

健儿乐颗粒对哮喘小鼠 Th17/Treg 失衡影响的实验研究

王毓恩¹ 周雪娜² 杨毅¹ 刘竹云³

摘要 **目的** 观察支气管哮喘小鼠血清及支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)上清中 Th17 相关炎症因子 IL-17、Treg 相关炎症因子 IL-10 水平,探讨健儿乐颗粒防治哮喘的作用机制。**方法** 40 只 Balb/c 小鼠按体重采用随机数字表法分为正常对照组、哮喘组、激发后哮喘组和健儿乐颗粒加哮喘组,共 4 组,每组 10 只。除正常对照组外,各组小鼠采用腹腔注射抗原混悬液后,1% 鸡清白蛋白(OVA, grade V)溶液致敏和激发建立小鼠哮喘模型。造模后健儿乐颗粒加哮喘组小鼠给予健儿乐颗粒(0.36 g/mL)药物干预,其余各组给予等量生理盐水灌胃,均持续 14 天。给药结束后,激发后哮喘组和健儿乐颗粒加哮喘组再次用 1% OVA (grade II) 溶液雾化吸入激发约 40 min 一次。HE 染色评价小鼠肺部炎症;酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清及 BALF 上清中 IL-10 和 IL-17 水平。**结果** 正常对照组小鼠肺组织肺内支气管结构正常,未见炎症细胞浸润。哮喘组及激发后哮喘组小鼠支气管壁黏膜上皮细胞损伤,有炎症细胞浸润。健儿乐颗粒加哮喘组小鼠支气管和血管周围炎症明显减轻。与正常对照组比较,哮喘组血清及 BALF 中 IL-17 水平升高,IL-10 水平降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与哮喘组比较,激发后哮喘组血清及 BALF 中 IL-17 水平升高,IL-10 水平降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$);健儿乐颗粒加哮喘组 IL-17 水平降低,IL-10 水平升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与激发后哮喘组比较,血清及 BALF 中健儿乐颗粒加哮喘组 IL-17 水平降低,IL-10 水平升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 健儿乐颗粒防治哮喘的作用机制,可能与其调节小鼠血清、BALF 中 Th17/Treg 细胞因子间的平衡有关。

关键词 健儿乐颗粒;哮喘;Th17/Treg

Effect of Jian'erle Granule on Th17/Treg Imbalance of Asthma Mice WANG Zhui-en¹, ZHOU Xue-na², YANG Yi¹, and LIU Zhu-yun³ 1 Faculty of Classics in Chinese Medicine, Yantai Campus, Binzhou Medical School, Shandong (264003); 2 First Clinical Medical School, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250355); 3 Yantai Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shandong (264003)

ABSTRACT **Objective** To observe the levels of Th17 associated inflammatory factor IL-17 and Treg associated inflammatory factor IL-10 in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of bronchial asthma mice, and to explore the mechanism of Jian'erle Granule (JG) for preventing and treating asthma. **Methods** Totally 40 Balb/c mice were divided into 4 groups according to random digit table, i.e., the normal control group, the asthma group, the post-excitation asthma group, the JG + asthma group, 10 in each group. Asthma model was established by 1% ovalbumin (OVA) (grade V) solution sensitization and excitation after intraperitoneal injection of antigen suspension in all groups except the normal control group. JG (0.36 g/mL) was administrated to mice in the JG + asthma group after modeling. Equal volume of normal saline was administrated to mice in the rest 3 groups. All medication lasted for 14 successive days. After medication mice in the JG + asthma group and the asthma group were excited with 1% OVA

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81341140)

作者单位:1. 滨州医学院烟台校区中医经典教研室(山东 264003); 2. 山东省中医药大学第一临床学院(济南 250355); 3. 山东省烟台市中医院(山东 264003)

通讯作者:杨毅, Tel:15908906604, E-mail:yy1976226@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.12.1510

(grade II) again for 40 min by atomization inhalation. Lung inflammation was examined by HE staining. Levels of IL-10 and IL-17 in BALF and serum were measured by ELISA. Results Bronchial structure in lung tissue was normal in mice of the normal control group, with no inflammatory infiltration seen. Mucosal epithelial cells of bronchial wall were injured in the asthma group and the post-excitation asthma group, with inflammatory infiltration seen. Inflammation around bronchus and blood vessels was obviously attenuated in the JG + asthma group. Compared with the normal control group, the IL-17 level in serum and BALF significantly increased, IL-10 level significantly decreased in the asthma group ($P < 0.01$). Compared with the asthma group, IL-17 level in serum and BALF increased and IL-10 level in serum and BALF decreased in the post-excitation asthma group ($P < 0.01$). Compared with the asthma group, the IL-17 level in serum and BALF significantly decreased, IL-10 level significantly increased in the JG + asthma group ($P < 0.01$). Compared with the post-excitation asthma group, the IL-17 level in serum and BALF significantly decreased and IL-10 level in serum and BALF significantly increased in the JG + asthma group ($P < 0.01$). Conclusion The mechanism for JG preventing and treating asthma might be correlated with regulating Th17/Treg cytokine balance in serum and BALF.

KEYWORDS Jian'erle Granule; asthma; Th17/Treg

支气管哮喘(bronchial asthma,简称哮喘)是呼吸系统的常见病、多发病,以慢性气道炎症及气道重塑为特征,表现为多种炎性细胞(淋巴细胞、嗜酸粒细胞、肥大细胞、上皮细胞等)和细胞因子浸润及气道高反应性。哮喘的主要病理改变是气道的慢性炎症,以及由此引发的气道高反应性和气道结构的重构,其具体发病机制目前仍不清楚。新近研究显示 Th17 细胞及 Treg 细胞功能失衡在哮喘的发生、发展中起重要作用,可加剧肺部炎症发展,降低呼吸功能^[1]。调节 Th17/Treg 之间的平衡可能成为治疗哮喘的新方法。健儿乐颗粒,由烟台市中医医院制剂室制,以“卫出三焦”理论组方^[2],用于治疗小儿哮喘,经前期实验研究中发现,可明显改善哮喘小鼠气道炎性反应,但 Th1/Th2 失衡并未得到纠正^[3],显示该药的作用机制与其他免疫调控方式有关。因而本实验以 Th17/Treg 为出发点,探讨健儿乐颗粒防治哮喘的其他可能机制,为该方进一步推广和应用提供现代科学依据。

材料与方法

1 动物 40 只健康雌性 Balb/c 小鼠,SPF 级,体重 16~29 g,6~8 周龄,由山东大学实验动物中心提供,动物合格证编号:SCXK(鲁)20130009。实验期间,饲养环境通风良好,室温 21℃ 左右。

2 药物 健儿乐颗粒(主要药物为山楂、鸡内金、黄芪、党参、冬虫夏草、蜂胶、防风、陈皮、五味子、甘草,按比例 1:1:3:2:0.6:1:1:1:1:0.5 配制,经混合、水煎、浓缩、烘干,制粒装袋,每袋 10 g),由烟台市中医医院制备。

3 试剂与仪器 主要试剂:鸡清白蛋白(OVA)

购自 Sigma 公司(批号:1000779580);IL-10(批号:201404)、IL-17 ELISA 试剂盒(批号:201405),购自美国 Rapidbio 公司。主要仪器:402 型超声雾化器,上海天缘医用生物有限公司;DMI3000M 型光学显微镜,德国 Leica 制造;Ariol 型病理摄像及图像分析系统,德国 Leica 制造。

4 动物分组及模型的建立 将 40 只健康雌性 Balb/c 小鼠按体重根据随机数字表法分为正常对照组、哮喘组、激发后哮喘组和健儿乐颗粒加哮喘组,共 4 组,每组 10 只。除正常对照组外,其余 Balb/c 小鼠按参考文献[4]开始造模,第 1 天一次性腹腔注射抗原混悬液 0.3 mL(OVA grade V,10 mg、氢氧化铝 20 mg、生理盐水 0.3 mL),正常饲养至第 14 天开始,造模 Balb/c 小鼠用 1% OVA (grade II)溶液(402 超声雾化器)雾化吸入,隔天 1 次,每次约 40 min,共 7 次。末次吸入激发后正常饲养 2 周,小鼠出现明显的腹肌收缩,呼吸困难或点头样呼吸,严重者出现动作迟缓或俯伏不动、四肢瘫软,反应迟钝等反应时停止。造模过程中,Balb/c 小鼠无死亡,哮喘缓解期模型造模成功。造模小鼠第 4 周开始给予药物干预,给药 2 周后,激发后哮喘组、健儿乐颗粒加哮喘组再次用 1% OVA (grade II)溶液雾化吸入激发约 40 min 一次。

5 给药方法 用药剂量按施新嵴^[5]方法计算,健儿乐颗粒加哮喘组小鼠给予 0.4 mL 健儿乐颗粒水煎液(健儿乐颗粒用蒸馏水溶解至 0.36 g/mL,给药剂量按体重计算相当于临床儿童剂量的 9.1 倍),连续 14 天,每天 1 次。其他各组灌胃以等量的生理盐水,持续 14 天。

6 检测指标及方法

6.1 小鼠行为学改变 观察各组小鼠行动、呼吸、情绪等变化,尤其注意观察小鼠有否咳喘、点头样呼吸等。

6.2 病理学观察 剪取小鼠左侧肺叶置于 10% 福尔马林溶液中。常规取材、脱水、石蜡包埋、制备石蜡切片、HE 染色、中性树胶封片,光学显微镜下观察肺部的炎症病理改变。

6.3 血清及支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 的制备 给药结束后,激发后哮喘组、健儿乐颗粒加哮喘组再次用 1% OVA (grade II) 溶液 (402 超声雾化器) 雾化吸入激发约 40 min。末次激发后 24 h 内,所有小鼠摘眼球法从眶动、静脉采血,即行离心 (4 ℃, 2 000 r/min, 10 min) 取血清约 0.3 ~ 0.5 mL,标本标号后置于 -80 ℃ 冰箱保存,待测细胞因子。颈椎脱臼处死 Balb/c 小鼠后,逐层分离气管、插管、结扎左肺,立即将留置针插入气管,用 1 mL 注射器抽取生理盐水 1 mL 后,接于留置针后缓慢注入,同时稍微用力按摩胸部,以便灌注充分,然后再缓慢抽出,连续 3 次对右肺叶进行灌注,可回收约 2 mL 肺泡灌洗液,随后将其置于 5 mL 的离心管中离心 10 min (4 ℃, 2 000 r/min),留取上清液 1 mL,标本编号后置于 -20 ℃ 冰箱中保存,待测细胞因子。

6.4 ELISA 法检测小鼠 BALF 及血清 IL-10 和 IL-17 水平 检测步骤严格按 ELISA 试剂盒要求进行。

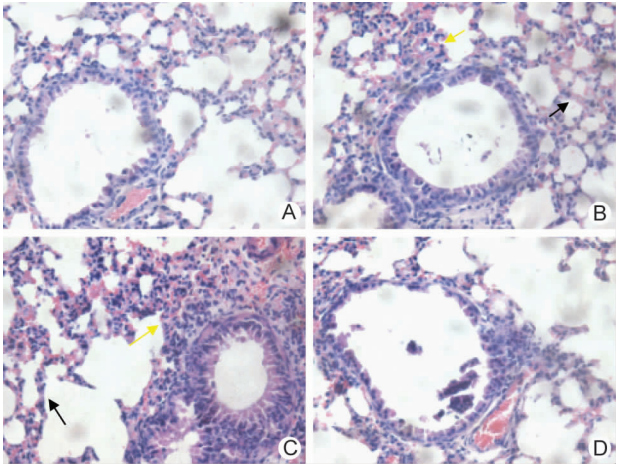
7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件包进行统计,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。均符合正态分布和方差齐性的资料,多组间比较采用单因素方差分析 (AVONA),两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠行为学改变 正常对照组小鼠毛发光泽,活动灵活。哮喘组、激发后哮喘组、健儿乐颗粒加哮喘组小鼠予 OVA 气道吸入后出现呼吸增快、躁动不安、咳嗽喘息、抓耳挠痒以及明显的腹肌收缩,呼吸困难或点头样呼吸,严重者出现动作迟缓,反应迟钝等,随着吸入次数增多,上述症状表现日益明显,造模成功后,哮喘组和激发后哮喘组上述症状无改善;健儿乐颗粒组小鼠则日益减轻。

2 各组小鼠肺组织病理学变化 (图 1) 正常对照组小鼠肺组织肺内支气管结构正常,柱状上皮细胞排列整齐,纤毛无倒伏、缺失等异常,肺泡壁毛细血管

无充血、缺血,肺泡腔内清洁无渗出,未见炎症细胞浸润。哮喘组及激发后哮喘组小鼠支气管壁黏膜上皮细胞损伤,纤毛倒伏、缺失,支气管壁充血、水肿,可见以淋巴细胞、嗜酸性粒细胞和单核细胞为主的炎症细胞浸润,伴有支气管平滑肌层肥大、增生,周围肺泡间隔增宽,伴炎症细胞浸润。健儿乐颗粒加哮喘组小鼠支气管和血管周围炎症明显减轻,可见少量的淋巴细胞、嗜酸性粒细胞浸润,偶见中性粒细胞,毛细血管轻度扩张,其病变程度较哮喘组及激发后哮喘组有所减轻,肺泡亦出现充血、水肿。



注:A 为正常对照组;B 为哮喘组;C 为激发后哮喘组;D 为健儿乐颗粒加哮喘组;黄色箭头表示嗜酸性粒细胞增多为主;黑色箭头表示支气管黏膜增厚

图 1 各组小鼠肺病理比较 (HE 染色, ×400)

3 各组小鼠血清中炎症因子 IL-17 和 IL-10 水平比较 (表 1) 与正常对照组比较,哮喘组 IL-17 水平升高,IL-10 水平降低 ($P < 0.01$)。与哮喘组比较,激发后哮喘组 IL-17 水平升高,IL-10 水平降低 ($P < 0.01$);健儿乐颗粒加哮喘组 IL-17 水平降低,IL-10 水平升高 ($P < 0.01$)。与激发后哮喘组比较,健儿乐颗粒加哮喘组 IL-17 水平降低,IL-10 水平升高 ($P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠血清 IL-17 和 IL-10 水平比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-17	IL-10
正常对照	10	49.21 ± 1.30	52.75 ± 1.71
哮喘	10	53.67 ± 1.27 *	47.60 ± 0.93 *
激发后哮喘	10	56.19 ± 1.01 Δ	44.65 ± 1.31 Δ
健儿乐颗粒加哮喘	10	51.85 ± 1.09 $\Delta\Delta$	50.62 ± 1.06 $\Delta\Delta$

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与哮喘组比较, $\Delta P < 0.01$;与激发后哮喘组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$

4 各组小鼠 BALF 中炎症因子 IL-10 和 IL-17 水平比较 (表 2) 与正常对照组比较,哮喘组 IL-17 水平升高,IL-10 水平降低 ($P < 0.01$)。与哮喘组比较,激发

后哮喘组 IL-17 水平升高, IL-10 水平降低($P < 0.01$); 健儿乐颗粒加哮喘组 IL-17 水平降低, IL-10 水平升高($P < 0.01$)。与激发后哮喘组比较, 健儿乐颗粒加哮喘组 IL-17 水平降低, IL-10 水平升高($P < 0.01$)。

表 2 各组小鼠 BALF 上清液 IL-17 和 IL-10 水平比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-17	IL-10
正常对照	10	51.13 $\pm$ 0.99	55.74 $\pm$ 3.43
哮喘	10	57.46 $\pm$ 1.48 *	34.24 $\pm$ 3.22 *
激发后哮喘	10	64.05 $\pm$ 1.93 Δ	25.99 $\pm$ 2.25 Δ
健儿乐加哮喘	10	54.83 $\pm$ 1.31 $\Delta\Delta$	47.00 $\pm$ 4.91 $\Delta\Delta$

注:与正常对照组比较, * $P < 0.01$;与哮喘组比较, $\Delta P < 0.01$;与激发后哮喘组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$

讨 论

免疫失衡是哮喘免疫易感体质形成的本质,在各种因素的作用下, Th 细胞出现漂移现象, 每类 Th 亚群通过分泌独特的细胞因子对哮喘气道炎症的形成施加影响^[6]。所以, 使用药物对 T 细胞漂移所造成免疫失衡进行干涉是逆转哮喘免疫易感体质的重要途径。

有研究认为, 辅助性 T 淋巴细胞 (help T cells, Th) 中的 Th1 和 Th2 亚群免疫应答失衡, 是哮喘发生的关键因素^[7]。但近年来逐渐多的研究显示, 单独的 Th1/Th2 免疫失衡难以全面解释哮喘患者的免疫体质^[8,9]。Th17 和调节性 T 淋巴细胞 (regulatory T cells, Treg) 被发现是 Th 细胞的两类新亚群, 并与哮喘等自身免疫性疾病的发生密切相关。由于 Th17 和 Treg 相互拮抗的作用, 它们成为评价免疫平衡的新标尺。已有实验研究证明, 哮喘患者体内 IL-17 水平增高且与疾病的严重程度成正相关^[10-12]。这些都将哮喘发病过程中免疫学机制指向一种新的学说-Th17/Treg 免疫平衡^[13], 近期的相关研究也进一步证明了这个^[14,15]。

对于作为哮喘癥结的机体免疫紊乱, 发作期的治疗主要着眼于气道炎症的消退, 并不能解决免疫紊乱, 基于哮喘的易复发性及由于反复发作而导致病情发展的危害, 缓解期预防性治疗是哮喘治疗的核心部分, 这与中医治未病的理念一致。目前多数医家认为哮喘缓解期以正虚为主, 正虚可以表现为肺虚、脾虚、肾虚, 所以从补肺固卫^[16]、健运脾胃^[17]、补肾培元^[18] 治疗者居多, 也有联合几种方法论治者^[19]。

中医学理论认为, 卫气是抵御外邪的重要物质。既往关于缓解期的治疗理论, 多强调脏腑功能不足, 而忽视脏腑与卫气相互作用的问题。鉴于此, 本课题组提出, “卫出三焦”, 肺脾肾三脏作为统一协调的整体,

在卫气生成和功能发挥中起关键作用; 缓解期扶正固本要把三者作为一个整体来思考^[2]。这与临床调查所揭示的哮喘发病内因一致^[20]。健儿乐颗粒即基于以上研究并结合临床用药经验所拟方剂。

前期研究中发现, 健儿乐颗粒能减少哮喘发作, 进而逐步改善呼吸道功能^[21]; 并可明显改善哮喘小鼠气道炎症反应, 但 Th1/Th2 失衡并未得到纠正^[22], 显示该药的作用机制与其他免疫调控方式有关。另有研究表明, 本方中所用药物黄芪具有提高免疫抑制小鼠 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞数的比例、降低 CD4⁺T 细胞的数量及抑制 IL-17 分泌活性的作用^[23]; 方中冬虫夏草提取物能够明显促进 MLC 体系细胞中 Treg 细胞增殖, 抑制 Th17 细胞增殖, 降低 Th17/Treg 细胞比值, 改变 Th17/Treg 轴的平衡, 同时增加 IL-2 分泌、减少 IL-6、IL-17、IL-23 分泌, 有利于诱导免疫耐受^[24]。表明本方可能对 Th17/Treg 的失衡有调控作用。

IL-17 是 Th17 细胞独特分泌的效应细胞因子, 可以诱导多种细胞分泌和释放多种中性粒细胞趋化因子, 进而导致大量的中性粒细胞募集, 加重哮喘气道炎症。另一方面, 可以促使气道黏液腺分泌大量黏液, 增加气道的高反应性, 从而在哮喘气道重塑的过程中发挥重要的作用。IL-10 是 CD4⁺CD25⁺Treg 分泌的抑制性细胞因子, 在哮喘发病机制中具有负调节作用, 对哮喘炎症启动过程中 T 细胞的活化、细胞因子分泌 (如 IL-4、TNF 等) 及炎性细胞在气道内积聚、激活及分泌细胞因子都有抑制作用, 也可阻止 CD4⁺T 细胞受体介导的 T 细胞的活化, 抑制嗜酸粒细胞表达, 加速嗜酸粒细胞加速凋亡, 而发挥抗过敏作用。

在本实验研究中发现哮喘小鼠 BALF、血清中 IL-10 水平在哮喘组较正常对照组明显下降, 表明在哮喘中 Treg 细胞功能较正常对照组明显下降, 提示 Treg 细胞在哮喘中对机体起到保护作用, Treg 细胞功能的降低与哮喘的发生、发展有着密切的联系。哮喘组中 Th17 相关细胞因子 IL-17 在 BALF、血清中水平亦较正常对照组明显升高, 表明 Th17 参与了哮喘的发病过程。健儿乐颗粒加哮喘组小鼠的 BALF 及血清中, IL-17 水平均较哮喘模型组小鼠明显降低 ($P < 0.01$); 而 IL-10 水平均较哮喘模型组升高 ($P < 0.01$)。提示经过健儿乐颗粒干预后, 哮喘小鼠体内促炎细胞因子和抑制炎症细胞因子的变化趋势向疾病好转方向发展, 说明健儿乐颗粒对 Th17/Treg 相关细胞因子具有良性调节作用。

综上所述, 健儿乐颗粒能有效缓解哮喘小鼠的症状表现, 抑制气道炎症反应, 其作用机制可能是通过下

调 Th17 及其细胞因子,上调 Treg 及其细胞因子,从而纠正 Th17/Treg 平衡,使之向 Treg 倾斜,有效抑制 Th17 的过度免疫反应。

参 考 文 献

- [1] Hamzaoui A, Maalmi H, Berras A, et al. Transcriptional characteristics of CD4 T cells in young asthmatic children: RORC and FOXP3 axis[J]. J Inflamm Res, 2011, 4(1): 139-146.
- [2] 杨毅,王醅恩,吉博文,等.“卫出三焦”理论与小儿咳嗽变异性哮喘预防[J]. 黑龙江中医药, 2012, 41(5): 2.
- [3] 王醅恩,杨毅,吉博文,等. 健儿乐颗粒预防 CVA 小鼠气道变应性炎症的实验研究[J]. 陕西中医学院学报, 2012, 35(6): 77-80.
- [4] 胡斯明. 调节性 T 细胞/Th17 在支气管哮喘小鼠气道炎症过程中的变化[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(19): 2881-2884.
- [5] 施新畴主编. 现代医学实验动物学[M]. 北京:人民军医出版社, 2000:335.
- [6] Takeda K, Dow SW, Miyahara N, et al. Vaccine-induced CD8 + T cell-dependent suppression of airway hyperresponsiveness and inflammation[J]. J Immunol, 2009, 183(1): 181-190.
- [7] Finn PW, Bigby TD. Innate immunity and asthma[J]. Proc Am Thorac Soc, 2009, 6(3): 260-265.
- [8] Heaton T, Rowe J, Turner S, et al. An immunological approach to asthma: identification of *in-vitro* T-cell response patterns associated with different wheezing phenotypes in children[J]. Lancet, 2005, 365(9454): 142-149.
- [9] Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis[J]. Science, 2002, 296(5567): 490-494.
- [10] Molet S, Hamid Q, Davoine F, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines[J]. J Allergy Clin Immunol, 2001, 108(3): 430-438.
- [11] Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, et al. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999, 160(5 Pt 1): 1532-1539.
- [12] Louis R, Lau LC, Bron AO, et al. The relationship between airways inflammation and asthma severity[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161(1): 9-16.
- [13] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells[J]. Nature, 2006, 441(7090): 235-238.
- [14] 周辰,陈军浩,殷凯生. 辅助性 T 细胞 17 和调节性 T 细胞在哮喘小鼠中的失衡表达及其意义[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2010, 9(1): 28-31.
- [15] 施宇衡,时国朝. 支气管哮喘患者外周血 Th17、CD4⁺CD25⁺Treg 细胞表达特征[J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(1): 740-743.
- [16] 李小娟,廉富,孙增涛,等. 补肺颗粒治疗支气管哮喘缓解期患者 33 例临床观察[J]. 中医杂志, 2015, 56(2): 128-131.
- [17] 钟诗旭,孟晓露. 孟晓露从“脾主运化”论治小儿哮喘缓解期经验[J]. 广西中医药, 2014, 37(5): 44-45.
- [18] 杨华,孙丽凤,于维娜. 益肾缓哮颗粒治疗缓解期支气管哮喘疗效观察[J]. 山东中医药大学学报, 2015, 39(1): 48-50.
- [19] 洪日,徐艳玲. 徐艳玲从肺脾肾论治哮喘缓解期[J]. 实用中医内科杂志, 2014, 28(7): 19-21.
- [20] 王醅恩,杨毅,吉博文,等. 儿童 CVA 诱发因素的临床调查及辨证分析[J]. 中华全科医学, 2012, 10(9): 1440-1442.
- [21] 刘竹云,王醅恩,于忠翠. 健儿乐颗粒治疗咳嗽变异型哮喘缓解期儿童 52 例临床观察[J]. 中医杂志, 2010, 51(4): 319-322.
- [22] 王醅恩,杨毅,吉博文,等. 健儿乐颗粒预防 CVA 小鼠气道变应性炎症的实验研究[J]. 陕西中医学院学报[J]. 2012,35(6): 77-80.
- [23] 王雪梅,贾天玉,管彬,等. 黄芪多糖对免疫抑制模型小鼠 Treg 细胞及 Th17 细胞亚群的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(1): 153-157.
- [24] 杨梅,张岩,金昊,等. 冬虫夏草提取物对混合淋巴细胞培养体系 Treg/Th17 轴的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2016, 26(3): 223-230.

(收稿:2015-03-24 修回:2016-03-09)