

益肺化痰汤减轻哮喘脾虚证大鼠气道高黏状态的作用与机制

翟建宾, 赵宏达, 赵臣亮, 于士昌, 程志鸿, 赵亮*

(河北省中医院, 石家庄 050000)

[摘要] **目的:**探讨益肺化痰汤减轻哮喘脾虚证大鼠气道高黏状态的作用与机制。**方法:**将55只8~9周龄、清洁级SD大鼠采用中医脾虚证复合西医哮喘动物建模方法制备哮喘脾虚证模型,造模成功后采用随机数字表法分为模型组、地塞米松组、益肺化痰汤低、中、高剂量组,另取11只SD大鼠记为正常组。地塞米松组予0.087 5 mg·kg⁻¹醋酸地塞米松灌胃,益肺化痰汤低、中、高剂量组分别予0.8、1.6、3.2 g·kg⁻¹益肺化痰汤流浸膏灌胃,模型组和正常组分别予10 mL·kg⁻¹蒸馏水灌胃。每日1次,共8周。观察各组一般情况;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-13(IL-13)、 γ 干扰素(IFN- γ)水平;苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠肺组织病理改变;阿尔辛蓝-过碘酸雪夫(AB-PAS)染色观察大鼠气道杯状细胞增生与黏液分泌状况;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测大鼠肺组织转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)、Smad2、Smad3、黏蛋白5A(MUC5A)、黏蛋白5B(MUC5B) mRNA表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肺组织TGF- β_1 、Smad2、Smad3、MUC5A、MUC5B蛋白表达。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠存在体质量下降、肌肉消瘦、食量减少、饮水增多、肛温升高、倦怠少动及游泳耐力下降等脾虚证症状,同时伴随喘促、点头等呼吸困难症状。与正常组比较,模型组大鼠BALF中IL-4和IL-13水平显著上升,IFN- γ 水平显著下降($P<0.01$),气道黏膜层及黏膜下层见大量炎性细胞浸润、气管平滑肌明显增厚、黏膜处存在大量上皮细胞增生、变形及脱落现象,肺组织病理评分显著上升($P<0.01$),气道可见大量杯状细胞增生、且形成大量黏液栓,气道阳性相对着色面积、TGF- β_1 、Smad2、Smad3、MUC5A、MUC5B mRNA和蛋白质相对表达量显著上升($P<0.01$);与模型组比较,地塞米松组和益肺化痰汤各剂量组BALF中IL-4、IL-13水平下降,IFN- γ 水平上升($P<0.05$, $P<0.01$),气道黏膜层及黏膜下层炎性细胞浸润逐渐减少、气管平滑肌增厚现象逐渐减少、黏膜处上皮细胞增生、变形及脱落现象逐渐减少,肺组织病理评分显著下降($P<0.01$),气道杯状细胞增生逐渐减轻,气道阳性相对着色面积、TGF- β_1 、Smad2、Smad3、MUC5A、MUC5B mRNA和蛋白表达下降($P<0.05$, $P<0.01$);与地塞米松组比较,益肺化痰汤低剂量组上述指标差异无统计学意义,益肺化痰汤中、高剂量组改善更明显($P<0.05$, $P<0.01$);上述指标改善益肺化痰汤各剂量组呈剂量依赖性。**结论:**益肺化痰汤可减轻哮喘脾虚证大鼠气道高黏状态,可能与抑制TGF- β_1 、Smad2、Smad3、MUC5A、MUC5B表达,下调IL-4和IL-13水平,上调IFN- γ 水平相关。

[关键词] 益肺化痰汤;哮喘;脾虚证;气道黏液;转化生长因子- β_1 ;黏蛋白5A;黏蛋白5B

[中图分类号] R285.5;R966;R562.2;R256.12 **[文献标识码]** **[文章编号]** 1005-9903(2022)16-0100-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221694

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220422.1909.004.html>

[网络出版日期] 2022-04-24 9:43

Effect of Yifei Huatan Decoction on Relieving Airway Hyperviscosity in Asthmatic Rats with Spleen Deficiency Syndrome and Its Mechanism

ZHAI Jianbin, ZHAO Hongda, ZHAO Chenliang, YU Shichang, CHENG Zhihong, ZHAO Liang*
(Hebei Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Yifei Huatan decoction on relieving airway hyperviscosity in asthmatic rats with spleen deficiency syndrome and its mechanism. **Method:** Fifty-five SPF level SD rats at 8-9 week of age were used to induce asthma with spleen deficiency syndrome by animal

[收稿日期] 2022-02-16

[基金项目] 河北省中医药管理局科研计划项目(2018012)

[第一作者] 翟建宾, 硕士, 从事心胸外科、微创胸外科医学研究, E-mail: zhaidoctor99@163.com

[通信作者] *赵亮, 博士, 副主任医师, 从事心胸外科、微创胸外科医学研究, E-mail: zhaolcardiac@163.com

modeling of traditional Chinese medicine combined with asthma of western medicine. After successful modeling, the rats were divided into model group, dexamethasone group, low, medium, and high-dose Yifei Huatan decoction groups by random number table method, and 11 clean SD rats at 8-9 week of age were recorded as a normal group. Rats in the dexamethasone group were given $0.0875 \text{ mg kg}^{-1}$ dexamethasone acetate by gavage. Rats in the low, medium, and high-dose Yifei Huatan decoction groups were given 0.8, 1.6, 3.2 g kg^{-1} Yifei Huatan decoction liquid extract by gavage, respectively. Rats in the model group and the normal group were given 10 mL kg^{-1} distilled water. The medicine were given once per day for 8 w, and the general situation of each group was observed. The levels of interleukin-4 (IL-4), IL-13, and interferon- γ (IFN- γ) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The pathological changes in lung tissues of rats were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Alcian blue-periodic acid Schiff (AB-PAS) staining was used to detect the hyperplasia of airway goblet cells and mucus secretion in rats. The mRNA expressions of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), Smad2, Smad3, mucin 5AC (MUC5AC), and mucin 5B (MUC5B) in the lung tissues of rats were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). The protein expressions of TGF- β_1 , Smad2, Smad3, MUC5AC, and MUC5B in the lung tissues of rats were detected by Western blot. **Result:** As compared with the normal group, rats in the model group showed the symptoms of spleen deficiency syndrome, such as decreased body weight, muscle emaciation, decreased food intake, increased water intake, increased anal temperature, tiredness, and decreased swimming endurance, accompanied by dyspnea symptoms such as wheezing and nodding. As compared with the normal group, IL-4 and IL-13 levels in the BALF of the model group were significantly increased ($P < 0.01$), while the IFN- γ level was significantly decreased ($P < 0.01$). In the model group, a large number of inflammatory cells were observed in the mucosa and submucosa of the airway, and the smooth muscle of the trachea was significantly thickened. The hyperplasia, deformation, and exfoliation of various epithelial cells were observed in the mucosa, and the pathological scores of lung tissue increased significantly ($P < 0.01$) in the model group. A large number of goblet cells were observed in the airway with the formation of plenty of mucous thrombus in the model group, and the positive relative staining area of airway, and mRNA and protein expressions of TGF- β_1 , Smad2, Smad3, MUC5AC, and MUC5B were significantly increased ($P < 0.01$). As compared with the model group, IL-4 and IL-13 levels in BALF of the dexamethasone group and the Yifei Huatan decoction groups decreased, while the IFN- γ level increased. The inflammatory cell infiltration in airway mucosa and submucosa, the thickening of tracheal smooth muscle, the hyperplasia, deformation, and exfoliation of epithelial cells in mucosa were gradually decreased, and the pathological scores of lung tissues decreased significantly ($P < 0.01$) in the dexamethasone group and the Yifei Huatan decoction groups. Goblet cell proliferation gradually decreased, and the positive relative staining area of airway, and mRNA and protein relative expressions of TGF- β_1 , Smad2, Smad3, MUC5AC, and MUC5B decreased with statistically significant difference ($P < 0.05$, $P < 0.01$). There was no significant difference in the above indexes in the dexamethasone group and the Yifei Huatan decoction low-dose group. The above indexes were dose-dependent in the low, medium, and high-dose Yifei Huatan decoction groups. **Conclusion:** Yifei Huatan decoction reduces airway hyperviscosity in asthmatic rats with spleen deficiency syndrome, which may be related to the inhibition of TGF- β_1 , Smad2, Smad3, MUC5AC, and MUC5B expressions, down-regulation of IL-4 and IL-13 levels, and up-regulation of IFN- γ level.

[Keywords] Yifei Huatan decoction; asthma; spleen deficiency syndrome; airway mucus; transforming growth factor- β_1 ; mucin 5AC; mucin 5B

支气管哮喘(以下简称哮喘)是由多种炎性细胞和细胞因子参与的呼吸系统常见且多发的慢性

炎症性疾病。据调查显示我国成人哮喘发病率为1.81%,儿童发病率为4.9%,且发病率逐年上升^[1-2]。

气道黏液高分泌是哮喘慢性炎症的重要临床病理特征,黏液分泌过多可致哮喘病情恶化和死亡率上升,然而当前抑制黏液分泌药物疗效甚微,因此急需寻找新的药物以抑制哮喘患者气道黏液高分泌^[3]。中医认为哮喘病位在肺,与脾的生理病理情况密切相关,脾气虚,气血生化不足,而至哮喘反复发作^[4]。益肺化痰汤是国家级名老中医米烈汉的经验方,主治痰壅气逆、湿痰中阻、肺脾两虚证,已有研究报道益肺化痰汤可减轻脾肺气虚证患者病症严重程度、明显促进肺功能恢复^[5]。哮喘可见气道炎症细胞浸润,其中炎症细胞分泌的白细胞介素(IL)-4、IL-13和 γ 干扰素(IFN- γ)可导致气道炎症及气道黏液分泌增加^[6]。但益肺化痰汤能否通过调控哮喘患者机体IL-4、IL-13和IFN- γ 的分泌调节气道炎症及黏液分泌未知。哮喘可见气道杯状细胞明显增生和黏液分泌增多,转化生长因子(TGF)是一类多功能细胞因子,可诱导上皮细胞层破坏、气道炎症、平滑肌细胞增殖、杯状细胞增生等多种细胞反应,Smad是TGF- β 信号通路下游信号的关键传导分子,限制性Smad蛋白Smad2和Smad3介导TGF- β_1 胞内信号传导,在哮喘发病过程中发挥重要作用,有报道证明抑制TGF- β /Smad3信号通路可减轻哮喘大鼠气道炎症和气道重塑,从而缓解气道高黏状态^[7]。黏蛋白5AC(MUC5AC)和黏蛋白5B(MUC5B)是促进气道分泌黏液的黏蛋白,两者表达与气道杯状细胞增生、黏液分泌密切相关^[8]。但益肺化痰汤是否能够通过调控TGF- β /Smad信号通路和黏蛋白表达减轻哮喘脾虚证气道高黏状态尚未可知。因此,本研究选取成年SD大鼠进行动物学实验,探究益肺化痰汤通过调控TGF- β /Smad信号通路及黏蛋白表达调节哮喘(脾虚证)患者气道高黏状态的作用与机制。

1 材料

1.1 动物 66只SD大鼠,8~9周龄,清洁级,雌雄各半,体质量180~220 g,购自广东至远生物医药科技有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(粤)2021-0057,使用许可证号SYXK(粤)2021-0251,分笼饲养。本研究已经过医院伦理委员会审批,医院动物伦理号2020-KY-017-05。

1.2 药物与试剂 益肺化痰汤组方为黄芪、丹参、党参、炒白术、防风、茯苓、山药、陈皮、法半夏、川芎、甘草(北京同仁堂,批号分别为6927856089277、6927856089185、244004944、3015684、3014936、244003096、244001754、244001166、38711903、

NJD044、244002973,经河北省中医院苏奎国教授鉴定,符合2020年版《中华人民共和国药典》^[9]和部颁药品质量标准),醋酸地塞米松(深圳振强生物技术有限公司,批号D0710000),卵蛋白(上海泽叶生物科技有限公司,批号ZY9000),灭活百日咳杆菌疫苗[爱必信(上海)生物科技有限公司,批号abs03016],氢氧化铝干粉(淄博诺达化工有限公司,批号h-wf-1);大鼠IL-4、IL-13、IFN- γ 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉赛培生物科技有限公司,批号分别为SP12281、SP12290、SP12301),苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、阿尔辛蓝-过碘酸雪夫(AB-PAS)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为G1285、G1120-3);总RNA提取试剂盒(瑞士罗氏公司,批号12033674001);TGF- β_1 、Smad2、Smad3、MUC5AC、MUC5B和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)聚合酶链式反应(PCR)引物(由北京博尔西科技有限公司合成);二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(上海睿时生物科技有限公司,批号23227);兔抗大鼠TGF- β_1 、Smad2、Smad3、MUC5AC、MUC5B和GAPDH单克隆抗体(一抗),羊抗兔TGF- β_1 、Smad2、Smad3、MUC5AC、MUC5B和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)辣根过氧化物酶(HRP)标记多克隆抗体(二抗)(深圳市豪地华拓生物科技有限公司,批号分别为YT763、ab228765、P84022、P98088、Q9HC84、5174S; P3718g-Rb、ab205718、A0516、ab6721、ab97200、LS-C36500)。

1.3 仪器 AN-831型超声雾化机(厦门安科瑞仪器有限公司),1000L型雾化箱(上海玉研科学仪器有限公司),HBS-1096B型酶标仪(北京合众博普科技发展有限公司),UV752型分光光度计(青岛路博伟业环保科技有限公司),JZ-TGL16M型低温高速离心机(南京威美特科学仪器有限公司),BX46型光学显微镜(日本奥林巴斯公司),QTOWER2.2型聚合酶链式反应(PCR)仪(德国耶拿分析仪器股份有限公司),BLYDYY-12型电泳仪(北京恒奥德仪器仪表有限公司)。

2 方法

2.1 益肺化痰汤流浸膏制备 益肺化痰汤药材组方^[10]为黄芪20 g,丹参、党参、炒白术、防风、茯苓、山药各10 g,陈皮、法半夏、川芎各5 g,甘草2 g,洗净后加入药材总量的6倍体积冷水浸泡30 min,加热,水沸后改为文火煎40 min,过滤药液,同法再次煎煮取药液,混合2次药液,80℃水浴浓缩药液为流浸膏,每1 mL流浸膏含1 g生药,4℃恒温保存。

2.2 造模、分组及给药 参照文献[11]构建脾虚动物模型,然后在脾虚动物模型基础上参照文献[12]构建哮喘脾虚证^①动物模型。^①脾虚动物模型:饮食不节,55只大鼠单只喂甘蓝15 g/只,双日以猪油3 mL/只灌胃,共8 d;疲劳过度,在上述处理当日使大鼠游泳至力竭,驱赶仍无法继续游泳,且出现身体向腹侧卷曲、发抖、欲溺水等征象,每日1次,共8 d;大鼠体质量下降、肌肉消瘦、食量减少、饮水增多、肛温升高、倦怠少动及游泳耐力下降等症状,符合脾虚病标准,表明脾虚证模型构建成功。^②哮喘脾虚证动物模型:在脾虚动物模型成功构建基础上,将大鼠于第1、3、5天腹腔注射抗原液1 mL(卵蛋白100 mg、灭活百日咳杆菌疫苗 5×10^4 个、氢氧化铝干粉100 mg)致敏;致敏后第15天,超声雾化机对1%卵蛋白溶液进行喷雾,各组大鼠于雾化箱中自行吸入激发,每次喷雾10 min,隔日1次,共3次;大鼠出现喘促、点头等呼吸困难症状表明哮喘脾虚证动物模型构建成功。将建模成功大鼠采用随机数字表分为模型组、地塞米松组、益肺化痰汤低、中、高剂量组,另取11只成年SD大鼠记为正常组。地

塞米松组予 $0.0875 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 醋酸地塞米松灌胃;益肺化痰汤低、中、高剂量组分别予 0.8 、 1.6 、 $3.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 益肺化痰汤流浸膏灌胃;模型组和正常组分别予 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 蒸馏水灌胃。每天1次,共8周。

2.3 ELISA 检测 各组大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)IL-4、IL-13、IFN- γ 水平 末次给药24 h后,脱颈处死大鼠,提取大鼠BALF:暴露大鼠气管及肺脏,一次性去针头注射器向气管和右侧肺中缓慢注入生理盐水6 mL,立即缓慢抽回,反复3次;获取抽吸液, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min(离心半径6.2 cm),取上清即为BALF;在酶标包被板上加入待测样品, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 温育30 min,洗涤,加入酶标试剂, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 温育30 min,洗涤,显色反应,测450 nm吸光度A。

2.4 HE 染色观察 各组大鼠肺组织病理改变与病理评分 末次给药24 h后,取大鼠左肺门组织,多聚甲醛固定,切片($5 \mu\text{m}$);HE染色,苏木素染色30 min,水洗,伊红复染3 min,脱水脱透明中性树胶封片;光学显微镜下观察肺组织的病理改变。按照UNDERWOOD等的^[13]研究标准对肺组织炎症病变进行评分,取平均值,肺组织炎症病变评分标准见表1。

表1 肺组织炎症病变评分

Table 1 Score of pulmonary inflammation

组织病变分级	血管和支气管周围嗜酸性粒细胞	组织水肿	肺组织上皮损伤
0	正常	正常	正常
1	轻度细胞浸润,未见组织损伤	轻度组织水肿	轻度细胞脱落
2	轻到中度细胞浸润,轻度组织损伤	中度支气管水肿	轻度细胞脱落
3	中度细胞浸润,轻度组织损伤	区域性和灶性水肿	中度细胞脱落
4	中到重度细胞浸润,明显组织损伤	显著水肿	中度细胞脱落
5	重度细胞浸润,显著组织损伤改变	显著水肿	上皮细胞化生

2.5 AB-PAS 染色检测 各组大鼠气道杯状细胞增生与黏液分泌 末次给药24 h后,取右肺近肺门处组织,固定,常规石蜡包埋切片($5 \mu\text{m}$)。常规脱蜡至水,高碘酸染色10 min,水洗;雪夫(Schiff)试剂染色10 min,去Schiff试剂;滴加偏重亚硫酸钠2 min,2次;流水洗10 min,常规脱水、透明、封片。光学显微镜下随机选取5个支气管腔大小视野进行观察。气道上皮杯状细胞面积即气道阳性相对着色面积可反映气道内黏液分泌程度。气道阳性相对着色面积=气道上皮杯状细胞面积/总细胞面积 $\times 100.00\%$ 。

2.6 实时荧光定量PCR(Real-time PCR)检测 各组大鼠肺组织TGF- β_1 、Smad2、Smad3、MUC5AC、MUC5B mRNA表达 末次给药24 h,取右肺下叶

100 mg,提取总RNA,核酸蛋白仪检测RNA纯度为1.8~2.0合格,逆转录合成互补脱氧核糖核酸,PCR反应,引物序列见表2。反应条件为 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性5 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性10 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火、延伸30 s,循环40次。本研究选取GAPDH为内参基因,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ^[14]表示待测基因mRNA相对表达量。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 各组大鼠肺组织TGF- β_1 、Smad2、Smad3、MUC5AC、MUC5B蛋白表达 末次给药24 h后,取大鼠右肺中叶100 mg,于冰浴中用裂解液处理细胞20 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径6.2 cm),取上清液,BCA法检测蛋白浓度,调整蛋白浓度为 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。每泳道上样 $5 \mu\text{L}$,电泳,转膜,封闭,加一抗(1:500) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,洗涤,加HRP标记二抗

表2 引物序列

Table 2 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
TGF-β ₁	上游 TACAGGGCTTTTCGCTTCAGT	394
	下游 TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC	
Smad2	上游 GCTCAAGCATGTCCTAAAGTCC	276
	下游 ACTGTCTTATGCCAAACACGAAAC	
Smad3	上游 GCAGTGCCAATCACAGAGAA	386
	下游 AACAGCCTGGGAGAGACTCA	
MUC5AC	上游 TCAACGGAGACTGCGAGTACAC	135
	下游 TCTTGATGGCCTTGAGCA	
MUC5B	上游 CTGCGAGACCGAGGTCAACATC	415
	下游 TGGGCAGCAGGAGCACGGAG	
GAPDH	上游 ATGACATCAAGAAGGTGGTG	177
	下游 CATAACCAGGAAATGAGCTTG	

(1:1 000), 室温孵育 1 h, 洗涤, 显色 5 min, 分析待测基因与内参基因蛋白条带比值。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析, 多样本计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间以单因素方差分析和 SNK-q 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

表3 益肺化痰汤对各组大鼠 BALF 中 IL-4、IL-13、IFN-γ 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	IL-4	IL-13	IFN-γ
正常组	11		7.322±1.443	20.161±3.832	61.082±12.031
模型组	10		18.594±3.615 ²⁾	41.572±7.644 ²⁾	28.934±5.643 ²⁾
地塞米松组	11	0.087 5	14.212±2.743 ⁴⁾	34.911±6.072 ³⁾	36.165±7.031 ³⁾
益肺化痰汤低剂量组	11	800	13.931±2.691 ⁴⁾	34.473±6.041 ³⁾	37.252±7.113 ⁴⁾
益肺化痰汤中剂量组	11	1 600	11.363±2.190 ^{4,5,7)}	29.344±5.193 ^{4,5,7)}	44.591±8.716 ^{4,5,7)}
益肺化痰汤高剂量组	11	3 200	8.951±1.711 ^{4,6,8,10)}	24.521±4.481 ^{4,6,8,9)}	53.310±10.063 ^{4,6,8,9)}

注: 与正常组比较¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01; 与模型组比较³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01; 与地塞米松组比较⁵⁾P<0.05, ⁶⁾P<0.01; 与益肺化痰汤低剂量组比较⁷⁾P<0.05, ⁸⁾P<0.01; 与益肺化痰汤中剂量组比较⁹⁾P<0.05, ¹⁰⁾P<0.01(表4-表7同)

3.3 对各组大鼠肺组织病理改变及病理评分的影响 研究结果显示, 正常组大鼠肺组织形态完整, 气道周围无炎细胞浸润, 黏膜无增生、变形。与正常组比较, 模型组大鼠气道黏膜层及黏膜下层见大量炎性细胞浸润, 气管平滑肌明显增厚, 黏膜处存在大量上皮细胞增生、变形及脱落现象。与模型组比较, 地塞米松组和益肺化痰汤低剂量组大鼠气道黏膜层及黏膜下层炎性细胞浸润、气管平滑肌增厚现象、黏膜处上皮细胞增生、变形及脱落现象均减少; 益肺化痰汤中剂量组大鼠气道黏膜层及黏膜下层炎性细胞浸润进一步减少、气管平滑肌增厚现象和黏膜处上皮细胞增生、变形及脱落现象更少;

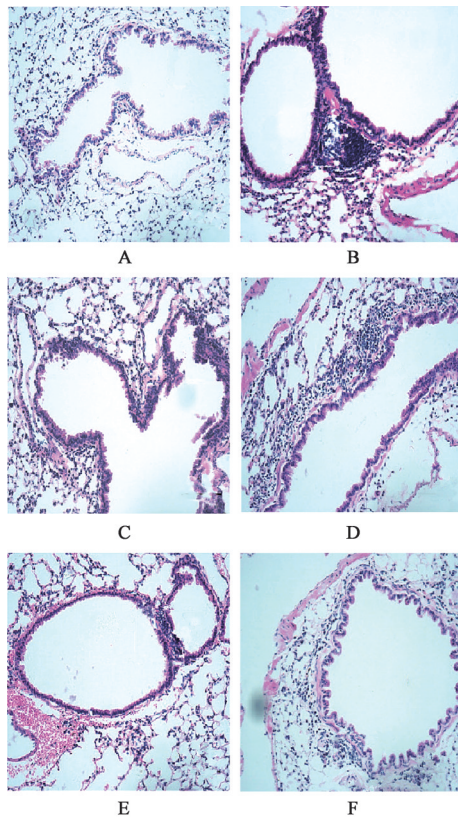
3 结果

3.1 对大鼠一般情况的影响 正常组大鼠体质量增加、肌肉、食量、饮水、肛温、精神及游泳耐力均正常, 且未见喘促、点头等呼吸困难症状; 与正常组比较, 建模大鼠存在体质量下降、肌肉消瘦、食量减少、饮水增多、肛温升高、倦怠少动及游泳耐力下降等符合脾虚证的症状, 同时伴随喘促、点头等呼吸困难症状。造模过程中有 1 只大鼠死亡, 将造模成功大鼠采用随机数字表分为模型组、地塞米松组、益肺化痰汤低、中、高剂量组, 除模型组 10 只外其余每组 11 只。

3.2 对各组大鼠 BALF 中 IL-4、IL-13、IFN-γ 水平的影响 与正常组比较, 模型组 IL-4、IL-13 水平显著上升, IFN-γ 水平显著下降(P<0.01)。与模型组比较, 地塞米松组和益肺化痰汤各剂量组 IL-4、IL-13 水平下降, IFN-γ 水平上升(P<0.05, P<0.01)。与地塞米松组比较, 益肺化痰汤低剂量组上述指标差异无统计学意义, 益肺化痰汤中、高剂量组 IL-4、IL-13 水平下降, IFN-γ 水平上升(P<0.05, P<0.01), 益肺化痰汤各剂量组呈剂量依赖性。见表 3。

益肺化痰汤高剂量组大鼠气管周围仅存在少量炎细胞浸润、气管平滑肌增厚程度不明显、黏膜处上皮细胞增生不明显。与正常组比较, 模型组大鼠肺组织病理评分显著上升(P<0.01)。与模型组比较, 地塞米松组和益肺化痰汤各剂量组肺组织病理评分显著下降(P<0.01)。与地塞米松组比较, 益肺化痰汤低剂量组肺组织病理评分差异无统计学意义, 益肺化痰汤中、高剂量组肺组织病理评分显著下降(P<0.01), 益肺化痰汤各剂量组呈剂量依赖性。见图 1 和表 4。

3.4 对各组大鼠气道杯状细胞增生与黏液分泌的影响 正常组大鼠气道气管及支气管可见极少杯



注:A.正常组;B.模型组;C.地塞米松组;D~F.益肺化痰汤低、中、高剂量组(图2和图3同)

图1 益肺化痰汤对各组大鼠肺组织病理的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Yifei Huatan decoction on lung tissue pathology of rats in each group (HE, ×200)

表4 益肺化痰汤对各组大鼠肺组织病理评分的影响(̄x±s)

Table 4 Effect of Yifei Huatan decoction on pathological score of lung tissue in rats of each group (̄x±s) 分

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	肺组织病理评分
正常组	11		0
模型组	10		4.40±0.52 ²⁾
地塞米松组	11	0.087 5	2.55±0.82 ⁴⁾
益肺化痰汤低剂量组	11	800	2.64±0.67 ⁴⁾
益肺化痰汤中剂量组	11	1 600	1.73±0.65 ^{4,6,8)}
益肺化痰汤高剂量组	11	3 200	0.91±0.54 ^{4,6,8,10)}

状细胞存在,气道内无明显黏液分泌。与正常组比较,模型组大鼠气道可见大量杯状细胞增生,且形成大量黏液栓,气道黏液分泌显著增加($P<0.01$)。与模型组比较,地塞米松组和益肺化痰汤低剂量组大鼠杯状细胞增生减轻、黏液分泌减少($P<0.01$),益肺化痰汤中剂量组大鼠杯状细胞增生进一步减轻、黏液分泌进一步减少($P<0.01$),益肺化痰汤高剂量组大鼠杯状细胞增生极少、黏液分泌程度显著下降($P<0.01$),基本趋于正常。见图2和表5。

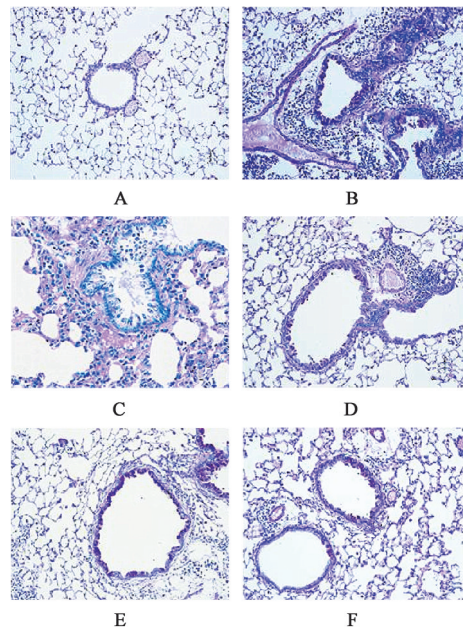


图2 益肺化痰汤对各组大鼠气道黏液分泌的影响(AB-PAS, ×200)

Fig. 2 Effect of Yifei Huatan decoction on airway mucus secretion of rats in each group (AB-PAS, ×200)

表5 益肺化痰汤对各组大鼠气道组织AB-PAS阳性相对着色面积的影响(̄x±s)

Table 5 Effect of Yifei Huatan decoction on AB-PAS positive relative staining area in airway tissue of rats in each group (̄x±s) %

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	气道组织AB-PAS阳性相对着色面积
正常组	11		1.061±0.201
模型组	10		17.153±3.036 ²⁾
地塞米松组	11	0.087 5	12.553±2.401 ⁴⁾
益肺化痰汤低剂量组	11	800	11.973±2.296 ⁴⁾
益肺化痰汤中剂量组	11	1 600	7.871±1.421 ^{4,6,8)}
益肺化痰汤高剂量组	11	3 200	5.203±1.004 ^{4,6,8,10)}

3.5 对各组大鼠肺组织TGF-β₁、Smad2、Smad3、MUC5AC、MUC5B mRNA表达的影响 研究结果显示,与正常组比较,模型组TGF-β₁、Smad2、Smad3、MUC5AC、MUC5B mRNA表达显著上升,差异具有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,地塞米松组和益肺化痰汤各剂量组TGF-β₁、Smad2、Smad3、MUC5AC、MUC5B mRNA表达明显降低($P<0.05, P<0.01$)。与地塞米松组比较,益肺化痰汤低剂量组上述指标差异无统计学意义,益肺化痰汤中、高剂量组TGF-β₁、Smad2、Smad3、MUC5AC、MUC5B mRNA表达明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$),益肺化痰汤各剂量组呈剂量依赖性。见表6。

表6 益肺化痰汤对各组大鼠肺组织 TGF-β₁、Smad2、Smad3、MUC5AC、MUC5B mRNA 相对表达量的影响 (x̄±s)

Table 6 Effect of Yifei Huatan decoction on mRNA relative expression of TGF-β₁, Smad2, Smad3, MUC5AC and MUC5B in lung tissue of rats in each group (x̄±s)

组别	n	剂量 /mg·kg ⁻¹	TGF-β ₁	Smad2	Smad3	MUC5AC	MUC5B
正常组	11		1.003±0.196	1.108±0.216	1.012±0.194	1.061±0.192	1.110±0.201
模型组	10		2.942±0.558 ²⁾	2.607±0.514 ²⁾	2.125±0.398 ²⁾	5.032±0.964 ²⁾	3.723±0.736 ²⁾
地塞米松组	11	0.087 5	2.403±0.451 ³⁾	2.184±0.402 ³⁾	1.802±0.294 ³⁾	4.007±0.781 ³⁾	3.019±0.587 ³⁾
益肺化痰汤低剂量组	11	800	2.397±0.429 ³⁾	2.181±0.406 ³⁾	1.793±0.301 ³⁾	3.893±0.756 ⁴⁾	3.021±0.583 ³⁾
益肺化痰汤中剂量组	11	1 600	1.902±0.354 ^{4,6,8)}	1.754±0.308 ^{4,5,7)}	1.521±0.287 ^{4,5,7)}	2.904±0.558 ^{4,6,8)}	2.497±0.495 ^{4,5,7)}
益肺化痰汤高剂量组	11	3 200	1.523±0.286 ^{4,6,8,9)}	1.416±0.232 ^{4,6,8,10)}	1.226±0.232 ^{4,6,8,9)}	1.945±0.359 ^{4,6,8,10)}	1.835±0.361 ^{4,6,8,10)}

3.6 对 各 组 大 鼠 肺 组 织 TGF-β₁、Smad2、Smad3、MUC5AC、MUC5B 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠 TGF-β₁、Smad2、Smad3、MUC5AC、MUC5B 蛋白表达显著升高(P<0.01)。与模型组比较,地塞米松组和益肺化痰汤各剂量组 TGF-β₁、Smad2、Smad3、MUC5AC、MUC5B 蛋白表达明显

降低(P<0.05, P<0.01)。与地塞米松组比较,益肺化痰汤低剂量组上述指标差异无统计学意义,益肺化痰汤中、高剂量组 TGF-β₁、Smad2、Smad3、MUC5AC、MUC5B 蛋白表达明显降低(P<0.05, P<0.01),益肺化痰汤各剂量组呈剂量依赖性。见表7和图3。

表7 益肺化痰汤对各组大鼠肺组织 TGF-β₁、Smad2、Smad3、MUC5AC、MUC5B 蛋白表达的影响 (x̄±s)

Table 7 Effect of Yifei Huatan decoction on expression of TGF-β₁, Smad2, Smad3, MUC5AC and MUC5B in lung tissue of rats in each group (x̄±s)

组别	n	剂量 /mg·kg ⁻¹	TGF-β ₁ /GAPDH	Smad2/GAPDH	Smad3/GAPDH	MUC5AC/GAPDH	MUC5B/GAPDH
正常组	11		0.082±0.014	0.073±0.013	0.085±0.016	0.146±0.025	0.195±0.036
模型组	10		0.756±0.142 ²⁾	0.631±0.123 ²⁾	0.894±0.172 ²⁾	0.562±0.107 ²⁾	0.468±0.089 ²⁾
地塞米松组	11	0.087 5	0.573±0.112 ⁴⁾	0.497±0.091 ³⁾	0.703±0.138 ⁴⁾	0.461±0.082 ³⁾	0.392±0.072 ³⁾
益肺化痰汤低剂量组	11	800	0.565±0.101 ⁴⁾	0.493±0.092 ⁴⁾	0.710±0.141 ³⁾	0.459±0.083 ³⁾	0.384±0.071 ³⁾
益肺化痰汤中剂量组	11	1 600	0.387±0.074 ^{4,6,8)}	0.305±0.057 ^{4,6,8)}	0.482±0.094 ^{4,6,8)}	0.374±0.071 ^{4,5,7)}	0.302±0.054 ^{4,6,8)}
益肺化痰汤高剂量组	11	3 200	0.168±0.031 ^{4,6,8,10)}	0.149±0.024 ^{4,6,8,10)}	0.217±0.041 ^{4,6,8,10)}	0.261±0.049 ^{4,6,8,10)}	0.251±0.042 ^{4,6,8,9)}

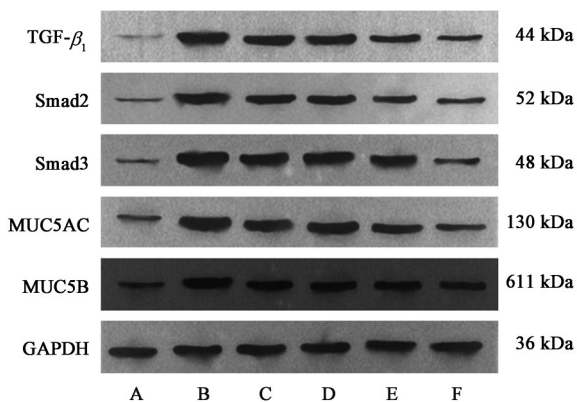


图3 各组大鼠肺组织 TGF-β₁、Smad2、Smad3、MUC5AC、MUC5B 蛋白电泳

Fig. 3 Electrophoresis of TGF-β₁, Smad2, Smad3, MUC5AC and MUC5B protein in lung tissue of rats in each group

4 讨论

哮喘是一种多基因遗传病,有明确的家族性;

各种特异性和非特异性吸入物,如感染、食物、药物、气候变化等环境因素影响易感个体,也会加速哮喘恶化或持续发病,故哮喘的发生是基因和环境等多种因素共同作用的结果,而气道黏液高分泌为哮喘主要病理学表现之一^[15]。目前治疗哮喘的常用药如地塞米松等糖皮质激素、茶碱类药物和白三烯受体阻滞剂等均有抑制气道黏液高分泌的作用^[16],尽管具有一定疗效,但存在不能根治、治疗周期长、不良反应等问题,因此急需寻找更加高效的药物以解决这些问题。

哮喘属中医“哮病”“喘证”范畴,缓解期常见于肺脾气虚证。《诸病源候论》曰:“肺病令人上气,兼胸膈痰满,气行壅滞,喘息不调,至咽喉有如水鸡之鸣也。”又如《王旭高医案》曰:“痰恋不化,气机阻滞,一触风寒,喘即举发。”肺主气,肺气虚则至津液无气推行而停聚于内,凝结成痰;脾为气血生化之

源,脾气虚则运化失职,水湿停聚,凝结成痰;肺与外部相通,易受外界侵袭,使肺、脾二脏虚损,脾失运化、肺失宣降,聚而成痰,故痰瘀互结为哮喘病机关键,肺脾肾不足为病机根本,治疗上以益肺健脾、化痰逐瘀为主要原则。

本研究结果显示,造模大鼠体质量下降、肌肉消瘦、食量减少、饮水增多、肛温升高、倦怠少动及游泳耐力下降、喘促、点头、呼吸困难等症状,与既往研究中哮喘脾虚证模型病理情况一致,证明本研究哮喘(脾虚证)模型制备成功^[17]。地塞米松是治疗哮喘的关键药物,因此本研究选取地塞米松为阳性药物,与益肺化痰汤治疗形成对照,确保研究的准确性和严谨性^[18]。本研究结果表明,益肺化痰汤可有效抑制气道杯状细胞增生,抑制炎症细胞浸润,抑制上皮细胞增生、变性及脱落,抑制黏液分泌,减轻哮喘脾虚证大鼠气道高黏状态。益肺化痰汤中黄芪为君药,补益肺脾、益气固表;党参、山药、茯苓健脾润肺、补中益气以扶正,防风、白术祛风邪、益气固表,陈皮、法半夏理气燥湿、化痰祛瘀,共为臣药;丹参、川芎活血化瘀,共为佐药;甘草补脾益气、祛痰止咳,调和诸药,为使药,众药配伍,共奏补肺健脾、化痰逐瘀之功。有研究指出黄芪多糖可有效改善哮喘大鼠气道和肺组织炎症,减少气道血管重塑,发挥抗哮喘作用^[19-20]。故而益肺化痰汤可能通过缓解哮喘大鼠(脾虚证)气道和肺组织炎症状态减轻气道高黏状态。

本研究结果发现益肺化痰汤可下调IL-4、IL-13水平,上调IFN- γ 水平,抑制TGF- β_1 、Smad2、Smad3、MUC5AC、MUC5B表达,发挥减轻气道高黏状态作用。哮喘为气道慢性炎症性疾病,机体接触变应原后,T辅助细胞(Th)亚群释放的IL-4、IL-13、IFN- γ 等细胞因子,在炎症级联反应中发挥关键的调节作用,MOLITORISOVA等^[21]发现下调IL-4、IL-13水平,上调IFN- γ 水平,可减轻气道炎症反应;胡蔚等^[22]发现下调IL-4和IL-13水平,可抑制哮喘小鼠肺组织炎症细胞浸润和黏液的分泌。气道黏液大量分泌是哮喘气道炎症的特征性改变,杯状细胞是黏液产生和分泌的主要细胞,杯状细胞脱颗粒释放黏蛋白可加重哮喘恶化程度。TGF- β_1 在细胞生长分化、免疫调节、炎症反应中发挥关键的调节作用,可促进炎症细胞增殖、分化,促进气道炎症反应,促进哮喘患者气道杯状细胞增生导致气道内黏液分泌增多^[23-24]。TGF- β /Smad信号通路在哮喘发病过程中发挥重要作用,Smad2和Smad3是TGF- β /Smad

信号通路下游第一信号分子,张鹤等^[25]发现抑制TGF- β_1 、Smad2、Smad3表达,可抑制炎症细胞浸润、黏液分泌、上皮下胶原沉积,发挥调节气道重塑的作用;DONG等^[26]指出抑制TGF- β_1 、Smad2、Smad3表达,下调IL-4和IL-13水平可减轻哮喘小鼠气道炎症和气道重塑。黏蛋白MUC5AC和MUC5B是气道黏蛋白的主要成分,位于气道上皮杯状细胞内,两者表达水平反应出气道杯状细胞增生程度及气道黏液的分泌状态^[27]。程丹等^[28]发现IL-13可促进MUC5AC高表达引起哮喘气道黏液的高分泌。本研究结果与上述研究结果一致,提示益肺化痰汤可能通过抑制TGF- β_1 、Smad2、Smad3、MUC5AC、MUC5B表达,下调IL-4、IL-13水平,上调IFN- γ 水平发挥减轻哮喘气道高黏状态的作用。有报道指明黄芪多糖和黄芪甲苷可下调BALF或痰液中IL-4、IL-13水平、上调INF- γ 水平改善哮喘小鼠肺组织炎症浸润,减轻气道炎症,从而发挥抗哮喘作用^[29-30];隐丹参酮可通过调节TGF- β_1 /smad信号通路调节小鼠气道炎症^[31]。因此,益肺化痰汤方药可抑制气道炎症反应,减轻哮喘气道高黏状态。

综上所述,益肺化痰汤可减轻哮喘脾虚证气道高黏状态,可能通过抑制TGF- β_1 、Smad2、Smad3、MUC5AC、MUC5B表达,下调IL-4、IL-13水平,上调IFN- γ 水平,缓解气道炎症状态,抑制气道杯状细胞增生,抑制黏液分泌;益肺化痰汤呈剂量依赖性。本研究首次提出益肺化痰汤可通过调节炎症因子分泌及TGF- β_1 /Smad信号通路减轻哮喘脾虚证机体气道炎症和黏液分泌状态。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 廖小刚,朱爱勇,王欣国,等. 中国成人哮喘患病率的Meta分析[J]. 中国循证医学杂志, 2020, 20(10): 1164-1172.
- [2] 周舒,黄嘉,梁雅丽,等. 中国儿童哮喘患病率及其危险因素Meta分析[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2020, 47(3): 253-259.
- [3] SHASTRI M D, CHONG W C, DUA K, et al. Emerging concepts and directed therapeutics for the management of asthma: Regulating the regulators[J]. Inflammopharmacology, 2021, 29(1): 15-33.
- [4] 李成辉,任宝琦,黄镛. 支气管哮喘中医证候的现代文献研究[J]. 中国中医急症, 2021, 30(5): 790-792.
- [5] 白焕强,王淑萍. 益肺化痰汤加减治疗脾肺气虚证哮喘疗效观察[J]. 中国中医急症, 2018, 27(8): 1451-1453.

- [6] CELLAT M, KUZU M, İŞLER C T, et al. Tyrosol improves ovalbumin (OVA) -induced asthma in rat model through prevention of airway inflammation[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2021, 394(10):2061-2075.
- [7] GE Y, CHENG R, SUN S, et al. Fangxiao formula alleviates airway inflammation and remodeling in rats with asthma via suppression of transforming growth factor- β /Smad3 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 119:109429.
- [8] CAMPBELL L, HEPWORTH M R, WHITTINGHAM-DOWD J, et al. ILC2s mediate systemic innate protection by priming mucus production at distal mucosal sites[J]. *J Exp Med*, 2019, 216(12):2714-2723.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020.
- [10] 杨华, 田萌, 米烈汉. 益肺化痰汤治疗支气管哮喘非急性发作期 37 例[J]. *陕西中医*, 2016, 37(2):208-209.
- [11] 姜宇璐, 张北雪, 马善鹏, 等. 4 种不同来源的苍术和白术对偏于实证的脾虚大鼠药效学比较研究[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(8):142-146.
- [12] 史琦, 李春雷, 孔艳华, 等. SD 大鼠哮喘模型建立方法及评价的比较研究[J]. *世界中医药*, 2019, 14(11):2887-2892.
- [13] UNDERWOOD S, FOSTER M, RAEBURN D, et al. Time-course of antigen-induced airway inflammation in the guinea-pig and its relationship to airway hyperresponsiveness [J]. *Eur Respir J*, 1995, 8(12):2104-2113.
- [14] KUMAR A, LORAND D. Robust $\Delta\Delta\text{ct}$ estimate [J]. *Genomics*, 2021, 113(1 Pt 1):420-427.
- [15] JOHANSSON H, MERSHA T B, BRANDT E B, et al. Interactions between environmental pollutants and genetic susceptibility in asthma risk [J]. *Curr Opin Immunol*, 2019, 60:156-162.
- [16] LOMMATZSCH M, BUHL R, KORN S. The treatment of mild and moderate asthma in adults [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2020, 117(25):434-444.
- [17] 吴瑞, 李秀敏, 苗明三. 基于中西医临床病证特点的哮喘动物模型分析[J]. *中药药理与临床*, 2020, 36(2):253-257.
- [18] RODRIGUEZ-MARTINEZ C E, SOSSA-BRICEÑO M P, CASTRO-RODRIGUEZ J A. Dexamethasone or prednisolone for asthma exacerbations in children: A cost-effectiveness analysis [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2020, 55(7):1617-1623.
- [19] 王利红, 张影, 兰坤, 等. 黄芪多糖对哮喘模型小鼠肺组织炎症的抑制作用及其机制[J]. *吉林大学学报:医学版*, 2019, 45(2):313-318, 后插4.
- [20] 闫伟华, 常静侠. 黄芪多糖对哮喘大鼠气道炎症及肺组织血管内皮生长因子表达的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(8):953-955.
- [21] MOLITORISOVA M, SUTOVSKA M, KAZIMIEROVA I, et al. The anti-asthmatic potential of flavonol kaempferol in an experimental model of allergic airway inflammation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 891:173698.
- [22] 胡蔚, 李岚. 枇杷叶提取物对卵清蛋白诱导的哮喘小鼠气道炎症和气道重塑的影响[J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38(1):20-27.
- [23] 翟建宾, 赵亮, 于士昌, 等. 桑苏饮调控 TLR4 通路抑制哮喘大鼠气道炎症[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(14):21-28.
- [24] YU J, LI K, XU J. Indoor PM_{2.5} from coal combustion aggravates ovalbumin-induced asthma-like airway inflammation in BALB/c mice [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 317(1):L29-L38.
- [25] 张鹤, 张芸, 王宋平. 1, 25-二羟维生素 D₃ 通过 TGF- β_1 /(Smad2/3)影响的 ROS 调节气道重塑[J]. *天津医药*, 2020, 48(4):267-270, 236.
- [26] DONG L, WANG Y, ZHENG T, et al. Hypoxic hUCMSC-derived extracellular vesicles attenuate allergic airway inflammation and airway remodeling in chronic asthma mice [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1):4.
- [27] WANG A, ZHANG Q, WANG Y, et al. Inhibition of Gabrp reduces the differentiation of airway epithelial progenitor cells into goblet cells [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(1):720.
- [28] 程丹, 陈恒睿, 王梦玫, 等. 白细胞介素-13 对支气管上皮细胞 SPDEF 表达的影响及 SPDEF 在哮喘气道黏液高分泌中的作用[J]. *临床内科杂志*, 2020, 37(1):53-56.
- [29] 商玉立, 郭彩霞, 石红梅, 等. 黄芪多糖对哮喘小鼠气道炎症启动因子 TSLP 和 DCs 表达的影响[J]. *中国抗生素杂志*, 2021, 46(7):711-716.
- [30] 黄思捷, 王嵩, 郁兰, 等. 黄芪甲苷 IV 对哮喘小鼠 Th2 转录因子表达的抑制作用[J]. *现代免疫学*, 2020, 40(1):28-33.
- [31] 王重阳, 姜京植, 李俊峰, 等. 隐丹参酮通过 TWEAK/Fn14 和 TGF- β_1 /Smads 信号通路缓解 OVA 诱导哮喘小鼠气道炎症[J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(8):1149-1154.

[责任编辑 王鑫]