

# 加味茵陈蒿汤对湿热哮喘大鼠气道白细胞介素-6, 信号转导因子-3 表达的影响及与气道炎症的关系

张桂菊<sup>1</sup>, 卢立伟<sup>1</sup>, 吴金勇<sup>1</sup>, 周朋<sup>1</sup>, 袁雷鸣<sup>1</sup>, 李燕宁<sup>2</sup>, 季旭明<sup>3\*</sup>

(1. 山东中医药大学第一临床医学院, 济南 250011;

2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011;

3. 山东中医药大学基础医学院, 济南 250355)

**[摘要]** **目的:**探讨加味茵陈蒿汤对湿热哮喘大鼠气道急性炎症的影响及其可能的机制。**方法:**50只健康雄性SD大鼠随机分成5组,每组10只,分别为空白组、湿热哮喘模型组、加味茵陈蒿汤低、高剂量组(6.29, 12.58 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、地塞米松组(0.08 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。多因素干预建立湿热哮喘大鼠模型,实验第16天开始给药,末次激发24h以内处死大鼠,腹主动脉采血,留取肺组织检测。对各组大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中细胞进行计数和炎性细胞分类,酶联免疫吸附实验(ELISA)法测定BALF中细胞因子白细胞介素(IL)-2, IL-4, IL-5, IL-6, 干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )水平,免疫组织化学染色检测气道信号转导因子-3(STAT3)蛋白表达,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,RT-PCR定量检测肺组织STAT3水平。应用SPSS 17.0软件进行统计分析。**结果:**与正常组比较,模型组IL-4, IL-5, IL-6水平升高( $P < 0.05$ ), IL-2, IFN- $\gamma$ 水平降低( $P < 0.05$ ),气道STAT3蛋白、肺组织STAT3 mRNA水平升高;与模型组比较,各给药组大鼠IL-4, IL-5, IL-6水平降低( $P < 0.05$ ), IL-2, IFN- $\gamma$ 水平均升高( $P < 0.05$ ),且哮喘大鼠BALF中IL-6, 气道STAT3蛋白,肺组织STAT3 mRNA分别与BALF中细胞总数及嗜酸性粒细胞,淋巴细胞, IL-4, IL-5, IL-6呈正相关( $P < 0.01$ ),与IL-2, IFN- $\gamma$ 呈负相关( $P < 0.01$ )。各给药组均可降低气道炎症及STAT3信号通路表达,地塞米松组疗效最优,其次为加味茵陈蒿汤低剂量组。**结论:**加味茵陈蒿汤能明显降低气道炎症,其作用机制可能与抑制IL-6/STAT3信号通路表达从而调节Th1/Th2细胞因子失衡有关。

**[关键词]** 湿热哮喘; 气道白介素-6/信号转导因子-3; 气道炎症

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)15-0133-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015150133

**Influence of Jiawei Yinchenhao Decoction on Expression of IL-6/STAT3 and Relationship Between IL-6, STAT3 and Acute Airway Inflammation in Dampness-heat Asthma Rat** ZHANG Gui-ju<sup>1</sup>, LU Li-wei<sup>1</sup>, WU Jin-yong<sup>1</sup>, ZHOU Peng<sup>1</sup>, XI Lei-ming<sup>1</sup>, LI Yan-ning<sup>2</sup>, JI Xu-ming<sup>3\*</sup> (1. The First Clinical College of Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250011, China; 2. Department of Pediatrics of Shandong University of TCM Hospital, Ji'nan 250011, China; 3. College of Basic Medicine of Shandong University of TCM, Ji'nan 250355, China)

**[Abstract]** **Objective:** To discuss the effect of Jiawei Yinchenhao decoction on the acute airway inflammation and its possible mechanism in the of dampness-heat asthma rat. **Method:** Fifty healthy male SD rats were randomly divided into five groups: control group, dampness-heat asthma model group and Jiawei Yinchenhao decoction low dose group, Jiawei Yinchenhao decoction high dose group, dexamethasone group, 10 rats in each group. The dampness-heat asthma model was induced by multi-factors. The rats in dampness-heat asthma groups were fed with medicine from 16th day of the experiment. The rats were killed within 24 h after the last asthma provocation test to collect abdominal aortic blood and lung tissue specimens for testing indexes. The bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected, the total cell and the cell differentials were counted, the level of interleukin-

**[收稿日期]** 20140911(016)

**[基金项目]** 山东省中医药科技发展计划项目(2011-045)

**[第一作者]** 张桂菊, 副教授, 从事中医儿科疾病诊疗工作, Tel: 13685316296, E-mail: 13685316296@163.com

**[通讯作者]** \*季旭明, 教授, 从事方剂作用机制及药效物质基础研究, Tel: 13793171451, E-mail: jixuming724@163.com

2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-6, and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in BALF were measured by ELISA. The expression of signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) in airway was detected by immunohistochemistry technique. With glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) being a control, airway tissue extracts were used for detecting STAT3/GAPDH expression level by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). SPSS 17.0 software was used to analyze the data. **Result:** Compared with the control group, the level of IL-2 and IFN- $\gamma$  in BALF of the other groups was declined while IL-4, IL-5 and IL-6 level was higher than that in the control group. Compared with the dampness-heat asthma group, the IL-4, IL-5 and IL-6 level in treatment groups was significantly lower than that in the model group ( $P < 0.05$ ), while IL-2, IFN- $\gamma$  was higher. The level of IL-6, STAT3 and STAT3/GAPDH had positive correlations with IL-4, IL-5 and IL-6 in BALF ( $P < 0.05$ ) and negative correlations with IL-2, IFN- $\gamma$ . All the treatment group could reduce airway inflammation. **Conclusion:** Clearing heat and removing dampness and phlegm method could reduce the acute airway inflammation, its efficacy is dose-related, the Chinese medicine low dose group has better effect. Its mechanism may be related to inhibition of IL-6/STAT3 signaling pathway to regulate the expression of Th1/Th2 cytokine imbalance.

**[Key words]** dampness-heat asthma; interleukin-6/signal transducers and activators of transcription 3; airway inflammation

支气管哮喘是由多种细胞(如嗜酸性粒细胞、肥大细胞、T淋巴细胞、中性粒细胞等)和细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病,多种细胞因子通过不同的信号途径与哮喘的发病机制<sup>[1]</sup>。由于生活环境、饮食习惯等因素的变化,哮喘急性期(湿热证)(以下简称湿热哮喘)逐渐增多,除表现咳嗽、痰壅等肺系症状外,大便黏滞不爽或便秘,舌质红,苔厚腻等湿热证候也更加突出。临床研究表明清热利湿化痰法治疗湿热型哮喘患儿取得了较好的疗效<sup>[2]</sup>,能明显改善湿热哮喘患儿咳嗽、咯痰、哮鸣音等症状体征和肺功能,但其机制尚未进行探讨。本文通过建立湿热哮喘大鼠模型,研究湿热哮喘大鼠气道白介素-6/气道信号转导因子-3(IL-6/STAT3)表达和活化与气道炎症指标的相关性,观察清热利湿化痰法抑制肺组织 STAT3 磷酸化对气道炎症的影响,探讨清热利湿化痰法对湿热哮喘大鼠可能的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级雄性SD大鼠50只,山东中医药大学实验动物中心提供,合格证号SCXK(鲁)2005-1015,体重(150±10)g,月龄1~1.5月左右。饲养于山东中医药大学SPF动物实验室内温度(22±2)℃。

**1.2 药物、试剂** 加味茵陈蒿汤处方:茵陈12g,栀子6g,生大黄3g,苦参6g,浙贝母片6g,甘草6g;生药材购买于山东中医药大学附属医院。采用水煎醇沉法制作膏剂,山东中医药大学附属医院制剂室负责制剂和质量控制,制得中药药液生药含量

1g·mL<sup>-1</sup>,4℃冰箱保存备用。地塞米松片(晨欣药业股份有限公司,批号130606205)。

PCR随机引物(RIP022,北京鼎盛昌盛生物技术有限责任公司),卵清蛋白干粉(货号9006-59-1,北京索荣宝科技有限公司),抗-STAT3抗体(批号ab119352,Abcam公司),大肠埃希菌干燥菌种(山东省卫生防疫站菌种室,菌号8099)。大鼠白细胞介素(IL)-2(批号CK-E30648R),IL-4(批号CK-E30647R),IL-5(批号CK-E30490R),IL-6(批号CK-E30646R), $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ ,批号CK-E30654R)ELISA试剂盒(上海研辉生物科技有限公司)。

**1.3 仪器** 1510型全波长酶标仪(Thermo Fisher公司),S666F型超声雾化器(北京芬道实验器材有限公司),奥林巴斯CHC型双目生物显微镜,PRISM 7700型荧光定量PCR仪(ABI公司),1510型全波长酶标仪(Thermo Fisher公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组及模型的复制** 50只大鼠随机分成5组,每组10只,分别为正常组、湿热哮喘模型组和加味茵陈蒿汤低、高剂量(6.29,12.58g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),地塞米松组(0.08mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。模型复制<sup>[3-5]</sup>采取湿热环境、高脂饲料饮食、大肠埃希菌灌胃、哮喘激发多因素干预建立湿热哮喘大鼠模型,于每日上午和夜间ig给予各哮喘组大鼠2mL/只高脂饲料,连续喂养14d;正常组相同时间ig生理盐水2mL/只。第7,14天用1mL10%卵蛋白氢氧化铝生理盐水混悬液(100mg卵蛋白+100mg氢氧化铝+1mL生理盐水)对各哮喘组大鼠进行ip致敏;实验

第12天对各哮喘组大鼠 *ig* 大肠埃希菌 2 mL/只(密度  $1 \times 10^9$ /mL), 12 h 后再 *ig* 大肠埃希菌 1 mL/只(密度  $1 \times 10^9$ /mL)。第13天开始将各哮喘组大鼠放入温度  $(33 \pm 2)^\circ\text{C}$ , 相对湿度  $(95 \pm 3)\%$  环境中造模 3 d, 每天 8 h。实验第16天开始将各哮喘组大鼠放入密闭有机玻璃雾化箱中, 使大鼠吸入 2% 卵蛋白生理盐水溶液激发哮喘, 每日 1 次, 每次 30 min, 连续 7 d, 空白组则给予生理盐水雾化吸入; 同时, 自实验第16天于每日雾化激发前对各哮喘组大鼠灌胃给药至实验结束, 给药体积  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 空白组给予相同体积的生理盐水灌胃。于末次激发后 24 h 内, 处死大鼠, 腹主动脉取血, 留取肺组织进行各项指标检测。

**2.2 支气管肺泡灌洗液(BALF)及肺组织标本的留取** 末次激发后 24 h 内以 10% 水合氯醛  $3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  *ip* 麻醉, 腹主动脉取血 5 mL,  $4^\circ\text{C}$   $5\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心, 15 min 后提取血清, 置  $-80^\circ\text{C}$  低温冰箱待测。分离气管, 右肺用 5 mL PBS 液冲洗 3 遍, 回收 BALF 3 mL 静置 2 h 后经  $4^\circ\text{C}$   $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 离心 15 min, 取上清液  $-80^\circ\text{C}$  冰箱保留备检, 沉淀用 1 mL PBS 重悬细胞, 取 10  $\mu\text{L}$  重悬液。瑞氏染色法染色, 油镜下计数至少 400 个细胞并行炎症细胞计数和分类。左肺留取肺组织液氮速冻后  $-80^\circ\text{C}$  冰箱冻存备用。

**2.3 BALF 中 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- $\gamma$  检测** 酶联免疫吸附法(ELISA)测定 BALF 上清液 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- $\gamma$  水平, 详细步骤参见试剂盒说明书。

**2.4 气道 STAT3 蛋白表达** 免疫组织化学染色, 检测大鼠气道 STAT3 蛋白, 结果判断: 阳性信号为胞浆、核内呈换色或棕褐色颗粒, 用图像分析系统采集显微镜下图像, 高倍镜下(400 倍)对每张切片随机选择 5 个视野, 应用 Image-Pro Plus Version 5.1 软件进行分析。对阳性细胞进行扫描测定大鼠气道 STAT3 平均吸光度 *A*, 计算其平均值作为该切片的代表值, 用阳性细胞的平均 *A* 代表 STAT3 蛋白表达量的多少。

**2.5 肺组织 STAT3 mRNA 检测** 免疫荧光 RT-PCR 定量检测肺组织 STAT3 mRNA。从  $-80^\circ\text{C}$  冰箱提取组织标本按试剂盒说明分别提取各组细胞的总 RNA。用 DNase 处理提取的 RNA, 使用 TOYOBO 反转录试剂盒进行 cDNA 的合成, PCR 反应体系(25  $\mu\text{L}$ ): cDNA 1  $\mu\text{L}$ , primer F( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , primer R( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ ,  $2 \times \text{Mix}$  12.5  $\mu\text{L}$ ,

Sybr Green I( $10 \times$ ) 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu\text{L}$ , 反应条件为  $95^\circ\text{C}$ , 10 min, 然后  $95^\circ\text{C}$ , 15 s,  $60^\circ\text{C}$  1 min, 共 40 个循环, 扩增 STAT3。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳分析。依据目的基因 PCR 产物与 GAPDH 产物灰度比, 判断样品 STAT3 mRNA 浓度。PCR 引物如下: STAT3 上游 5'-GAGGAGGCA TTCGAAAG-3', 下游 5'-TCGTTGTTGTCACACAG AT-3'; GAPDH 上游 5'-ACAGCAACAGGGTGGTGG AC-3', 下游 5'-TTTGAAGGGTGCAG CGAACTT-3'。

**2.6 统计学分析** 实验数据用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 对符合正态分布的计量资料的多组之间比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 Dunnett-*t* 检验, 相关分析采用单因素直线相关分析, 以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 一般情况** 实验中各湿热组大鼠除出现烦躁、不停抓挠头面部、打喷嚏、呼吸加快、静伏不动, 严重者伸颈、缩胸、呈喘息状等典型哮喘激发病状外<sup>[5]</sup>, 各湿热哮喘组大鼠出现大便不同程度的黏滞或溏泄, 肛门红肿充血且污秽, 居处湿热环境时肛温较空白组大鼠显著升高, 倦怠食少, 体重增长缓慢, 皮毛逐渐枯槁无泽等湿热证症状<sup>[3-4]</sup>, 提示湿热哮喘的造模成功。

**3.2 对湿热哮喘大鼠 BALF 中细胞计数及炎症细胞分类的影响** 与正常组比较, 哮喘模型组炎症细胞总数升高( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组细胞总数和各类炎症细胞明显降低( $P < 0.01$ )。见表 1。

**3.3 对湿热哮喘大鼠 BALF 中 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- $\gamma$  水平的影响** 与正常组比较, 各哮喘组 IL-2, IFN- $\gamma$  降低, IL-4, IL-5, IL-6 升高( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组 IL-4, IL-5, IL-6 细胞因子水平降低( $P < 0.05$ ), 地塞米松组最低, 其次为加味茵陈蒿汤低剂量组。各治疗组 IL-2, IFN- $\gamma$  水平高于模型组( $P < 0.01$ )。见表 2。

**3.4 对湿热哮喘大鼠气道 STAT3 蛋白表达及肺组织 STAT3 mRNA 表达的影响** 与正常组比较, 湿热哮喘组气道 STAT3 蛋白吸光度 *A* 和肺组织 STAT3 mRNA 均升高( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 地米组气道 STAT3 *A* 和肺组织 STAT3 mRNA 均降低( $P < 0.05$ ), 加味茵陈蒿汤低剂量组气道 STAT3 蛋白表达降低( $P < 0.05$ )。见图 1, 表 3。

表 1 加味茵陈蒿汤对湿热哮喘大鼠 BALF 中细胞计数及炎性细胞分类的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effect of Jiawei Yinchenhao decoction on total cell and cell differentials in BALF in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

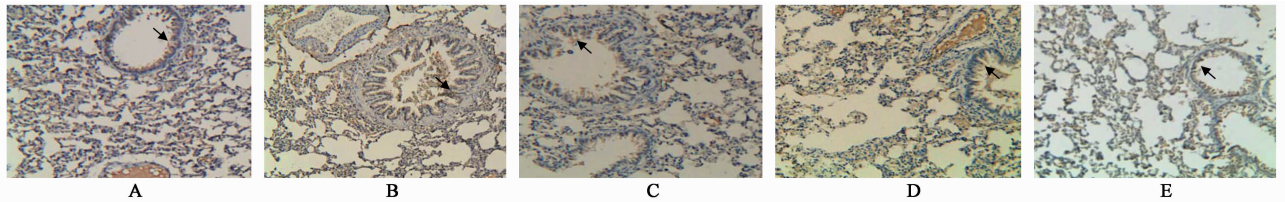
组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	细胞总数/ $\times 10^5/L$	中性粒细胞/ $\times 10^5/L$	嗜酸性粒细胞/ $\times 10^5/L$	淋巴细胞/ $\times 10^5/L$
正常	-	27.50 $\pm$ 0.92	3.75 $\pm$ 0.71	0.75 $\pm$ 0.71	3.88 $\pm$ 0.64
模型	-	132.38 $\pm$ 5.76 <sup>1)</sup>	18.25 $\pm$ 1.04 <sup>1)</sup>	40.12 $\pm$ 3.72 <sup>1)</sup>	25.63 $\pm$ 1.30 <sup>1)</sup>
加味茵陈蒿汤	6.29	81.25 $\pm$ 4.30 <sup>2)</sup>	12.63 $\pm$ 1.77 <sup>2)</sup>	16.25 $\pm$ 1.67 <sup>2)</sup>	17.38 $\pm$ 2.00 <sup>2)</sup>
	12.58	105.00 $\pm$ 6.91 <sup>2,3)</sup>	14.75 $\pm$ 1.16 <sup>2,3)</sup>	29.75 $\pm$ 1.98 <sup>2,3)</sup>	20.5 $\pm$ 2.07 <sup>2,3)</sup>
地塞米松	0.08	61.22 $\pm$ 4.24 <sup>2,3,4)</sup>	6.78 $\pm$ 1.09 <sup>2,3,4)</sup>	7.11 $\pm$ 1.17 <sup>2,3,4)</sup>	12.89 $\pm$ 1.27 <sup>2,3,4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与加味茵陈蒿汤 6.29  $g \cdot kg^{-1}$  组比较<sup>3)</sup> $P < 0.01$ ;与加味茵陈蒿汤 12.58  $g \cdot kg^{-1}$  组比较<sup>4)</sup> $P < 0.01$  (表 2~3 同)。

表 2 加味茵陈蒿汤对湿热哮喘大鼠 BALF 中 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- $\gamma$  水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of Jiawei Yinchenhao decoction on expression of level of IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- $\gamma$  in BALF in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	IL-2/ $ng \cdot L^{-1}$	IL-4/ $ng \cdot L^{-1}$	IL-5/ $ng \cdot L^{-1}$	IL-6/ $ng \cdot L^{-1}$	IFN- $\gamma$ / $ng \cdot L^{-1}$
正常	-	1 299.63 $\pm$ 75.02	35.34 $\pm$ 4.47	33.77 $\pm$ 3.02	48.77 $\pm$ 4.78	57.86 $\pm$ 4.14
模型	-	620.63 $\pm$ 67.94 <sup>1)</sup>	73.48 $\pm$ 4.71 <sup>1)</sup>	61.44 $\pm$ 4.14 <sup>1)</sup>	108.78 $\pm$ 8.27 <sup>1)</sup>	34.76 $\pm$ 5.40 <sup>1)</sup>
加味茵陈蒿汤	6.29	968.11 $\pm$ 51.30 <sup>2)</sup>	55.18 $\pm$ 2.53 <sup>2)</sup>	47.38 $\pm$ 2.76 <sup>2)</sup>	76.40 $\pm$ 4.07 <sup>2)</sup>	50.96 $\pm$ 3.27 <sup>2)</sup>
	12.58	822.67 $\pm$ 59.90 <sup>2,3)</sup>	62.48 $\pm$ 3.60 <sup>2,3)</sup>	53.68 $\pm$ 2.83 <sup>2,3)</sup>	89.93 $\pm$ 6.36 <sup>2,3)</sup>	42.27 $\pm$ 3.93 <sup>2,3)</sup>
地塞米松	0.08	1121.38 $\pm$ 90.98 <sup>2,3,4)</sup>	46.15 $\pm$ 4.53 <sup>2,3,4)</sup>	44.19 $\pm$ 3.28 <sup>2,4)</sup>	62.88 $\pm$ 5.03 <sup>2,3,4)</sup>	54.88 $\pm$ 3.56 <sup>2,4)</sup>



A. 正常组; B. 模型组; C. 加味茵陈蒿汤 6.29  $g \cdot kg^{-1}$  组; D. 加味茵陈蒿汤 12.58  $g \cdot kg^{-1}$  组; E. 地塞米松 0.08  $g \cdot kg^{-1}$  组

图 1 加味茵陈蒿汤对湿热哮喘大鼠气道 STAT3 表达的影响 (免疫组化,  $\times 400$ )

Fig. 1 Effect of Jiawei Yinchenhao decoction on expression of STAT3 in dampness-heat rats (Immunohistochemistry,  $\times 400$ )

表 3 加味茵陈蒿汤对湿热哮喘大鼠气道 STAT3 蛋白表达及肺组织 STAT3 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of Jiawei Yinchenhao decoction on expression of STAT3 protein in airway and STAT3/mRNA in lung tissue in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	气道 STAT3 蛋白/A	肺组织 STAT3 mRNA/GAPDH
正常	-	0.20 $\pm$ 0.02	0.014 $\pm$ 0.003
模型	-	0.51 $\pm$ 0.01 <sup>1)</sup>	0.110 $\pm$ 0.020 <sup>1)</sup>
加味茵陈蒿汤	6.29	0.39 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>	0.004 $\pm$ 0.001
	12.58	0.48 $\pm$ 0.02 <sup>3)</sup>	0.074 $\pm$ 0.010
地塞米松	0.08	0.22 $\pm$ 0.00 <sup>2,3,4)</sup>	0.017 $\pm$ 0.003 <sup>2,3,4)</sup>

**3.5 气道 STAT3 蛋白表达, 肺组织 STAT3/mRNA 与炎症指标的相关分析** 哮喘大鼠气道 STAT3 蛋白平均吸光度, STAT3 mRNA/GAPDH 分别与 BALF 中细胞总数及嗜酸性粒细胞、淋巴细胞呈正相关 ( $P < 0.01$ ), 与 IL-4, IL-5, IL-6 呈正相关 ( $P <$

0.01), 与 IL-2, IFN- $\gamma$  呈负相关 ( $P < 0.01$ )。见表 4。

表 4 STAT3 表达, IL-6 与炎症指标的相关分析

Table 4 Correlation analysis of STAT3, IL-6 and inflammatory markers

项目	气道 STAT3 蛋白/A		肺组织 STAT3 mRNA/GAPDH		IL-6	
	r 值	P	r 值	P	r 值	P
细胞总数	0.931	0.000	0.745	0.000	0.955	0.000
EOS 计数	0.942	0.000	0.793	0.000	0.933	0.000
LYM 计数	0.911	0.000	0.701	0.000	0.928	0.000
IL-2	-0.909	0.000	-0.752	0.000	-0.927	0.000
IL-4	0.906	0.000	0.729	0.000	0.935	0.000
IL-5	0.868	0.000	0.729	0.000	0.909	0.000
IFN- $\gamma$	-0.836	0.000	-0.772	0.000	-0.895	0.000

#### 4 讨论

Th1/Th2 细胞因子失衡在哮喘气道慢性炎症中起重要作用<sup>[1]</sup>,哮喘患儿 Th1 分泌的 IFN- $\gamma$ , IL-2 减少, Th2 分泌的 IL-4, IL-5 增多是导致 Th1/Th2 失衡的关键, IL-6/STAT3 信号通路是 IL-6 活化的主要通路,参与多种炎症反应,研究表明,湿热因素能够影响 Th1/Th2, Treg/Th17, IL-6 等细胞因子,在多种炎症性疾病中起重要作用<sup>[6]</sup>。本研究采用多因素干预建立湿热哮喘大鼠模型<sup>[3-5]</sup>,并应用清热利湿化痰法,采用加味茵陈蒿汤进行干预,研究湿热哮喘大鼠 IL-6/STAT3 气道炎症之间的关系。实验数据表明,IL-6 和 STAT3 表达水平与 BALF 中炎性细胞和 IL-4, IL-5 水平呈正相关,与 IFN- $\gamma$ , IL-2 表达呈负相关,中药治疗组在减轻气道炎性指标和抑制气道 STAT3 表达磷酸化方面疗效确切,提示清热利湿化痰法可能通过抑制 IL-6/STAT3 信号通路的表达,实现对 Th1/Th2 失衡的调节。

IL-6 与哮喘、类风湿性关节炎等炎性疾病发病关系密切,其受体广泛存在于机体各个组织,IL-6 与受体结合后激活细胞内酪氨酸激酶-信号转导和转录激活因子信号转导通路,通过转录因子-3 (STAT3) 磷酸化后转移到核内调节靶基因的表达<sup>[7]</sup>。STAT3 能启动 Th17 分化,使气道上皮细胞、平滑肌细胞高表达 IL-6 加重气道炎症<sup>[7-8]</sup>。Marina 等<sup>[9]</sup>观察到与正常模型相比,STAT3 基因敲除小鼠气道 EOS, IL-4, IL-5 等明显减少。Finotto 等<sup>[10]</sup>应用 IL-6 抗体和 gp130 融和蛋白干预局部阻断 IL-6 受体的信号通路,发现干预组哮喘小鼠气道炎症明显减轻。另外 IL-6 能通过 STAT3 活化、上调细胞因子信号抑制分子 1 (SOCS1) 表达,干扰 IFN- $\gamma$  受体的信号转导,促进 Th2 细胞因子优势,抑制 Th1 分化<sup>[11]</sup>,同时促进活化 CD4<sup>+</sup>T 细胞分泌 IL-4 诱导 Th2 分化。各哮喘组 IL-6 水平明显高于正常组 ( $P < 0.01$ ),气道 STAT3 和肺组织 STAT3/GAPDH 表达高于正常组。且大鼠 IL-6,气道 STAT3 吸光度值、肺组织 STAT3/GAPDH 分别与 BALF 中细胞总数及嗜酸性粒细胞、淋巴细胞呈正相关 ( $P < 0.01$ ),与 IL-4, IL-5, IL-6 呈正相关 ( $P < 0.01$ ),与 IL-2, IFN- $\gamma$  呈负相关 ( $P < 0.01$ )。地塞米松组在降低 IL-6 和 STAT3 水平疗效最好,其次为中药低剂量组。

本研究应用清热利湿化痰法,方剂选用加味茵陈蒿汤,在原方基础上加用苦参、浙贝母、甘草,苦参味苦可泄肠腑之热,和栀子清利三焦共为臣药;浙贝母清热降气化痰,与大黄同用,可加强君臣清热利气

之效,故为佐药;甘草调和诸药,以缓诸苦药苦寒之性,是为使药。全方组合共奏清热、去湿、利气之功。但本方药性皆苦寒,用量不宜过大,本实验大鼠采用幼龄 SD 大鼠,其生理特点可能与小儿“脾常不足”类似,故大剂量用药易损伤脾胃而影响药物吸收,反而出现药效下降。实验结果表明:加味茵陈蒿汤能明显降低气道炎症,其疗效与药物剂量有关,以低剂量为宜,其作用机制可能与加味茵陈蒿汤能够抑制 IL-6/STAT3 信号通路表达从而调节 Th1/Th2 细胞因子失衡有关。

#### [参考文献]

- [1] 杨华,黄桂红. Th1/Th2 细胞因子失衡在哮喘发病机制中的作用[J]. 临床肺科杂志, 2013, 18(12): 2271-2272.
- [2] 甲宗琳. 清热利湿化痰法治疗小儿湿热哮喘临床观察[D]. 济南: 山东中医药大学, 2013: 19-20.
- [3] 彭成. 中医药动物实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 302.
- [4] 董银卯,林楠,孟宏,等. 祛湿清热方对湿热模型的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 291-293.
- [5] 曹珊珊,孙秩秋. 支气管哮喘动物模型制备的研究[J]. 中国中医急症, 2012, 21(10): 1574-1575.
- [6] 张志明,刘叶,金冬梅. 温病湿热证与免疫功能关系的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(1): 99-101.
- [7] 王妍,彭经纬,王敏. STAT3 与支气管哮喘[J]. 临床肺科杂志, 2012, 17(12): 2263-2264.
- [8] Kim Y S, Choi E J, Lee W H, et al. Extracellular vesicles, especially derived from Gram-negative bacteria, in indoor dust induce neutrophilic pulmonary inflammation associated with both Th1 and Th17 cell responses [J]. Clin Exp Allergy, 2013, 43(4): 443-454.
- [9] Marina C, Simeone-Penney M C, Severgninim, et al. Airway epithelial STAT3 is required for allergic inflammation in a murine model of asthma[J]. Immunol, 2007, 178(1): 6191-6199.
- [10] Finotto S, Eigenbrod T, Karwo R, et al. Local blockade of IL-6R signaling induces lung CD4<sup>+</sup>T cell apoptosis in a routine model of asthma via regulatory T cells[J]. Int Immunol, 2007, 19(6): 685-693.
- [11] 吴翰桂,丁鸣. IL-4, IL-12, IL-6/STAT/SOCS 途径对 Th 细胞分化调节机制的研究进展[J]. 国外医学: 免疫学分册, 2003, 26(1): 44-46.

[责任编辑 聂淑琴]