

· 基础研究 ·

阳和平喘颗粒对哮喘 BMSCs 归巢及 Notch 信号通路的影响

王 坤¹ 朱慧志² 杨 磊¹ 徐晴雯¹ 任冯春¹

摘要 **目的** 观察阳和平喘颗粒通过调控 Notch 信号通路对骨髓间充质干细胞(BMSCs)移植后哮喘大鼠气道炎症的影响。**方法** 取 30 SD 只大鼠随机分为 5 组:正常对照(NC)组、模型对照(MC)组、BMSCs 移植(BMSCs)组、BMSCs 地塞米松组(BMSCs 地米组)、BMSCs 阳和平喘颗粒组(BMSCs 阳和组),每组 6 只。给予大鼠卵清蛋白致敏激发哮喘模型,尾静脉移植 BMSCs。计数支气管肺泡灌洗液(BALF)中嗜酸性粒细胞(E)、嗜中性粒细胞(Neu)、淋巴细胞(L)、单核细胞(MΦ),酶联免疫吸附法检测肺组织白细胞介素(IL)-2、IL-4、CXC 趋化因子受体(CXCR-3)和 CC 趋化因子受体 4(CCR-4),RT-PCR 法检测肺组织 Notch 通路配体 Jagged1 及相关基因重组信号序列结合蛋白-J(RBP-J)、GATA 结合蛋白 3(GATA-3) mRNA 表达,免疫印迹法检测肺组织基质细胞衍生因子-1(SDF-1)、CXC 趋化因子受体(CXCR-4)蛋白表达。**结果** 与 NC 组比较,MC 组 BALF 中炎性细胞总数及各炎性细胞计数显著升高,IL-2、CXCR-3、SDF-1 表达降低,IL-4、CCR-4 表达升高,肺组织 Notch1、Jagged1、RBP-J、GATA-3 表达升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与 MC 组比较,BMSCs 地米组及 BMSCs 阳和组炎性细胞(E、Neu、L、MΦ)数目均减少,IL-2、CXCR-3、SDF-1、CXCR4 表达升高,IL-4、CCR-4 降低,肺组织 Notch1、Jagged1、RBP-J、GATA-3 表达降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与 BMSCs 组比较,BMSCs 地米组 MΦ 数目、IL-4、CCR-4、Notch1、RBP-J 表达降低,BMSCs 阳和组 Neu、MΦ、IL-4、Notch1、RBP-J 表达降低($P<0.05$)。BMSCs 地米组与 BMSCs 阳和组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 阳和平喘颗粒可通过调节 Notch 通路,促进 BMSCs 向哮喘肺组织的归巢率,强化对 Th2 炎症的抑制作用而改善哮喘。

关键词 哮喘;阳和平喘颗粒;间充质干细胞;Notch 信号通路;归巢

Effect of Yanghe Pingchuan Granule on Homing and Notch Signaling Pathway of Asthma BMSCs

WANG Kun¹, ZHU Hui-zhi², YANG Lei¹, XU Qing-wen¹, and REN Feng-chun¹ 1 Graduate School, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei (230012); 2 Department of Respiratory, First Affiliated Hospital, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei (230031)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Yanghe Pingchuan Granule (YHPCG) on the airway inflammation of asthmatic rats after transplantation of bone mesenchymal stem cells (BMSCs) by regulating Notch signaling pathway. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into 5 groups: normal control (NC) group, model control (MC) group, BMSCs transplantation (BMSCs) group, BMSCs dexamethasone group, BMSCs YHPCG group, 6 in each group. The asthma model was sensitized with ovalbumin and then BMSCs were transplanted into the rats via the tail vein. The numbers of eosinophils (E), neutrophils (Neu), lymphocytes (L), and monocytes (MΦ) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were counted. The levels of IL-2, IL-4, CXC chemokine receptor-3 (CXCR-3) and CC chemokine receptor-4 (CCR-4) in lung tissue were detected by ELISA. RT-PCR was used to detect the expressions of Notch pathway ligand Jagged1 and relevant gene recombination signal sequence binding protein-J (RBP-J), GATA binding protein 3 (GATA-3) mRNA. Western blot was used to detect the expressions of stromal cell-derived factor-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No: 81373600)

作者单位: 1. 安徽中医药大学研究生院(合肥 230012); 2. 安徽中医药大学第一附属医院呼吸科(合肥 230031)

通讯作者: 朱慧志, Tel: 0551-62838505, E-mail: huizhizhu87@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200814. 325

1 (SDF-1) and CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) protein in lung tissue. **Results** Compared with the NC group, the total number of inflammatory cells and the count of inflammatory cells in BALF increased significantly, as well as the expressions of IL-4, CCR-4, Notch1, Jagged1, RBP-J, GTAT-3 in lung tissue in the MC group ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the MC group, the numbers of inflammatory cells (E, Neu, L, MΦ) the expressions of IL-4 and CCR-4, as well as the expressions of Notch1, Jagged1, RBP-J and GTAT-3 in lung tissue were lower in BMSCs dexamethasone group and BMSCs Yanghe group. Compared with the MC group, expressions of IL-2, CXCR-3, SDF-1, and CXCR4 were higher in BMSCs dexamethasone group and BMSCs Yanghe group ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the BMSCs group, the numbers of MΦ, IL-4, CCR-4, Notch1, RBP-J in the BMSCs dexamethasone group decreased, and the expressions of Neu, MΦ, IL-4, Notch1 and RBP-J in the BMSCs Yanghe group decreased ($P<0.05$). There was no significant difference between BMSCs dexamethasone group and BMSCs Yanghe group ($P>0.05$). **Conclusion** YHPCG increased the homing rate of BMSCs to asthmatic lung tissue by regulating the Notch pathway, thereby strengthening the inhibitory effect of BMSCs on Th2 inflammation to improve asthma.

KEYWORDS asthma; Yanghe Pingchuan Granule; bone mesenchymal stem cell; Notch signaling pathway; homing

哮喘是临床常见呼吸系统疾病, 主要特征为慢性气道炎症, 其中以辅助 T 细胞(helper T cells, Th)2 细胞占主导的免疫炎症反应在哮喘中起主要作用^[1]。研究发现, Notch 信号通路由于参与了 Th2 型细胞的过度分化, 故而成为哮喘炎症发生发展过程中的重要环节^[2]。研究表明, 来源于骨髓的间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 凭借其强大的免疫调节作用, 在哮喘等多种免疫炎症性疾病中表现出临床治疗潜力^[3,4]。当肺组织出现炎症时所释放的趋化因子(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)与 BMSCs 表面表达的相关受体(CXC chemokine receptor, CXCR)4 结合, 使得 BMSCs 沿着 SDF-1 的浓度梯度由骨髓迁移至受损部位(即“归巢”), 发挥免疫调节作用。中医药在哮喘的治疗中发挥重要作用, 可缓解哮喘气道重塑, 抑制 Th2 细胞优势表达, 改善哮喘气道炎症^[5,6]。阳和平喘汤是安徽中医药大学第一附属医院国家级名老中医胡国俊教授在长期诊治哮喘病证过程中精炼而成的效方, 通过规范化制作工艺及质控标准, 形成质量稳定的颗粒剂(即阳和平喘颗粒), 运用于临床治疗哮喘多年, 并取得了良好的治疗效果^[7]。本课题组已观察到阳和平喘颗粒通过促进 BMSCs 归巢可强化抑制哮喘 Th2 炎症的作用^[8,9]。此次研究基于阳和平喘颗粒对 Notch 信号通路的调控进一步探讨其促进 BMSCs 归巢、改善哮喘炎症的可能作用机制。

材料与方法

1 动物 4~6 周龄清洁级雄性 SD 大鼠 30 只, 体重(200±20)g。(20±2)℃和 12 h 光照-黑暗循环

条件下分笼适应性饲养 1 周左右。整个饲养及实验过程按国家实验动物保护与使用准则进行。大鼠由安徽医科大学实验中心提供, 生产许可证号: SCXK(皖)2017-001, 动物使用许可证号: SYXK(皖)2017-006。本实验由安徽中医药大学动物伦理委员会批准(No.AHUCM-rats-2019005)。

2 试剂及仪器 白细胞介素(Interleukin, IL)-2、IL-4 试剂盒: 美国 RD 公司, 批号分别为: R2000、R4000。CXCR-3 和 CC 趋化因子受体(CC chemokine receptor, CCR)-4 试剂盒: 上海乔羽生物, 批号: QY-R1841、QY-W1168P。PCR 试剂盒: 美国 Thermo Fisher 公司, 批号: 11736059。SDF-1、CXCR4 抗体: 美国 Santa 公司, 批号分别为: sc-74271、sc-53534。显微镜: 日本 OLYMPUS; 超声雾化器: 江苏鱼跃医疗设备股份有限公司; 荧光定量 PCR 仪: Thermo, 型号: PIKOREAL 96。

3 药物 阳和平喘颗粒(熟地黄 15 g 当归 10 g 巴戟天 10 g 五味子 6 g 麻黄 6 g 葶苈子 10 g 桔梗 10 g 白芥子 6 g 旋覆花 9 g)由四川新绿色药业提供; 醋酸地塞米松片购自于上海信谊药厂(0.75 mg/片, 批号: 015180103)。

4 动物分组 30 只大鼠随机均分为 5 组: 正常对照(normal control, NC)组、模型对照(model control, MC)组、BMSCs 移植组(BMSCs 组)、BMSCs 地塞米松组(BMSCs 地米组)、BMSCs 阳和平喘组(BMSCs 阳和组), 每组 6 只。

5 模型制备 模型复制分为致敏和激发两个阶段^[10]。实验第 0、7、14 天, 每只大鼠通过腹腔注射 10% 卵清蛋白(ovalbumin, OVA)溶液(含 10 mg

OVA 和 100 mg 氢氧化铝凝胶的无菌抗原液) 1 mL 致敏,第 21 天开始用 1%OVA 雾化激发 30 min,隔日 1 次,持续 6 周,正常对照组予以生理盐水相同雾化处理。

6 干预方法 首次激发前一天(第 20 天),BMSCs 组、BMSCs 阳和组、BMSCs 地米组分别通过尾静脉将配置好的浓度为 1×10^6 /mL 的 BMSCs 悬液 0.5 mL 植入大鼠体内,NC 组、MC 组予以等量 PBS 尾静脉注射。首次激发后,按成人剂量换算大鼠等效剂量^[11],BMSCs 地米组给予浓度为 0.125 mg/mL 地塞米松溶液(0.125 mg/kg)灌胃(约相当于 70 kg 成人每天 1.5 mg);BMSCs 阳和组给予浓度为 0.86 g/mL 阳和平喘颗粒溶液(7.74 g/kg)灌胃(约相当于成人剂量 6.3 倍)。NC 组、MC 组、BMSCs 组以生理盐水代替治疗药物灌胃。每日给药 1 次,连续 6 周。

7 检测指标及方法

7.1 支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)炎症细胞计数和分类 各组大鼠在末次激发 24 h 后,经腹腔注射 6% 水合氯醛(0.06 mL/kg)麻醉后抽取肺泡灌洗液,后用瑞氏染色法进行染色,置于光学显微镜下进行细胞分类嗜酸性粒细胞(eosinophils, E)、嗜中性粒细胞(neutrophils, Neu)、淋巴细胞(lymphocytes, L)、单核细胞(monocytes, MΦ)计数。

7.2 血清及肺组织 Th1、Th2 细胞因子及趋化因子受体检测 采用酶联免疫吸附法检测 Th1 细胞因子/趋化因子受体 IL-2、CXCR-3、Th2 细胞因子/趋化因子受体 IL-4、CCR-4。在酶标仪上测 OD490 波长 IL-2、IL-4、CXCR-3、CCR-4 值,根据标准曲线计算 IL-2、IL-4、CXCR-3、CCR-4 具体浓度。

7.3 RT-PCR 法检测肺组织 Notch 通路相关基因表达 提取大鼠肺组织总 RNA,采用 RT-PCR 检测肺组织 Notch1、Jagged1、重组信号序列结合蛋白-J(recombination signal sequence binding protein-J, RBP-J)、GATA 结合蛋白 3(GATA binding protein-3, GATA-3) mRNA 表达。引物由上海生工生物公司提供。步骤:使用 NucleoSpin RNA II Kit,通过 MMLV 逆转录酶从 1 mg 总 RNA 中制备互补 DNA,然后使用 GoTaq q-PCR Master Mix 和 7900HT 平台(PE)进行定量 PCR。扩增产物进行 1.5% 琼脂糖电泳,UV 凝胶显像仪扫描并进行图像分析。目的基因 Notch1、Jagged1、RBP-J、GATA-3 与 β -actin 光密度的比值代表目的基因的相对表达含量,数据通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算出。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基金名称	引物序列	片断长度 (bp)
Notch1	上游:5'-GTGCCTGCCCTTTGAGTCTT-3'	148
	下游:5'-GCGATAGGAGCCGATCTCATTG-3'	
Jagged1	上游:5'-CAGGGATTGCCACTTT-3'	140
	下游:5'-GCAGGTTTTGTGTCATT-3'	
	上游:5'-TTCAAAAACCCCGTTGTCTC-3'	141
	下游:5'-CAAAACCAACCAACCAACC-3'	
GATA-3	上游:5'-CCCTTCTCCAAGACGTCCAT-3'	154
	下游:5'-CTTCTCATCTTGCTGGCC-3'	
β -actin	上游:5'-AAGGTGTACGTTGACATCCGTAAAG-3'	120
	下游:5'-CAGCTCAGTAACAGTCCGCCTAGA-3'	

7.4 BMSCs 归巢能力相关蛋白 SDF-1、CXCR4 检测 提取肺组织总蛋白,采用免疫印迹法检测肺组织 SDF-1、CXCR4 蛋白表达。步骤:使用裂解缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1% TritonX-100, 20% 甘油, 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl 和 1 mmol/L PMSF)制备蛋白提取物。将 90 μ g 蛋白质上样到 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上,进行电泳,后转移至硝酸纤维素膜上,将印迹的膜与在 5% 牛奶/TBST 中 1:3 000 稀释的抗白蛋白抗体孵育 24 h。在 TBST 中洗涤 3 次 10 min 后,将膜与 5% 牛奶/PBST 中的辣根过氧化物酶偶联的二抗以 1:2 500 稀释液孵育 3 h。最后将膜在 PBST 中洗涤 3 次,每次 10 min。使用增强的化学发光系统观察 SDF-1、CXCR4 蛋白表达。采用 Image-pro Plus 图像分析软件分析 SDF-1、CXCR4 蛋白表达量。

8 统计学方法 采用 SPSS 12.0 进行统计分析。结果数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,两组组间比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组支气管 BALF 炎症细胞计数比较(表 2) 与 NC 组比较,MC 组 BALF 中炎性细胞总数及各炎性细胞计数显著升高($P < 0.01$)。与 MC 组比较,BMSCs 组、BMSCs 地米组、BMSCs 阳和组炎性细胞 E、Neu、L、MΦ 数目减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 BMSCs 组比较,BMSCs 地米组 MΦ 数目减少,BMSCs 阳和组 Neu、MΦ 数目减少($P < 0.05$)。BMSCs 地米组与 BMSCs 阳和组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2 各组肺组织 Th1、Th2 细胞因子及趋化因子受体表达比较(表 3) 与 NC 组比较,MC 组 IL-2、CXCR-3 表达降低,IL-4、CCR-4 表达升高($P<0.01$)。与 MC 组比较,BMSCs 组、BMSCs 地米组、BMSCs 阳和组 IL-2、CXCR-3 表达升高,IL-4、CCR-4 表达降低($P<0.05, P<0.01$)。与 BMSCs 组比较,BMSCs 地米组 IL-4、CCR-4 表达降低,BMSCs 阳和组 IL-4 表达降低($P<0.05$)。BMSCs 地米组与 BMSCs 阳和组比较,Th1、Th2 细胞因子及趋化因子受体表达差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 各组肺组织 Notch 通路相关基因表达比较(表 4) 与 NC 组比较,MC 组 Notch1、Jagged1、RBP-J、GTAT-3 表达升高($P<0.05, P<0.01$)。与 MC 组比较,BMSCs 组、BMSCs 地米组、BMSCs 阳和组 Notch1、Jagged1、RBP-J、GTAT-3 表达降低($P<0.05, P<0.01$)。与 BMSCs 组比较,BMSCs 地米组、BMSCs 阳和组 Notch1、RBP-J 表达降低($P<0.05$)。BMSCs 地米组与 BMSCs 阳和组比较,Notch 通路相关基因表达差异无统计学意义($P>0.05$)。

4 各组归巢能力相关蛋白 SDF-1、CXCR4 表达比较(表 5,图 1) 与 NC 组比较,MC 组 SDF-1 表达

降低($P<0.05$)。与 MC 组比较,BMSCs 组 CXCR4 表达升高($P<0.05$),BMSCs 地米组、BMSCs 阳和组 SDF-1、CXCR4 表达升高($P<0.05, P<0.01$)。BMSCs 组、BMSCs 地米组、BMSCs 阳和组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 5 各组归巢能力相关蛋白 SDF-1、CXCR4 表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	SDF-1	CXCR4
NC	6	1.02±0.54	0.68±0.19
MC	6	0.54±0.03*	0.85±0.16
BMSCs	6	1.25±0.62	1.14±0.39 [△]
BMSCs 地米	6	1.71±0.74 ^{△△}	1.28±0.66 [△]
BMSCs 阳和	6	1.54±0.68 ^{△△}	1.68±0.73 ^{△△}

注:与 NC 组比较,* $P<0.05$;与 MC 组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$

促进哮喘气道炎症发作。本研究结果发现,与 NC 组比较,MC 组 BALF 中炎性细胞总数及各炎性细胞计数显著升高,肺组织 SDF-1 表达降低。说明致敏后可出现炎性细胞因子和嗜酸性粒细胞向肺组织的聚集,

讨 论

在过敏原的刺激下 Th1/Th2 细胞功能及比例失调,

表 2 各组大鼠 BALF 中炎症细胞总数和分类比较 ($\times 10^6/\text{mL}, \bar{x}\pm s$)

组别	n	E	Neu	L	MΦ
NC	6	0.09±0.03	0.08±0.02	0.11±0.05	1.12±0.15
MC	6	3.56±1.07*	2.26±0.78*	2.85±0.98*	7.73±1.98*
BMSCs	6	1.99±0.58 ^{△△}	1.94±0.79 [△]	1.87±0.69 ^{△△}	5.92±1.15 [△]
BMSCs 地米	6	1.35±0.44 ^{△△}	1.16±0.84 ^{△△}	1.13±0.47 ^{△△}	4.09±1.06 ^{△△△}
BMSCs 阳和	6	1.43±0.72 ^{△△}	0.90±0.68 ^{△△△}	1.17±0.64 ^{△△}	4.11±0.97 ^{△△△}

注:与 NC 组比较,* $P<0.01$;与 MC 组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$;与 BMSCs 组比较,[△] $P<0.05$

表 3 各组肺组织 Th1、Th2 细胞因子及趋化因子受体表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

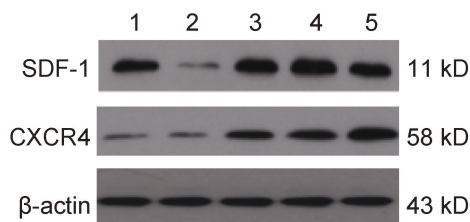
组别	n	IL-2 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	CXCR-3 (ng/mL)	CCR-4 (ng/mL)
NC	6	79.08±12.47	67.48±14.24	24.12±0.63	31.13±8.12
MC	6	50.54±10.35*	96.13±19.43*	10.89±4.98*	48.84±7.51*
BMSCs	6	61.20±9.45 [△]	84.34±12.69 [△]	18.13±11.41 [△]	39.09±9.49 [△]
BMSCs 地米	6	59.20±9.32 [△]	72.27±13.71 ^{△△△}	19.13±10.86 [△]	32.09±10.74 ^{△△△}
BMSCs 阳和	6	62.20±13.42 [△]	75.73±11.38 ^{△△△}	17.13±9.29 [△]	35.09±9.43 ^{△△}

注:与 NC 组比较,* $P<0.01$;与 MC 组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$;与 BMSCs 组比较,[△] $P<0.05$

表 4 各组肺组织 Notch 通路相关基因表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Notch1	Jagged1	RBP-J	GTAT-3
NC	6	0.68±0.22	0.87±0.14	1.03±0.18	0.74±0.13
MC	6	2.14±1.07**	1.19±0.49*	2.84±1.30**	1.90±1.32**
BMSCs	6	1.27±0.68 [△]	0.76±0.21 [△]	2.06±0.63 [△]	1.21±0.46 [△]
BMSCs 地米	6	0.66±0.33 ^{△△△}	0.83±0.28 ^{△△△}	1.69±0.71 ^{△△}	0.89±0.47 [△]
BMSCs 阳和	6	0.78±0.37 ^{△△△}	0.77±0.24 ^{△△}	1.74±0.62 ^{△△}	0.94±0.58 [△]

注:与 NC 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 MC 组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$;与 BMSCs 组比较,[△] $P<0.05$



注:1 为 NC 组;2 为 MC 组;3 为 BMSCs 组;4 为 BMSCs 地米组;5 为 BMSCs 阳和组

图 1 各组大鼠肺组织 SDF-1、CXCR4 蛋白表达

过度分泌 IL-4、IL-5、IL-13 等多种炎症因子,诱导和致使哮喘气道炎症加重。本研究发现,干预后 BMSCs 组和 BMSCs 阳和组炎性细胞 E、Neu、L、MΦ 数目均减少。且与 BMSCs 组比较,BMSCs 阳和组 Neu 数目减少,BMSCs 阳和组肺组织 SDF-1、CXCR4 表达升高。说明 BMSCs 归巢和阳和平喘颗粒干预能显著抑制炎性细胞因子和嗜酸性粒细胞的募集,延缓或改善哮喘炎症发生。

Notch 信号通路参与调控细胞在转录水平的发育和分化及免疫功能的调节^[12]。Notch 受体中的 Notch1 与配体 Jagged1 结合后可促进 Th2 细胞极化和细胞因子的产生。转录因子 GATA-3 是诱导 Th2 型应答最为关键的专一性因子。Notch1 借助于介导 Notch 受体信号的关键转录因子 RBP-J 与 GATA-3 基因结合,激活 GATAT-3 基因而诱导 Th2 细胞分化^[13]。此外,Th2 细胞因子 IL-4 也存在与 RBP-J 的结合位点,诱导 Th2 细胞分化而加重哮喘发作。本研究发现,与 NC 组比较,MC 组 IL-2、CXCR-3 表达降低,IL-4、CCR-4 表达升高,且 MC 组 Notch1、Jagged1、RBP-J、GTAT-3 表达升高。说明 Notch 信号通路作为调节 Th2 细胞分化的关键环节,在哮喘炎症中具有重要影响。BMSCs 是一种多能干细胞,可调节宿主免疫并抑制炎症,这为其治疗哮喘提供可能。研究表明,Notch 信号通路可调节 BMSCs 向损伤组织的归巢。通过阻断 Notch 信号可上调 BMSCs 中 CXCR4 的表达,促进 BMSCs 向损伤部位迁移^[14]。

哮喘属中医学“哮证”的范畴,为本虚标实之证。肾虚为本,痰瘀为标。BMSCs 来源于骨髓,亦属中医学“精”“髓”范畴。肾气的盛衰与现代医学中免疫功能的关系密切相关^[15]。BMSCs 的免疫调节作用与“肾精”在抵御外界病原侵袭方面有异曲同工之处。BMSCs 可能是肾精在细胞水平上的表现形式。阳和平喘颗粒由《椿田医话》阳和饮化裁而来,基于“温运

肾督以煦其上,化痰和营以启肺闭”^[16]理论基础,方中熟地、巴戟天温肾纳气、填精益髓,当归、五味子通补精血,燮调营卫,麻黄、白芥子宣肺化痰、止咳平喘,葶苈子、桔梗、旋覆花宣降相合,化痰利肺,全方攻补兼施,攻而不伤,补而不碍,共奏温肾调营、化痰平喘之功。研究表明,补肾中药能促进 BMSCs 增殖、分化,并通过上调 BMSCs 表面的趋化因子受体 CXCR4 蛋白表达,增强其归巢能力^[17]。前期研究发现,阳和平喘颗粒能升高哮喘患者血清中 IFN-γ 含量,调节 Th1/Th2 细胞因子,减轻气道炎症,还能够有效改善慢性持续期哮喘患者肺功能及生活质量^[7]。通过阳和平喘颗粒干预,哮喘大鼠 IL-13 水平下调,气道炎症好转,黏液分泌及杯状细胞增生改善,气道重塑减轻^[8,18]。本研究发现,阳和平喘颗粒能显著降低炎性细胞如 E、Neu、L、MΦ 数目,提示阳和平喘颗粒可改善 BMSCs 移植后哮喘大鼠气道炎症。进一步观察发现,阳和平喘颗粒能提高 IL-2、CXCR-3、SDF-1、CXCR4 表达水平,且可降低 IL-4、CCR-4、Notch1、Jagged1、RBP-J、GTAT-3 表达。提示阳和平喘颗粒可能调节 Notch1 通路相关基因表达,抑制 Th2 细胞因子/趋化因子表达,上调 Th1 细胞因子表达,使 Th1/Th2 细胞因子再次归于平衡。本研究结果显示,BMSCs 联合阳和平喘颗粒能提高外周血 SDF-1 及 BMSCs 表面 CXCR4 表达,形成骨髓内外 SDF-1 浓度差,促进 BMSCs 向肺组织的归巢及其在体外的迁移。因此,阳和平喘颗粒通过降低 Notch1、配体 Jagged1 及 Th2 细胞因子表达,促进 BMSCs 向哮喘受损肺组织迁移并改善 Th2 炎症反应,抑制哮喘发作。

综上所述,本研究表明阳和平喘颗粒在促进 BMSCs 归巢能力方面可能存在类 Notch 抑制剂样作用。通过抑制 Notch 信号通路过激活,增加血清中 SDF-1、CXCR4 含量,从而提高 BMSCs 归巢率,进一步强化对哮喘 Th2 型炎症的免疫调节作用。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Kim SB, Lee AY, Chun JM, et al. *Anthriscus sylvestris* root extract reduces allergic lung inflammation by regulating interferon regulatory factor 4-mediated Th2 cell activation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 232: 165-175.
- [2] Klaus Bønnelykke, Carole Ober. Leveraging gene-environment interactions and endotypes for asthma gene discovery [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016,

- 137(3): 667-679.
- [3] Mohammadian M, Boskabady MH, Kashani IR, et al. Effect of bone marrow derived mesenchymal stem cells on lung pathology and inflammation in ovalbumin-induced asthma in mouse [J]. Iran J Basic Med Sci, 2016, 19(1): 55-63.
- [4] 任冬花, 关巍, 冯喜英, 等. 骨髓间充质干细胞逆转支气管哮喘小鼠气道重构及其机制[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(18): 4528-4531.
- [5] 江立斌, 戴金峰. 穿山龙总皂苷对哮喘小鼠 BRP-39 表达及 PI3K/AKT 信号通路的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(1): 75-79.
- [6] 宫静, 吴根英, 杨琳. 辛麻颗粒对哮喘小鼠胸腺基质淋巴细胞生成素分泌和 Th2 优势免疫作用的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(7): 855-858.
- [7] 刘洋, 朱慧志. 阳和平喘颗粒干预支气管哮喘慢性持续期肺功能气道炎症的临床研究[J]. 成都中医药大学学报, 2014, 37(3): 52-55.
- [8] 张洁, 朱慧志, 刘向国, 等. 阳和平喘颗粒对哮喘模型大鼠血清 IL-4、IL-5 和 IL-13 的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(11): 2426-2428, 2463.
- [9] 王坤, 朱慧志, 朱舜之, 等. 基于 Treg-SDF1/CXCR4-STAT6 通路观察阳和平喘颗粒对 BMSCs 移植后哮喘大鼠气道炎症的影响[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(5): 2169-2174.
- [10] Palmans E, Kips JC, Pauwels RA. Prolonged allergen exposure induces structural airway changes in sensitized rats [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161(2 Pt 1): 627-635.
- [11] 徐叔云主编. 药理实验方法学[M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 203.
- [12] Matsuno Y, Kiwamoto T, Moroshima Y, et al. Notch signaling regulates cell density-dependent apoptosis of NIH3T3 through an IL-6/STAT3 dependent mechanism[J]. Eur J Cell Biol, 2018, 97(7): 512-522.
- [13] Dua B, Upadhyay R, Natrajan M, et al. Notch signaling induces lymphoproliferation, T helper cell activation and Th1/Th2 differentiation in leprosy[J]. Immunol Lett, 2019, 207: 6-16.
- [14] Xie J, Wang W, Si JW, et al. Notch signaling regulates CXCR4 expression and the migration of mesenchymal stem cells [J]. Cellul Immunol, 2013, 281: 68-75.
- [15] 明溪, 虞坚尔, 李刚, 等. 基于中医“肾精”学说与间充质干细胞的内在相关性探讨补肾药在哮喘治疗中的作用机理[J]. 中医杂志, 2016, 57(16): 1358-1362.
- [16] 朱慧志, 杨程, 周雯, 等. 胡国俊先生哮喘学术思想及辨治经验[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(1): 14-16.
- [17] 刘幸明, 赵永杰, 蔡俊笙, 等. 补肾中药对老化间充质干细胞内外微环境改变及其分化方向调控的影响[J]. 中成药, 2019, 41(9): 2233-2236.
- [18] 黄晖, 朱慧志, 刘璐, 等. 阳和平喘颗粒不同阶段干预对哮喘大鼠气道黏液高分泌及血清 IL-13 水平影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(2): 16-19, 225.
- (收稿: 2020-04-22 在线: 2020-09-17)
- 责任编辑: 李焕荣
英文责编: 张晶晶

《中国中西医结合杂志》第 17 次荣获“百种中国杰出学术期刊”

2020 年 12 月 29 日, 中国科技论文 2019 年统计结果在京发布。《中国中西医结合杂志》被收录为“中国科技核心期刊”并再次荣获“百种中国杰出学术期刊”。

中国科学技术信息研究所每年出版《中国科技期刊引证报告》发布中国科技论文与引文数据库收录的中国科技论文核心期刊的二十余项文献计量指标, 从 1999 年开始以此为基础, 研制了中国科技期刊综合评价指标体系, 对期刊进行综合评定。2002 年开始, 中国科学技术信息研究所每年评选一次百种中国杰出学术期刊。此次是《中国中西医结合杂志》自 2002 年首次评选以来, 第 17 次入选, 充分彰显我刊的学术影响力。

感谢长期以来广大作者、读者以及专家对中国中西医结合杂志社的大力支持, 在此表示由衷的感谢。杂志也愿与广大科研工作者一起努力, 共同促进中西医结合事业发展。