

## 疏风通络方对哮喘小鼠模型 Eotaxin、CCR3 蛋白表达及 ERK 磷酸化的影响

刘超武<sup>1</sup>, 王洁<sup>2</sup>, 熊桅<sup>1</sup>, 王悦<sup>1</sup>, 朱振刚<sup>1\*</sup>

(1. 天津中医药大学第一附属医院, 国家中医针灸临床医学研究中心, 天津 300381;

2. 唐山市中医院, 河北唐山 063000)

**[摘要]** 目的:初步探讨疏风通络方通过影响哮喘小鼠模型血清嗜酸性粒细胞趋化因子(Eotaxin)及肺组织CC类趋化因子受体3(CCR3)、细胞外信号调节激酶(ERK)磷酸化的表达水平进而抑制哮喘气道炎症的机制。方法:将70只C57BL/6小鼠随机分成正常组、哮喘模型组、疏风通络方低、中、高剂量组(7.75、15.5、30 g·kg<sup>-1</sup>)、百日咳素(PTX)组、CCR3抑制剂(SB328437)组、磷脂酰肌醇3-激酶抑制剂(LY294002)组、p38蛋白激酶拮抗剂抑制剂(SB203580)组、ERK抑制剂(PD98059)组。采用卵清蛋白(OVA)、氢氧化铝[Al(OH)<sub>3</sub>]腹腔注射+OVA雾化建立小鼠哮喘模型(均为0.2 mL)。造模成功后,应用苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠各组肺组织炎症浸润情况、酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组小鼠血清中的Eotaxin[CC类趋化因子11(CCL11)、CC类趋化因子24(CCL24)]的水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺组织ERK磷酸化水平及CCR3含量。结果:与正常组比较,模型小鼠支气管明显收缩,管腔狭窄,肺泡结构破坏,肺组织中可见大量炎性细胞浸润,支气管内可见黏液栓,气管黏膜下组织水肿,皱襞增多等表现,小鼠血清中CCL11、CCL24的含量显著增加( $P<0.01$ ),肺组织中CCR3蛋白的表达量明显增高( $P<0.05$ ),模型组、PTX组肺组织中的ERK水平明显升高( $P<0.05$ ),模型组、疏风通络方低剂量组肺组织中磷酸化(p)-ERK的水平明显升高( $P<0.05$ );与模型组比较,病理显示疏风通络方高剂量组肺组织病变明显减轻;疏风通络方高剂量组、SB328437组CCL11含量明显降低( $P<0.05$ ),疏风通络方低、高剂量组、PTX组、SB203580组、PD98059组、SB328437组小鼠肺组织中CCR3蛋白的表达明显降低( $P<0.05$ );疏风通络方高剂量组、PD98059组p-ERK的水平明显降低( $P<0.05$ );PD98059组的ERK水平明显降低( $P<0.05$ )。结论:疏风通络方可以抑制哮喘气道炎症,其机制可能与其通过下调CCR3蛋白、CCL11的表达及ERK磷酸化抑制嗜酸性粒细胞活化有关。

**[关键词]** 支气管哮喘; 疏风通络方; CC类趋化因子11(CCL11); CC类趋化因子24(CCL24); CC类趋化因子受体3(CCR3); 细胞外信号调节激酶(ERK)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R284;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)14-0054-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220608

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220114.1159.005.html>

[网络出版日期] 2022-01-14 16:52

### Effect of Shufeng Tongluo Prescription on Eotaxin and CCR3 Protein Expression and ERK Phosphorylation Level of Asthma Mice

LIU Chaowu<sup>1</sup>, WANG Jie<sup>2</sup>, XIONG Wei<sup>1</sup>, WANG Yue<sup>1</sup>, ZHU Zhengang<sup>1\*</sup>

(1. National Clinical Research Center of Chinese Acupuncture and Moxibustion, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300381, China;

2. Tangshan Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tangshan 063000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To preliminarily explore the mechanism of Shufeng Tongluo prescription (SFTLP) in inhibiting airway inflammation in asthma mice by affecting the expression levels of eotaxin in the

[收稿日期] 2021-11-09

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81673900)

[第一作者] 刘超武,博士,副主任医师,从事呼吸系统疾病的中西医结合临床与基础研究,E-mail:liuchaowutem@163.com

[通信作者] \*朱振刚,硕士,主任医师,从事呼吸系统疾病的中西医结合临床与基础研究,E-mail:airforcechina@aliyun.com

serum, CC type chemokine receptor 3 (CCR3), and extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation in lung tissues. **Method:** Seventy C57BL/6 mice were randomly divided into a blank group, a model group, low-, medium-, and high-dose SFTLP groups (7.75, 15.5, 30 g·kg<sup>-1</sup>), a pertussis toxin (PTX) group, a CCR3 inhibitor (SB328437) group, a phosphoinositide 3-kinase (PI3K) inhibitor (LY294002) group, a p38 protein kinase antagonist inhibitor (SB203580) group, and an ERK inhibitor (PD98059) group. The asthma model was induced in mice by intraperitoneal injection of ovalbumin (OVA) and aluminum hydroxide [Al(OH)<sub>3</sub>] combined with OVA atomization (0.2 mL for all). After modeling, hematoxylin-eosin staining (HE staining) was used to observe the inflammatory infiltration of lung tissues in mice. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the serum levels of eotaxin [CC chemokine ligand (CCL) 11 and CCL24] in each group. Western blot was used to detect the levels of ERK phosphorylation and CCR3 in lung tissues. **Result:** Compared with the blank group, the model group showed obvious bronchial constriction, lumen stenosis, damaged alveolar structure, massive inflammatory cell infiltration in lung tissues, mucous plug in the bronchus, edema in the submucosal tissues of the trachea, increased folds, increased serum levels of CCL11 and CCL24 ( $P<0.01$ ), and increased expression of CCR3 protein in lung tissues ( $P<0.05$ ). The ERK levels in lung tissues of the model group and the PTX group increased ( $P<0.05$ ). The level of p-ERK in lung tissues of the model group and the low-dose SFTLP group increased ( $P<0.05$ ). As revealed by pathological results, compared with the model group, the high-dose SFTLP group showed relieved lung lesions. The high-dose SFTLP group and the SB328437 group showed reduced CCL11 content ( $P<0.05$ ). The low- and high-dose SFTLP group, the PTX group, the SB203580 group, the PD98059 group, and the SB328437 group showed decreased CCR3 protein expression in lung tissues ( $P<0.05$ ). The high-dose SFTLP group and the PD98059 group showed reduced p-ERK level ( $P<0.05$ ). The PD98059 group showed reduced ERK level ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** SFTLP can inhibit airway inflammation in asthma, and the mechanism may be related to the inhibition of eosinophil activation by down-regulating CCR3 and CCL11 expression and ERK phosphorylation.

**[Keywords]** bronchial asthma; Shufeng Tongluo prescription; CC chemokine ligand 11 (CCL11); CC chemokine ligand 24 (CCL24); C-C type chemokine receptor 3 (CCR3); extracellular signal-regulated kinase (ERK)

中国最新哮喘流行病学调查结果显示我国成人(≥20岁)哮喘患者超过4 000万<sup>[1-3]</sup>。哮喘造成了严重的经济和社会负担。西医虽然通过糖皮质激素治疗,哮喘有可能会得到较好控制,但实际上,在我国哮喘的总体控制率并不高,一项针对30个城区的调查显示我国城区的哮喘总体控制率为28.5%<sup>[4]</sup>。虽然糖皮质激素是治疗哮喘的有效药物,但长时间中高等剂量的应用会对下丘脑-垂体-肾上腺轴有一定的抑制作用<sup>[5]</sup>。中医药治疗哮喘有悠久的历史,具有治疗靶点多、不良反应小的优势。前期研究证实,疏风通络方能够诱导豚鼠哮喘模型嗜酸性粒细胞凋亡,减轻炎症介质释放,减少嗜酸性粒细胞浸润,且该方还具有干预哮喘大鼠肺组织嗜酸性粒细胞跨膜迁移的作用<sup>[6-8]</sup>。嗜酸性粒细胞活化在哮喘的发病中起着关键的作用<sup>[9-13]</sup>,一些研究表明CC类趋化因子受体3(CCR3)表达、CC类趋化因子11(CCL11)、细胞外信号调节激酶(ERK)磷酸化在嗜

酸性粒细胞活化中起到重要的作用<sup>[14-16]</sup>。本研究通过观察疏风通络方(SFTLP)对小鼠模型肺组织、CCR3蛋白表达、ERK磷酸化及血清Eotaxin含量的影响,探讨SFTLP治疗哮喘气道炎症的分子生物学机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康清洁级雄性C57BL/6小鼠70只,6周龄,体质量18~22 g,由北京实验动物技术有限公司提供,实验动物合格证号SCXK(京)2016-006。所有小鼠置于中国医学科学院放射研究所动物中心饲养,给予持续灯光照射12 h,温度20~25℃,湿度45%~55%,适应性饲养1周后开始实验。实验动物处理遵守中国医学科学院放射研究所实验动物伦理委员会的伦理要求(伦理批件编号IRM-DWLL-2021158)。

**1.2 药物** 研究药物SFTLP:由荆芥穗6 g、蝉蜕6 g、炙麻黄6 g、杏仁10 g、黄芩10 g、地龙10 g、白僵

蚕 10 g、半夏 10 g、丹参 30 g、甘草 6 g,所有饮片均由天津中医药大学第一附属医院主管药师藏滨鉴定,饮片批号 019010317958,将饮片制成规格为  $4\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的浓缩液(天津中医一附院药厂制剂室);正常组药物:百日咳素(PTX,美国 Libs lab 公司,批号 list180237A1);CCR3 受体拮抗剂(SB328437)、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)蛋白拮抗剂(LY294002)、p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)蛋白激酶拮抗剂(SB203580)、ERK1/2 激酶拮抗剂(PD98059)(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab120648、ab120243、ab120161、ab120234)。

**1.3 试剂** 卵清蛋白(OVA,美国 Sigma 公司,批号 A-5503);氢氧化铝佐剂(天津大学化学实验室配置);小鼠血清 CCL11、小鼠血清 CCL24 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 H259、WSJH30001A);Mayer 苏木素-伊红(HE)染液、RIPA 裂解液、PMSF 磷酸化蛋白酶抑制剂、脱脂奶粉、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 500 微孔、 $5\times$ 蛋白上样缓冲液、Tris、甘氨酸、10%十二烷基硫酸钠(SDS)溶液、彩虹 130 光谱蛋白 marker(15-130KD)、SDS-聚丙烯酰胺(PAGE)凝胶制备试剂盒、抗体稀释液(普通型)、膜封闭液、膜再生液、 $20\times$ TBST、TBST、磷酸盐缓冲液(PBS)、ECLPlus 超敏发光液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 G1080、R0020、P0100、D8340、PC0020、P1040、T8060、G8200、S1010、PR1950、P1200、A1800、SW3010、SW3020、T1082、T1085、P1020、PE0010);PVDF 膜(美国密里博公司,批号 MB0323);Tris-MOPS-SDS Running Buffer Power(金斯瑞生物科技有限公司,批号 M00138);磷酸化(p)-p44/42 MAPK(ERK1/2)(美国 CST 公司,批号 4370T);CCR3 抗体[Y31](英国 Abcam 公司,批号 ab32512);山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(H+L)二抗(武汉博士德生物工程有限公司,批号 BA1054);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国 Proteintech 公司,批号 10494-1-AP)。

**1.4 仪器** NE-C900 型压缩雾化器(欧姆龙公司);小鼠雾化箱(自制  $50\text{ cm}\times 40\text{ cm}\times 20\text{ cm}$ );corning3590 型 96 孔酶标板(美国康宁公司);移液枪( $20\sim 200\text{ }\mu\text{L}$ ,  $0.5\sim 10\text{ }\mu\text{L}$  规格)(德国艾本德股份公司);xianou-48LD 型高通量多样品组织研磨机(南京先欧仪器制造有限公司);DHS-NP-40LS 型电动强力搅拌器(南京先欧仪器制造有限公司);3-18K 型冷冻高速离心机、Histostar 型组织包埋机、HM325

型石蜡切片机、MultiSkan3IVD 型多功能酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司);Bio-Rsd GelDoc XR 型凝胶成像系统(美国伯乐公司);DYY-6C 电泳仪、DYCZ-40D 转移槽、WD-9405B 水平摇床(北京六一仪器厂);KHY-100 型恒温培养振荡器(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)、HD-100 型恒温金属浴(杭州博日公司);JE3002GE 型电子天平(上海市梅特勒-托利多有限公司);U-LBD-2 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);MDF-86 型  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱、MDF-25 型  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  低温冰箱(中科美菱低温科技股份有限公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组及给药剂量** 将小鼠随机分为 10 组,即正常组、模型组、SFTLP(中药)低、中、高剂量组、PTX 组、SB328437 组、LY294002 组、SB203580 组、PD98059 组,每组 7 只。中药给药剂量参照徐淑云主编的《药理实验方法学》<sup>[17]</sup>计算小鼠的等效剂量约为  $15.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,此剂量为本次实验研究小鼠给药的中剂量,然后取中剂量的  $1/2$  作为低剂量,取中剂量的 2 倍作为高剂量,即中药低、中、高剂量分别为  $7.75$ 、 $15.5$ 、 $30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。PTX 组、SB328437 组、LY294002 组、SB203580 组、PD98059 组分别腹腔注射相应拮抗剂  $0.2\text{ mL}$ 。

**2.2 哮喘模型的建立及给药时间** 参考相关文献[18]并加以改进,将小鼠适应性饲养 5 d,除正常组外,其余各组小鼠于实验第 1 天腹腔注射  $0.2\text{ mL}$  的致敏液(OVA 与氢氧化铝混合液),使小鼠致敏;第 14 天进行强化致敏,方法同第 1 次;第 24 天,除正常组小鼠外,将其余小鼠放入雾化箱,用压缩雾化器激发小鼠诱导哮喘,OVA 雾化的浓度为 2.5%,每天 1 次,每次 30 min,连续激发 7 d,正常组以生理盐水雾化做对照。SFTLP 组于末次激发后的第 1 天开始按低、中、高 3 组剂量给予中药灌胃、腹腔注射生理盐水,PTX 组、SB328437 组、LY294002 组、SB203580 组、PD98059 组分别腹腔注射相应拮抗剂,以及生理盐水灌胃,正常组及模型组给予生理盐水灌胃以及腹腔注射,连续 4 d,最后一次给药的 24 h 后处死小鼠,进行标本采集。

**2.3 取材** 外周血(PB):尾静脉(若量少,则眼眶放血)取血  $1\text{ mL}$ ,室温下将血液自然凝固  $20\sim 30\text{ min}$ , $2\ 000\sim 3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,离心  $20\text{ min}$ (离心半径  $3\text{ cm}$ ,下同),收集上清,储存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱冻存;摘除右肺,置于灭酶冻存管保存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中以备用;通过气管插管灌注 10% 中性甲醛使左肺膨胀

(内固定),然后摘除左肺浸入10%中性甲醛中(外固定)。固定48 h后,沿左肺门处斜形切取肺叶约2 mm,常规乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,制做石蜡切片进行HE染色。

**2.4 HE染色病理观察肺各组小鼠肺组织病理学改变** 病理标本进行HE染色,光学显微镜下观察各组小鼠肺组织的病理形态学改变;观察肺组织的形态变化,如体积、颜色、有无明显的病理改变及细胞浸润的情况。

**2.5 ELISA检测小鼠血清CCL11、CCL24含量** 严格按照试剂盒说明书操作,用酶标仪450 nm波长测量各孔的吸光度 $A$ ,依据标准曲线获得样品的浓度。

**2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺组织中CCR3的含量及ERK磷酸化水平** 称取肺组织50 mg,放置于2 mL离心管内,加入裂解液(RIPA 500  $\mu$ L+PMSF 5  $\mu$ L,磷酸化蛋白酶抑制剂),研磨、充分裂解,15 000  $r \cdot \min^{-1}$ 离心30 min,取上清液。按照BCA法测定的样本中总蛋白浓度,对样本进行稀释,使各组样本中总蛋白浓度相等;再将样本放入其中变性10 min,后于-20  $^{\circ}$ C冷冻保存。向玻璃板夹槽内依次加入分离胶、浓缩胶,向凝胶孔中加入相对应体积的样本以及marker 5  $\mu$ L进行电泳。剪切与凝胶大小相同的PVDF膜,将PVDF膜放入甲醇中浸泡30 s激活,然后进行转膜。将转好的PVDF膜放入配置好的脱脂奶粉中,室温封闭2 h。取出封闭后的PVDF膜裁切PVDF膜。将剪裁完的PVDF膜放至TBST中漂洗5次,每次5 min。将PVDF膜放入稀释好的一抗(CCR3稀释比例为1:500;ERK稀释比例为1:1 000)中,室温下水平摇床上振荡孵育;取出一抗孵育后的PVDF膜,用抗体稀释液对二抗进行稀释(稀释比例为1:5 000),将PVDF膜放入稀释好的二抗中,放于水平摇床上室温振荡孵育2 h。取出二抗孵育后的PVDF膜,放至1 $\times$ TBST中漂洗5次,每次5 min。将PVDF膜放入发光液中3 min后放入Bio-Rad凝胶成像系统中进行显影。用Quantity One软件对蛋白条带进行分析,计算灰度值,以GAPDH作为内参蛋白进行校准,用目标蛋白条带的灰度值/GAPDH蛋白条带的灰度值表示蛋白的相对表达量。

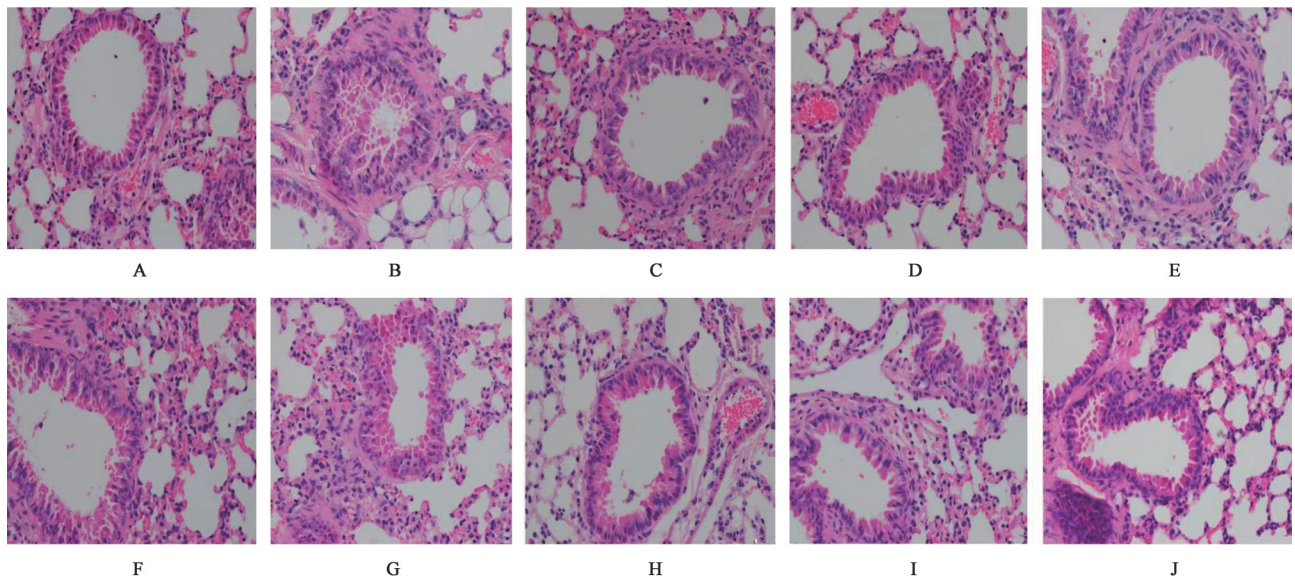
**2.7 统计学方法** 统计分析所有结果均采用SPSS 23.0统计软件统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 $t$ 检验;多组间采用ANOVA方差分析;等级资料采用非参数检验,分类资料采用卡方检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对哮喘小鼠模型肺组织病理变化的影响** 正常组小鼠肺组织的结构正常,支气管管腔规则,肺泡、肺泡间隔形态结构正常,细胞排列整齐有序,未见炎性细胞浸润;模型组小鼠支气管明显收缩,管腔狭窄,肺泡结构破坏,肺组织中可见大量以嗜酸性粒细胞、淋巴细胞及中性粒细胞为主的炎性细胞浸润,支气管内可见黏液栓,气管黏膜下组织水肿,皱襞增多等表现;中药低剂量组肺组织仍有轻到中度损伤,炎症细胞较模型组稍有减少,气道黏膜下组织水肿、支气管平滑肌痉挛、纤毛上皮脱落、管腔阻塞等表现轻度改善。中药中剂量组、SB328437组可见嗜酸性粒细胞、中性粒细胞及淋巴细胞等炎症细胞减少,气道黏膜下组织水肿、支气管平滑肌痉挛、纤毛上皮脱落、管腔阻塞等表现得以改善,但总体不如高剂量组明显;中药高剂量组肺组织病变明显减轻,气管壁轻度损伤,以嗜酸性粒细胞为主的炎性细胞降低显著,气道黏膜下组织水肿、管腔阻塞等表现明显改善。PTX组、LY294002组、SB203580组、PD98059组肺组织仍有不同程度的损伤,支气管收缩以及管腔狭窄,可见肺组织仍有局部炎性浸润的表现,可见淋巴细胞、嗜酸性粒细胞等,支气管管腔狭窄减轻,气道黏膜下水肿减轻。见图1。

**3.2 对哮喘小鼠模型血清CCL11、CCL24水平的影响** 与正常组比较,模型组小鼠血清中CCL11、CCL24的含量显著增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,中药高剂量组、SB328437组的CCL11含量明显降低( $P < 0.05$ ),中药低、中、高剂量组、LY294002组、SB328437组之间比较小鼠血清中CCL11的含量差异无统计学意义,PTX组、SB203580组、PD98059组与模型组比较CCL11水平差异无统计学意义;与模型组比较,中药低、中、高剂量组、SB328437组、PD98059组、PTX组、LY294002组、SB203580组小鼠血清CCL24的含量差异无统计学意义,且PTX组小鼠血清CCL24的含量高于模型组。见表1。

**3.3 对哮喘小鼠模型肺组织CCR3、ERK磷酸化总体水平的影响** 与正常组比较,模型组小鼠肺组织中CCR3蛋白的表达量明显增高( $P < 0.05$ );与模型组比较,中药低、高剂量组、PTX组、SB203580组、PD98059组、SB328437组小鼠肺组织中CCR3蛋白的表达明显降低( $P < 0.05$ ),LY294002组小鼠肺组织中CCR3蛋白的表达与模型组比较差异无统计学意义。与正常组比较,模型组、中药低剂量组肺组织



注: A. 正常组; B. 模型组; C. 中药低剂量组; D. 中药中剂量组; E. 中药高剂量组; F. PTX组; G. SB328437组; H. LY294002组; I. SB203580组; J. PD98059组

图1 SFTLP对哮喘小鼠肺组织的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of SFTLP on lung tissue of asthmatic mice (HE, ×400)

表1 SFTLP对哮喘小鼠外周血清CCL11、CCL24的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=7$ )

Table 1 Effect of SFTLP on serum levels of CCL11 and CCL24 in asthmatic mice ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=7$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	CCL11/ng·L <sup>-1</sup>	CCL24/μg·L <sup>-1</sup>
正常组		852.55±193.94	8.10±2.89
模型组		1 464.69±434.72 <sup>2)</sup>	13.17±3.18 <sup>2)</sup>
中药低剂量组	7.75	1 160.71±347.46	12.37±3.22
中药中剂量组	15.50	1 202.15±212.82	11.31±2.88
中药高剂量组	30.00	1 073.11±389.07 <sup>3)</sup>	9.58±3.07
PTX组	0.2 <sup>4)</sup>	1 327.43±294.37	14.43±6.05
SB328437组	0.2 <sup>4)</sup>	1 137.68±191.16 <sup>3)</sup>	10.00±2.56
LY294002组	0.2 <sup>4)</sup>	1 209.17±281.90	12.13±3.13
SB203580组	0.2 <sup>4)</sup>	1 397.71±491.54	12.87±4.15
PD98059组	0.2 <sup>4)</sup>	1 447.71±201.51	11.51±3.97

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ;  
<sup>4)</sup>表示单位为mL

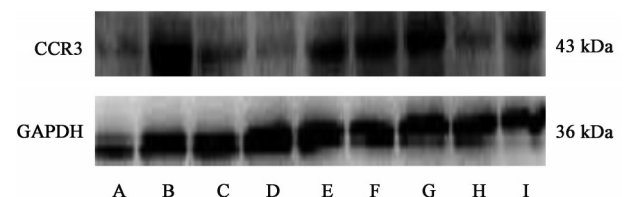
中 p-ERK 的水平明显升高 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 中药高剂量组、PD98059 组 p-ERK 的水平明显降低 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 中药低剂量组、PTX 组、SB328437 组、LY294002 组、SB203580 组的 p-ERK 水平差异无统计学意义。与正常组比较, 模型组、PTX 组肺组织中的 ERK 水平升高, 与模型组比较, PD98059 组的 ERK 水平明显降低 ( $P<0.05$ ), 其余组与模型组比较, 肺组织中 ERK 的水平差异无统计学意义。见表 2、图 2 和图 3。

表2 SFTLP对小鼠肺组织CCR3、ERK磷酸化总体水平的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=7$ )

Table 2 Effect of SFTLP on overall phosphorylation levels of CCR3 and ERK in mouse lung tissues ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=7$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	CCR3 /GAPDH	p-ERK /GAPDH	ERK /GAPDH
正常组		0.78±0.08	0.48±0.13	1.08±0.17
模型组		1.32±0.34 <sup>1)</sup>	0.94±0.44 <sup>1)</sup>	1.83±0.68 <sup>1)</sup>
中药低剂量组	7.75	0.85±0.20 <sup>2)</sup>	0.99±0.28	1.32±0.47
中药高剂量组	15.50	0.79±0.21 <sup>2)</sup>	0.55±0.14 <sup>2)</sup>	1.48±0.33
PTX组	30.00	0.94±0.13 <sup>2)</sup>	0.84±0.17	1.86±0.53
SB328437组	0.2 <sup>3)</sup>	0.99±0.16 <sup>2)</sup>	0.68±0.29	1.64±0.22
LY294002组	0.2 <sup>3)</sup>	1.19±0.22	0.72±0.21	1.64±0.45
SB203580组	0.2 <sup>3)</sup>	0.88±0.10 <sup>2)</sup>	0.63±0.14	1.67±0.39
PD98059组	0.2 <sup>3)</sup>	0.90±0.15 <sup>2)</sup>	0.54±0.10 <sup>2)</sup>	0.88±0.20 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ ;<sup>3)</sup>表示单位为mL



注: A. 正常组; B. 模型组; C. 中药低剂量组; D. 中药高剂量组; E. PTX组; F. SB328437组; G. LY294002组; H. SB203580组; I. PD98059组

图2 各组肺组织中CCR3蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of protein expression of CCR3 in lung tissues of each group

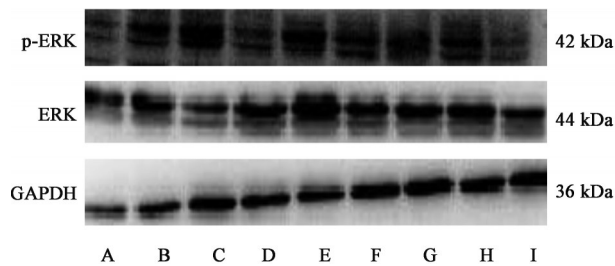


图3 各组肺组织ERK磷酸化电泳  
Fig. 3 Electrophoresis of ERK phosphorylation in lung tissues of each group

#### 4 讨论

哮喘是由多种细胞包括嗜酸粒细胞、肥大细胞、T淋巴细胞、中性粒细胞、平滑肌细胞、气道上皮细胞等细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病<sup>[19]</sup>。嗜酸粒细胞在哮喘的发病中起到关键的作用<sup>[20-24]</sup>，嗜酸粒细胞的活化合成释放的各种炎症介质可引起支气管平滑肌收缩，微血管渗透性和黏液腺分泌增加。嗜酸性粒细胞趋化性细胞因子是体内细胞向特定部位定向移动的始动者，亦是强有力的细胞活化的激动剂，而CCR3蛋白、CCL11、ERK磷酸化在嗜酸性粒细胞活化中起了至关重要的作用<sup>[25]</sup>。

SFTLP为天津中医药大学第一附属医院治疗哮喘的经验方，由炙麻黄、杏仁、荆芥穗、蝉蜕、黄芩、地龙、白僵蚕、半夏、丹参、甘草等中药组成。一些研究结果提示处方中的某些药物能够作用于Eotaxin、ERK起到减轻哮喘小鼠气道炎症的作用，有研究显示麻黄水提取物雾化吸入对减轻哮喘小鼠气道炎症以及抑制支气管肺组织中的Eotaxin蛋白的表达具有显著效果<sup>[26]</sup>。韩超等<sup>[27]</sup>研究发现黄芩苷可降低哮喘大鼠血中的转化生长因子- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )、 $\alpha$ -肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)的蛋白表达，并影响ERK信号转导通路，从而减轻气道炎症。

本研究发现，哮喘小鼠模型经SFTLP干预后，其肺组织炎症反应减轻，炎症细胞减少，同时，SFTLP组CCL11的含量、CCR3及ERK磷酸化水平较模型组降低。因此说明SFTLP可能通过下调Eotaxin/CCR3信号通路上的CCL11含量及CCR3蛋白水平和ERK磷酸化水平，抑制嗜酸细胞的活化，抑制哮喘气道炎症。基于以上结果本课题组认为，SFTLP从痰、风、瘀、虚等4个方面对哮喘进行治疗，对哮喘的炎症控制有明确的疗效，本研究揭示了SFTLP可能通过下调CCR3蛋白、CCL11的表达及ERK磷酸化抑制嗜酸性粒细胞活化减轻炎症反应的分子生物学机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] KEWU H, TING Y, JIANYING X, et al. Prevalence, risk factors, and management of asthma in China: A national cross-sectional study [J]. *Lancet*, 2019, 394 (10196):407-418.
- [2] 贾素琴, 沈华浩. 趋化性细胞因子与支气管哮喘气道内嗜酸粒细胞的募集与活化[J]. *国外呼吸杂志*, 2006, 26(5):337-340.
- [3] 王硕, 王真奎, 张婉莹, 等. 小鼠哮喘发作过程中相关炎症因子的动态变化[J]. *现代生物医学进展*, 2019, 19(18):3428-3431.
- [4] 林江涛, 王文巧, 周新, 等. 我国30个省市城区门诊支气管哮喘患者控制水平的调查结果[J]. *中华结核和呼吸杂志* 2017, 40(7):494-498.
- [5] OZLEM C, DOGUS V, EBRU A Y, et al. Evidence of hypothalamic-pituitary-adrenal axis suppression during moderate-to-high-dose inhaled corticosteroid use [J]. *Eur J Pediatr*, 2015, 174(11):1421-1423.
- [6] 张慧琪, 刘桂颖, 尹新中, 等. 疏风通络方对哮喘大鼠不同时相外周血和肺泡灌洗液嗜酸细胞数量变化的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2013, 11:2365-2368.
- [7] 刘贵颖, 张慧琪, 尹新中, 等. 疏风通络方对哮喘大鼠嗜酸细胞跨膜迁移相关因子VCAM-1/PI3K/Rac-1/NOX2/NOX4/SHP-2表达影响的研究[J]. *天津中医药*, 2013, 3:159-163.
- [8] 张慧琪, 刘贵颖, 尹新中, 等. 疏风通络方对哮喘大鼠肺组织嗜酸细胞浸润影响随机平行对照研究[J]. *实用中医内科杂志*, 2013, 6:76-79.
- [9] HUAHAO S. Eosinophil: Central mediator of allergic asthma? [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2005, 118(1):4-5.
- [10] FRICKER M, MCDONALD V M, WINTER N A, et al. Molecular markers of type 2 airway inflammation are similar between eosinophilic severe asthma and eosinophilic chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Allergy*, 2021, 76(7):2079-2089.
- [11] NELSON R K, BUSH A, STOKRS J, et al. Eosinophilic asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2020, 8(2):465-473.
- [12] VAN H G, BUREAU F, DESMET C J. Eosinophils as drivers of severe eosinophilic asthma: Endotypes or plasticity? [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18):10150.
- [13] HEANEY L G, PEREZ DE LLANO L, AL-AHMAD M, et al. Eosinophilic and noneosinophilic asthma: An expert consensus framework to characterize phenotypes in a global real-life severe asthma cohort [J]. *Chest*, 2021, 160(3):814-830.
- [14] WELLEMANS V, BENHASSOU H A, FUSELIER E, et al. Role of CCR3 in respiratory syncytial virus

- infection of airway epithelial cells[J]. *iScience*, 2021, 24:103433.
- [15] GANZALO J A, JIA G Q, AGUIRRE V, et al. Mouse Eotaxin expression parallels eosinophil accumulation during lung allergic inflammation but it is not restricted to a Th2-type response [J]. *Immunity*, 1996, 4 (1) : 1-14.
- [16] 王丽娜,付英霞,张凤林,等. 成人哮喘患者血清 Periostin、Eotaxin、STAT3 水平与气道高反应性的相关性研究 [J]. *检验医学与临床*, 2017, 14 (2) : 249-251.
- [17] 徐淑云. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002.
- [18] 马子凤,尹磊森,冉君,等. 小鼠过敏性哮喘模型制备的特点分析[J]. *东南大学学报:医学版*, 2014(5) : 650-655.
- [19] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2016, 39(9) : 675-697.
- [20] HOGAN M B, WEISSMAN D N, HUBBS A F, et al. Regulation of eosinophilopoiesis in a murine model of asthma[J]. *J Immunol*, 2003, 171(5):2644-2651.
- [21] TEAL S H, YING L, WILLIAM R H, et al. Epithelial regulation of eicosanoid production in asthma [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2012, 25(6):432-437.
- [22] 李红丽,唐雪春,任珍翠,等. 哮喘中医证候与外周血及气道嗜酸性粒细胞的相关性研究[J]. *广州中医药大学学报*, 2021, 38(2):241-245.
- [23] WECHSLER M E, MUNITZ A, ACKERMAN S J, et al. Eosinophils in health and disease: A state-of-the-art review[J]. *Mayo Clin Proc*, 2021, 96(10):2694-2707.
- [24] 王利玲,吴强鹏,程黎. 抗菌肽 LL-37 激活嗜酸性粒细胞释放炎性递质对哮喘的发病机制研究[J]. *医学研究生学报*, 2017, 30(1):70-76.
- [25] HELENE F R, SIMON P, PAUL S F, et al. Eosinophil trafficking in allergy and asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 119(6):1303-1310.
- [26] 李中燕,邓俊,熊彬,等. 麻黄碱对 TNF- $\alpha$  诱导人支气管上皮细胞 eotaxin 表达的影响[J]. *重庆医学*, 2016, 45(8):1016-1018.
- [27] 韩超,杨柳,张秋玲,等. 黄芩苷对哮喘大鼠气道重塑作用的实验研究[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2017, 22(7):749-754.

[责任编辑 周冰冰]