

## 桔梗元参汤对过敏性哮喘小鼠气道炎症和黏液分泌的影响及其机制

唐红梅, 李月蛟, 王 星, 王志彬, 袁谢芳, 王孝芸

(西南医科大学附属医院炎症与变态反应实验室, 四川 泸州 646000)

**[摘要]** **目的:** 探讨桔梗元参汤(JGYST)对过敏性哮喘小鼠气道组织炎症和黏液分泌的影响, 并阐明其相关作用机制。**方法:** 40只雄性C57BL/J小鼠随机分为对照组、JGYST组、卵清蛋白(OVA)组及OVA+JGYST组。OVA组和OVA+JGYST组小鼠用50 μg OVA腹腔注射致敏, 每周2次, 致敏后连续7 d用OVA 20 μg滴鼻激发哮喘; OVA+JGYST组小鼠每次OVA激发前1 h用JGYST 200 μL灌胃, 共灌胃7次; 对照组用相同剂量的PBS缓冲液腹腔注射、滴鼻和灌胃; JGYST组小鼠用相同剂量PBS缓冲液腹腔注射和滴鼻, 用相同剂量JGYST灌胃。采用HE染色和过碘酸-雪夫(PAS)染色观察各组小鼠肺组织病理形态表现并计算炎症评分和PAS评分, 流式细胞术检测各组小鼠肺组织中嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、辅助性T淋巴细胞1(Th1)、辅助性T淋巴细胞2(Th2)和树突状细胞(DCs)数及成熟DCs百分率和活性氧(ROS)水平, 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测各组小鼠肺组织中白细胞介素4(IL-4)、白细胞介素10(IL-10)和肿瘤坏死因子α(TNF-α)mRNA表达水平。**结果:** HE染色和PAS染色, 对照组小鼠气道和肺泡结构完整、无炎症细胞浸润, 无黏液分泌; 与对照组比较, OVA组小鼠气道组织周围有大量炎症细胞浸润, 炎症评分和PAS评分明显升高( $P<0.01$ ); 与OVA组比较, JGYST组和OVA+JGYST组小鼠气道组织炎症细胞浸润减少, 炎症评分和PAS评分明显降低( $P<0.01$ )。流式细胞术检测, 与对照组比较, OVA组小鼠肺组织中嗜酸性粒细胞、Th2和DCs数均明显增加( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), 成熟DCs百分率和ROS水平均明显升高( $P<0.01$ ); 与OVA组比较, JGYST组和OVA+JGYST组小鼠肺组织中嗜酸性粒细胞、Th2和DCs数均明显减少( $P<0.01$ ), 成熟DCs百分率和ROS水平均明显降低( $P<0.01$ )。RT-qPCR法检测, 与对照组比较, OVA组小鼠肺组织中IL-4、IL-10和TNF-α mRNA表达水平升高( $P<0.01$ ); 与OVA组比较, JGYST组和OVA+JGYST组小鼠肺组织中IL-4和TNF-α mRNA表达水平降低( $P<0.01$ ), IL-10 mRNA表达水平升高( $P<0.01$ )。**结论:** JGYST可以减轻过敏性哮喘小鼠气道组织炎症和黏液分泌, 其作用机制可能与其减少Th2细胞和DCs数量, 降低ROS水平和促炎细胞因子表达水平同时升高抗炎细胞因子表达水平有关。

**[关键词]** 桔梗元参汤; 哮喘; 气道炎症; 活性氧; 细胞因子

**[中图分类号]** R562 **[文献标志码]** A

## Effect of Jiegeng Yuanshen Tang on airway inflammation and mucus secretion in allergic asthmatic mice and its mechanism

TANG Hongmei, LI Yuejiao, WANG Xing, WANG Zhibin, YUAN Xiefang, WANG Xiaoyun  
(Inflammation and Allergic Reaction Laboratory, Affiliated Hospital, Southwest Medical University,  
Luzhou 646000, China)

**[收稿日期]** 2023-03-28

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金项目(82100021); 西南医科大学自然科学基金项目(2022QN010)

**[作者简介]** 唐红梅(1987-), 女, 四川省泸州市人, 助理研究员, 医学硕士, 主要从事呼吸系统疾病基础和临床方面的研究。

**[通信作者]** 王孝芸, 主管技师(E-mail: lgpl2010@163.com)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the effect of Jiegeng Yuanshen Tang (JGYST) on airway tissue inflammation and mucus secretion in the mice with allergic asthma, and to clarify the related mechanism. **Methods:** Forty male C57BL/J mice were randomly divided into control group, JGYST group, ovalbumin (OVA) group, and OVA + JGYST group. The mice in OVA group and OVA + JGYST group were sensitized with 50  $\mu\text{g}$  OVA via intraperitoneal injection twice weekly, followed by 20  $\mu\text{g}$  OVA nasal drops daily for 7 d to induce asthma; the mice in OVA + JGYST group were gavaged with 200  $\mu\text{L}$  JGYST 1 h before each OVA challenge, and the administration lasted for 7 d; the mice in control group were given equivalent dose of PBS via intraperitoneal injection, nasal drops, and gavage; the mice in JGYST group were given the same dose of PBS for intraperitoneal and nasal administration and gavaged with the same dose of JGYST. The pathomorphology of lung tissue of the mice in various groups was observed by HE staining and periodic acid-Schiff (PAS) staining, and the inflammation and PAS scores were calculated; flow cytometry method was used to detect the numbers of eosinophils, neutrophils, helper T lymphocyte 1 (Th1) cells, helper T lymphocyte 2 (Th2) cells, and dendritic cells (DCs), as well as the percentage of mature DCs and level of reactive oxygen species (ROS) in lung tissue of the mice in various groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) mRNA in lung tissue of the mice in various groups. **Results:** The HE and PAS staining results showed that the mice in control group had intact airway and alveolar structure, without infiltration of inflammatory cells or mucus secretion; compared with control group, there was a large number of infiltrating inflammatory cells in airway tissue of the mice in OVA group, and the inflammation and PAS scores were increased ( $P < 0.01$ ); compared with OVA group, the infiltration of inflammatory cells in airway tissue of the mice in JGYST group and OVA + JGYST group was decreased, and the inflammation and PAS scores were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The flow cytometry results showed that compared with control group, the numbers of eosinophils, Th2 cells, and DCs in lung tissue of the mice in OVA group were increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and the percentage of mature DCs and level of ROS were significantly increased ( $P < 0.01$ ); compared with OVA group, the numbers of eosinophils, Th2 cells, and DCs in lung tissue of the mice in JGYST group and OVA + JGYST group were decreased ( $P < 0.01$ ), and the percentage of mature DCs and level of ROS were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The RT-qPCR results showed that compared with control group, the expression levels of IL-4, IL-10, and TNF- $\alpha$  mRNA in lung tissue of the mice in OVA group were increased ( $P < 0.01$ ); compared with OVA group, the expression levels of IL-4 and TNF- $\alpha$  mRNA in lung tissue of the mice in JGYST group and OVA + JGYST group were decreased ( $P < 0.01$ ), while the expression level of IL-10 mRNA was increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** JGYST can alleviate the airway tissue inflammation and mucus secretion in the mice with allergic asthma, and its mechanism may be related to reducing the number of Th2 cells and DCs, decreasing the ROS level and expression level of proinflammatory cytokine, and increasing the expression level of anti-inflammatory cytokine.

**KEYWORDS** Jiegeng Yuanshen Tang; Asthma; Airway inflammation; Reactive oxygen species; Cytokine

哮喘是由多种细胞和炎症因子介导的慢性呼吸系统疾病, 是危害全球数百万人健康的全球公共卫生问题。目前哮喘临床治疗以西医治疗为主, 包括糖皮质激素、 $\beta$ -受体激动剂和白三烯受体拮抗剂等。虽然上述药物可以缓解哮喘症状, 但也存在产生耐药性、药物疗效明显下降、机体代谢紊乱和免疫力降低等不良反应。与西药比较, 中药具有作用

温和、作用时间长和治疗成本低等优势<sup>[1]</sup>。

桔梗元参汤 (Jiegeng Yuanshen Tang, JGYST) 出自清朝名医黄元御《四圣心源》, 主要成分包括桔梗、元参、杏仁、橘皮、法半夏、茯苓、甘草和生姜, 具有清咽解毒、宣肺平喘及和胃降逆的功效。研究<sup>[2-5]</sup>表明: JGYST 对小儿化脓性扁桃体炎、变应性鼻炎、急性咽炎和急性呼吸道感

染均有治疗作用。关于JGYST对过敏性哮喘的治疗目前尚未见报道。本研究通过建立过敏性哮喘小鼠模型,采用JGYST进行干预,观察JGYST对哮喘小鼠的影响,并探讨其可能的作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物、药物、主要试剂和仪器** 健康雄性C57BL/J小鼠40只,体质量20~35 g,6~8周龄,由重庆腾鑫生物技术有限公司提供,动物使用许可证号:SYXK(川)2018-065。卵清蛋白(ovalbumin, OVA)购自美国Sigma公司,活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,桔梗、玄参、杏仁、陈皮、法半夏、茯苓、甘草和生姜购自北京同仁堂(集团)有限公司,抗CD4、抗CD45、抗CD11c、抗CD11b、抗CD86、抗白细胞介素4(interleukin-4, IL-4)、抗Siglec-F(CD170)、抗Ly6G和抗干扰素 $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )抗体购自美国Invitrogen公司, RNA提取试剂盒和实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)检测试剂盒购自南京诺维赞生物技术有限公司。流式细胞仪购自美国ACEA Biosciences公司, RT-qPCR仪购自瑞士Roche公司。

**1.2 实验分组和哮喘模型制备** 40只雄性C57BL/J小鼠随机分为对照组、JGYST组、OVA组和OVA+JGYST组,每组10只。OVA组和OVA+JGYST组小鼠采用OVA联合氢氧化铝[Al(OH)<sub>3</sub>]腹腔注射致敏,每只小鼠50  $\mu$ g OVA+2.5 mg Al(OH)<sub>3</sub>,每周2次;致敏后每只小鼠连续7 d用20  $\mu$ g OVA滴鼻激发哮喘<sup>[6]</sup>,OVA+JGYST组小鼠在每次OVA激发前1 h用JGYST 200  $\mu$ L灌胃,共灌胃7次;对照组小鼠用相同剂量的PBS缓冲液腹腔注射、滴鼻和灌胃;JGYST组小鼠用相同剂量PBS缓冲液腹腔注射和滴鼻,用相同剂量JGYST灌胃。造模期间密切观察各组小鼠的健康状况。

**1.3 HE染色和过碘酸-雪夫(periodic acid-Schiff, PAS)染色观察各组小鼠肺组织病理形态表现并计算炎症评分和PAS评分** 收集各组小鼠肺组织,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋切片后行HE染色和PAS染色,进行炎症评分和黏液分泌情况评估(PAS评分)。<sup>①</sup>炎症评分。每张切片选取10个区域对气道和血管周围组织炎症细胞浸润严重程度和

浸润总体范围进行评分。浸润严重程度评分:0分,无炎症细胞;1分,<3个炎症细胞;2分,4~10个炎症细胞;3分,>10个炎症细胞;浸润总体范围评分:0分,无炎症细胞浸润;1分,炎症细胞浸润范围<25%;2分,炎症细胞浸润范围25%~75%;3分,炎症细胞浸润范围>75%。结合炎症细胞浸润严重程度和浸润总体范围对炎症进行评分,最高评分可达9分<sup>[7]</sup>。<sup>②</sup>PAS评分。每张切片选取10个区域,对PAS阳性杯状细胞进行PAS评分:0分,PAS阳性杯状细胞百分率<5%;1分,PAS阳性杯状细胞百分率5%~25%;2分,PAS阳性杯状细胞百分率26%~50%;3分,PAS阳性杯状细胞百分率51%~75%;4分,PAS阳性杯状细胞百分率>75%<sup>[8]</sup>。

**1.4 流式细胞术检测各组小鼠肺组织中中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、辅助性T淋巴细胞1(helper T lymphocyte 1, Th1)、辅助性T淋巴细胞2(helper T lymphocyte 2, Th2)和树突状细胞(dendritic cells, DCs)数** 取各组小鼠肺组织,用I型胶原酶和DNA酶消化过滤获得单细胞,用相应抗体在4  $^{\circ}$ C条件下进行染色,0.5 h后上机检测中性粒细胞(CD45+Siglec-F-Ly6G+CD11b+)、嗜酸性粒细胞(CD45+Siglec-F+Ly6G-CD11c-)、Th1细胞(CD45+CD4+IFN- $\gamma$ +)、Th2细胞(CD45+CD4+IL-4+)、成熟DCs(CD45+CD11c+CD86+)和总DCs(CD45+CD11c+)数。结果以各组荧光阳性细胞数表示,采用Flowjo软件对流式细胞术检测结果进行分析,计算成熟DCs百分率。成熟DCs百分率=成熟DCs数/总DCs数 $\times$ 100%。

**1.5 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)荧光探针检测各组小鼠肺组织中ROS水平** 取各组小鼠肺组织,用I型胶原酶和DNA酶裂解,过滤获得单细胞。收集细胞悬浮于用无血清培养液稀释的DCFH-DA(1:1 000, 100  $\mu$ L)中,37  $^{\circ}$ C细胞培养箱中孵育20 min。每隔3~5 min颠倒混匀,使探针和细胞充分接触。用无血清细胞培养液洗涤细胞3次以充分去除未进入细胞内的DCFH-DA。洗涤后加100  $\mu$ L流式上样缓冲液,流式细胞术检测ROS水平。ROS水平以各组细胞的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)表示,采用Flowjo软件对流式细胞术检测结

果进行分析。

**1.6 RT-qPCR法检测各组小鼠肺组织中IL-4、IL-10和TNF- $\alpha$  mRNA表达水平** 采用RNA提取试剂盒分离各组小鼠肺组织总RNA。以RNA为模板, 采用逆转录试剂盒合成cDNA。以cDNA为模板, 采用SYBR qPCR试剂盒检测IL-4、IL-10和TNF- $\alpha$  mRNA表达水平。反应条件: 95  $^{\circ}$ C、10 s, 58  $^{\circ}$ C、10 s, 72  $^{\circ}$ C、10 s, 共40个循环。以GAPDH为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组小鼠肺组织中IL-4、IL-10和TNF- $\alpha$  mRNA表达水平。引物序列见表1。

表1 RT-qPCR引物序列

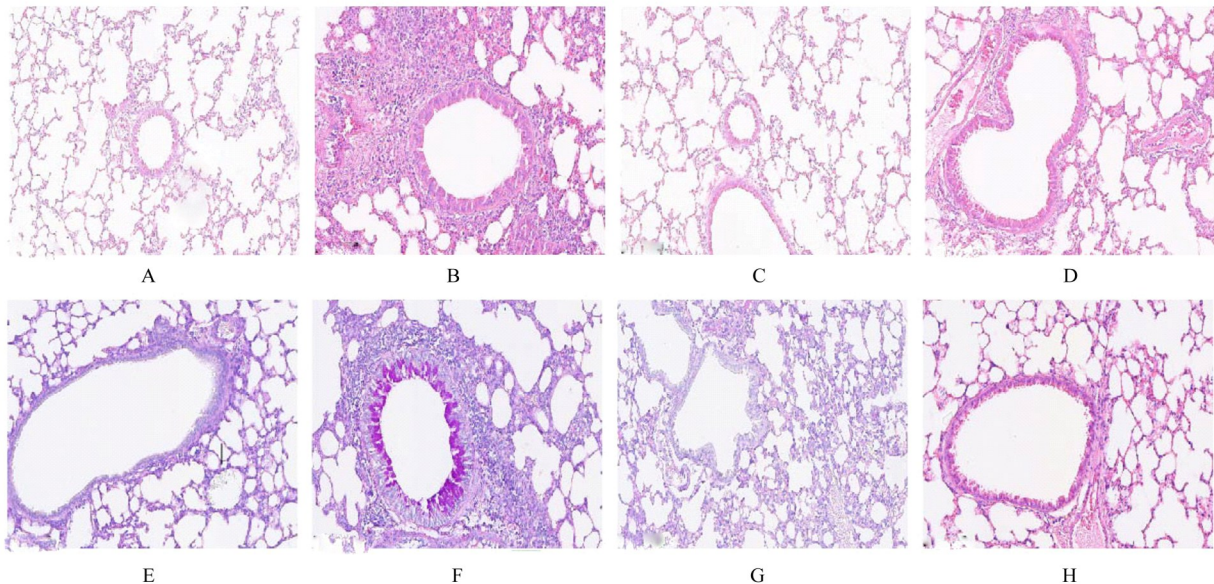
Tab.1 Primer sequences of RT-qPCR

Primer	Sequence(5'-3')
IL-4	Forward: ATCATCGGCATTTTGAACGAGGTC
	Reverse: ACCTTGGAAGCCCTACAGACGA
IL-10	Forward: CGGGAAGACAATAACTGCACCC
	Reverse: CGGTTAGCAGTATGTTGTCCAGC
TNF- $\alpha$	Forward: GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT
	Reverse: GCCATAGAAGTATGATGAGAGGGAG
GAPDH	Forward: CATCACTGCCACCCAGAAGACTG
	Reverse: ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTTCAG

**1.7 统计学分析** 采用SPSS 17.0统计软件进行统计学分析。各组小鼠肺组织炎症评分和PAS评分, 各组小鼠肺组织中中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、Th1细胞、Th2细胞和DCs数, 成熟DCs百分率和ROS水平, 各组小鼠肺组织中IL-4、IL-10和TNF- $\alpha$  mRNA表达水平, 均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用LSD- $t$ 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组小鼠肺组织病理形态表现、炎症评分和PAS评分** HE染色和PAS显示: 对照组小鼠气道和肺泡结构完整、清晰, 无炎症细胞浸润, 无黏液分泌; 与对照组比较, OVA组小鼠气道变窄, 管壁增厚, 黏液分泌增加, 气道组织和血管周围有大量炎症细胞浸润, 炎症评分和PAS评分明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与OVA组比较, JGYST组和OVA+JGYST组小鼠气道组织炎症细胞浸润和黏液分泌明显减少, 炎症评分和PAS评分明显降低 ( $P < 0.01$ )。见图1和表2。



A-D: HE staining; E-H: PAS staining; A,E: Control group; B,F: OVA group; C,G: JGYST group; D,H: OVA+JGYST group.

图1 各组小鼠肺组织HE染色和PAS染色结果( $\times 200$ )

Fig.1 HE staining and PAS staining results of lung tissue of mice in various groups( $\times 200$ )

**2.2 各组小鼠肺组织中嗜酸性粒细胞和中性粒细胞数** 与对照组比较, OVA组小鼠肺组织中嗜酸

性粒细胞数明显增加 ( $P < 0.01$ ); 与OVA组比较, JGYST组和OVA+JGYST组小鼠肺组织中

表2 各组小鼠肺组织炎症评分和PAS评分

Tab. 2 Inflammation scores and PAS scores of lung tissue of mice in various groups ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Group	Inflammation score	PAS score
Control	2.17±0.82	0.67±0.52
OVA	7.75±0.82*	1.83±0.41*
JGYST	2.83±0.61 <sup>△</sup>	0.50±0.55 <sup>△</sup>
OVA+JGYST	4.50±0.84 <sup>△</sup>	0.83±0.41 <sup>△</sup>

\* $P<0.01$  compared with control group; <sup>△</sup> $P<0.01$  compared with OVA group.

嗜酸性粒细胞数明显减少 ( $P<0.01$ )。各组小鼠肺组织中中性粒细胞数比较差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见表3。

**2.3 各组小鼠肺组织中Th1和Th2细胞数** 与对照组比较, OVA组小鼠肺组织中Th2细胞数明显增加 ( $P<0.01$ ); 与OVA组比较, JGYST组和OVA+JGYST组小鼠肺组织中Th2细胞数明显减少 ( $P<0.01$ )。各组小鼠肺组织中Th1细胞数比较差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见表4。

**2.4 各组小鼠肺组织中DCs数** 与对照组比较, OVA组小鼠肺组织中总DCs数和成熟DCs数明显增加 ( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), 成熟DCs百分率明显升高 ( $P<0.01$ ); 与OVA组比较, JGYST组

表3 各组小鼠肺组织中嗜酸性粒细胞和中性粒细胞数

Tab. 3 Numbers of eosinophils and neutrophils in lung tissue of mice in various groups ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Group	Number of eosinophils	Number of neutrophils
Control	603.33±293.62	857.50±326.55
OVA	9 957.67±5 692.08*	3 261.50±3 144.02
JGYST	382.33±140.36 <sup>△</sup>	673.50±195.18
OVA+JGYST	3 222.00±1 843.63 <sup>△</sup>	3 569.00±2 212.35

\* $P<0.01$  compared with control group; <sup>△</sup> $P<0.01$  compared with OVA group.

表4 各组小鼠肺组织中Th1和Th2细胞数

Tab. 4 Numbers of Th1 and Th2 cells in lung tissue of mice in various groups ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Group	Number of Th1	Number of Th2
Control	664.00±707.45	167.33±51.76
OVA	377.67±410.03	1 234.33±456.00*
JGYST	323.83±113.95	204.83±84.02 <sup>△</sup>
OVA+JGYST	401.67±264.29	496.67±275.74 <sup>△</sup>

\* $P<0.01$  compared with control group; <sup>△</sup> $P<0.01$  compared with OVA group.

和OVA+JGYST组小鼠肺组织中总DCs数和成熟DCs数明显减少 ( $P<0.01$ ), 成熟DCs百分率明显降低 ( $P<0.01$ )。见表5。

表5 各组小鼠肺组织中总DCs数、成熟DCs数和成熟DCs百分率

Tab. 5 Numbers of total DCs, mature DCs and percentages of mature DCs in lung tissue of mice in various groups

( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Group	Number of total DCs	Number of mature DCs	Percentage of mature DCs ( $\eta/\%$ )
Control	1 7291.83±3 202.22	2 324.17±527.28	13.54±2.28
OVA	36 178.33±16 558.82*	28 040.50±13 712.93**	76.85±7.08**
JGYST	13 857.67±3 931.81 <sup>△</sup>	1 977.83±848.21 <sup>△</sup>	13.78±3.07 <sup>△</sup>
OVA+JGYST	16 398.33±6 992.92 <sup>△</sup>	8 022.67±5 424.33 <sup>△</sup>	45.00±13.49 <sup>△</sup>

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control group; <sup>△</sup> $P<0.01$  compared with OVA group.

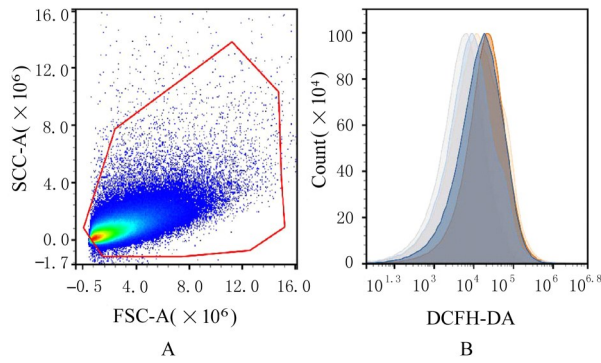
**2.5 各组小鼠肺组织中ROS水平** 与对照组比较, OVA组小鼠肺组织中ROS水平明显升高 ( $P<0.01$ ); 与OVA组比较, JGYST组和OVA+JGYST组小鼠肺组织中ROS水平明显降低 ( $P<0.01$ )。见图2和表6。

**2.6 各组小鼠肺组织中IL-4、IL-10和TNF- $\alpha$  mRNA表达水平** 与对照组比较, OVA组小鼠肺组织中IL-4、IL-10和TNF- $\alpha$  mRNA表达水平均明显升高 ( $P<0.01$ ); 与OVA组比较, JGYST组

小鼠组织中IL-4、IL-10和TNF- $\alpha$  mRNA表达水平均明显降低 ( $P<0.01$ ); OVA+JGYST组小鼠肺组织中IL-4和TNF- $\alpha$  mRNA水平明显降低 ( $P<0.01$ ), IL-10 mRNA表达水平明显升高 ( $P<0.01$ )。见图3。

### 3 讨论

中药在防治哮喘方面积累了丰富的经验, 且具有较好的临床效果<sup>[9-11]</sup>。研究<sup>[2-4]</sup>表明: JGYST可用于治疗小儿化脓性扁桃体炎、变应性鼻炎和急性



A: Number of total cells; B: Level of ROS.

图2 DCFH-DA 荧光探针检测各组小鼠肺组织中 ROS 水平

Fig. 2 Levels of ROS in lung tissue of mice in various groups detected by DCFH-DA fluorescence probe

咽炎等, 然而 JGYST 是否对哮喘有效尚未见文献报道。本研究采用 JGYST 对过敏性哮喘小鼠进行干预, 结果显示: JGYST 可减轻哮喘小鼠气道组织炎症细胞浸润, 减少嗜酸性粒细胞数量并且抑制

表6 各组小鼠肺组织中 ROS 水平

Tab. 6 Levels of ROS in lung tissue of mice in various groups ( $n=6, \bar{x} \pm s, \times 10^4$ )

Group	ROS level
Control	18 152.67 ± 732.93
OVA	31 854.33 ± 6 117.00*
JGYST	13 539.67 ± 2 932.94 <sup>△</sup>
OVA+JGYST	19 425.83 ± 2 471.19 <sup>△</sup>

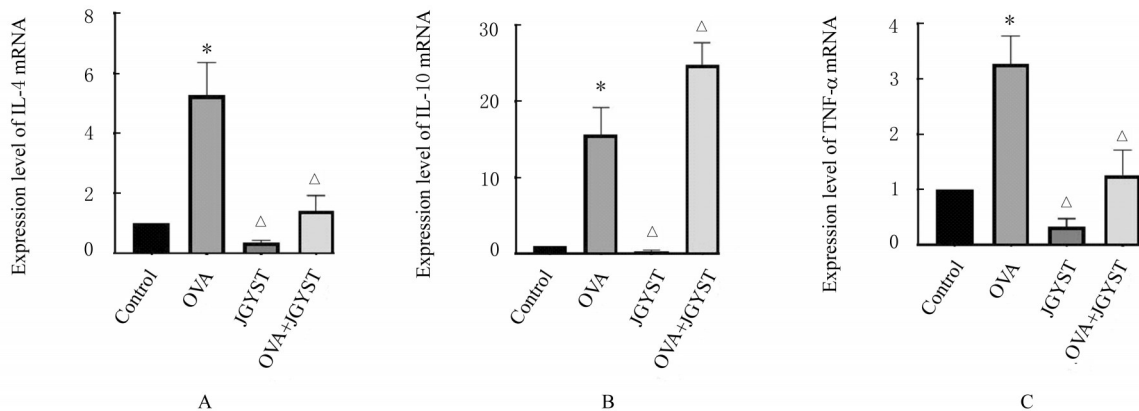
\* $P < 0.01$  compared with control group; <sup>△</sup> $P < 0.01$  compared with OVA group.

组织气道黏液分泌, 表明 JGYST 可减轻过敏性哮喘小鼠气道炎症和黏液分泌, 改善过敏性哮喘小鼠症状。

CD4+T 淋巴细胞主要分为 Th1 细胞和 Th2 细胞 2 个亚群, 二者在正常人体内呈动态平衡, Th1/Th2 细胞免疫失衡是过敏性哮喘的经典途径<sup>[12]</sup>。Th1 细胞主要分泌 IFN- $\gamma$ , 抑制由 IL-4 诱导的 IgE 的生成。Th2 细胞主要分泌 IL-4, 可激活嗜酸性粒细胞, 促进气道炎症、气道重塑和黏液分泌<sup>[13-16]</sup>。本研究结果显示: OVA 组小鼠肺组织中 Th2 细胞数明显增加, JGYST 干预可减少小鼠肺组织中 Th2 细胞数, 提示 JGYST 可以改善小鼠体内 Th1/Th2 细胞的免疫失衡状态。

DCs 是免疫系统最重要的抗原提呈细胞, 在固有免疫和获得性免疫中起桥梁作用。过敏原可刺激气道组织上皮细胞产生警报素和炎症因子, 激活 DCs 进而启动和维持 Th2 免疫反应<sup>[17-18]</sup>。CD11c 通常被视为小鼠 DCs 的标记物<sup>[19]</sup>。研究<sup>[20-21]</sup>表明: 在 OVA 诱导的过敏性哮喘小鼠中, 与野生型小鼠比较, DCs 敲除小鼠气道高反应和气道组织嗜酸性粒细胞浸润均有降低。本研究结果显示: OVA 可增加小鼠肺组织中 DCs 数, JGYST 干预可以明显减少小鼠肺组织的 DCs 数, 表明 JGYST 可通过下调过敏性哮喘小鼠的 DCs 表达减轻 Th2 免疫反应。

ROS 具有代谢调节功能, 过量的 ROS 会对细胞造成损害, 促进细胞死亡和疾病的发生<sup>[22]</sup>。研究<sup>[23]</sup>显示: ROS 可通过多种细胞内信号途径促进气道炎症, 因此抑制 ROS 并减轻气道炎症是哮喘治疗的思路之一。研究<sup>[24]</sup>表明: JGYST 含药血清

A: Expression level of IL-4 mRNA; B: Expression level of IL-10 mRNA; C: Expression level of TNF- $\alpha$  mRNA. \* $P < 0.01$  vs control group; <sup>△</sup> $P < 0.01$  vs OVA group.图3 各组小鼠肺组织中 IL-4、IL-10 和 TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平Fig. 3 Expression levels of IL-4, IL-10, and TNF- $\alpha$  mRNA in lung tissue of mice in various groups

可明显降低人中性粒细胞弹性蛋白酶(human neutrophil elastase, HNE)诱导的ROS增加。本研究结果显示:OVA组小鼠肺组织中ROS水平明显升高, JGYST干预可以明显降低小鼠肺组织中ROS水平, 进而减轻过敏性哮喘小鼠的气道组织炎症。

IL-4由Th2细胞分泌, 是一种促炎细胞因子, 可刺激B淋巴细胞合成IgE<sup>[15]</sup>。TNF- $\alpha$ 是免疫反应中重要的细胞因子, 在各种慢性炎症性疾病中均有表达, 是中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的化学趋化因子, 也可激活T淋巴细胞<sup>[25-26]</sup>。研究<sup>[27-28]</sup>表明: IL-10作为一种抗炎细胞因子, 可减少嗜酸性粒细胞和中性粒细胞的浸润。本研究结果显示: OVA组小鼠肺组织中IL-4、IL-10和TNF- $\alpha$  mRNA表达水平明显升高, JGYST干预后可明显降低小鼠肺组织中IL-4和TNF- $\alpha$  mRNA表达水平, 升高IL-10 mRNA表达水平, 表明JGYST可通过减少过敏性哮喘小鼠肺组织中IL-4和TNF- $\alpha$ 表达, 增加IL-10表达, 进而减轻气道炎症。

综上所述, JGYST可以减轻过敏性哮喘小鼠气道炎症和黏液分泌, 其机制可能与减少Th2细胞和DCs数量、降低ROS水平和IL-4及TNF- $\alpha$  mRNA表达水平以及升高IL-10 mRNA表达水平有关。本研究为采用JGYST治疗过敏性哮喘提供了理论和实验依据, 未来应进一步通过临床试验研究JGYST抑制过敏性哮喘气道炎症和黏液分泌的具体机制, 为哮喘的治疗提供新的线索和思路。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

唐红梅参与论文设计、撰写和修改, 唐红梅、李月蛟、王星、王志彬和袁谢芳参与实验数据的获取和分析, 王孝芸参与实验设计。

#### [参考文献]

- [1] 王 鹏. 支气管哮喘药物治疗现状及进展分析[J]. 实用中西医结合临床, 2018, 18(3): 176-177.
- [2] 杜文元. 元参桔梗饮治疗小儿化脓性扁桃体炎25例报告[J]. 内蒙古医学杂志, 2009, 41(S2): 81.
- [3] 高健美, 申 茹, 徐英辉. 桔梗元参汤对变应性鼻炎小鼠行为学和p38MAPK/COX-2信号转导通路的影响[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(1): 11-13.
- [4] 张语琨. 桔梗玄参汤合千层纸汤治疗急性咽炎性咳嗽的临床疗效观察[J]. 中医临床研究, 2018, 10(8): 26-27, 29.
- [5] 陈晓薇, 程 程. 桔梗元参汤治疗急性上呼吸道感染临床疗效观察[J]. 深圳中西医结合杂志, 2020, 30(7): 61-62.
- [6] ZHANG Y, TANG H M, YUAN X F, et al. TGF- $\beta$ 3 promotes MUC5AC hyper-expression by modulating autophagy pathway in airway epithelium [J]. EBioMedicine, 2018, 33: 242-252.
- [7] SUZAKI Y, HAMADA K, NOMI T, et al. A small-molecule compound targeting CCR5 and CXCR3 prevents airway hyperresponsiveness and inflammation[J]. Eur Respir J, 2008, 31(4): 783-789.
- [8] XUE L N, LI C, GE G B, et al. Jia-Wei-yu-ping-Feng-San attenuates group 2 innate lymphoid cell-mediated airway inflammation in allergic asthma [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 703724.
- [9] 隋博文, 王 达, 翟平平, 等. 射干麻黄汤对哮喘小鼠气道重塑及Th17/CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg细胞的影响及机制研究[J]. 中国中医急症, 2017, 26(2): 204-207.
- [10] 朱立成, 尚云飞, 姜水菊. 小青龙颗粒对支气管哮喘患者外周血Th17/Treg平衡影响的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(20): 2173-2174, 2176.
- [11] 刘新生, 达春水, 程 科. 麻杏二陈三子汤对小儿哮喘急性发作的疗效及其对免疫机制的影响[J]. 世界中医药, 2017, 12(10): 2389-2392.
- [12] ZHAO S M, WANG H S, ZHANG C, et al. Repeated herbal acupoint sticking relieved the recurrence of allergic asthma by regulating the Th1/Th2 cell balance in the peripheral blood [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 1879640.
- [13] CHEN X, LIU H, PENG Y M, et al. Expression and correlation analysis of IL-4, IFN- $\gamma$  and Fc $\alpha$ RI in tonsillar mononuclear cells in patients with IgA nephropathy [J]. Cell Immunol, 2014, 289(1/2): 70-75.
- [14] HAMMAD H, LAMBRECHT B N. The basic immunology of asthma[J]. Cell, 2021, 184(9): 2521-2522.
- [15] LEÓN B, BALLESTEROS-TATO A. Modulating Th2 cell immunity for the treatment of asthma[J]. Front Immunol, 2021, 12: 637948.
- [16] KUPERMAN D A, HUANG X Z, KOTH L L, et al. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma[J]. Nat Med, 2002, 8(8): 885-889.
- [17] SCHUIJS M J, HAMMAD H, LAMBRECHT B N. Professional and 'amateur' antigen-presenting cells in type 2 immunity [J]. Trends Immunol, 2019, 40(1): 22-34.

- [18] FINOTTO S. Resolution of allergic asthma [J]. *Semin Immunopathol*, 2019, 41(6): 665-674.
- [19] MORIANOS I, SEMITEKOLOU M. Dendritic cells: critical regulators of allergic asthma [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 7930.
- [20] NAKANO H, FREE M E, WHITEHEAD G S, et al. Pulmonary CD103 (+) dendritic cells prime Th2 responses to inhaled allergens [J]. *Mucosal Immunol*, 2012, 5(1): 53-65.
- [21] FEAR V S, LAI S P, ZOSKY G R, et al. A pathogenic role for the integrin CD103 in experimental allergic airways disease [J]. *Physiol Rep*, 2016, 4(21): e13021.
- [22] GUPTA N, VERMA K, NALLA S, et al. Free radicals as a double-edged sword: the cancer preventive and therapeutic roles of curcumin [J]. *Molecules*, 2020, 25(22): 5390.
- [23] DOZOR A J. The role of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1203: 133-137.
- [24] 高健美, 夏昌英, 雷鸣, 等. 基于细胞凋亡研究桔梗元参汤含药血清对炎性气道黏液高分泌的抑制作用 [J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(3): 8-11.
- [25] BRIGHTLING C, BERRY M, AMRANI Y. Targeting TNF-alpha: a novel therapeutic approach for asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 121(1): 5-10.
- [26] LEE E, LEE S Y, PARK M J, et al. TNF- $\alpha$  (rs1800629) polymorphism modifies the effect of sensitization to house dust mite on asthma and bronchial hyperresponsiveness in children [J]. *Exp Mol Pathol*, 2020, 115: 104467.
- [27] MATSUDA M, INABA M, HAMAGUCHI J, et al. Local IL-10 replacement therapy was effective for steroid-insensitive asthma in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 110: 109037.
- [28] 向小琴, 张婷婷, 钟江姗, 等. 短链脂肪酸对脂多糖诱导的大鼠急性呼吸窘迫综合征的影响及其作用机制 [J]. *解放军医学杂志*, 2022, 47(6): 561-568.