

搜风愈喘方抑制哮喘大鼠气道重塑的作用机制研究

梁磊¹, 张宇婧¹, 李淑娣², 闫永彬² (1. 河南中医药大学儿科医学院, 河南 郑州 450000; 2. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450000)

摘要: **目的** 探讨搜风愈喘方(*Soufeng Yuchuan* recipe, SFYCR)通过改善气道重塑治疗哮喘的作用及机制。**方法** 将32只大鼠随机分为正常对照组、模型对照组、地塞米松组、搜风愈喘方组各8只。模型对照组、地塞米松组及搜风愈喘方组予卵清白蛋白(OVA)注射致敏及雾化吸入激发以复制哮喘大鼠模型。模型复制成功后,搜风愈喘方组给予相应剂量中药液灌胃;正常对照组、模型对照组给予生理盐水等容量灌胃;地塞米松组给予相应地塞米松溶液灌胃,连续灌胃21 d,期间观察记录各组大鼠的一般情况。末次给药12 h后,以腹腔注射50 mg·kg⁻¹氯胺酮麻醉大鼠后取材,HE染色及免疫组化检测肺组织病理形态学变化;ELISA法检测血清中的白细胞介素(IL)-13、IL-25、转化生长因子β1(TGF-β1)、血管内皮生长因子(VEGF)含量;PCR法检测肺组织匀浆中IL-13、IL-25、TGF-β1、VEGF的基因(mRNA)表达。**结果** HE染色和免疫组化结果显示,与正常对照组比较,模型对照组气道平滑肌增厚,支气管黏膜上皮细胞出现了水肿和坏死,并伴有以淋巴细胞和嗜酸性粒细胞为主的炎症细胞浸润;地塞米松组及搜风愈喘方组可改善上述病理变化。ELISA法及PCR法测定结果显示,与正常对照组比较,模型对照组血清中的IL-13、IL-25、TGF-β1、VEGF含量及肺组织匀浆中IL-13、IL-25、TGF-β1、VEGF的基因表达升高($P < 0.05$);地塞米松组及搜风愈喘方组可抑制血清中的IL-13、IL-25、TGF-β1、VEGF含量及肺组织匀浆中IL-13、IL-25、TGF-β1、VEGF基因的表达($P < 0.05$)。**结论** 搜风愈喘方可改善气道重塑以治疗哮喘,其机制可能与抑制IL-13、IL-25、TGF-β1、VEGF的表达有关。**关键词:** 搜风愈喘方;哮喘;气道重塑;细胞因子;大鼠

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2022)01-0050-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2022.01.008

The Mechanism of *Soufeng Yuchuan* Recipe on Inhibiting Airway Remodeling in Asthmatic Rats

LIANG Lei¹, ZHANG Yujing¹, LI Shudi², YAN Yongbin² (1.College of Pediatrics, Henan University of TCM, Zhengzhou 450000 Henan, China; 2.The First Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou 450000 Henan, China)

Abstract: **Objective** To explore the efficacy and mechanism of *Soufeng Yuchuan* recipe (SFYCR) on asthma by improving airway remodeling. **Methods** Thirty-two rats were randomly allocated to the normal control group, the model control group, the dexamethasone group and the SFYCR group. Model control group, dexamethasone group and SFYCR group were sensitized by OVA injection and stimulated by atomization inhalation to replicate the asthmatic rat model. After successful model replication, SFYCR group was given Chinese medicine solution by intragastric administration, normal control group and model control group were given equal volume of normal saline by intragastric administration, dexamethasone group orally received corresponding dexamethasone solution. All groups were administered for 21 continuous days. The general situation of rats in each group was observed. 12 hours after the last administration, rats were anesthetized with intraperitoneal injection of 50 mg·kg⁻¹ ketamine and the biological samples were collected for further test. The pathological changes of lung tissues were detected by HE staining and IHC, ELISA was used to examine the contents of interleukin-13 (IL-13), interleukin-25 (IL-25),

收稿日期: 2021-09-02

作者简介: 梁磊,男,硕士,研究方向: 小儿感染性疾病。Email: lianglei2118@163.com。通信作者: 闫永彬,男,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向: 小儿消化及感染性疾病防治研究。Email: yanyongbin827@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81973903)。

transforming growth factor- β 1(TGF- β 1), vascular endothelial growth factor(VEGF). The messenger RNA(mRNA) expressions of IL-13, IL-25, TGF- β 1, VEGF were investigated by PCR detection. **Results** HE dyeing and IHC results showed thickening of airway smooth muscle, edema and necrosis of bronchial mucosa epithelial cells and inflammatory cell infiltration consisted mainly of lymphocytes and eosinophils in model control group. The above pathological changes were improved in dexamethasone group and SFYCR group. ELISA and PCR showed that compared with normal control group, the levels of IL-13, IL-25, TGF- β 1 and VEGF in serum and the mRNA expressions of IL-13, IL-25, TGF- β 1 and VEGF in lung tissue homogenate in model control group were increased ($P < 0.05$). Dexamethasone and SFYCR could inhibit the contents of IL-13, IL-25, TGF- β 1 and VEGF in serum and the mRNA expression of IL-13, IL-25, TGF- β 1 and VEGF in lung tissue homogenate($P < 0.05$). **Conclusion** SFYCR can improve airway remodeling in the treatment of asthma, and its mechanism may be related to the inhibition of the expression of IL-13, IL-25, TGF- β 1 and VEGF.

Keywords: Soufeng Yuchuan recipe; asthma; airway remodeling; cytokines; rats

哮喘是以气道炎症和高反应性为特征的异质性疾病,以反复发作的咳嗽、喘息、气促、胸闷为主要特征^[1-2]。近年来,我国儿童哮喘患病率大幅度上升,城市儿童哮喘患病率已高达 3.02%^[3]。在哮喘的进展过程中,由于致炎因素的持久刺激,气道壁及平滑肌出现增厚,并伴随微血管的形成,进而造成气道壁狭窄、新生细小血管形成、肺功能逐渐降低,从而形成哮喘的气道重塑^[4]。因此,气道重塑迫使气道发生功能和结构的不可逆性改变是导致哮喘病情反复难愈的关键原因。进一步探究哮喘气道重塑的产生及进展机制,寻找治疗靶点,早期阻断甚至逆转气道重塑过程已经成为哮喘研究的热点与难点。

目前临床上治疗儿童支气管哮喘仍以激素为主,虽有一定的治疗效果,但存在用药周期长、副作用较大等弊端。临床研究^[5-6]表明,中医药在治疗儿童哮喘方面疗效确切且毒副作用小,安全性较高。闫永彬教授长期投入于小儿呼吸与感染性疾病相关研究,基于小儿“稚阴稚阳”“五脏有余不足”“久病入络”等学说,提出“伏风暗瘀宿痰”的小儿哮喘病机新说^[7],拟定搜风愈喘方,寓以祛风、活血、化痰三法并行,用于儿童哮喘诊治。临床观察^[8-9]提示,经本方干预后,哮喘患者咳嗽、喘息等症状明显减轻,疗效优于西医对照组,且安全性良好。

本研究选择哮喘大鼠为研究对象,探讨搜风愈喘方能否通过改变血清中的白细胞介素(IL)-13、IL-25、转化生长因子 β 1(TGF- β 1)、血管内皮生长因子(VEGF)含量及肺组织匀浆中 IL-13、IL-25、TGF- β 1、VEGF 的 mRNA 表达水平,发挥改善气道重塑作用

以治疗哮喘,以期在循证医学基础上为实现中医药精准辨治哮喘提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物 SD 大鼠,雄性,SPF 级,6 周龄,体质量为(200 $\pm$ 20)g,山东省济南朋悦实验动物有限公司提供,动物许可证号:SCXK(鲁)20190003,动物质量合格证号:201900117。饲养于河南省郑州市河南中医药研究院动物实验室,室内温度 24℃~26℃,室内湿度 55%~65%,12 h 光暗循环,饲喂普通饲料,自由饮食。本研究经河南中医药大学伦理委员会批准,批准号:DWLL20190310。

1.2 药物及试剂 搜风愈喘方的组方为:醋莪术、炒莱菔子、炒苦杏仁、党参、焦山楂、地龙、炒白僵蚕、旋覆花、蜜麻黄、橘络、蝉蜕、红花、炙甘草,药材购自安徽人民中药饮片有限公司,经河南中医药大学药学院中药学教研室崔瑛教授鉴定;卵清白蛋白(OVA),美国 Sigma 公司,批号:A5503;氢氧化铝佐剂,美国 Pierce 公司,批号:77161;醋酸地塞米松片,天津力生制药股份有限公司,规格:每片 0.75 mg,批号:H12020122;4%多聚甲醛通用型组织固定液,美国 Biosharp 公司,批号:BL539A;PBS 缓冲液,北京索莱宝公司,批号:P1022;生理盐水,石家庄四药股份有限公司,批号:2105223801;IL-13 抗体、IL-25 抗体、TGF- β 1 抗体、VEGF 抗体,武汉爱博泰克公司,批号分别为:A2089-50、A8252-50、A2124、A12303;IL-13、IL-25、TGF- β 1、VEGF 试剂盒,武汉伊莱瑞特公司,批号分别为:MM-70619R1、MM-70631R1、

MM-0181R1、MM-0179R1。

1.3 仪器 NE-C28P 型压缩雾化器, 欧姆龙(中国)有限公司; JJ-12J 型脱水机、JB-P5 型包埋机, 武汉俊杰电子公司; CRYOSTAR NX50 型冰冻切片机, 美国 Thermo 公司; RM2016 型病理切片机, 上海徕卡公司; Eclipse Ci-L 型正置白光拍照显微镜, 日本 Nikon 公司; CFX 型荧光定量聚合酶链式反应仪, 美国 Bio-Rad 公司; D3024R 型低温高速离心机, 北京 DragonLab 公司; Multiskan FC 型酶标定量测定仪, 美国 Thermo Electron 公司; Image-Pro Plus 6.0 显微镜图像分析系统, 美国 Media Cybernetics 公司。

1.4 药物制备 搜风愈喘方中药饮片以纯水浸泡 30 min, 加热至沸腾后以文火煎煮 30 min, 倒出药液并过滤; 残渣复煎, 倒出药液, 将 2 次药液混合, 置 70 °C 恒温水浴, 药液浓缩至 $0.63 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 4 °C 恒温冰箱保存。

1.5 分组及模型复制 32 只大鼠普通饲养 1 周。将其随机均分为 4 组, 分别为正常对照组、模型对照组、地塞米松组、搜风愈喘方组。参考相关文献报道^[10]复制哮喘大鼠模型, 实验第 1 天及第 7 天, 模型对照组、地塞米松组、搜风愈喘方组予卵清白蛋白与氢氧化铝佐剂的混合液 1 mL (含 1 mg 卵清白蛋白和 200 mg 氢氧化铝佐剂) 五点注射致敏; 实验第 15 天, 将大鼠放于密封性良好的光亮器具内, 予 1% 卵清白蛋白溶液 (卵清白蛋白溶于生理盐水) 压缩雾化吸入以激发哮喘; 实验第 16 天、第 17 天连续雾化激发 2 d; 此后隔日雾化 1 次, 每次 20 min, 持续 2 周。观察和记录大鼠一般情况, 以大鼠产生点头呼吸、呼吸频率加快、情绪躁动不安、精神萎靡不振、毛发缺乏光泽、口唇黏膜发绀、腹壁内凹及支气管、肺组织出现哮喘样病变为模型复制成功标准^[11]。

1.6 给药方法 模型复制成功后, 各组大鼠给予相应药液进行灌胃。根据成人与大鼠的体质量换算公式得出大鼠用药量: $\text{dB} = \text{dA} \times 6.25$ (dA、dB 分别代表成人、大鼠每日每千克体质量用药剂量^[12])。搜风愈喘方组给予 $11.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 中药液灌胃, 正常对照组、模型对照组给予生理盐水等容量灌胃, 地塞米松组给予 $0.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 地塞米松溶液灌胃, 每日 1 次, 连续 21 d。期间观察记录各组大鼠的一般情况。

1.7 标本采集 末次给药 12 h 后, 腹腔注射 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氯胺酮麻醉实验大鼠, 腹主动脉取血, 室温静置 1 h, 4 °C 条件下, 以离心半径为 13 cm、 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$

离心 15 min, 取上清液, -80 °C 冰箱冷藏, 以备检测血清指标; 快速解剖大鼠、摘取合适大小的肺脏组织, PBS 缓冲液冲洗干净、置于 -80 °C 冰箱冻存, 以备检测 mRNA 的表达; 取 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 大小的肺组织, 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋及切片, 以备病理形态学的观察。

1.8 指标检测

1.8.1 大鼠一般情况 观察并记录各组大鼠雾化激发及药物干预前后各阶段的体质量、食量、情绪、活动强度、精神状态、呼吸频率、毛发色泽、口唇黏膜颜色变化及腹壁是否有凹陷等表现。

1.8.2 肺组织病理形态学检测 取出待测肺组织标本, 冲洗、固定、脱水, 以二甲苯透明处理、浸蜡、包埋、切片、脱蜡、水化, HE 染色后将切片置于显微镜下分别放大 40 倍、200 倍, 所有切片均取 3 个完整的细支气管横截面。通过图像采集软件及计算机图像分析系统测量气道壁面积 (Airway wall area, WAt)、气道平滑肌面积 (Airway smooth muscle area, WAm)、气道基底膜周径 (Airway basement membrane circumference, Pbm), 用 Pbm 将 WAt、WAm 标准化, 并以 WAt/Pbm、WAm/Pbm 值分别代表气道壁和平滑肌的厚度, 以此为标准^[13], 评估分析气道重塑程度。

1.8.3 肺组织免疫组化检测 石蜡切片经脱蜡、水化、抗原修复, 3% BSA 室温封闭 30 min, 滴加规定浓度的 IL-13 (1:100)、IL-25 (1:50)、TGF- β 1 (1:200)、VEGF (1:100) 一抗, 4 °C 孵育过夜; 加入二抗 (HRP 标记的山羊抗兔 IgG, 浓度为 1:200), 室温孵育 1 h。DAB 显色, Harris 苏木素复染, 脱水, 透明, 中性树胶封片。采用 IPP 图像分析系统, 测定平均光密度值。

1.8.4 血清中 IL-13、IL-25、TGF- β 1、VEGF 含量检测 通过 ELISA 法检测血清中 IL-13、IL-25、TGF- β 1、VEGF 含量, 严格按 ELISA 试剂盒说明进行操作。

1.8.5 肺组织匀浆中 IL-13、IL-25、TGF- β 1、VEGF 的基因表达检测 用 TRIzol 试剂提取冻存的肺组织总 RNA, 按照逆转录以及 PCR 试剂盒的操作步骤进行反转录及实时荧光定量 PCR 反应。反应条件为 95 °C 变性 15 min, 1 个循环; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环。按照相对定量方法分析, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法表示 mRNA 的相对表达量^[14]。引物由武汉赛维尔生物科技有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 引物序列及扩增长度

Table 1 Primer sequence and amplification length

引物	引物序列	扩增长度/bp
IL-13	上游 5'-GTGGCCCTCAGGAGCTTAT-3'	99
	下游 5'-TGTCAGGTCCACGCTCCATA-3'	
TGF-β1	上游 5'-CCAACTACTGCTTCAGCTCCACA-3'	276
	下游 5'-GCTTGCGACCCACGTAGTAGA-3'	
GADPH	上游 5'-CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3'	138
	下游 5'-GGTGAAGAATGGGAGTTGCT-3'	
IL-25	上游 5'-GTACCAGGCTGTTCGCTTCTT-3'	194
	下游 5'-AGGATTCTGGGTGGTGGTG-3'	
VEGF	上游 5'-GCACTGGACCTGGCTTTACT-3'	102
	下游 5'-AACTTACCACCTTCATGGGCTTT-3'	

1.9 统计学处理方法 采用 SPSS 23.0 统计分析软件, 计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。符合正态分布的各组相关数据, 如满足方差齐性, 即采用单因素方差分析, 如不满足方差齐性, 则采用 Dunnett's T3 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况变化 正常对照组大鼠饮食正常、毛色光亮、口唇黏膜及呼吸频率正常、情绪稳定、无打斗行为。经雾化激发, 除正常对照组外, 其余各组大鼠出现不同程度进食减少、呼吸加快、情绪

躁动、腹部凹陷、口唇发绀及毛发枯槁等表现, 上述表现伴随大鼠雾化吸入次数的增加而加重, 并有极少数大鼠出现争抢饮水打斗行为。经药物干预, 地塞米松组和搜风愈喘方组大鼠食量较前增加、精神改善、呼吸平稳、口唇黏膜正常、腹部无内凹; 与地塞米松组比较, 搜风愈喘方组大鼠整体症状较轻。

2.2 大鼠肺组织病理形态学变化 如图 1、表 2 所示, 与正常对照组比较, 模型对照组支气管黏膜上皮细胞出现不同程度水肿及结构紊乱、坏死, 气道平滑肌增厚明显, 少数管腔内可见大量黏液性物质, 并伴随肺泡腔、肺泡壁的扩大、断裂出现融合样改变, 可见明显气道重塑改变; 地塞米松组支气管黏膜上皮细胞较为完整, 气道平滑肌轻度增厚, 管腔轻度狭窄; 搜风愈喘方组黏膜上皮细胞基本完整, 气道平滑肌厚度变薄, 管腔狭窄程度明显改善, 肺泡腔未见渗出, 气道重塑程度好转。模型对照组大鼠肺组织 WAm/Pbm 值、WAt/Pbm 值明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 地塞米松组及搜风愈喘方组大鼠肺组织 WAm/Pbm 值、WAt/Pbm 值明显下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。以上结果表明, 经搜风愈喘方及地塞米松干预, 大鼠肺组织气道壁及气道平滑肌厚度明显降低, 抑制了气道重塑。

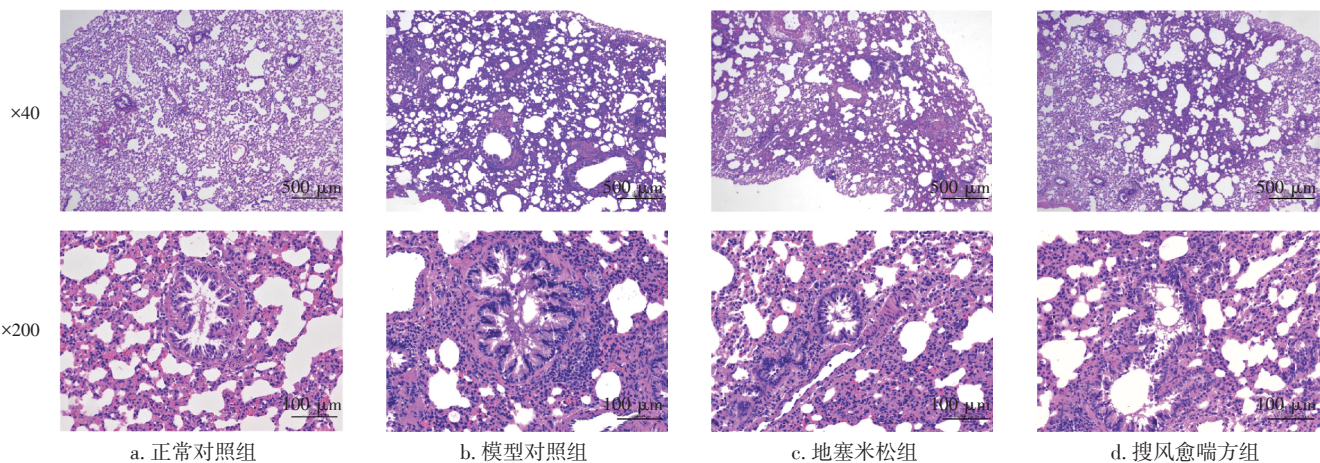


图 1 各组大鼠肺组织病理学变化(HE 染色, ×40, ×200)

Figure 1 The pathological changes of lung tissue in rats(HE staining, ×40, ×200)

表 2 各组大鼠肺组织形态学变化($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 2 Morphological changes of lung tissue in rats($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	WAm/Pbm 值	WAt/Pbm 值
正常对照组	6.79 ± 0.16	27.20 ± 0.92
模型对照组	17.91 ± 0.28*	43.37 ± 1.15*
地塞米松组	8.76 ± 0.40*	30.13 ± 0.97*
搜风愈喘方组	8.15 ± 0.45*	31.14 ± 1.14*

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型对照组比较, * $P < 0.05$

2.3 各组大鼠肺组织免疫组化检测结果 如图 2、表 3 所示, 正常对照组大鼠肺组织切片阳性反应细胞明显少于模型对照组; 模型对照组可见大量阳性反应细胞, 主要分布在气管黏膜部位, 呈棕黄色; 地塞米松组及搜风愈喘方组未见明显差异。模型对照组大鼠肺组织 IL-13、IL-25、TGF-β1 及 VEGF 水平升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 地塞米松组

及搜风愈喘方组大鼠肺组织 IL-13、IL-25、TGF-β1 及 VEGF 水平降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。以上结果表明, 搜风愈喘方可降低大鼠肺组织中

IL-13、IL-25、TGF-β1 及 VEGF 细胞因子活性, 减轻气道重塑。

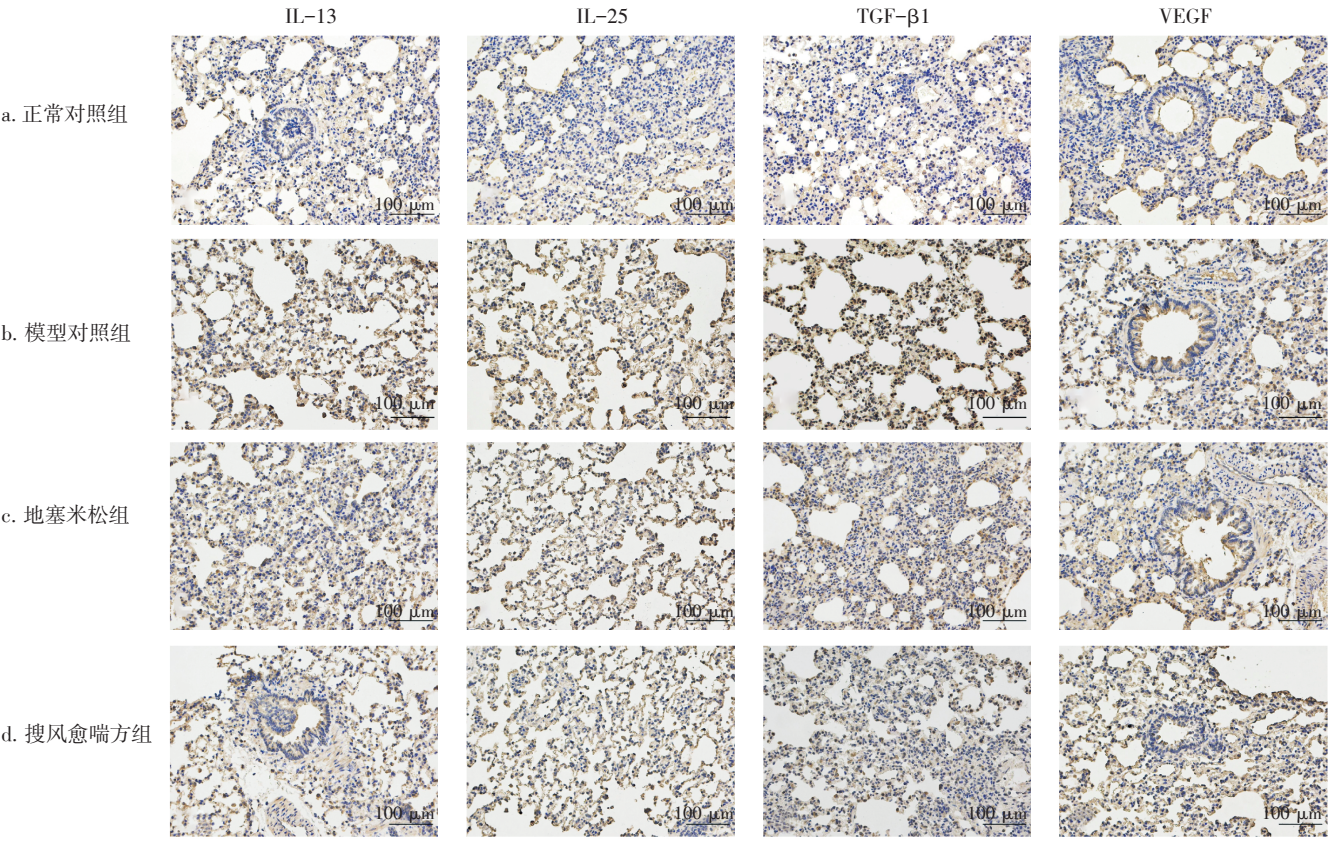


图2 各组大鼠肺组织中 IL-13、IL-25、TGF-β1、VEGF 的表达(免疫组化, ×200)

Figure 2 Expression of IL-13, IL-25, TGF-β1 and VEGF in lung tissue of rats(IHC, ×200)

表3 各组大鼠肺组织中 IL-13、IL-25、TGF-β1、VEGF 平均光密度值比较($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 3 Average optical density of IL-13, IL-25, TGF-β1 and VEGF in lung tissue of rats($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	IL-13	IL-25	TGF-β1	VEGF
正常对照组	0.24±0.02	0.24±0.01	0.25±0.01	0.27±0.02
模型对照组	0.46±0.04 [#]	0.44±0.02 [#]	0.49±0.02 [#]	0.49±0.01 [#]
地塞米松组	0.26±0.03 [*]	0.27±0.01 [*]	0.27±0.02 [*]	0.28±0.02 [*]
搜风愈喘方组	0.28±0.02 [*]	0.27±0.01 [*]	0.28±0.02 [*]	0.28±0.02 [*]

注: 与正常对照组比较, [#] $P<0.05$; 与模型对照组比较, ^{*} $P<0.05$

2.4 各组大鼠血清 IL-13、IL-25、TGF-β1、VEGF 含量变化 如表 4 所示, 与正常对照组比较, 模型对照组大鼠血清中 IL-13、IL-25、TGF-β1、VEGF 含量明显升高, 差异有统计学意义($P<0.05$); 与模型对照组比较, 地塞米松组及搜风愈喘方组大鼠血清中 IL-13、IL-25、TGF-β1、VEGF 含量下降, 差异有统计学意义($P<0.05$)。以上结果说明, 搜风愈喘方可降低大鼠血清中 IL-13、IL-25、TGF-β1 及

VEGF 细胞因子含量, 进而改善气道重塑以抑制哮喘症状。

表4 各组大鼠血清中 IL-13、IL-25、TGF-β1、VEGF 含量变化($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 4 Contents of IL-13, IL-25, TGF-β1 and VEGF content in rat serum($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	IL-13 /(pg·mL ⁻¹)	IL-25 /(pg·mL ⁻¹)	TGF-β1 /(pg·mL ⁻¹)	VEGF /(pg·mL ⁻¹)
正常对照组	4.79±1.00	3.67±0.18	7.93±2.47	3.84±1.43
模型对照组	21.09±1.42 [#]	22.20±1.29 [#]	18.11±0.65 [#]	20.19±1.97 [#]
地塞米松组	8.39±1.32 [*]	8.95±1.31 [*]	9.84±1.10 [*]	8.31±0.75 [*]
搜风愈喘方组	8.96±1.41 [*]	8.01±0.85 [*]	10.42±1.24 [*]	9.27±0.55 [*]

注: 与正常对照组比较, [#] $P<0.05$; 与模型对照组比较, ^{*} $P<0.05$

2.5 大鼠肺组织匀浆中 IL-13、IL-25、TGF-β1、VEGF 的基因表达变化 如表 5 所示, 与正常对照组比较, 模型对照组大鼠肺组织匀浆中 IL-13、IL-25、TGF-β1、VEGF 的 mRNA 表达量升高, 差异有统计学意义($P<0.05$); 与模型对照组比较, 搜风愈喘方

组及地塞米松组大鼠肺组织匀浆中 IL-13、IL-25、TGF- β 1、VEGF 的 mRNA 表达下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。由此可见,搜风愈喘方可使大鼠肺组织匀浆中 IL-13、IL-25、TGF- β 1 及 VEGF 的 mRNA 表达减弱,进而抑制其生理效应以改善气道重塑。

表 5 各组大鼠肺组织匀浆中 IL-13、IL-25、TGF- β 1、VEGF 的基因表达变化($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 5 The mRNA expressions of IL-13, IL-25, TGF- β 1 and VEGF in lung tissue homogenate of rats($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	IL-13	IL-25	TGF- β 1	VEGF
正常对照组	0.99 $\pm$ 0.12	0.99 $\pm$ 0.02	1.09 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.20
模型对照组	4.05 $\pm$ 0.57 [#]	4.27 $\pm$ 0.23 [#]	4.54 $\pm$ 0.14 [#]	4.22 $\pm$ 0.06 [#]
地塞米松组	1.99 $\pm$ 0.34 [*]	1.66 $\pm$ 0.29 [*]	1.67 $\pm$ 0.20 [*]	1.36 $\pm$ 0.11 [*]
搜风愈喘方组	1.88 $\pm$ 0.13 [*]	1.21 $\pm$ 0.23 [*]	1.65 $\pm$ 0.23 [*]	1.46 $\pm$ 0.21 [*]

注:与正常对照组比较,[#] $P<0.05$;与模型对照组比较,^{*} $P<0.05$

3 讨论

哮喘的中医经典病机为“内有壅塞之气,外有非时之感,膈有胶固之痰”,随着研究的深入,“风、痰、瘀”三者哮喘疾病进程中所产生的关键作用被更多学者所认识。晁恩祥^[15]认为“风盛痰阻,气道挛急”为诱发哮喘的主要病机;洪广祥^[16]提出“痰瘀伏肺”为哮喘之宿根,宿痰、血瘀互为因果,痰瘀不解而造成哮喘迁延不愈。闫永彬教授研读经典并基于临床验效提出了哮喘“伏风暗瘀宿痰”的病机新说,认为伏风为哮喘触发之诱因,暗瘀为其病情迁延之关键,宿痰为其复发之根源,三者合并,迫使气道出现痉挛,进而诱发哮喘。基于此而创立搜风愈喘方,寓祛风、活血、化痰三法并行,方用炒白僵蚕、地龙、蝉蜕、橘络根除深伏肺络之风邪,旋覆花、炒苦杏仁、蜜麻黄以平喘止咳化痰;用党参健脾补气,炙甘草益气健脾,助血运行之效;取炒莱菔子、焦山楂消食化滞之功;施以红花、醋莪术祛瘀活血,故而令脾气健旺、滞化食消,暗瘀自清。现代研究证明,“风”邪是诱发过敏性疾病的始动因素,僵蚕、蝉蜕等祛风药通过减少人体组织胺、激肽等生物活性物质的产生而抑制过敏反应^[17-18];细胞外基质是气道重塑的关键因素^[19],中医取类比象思维认为其与“痰”类似,旋覆花、苦杏仁等化痰药可有效抑制气道黏膜黏液腺化生和黏液分泌,减少炎性细胞黏附趋化;新生血管无正常的血管结构,极易造成出血,出血时间稍长即为瘀血。活血化瘀法可有效改善血液流变性,减少新生血管形成的可能性,调控气道重塑^[20]。本方寓搜风祛

痰消瘀、降逆止咳平喘之意,与西医的抗过敏、调控细胞外基质,血管重塑高度契合,应用于儿科临床多年,疗效确切^[8-9]。

研究^[21]发现,气道壁和气道平滑肌层增厚是哮喘气道重塑的重要病理特征,实验多采用气道壁厚度和气道平滑肌厚度作为评价气道重塑的指标。当前,糖皮质激素仍是控制哮喘的一线用药。研究^[22-23]发现糖皮质激素可抑制气道壁及平滑肌增厚,对改善气道重塑有积极作用,但其用药时间长、副作用较大,患儿家长存在明显排斥心理;中医药可通过减轻气道壁、平滑肌增厚以抑制气道重塑^[24]。本研究发现,与正常对照组比较,模型对照组肺组织切片气道壁和气道平滑肌明显增厚,地塞米松组及搜风愈喘方组气道壁和气道平滑肌厚度明显降低,且与阳性反应细胞表达呈正相关;由此可见,中药干预可改善哮喘大鼠气道厚度,从微观角度进一步揭示了搜风愈喘方抑制气道重塑的作用机理。

气道重塑作为哮喘的关键特征^[21],与 Th2 型免疫反应密切相关。IL-13 是一种多效能的 Th2 型细胞因子^[25],IL-25 是 IL-17 细胞因子家族成员之一,均可诱导和增强 Th2 型免疫反应,促进 B 细胞增殖和抗体分泌,在 IgE 介导的 I 型变态反应中发挥重要作用,同时参与气道重塑^[26-27]。本研究发现模型组大鼠肺组织 IL-13、IL-25 的 mRNA 表达均明显升高,提示 IL-13、IL-25 参与气道重塑过程,其作用可能是通过调控 IL-13、IL-25 水平降低血清游离 IgE 含量,抑制过敏性炎症反应,以减少哮喘的急性发作次数,改善哮喘症状,具体机制有待进一步研究。

TGF- β 1 参与调节哮喘细胞外基质,是哮喘气道重塑的关键因子,其可通过增加胶原蛋白 I 和纤连蛋白的表达水平来促进基质蛋白沉积,并促进 ASMC 的增殖能力^[28]。阮晓琳等^[13]发现气阴双补中药能下调 TGF- β 1、Smad2/3 基因的表达水平,改善哮喘大鼠肺组织上皮细胞增生、脱落,细胞外基质沉积,气管壁增厚等表现,进而抑制气道重塑。Jie Cuid 等^[29]研究发现补肾清肺方可降低 TGF- β 1 的表达,减少支气管周胶原沉积和平滑肌增厚从而延缓哮喘气道重塑的过程。本研究结果显示,搜风愈喘方可明显降低 TGF- β 1 水平,改善哮喘临床症状,其作用可能与通过调控细胞外基质平衡以抑制气道重塑相关。

扩展性及可塑性是气道的血管系统所具备的较强功能,由于致炎因素的参与,造成血管壁通透性增加、新生血管形成、增多等变化,进而导致气道重塑^[30]。因此,在气道重塑中,血管重塑发挥了关键作用。研究^[31]表明,VEGF 浓度升高是新生血管形成的

生物标志物, 增加血管的通透性、促进血管生成是其重要的生理功能。Nazanin 等^[32]研究表明 Sema3E 可通过调节促血管生成因子及抗血管生成因子进而抑制过敏性哮喘气道中的血管生成。龙声志等^[33]研究发现防风乌梅通过抑制气道平滑肌细胞由收缩型向合成型的转化, 减少 VEGF 等活性物质释放改善气道重塑。现代研究^[20]认为由于新生血管尚未形成成熟的血管结构, 非常脆弱, 易于破裂出血, 出血留滞即为瘀血, 而中医活血祛瘀法可明显抑制血管新生, 调控气道重塑。本研究表明, 搜风愈喘方可明显降低 VEGF 水平, 通过减少血管新生抑制气道重塑, 缓解哮喘临床症状。

综上, 搜风愈喘方可减轻哮喘大鼠的呼吸道症状及肺组织病理学改变, 改善大鼠气道重塑, 其作用机制可能与其抑制 IL-13、IL-25、TGF- β 1、VEGF 的表达有关。

参考文献:

- [1] 苏楠. 支气管哮喘控制的中国专家共识[J]. 中华内科杂志, 2013, 52(5): 440-443.
- [2] 鲍一笑, 陈爱欢, 符州, 等. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南(2016年版)[J]. 中华儿科杂志, 2016, 54(3): 167-181.
- [3] 孙新, 吴华杰, 鲍一笑, 等. 中国儿童哮喘标准化门诊建设现状与探索[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2021, 36(7): 514-519.
- [4] 李双, 韩君萍, 杨金华, 等. 支气管哮喘气道重塑的病理改变及针刺调节的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(7): 1752-1754.
- [5] 呼延和. 中中医药治疗小儿顽固性哮喘的临床疗效[J]. 中国医药指南, 2021, 19(19): 119-120.
- [6] 董鑫, 陈馨雨. 中药治疗小儿咳嗽变异性哮喘研究概况[J]. 中医临床杂志, 2019, 31(12): 2359-2363.
- [7] 闫永彬, 贾长虹, 杨明江, 等. 从伏风暗瘀宿痰辨治小儿哮喘[J]. 中医杂志, 2016, 57(21): 1877-1878, 1881.
- [8] 周宏鹤. 搜风愈喘方治疗儿童哮喘发作期的临床与实验研究[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2016.
- [9] 梁士锋, 梁勇, 王进. 搜风愈喘方联合针刺治疗支气管哮喘的疗效及对IgE、VEGF、IL-4的影响[J]. 中国中医急症, 2020, 29(12): 2180-2182.
- [10] 王心恒, 杨勤军, 方向明, 等. 平喘宁对支气管哮喘大鼠黏蛋白AC表达影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(4): 46-50+221.
- [11] 曾晓媛, 黄信刚, 陈红梅, 等. 卡介苗对哮喘小鼠肺组织中PPAR- γ 表达的影响及意义[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(3): 409-412.
- [12] 苏杭. 菟丝子黄酮、雷公藤多苷对原代培养小鼠精细胞增殖及凋亡影响的实验研究[D]. 郑州: 河南中医学院, 2014.
- [13] 阮晓琳, 周星星, 彭来君, 等. 气阴双补中药对哮喘大鼠肺组织TGF- β 1及Smad2/3表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(3): 1271-1275.
- [14] 李易水, 储心乔, 彪雅宁, 等. 当归芍药散对非酒精性脂肪肝病大鼠TLR4/MyD88/JNK信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(17): 24-31.
- [15] 杨玉萍, 晁恩祥. 国医大师晁恩祥教授从风论治呼吸疾病理论[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(12): 3702-3704.
- [16] 叶超, 余建玮, 刘伟军, 等. 国医大师洪广祥教授治疗哮喘经验挖掘分析[J]. 中国医学创新, 2017, 14(32): 78-82.
- [17] 汪受传. 从风论治儿童过敏性疾病[J]. 中医杂志, 2016, 57(20): 1728-1731.
- [18] 高长久, 张梦琪, 曹静, 等. 蝉蜕的药理作用及临床应用研究进展[J]. 中医药学报, 2015, 43(2): 110-112.
- [19] HOSSNY E, EL-AWADY H, BAKR S, et al. Vascular endothelial growth factor overexpression in induced sputum of children with bronchial asthma[J]. John Wiley & Sons, Ltd, 2005, 115(1): 269.
- [20] 陈兰羽, 马继征, 刘咏梅, 等. 基于HIF-1 α 介导的VEGF mRNA表达探讨膈下逐瘀汤抗肝纤维化血管新生的机制[J]. 中草药, 2019, 50(2): 449-456.
- [21] 邹璐, 孙祝美, 郭春荣, 等. 中医药防治支气管哮喘气道重塑相关信号通路研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(11): 5057-5060.
- [22] FENG Y, YANG C, YANG W, et al. Effect of dexamethasone on TGF- β 1/Smad3 signalling pathway in airway remodelling model of asthmatic rats[J]. Journal of College of Physicians And Surgeons Pakistan, 2019, 29(6): 537-540.
- [23] SOLANKI B, PRAKASH A, REHAN H S, et al. Effect of inhaled corticosteroids on serum periostin levels in adult patients with mild-moderate asthma[J]. Allergy and Asthma Proceedings, 2019, 40(1): 32-34.
- [24] 黄钢花, 黎凯燕, 黎世明, 等. 小儿喘咳液合苍耳子散对哮喘大鼠气道重塑影响的研究[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(7): 1682-1685.
- [25] 徐增梅, 丁伟伟, 尹婷婷, 等. 麻芍平喘汤对支气管哮喘大鼠气道重塑及IL-5、IL-13影响研究[J]. 实用中医药杂志, 2014, 30(12): 1074-1075.
- [26] ROBERTS G, FONTANELLA S, SELBY A. Connectivity patterns between multiple allergen specific IgE antibodies and their association with severe asthma[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2020, 146(4): 821-830.
- [27] ZHANG Y Y, LI H W, CHEN Z M. Research progress in the application of anti-IgE antibody for allergic asthma in school-age children[J]. Zhonghua Er Ke Za Zhi, 2020, 58(3): 255-258.
- [28] ZHANG H, YAN H, LI X, et al. TNFSF14, a novel target of miR6, facilitates airway remodeling in airway smooth muscle cells via inducing extracellular matrix protein deposition and proliferation [J]. The Kaohsiung Journal of Medical Sciences, 2020, 36(7): 508-514.
- [29] WEI Y, LUO Q L, SUN J, et al. Bu-Shen-Yi-Qi formulae suppress chronic airway inflammation and regulate Th17/Treg imbalance in the murine ovalbumin asthma model[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2015, 164(15): 368-377.
- [30] KRISTAN S S, MARC M M, KERN I, et al. Airway angiogenesis in stable and exacerbated chronic obstructive pulmonary disease[J]. Scandinavian Journal of Immunology, 2011, 75(1): 109-114.
- [31] GOMULKA K, LIEBHART J, GADYSZ U, et al. VEGF serum concentration and irreversible bronchoconstriction in adult asthmatics [J]. Advances in Clinical and Experimental Medicine, 2019, 28(6): 759-763.
- [32] TATARI N, MOVASSAGH H, SHAN L, et al. Semaphorin 3E inhibits house dust mite-induced angiogenesis in a mouse model of allergic asthma[J]. American Journal Of Pathology, 2019, 189(4): 762-772.
- [33] 龙声志, 朱海燕, 吴贤波, 等. 防风-乌梅配伍含药血清对气道平滑肌细胞增殖模型表型转化调控作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(2): 1-7.

(编辑: 修春)