation of lung histopathology, suppression of inflammation and fibrosis, reduction of systemic and local pro-inflammatory cytokines, and inhibition of TAK1 activation and downstream NF- κ B/MAPK signaling. There was no statistically significant difference in the levels of MLI and TAK1 mRNA between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion:** Carnosol dose-dependently attenuates pulmonary inflammation and fibrosis in COPD mice by inhibiting TAK1 transcription and phosphorylation, consequently blocking the downstream NF- κ B/MAPK signaling cascade and ameliorating pulmonary histopathological damage.

【Key words】 Chronic obstructive pulmonary disease; Carnosol; TAK1; NF- κ B; MAPK

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种以持续性气流受限为核心特征、呈进行性发展的慢性炎症性肺部疾病, 其全球发病率与死亡率持续攀升, 给社会医疗资源及患者家庭带来沉重负担^[1-3]。当前临床治疗以支气管扩张剂、糖皮质激素等对症支持治疗为主, 难以逆转气道重塑及炎症进展, 研发靶向 COPD 关键病理机制的新型药物, 对改善患者预后具有重要临床意义^[4-5]。

相关研究^[6-7]证实 COPD 的病理进程与气道

及肺实质慢性炎症失衡、气道重塑密切相关, NF- κ B/MAPK 信号通路的异常激活是介导炎症因子大量释放、推动炎症反应级联放大的核心机制。鼠尾草酚是一种从鼠尾草属植物中提取的天然多酚类化合物, 具有显著的抗炎、抗氧化活性, 已有研究^[8-9]证实其可通过阻断 NF- κ B/MAPK 通路的磷酸化级联反应发挥抗炎效应。转化生长因子 β 激活激酶 1 (TGF- β -activated kinase 1, TAK1) 作为 NF- κ B/MAPK 通路的上游关键激活因子, 在炎症信号转导中发挥核心调控作用, 其异常活化已被证实参与

COPD 的炎症进展及气道重塑过程^[10-11]。

鉴于 TAK1 是 NF- κ B/MAPK 通路的上游关键激活因子,而鼠尾草酚已被证实可阻断该下游通路活化,推测其可能通过调控 TAK1 活性发挥抗炎作用,但该假设在 COPD 模型中尚未验证^[12]。本研究通过构建 COPD 小鼠模型,探讨鼠尾草酚对小鼠肺部炎症反应及肺组织病理损伤的改善作用,明确其是否通过抑制 TAK1 活性及下游通路传导发挥效应,为 COPD 的靶向治疗提供实验依据及新的研究方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级健康雄性 C57BL/6 小鼠,6 周龄,体质量 18~22 g,购于成都药康生物技术有限公司,许可证号 SCXK(川)2020-0034,饲养环境温度 20~26 °C,自由饮食饮水,购回后适应性饲养 1 周,实验过程中对动物的处置符合实验动物伦理学要求。

1.1.2 试剂 娇子牌香烟(焦油量:10 mg 烟气烟碱量:1.0 mg;烟气一氧化碳量:12 mg)购于四川中烟工业有限公司;香烟提取物(CSE,1 支娇子牌香烟减去滤嘴后与真空泵连接,点燃香烟,将烟雾抽至装有 10 mL PBS 缓冲液的容器中,待烟雾充分溶解后用 0.20 μ m 过滤器在超净工作台中过滤除去细菌及颗粒等,该溶液即为 100% 的香烟提取物溶液),PBS 粉剂购于上海青牧生物有限公司;鼠尾草酚(纯度 $\geq$ 98%)购于索莱宝,LPS 和地塞米松购于 sigma,1.25% 三溴乙醇购于北京吉田生物科技有限公司,兔抗鼠 p-TAK1、I κ B α 抗体购于 boster,兔抗鼠 β -actin 抗体购于 Abclonal,p-JNK、p-P38、p-P65 抗体购于 Affinity,HE 染液套装、Masson 染液套装购于 Servicebio、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)检测试剂盒购于上海茁彩生物科技有限公司,合成引物购于成都欣诺生物技术有限公司。

1.1.3 仪器 切片机(上海徕卡仪器有限公司),电泳仪(美国 Bio-Rad),全波长酶标仪(美国赛默飞世尔科技有限公司),显微镜(日本尼康),台式真空泵(Kylin-Bell lab Instrument),0.20 μ m 过滤器(Life Sciences),PCR 梯度仪器(德国艾本德股份公司),实时荧光定量 PCR 仪(美国赛默飞世尔科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 COPD 小鼠模型构建及分组干预 将 30 只 SPF 级 C57BL/6 小鼠按随机数字表法分为 5 组(每组各 6 只):正常对照组、模型组、低剂量鼠尾草酚组(2.5 mg/kg)、高剂量鼠尾草酚组(5 mg/kg)和地塞米松组(1 mg/kg)^[13]。依据 Lu 等^[14]的方法制作

COPD 模型,并进行了适当的调整。采用腹腔注射香烟提取物(CSE)联合烟熏及气管滴注 LPS 的方法建立 COPD 模型。除正常对照组外,其余各组于第 1、12、23 天腹腔注射 CSE(300 μ L);并于第 1、14 天在麻醉下气管滴注 LPS(7.5 μ g/50 μ L)。从第 2~30 天(除第 12、14、23 天),每天进行香烟烟雾暴露(每次 5 支香烟,30 min/次,每日 2 次,间隔 10 min,每周 5 d)。正常对照组在相应时间点给予等量 PBS 腹腔注射和生理盐水气管滴注,并常规饲养。

各干预组(低、高剂量鼠尾草酚组及地塞米松组)于第 24~30 天在每日烟熏前 30 min 腹腔注射相应药物,每天 1 次。实验期间每日观察小鼠一般状态(精神、食欲、活动等)。末次给药 24 h 后,收集血清、支气管肺泡灌洗液(BALF)及肺组织,用于后续检测。

1.2.2 收集血清和 BALF 于末次给药 24 h 后,小鼠腹腔注射 1.25% 三溴乙醇麻醉,眼球取血 0.8~1 mL,置于离心管中室温静置 30 min,4 000 r/min、4 °C 离心 10 min 分离血清,分装后-80 °C 超低温冰箱冻存备用。采血后颈椎脱臼处死小鼠,剪开胸壁暴露气管及肺组织,丝线结扎右肺下叶,插入 24 G 留置针并固定,缓慢注入 0.6 mL 无菌 PBS 缓冲液行肺灌洗,轻柔按摩后回收灌洗液,重复 3 次并合并,计算回收率($\geq$ 80% 为合格);灌洗液 1 000 r/min、4 °C 离心 10 min,吸取上清液分装,-80 °C 冻存备用。

1.2.3 炎症细胞因子检测 严格按照试剂盒说明书操作,检测血清及 BALF 中 IL-1 β 、TNF- α 浓度。设置标准孔、空白孔及样本孔,加入试剂后 37 °C 恒温孵育,洗涤去除未结合物,加入显色剂避光反应,终止反应后用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔吸光度(OD 值),依据标准曲线计算目标因子浓度。

1.2.4 肺组织病理学检查 取结扎的右肺下叶组织,经 4% 多聚甲醛常温固定 24 h,梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后制作 5 μ m 连续切片,烤片并分别行 HE 及 Masson 三色染色。HE 染色用于观察肺泡结构完整性及炎症浸润情况,采用半定量评分法评估病理损伤程度,具体方法为:每组取 5 张切片,在图片中央绘制“十”字,计数经此十字线的肺泡间隔数 Ns(个),测出十字线总长度 L(μ m),并计算出肺泡平均截距(mean linear intercept,MLI),计算公式为 $MLI = L/Ns$ ^[15];Masson 染色用于观察蓝色胶原纤维分布,通过 Image-Pro Plus 6.0 软件分析蓝色区域面积占比量化胶原沉积水平,每组取 5 张切片结果取平均值。

1.2.5 Western blot 法检测肺组织 p-TAK1、p-

JNK、p-P38、p-P65、和 I κ B α 蛋白的表达水平 取左肺组织 50 mg 剪碎,加入含 1%蛋白酶/磷酸酶抑制剂的预冷 RIPA 裂解液 500 μ L,在低温高速组织研磨仪(4 m/s,30 s,循环 2 次,每次循环间隔冰上冷却 30 s)中匀浆后 4 $^{\circ}$ C 裂解 30 min,12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 30 min 取上清得总蛋白。BCA 法测定浓度,调整上样量后加 5 $\times$ 上样缓冲液,95 $^{\circ}$ C 变性 10 min,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

取 20 μ g 变性蛋白行 SDS-PAGE 电泳(10%分离胶、4.5%浓缩胶),转印至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶室温封闭 2 h。加入一抗(p-TAK1、I κ B α 、p-JNK、p-P38、p-P65 及 β -actin,1:2 000 稀释)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗涤后加山羊抗兔二抗(1:8 000 稀释)室温孵育 2 h。ECL 化学发光显影,采用 Tanon 全自动化学发光图像分析系统软件 V2.0 对目的蛋白与内参 β -actin 的灰度值比值,量化相对表达水平。

1.2.6 RT-qPCR 法检测肺组织 TAK1 的 mRNA 水平 采用 Trizol 试剂提取肺组织总 RNA,紫外分光光度计检测纯度(A260/A280=1.8~2.2,A260/230=2.0~2.2 为合格)。按逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA,反应条件:37 $^{\circ}$ C 15 min,50 $^{\circ}$ C 5 min,98 $^{\circ}$ C 5 min。

以 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 扩增,20 μ L 反应体系含 cDNA 2 μ L、上下游引物各 0.5 μ L、SYBR Green qPCR Mix 10 μ L 及无酶水 7 μ L。引物序列:TAK1 上游 5'-CGTCACGGATTCTGCT-TCTG-3',下游 5'-CGGTGGTGCTTGTGTTGAT-GAT-3'; β -actin 上游 5'-GTGGGAATGGGT-CAGAAGGA-3',下游 5'-TCATCTTTTCACG-GTTGGCC-3'。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 10 s、60 $^{\circ}$ C 退火 10 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 40 个循环,熔解曲线验证引物特异性。采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法计算 TAK1 mRNA 相对表达量,以 β -actin 为内参,每组 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行统计学分析。所有计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠生长状况

正常对照组精神状态、活动状态良好且毛发光亮;模型组的食欲、活动状态不佳且毛发无光泽,精神萎靡,活动后出现呼吸急促症状;低剂量鼠尾草酚

组的食欲、精神状态、毛发光泽、活动后呼吸急促症状较模型组有改善;高剂量鼠尾草酚组和地塞米松组的食欲、精神状态、毛发光泽、活动后呼吸急促症状较模型组明显改善。

2.2 血清及 BALF 中炎症细胞因子

与正常对照组相比,模型组小鼠血清中 IL-1 β 和 TNF- α 水平均升高(*P*<0.001);与模型组相比,低剂量鼠尾草酚组的 IL-1 β 和 TNF- α 水平无统计学差异(*P*>0.05);高剂量鼠尾草酚组和地塞米松组的 IL-1 β 和 TNF- α 水平下降(*P*<0.05)。见表 1。

与正常对照组相比,模型组小鼠的 BALF 中 IL-1 β 和 TNF- α 水平均升高(*P*<0.001);与模型组相比,低剂量鼠尾草酚组的 IL-1 β 和 TNF- α 水平无统计学差异(*P*>0.05),高剂量鼠尾草酚组和地塞米松组的 IL-1 β 和 TNF- α 水平下降(*P*<0.05)。见表 2。

表 1 各组血清中 IL-1 β 和 TNF- α 的变化($\bar{x}\pm s$,pg/mL)		
组别	IL-1 β	TNF- α
正常对照组(<i>n</i> =6)	40.66 $\pm$ 3.47	188.41 $\pm$ 25.13
模型组(<i>n</i> =6)	55.72 $\pm$ 7.20 ^①	245.46 $\pm$ 28.38 ^①
低剂量鼠尾草酚组(<i>n</i> =6)	51.24 $\pm$ 9.51	230.62 $\pm$ 17.65
高剂量鼠尾草酚组(<i>n</i> =6)	46.82 $\pm$ 5.74 ^②	214.65 $\pm$ 13.84 ^②
地塞米松组(<i>n</i> =6)	45.06 $\pm$ 5.21 ^②	212.01 $\pm$ 26.24 ^②
<i>F</i> 值	4.690	5.238
<i>P</i> 值	0.006	0.003

①*P*<0.05,与正常对照组相比;②*P*<0.05,与模型组相比。

表 2 各组肺泡灌洗液中 IL-1 β 和 TNF- α 的变化($\bar{x}\pm s$,pg/mL)		
组别	IL-1 β	TNF- α
正常对照组(<i>n</i> =6)	4.38 $\pm$ 0.71	37.49 $\pm$ 3.01
模型组(<i>n</i> =6)	6.56 $\pm$ 0.78 ^①	53.32 $\pm$ 4.95 ^①
低剂量鼠尾草酚组(<i>n</i> =6)	5.91 $\pm$ 0.82	49.33 $\pm$ 4.94
高剂量鼠尾草酚组(<i>n</i> =6)	5.39 $\pm$ 0.89 ^②	45.15 $\pm$ 3.71 ^②
地塞米松组(<i>n</i> =6)	5.28 $\pm$ 0.83 ^②	44.38 $\pm$ 3.40 ^{②③}
<i>F</i> 值	6.010	12.620
<i>P</i> 值	0.002	<0.001

①*P*<0.05,与正常对照组相比;②*P*<0.05,与模型组相比;③*P*<0.05,与低剂量鼠尾草酚相比。

2.3 病理结果

2.3.1 HE 染色 与正常对照组比较,模型组小鼠气管周围可见炎症细胞浸润,肺泡腔不规则扩大,肺泡壁断裂,肺泡相互融合,形成肺大泡,肺泡间质明显增厚,MLI 明显变长(*P*<0.001);与模型组比较,低剂量鼠尾草酚组小鼠气管周围可见部分炎症细胞浸润,肺泡破坏减少,肺泡间质增厚减轻,MLI 变短(*P*<0.05);与低剂量鼠尾草酚组相比,高剂量鼠尾草酚组小鼠肺泡破坏更少,肺泡间质未见明显增厚,MLI 明显变短(*P*<0.05);高剂量鼠尾草酚组和地塞米松组相比,炎症浸润、肺泡破坏程度、肺泡间质改变未见明显差异,MLI 差异无统计学意义(*P*>0.05)。见图 1-图 2。

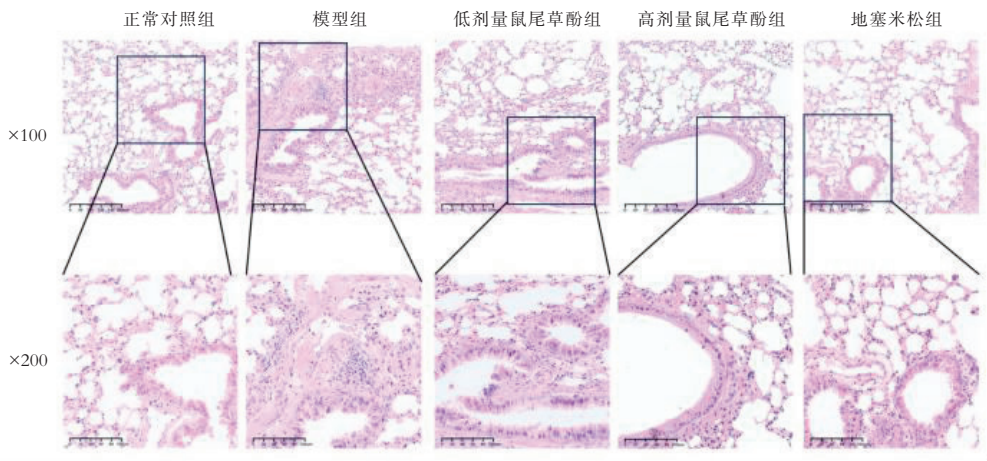


图 1 各组小鼠肺组织病理(HE 染色)

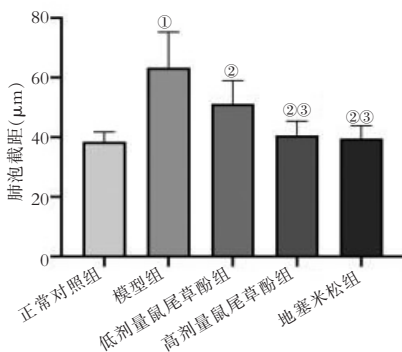


图 2 各组小鼠肺泡截距

① $P<0.05$,与正常对照组相比;② $P<0.05$,与模型组相比;③ $P<0.05$,与低剂量鼠尾草酚相比。

2.3.2 Masson 染色结果 与正常对照组相比,模型组小鼠肺组织胶原沉积程度更重($P<0.001$);和模型组相比,低剂量鼠尾草酚组、高剂量鼠尾草酚组和地塞米松组的肺组织胶原沉积程度减轻($P<0.05$);和低剂量鼠尾草酚组相比,高剂量鼠尾草酚组和地塞米松组的肺组织胶原沉积减轻更明显($P<0.05$);高剂量鼠尾草酚组和地塞米松组的肺组织胶原沉积程度无统计学差异($P>0.05$)。见图 3-图 4。

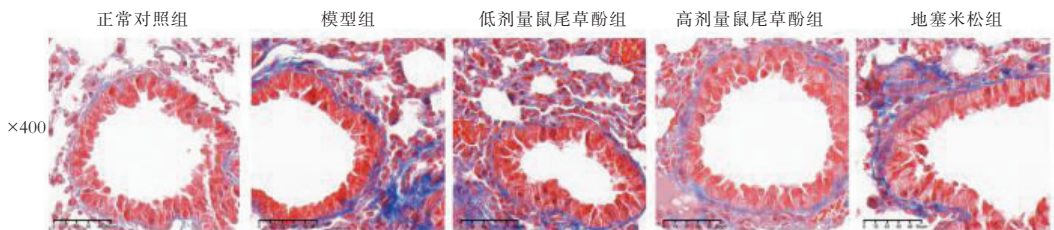


图 3 各组小鼠肺组织病理(Masson 染色)

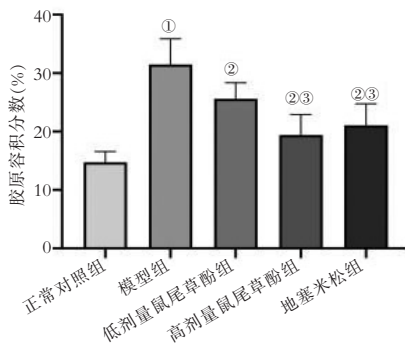


图 4 各组小鼠肺组织 Masson 染色统计结果

① $P<0.05$,与正常对照组相比;② $P<0.05$,与模型组相比;③ $P<0.05$,与低剂量鼠尾草酚相比。

p-TAK1、p-JNK、p-P38、p-P65 蛋白表达水平升高($P<0.001$),I κ B α 蛋白表达水平降低($P<0.001$)。鼠尾草酚及地塞米松干预后,和模型组相比,低剂量鼠尾草酚组 p-TAK1、p-P38 蛋白表达水平下降($P<0.01$),I κ B α 蛋白表达水平升高($P<0.01$);高剂量鼠尾草酚组和地塞米松组 p-TAK1、p-JNK、p-P38、p-P65 蛋白表达水平下降($P<0.01$),I κ B α 蛋白表达水平升高($P<0.001$)。和低剂量鼠尾草酚组相比,高剂量鼠尾草酚组 p-TAK1、p-P38、p-P65 蛋白表达水平下降($P<0.05$);地塞米松组 p-TAK1、p-JNK、p-P38、p-P65 蛋白表达水平下降($P<0.05$),I κ B α 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。高剂量鼠尾草酚组和地塞米松组两组之间比较,p-TAK1、p-JNK、p-P38、p-P65 和 I κ B α 蛋白的表达

2.4 Western blot 法检测肺组织 p-TAK1、p-JNK、p-P38、p-P65 和 I κ B α 蛋白的表达水平

与正常对照组相比,模型组小鼠肺组织中

水平均无统计学差异($P>0.05$)。见表 3。

表 3 鼠尾草酚对 COPD 小鼠肺组织炎症相关蛋白的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	p-TAK1	p-JNK	p-P65	p-P38	IκBα
正常对照组($n=6$)	1.02±0.25	0.99±0.18	1.01±0.35	1.00±0.11	1.00±0.07
模型组($n=6$)	3.11±0.47 ^①	1.93±0.24 ^①	2.14±0.33 ^①	2.22±0.16 ^①	0.40±0.06 ^①
低剂量鼠尾草酚组($n=6$)	2.37±0.39 ^②	1.64±0.34	1.95±0.44	1.85±0.11 ^②	0.78±0.11 ^②
高剂量鼠尾草酚组($n=6$)	1.86±0.43 ^{②③}	1.41±0.25 ^②	1.33±0.28 ^{②③}	1.49±0.19 ^{②③}	0.84±0.078 ^②
地塞米松组($n=6$)	1.72±0.39 ^{②③}	1.28±0.25 ^{②③}	1.30±0.19 ^{②③}	1.47±0.31 ^{②③}	0.88±0.062 ^{②③}
F 值	23.57	11.35	12.47	34.55	49.47
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

① $P<0.05$,与正常对照组相比;② $P<0.05$,与模型组相比;③ $P<0.05$,与低剂量鼠尾草酚相比。

2.5 RT-qPCR 检测肺组织 TAK1 的 mRNA 水平

与正常对照组相比,模型组小鼠的肺组织 TAK1 的 mRNA 水平升高($P<0.001$);与模型组相比,低剂量鼠尾草酚组、高剂量鼠尾草酚组和地塞米松组小鼠的肺组织 TAK1 的 mRNA 水平均下降($P<0.01$);与低剂量鼠尾草酚组相比,高剂量鼠尾草酚组和地塞米松组小鼠的肺组织 TAK1 的 mRNA 水平下降($P<0.01$);高剂量鼠尾草酚组和地塞米松组小鼠的肺组织 TAK1 的 mRNA 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 5。

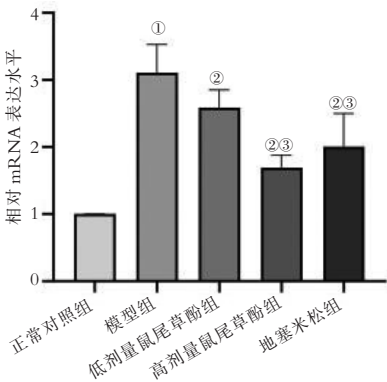


图 5 各组小鼠肺组织 TAK1 mRNA 水平

① $P<0.05$,与正常对照组相比;② $P<0.05$,与模型组相比;③ $P<0.05$,与低剂量鼠尾草酚相比。

3 讨论

慢性阻塞性肺疾病(COPD)的特征性肺部炎症与香烟烟雾等有害暴露密切相关,其发生涉及复杂的细胞内信号转导网络。其中,TAK1 作为整合上游应激信号与下游促炎通路的核心节点,其作用日益受到关注^[16]。TAK1 一旦被激活,可同时启动 NF-κB 和 MAPK 信号轴,驱动炎症因子表达^[17-18]。有研究^[16,19]表明,在急性肺损伤和哮喘等肺部炎症模型中,抑制 TAK1 能有效减轻炎症反应,这提示靶向 TAK1 是干预 COPD 的潜在策略。基于此,本

研究探讨了天然化合物鼠尾草酚(Carnosol)是否通过调控 TAK1 通路对抗 COPD 炎症。

本研究结果证实,在熏烟联合 LPS 诱导的 COPD 小鼠模型中,TAK1 信号通路被显著激活,表现为肺组织 TAK1 mRNA 表达及 p-TAK1 水平升高,并伴随下游 JNK、P38 磷酸化及 NF-κB(p-P65 升高、IκBα 降解)信号的增强。重要的是,高剂量鼠尾草酚的干预能剂量依赖性地逆转上述变化;其不仅降低了 TAK1 的转录与活化水平,还抑制了下游 p-JNK、p-P38 和 p-P65 的信号转导,并阻止了 IκBα 的降解。这一系列变化与肺部病理损伤减轻、胶原沉积减少及促炎因子(TNF-α, IL-1β)水平下降的表型改善相一致。这提示鼠尾草酚的作用靶点可能位于 TAK1 或其上游,且需达到足够的抑制强度才能全面阻断下游炎症网络。

本研究存在一定局限性。首先,使用的烟熏联合 LPS 急性攻击模型虽能模拟 COPD 的部分急性炎症和病理,但与人类 COPD 的慢性进展病程仍存在差异。其次,尽管相关性证据充分,但缺乏直接的因果性论证,例如未使用 TAK1 特异性抑制剂或基因修饰动物来验证鼠尾草酚的作用是否严格依赖于 TAK1。第三,机制研究仍停留在通路描述层面,鼠尾草酚是直接结合 TAK1 蛋白,还是通过调控其上游衔接蛋白如 TGF-β 激活激酶 1(MAP3K7)结合蛋白 1/2(TAB2)或影响其泛素化修饰等间接方式发挥作用,尚未明确。最后,研究主要聚焦于炎症信号,对氧化应激等其他 COPD 关键机制探讨尚且不足^[20]。

综上,本研究表明高剂量鼠尾草酚能有效缓解 COPD 模型小鼠的肺部炎症浸润、胶原沉积及促炎因子释放,其效果与地塞米松相当且具有剂量依赖性。其分子机制与抑制 TAK1 信号通路密切相关,表现为下调 TAK1 的基因转录与蛋白磷酸化,进而阻断其下游 JNK、P38 MAPK 和 NF-κB 信号通路

的传导。这些从组织病理、炎症因子到多层次分子信号的证据提示,鼠尾草酚可能通过靶向 TAK1 这一关键节点发挥抗 COPD 作用,为其作为潜在的 COPD 治疗药物提供了临床前依据。

参考文献

- [1] Christenson SA, Smith BM, Bafadhel M, *et al.* Chronic obstructive pulmonary disease [J]. *The Lancet*, 2022, 399 (10342): 2227—2242.
- [2] Ruvuna L, Sood A. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Clinics in Chest Medicine*, 2020, 41 (3): 315—327.
- [3] Safiri S, Carson-Chahhoud K, Noori M, *et al.* Burden of chronic obstructive pulmonary disease and its attributable risk factors in 204 countries and territories, 1990—2019: results from the Global Burden of Disease Study 2019[J]. *British Medical Journal*, 2022, 378; e069679.
- [4] Ferrera MC, Labaki WW, Han MK. Advances in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Annual Review of Medicine*, 2021, 72: 119—134.
- [5] Ahmadi A, Ahrari S, Salimian J, *et al.* p38 MAPK signaling in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis and inhibitor therapeutics[J]. *Cell Communication and Signaling*, 2023, 21(1): 314.
- [6] Avezina R, Chen T, Wang D. Conventional, complementary and alternative medicines: mechanistic insights into therapeutic landscape of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 2023, 18: 447—457.
- [7] Alanazi FJ, Alruwaili AN, Aldhafeeri NA, *et al.* Pathological interplay of NF- κ B and M1 macrophages in chronic inflammatory lung diseases[J]. *Pathology, Research and Practice*, 2025, 269: 155903.
- [8] Xu X, Zhang 66G, Peng K, *et al.* Carnosol maintains intestinal barrier function and mucosal immune homeostasis in DSS-induced colitis[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 894307.
- [9] Loussouarn M, Krieger-Liszkay A, Svilar L, *et al.* Carnosic acid and carnosol, two major antioxidants of rosemary, act through different mechanisms[J]. *Plant Physiology*, 2017, 175 (3): 1381—1394.
- [10] Yun HJ, Lee HY. The novel TAK1 inhibitor handelin inhibits NF- κ B and AP-1 activity to alleviate elastase-induced emphysema in mice[J]. *Life Sciences*, 2023, 319: 121388.
- [11] Luo L, Wang H, Xiong J, *et al.* Echinatin attenuates acute lung injury and inflammatory responses via TAK1-MAPK/NF- κ B and Keap1-Nrf2-HO-1 signaling pathways in macrophages[J]. *PLoS One*, 2024, 19(5): e0303556.
- [12] Li L, Pan Z, Ning D, *et al.* Rosmanol and carnosol synergistically alleviate rheumatoid arthritis through inhibiting TLR4/NF- κ B/MAPK pathway[J]. *Molecules*, 2021, 27(1): 78.
- [13] Gonçalves C, Fernandes D, Silva I, *et al.* Potential anti-inflammatory effect of Rosmarinus officinalis in preclinical in vivo models of inflammation[J]. *Molecules*, 2022, 27(3): 609.
- [14] Lu L, Zhu C, Xu J, *et al.* Therapeutic effects of Lifei decoction in a murine model of COPD induced by LPS and cigarette smoke [J]. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 2024, 19: 957—967.
- [15] 张蓝熙, 田燕歌, 朱丽华, 等. 补肺益肾方通过调控 Nrf2 通路抗氧化应激治疗慢性阻塞性肺疾病机制[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(5): 2374—2379.
- [16] Kalchier-Dekel O, Yao X, Barochia AV, *et al.* Apolipoprotein E signals via TLR4 to induce CXCL5 secretion by asthmatic airway epithelial cells[J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2020, 63(2): 185—197.
- [17] Zhu W, Luo W, Han J, *et al.* Schisandrin B protects against LPS-induced inflammatory lung injury by targeting MyD88 [J]. *Phytomedicine*, 2023, 108: 154489.
- [18] Shi M, Wang L, Zhou J, *et al.* Direct factor Xa inhibition attenuates acute lung injury progression via modulation of the PAR-2/NF- κ B signaling pathway[J]. *American Journal of Translational Research*, 2018, 10(8): 2335—2349.
- [19] Yang L, Chen H, Hu Q, *et al.* Eupalinolide B attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury through inhibition of NF- κ B and MAPKs signaling by targeting TAK1 protein[J]. *International Immunopharmacology*, 2022, 111: 109148.
- [20] Barnes PJ. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(5): 965.

(收稿日期: 2026—03—16)

修回日期: 2026—04—28)