

· 基础研究 ·

阳和平喘颗粒对哮喘大鼠 HMGB1 相关
信号通路蛋白及炎症因子的影响曹晓梅^{1, 2} 朱慧志³ 杨磊¹ 吕川¹

摘要 **目的** 探讨阳和平喘颗粒对哮喘大鼠相关炎症因子及高迁移率蛋白 1 (HMGB1)、Toll 样受体 4 (TLR4)、核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路调控的影响。**方法** 60 只 SD 雄性大鼠按随机数字表法分为正常组, 模型组, 地塞米松组 (0.25 g/kg), 阳和平喘颗粒 (简称阳和) 低 (3.87 g/kg)、中 (7.74 g/kg)、高 (15.48 g/kg) 组, 每组 10 只。联合应用氢氧化铝和卵蛋白致敏诱发大鼠, 建立哮喘的动物模型, 药物干预 4 周。采用 HE 染色观察肺组织病理炎症评分和形态学变化; 吉姆萨染色计肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞 (Eos)、中性粒细胞 (Neu)、淋巴细胞 (Lym) 数量; 动物肺功能仪检测各组大鼠肺功能; 免疫组化法检测肺组织 HMGB1、TLR4、NF- κ B 蛋白表达量; 酶联免疫吸附测定法检测大鼠血清中 IL-5、IL-4、IL-13 含量; Western Blot 法检测各组大鼠肺组织 HMGB1、TLR4、磷酸化核因子- κ B (p-NF- κ B)、磷酸化核因子- κ B 抑制蛋白 (p-I κ B) 蛋白表达情况; 实时荧光定量聚合酶链式反应 (qPCR) 检测各组大鼠肺组织 HMGB1、TLR4、NF- κ B、核因子- κ B 抑制蛋白 (I κ B) mRNA 转录水平。**结果** 与正常组比较, 模型组 HE 染色见大鼠肺组织大量炎性浸润及渗出, 肺泡炎症增加, 上皮细胞明显脱落, 管壁平滑肌厚度增加, 用力肺活量 (FVC)、0.3 秒用力呼气容积 (FEV0.3)、FEV0.3/FVC、呼气峰流量 (PEF)、最大每分钟通气量 (MVV) 及 I κ B 表达下降, 肺组织 HMGB1、TLR4、NF- κ B 表达升高, 大鼠血清中 IL-5、IL-4、IL-13 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较, 阳和各剂量组及地塞米松组气道炎症渗出物减少, 肺泡炎症减少, 平滑肌厚度降低, FVC、FEV0.3、PEF、MVV 升高, IL-5、IL-4、IL-13 水平降低, 肺组织 HMGB1、TLR4、NF- κ B 表达减少, I κ B 表达水平上升 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与阳和低剂量组比较, 阳和中、高剂量组及地塞米松组肺泡炎症评分及气管平滑肌厚度下降, IL-5、IL-4、IL-13 水平降低, MVV、PEF、FVC、FEV0.3 明显升高, 肺组织中 HMGB1、TLR4、NF- κ B 表达减少, I κ B 表达增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与阳和中剂量组比较, 阳和高剂量组及地塞米松组肺泡炎症评分及平滑肌厚度降低, PEF、MVV、FEV0.3、FEV0.3/FVC 水平上升, IL-4、IL-5 表达水平降低, 肺组织 HMGB1、TLR4、NF- κ B 表达减少, I κ B 表达增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)。阳和高剂量组与地塞米松组各指标比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。**结论** 阳和平喘颗粒可通过调节 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路, 降低 Th2 相关细胞因子水平, 抑制 Th2 炎症的进展, 有效改善哮喘大鼠气道炎症。

关键词 阳和平喘颗粒; 支气管哮喘; 高迁移率蛋白 1; Toll 样受体 4; 核因子- κ B; 中药

Effect of Yanghe Pingchuan Granule on HMGB1-Related Signalling Pathway Proteins and Inflammatory Factors in Asthmatic Rats

CAO Xiao-mei^{1, 2}, ZHU Hui-zhi³, YANG Lei¹, and LU Chuan¹
1 Graduate School, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei (230012); 2 Key Laboratory of Xin'an Medical Education Ministry, Hefei (230031); 3 Department of Respiratory, First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei (230031)

ABSTRACT Objective To investigate the effect of Yanghe Pingchuan Granule (YHPCG) on

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. 新安医学教育部重点实验室 (合肥 230031); 3. 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.20230412.044

the regulation of inflammatory factors and high-mobility histone (HMGB1), toll-like receptor 4 (TLR4) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) signalling pathways in asthmatic rats. **Methods** Totally 60 SD male rats were divided into normal group, model group, dexamethasone group ($0.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), low-dose YHPCG group ($3.87 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), medium-dose YHPCG group ($7.74 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and high-dose YHPCG group ($15.48 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) according to random number method, 10 rats in each group. The animal model of asthma was established. After 4 weeks of drug intervention, the pathological inflammatory score and morphological changes of lung tissue were observed by HE staining. The number of eosinophil (Eos), neutrophil (Neu) and lymphocyte (Lym) in alveolar lavage fluid were measured by Giemsa staining. The lung function of rats in each groups was detected by animal lung function instrument. The expression levels of HMGB1, TLR4, and NF- κ B protein in lung tissue were detected by immunohistochemistry. The contents of IL-5, IL-4 and IL-13 in the serum of rats were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Western Blot was used to detect the protein expression of HMGB1, TLR4, phosphorylated nuclear factor kappa B (p-NF κ B), and phosphorylated nuclear factor kappa B inhibitor protein (p-I κ B) and in lung tissues of rats. The transcription levels of HMGB1, TLR4, NF- κ B, and nuclear factor kappa B inhibitor protein (I κ B) mRNA in lung tissues of rats were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR). **Results** Compared with the normal group, HE staining in the model group showed substantial inflammatory infiltration and exudation, alveolar inflammation increased, obvious exudation of epithelial cells, increased thickness of smooth muscle of tube wall, the expression of HMGB1, TLR4, and NF- κ B in lung tissue and the levels of IL-5, IL-4, and IL-13 in serum increased, while forced vital capacity (FVC), forced expiratory volume in 0.3 second (FEV_{0.3}), average flow rate in 0.3 seconds (FEV_{0.3}/FVC), peak expiratory flow (PEF), minute ventilation volume (MVV) and the expression of I κ B decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the airway inflammatory exudate and alveolar inflammation decreased, smooth muscle thickness, IL-5, IL-4, and IL-13 levels decreased, HMGB1, TLR4 and NF- κ B expression decreased, FVC, FEV_{0.3}, PEF, MVV, and I κ B increased in YHPCG groups and dexamethasone group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the low-dose group, alveolar inflammation, smooth muscle thickness, and the levels of IL-5, IL-4 and IL-13 in the medium and high-dose groups along with dexamethasone group decreased, while the expression of HMGB1, TLR4 and NF- κ B in lung tissues decreased, and FVC, FEV_{0.3}, PEF, MVV, and I κ B expression increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the medium-dose group, alveolar inflammation, smooth muscle thickness and the levels of I κ B expression increased IL-4, IL-5 decreased, while the expression of HMGB1, TLR4, NF- κ B in lung tissues decreased, and PEF, MVV, FEV_{0.3}, FEV_{0.3}/FVC and I κ B expression increased in the high-dose group and dexamethasone group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Finally, there was no significant difference between the high-dose group and dexamethasone group ($P > 0.05$). **Conclusion** YHPCG could alleviate airway inflammation in asthmatic rats by regulating the HMGB1/TLR4/NF- κ B signalling pathway, reducing the level of Th2 related cytokines, and inhibiting the progression of Th2 inflammation.

KEYWORDS Yanghe Pingchuan Granule; bronchial asthma; high mobility group box protein; Toll-like receptor 4; nuclear factor kappa B; Chinese herbal medicine

支气管哮喘 (bronchial asthma, 简称哮喘) 是一种累及多种细胞及细胞成分的慢性呼吸道疾病, 特征为气道炎症、气道高反应及黏膜下纤维化^[1]。哮喘发病的流行率占 1%~18%, 广泛影响全世界大约 3.39 亿人^[2, 3]。哮喘主要是由 2 型辅助性 T 细胞 (type 2 T helper cell, Th2) 介导的免疫炎症反应, 以嗜酸性气道炎症为主要特征^[4]。气道炎症反应诱导 Th2 细胞因子过表达, 激活气道嗜酸性粒细胞募集、肥大细胞浸润、黏液生成和气道高反应, 在哮喘免疫发病机制中起重要作用^[5]。高迁移率蛋白 (high mobility

group box protein, HMGB1) 作为嗜酸性粒细胞的化学引诱剂, 有助于促进哮喘患者气道嗜酸性粒细胞增多^[6]。HMGB1 与 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 相结合, 激活下游核因子- κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 信号通路, 以促进气道炎症反应级联^[7]。研究证实, HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路是诱导哮喘肺部炎症细胞因子释放和组织损伤的关键信号通路^[8, 9]。西药治疗哮喘主要包括缓解症状的吸入类固醇 (inhaled corticosteroids, ICS) 等药物, 但长期使用复发率较高且有不良反应, 远期疗效欠佳^[10]。

中药治疗哮喘具有独特优势,不良反应小且患者的耐受性好。阳和平喘汤是国家级名老中医胡国俊在长期临床验证基础上提炼的经典方,经过规范化的制作工艺改良而制作成质量稳定的颗粒剂,多年运用于哮喘的临床治疗并取得良好的疗效^[11]。本课题组前期发现阳和平喘颗粒可改善哮喘患者临床症状和大气道功能,降低气道反应性,减轻气道炎症,有效提高慢性持续期哮喘患者的生活质量^[12]。本文旨在通过卵蛋白(ovalbumin, OVA)联合氢氧化铝建立哮喘大鼠模型,从 HMGB1 关键信号通路研究阳和平喘颗粒治疗哮喘的分子作用机制。

材料与方法

1 动物 选用雄性 SPF 级 SD 大鼠 60 只,5 周龄,体重(200±20)g,购于河南省动物实验中心,生产许可证号:SCXK(豫)2019-0002。饲养于安徽中医药大学实验动物中心,室温 21~23℃,湿度 45%~55%,光照自然,饮水、饮食均自由,笼具、饲料及饮水均按 SPF 级实验动物要求进行制备及消毒,动物实验严格遵守安徽中医药大学伦理委员会的要求并且其对本实验研究予以审批通过(No. AHUCM-rats-2021131)。

2 药物 阳和平喘颗粒(熟地 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 白芥子 6 g 桔梗 10 g 旋覆花 9 g),称取处方量药材,然后加入 8 倍量 80% 乙醇溶液,回流提取每次 1.5 h,提取 2 次后合并,再静置 12 h 后过滤至无醇味。真空干燥成干浸膏后粉碎成细粉,加入干浸膏粉 0.8 倍重量的辅料(微晶纤维素:β-环糊精=3:1),混匀,再加入 95% 的乙醇适量,干燥整粒后装袋(12 g/包)。每克颗粒含生药约 2.7 g,为四川新绿色药业科技有限公司生产,产品批号:20190718。醋酸地塞米松片,0.75 mg/片,上海上药信谊药厂有限公司,批号:015200405。

3 主要试剂及仪器 卵清白蛋白(ovalbumin, OVA, Sigma 公司,批号 AP0028);氢氧化铝(国药集团化学试剂有限公司生产,批号:20190704);柠檬酸盐修复液、PBS 缓冲液粉末、苏木素染液(Ebiogo 公司,批号:11232115、11232114、09232110);HMGB1 抗体(Bioss 公司,批号:AF11297418)、TLR4 抗体(Proteintech 公司,批号:10010906)、磷酸化核因子-κB 抑制蛋白(phosphorylated nuclear factor kappa B inhibitor protein, p-IκB)抗体(Bioworld 公司,批号:CJ36131)、

p-NF-κB 抗体(Santa Cruz,批号:E0818)。生物组织自动脱水机、生物组织包埋机(湖北亚光公司,批号:ZT-12M、YB-7LF);徕卡切片机(Leica 公司,批号:RM2016);LX300 低速迷你离心机(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);微孔板迷你离心机(杭州奥盛仪器有限公司,型号:MINI-P25);电热恒温鼓风干燥箱(上海三发科学仪器有限公司,型号:DHG-9070);肺功能仪器(北京贝兰博科技有限公司,型号:AniRes2003);电泳仪(Tanon 公司,型号:EPS300);高速冷冻离心机(嘉文仪器装备有限公司,型号:JW-3021HR);转膜仪(Tanon 公司,型号:VE-186);荧光定量 PCR 仪(Thermo Scientific,型号:PIKOREAL 96);超声雾化器(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司,型号:402B)。

4 动物造模及分组 复制大鼠慢性哮喘模型^[13],适应性喂养 1 周后,选取月龄 6 周、体重(200±20)g 雄性大鼠,以相近体重分成一组,每 10 只 SD 大鼠为一个区组,分成 6 个区组,采用计算机产生随机数字的方法,将大鼠分成以下 6 组:正常组、模型组、阳和平喘颗粒(简称阳和)低剂量组、阳和中剂量组、阳和高剂量组、地塞米松组。过程分为致敏阶段:除正常组以外,其他各组大鼠在第 1、8 天分别注射致敏混合液 1 mL(10% OVA,含 10 mg OVA 和 100 mg 氢氧化铝),其中腹腔注射 0.5 mL、腹股沟皮下注射 0.5 mL(左右两侧各 0.25 mL)。激发阶段:于第 15 天,将大鼠放入玻璃雾化箱内用超声雾化器以最大雾化量进行雾化吸入激发,OVA 雾化的浓度为 1%,每次雾化 30 min,每天 1 次,连续 4 周。60 只大鼠造模过程中未发生死亡现象。

5 干预方法及标本采集 地塞米松片碾碎后加入生理盐水,配成 0.25 mg/mL 混悬液。按照阳和平喘颗粒成人剂量换算成大鼠的等效剂量^[14]约为 7.74 g/kg,该剂量为本实验研究中大鼠给药中剂量,取中剂量的 1/2 作为低剂量,然后取给药中剂量的 2 倍作为高剂量,即阳和平喘颗粒低、中、高给药量分别为 3.87、7.74、15.48 g/kg(约相当于成人剂量的 3.15、6.3、12.6 倍)。于第 15 天,按照阳和低、中、高三种给药剂量进行中药灌胃,每天 1 次,给药 4 周;地塞米松组按醋酸地塞米松溶液 0.25 mg/kg 灌胃,每天 1 次,给药 4 周;每天则在激发前 1 h 给药。正常组、模型组灌胃生理盐水 10 mL/kg,给药次数及时间同前。末次激发 24 h 之后,予以 3% 戊巴比妥钠 3 mg/kg 注射麻醉,取大鼠的腹主动脉血 4 mL,-20℃保存,备用于 ELISA 检测,肺功能检测后取下右肺

组织置于 10% 甲醛固定。结扎右侧主支气管, 予以 2 mL 生理盐水对左侧主支气管进行灌洗, 灌洗后收集肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF), 先后灌洗 2 次, 每次回收量约为 1.5 mL, 总回收约 3 mL, 用于吉姆萨染色。右肺上叶用于 HE 染色并制备肺组织切片, 右肺下叶保存于液氮罐中, 用于提取并检测总 RNA 及蛋白。

6 检测指标及方法

6.1 HE 染色观察肺组织的病理炎症评分及形态学变化 收集大鼠肺组织并置于 10% 甲醛保存固定, 24 h 后取出, 脱水后用石蜡包埋, 制作成组织切片, 厚度为 3~4 μm , 经苏木素浸染、伊红染液染色, 乙醇脱水, 二甲苯透明处理后, 中性树胶封片, 显微镜下观察大鼠肺组织病理变化。依据炎症评分标准^[15]进行肺炎评分: 0 分: 未见炎症细胞; 1 分: 少量炎症细胞, 肺泡壁结构正常, 肺泡内见少量的巨噬细胞; 2 分: 炎症细胞成环状且周围的支气管旁层厚为 1 个细胞, 肺泡壁结构轻度增厚, 肺泡内见较多的巨噬细胞、嗜酸性粒细胞 (eosinophils, Eos); 3 分: 炎症细胞成环状且周围的支气管旁层厚为 2~4 个细胞, 肺泡壁结构增厚, 肺泡内 30%~50% 见多核巨细胞、嗜酸性粒细胞; 4 分: 炎症细胞成环状且周围的支气管旁层厚为 >4 个细胞, 肺泡壁结构显著增厚, 肺泡内 >50% 见多核巨细胞、嗜酸性粒细胞; 5 分: 完全实变。观察计算支气管平滑肌壁厚度, 利用 Image J 分析测量支气管管腔的内周长 (perimeter internal, Pi), 管壁面积 (wall area, WA), 支气管内平滑肌面积 (smooth muscle area, SMA)。用 Pi 分别对 WA、SMA 进行标准化, WA/Pi 和 SMA/Pi 代表相应管壁的厚度。

6.2 吉姆萨染色观察大鼠肺泡灌洗液中炎症细胞 取大鼠新鲜的肺泡灌洗液, 用离心机 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 取沉淀物均匀涂抹至黏附载玻片上, 厚薄要适宜。将切片滴加甲醇固定 5 min, 蒸馏水稍洗。去除切片上多余液体, 滴加吉姆萨工作液染色 20 min。用自来水从切片一端缓慢冲洗干净。室温干燥切片, 显微镜观察结果, 大鼠气道炎症细胞进行分类 Eos、中性粒细胞 (neutrophils, Neu)、淋巴细胞 (lymphocytes, Lym) 并计数。

6.3 动物肺功能仪检测大鼠肺功能 大鼠末次激发 24 h 后将大鼠麻醉后行气管插管, 然后放置于密闭自制全身体积描记器内。连接气管插管和体描箱, 待数据曲线稳定后开始记录指标用力肺活量 (forced vital capacity, FVC)、0.3 秒用力呼气容积

(forced expiratory volume in 0.3 second, FEV0.3)、0.3 秒内的平均流速 (FEV0.3/FVC)、最大每分钟通气量 (minute ventilation volume, MVV) 及呼气峰流量 (peak expiratory flow, PEF) 指标。

6.4 免疫组化法检测肺组织 HMGB1、TLR4、NF- κ B 蛋白表达 将固定好的肺组织取出, 室温下经梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 将组织蜡块依次通过 3 道二甲苯, 每道 5 min, 再依次过 (100%~95%~80%) 乙醇后, 阻断内源性过氧化物酶, 甩去多余液体, 滴加一抗、二抗, 滴加 DAB 染色, 常规脱水, 透明封片后镜下观察肺组织 HMGB1、TLR4、NF- κ B 表达情况。

6.5 ELISA 检测 IL-13、IL-5、IL-4 因子水平 大鼠腹腔麻醉后抽取腹主动脉血, 室温下让血液自然凝固 10~20 min, 离心 20 min 左右 (2 000~3 000 r/min)。仔细收集上清, 采用酶联免疫吸附法检测大鼠血清中 IL-13、IL-5、IL-4 细胞因子的含量。

6.6 Western Blot 法检测肺组织 HMGB1、TLR4、p-NF- κ B、p-I κ B 蛋白表达 取组织样本 100 mg, 加入 RIPA 细胞裂解液进行裂解。离心后收集上清液, 配置凝胶。使收集的蛋白样品充分变性, 因此按照 1:4 加入 5XSDS-PAGE 蛋白上样缓冲液。恒压电泳 1 h, 恒流转膜, 转膜完毕后漂洗 5 min, 用以洗去膜上的转膜液。加入封闭液 (5% 脱脂奶粉), 在摇床上室温封闭 2 h, 孵育一抗, 加入洗涤液 (PBST), 每次 10 min, 共洗涤 3 次, 再孵育二抗并洗涤, 使用 Image J 软件进行胶片条带的分析。

6.7 qPCR 检测肺组织 HMGB1、TLR4、NF- κ B、I κ B mRNA 转录水平 称取肺组织并剪碎, 液氮研磨成粉末状, 收集粉末, 加入裂解液裂解完全后。离心后取上清。提取总 RNA, 以 cDNA 作为荧光定量模板。变性、退火、延伸后进行 40 个循环 PCR 扩增。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值法进行计算, 以 β -actin 作为实验的内参照, 对目的基因 HMGB1、TLR4、NF- κ B、I κ B mRNA 进行分析。见表 1。

7 统计学方法 采用统计软件 SPSS 26.0 进行分析; 计量资料数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据资料需要满足正态性分布之后, 组之间比较用单因素方差分析法分析, 组间多重比较应用 SNK 法。若定量数据不满足正态性, 则多组相比采用秩和检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

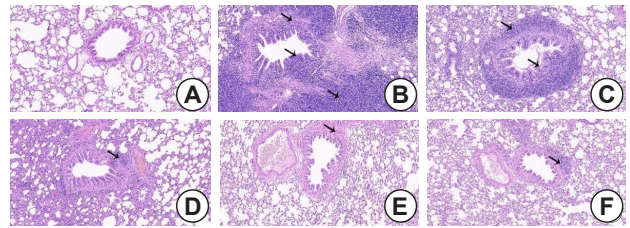
1 大鼠一般情况 正常组大鼠体重逐步增加,

表 1 引物序列

基因名称	引物序列	产物长度 (bp)
β-actin	上游: 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3'	150
	下游: 5'-TTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'	
HMGB1	上游: 5'-TGCCTCGCGGAGGAAAAT-3'	168
	下游: 5'-CTCTGAGCACTTCTTGGAGA-3'	
TLR4	上游: 5'-TAGCCATTGCTGCCAACATC-3'	95
	下游: 5'-ACACCAACGGCTCTGGATAA-3'	
NF-κB	上游: 5'-ACTGCTTTGACTCACTCCATA-3'	78
	下游: 5'-AAGGTATGGGCCATCTGTTGA-3'	
IκB	上游: 5'-GAAATCTGGGGAAGCTCAGC-3'	91
	下游: 5'-TGTTAAATAGCCACACCCCG-3'	

反应灵活,皮毛色泽光亮,饮食活动均正常。模型组大鼠体质量增加缓慢,反应迟缓,皮毛无光泽,同时出现精神状态较差,挠鼻喷嚏,喘息频繁,烦躁抖毛等症状。与模型组比较,各干预组大鼠以上症状均有一定程度减轻,精神、饮食饮水等活动一切正常。

2 各组大鼠肺组织病理学比较(图 1) 正常组大鼠支气管结构完整可见,管壁各层及周围组织均无炎性细胞浸润及纤维组织增生。模型组大鼠气管壁结构破损严重,含有大量炎症细胞,炎性渗出物形成黏液栓,堵塞气道管腔出现明显狭窄,气道上皮明显增生,大量上皮细胞脱落,支气管黏膜下层黏液腺异常增生并扩张。与模型组比较,阳和低剂量组气管壁炎性分泌物、上皮细胞脱落稍减少。与阳和低剂量组比较,阳和中剂量组见部分气管壁炎性细胞浸润,管腔内有少量脱落上皮细胞,黏液渗出物分泌减少。与阳和中剂量组比较,阳和高剂量及地塞米松组管壁结



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为阳和低剂量组;D 为阳和中剂量组;E 为阳和高剂量组;F 为地塞米松组;黑色箭头所示为典型病变处

图 1 各组大鼠肺组织病理变化(HE, ×100)

构清晰可见,支气管及周围炎性细胞浸润程度明显降低,黏膜损害较轻,管腔结构破损较少,上皮变性坏死及上皮细胞脱落明显减少。

3 各组大鼠炎症评分及气管形态学比较(表 2) 与正常组比较,模型组气道及其周围炎症评分及肺泡炎症评分增加,WA/Pi 及 SMA/Pi 增厚($P<0.01$)。与模型组比较,阳和低、中、高剂量组及地塞米松组气道周围炎症评分及肺泡炎症评分降低($P<0.01$),阳和中、高剂量组与地塞米松组 WA/Pi 及 SMA/Pi 厚度下降($P<0.01$)。与阳和低剂量组比较,阳和中、高剂量组及地塞米松组气道及其气道周围炎症评分减少,肺泡炎症评分明显减少,WA/Pi 及 SMA/Pi 厚度下降($P<0.05$, $P<0.01$)。与阳和中剂量组比较,阳和高剂量组及地塞米松组气道及其气道周围及肺泡炎症评分降低,WA/Pi 及 SMA/Pi 厚度明显减少($P<0.01$),阳和各剂量给药组呈现浓度依赖性;阳和高剂量组与地塞米松组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

4 各组大鼠肺功能比较(表 3) 与正常组比较,

表 2 各组大鼠炎症评分及气管形态学比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	气道/气道周围炎症(分)	肺泡炎症(分)	WA/Pi ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)	SMA/Pi ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)
正常	10	0.75 ± 0.46	0.38 ± 0.51	3.77 ± 0.46	3.71 ± 0.79
模型	10	4.88 ± 0.35*	4.63 ± 0.52*	23.27 ± 2.00*	14.90 ± 1.79*
阳和低剂量	10	3.75 ± 0.46 [△]	3.38 ± 0.52 [△]	20.24 ± 1.91	12.85 ± 1.06
阳和中剂量	10	2.86 ± 0.35 ^{△△}	2.38 ± 0.51 ^{△△△}	16.82 ± 1.74 ^{△△}	10.38 ± 0.90 ^{△△}
阳和高剂量	10	1.50 ± 0.54 ^{△△△○}	1.00 ± 0.76 ^{△△△○}	9.06 ± 0.49 ^{△△△○}	6.04 ± 0.92 ^{△△△○}
地塞米松	10	1.63 ± 0.52 ^{△△△○}	1.13 ± 0.64 ^{△△△○}	8.04 ± 0.72 ^{△△△○}	5.28 ± 0.42 ^{△△△○}

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,[△] $P<0.01$;与阳和低剂量组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$;与阳和中剂量组比较,[○] $P<0.01$

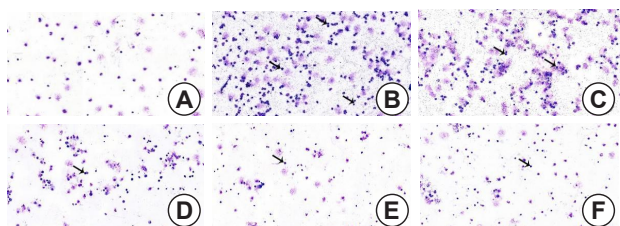
表 3 各组大鼠肺功能 FVC、FEV0.3、FEV0.3/FVC、MVV、PEF 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FVC (mL)	FEV0.3 (mL)	FEV0.3/FVC (%)	MVV (mL/s)	PEF (mL/s)
正常	10	11.750 ± 0.886	7.617 ± 0.359	65.134 ± 5.635	277.330 ± 9.507	38.044 ± 1.123
模型	10	8.750 ± 0.463*	4.066 ± 0.129*	45.583 ± 2.968*	169.440 ± 15.403*	16.646 ± 1.118*
阳和低剂量	10	9.825 ± 0.281 [△]	4.521 ± 0.145 [△]	46.034 ± 1.470	198.400 ± 8.918	19.306 ± 0.651 [△]
阳和中剂量	10	10.875 ± 0.641 ^{△△}	5.186 ± 0.191 ^{△△}	47.816 ± 2.973	228.251 ± 13.620 ^{△△}	24.008 ± 1.802 ^{△△}
阳和高剂量	10	11.375 ± 0.744 ^{△△△○}	6.273 ± 0.229 ^{△△△○}	55.377 ± 4.467 ^{△△△○}	262.869 ± 7.128 ^{△△△○}	32.267 ± 2.251 ^{△△△○}
地塞米松	10	11.500 ± 0.535 ^{△△△○}	6.581 ± 0.184 ^{△△△○}	57.341 ± 3.286 ^{△△△○}	260.521 ± 9.967 ^{△△△○}	32.709 ± 0.840 ^{△△△○}

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,[△] $P<0.01$;与阳和低剂量组比较,[△] $P<0.01$;与阳和中剂量组比较,[○] $P<0.01$

模型组 FVC、FEV0.3、FEV0.3/FVC、MVV、PEF 均明显降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各干预组 FVC、FEV0.3、MVV、PEF 均升高 ($P<0.01$), 阳和高剂量组及地塞米松组 FEV0.3/FVC 升高 ($P<0.01$); 与阳和低剂量组比较, 阳和中、高剂量组及地塞米松组 FVC、FEV0.3、MVV、PEF 水平升高 ($P<0.01$), 阳和高剂量组及地塞米松组 FEV0.3/FVC 水平升高 ($P<0.01$); 与阳和中剂量组比较, 阳和高剂量组及地塞米松组 FEV0.3、FEV0.3/FVC、MVV、PEF 水平均升高 ($P<0.01$); 阳和高剂量组及地塞米松组各指标比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

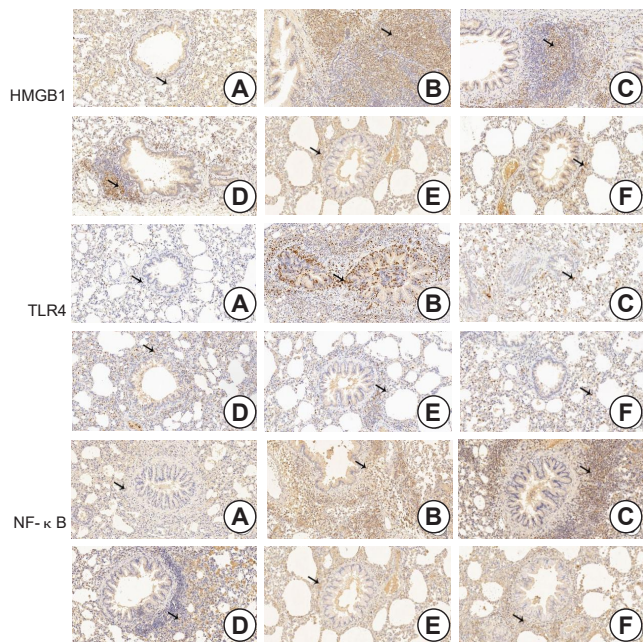
5 各组大鼠肺泡灌洗液中炎症细胞数目比较 (图 2, 表 4) 与正常组比较, 模型组肺泡灌洗液中炎症细胞总数、各种炎症细胞计数明显升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 阳和各剂量组及地塞米松组炎症细胞 Eos、Lym、Neu 数目减少 ($P<0.01$)。与阳和低剂量组比较, 阳和中、高剂量组及地塞米松组炎症细胞 Eos、Lym、Neu 数目减少 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与阳和中剂量组比较, 阳和高剂量组 Lym 数目减少 ($P<0.01$)。阳和高剂量组与地塞米松组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为阳和低剂量组; D 为阳和中剂量组; E 为阳和高剂量组; F 为地塞米松组; 黑色箭头表示炎症细胞

图 2 各组大鼠肺泡灌洗液中炎症细胞数目分类 (Giemsa, $\times 200$)

6 各组大鼠肺组织 HMGB1、TLR4、NF- κ B 表达水平比较 (图 3, 表 5) HMGB1、TLR4 抗体表达位点在细胞核和细胞膜中, 呈棕色或黄色。NF- κ B 抗体在细胞核或细胞质中表达。与正常组比



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为阳和低剂量组; D 为阳和中剂量组; E 为阳和高剂量组; F 为地塞米松组; 黑色箭头所示为阳性表达

图 3 各组大鼠肺组织病理 HMGB1、TLR4、NF- κ B 蛋白变化 (免疫组化, $\times 200$)

较, 模型组肺组织 HMGB1、TLR4、NF- κ B 表达升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 阳和各剂量组及地塞米松组 HMGB1、TLR4、NF- κ B 表达降低 ($P<0.01$)。与阳和低剂量组比较, 阳和中、高剂量及地塞米松组肺组织中 HMGB1、TLR4、NF- κ B 表达均降低 ($P<0.01$)。与阳和中剂量组比较, 阳和高剂量及地塞米松组 HMGB1、TLR4、NF- κ B 表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。阳和高剂量组与地塞米松组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

7 各组大鼠血清 IL-13、IL-5、IL-4 水平比较 (表 6) 与正常组比较, 模型组 IL-4、IL-5、IL-13 水平升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 阳和各剂量组及地塞米松组大鼠血清中 IL-4、IL-5、IL-13 表达水平下降 ($P<0.01$); 与阳和低剂量组比较, 阳和中、高剂量组及地塞米松组 IL-4、IL-5、IL-13 表达水平降

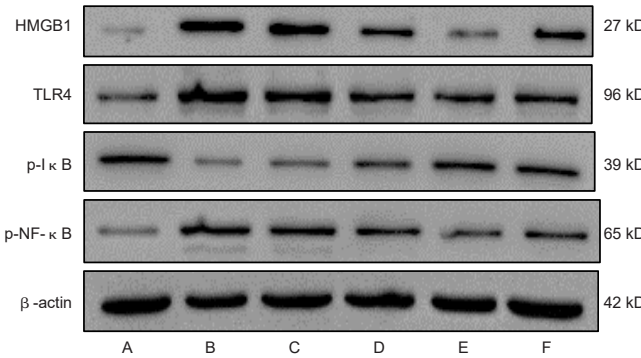
表 4 各组大鼠肺泡灌洗液中炎症细胞数量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Eos ($\times 10^6$ mL)	Neu ($\times 10^6$ mL)	Lym ($\times 10^6$ mL)
正常	10	0.092 $\pm$ 0.005	0.113 $\pm$ 0.011	0.106 $\pm$ 0.008
模型	10	3.947 $\pm$ 0.071*	3.313 $\pm$ 0.154*	3.933 $\pm$ 0.082*
阳和低剂量	10	2.183 $\pm$ 0.101 $^{\Delta}$	2.366 $\pm$ 0.180 $^{\Delta}$	2.073 $\pm$ 0.062 $^{\Delta}$
阳和中剂量	10	1.993 $\pm$ 0.123 $^{\Delta\Delta}$	2.042 $\pm$ 0.064 $^{\Delta\Delta}$	1.896 $\pm$ 0.016 $^{\Delta\Delta\Delta}$
阳和高剂量	10	1.823 $\pm$ 0.029 $^{\Delta\Delta\Delta}$	1.860 $\pm$ 0.065 $^{\Delta\Delta\Delta}$	1.720 $\pm$ 0.025 $^{\Delta\Delta\Delta\Delta}$
地塞米松	10	1.837 $\pm$ 0.094 $^{\Delta\Delta\Delta}$	1.951 $\pm$ 0.071 $^{\Delta\Delta\Delta}$	1.786 $\pm$ 0.079 $^{\Delta\Delta\Delta}$

注: 与正常组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, $^{\Delta}P<0.01$; 与阳和低剂量组比较, $^{\Delta\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta\Delta}P<0.01$; 与阳和中剂量组比较, $^{\Delta\Delta\Delta\Delta}P<0.01$

低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与阳和中剂量组比较, 阳和高剂量组、地塞米松组 IL-4、IL-5 表达水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 阳和高剂量组 IL-13 水平下降 ($P<0.05$); 阳和平喘高剂量组与地塞米松组比较, IL-4、IL-5、IL-13 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

8 各组大鼠肺组织 HMGB1、TLR4、p-NF- κ B、p-I κ B 蛋白表达比较 (图 4, 表 7) 与正常组比较, 模型组大鼠肺组织 HMGB1、TLR4、p-NF- κ B 蛋白表达升高, p-I κ B 降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 阳和各剂量组及地塞米松组 HMGB1、TLR4、p-NF- κ B 蛋白表达降低, p-I κ B 升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与阳和低剂量组比较, 与阳和中、高组及地塞米松组大鼠肺组织 HMGB1、TLR4、p-NF- κ B 蛋白表达水平降低, p-I κ B 上升 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与地塞米松组比较, 阳和高剂量组 HMGB1 蛋白表达降低 ($P<0.05$), TLR4、p-NF- κ B、p-I κ B 蛋白表达差异



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为阳和低剂量组; D 为阳和中剂量组; E 为阳和高剂量组; F 为地塞米松组

图 4 各组大鼠肺组织 HMGB1、TLR4、p-NF- κ B、p-I κ B 蛋白表达电泳图

无统计学意义 ($P>0.05$)。

9 各组大鼠肺组织 HMGB1、TLR4、NF- κ B、I κ B mRNA 转录表达水平比较 (表 8) 与正常组比

表 5 各组大鼠肺组织 HMGB1、TLR4、NF- κ B 蛋白比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HMGB1	TLR4	NF- κ B
正常	10	0.191 ± 0.009	0.196 ± 0.008	0.199 ± 0.015
模型	10	0.655 ± 0.018*	0.708 ± 0.021*	0.754 ± 0.072*
阳和低剂量	10	0.488 ± 0.019 [△]	0.469 ± 0.050 [△]	0.610 ± 0.039 [△]
阳和中剂量	10	0.380 ± 0.025 ^{△△}	0.402 ± 0.005 ^{△△}	0.371 ± 0.056 ^{△△}
阳和高剂量	10	0.286 ± 0.004 ^{△△○○}	0.279 ± 0.016 ^{△△○○}	0.274 ± 0.025 ^{△△○○}
地塞米松	10	0.295 ± 0.006 ^{△△○○}	0.292 ± 0.028 ^{△△○○}	0.289 ± 0.012 ^{△△○○}

注: 与正常组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, [△] $P<0.01$; 与阳和低剂量组比较, [△] $P<0.01$; 与阳和中剂量组比较, ^{○○} $P<0.05$, ^{○○} $P<0.01$

表 6 各组大鼠血清 IL-5、IL-4、IL-13 含量比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-5	IL-4	IL-13
正常	10	29.71 ± 6.31	40.94 ± 9.55	20.58 ± 5.31
模型	10	175.70 ± 28.53*	322.37 ± 69.58*	143.02 ± 21.96*
阳和低剂量	10	123.63 ± 17.86 [△]	206.49 ± 50.11 [△]	101.18 ± 17.43 [△]
阳和中剂量	10	84.68 ± 22.45 ^{△△}	155.89 ± 32.82 ^{△△}	85.49 ± 15.13 ^{△△}
阳和高剂量	10	55.94 ± 19.58 ^{△△○○}	102.05 ± 25.65 ^{△△○○}	57.50 ± 13.47 ^{△△○○}
地塞米松	10	58.62 ± 10.55 ^{△△○○}	95.92 ± 27.72 ^{△△○○}	67.15 ± 5.37 ^{△△}

注: 与正常组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, [△] $P<0.01$; 与阳和低剂量组比较, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$; 与阳和中剂量组比较, ^{○○} $P<0.05$, ^{○○} $P<0.01$

表 7 各组肺组织 HMGB1、TLR4、p-NF- κ B、p-I κ B 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HMGB1	TLR4	p-I κ B	p-NF κ B
正常	10	0.132 ± 0.042	0.279 ± 0.081	0.967 ± 0.028	0.221 ± 0.052
模型	10	1.039 ± 0.094*	0.908 ± 0.046*	0.414 ± 0.116*	0.739 ± 0.076*
阳和低剂量	10	0.772 ± 0.086 [△]	0.745 ± 0.043 ^{△△}	0.525 ± 0.032 ^{△△}	0.649 ± 0.016 ^{△△}
阳和中剂量	10	0.557 ± 0.091 ^{△△}	0.591 ± 0.112 ^{△△}	0.636 ± 0.058 ^{△△}	0.576 ± 0.083 ^{△△}
阳和高剂量	10	0.411 ± 0.066 ^{△△○○}	0.449 ± 0.095 ^{△△○○}	0.804 ± 0.041 ^{△△○○}	0.442 ± 0.056 ^{△△○○}
地塞米松	10	0.559 ± 0.058 ^{△△}	0.483 ± 0.058 ^{△△}	0.768 ± 0.015 ^{△△}	0.478 ± 0.093 ^{△△}

注: 与正常组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, [△] $P<0.01$, ^{△△} $P<0.05$; 与阳和低剂量组比较, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$; 与地塞米松组比较, ^{○○} $P<0.05$

表 8 各组大鼠肺组织 HMGB1、TLR4、NF- κ B、I κ B mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HMGB1	I κ B	TLR4	NF- κ B
正常	10	1.00 $\pm$ 0.073	1.00 $\pm$ 0.042	1.00 $\pm$ 0.104	1.00 $\pm$ 0.066
模型	10	2.30 $\pm$ 0.235*	0.57 $\pm$ 0.107*	1.54 $\pm$ 0.031*	1.56 $\pm$ 0.120*
阳和低剂量	10	1.83 $\pm$ 0.067 $^{\Delta}$	0.72 $\pm$ 0.026 $^{\Delta}$	1.44 $\pm$ 0.024 $^{\Delta}$	1.33 $\pm$ 0.026 $^{\Delta}$
阳和中剂量	10	1.70 $\pm$ 0.033 $^{\Delta\Delta}$	0.79 $\pm$ 0.017 $^{\Delta\Delta}$	1.32 $\pm$ 0.063 $^{\Delta\Delta}$	1.27 $\pm$ 0.027 $^{\Delta\Delta}$
阳和高剂量	10	1.47 $\pm$ 0.193 $^{\Delta\Delta\circ}$	0.90 $\pm$ 0.058 $^{\Delta\Delta\circ\circ}$	1.13 $\pm$ 0.091 $^{\Delta\Delta\circ\circ}$	1.13 $\pm$ 0.070 $^{\Delta\Delta\circ\circ}$
地塞米松	10	1.49 $\pm$ 0.145 $^{\Delta\Delta\circ}$	0.89 $\pm$ 0.069 $^{\Delta\Delta\circ\circ}$	1.14 $\pm$ 0.010 $^{\Delta\Delta\circ\circ}$	1.15 $\pm$ 0.078 $^{\Delta\Delta\circ}$

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $^{\Delta}P<0.01$;与阳和低剂量组比较, $^{\Delta\Delta}P<0.01$;与阳和中剂量组比较, $^{\circ}P<0.05$, $^{\circ\circ}P<0.01$

较,模型组 HMGB1、TLR4、NF- κ B mRNA 表达升高,I κ B mRNA 表达降低($P<0.01$);与模型组比较,阳和各剂量组及地塞米松组 HMGB1、TLR4、NF- κ B mRNA 水平下降,I κ B mRNA 水平升高($P<0.01$)。与阳和低剂量组比较,阳和中、高组及地塞米松组 HMGB1、TLR4、NF- κ B mRNA 表达降低,I κ B mRNA 表达升高($P<0.01$);与阳和中剂量组比较,阳和高剂量组及地塞米松组 HMGB1、TLR4、NF- κ B mRNA 表达降低,I κ B mRNA 表达上升($P<0.05$, $P<0.01$);阳和高剂量组与地塞米松组比较,HMGB1、TLR4、NF- κ B、I κ B mRNA 表达比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

讨 论

哮喘气道炎症反应主要由 Th2 型炎症引起,诱导细胞因子 IL-4、IL-5、IL-13 过表达,激活嗜酸性粒细胞与其前体的募集成熟及杯状细胞分化。IL-4、IL-13 参与黏液产生和杯状细胞增生,以及气道平滑肌和基底膜增厚,IL-4 可促进 Th2,抑制 Th1、IL-5 可促进嗜酸性粒细胞的成熟、活化和转运^[16]。本研究发现,阳和平喘颗粒高剂量组抑制炎症细胞因子分泌和嗜酸性粒细胞募集,减少黏液分泌及杯状细胞增生,降低气道基底膜厚度,阻断 Th2 型炎症反应的进展。

HMGB1 通常位于气道上皮细胞核内,遇过敏原刺激后,从细胞核转移到细胞质,由多种细胞类型主动分泌到细胞外区域^[17, 18]。细胞外 HMGB1 是一种新型介质,通过触发 Th2 型反应,加重过敏性哮喘嗜酸性粒细胞炎症^[19]。TLR4 是哮喘病理生理学中内源性危险信号,也是触发气道上皮细胞普遍表达的受体^[20]。HMGB1 通过增强 TLR4 诱发气道平滑肌收缩和气道重塑参与哮喘病理生理中^[21, 22]。NF- κ B 通路是 HMGB1-TLR4 轴的下游信号通路,调节哮喘炎症细胞因子表达^[23]。I κ B 可结合 NF- κ B 以非活性的状态处于细胞核外,发挥特异性抑制蛋白作用^[24]。

当外界病毒等刺激细胞后,磷酸化 NF- κ B 和 I κ B 靶向多泛素化并快速降解,释放 NF- κ B 二聚体转移到细胞核,导致多种疾病发生^[25]。研究发现,细胞外 HMGB1 高分泌可加重哮喘小鼠气道黏液生成,NF- κ B 可诱导 Th2 极化介导哮喘气道炎症^[26, 27]。这与本研究结果相一致,哮喘模型大鼠中 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路被激活,促进 IL-4、IL-5、IL-13 的释放,阳和平喘颗粒干预后,通过降低嗜酸性粒细胞诱导剂 HMGB1 表达,增加 I κ B 活性,抑制下游 TLR4 及 NF- κ B 激活,降低 Th2 细胞因子水平,促使 CD4⁺T 细胞亚群中 Th1/Th2 分化趋向平衡,降低气道黏液分泌,抑制哮喘气道炎症反应。

哮喘属中医学“哮证”,痰瘀贯穿哮证病程始终。胡国俊教授认为“痰瘀”为反复发作的夙根,与现代医学对气道炎症及重构的阐释息息相通^[28, 29]。肺部多种炎症细胞渗出浸润和杯状细胞增生是“痰伏于肺”潜在的病理因素。痰气痹阻,日久瘀滞气道,痰与瘀血壅滞肺脉,导致痰瘀互结,与管壁基底膜增厚及上皮下纤维化进展相吻合。阳和平喘颗粒在“阳和汤”“平喘汤”经典方基础上优化组方而来,基于“温煦肾督以运其上、活血调营以启肺闭”的理论基础^[28]。全方共 9 味药物组成,方中君药麻黄宣肺平喘;臣药巴戟天、熟地温肾督补精血,当归养血平喘以减巴戟天、熟地滋腻之碍;佐药白芥子与葶苈子豁痰利气,泻肺平喘;使药桔梗与旋覆花升降结合,以助麻黄解表之功,五味子与麻黄一开一合,启闭肺气。全方攻补兼施,共奏化痰之效。现代药理学表明,麻黄含有木犀草素有效成分,降低哮喘小鼠模型气道壁厚度,抑制 NF- κ B 信号通路减轻气道炎症^[30]。当归可抑制 IL-13 分泌,缓解哮喘杯状细胞增生和黏液高分泌^[31]。五味子提取物增强黏液纤毛清除率,抑制炎症介质 IL-8 等释放,增强止咳化痰之效^[32]。桔梗中活性成分桔梗皂苷可抑制肺组织炎症因子祛痰止咳、抗炎^[33]。熟地和巴戟天有效成分可促进 T 淋巴细胞增殖,减少白细胞数量,增强机体免疫力^[12]。白芥

子中化学成分以脂肪酸为主, 可利痰益气^[34]。麻黄与葶苈子共有活性成分槲皮素和 β -谷甾醇通过抑制 IL-6 等表达, 改善哮喘大鼠炎症反应^[35]。旋覆花与桔梗以助麻黄解表之功, 全方功补兼施、共奏化痰之效。前期研究发现, 早期给予阳和平喘颗粒干预可抑制气道黏液分泌和杯状细胞增生, 减轻大鼠气道炎症^[36]。本研究与既往不同^[36], 于第 15 天起每次雾化前 1 h 药物干预, 对哮喘大鼠模型早期发作进行治疗。本研究显示哮喘大鼠肺功能指标显著降低, 炎性细胞数目和肺泡炎症水平升高, 说明哮喘大鼠在致炎后刺激机体释放炎症介质, 参与局部炎症反应中, 导致肺组织病变、气道损伤和通气功能障碍, 提示肺功能降低与炎症细胞因子表达有相关性。阳和平喘颗粒干预后, 随着其浓度的增加, 呈现浓度依赖性改变, 当达到高剂量时可显著减少气道周围炎症细胞数目和肺泡炎症, 通过降低气道嗜酸性粒细胞炎症, 抑制黏液渗出分泌, 修复支气管形态结构及平滑肌厚度, 降低炎症反应对组织器官损伤, 提高肺功能水平, 改善哮喘大鼠的气道炎症和气道重塑的进展。

综上所述, 阳和平喘颗粒对哮喘大鼠模型改善气道炎症方面可能存在类 HMGB1 抑制剂样作用, 促使 TLR4 及 NF- κ B 失活, 提高 I κ B 活性, 抑制促炎因子释放, 干预 Th2 向 Th1 细胞分化, 修复肺功能损伤, 进而抑制免疫炎症反应。本实验存在着不足之处, 如阳和平喘颗粒抑制 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路机制在本研究中未进行充分证实。后续需在 HMGB1 蛋白阻断大鼠或 HMGB1 敲除大鼠上进一步研究, 并优化开展实验方案。本研究发现, 阳和平喘颗粒对 OVA 诱导哮喘大鼠模型具有抑制哮喘气道炎症作用, 为后续的实验与临床研究提供一定的参考。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] Yu L, Li JY. Punicalagin alleviates aged bronchial asthma by inhibiting Th2 differentiation through IL-4/STAT6 and Jagged1/Notch pathways[J]. J Healthc Eng, 2022: 1184677.
- [2] Nassoro DD, Mujwahuzi L, Mwakyula IH, et al. Asthma and COVID-19: emphasis on adequate asthma control[J]. Can Respir J, 2021: 9621572.
- [3] Dharmage SC, Perret JL, Custovic A. Epidemiology of asthma in children and adults[J]. Front Pediatr, 2019, 7: 246.
- [4] Papi A, Brightling C, Pedersen SE, et al. Asthma[J]. Lancet, 2018, 391 (10122): 783–800.
- [5] Lambrecht BN, Hammad H, Fahy JV. The cytokines of asthma[J]. Immunity, 2019, 50 (4): 975–991.
- [6] Wu WL, Gao JL, Chen D, et al. Epithelial microRNA-30a-3p targets RUNX2/HMGB1 axis to suppress airway eosinophilic inflammation in asthma[J]. Respir Res, 2022, 23 (1): 17.
- [7] Shang J, Liu WH, Yin CY, et al. Cucurbitacin E ameliorates lipopolysaccharide-evoked injury, inflammation and MUC5AC expression in bronchial epithelial cells by restraining the HMGB1-TLR4-NF- κ B signaling[J]. Mol Immunol, 2019, 114: 571–577.
- [8] 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.
- [9] Zhang H, Yang N, Wang TY, et al. Vitamin D reduces inflammatory response in asthmatic mice through HMGB1/TLR4/NFkappaB signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2018, 17 (2): 2915–2920.
- [10] Zhou YM, Zhao HH, Wang TS. Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of TMDCT Decoction in eosinophilic asthma through Treg/Th17 Balance[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 819728.
- [11] 汪永忠, 桂洁, 韩燕全, 等. 正交设计优选阳和平喘颗粒的提取工艺 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31 (8): 1705–1708.
- [12] 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.
- [13] Yan YB, Liu LL, Dou ZY, et al. Soufeng Yuchuan Decoction mitigates the ovalbumin induced lung damage in a rat model of asthma[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 125: 109933.
- [14] 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.
- [15] Johnathan M, Gan SH, Ezumi MF, et al. Phytochemical profiles and inhibitory effects of Tiger Milk mushroom (*Lignosus rhinocerus*) extract on

- ovalbumin-induced airway inflammation in a rodent model of asthma[J]. BMC Complement Altern Med, 2016, 16: 167.
- [16] Gandhi NA, Bennett BL, Graham NMH, et al. Targeting key proximal drivers of type 2 inflammation in disease[J]. Nat Rev Drug Discov, 2016, 15 (1): 35–50.
- [17] Min HJ, Park JS, Kim KS. Th2 cytokines-DUOX2-ROS-HMGB1 translocation axis is important in the pathogenesis of allergic rhinitis[J]. Clin Sci, 2021, 135 (3): 483–494.
- [18] Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation[J]. Nature, 2002, 418 (6894): 191–195.
- [19] Ma LB, Zeng JR, Mo BW, et al. High mobility group box 1: a novel mediator of Th2-type response-induced airway inflammation of acute allergic asthma[J]. Thorac Dis, 2015, 7 (10): 1732–1741.
- [20] Liu MX, Lu JJ, Zhang Q, et al. Clara cell 16 KDa protein mitigates house dust mite-induced airway inflammation and damage via regulating airway epithelial cell apoptosis in a manner dependent on HMGB1-mediated signaling inhibition[J]. Mol Med, 2021, 27 (1): 11.
- [21] Candia LD, Gomez E, Venereau E, et al. HMGB1 is upregulated in the airways in asthma and potentiates airway smooth muscle contraction via TLR4[J]. Allergy Clin Immunol, 2017, 140 (2): 584–587.e8.
- [22] Hou CC, Kong JL, Liang Y, et al. HMGB1 contributes to allergen-induced airway remodeling in a murine model of chronic asthma by modulating airway inflammation and activating lung fibroblasts[J]. Cell Mol Immunol, 2015, 12 (4): 409–423.
- [23] Poynter ME, Irvin CG, Janssen-Heininger YMW. Rapid activation of nuclear factor- κ B in airway epithelium in a murine model of allergic airway inflammation[J]. Am J Pathol, 2002, 160 (4): 1325–1334.
- [24] 罗静, 陈光耀, 陈嘉琪, 等. 补骨脂对骨关节炎软骨细胞模型基质金属蛋白酶及核因子- κ B 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41 (12): 1490–1495.
- [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] Li R, Wang J, Zhu FF, et al. HMGB1 regulates T helper 2 and T helper17 cell differentiation both directly and indirectly in asthmatic mice[J]. Mol Immunol, 2018, 97: 45–55.
- [27] Miraghadzadeh B, Cook MC. Nuclear factor-kappaB in autoimmunity: man and mouse[J]. Front Immunol, 2018, 9: 613.
- [28] 朱慧志, 胡国俊先生哮喘学术思想及辨证经验[J]. 辽宁中医药大学报, 2013, 15 (3): 14–17.
- [29] 辛玲杰, 贾新华. 从痰瘀阻络探讨哮喘小气道病变的机制及治疗[J]. 山东中医杂志, 2022, 41 (8): 823–852.
- [30] 郑文江, 谢富淇, 黄慧婷, 等. 基于网络药理学的射干-麻黄药对治疗支气管哮喘的分子机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 19 (25): 182–194.
- [31] 李宝晶, 杨竹雅, 李秀存, 等. 化痰活血方对哮喘小鼠肺泡灌洗液中趋化因子水平以及 Th17 相关细胞因子的影响[J]. 时珍国医国药, 2019, 30 (8): 1797–1801.
- [32] 邢楠楠, 屈怀东, 任伟超, 等. 五味子主要化学成分及现代药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 15 (27): 210–218.
- [33] 单进军, 杨瑞, 张新庄, 等. 桔梗汤止咳祛痰的网络药理学研究[J]. 中草药, 2018, 15 (49): 3501–3508.
- [34] 屈悦, 李瑶, 麦炜彬, 等. 白芥子散治疗哮喘网络药理学作用机制研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23 (8): 56–64.
- [35] 张贝贝, 曾梦楠, 张铭铭, 等. 基于网络药理学及实验验证的“麻黄-葶苈子”药对治疗支气管哮喘的作用研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (18): 4996–5007.
- [36] 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]. 辽宁中医药大学报, 2019, 21 (2): 16–19, 225.

(收稿: 2022-05-12 在线: 2023-05-26)

责任编辑: 白震