

· 基础研究 ·

平喘方对哮喘小鼠 NF- κ B 信号通路的调控及对 TLR4 mRNA 和蛋白表达的影响杨艳^{1,2} 薛征¹ 虞坚尔¹ 胡逸中^{1,2} 刘亚尊^{1,2} 徐万超^{1,2}

摘要 目的 研究平喘方通过调节核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路对哮喘小鼠的作用及其对 Toll 样受体 4 (TLR4) mRNA 和蛋白表达的影响。方法 将 60 只 SPF 级雄性 Balb/c 小鼠随机分为空白组、模型组、地塞米松组、平喘方组, 每组 15 只。除空白组外, 其余组均采用先卵清蛋白 (OVA) + 氢氧化铝凝胶 [Al (OH)₃] 腹腔注射致敏, 采用 OVA 雾化激发的方法来建立哮喘模型。地塞米松组、平喘方组分别予 0.075 mg/mL 地塞米松溶液、5.33 g/mL 平喘方灌胃治疗 1 周, 空白组、模型组给予等量生理盐水灌胃。末次给药 24 h 后, 采用 HE、Masson 染色观察肺组织病理变化, ELISA 法检测肺泡灌洗液 (BALF) 白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 浓度, Western Blot 观察肺组织中 NF- κ B 亚单位 (p65)、NF- κ B 的抑制蛋白 (I κ B α)、TLR4、髓样分化因子 (MyD88) 蛋白表达, RT-PCR 法观察 p65、I κ B α 、TLR4、MyD88 mRNA 水平。结果 HE 及 Masson 染色可见模型组小鼠肺组织明显炎症细胞浸润, 上皮基底膜增厚, 胶原纤维增多, 平喘方组小鼠肺部炎性细胞浸润明显减轻, 胶原纤维面积减小; 与空白组比较, 模型组小鼠 BALF 中 IL-6、TNF- α 浓度, 肺组织中 p65、MyD88 蛋白表达及 mRNA 水平, 气管中 TLR4 mRNA 及蛋白表达水平均升高 (均 $P < 0.01$), I κ B α 蛋白表达及 mRNA 水平降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 地塞米松组和平喘方组 BALF 中 IL-6、TNF- α 浓度均降低, MyD88、p65、TLR4 蛋白表达及 mRNA 水平下调 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 地塞米松组 I κ B α 蛋白表达及 mRNA 水平升高 (均 $P < 0.01$), 平喘方组 I κ B α mRNA 水平升高 ($P < 0.01$), I κ B α 蛋白表达上调, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与地塞米松组比较, 平喘方组 BALF 中 IL-6、TNF- α 因子水平、p65 mRNA 水平、TLR4 mRNA 水平、MyD88 蛋白表达及 mRNA 水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), p65 及 TLR4 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。结论 平喘方对 OVA 诱导哮喘小鼠的气道炎症有较好的改善作用, 其机制可能与降低 TLR4 及 MyD88 活性, 调控 NF- κ B 信号通路有关。

关键词 哮喘; 平喘方; 核因子-Kappa B; Toll 样受体 4

Effects of Pingchuan Formula on Asthmatic Mice via NF- κ B Signaling Pathway and Its Impact on TLR4 mRNA Level and Protein Expressions YANG Yan^{1,2}, XUE Zheng¹, YU Jian-er¹, HU Yi-zhong^{1,2}, LIU Ya-zun^{1,2}, and XU Wan-chao^{1,2} 1 Department of Pediatrics, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai (200071); 2 Graduate School, Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai (201203)

ABSTRACT Objective To study the effects of Pingchuan Formula (PCF) on asthmatic mice by regulating nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway, and to observe its effects on Toll-like receptor 4 (TLR4) mRNA level and protein expression. **Methods** Totally 60 male SPF grade Balb/c mice were randomly divided into blank group, model group, dexamethasone group, PCF group, 15 mice in each group. With the exception of the blank group, mice in the other groups were sensitized by intraperitoneal injection of ovalbumin (OVA) + Aluminum Hydroxide Gel [Al (OH)₃], and then OVA atomization excitation to replicate the asthma model. Mice in the dexamethasone group were given dexamethasone solution (0.075 mg/mL) by gastrogavage for one week.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 81874488)

作者单位: 1. 上海中医药大学附属市中医医院儿科 (上海 200071); 2. 上海中医药大学研究生院 (上海 201203)

通讯作者: 薛征, Tel: 021-56639828 转 2303, E-mail: xz695@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20210205.166

Mice in PCF group were treated with PCF (5.33 g/mL) by gastrogavage for one week. Mice in the blank group and the model group were given the same amount of normal saline by gastrogavage for one week. At 24 h after the last administration the pathological changes of lung tissue were observed by HE staining and Masson staining. Levels of IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected by ELISA. The protein expressions of p65 (a subunit of NF- κ B), inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase ($I\kappa$ B α), TLR4, and myeloid differentiation factor-88 (MyD88) in lung tissue were observed by Western Blot. Levels of p65, $I\kappa$ B α , TLR4, and MyD88 mRNA were observed by RT-PCR. **Results** HE and Masson staining showed obvious inflammatory cell infiltration, thickening of epithelial basement membrane, increased collagen fibers in the model group. The infiltration of inflammatory cells in the lung of mice in PCF group was obviously alleviated, and the collagen fiber area was reduced. Compared with the blank group, the levels of IL-6 and TNF- α , the protein expressions and mRNA levels of p65 and MyD88 in lung tissue, as well as the protein and mRNA expressions of TLR4 in trachea all significantly increased (all $P < 0.01$), $I\kappa$ B α protein expression and mRNA levels significantly decreased ($P < 0.01$) in the model group. Compared with the model group, the levels of IL-6 and TNF- α in BALF decreased, p65, TLR4, and MyD88 protein expressions and mRNA levels were down-regulated in dexamethasone and PCF groups ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The protein expression and mRNA level of $I\kappa$ B α significantly increased in dexamethasone group (all $P < 0.01$). $I\kappa$ B α mRNA level increased and the expression of $I\kappa$ B α protein was up-regulated in PCF group ($P < 0.01$), but with no statistical significance ($P > 0.05$). Compared with dexamethasone group, there were no significant differences in the levels of IL-6, TNF- α , p65 mRNA, TLR4mRNA, MyD88 protein expression and mRNA in BALF of PCF group ($P > 0.05$), but the protein expression of p65 and TLR4 increased ($P < 0.05$). **Conclusion** PCF improved the airway inflammation of OVA induced asthma mice possibly related to decreasing activities of TLR4 and MyD88 and regulating NF- κ B signaling pathway.

KEYWORDS asthma; Pingchuan Formula; nuclear factor-Kappa B; Toll-like receptor 4

哮喘是由多种炎性细胞参与的一种气道慢性炎症性疾病,以气道高反应性、可逆性气道阻塞、黏液异常分泌、气道结构改变和重塑为主要特征。目前全球哮喘患者超 3 亿人,并以每 10 年增加 20%~25% 的速率增长,预计到 2025 年将增加至 4 亿^[1,2],影响全球 4.3% 的人口^[3]。尽管随着全球哮喘防治倡议 (Global Initiative for Asthma, GINA) 方案的推广,哮喘治疗取得重大进展,糖皮质激素成为使用最广泛且有效的抗炎药物,但仍有 5%~10% 患者病情未能控制,甚至发展成为对激素不敏感的难治性哮喘^[4]。中药复方可通过多成分、多层次、多靶点、多机理整体调节机体免疫网络发挥治疗作用,目前运用现代技术研究中药复方治疗哮喘的作用机制成为一个重要课题。

哮喘属中医学“哮病”范畴,徐氏儿科历代传人认为,痰瘀互结为哮喘难治性之所在,据此创立平喘方^[5]。临床实践表明,平喘方标本兼治,降气定喘以治其标,化痰祛瘀以除其本,在缓解哮喘患儿症状、改善肺功能、提高免疫力方面疗效显著^[6,7]。课题组前期研究表明,平喘方可通过下调白细胞介素 4 (interleukin-6, IL-4)、IgE、趋化因子巨噬细胞炎性蛋白-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α ,

MIP-1 α) 等炎性因子,扭转辅助性 T 细胞 (T helper cell, Th)/Th2、Th17/调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 细胞平衡治疗哮喘^[8,9]。研究证实 NF- κ B 信号通路在慢性炎症进展过程中具有核心作用,靶向调控 NF- κ B 信号通路及其上游因子可控制炎症反应^[10,11]。本研究旨在探讨平喘方是否通过 NF- κ B 信号通路改善哮喘小鼠气道炎症,并进一步探究其可能的作用机制。

材料与方法

1 动物 SPF 级 Balb/c 雄性小鼠 60 只,4~6 月龄,体重 18~22 g,购于上海斯莱克实验动物有限公司,合格证号: SCXK (沪) 2017-0005。于温度 20~24 $^{\circ}$ C,湿度 50%~70% 环境下,IVC- II 型独立送风笼具中饲养,自由饮食,适应性喂养 1 周。本实验操作严格遵守《关于善待实验动物的指导性意见》^[12],经上海市中医医院动物伦理委员会批准 (No. dw2020003)。

2 药物与试剂 平喘方药物组成及剂量比例为炙麻黄 2、苦杏仁 3、莱菔子 3、炙甘草 2、紫苏子 3、地龙 2、桃仁 3、花椒目 3 组成,饮片为上海市中医医院中药房标准饮片,煎煮提取方法同课题组前期实验^[13],加水旺火煮沸后,温水煮 1 h,

保温 2 h, 将药物浓缩为含生药量 5.33 g/mL。地塞米松片(上海上药信谊药厂, 0.75 mg/片, 批号: HB102079); OVA (Sigma, 批号: A5503); Al(OH)₃ 凝胶、SYBR Green PCR 试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒(Thermo, 批号: 77161、K0223、PICPI23223); IL-6、TNF- α ELISA 试剂盒(X-Y Biotechnology, 批号: E20012、E20020), Trizol (Intitrogen, 批号: 1596-026); 逆转录试剂盒、蛋白预染 Marker (Fermentas, 批号: K1622、SM1811); Tween-20 吐温 (Amresco, 批号: BYL40713); 发光液 (Millipore, 批号: WBKLS0100); I κ B α 抗体 (Bioss, 批号: Bs-1287R); p65 抗体、GAPDH (CST, 批号: #8242, #5174), MyD88 抗体 (Abcam, 批号: Ab2064); 羊抗兔 HRP 标记二抗 (碧云天, 批号: A0208)。

3 仪器 正置显微镜 (Olympus 公司, CX41); 石蜡切片机 (徕克公司, SQ2125); 摊片机 (徕克公司); 显微图象分析系统 (NIKON 公司, DS-Ri2); Real-time 检测仪 (ABI 公司, ABI-7300); 低温冷冻离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司, TG-16M); 移液枪 (吉尔森 P 型移液器公司, Pipetman); 漩涡振荡器 (青浦泸西仪器厂, K30); 电动匀浆机 (FLUKO, PRO200); 电泳仪 (BIORAD 公司, mini protean 3 cell); 电转仪 (大连竞迈科技有限公司, PS-9); 酶标仪 (芬兰雷勃酶标仪, MK3); 水浴锅 (Leica, HI1210); 成像系统 (Tamon, 5200); 超声雾化器: (PARI GmbH, PARI BOYN)。

4 动物造模、分组及给药 SPF 级雄性 Balb/c 小鼠 60 只按随机数字表法分为 4 组: 空白组、模型组、地塞米松组、平喘方组, 每组 15 只。参照文献 [13, 14] 方法进行造模。除空白组之外的各组小鼠, 于第 1 天和第 14 天腹腔注射 0.5 mL 致敏液 (0.375 mL 生理盐水 + 50 μ g OVA + 0.125 mL Al(OH)₃ 凝胶), 第 21~27 天置于雾化箱内, 予 5% OVA 雾化激化, 每次 40 min, 每天 1 次。空白组以等量的生理盐水进行腹腔注射及雾化。各组均于每次雾化激发后 1 h 进行灌胃给药, 平喘方组按 10 mL/kg 的剂量给药 [根据计算公式: $D_{\text{小鼠}} = D_{\text{儿童}} \times R_{\text{小鼠}} / R_{\text{儿童}} \times (W_{\text{儿童}} / W_{\text{小鼠}})^{1/3}$, D 代表用药剂量, R 代表体型系数, W 代表体质量 [15]。平喘方临床常规剂量为 50 g/(kg \cdot d), 相当于 30 kg 儿童药量的 10 倍, 且前期研究发现使用该剂量效果最优 [16], 地塞米松组以等量浓度为 0.075 mg/mL 地塞米松溶液灌胃, 空白组、模型组以等量蒸馏水灌胃。

5 样本采集 末次给药 24 h 后, 对各组小鼠进行脱颈处死, 结扎右侧支气管, 予 1.5 mL 生理盐水进行左侧主支气管灌洗后收集支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF), 离心后取上清液用于 ELISA 检测。右侧肺上叶用 10% 甲醛固定, 肺上叶用 HE 染色、Masson 染色制备肺组织切片; 右侧肺下叶、右侧支气管剪分别碎制成匀浆, 用于 Real-time PCR、Western Blot 技术检测。

6 肺组织病理形态观察

6.1 HE 染色 右肺上叶置于 10% 甲醛固定 48 h 后, 用流水及酒精分别进行清洗、脱水, 用纯二甲苯进行透明处理, 在恒温箱中浸蜡, 完成后再用石蜡包埋, 常规切片。HE 染色后, 通过显微镜拍照, 采集分析样本相关部位。

6.2 Masson 染色 将包埋的肺组织中切片, 脱蜡至水。用配制好 Weigert 铁苏木素染色 5~10 min, 酸性乙醇分化液分化, 水洗, Masson 蓝化液返蓝, 水洗, 品红染色液染色 5~10 min。用弱酸工作液洗 1 min, 磷钼酸溶液洗 1~2 min, 弱酸工作液洗 1 min 后直接入苯胺蓝染色液中染色 1~2 min, 弱酸工作液洗 1 min 后用 95% 乙醇、无水乙醇脱水 3 次, 每次 5~10 s, 二甲苯透明 3 次, 每次 1~2 min, 最后用中性树脂封固。在 200 倍光学显微镜下, 观察每张切片不重复的 5 个视野, 并用 Image J 图片处理软件计算胶原容积分数 (collagen volume fraction, CVF), 即胶原沉积率 [17]。

7 BALF 中 IL-6、TNF- α 因子水平检测 按 ELISA 试剂盒说明书操作, 在 450 nm 处测吸光度值测定标本中 IL-6、TNF- α 浓度。

8 Real-time PCR 检测支气管中 TLR4 mRNA 水平及肺组织中 p65、I κ B α 、MyD88 mRNA 水平 使用 Trizol 试剂提取肺组织及支气管中的总 RNA 后, 进行 Real-time PCR 反应。反应体积为 25 μ L, 反应体系含 SYBRGreen Mix 12.5 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, cDNA 模板 2 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预加热 10 min, 95 $^{\circ}$ C 变形 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 40 个循环后, 在 60 $^{\circ}$ C 保持 1 min, 使产物延伸完整。数据采用仪器自带软件 ABI Prism 7300 SDS Software 记录各样本的 Ct 值, GAPDH 作为参数, 采用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 mRNA 相对表达量。

9 Western Blot 法检测肺组织中 TLR4、p65、I κ B α 、MyD88 蛋白表达水平 肺组织胞核蛋白的提取按照试剂盒说明书进行, 随后依次上样, 电泳, 转膜, 用 BCA 法进行膜上蛋白检测, 将一抗加入封

表 1 Real-time PCR 引物序列

基因名称	引物序列 (5'→3')	长度 (bp)
TLR4	Primer F 5' GCCGTTGGTGATCTTTG 3'	250
	Primer R 5' GCTGTTTGCTCAGGATTC 3'	
GAPDH	Primer F 5' ATCACTGCCACCCAGAAG 3'	191
	Primer R 5' TCCACGACGGACACATTG 3'	
IκBα	Primer F 5' GCTGCCCTATGATGACTG 3'	174
	Primer R 5' GTGTGGTGTGGTGCTAAG 3'	
P65	Primer F 5' GAAGACACGAGGCTACAAC 3'	130
	Primer R 5' TAGAAGGAGCAGGACTCAG 3'	
MyD88	Primer F 5' AACAGAAGCGACTGATTCC 3'	265
	Primer R 5' TCATTGAACACGGTTGAG 3'	

闭液中稀释,按 1:1 000 进行稀释,4 ℃ 孵育过夜后,孵育一抗的膜用 TBST 洗涤 3 次,根据用量,用封闭液稀释二抗,与膜 37 ℃ 孵育 1 min,用 TBST 洗涤 3 次,用 ECL 化学发光试剂盒显示蛋白条带。X 线片在图像分析系统上分析,用 Image J 软件分析条带灰度,以目标蛋白条带灰度值/内参 GAPDH 灰度值表示相应目的蛋白。

10 统计学方法 采用 SPSS 24.0 统计软件。计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组计量资料采用单因素方差分析及 LSD,若不服从条件,先进行变量变换再进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

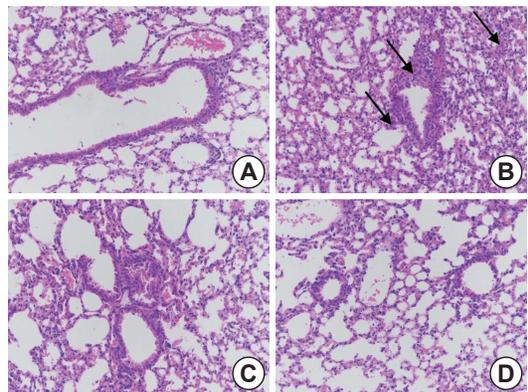
1 动物一般情况 空白组小鼠毛色光亮,饮食、一切活动正常,模型组小鼠烦躁不宁、毛发竖立、不同搔鼻、呼吸加快、口唇发绀、腹肌痉挛及四肢瘫软等表现。经 7 天药物干预后,与模型组比较,各给药组小鼠上述症状不明显,精神可、饮食饮水等一般活动正常。

2 各组小鼠肺组织病理学改变

2.1 HE 染色 (图 1) 高倍镜下,空白组小鼠气道管腔及周围组织平滑,未见炎症细胞浸润。模型组小鼠可见明显炎症细胞浸润,黏液分泌增加,气道黏膜水肿,甚则上皮混合细胞碎屑脱落。给药 7 天后,地塞米松组及平喘方组小鼠上述病理变化程度较模型组轻,组间未见明显差异。

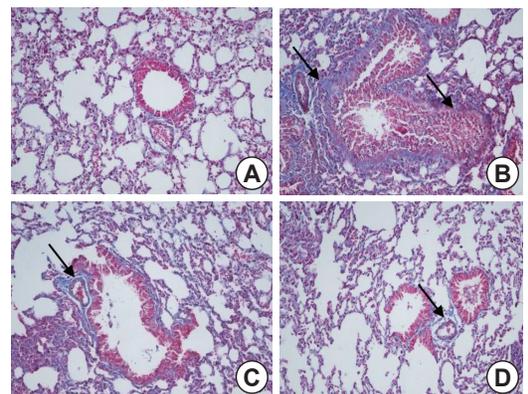
2.2 Masson 染色 (图 2) 空白组可见少许淡蓝色胶原纤维,与空白组比较,模型组上层基底膜增厚,杯状细胞、平滑肌增生,胶原纤维面积明显增多,颜色愈深;与模型组比较,平喘方组、地塞米松组上皮完整性略有恢复。

2.3 各组小鼠 CVF 比较 (表 2) 与空白组比



注: A 为空白组; B 为模型组; C 为地塞米松组; D 为平喘方组; 箭头所指处炎症细胞浸润,黏液分泌增加,气道黏膜水肿

图 1 各组肺组织病理变化 (HE, ×200)



注: A. 为空白组; B 为模型组; C 为地塞米松组; D 为平喘方组; 箭头所指处胶原纤维增多,杯状细胞及平滑肌增生

图 2 治疗 7 天后各组肺组织胶原沉积比较 (Masson, ×200)

较,模型组 CVF 升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,地塞米松组与平喘方组 CVF 降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),平喘方组与地塞米松组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组小鼠 CVF 比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	CVF
空白	10	0.1830 ± 0.0354
模型	10	0.2656 ± 0.0338*
地塞米松	10	0.2126 ± 0.0070 ^{△△}
平喘方	10	0.2168 ± 0.0253 [△]

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

3 各组小鼠 BALF 中 IL-6、TNF-α 水平比较 (表 3) 与空白组比较,模型组小鼠 IL-6、TNF-α 水平升高 ($P < 0.01$),与模型组比较,地塞米松组、

表 3 各组小鼠 BALF 中 IL-6、TNF- α 水平比较 (ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-6	TNF- α
空白	10	71.84 \pm 4.84	216.43 \pm 36.19
模型	10	203.06 \pm 7.80*	733.77 \pm 99.57*
地塞米松	10	91.65 \pm 13.78 Δ	325.03 \pm 65.24 Δ
平喘方	10	100.14 \pm 12.35 Δ	402.20 \pm 83.49 Δ

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

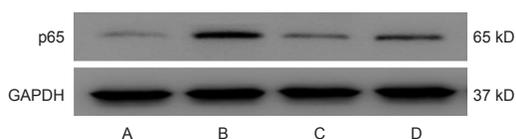
平喘方组 IL-6、TNF- α 水平下降 ($P < 0.01$);平喘方组与地塞米松组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

4 各组小鼠肺组织中 p65 蛋白表达及 mRNA 水平比较 (表 4, 图 3) 与空白组比较,模型组小鼠 p65 蛋白表达、mRNA 水平升高 ($P < 0.01$),与模型组比较,地塞米松组、平喘方组 p65 蛋白表达及 mRNA 水平均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),平喘方组与地塞米松组比较,p65 蛋白表达升高 ($P < 0.05$),p65 mRNA 水平比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 4 各组小鼠肺组织中 p65 蛋白表达及 mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	蛋白	mRNA
空白	10	0.0690 \pm 0.0001	0.0089 \pm 0.0021
模型	10	0.5873 \pm 0.1652*	0.0286 \pm 0.0041*
地塞米松	10	0.1240 \pm 0.0581 $\Delta\Delta$	0.0156 \pm 0.0052 $\Delta\Delta$
平喘方	10	0.3013 \pm 0.1209 $\Delta\Delta$	0.0190 \pm 0.0041 $\Delta\Delta$

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与地塞米松组比较, $\Delta P < 0.05$



注: A 为空白组; B 为模型组; C 为地塞米松组; D 为平喘方组

图 3 各组小鼠肺组织 p65 蛋白表达电泳图

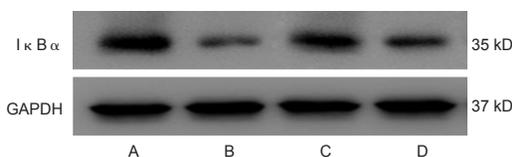
5 各组小鼠肺组织中 I κ B α 蛋白表达及 mRNA 水平比较 (图 4, 表 5) 与空白组比较,模型组 I κ B α 蛋白表达及 mRNA 水平降低 ($P < 0.01$),与模型组比较,地塞米松组 I κ B α 蛋白水平及 mRNA 水平均显著升高 ($P < 0.01$),平喘方组 I κ B α mRNA 水平升高 ($P < 0.01$),I κ B α 蛋白表达升高,但无统计学意义 ($P > 0.05$)。

6 各组小鼠支气管中 TLR4 mRNA 及蛋白表达水平比较 (表 6, 图 5) 与空白组比较,模型组 TLR4 mRNA 及蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),与模型组比较,地塞米松组、平喘方组小

表 5 各组小鼠肺组织 I κ B α 蛋白表达及 mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	蛋白	mRNA
空白	10	1.1307 \pm 0.2136	0.0164 \pm 0.0031
模型	10	0.2463 \pm 0.0960*	0.0054 \pm 0.0009*
地塞米松	10	0.8537 \pm 0.1680 Δ	0.0125 \pm 0.0006 Δ
平喘方	10	0.5050 \pm 0.1656	0.0100 \pm 0.0018 Δ

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$



注: A 为空白组; B 为模型组; C 为地塞米松组; D 为平喘方组

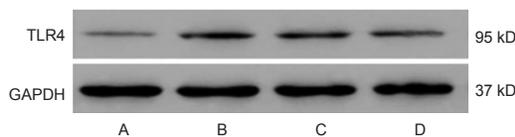
图 4 各组小鼠 I κ B α 蛋白表达电泳图

鼠 TLR4 mRNA 及蛋白表达水平均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),平喘方组与地塞米松组比较,TLR4 mRNA 水平比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),TLR4 蛋白水平升高 ($P < 0.05$)。

表 6 各组小鼠支气管中 TLR4 蛋白表达及 mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	蛋白	mRNA
空白	10	0.1710 \pm 0.0732	0.0197 \pm 0.0061
模型	10	0.5977 \pm 0.1004*	0.0613 \pm 0.0109*
地塞米松	10	0.3909 \pm 0.0820 $\Delta\Delta$	0.0319 \pm 0.0092 $\Delta\Delta$
平喘方	10	0.4412 \pm 0.1303 $\Delta\Delta$	0.0386 \pm 0.0062 $\Delta\Delta$

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与地塞米松组比较, $\Delta P < 0.05$



注: A 为空白组; B 为模型组; C 为地塞米松组; D 为平喘方组

图 5 各组小鼠 TLR4 蛋白表达电泳图

7 各组小鼠支气管中 MyD88 mRNA 及蛋白表达水平比较 (表 7, 图 6) 与空白组比较,模型组小鼠 MyD88 mRNA 及蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$),与模型组比较,地塞米松组、平喘方组小鼠 MyD88 mRNA 及蛋白表达水平均降低 ($P < 0.01$),平喘方组与地塞米松组比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

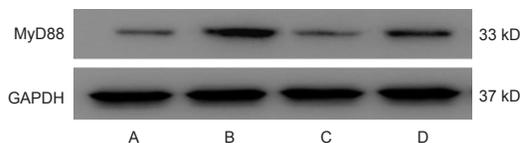
讨 论

中医学认为“痰”“瘀”为哮喘病理基础,气机升降失调为主要病机。徐氏儿科第四代传人虞坚尔

表 7 各组小鼠支气管中 MyD88 蛋白表达及 mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	蛋白	mRNA
空白	10	0.0763 ± 0.0856	0.0085 ± 0.0024
模型	10	0.6240 ± 0.1153*	0.0232 ± 0.0047*
地塞米松	10	0.1547 ± 0.0448 [△]	0.0118 ± 0.0032 [△]
平喘方	10	0.3833 ± 0.0436 [△]	0.0155 ± 0.0036 [△]

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$



注: A 为空白组; B 为模型组; C 为地塞米松组; D 为平喘方组

图 6 各组小鼠 MyD88 蛋白表达电泳图

教授认为,“痰瘀互阻”贯穿哮喘病程始终,而“痰瘀互阻”与现代医学气道炎症和气道重塑的认识有相通之处。肺部炎症细胞浸润、气管内渗出物、分泌物,是产生“痰”的基础,同中医学的“哮喘专主于痰”;气道上皮基底膜增厚,胶原纤维面积增多,气道结构发生重构,与中医学所述的“痰阻气道”相符合,这正是哮喘反复发作、难以根治的原因所在。平喘方基础方为炙麻黄、杏仁、甘草;全方由炙麻黄、杏仁、紫苏子、莱菔子、花椒目、桃仁、地龙、炙甘草组成;标本兼治,宣肺降气以定其喘,化痰以治其本,祛瘀以撼其根。方中炙麻黄宣肺平喘,杏仁降气止咳平喘,两药相向,一升一降,使肺气宣,逆气降,咳喘消,药理研究发现麻黄可明显松弛支气管平滑肌^[18],杏仁可抑制呼吸中枢平喘^[19];紫苏子、莱菔子降气消痰平喘,利膈宽肠,使痰邪可化或走大肠,药理研究发现紫苏子活性成分可镇咳、平喘、抗炎及利水平喘^[20],炒莱菔子能通过调节 IL-5、IgE 和 TNF- α 的含量,从而减轻气道炎症来缓解哮喘症状^[21];桃仁活血祛瘀、润肠通便,使痰邪可祛或从大肠而走,研究表明对于血瘀证,桃仁可通过下调 NF- κ B 总蛋白表达来缓解微循环障碍^[22];地龙活血祛瘀、通络平喘,现代药理研究证明,地龙能显著抑制哮喘小鼠 NF- κ B 的活性,并下调诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和环氧合酶(cyclooxygenase, COX-2)的合成,减少 TNF- α 、IL-6 的产生^[23],地龙与麻黄相配,可扩张支气管、缓解支气管痉挛,地龙与桃仁配伍常用于哮喘日久、兼见瘀血阻络者^[24];炙甘草益气补中、调和诸药,众药合用,共奏理气降逆、化痰平喘、活血祛瘀之功。本研究给药干预时间与前期研究^[13]不同,

各给药组小鼠均于每次雾化激发后 1 h 给药,持续 7 天,即在急性发作期干预。HE 染色和 Masson 染色结果显示哮喘急性发作期小鼠气道发生炎症,同时出现气道重塑,平喘方干预治疗后,气道炎性细胞浸润降低,胶原纤维面积减小,提示在哮喘急性发作期,以平喘药物为底方,适量配伍化痰和祛瘀药物,可有效降低气道炎症及抑制气道重塑。

NF- κ B 是一种经典的转录因子,几乎存在于所有细胞中,参与生长抑制、免疫反应、细胞内信号传递等多个过程。生理状态下, NF- κ B 在胞浆内与抑制性蛋白 I κ B α 结合,以 p65、p50、I κ B 三聚体的形式存在,不具有活性,当受到外界细菌、病毒、细胞因子等刺激后,磷酸化的 I κ B α 与 p65、p50 分离,具有活性的 NF- κ B 由胞浆进入细胞核内,调控相关靶基因的转录,导致多种疾病的发生^[25]。Burke SJ 等^[26]认为 NF- κ B 信号通路激活后参与炎症和免疫反应的调节,是哮喘的重要病理特征。Miraghazadeh B 等^[27]研究发现,在哮喘患者中, NF- κ B 可诱导 Th0 细胞向 Th2 转变及促进 Th2 因子(IL-4, IL-5 和 IL-13)产生,从而介导哮喘气道炎症。IL-6 作为哮喘 Th1/Th2 免疫失衡的调节剂,除了在促进炎症因子释放方面,与 NF- κ B 保持协同性,另可降低 TNF- γ 的产生,抑制 Th0 向 Th1 分化诱导^[28]。TNF- α 是一种重要的炎症启动因子,既能与 IL-6 相互协同共同促炎,又能使血管通透性增强,促进支气管活性物质的释放^[29,30]。值得注意的是, IL-6、TNF- α 是 NF- κ B 信号通路的启动剂,反过来 NF- κ B 信号通路又是 IL-6、TNF- α 的促释放剂,通过反馈环路,炎症反应进一步放大和持续。吸入糖皮质激素是目前治疗哮喘的重要手段,研究发现,激素吸入后临床症状的改善与血清中 IL-6、TNF- α 水平降低有关^[31],究其具体作用机制发现糖皮质激素可阻断 NF- κ B 与 DNA 靶位点的结合,将活化的 NF- κ B 恢复至无转录活性状态^[32,33]。本实验结果显示,模型组小鼠 p65 蛋白表达及 mRNA 转录水平显著上调, I κ B α 蛋白表达及 mRNA 水平显著降低,证实在哮喘模型中 NF- κ B 信号通路被激活。给予平喘方干预后, p65 蛋白表达及 mRNA 转录水平下降, I κ B α 蛋白表达及 mRNA 水平上调, IL-6、TNF- α 浓度随着 NF- κ B 活性降低而下降,提示平喘方可能通过抑制 NF- κ B 通路信号,下调细胞因子的释放从而对 OVA 诱导的哮喘发挥治疗作用。

TLR 属于模式识别受体家族,可及时识别和结合多种病原体相关分子,触发细胞内信号传导通路,

与下游蛋白激酶结合, 诱导转录因子激活, 并启动炎症细胞因子和其他宿主的转录^[34]。在哺乳动物中已发现 11 种 TLRs, TLR2 和 TLR4 是与哮喘关系最密切的成员^[35]。研究发现, 哮喘患者 TLR2、TLR4 mRNA 水平明显高于常人^[34,36]。在哮喘模型小鼠中^[37,38], TLR4 激活后触发 NF- κ B 信号通路, TNF- α 、IL-6、IL-4、IL-5 等表达上调, 而在 TLR4 基因敲除小鼠中^[38], IL-4、IL-5、IL-6、IL-13 的表达明显减轻, 证明 TLR4 参与实验性哮喘气道炎症的发生和发展。有研究表明, 在 OVA 诱导的哮喘小鼠肺组织中, TLR4 和 NF- κ B 水平显著升高, NF- κ B 是 TLR4 的下游靶点^[36,38]。TLR4 拮抗剂可使哮喘小鼠 NF- κ B 活性降低, Th2 因子水平下调, 哮喘减轻, 证实 TLR4/NF- κ B 信号通路是哮喘重要病理机制^[39]。TLR4 通过 MyD88 依赖和 MyD88 独立的方式激活 NF- κ B, 最终刺激促炎因子的产生^[33]。这与本实验结果一致, 平喘方干预的小鼠 TLR4 和 MyD88 的 mRNA 水平及蛋白表达降低, 下游靶点 NF- κ B 活性随之下降, 细胞因子释放受抑制。

综上所述, 平喘方对 OVA 诱导哮喘小鼠的气道炎症有较好的改善作用, 其机制可能与降低 TLR4 及 MyD88 活性, 调控 NF- κ B 信号通路有关。在哮喘急性发作期的治疗方面, 可在平喘药物基础上适时适量配伍化痰药物和祛瘀药物。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma[J]. Nat Med, 2012, 18 (5): 673-683.
- [2] Reddel HK, Bateman ED, Becker A, et al. A summary of the new GINA strategy: a roadmap to asthma control[J]. Eur Respir J, 2015, 46 (3): 622-639.
- [3] Khan I, Ul-Haq Z, Shaheen A, et al. Association of arg16gly and gln27glu, b2-adrenergic receptor gene polymorphism with asthma. A systematic review and meta-analysis of case control studies[J]. J Pak Med Assoc, 2018, 68 (1): 90-97.
- [4] Strek ME. Difficult asthma[J]. Proc Am Thorac Soc, 2006, 3: 116.
- [5] 吴杰, 虞坚尔. 虞坚尔辨证治疗小儿哮喘经验 [J]. 中医杂志, 2011, 52 (13): 1154, 1163.
- [6] 刘斐, 虞坚尔, 薛征, 等. 平喘方治疗小儿哮喘发作期的临床观察 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37 (7): 1633-1636.
- [7] 张新光, 薛征, 虞坚尔, 等. 精简平喘方不同制备方法对哮喘小鼠免疫功能影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20 (5): 19-23.
- [8] 刘斐, 虞坚尔, 白莉. 平喘方对支气管哮喘小鼠肺组织 microRNA126 与 GATA-3 表达的影响 [J]. 中成药, 2013, 11 (35): 2324-2428.
- [9] 朱慧华, 虞坚尔, 张晓峰, 等. 平喘方对支气管哮喘模型小鼠巨噬细胞炎症蛋白 -1 α 水平及 CD86 分子表达的实验研究 [J]. 上海中医药杂志, 2008, 9 (42): 58-62.
- [10] Schuliga M. NF-kappaB signaling in chronic inflammatory airway disease [J]. Biomolecules, 2015, 5: 1266-1283
- [11] Liu W, Zhu H, Fang H. Propofol potentiates sevoflurane-induced inhibition of nuclear factor-kappaB-mediated inflammatory responses and regulation of mitogen-activated protein kinases pathways via Toll-like receptor 4 signaling in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. Am J Med Sci, 2017, 354 (5): 493-505.
- [12] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见 [OL]. <http://www.nost.gov.vn/fggw/zfwj/>
- [13] 刘亚尊, 虞坚尔, 薛征, 等. 平喘方及拆方对哮喘模型小鼠 pDC/cDC 免疫失衡的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33 (6): 2349-2351.
- [14] 张玉昆. IgE 和白细胞介素 -17 对哮喘小鼠急性发作期的影响 [J]. 中国医药科学, 2015, 5 (3): 29-31.
- [15] 孙敬方主编. 实验动物方法学 [M]. 北京, 人民卫生出版社, 2001: 357.
- [16] 朱慧华, 虞坚尔, 张晓峰, 等. 平喘方对支气管哮喘模型小鼠巨噬细胞炎症蛋白 -1 α 水平及 CD86 分子表达的实验研究 [J]. 上海中医药杂志, 2008, 42 (9): 58-62.
- [17] 张宁宁, 吴力群, 霍婧伟, 等. 加味六安煎对咳嗽变异性哮喘大鼠气道重塑病理学形态学的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43 (1): 50-55.
- [18] 赵云生, 谢丽霞, 毛福英, 等. 基于平喘生物效价的麻黄品质评价研究 [J]. 中草药, 2015, 46 (24): 3695-3703.
- [19] 税丕先, 孙琴, 庄元琴, 等. HPLC 测定止咳定喘片中苦杏仁苷的含量 [J]. 中成药, 2007, 29 (12):

- 1870-1872.
- [20] 何育佩, 郝二伟, 谢金玲, 等. 紫苏药理作用及其化学物质基础研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49 (16): 3957-3968.
- [21] 李丽, 殷小杰, 王岚, 等. 炒莱菔子中芥子酸在大鼠体内得药代动力学及 PK-PD 相关性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26 (7): 119-116.
- [22] 以敏, 徐君毅, 邓家刚, 等. 桃仁提取物对寒热不同血瘀证大鼠内皮细胞的损伤及 NF- κ B 表达的影响 [J]. 广西中医药, 2017, 40 (2): 65-69.
- [23] Huang CQ, Li W, Zhang QF, et al. Anti-inflammatory activities of *Guang Pheretima* extract in lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 murine macrophages [J]. BMC Complement Alternat Med, 2018, 18 (1): 46.
- [24] 汪磊, 尤可, 李善刚. 地龙及其配伍在治疗支气管哮喘中的应用 [J]. 亚太传统医药, 2018, 14 (4): 103-105.
- [25] Baba M, Takahashi M, Yamashiro K, et al. Strong cytoplasmic expression of NF- κ B/p65 correlates with a good prognosis in patients with triple-negative breast cancer [J]. Surg Today, 2016, 46 (7): 843-851.
- [26] Burke SJ, Lu D, Sparer TE, et al. NF- κ B and STAT1 control CXCL1 and CXCL2 gene transcription [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2014, 306 (2): E131-E149.
- [27] Miraghazadeh B, Cook MC. Nuclear factor-kappaB in autoimmunity: man and mouse [J]. Front Immunol, 2018, 9: 613.
- [28] Rincon M, Irvin CG. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases [J]. Int J Biol Sci, 2012, 8 (9): 1281-1290.
- [29] Brightling C, Berry M, Amrani Y. Targeting TNF- α : a novel therapeutic approach for asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 121 (1): 5-10.
- [30] 陈俊龙, 云霞. 儿童哮喘与 TNF- α 及 sTNFR 的研究进展 [J]. 内蒙古医学杂志, 2011, 43 (10): 1214-1217.
- [31] 陈华佳, 胡婷. 长期吸入糖皮质激素对支气管哮喘患儿血清中 IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平的影响 [J]. 中南医学, 2008, 4 (4): 485-487.
- [32] Adcock IM, Barnes PJ. Molecular mechanisms of corticosteroid resistance [J]. Chest, 2008, 134 (2): 394-401.
- [33] Rao NA, Mccalman MT, Moulos P, et al. Coactivation of Gr and NF- κ B alters the repertoire of their binding sites and target genes [J]. Genome Res, 2011, 21 (9): 1404-1416.
- [34] Yousri M, Hussein A, Hanan A, et al. Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 polymorphisms and susceptibility to asthma and allergic rhinitis: A case-control analysis [J]. Cellul Immunol, 2012, 274: 34-38.
- [35] Kormann M, Depner M, Hartl D, et al. Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 122 (1): 86-92.
- [36] Zhang H, Yang N, Wang T, et al. Vitamin D reduces inflammatory response in asthmatic mice through HMGB1/TLR4/NFkappaB signaling pathway [J]. Molec Med Rep, 2018, 17 (2): 2915-2920.
- [37] Jiang HH, Duan JY, Xu KH, et al. Resveratrol protects against asthma-induced airway inflammation and remodeling by inhibiting the HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway [J]. Exp Ther Med, 2019, 18 (1): 459-466.
- [38] Li HY, Meng JX, Liu Z, et al. Propofol attenuates airway inflammation in a mast cell-dependent mouse model of allergic asthma by inhibiting the Toll-like receptor 4/reactive oxygen species/nuclear factor kappaB signaling pathway [J]. Inflammation, 2018, 41 (3): 914-923.
- [39] Li M, Wang ZN, Yang LF, et al. TLR4 antagonist suppresses airway remodeling in asthma by inhibiting the T-helper 2 response [J]. Exp Ther Med, 2017, 14: 2911-2916.

(收稿: 2020-08-25 在线: 2021-03-07)

责任编辑: 李焕荣
英文责编: 张晶晶