

# 厚朴麻黄汤对哮喘小鼠气道炎症及 TRPA1, TRPV1 mRNA 与蛋白表达的影响

胡方媛, 范玉浩, 范欣生\*, 岳勤霏, 刘娟  
(南京中医药大学基础医学院, 南京 210023)

**[摘要]** **目的:** 探讨厚朴麻黄汤对哮喘小鼠气道炎症的效应及对瞬时受体电位通道蛋白 A1 (TRPA1), TRPV1 mRNA 与蛋白表达的影响。**方法:** 将 60 只雌性 Balb/c 小鼠随机分为 6 组, 分别为空白组、模型组、厚朴麻黄汤低、中、高 (7, 14, 28 g·kg<sup>-1</sup>) 剂量组和地塞米松组 (0.002 4 g·kg<sup>-1</sup>), 每组 10 只。复制卵蛋白 (OVA) 致敏及激发小鼠哮喘模型。检测各组小鼠气道反应性, 以不同浓度氯化乙酰胆碱 (ACh) 雾化吸入激发后增强呼息间 (Penh) 值表示, 观察各组小鼠肺组织病理学改变, 外周血嗜酸性粒细胞数 (EOS), 支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中 EOS 百分比的变化。酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测白细胞介素 (IL)-4, IL-13, 前列腺素 D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), P 物质 (SP), 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 及蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测肺组织 TRPA1, TRPV1 mRNA 与蛋白表达。**结果:** 与正常组比较, 给予质量浓度为 12.5, 25, 50 g·L<sup>-1</sup> ACh 雾化吸入后, 模型组小鼠 Penh 明显上升 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 肺病理显示支气管及管壁周围有大量炎症细胞浸润, 支气管黏膜水肿、增厚, 黏液分泌增多; 外周血中 EOS 数量及 BALF 中 EOS 百分比明显升高 ( $P < 0.01$ )。BALF 中 IL-4, IL-13, PGD<sub>2</sub> 和 SP 水平以及肺组织中 TRPA1, TRPV1 mRNA 和蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与模型组比较, 各给药组 Penh 明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 肺组织病理损伤改善, 外周血中 EOS 数量及 BALF 中 EOS 百分比显著降低 ( $P < 0.01$ ); BALF 中 IL-4, IL-13, PGD<sub>2</sub> 和 SP 水平以及肺组织中 TRPA1, TRPV1 mRNA 与蛋白表达明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论:** 厚朴麻黄汤可以改善哮喘小鼠气道炎症、降低气道反应性, 其机制除降低 Th2 相关的细胞因子水平外, 可能也与调控 TRPA1, TRPV1 mRNA 与蛋白表达及降低相关神经因子水平有关。

**[关键词]** 厚朴麻黄汤; 哮喘; 气道炎症; 瞬时受体电位通道 A1; 瞬时受体电位通道 V1

**[中图分类号]** R2-0; R285; R289; R346 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)01-0037-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200139

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190918.1015.005.html>

**[网络出版时间]** 2019-09-18 13:16

## Effect of Houpu Mahuangtang on Airway Inflammation and Expression of TRPA1, TRPV1 mRNA and Protein in Asthmatic Mice

HU Fang-yuan, FAN Yu-hao, FAN Xin-sheng\*, YUE Qin-fei, LIU Juan

(College of Basic Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Houpu Mahuangtang on airway inflammation and expressions of gene and proteins of Transient receptor potential ankyrin 1, vanilloid 1 (TRPA1, TRPV1) in asthmatic mice. **Method:** Sixty female Balb/c mice were randomly divided into six groups: control group, model group, low, medium and high-dose Houpu Mahuangtang groups (7, 14, 28 g·kg<sup>-1</sup>) and dexamethasone group (0.002 4 g·kg<sup>-1</sup>), with 10 mice in each group. A mouse model of asthma was replicated by sensitizing and challenging with ovalbumin. The changes of enhanced pause (Penh) following acetylcholine chloride (ACh) inhalation were detected. The pathological changes of the lung tissues were observed. The number of eosinophils

**[收稿日期]** 20190416(018)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81673864, 81973731)

**[第一作者]** 胡方媛, 在读硕士, 从事经典方剂配伍研究, E-mail: hfyzy@126.com

**[通信作者]** \* 范欣生, 研究员, 博士生导师, 从事方剂组方理论与配伍研究, E-mail: fanxsh126@126.com

(EOS) in peripheral blood and the percentage of EOS in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected. Interleukin (IL) -4, IL-13, prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) and substance P (SP) were detected by enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA). The expressions of TRPA1 and TRPV1 gene and protein in lung tissues were detected by Quantitative Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot. **Result:** Compared with control group, mice of model group showed significantly increased in Penh following ACh inhalation ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), EOS in blood and the percentage of EOS in BALF ( $P < 0.01$ ). Histopathological changes in lungs showed inflammatory cell infiltration and bronchial mucosa damage. The levels of IL-4, IL-13, PGD<sub>2</sub> and SP in BALF and the expressions of TRPA1, TRPV1 mRNA and protein in lung tissues significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with model group, treatment groups had significant effects in decreasing Penh, relieving lung injury, reducing EOS count in blood and the percentage of EOS in BALF ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), reducing IL-4, IL-13, PGD<sub>2</sub> and SP levels in BALF ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), as well as down-regulating TRPA1 and TRPV1 mRNA and protein expressions in lung tissues ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Houpu Mahuangtang could reduce airway inflammation, airway responsiveness. In addition to the reduction of levels of Th2 related cytokines, the mechanism of Houpu Mahuangtang might be related to the regulation of TRPA1, TRPV1 mRNA and protein expressions, and the decrease of associated neurofactor levels.

[**Key words**] Houpu Mahuangtang; asthma; airway inflammation; transient receptor potential (TRP) ankyrin 1; TRP vanilloid 1 (TRPV1)

支气管哮喘是由多种细胞及细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病,主要特征包括气道对多种刺激因素呈现的高反应性,广泛多变的可逆性气流受限以及随病情延长而导致的一系列气道结构改变<sup>[1]</sup>,临床表现为反复发作的喘息、气急、胸闷或咳嗽等症状,常在夜间及凌晨发作或加重。目前全球至少有 3 亿哮喘患者,其患病率呈逐年上升的趋势<sup>[2]</sup>。临床常用糖皮质激素及  $\beta_2$  受体激动剂等药物治疗<sup>[3]</sup>。厚朴麻黄汤出自《金匮要略》<sup>[4]</sup>,由厚朴、麻黄、苦杏仁、石膏、法半夏、干姜、细辛、五味子、小麦组成,具有宣肺化饮、清热降逆、止咳平喘的功效。临床报道该方对哮喘具有明确疗效<sup>[5]</sup>,但目前对其效应机制研究不够深入。近年来发现瞬时受体电位通道蛋白 A1 (TRPA1), TRPV1 与哮喘病理过程有关<sup>[6-8]</sup>。本课题组前期研究发现卵蛋白(OVA)复合 PM2.5 诱导加重哮喘的小鼠肺组织中 TRPA1 和 TRPV1 表达均增加<sup>[9]</sup>。本研究观察厚朴麻黄汤干预 OVA 诱导小鼠哮喘模型的生物效应,对支气管肺泡灌洗液(BALF)中 Th2 相关细胞因子、神经因子水平以及肺组织中 TRPA1, TRPV1 mRNA 和蛋白表达的影响,探讨厚朴麻黄汤干预哮喘的效应及作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 60 只雌性 SPF 级 Balb/c 小鼠,7~8 周龄,体质量 18~22 g。购自南京市江宁区青龙山动物繁殖场,合格证号 SCXK(苏)2017-0001,实验前动物适应环境 3 d。本研究经南京中医药大学实验

动物伦理委员会批准,实验符合伦理委员会相关动物研究指导原则。

**1.2 药物及试剂** 厚朴、麻黄、苦杏仁、石膏、法半夏、干姜、细辛、五味子、小麦,购于南京中医药大学国医堂,以上药材经南京中医药大学药学院李伟东教授鉴定;OVA(上海伯奥生物科技有限公司,批号 171209),氯化乙酰胆碱(ACh,国药集团化学试剂有限公司,批号 20170412),地塞米松(南京先声药业有限公司,批号 015171207),嗜酸细胞(EOS)计数液,瑞吉氏染液(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20180709,20180315),甲醛溶液(西陇化工股份有限公司,批号 1704072),水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,批号 20150812);白细胞介素(IL)-4,IL-13,前列腺素 D<sub>2</sub>(PGD<sub>2</sub>),P 物质(SP)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海韵涵生物科技有限公司,批号分别为 CK-E20011M,CK-E11384M,CK-E92939M,CK-E20437M),trizol(美国 Invitrogen 公司,批号 15596-026),cDNA 第一链合成试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司,批号 K1622);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real time PCR) Master Mix (SYBR Green)(瑞士 Roche 公司,批号 04913850001);全蛋白抽提试剂盒,SDS-PAGE 凝胶电泳试剂盒,ECL 检测试剂盒(江苏凯基生物科技发展有限公司,批号分别为 KGP250,KGP113,KGP1123);TRPA1,TRPV1 抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 AB58844,AB5370);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)

抗体(美国 Proteintech 公司,批号 60004-1-Ig)。

**1.3 仪器** 402AI 型超声雾化器(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司);WBP-MS 型清醒无束缚小鼠给药和呼吸生理检测系统(法国 EMKA 公司);CX21 型 Olympus 显微镜(日本 Olympus 公司);Prism<sup>®</sup> 7500 型荧光实时定量 PCR 仪(美国 Invitrogen 公司);SpectraMax 190 型酶标仪(美国伯腾仪器公司);5024R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);164-5051 型 PowerPac<sup>™</sup> 基础电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 药物制备** 参考《金匱要略》<sup>[4]</sup>原方及《方剂学》<sup>[10]</sup>古今剂量换算并结合临床常用量,厚朴 15 g,麻黄 12 g,杏仁 9 g,石膏 30 g,法半夏 9 g,干姜 6 g,细辛 6 g,五味子 6 g,小麦 30 g,浸泡后回流提取 2 次,第 1 次加 10 倍量蒸馏水,第 2 次加 8 倍量蒸馏水,每次 1.5 h,药液过 8 层纱布,合并 2 次滤液,加压浓缩至 2.8 g·mL<sup>-1</sup>,药液常温冷却后,至 4 ℃ 冰箱内保存备用。小鼠给药量按照体表面积换算<sup>[11]</sup>,厚朴麻黄汤中剂量为临床等效量(14 g·kg<sup>-1</sup>),低剂量为临床等效量 0.5 倍(7 g·kg<sup>-1</sup>),高剂量为临床等效量 2 倍(28 g·kg<sup>-1</sup>)。

**2.2 动物分组及模型复制** 60 只 Balb/c 小鼠随机分为 6 组,分别为空白组、模型组、厚朴麻黄汤低、中、高剂量组和地塞米松组,每组 10 只。参考文献复制 OVA 致敏激发哮喘小鼠模型<sup>[12-13]</sup>,除空白组外,其余 5 组小鼠分别于第 1,8 天皮下、腹腔各注射致敏液 0.1 mL(0.2 mL 致敏液含 OVA 0.1 mg,氢氧化铝 0.02 mg)致敏;第 15~21 天每天雾化吸入 OVA 激发,第 22~28 天隔天激发。第 19~28 天分别予厚朴麻黄汤低、中、高(7,14,28 g·kg<sup>-1</sup>)剂量灌胃;地塞米松组予以 2.4 mg·kg<sup>-1</sup> 的地塞米松溶液灌胃,连续给药 10 d。

**2.3 检测增强呼吸间歇(Penh)** 末次激发后 24 h 进行小鼠无创肺功能测试,将小鼠置于特定描记箱中,待小鼠安静后,先记录小鼠在 PBS 激发下增强的 Penh 值(作为基线值),然后按 6.25,12.5,25,50 g·L<sup>-1</sup> 梯度浓度雾化 ACh 50 μL,每个剂量连续记录 5 min Penh 值。测定 Penh 后,以 0.01 mL·g<sup>-1</sup> 腹腔注射 4% 水合氯醛麻醉处死,取血、肺泡灌洗液及肺组织等。

**2.4 HE 染色观察小鼠肺组织病理形态学变化** 取小鼠左肺组织,10% 甲醛固定,石蜡包埋切片,常规制备病理切片,HE 染色后 200 倍光学显微镜下观

察肺组织的病理变化。

**2.5 外周血和 BALF 中 EOS 水平变化** 取血液 20 μL 混匀于嗜酸细胞计数液 0.38 mL 中,在光学显微镜下进行 EOS 计数。将小鼠固定,打开胸腔行气管插管,对左侧主支气管进行结扎,以磷酸盐缓冲液(PBS)1.5 mL 分 3 次灌洗,每次 0.5 mL,回收率均为 80% 以上。收集到的 BALF 4 ℃,3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,吸出上清液,取沉淀涂片固定,瑞吉氏染液染色,显微镜下读取 200 个白细胞,统计 EOS 百分比。

**2.6 ELISA 检测 BALF 中细胞因子和神经因子水平** 将 2.4 项收集到的 BALF 上清液,采用 ELISA 检测 BALF 中 IL-4,IL-13,PGD<sub>2</sub>,SP 水平,按试剂盒说明书进行操作。

**2.7 Real-time PCR 检测肺组织 TRPA1,TRPV1 mRNA 的表达** 取厚朴麻黄汤优效剂量组右肺组织,用 trizol 试剂提取总 RNA,电泳检测其完整性。按照 Thermo Fisher 公司 cDNA 第一链合成试剂盒说明书进行逆转录合成 cDNA。利用实时荧光定量 PCR 仪测定 TRPA1,TRPV1 mRNA 转录水平表达。PCR 反应参数:变性为 94 ℃ 30 s,退火为 58 ℃ 30 s,延伸为 72 ℃ 30 s 各 1 次,进行 40 个循环,收集荧光信号,反应结束,进行数据分析,用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法计算 TRPA1,TRPV1 mRNA 表达水平。以 GAPDH 为内参,引物序列见表 1。TRPA1,TRPV1,GAPDH 的 PCR 引物均由江苏凯基生物科技发展有限公司设计合成。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
TRPA1	上游 TTGGATATTGCCAAAGAAGTGATCC	125
	下游 GAGGAACAAGGGCAACACGA	
TRPV1	上游 TCACCGTCAGCTCTGTGTCTC	117
	下游 GATCATAGACCTTGGGGGC	
GAPDH	上游 TATGTCGTGGAGTCTACTGCT	149
	下游 GAGTTGTCATATTTCTCTGCTG	

**2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺组织 TRPA1,TRPV1 蛋白表达** 取空白组、模型组及厚朴麻黄汤中剂量组小鼠右肺组织,按蛋白提取试剂盒要求提取总蛋白,用 BCA 法测定,并将各组蛋白调至等浓度后,进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,将凝胶上蛋白用半干法转移至 PVDF 膜上后,加入含

5% 脱脂奶粉的封闭液, 摇床振荡反应 1.5 ~ 2 h。封闭结束用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。加入稀释的一抗 TRPA1 (1 : 1 000), TRPV1 (1 : 1 000), GAPDH (1 : 5 000), 4 °C 摇床振荡孵育过夜。室温振荡 30 min, 吸弃一抗, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。加入稀释的二抗 (1 : 5 000), 室温摇床振荡反应 1 ~ 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 8 min。化学发光法进行曝光显色, 成像后使用 Gel-Pro 32 软件对结果进行灰度分析。

**2.9 统计学分析** 使用 GraphPad Prism 6 进行实验数据分析, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用 One-way ANOVA 分析, 组间两两比较采用 *t* 检

验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对各组小鼠 Penh 的影响** 与空白组比较, 模型组小鼠在 ACh 质量浓度为 12.5, 25, 50  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, Penh 明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。与模型组比较, ACh 质量浓度为 12.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 厚朴麻黄汤中剂量组和地塞米松组 Penh 明显降低 ( $P < 0.05$ ); ACh 质量浓度为 25  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 厚朴麻黄汤低、中、高剂量组及地塞米松组 Penh 明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); ACh 质量浓度 50  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 厚朴麻黄汤低、中、高剂量组及地塞米松组小鼠 Penh 显著降低 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 厚朴麻黄汤对不同浓度 ACh 干预后各组小鼠 Penh 变化的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

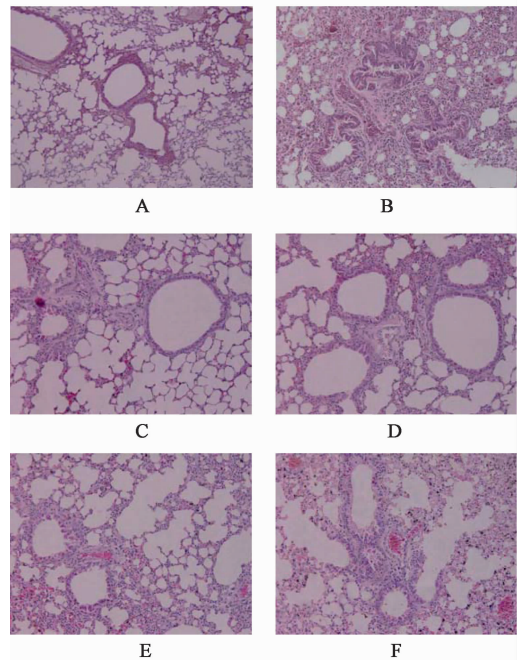
组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	基线值	ACh 不同浓度激发后 Penh 增加值			
			6.25 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	12.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	25 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	0.32 ± 0.04	0.34 ± 0.03	0.43 ± 0.07	0.48 ± 0.09	0.52 ± 0.22
模型	-	0.36 ± 0.56	0.49 ± 0.18	0.95 ± 0.66 <sup>1)</sup>	1.34 ± 0.54 <sup>1)</sup>	1.96 ± 0.65 <sup>2)</sup>
地塞米松	0.0024	0.45 ± 0.17	0.42 ± 0.14	0.45 ± 0.15 <sup>3)</sup>	0.59 ± 0.24 <sup>3)</sup>	0.74 ± 0.24 <sup>4)</sup>
厚朴麻黄汤	7	0.38 ± 0.04	0.48 ± 0.10	0.59 ± 0.16	0.78 ± 0.23 <sup>3)</sup>	1.06 ± 0.37 <sup>4)</sup>
	14	0.34 ± 0.01	0.39 ± 0.05	0.51 ± 0.14 <sup>3)</sup>	0.65 ± 0.18 <sup>4)</sup>	0.90 ± 0.29 <sup>4)</sup>
	28	0.36 ± 0.07	0.46 ± 0.10	0.61 ± 0.17	0.85 ± 0.33 <sup>3)</sup>	1.09 ± 0.29 <sup>4)</sup>

注: 与空白组比较<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>  $P < 0.01$ 。

**3.2 对各组小鼠肺组织病理学的影响** 与空白组比较, 模型组小鼠支气管及管壁周围有大量炎症细胞浸润, 支气管黏膜水肿、增厚, 管腔狭窄, 黏液分泌增多; 与模型组比较, 用药组肺组织病理出现不同程度减轻, 其中厚朴麻黄汤中剂量组减轻最明显。见图 1。

**3.3 对各组小鼠外周血及 BALF 中 EOS 水平的影响** 与空白组比较, 模型组外周血 EOS 数及 BALF 中 EOS 百分比显著增高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 厚朴麻黄汤低、中、高剂量组和地塞米松组外周血 EOS 数及 BALF 中 EOS 百分比显著降低 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

**3.4 对各组小鼠 BALF 中细胞因子水平的影响** 与空白组比较, 模型组 IL-4, IL-13, PGD<sub>2</sub>, SP 水平明显升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 厚朴麻黄汤中剂量组、地塞米松组 IL-4 水平明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 厚朴麻黄汤中、高剂量组、地塞米松组 IL-13 水平明显降低 ( $P < 0.05$ ); 厚朴麻黄汤低、中、高剂量组、地塞米松组 PGD<sub>2</sub> 水平明显降低 ( $P < 0.01$ ); 厚朴麻黄汤中、高剂量组、地塞米松组 SP 水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。见表 4。



A. 空白组; B. 模型组; C. 地塞米松组; D. 厚朴麻黄汤低剂量组; E. 厚朴麻黄汤中剂量组; F. 厚朴麻黄汤高剂量组

图 1 厚朴麻黄汤对各组小鼠肺组织病理学的影响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Houpu Mahuangtang on histopathology of lung tissue in different groups of mice (HE, ×200)

表 3 厚朴麻黄汤对各组小鼠外周血及 BALF 中 EOS 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of Houpu Mahuangtang on EOS level in peripheral blood and BALF in different groups of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	血液中 EOS 数 (×10 <sup>6</sup> )/个/L	BALF 中 EOS 百分比/%
空白	-	65 ± 52.97	2.63 ± 1.60
模型	-	383 ± 68.31 <sup>1)</sup>	7.08 ± 1.74 <sup>1)</sup>
地塞米松	0.0024	190 ± 54.77 <sup>2)</sup>	4.17 ± 1.03 <sup>2)</sup>
厚朴麻黄汤	7	222 ± 36.32 <sup>2)</sup>	4.20 ± 1.48 <sup>2)</sup>
	14	150 ± 35.36 <sup>2)</sup>	4.06 ± 1.47 <sup>2)</sup>
	28	188 ± 44.32 <sup>2)</sup>	4.44 ± 1.69 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

表 4 厚朴麻黄汤对各组小鼠 BALF 中细胞因子水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effect of Houpu Mahuangtang on cytokine levels in BALF in different groups of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

ng·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-4	IL-13	PGD <sub>2</sub>	SP
空白	-	228 ± 49.71	32 ± 3.43	273 ± 15.45	289 ± 10.91
模型	-	328 ± 20.84 <sup>1)</sup>	38 ± 1.70 <sup>1)</sup>	314 ± 17.87 <sup>1)</sup>	315 ± 20.27 <sup>1)</sup>
地塞米松	0.0024	271 ± 39.75 <sup>3)</sup>	35 ± 3.11 <sup>2)</sup>	271 ± 17.98 <sup>3)</sup>	275 ± 8.56 <sup>3)</sup>
厚朴麻黄汤	7	309 ± 20.76	37 ± 4.24	283 ± 13.43 <sup>3)</sup>	301 ± 10.16
	14	285 ± 35.26 <sup>2)</sup>	31 ± 3.09 <sup>2)</sup>	279 ± 7.04 <sup>3)</sup>	267 ± 5.10 <sup>3)</sup>
	28	310 ± 10.98	33 ± 4.07 <sup>2)</sup>	278 ± 12.70 <sup>3)</sup>	257 ± 10.19 <sup>3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ (表 5,6 同)。

表 5 厚朴麻黄汤对各组小鼠肺组织 TRPA1, TRPV1 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of Houpu Mahuangtang on expression of TRPA1, TRPV1 mRNA in lung tissue of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TRPA1	TRPV1
空白	-	0.99 ± 0.01	1.07 ± 0.1
模型	-	2.43 ± 0.01 <sup>1)</sup>	2.21 ± 0.02 <sup>1)</sup>
厚朴麻黄汤	14	1.54 ± 0.01 <sup>3)</sup>	1.45 ± 0.02 <sup>2)</sup>

3.5 对各组小鼠肺组织 TRPA1, TRPV1 mRNA 表达的影响 与空白组比较,模型组 TRPA1, TRPV1 mRNA 表达显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,厚朴麻黄汤组 TRPA1, TRPV1 mRNA 表达明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 5。

3.6 对各组小鼠肺组织 TRPA1, TRPV1 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组 TRPA1, TRPV1 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.01$ );厚朴麻黄汤组 TRPA1, TRPV1 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 2,表 6。

#### 4 讨论

《金匱要略·肺痿肺癰咳嗽上气病脉证并治》篇中记载:“咳而脉浮者,厚朴麻黄汤主之。”方中

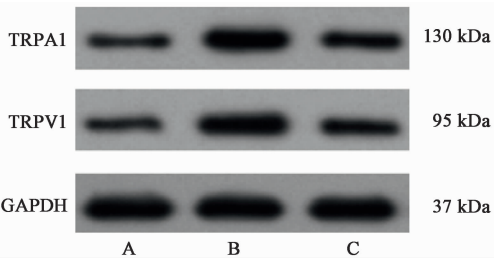
表 6 厚朴麻黄汤对各组小鼠肺组织 TRPA1, TRPV1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 6 Effect of Houpu Mahuangtang on expression of TRPA1, TRPV1 protein in lung tissue of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TAPA1/GAPDH	TAPV1/GAPDH
空白	-	0.21 ± 0.02	0.23 ± 0.01
模型	-	0.63 ± 0.02 <sup>1)</sup>	0.55 ± 0.06 <sup>1)</sup>
厚朴麻黄汤	14	0.38 ± 0.02 <sup>3)</sup>	0.39 ± 0.06 <sup>2)</sup>

益气。诸药相合,共奏宣肺涤饮,降气平喘之功,主要用于寒饮蕴肺、郁而化热,上迫于肺、肺失宣降之证。

哮喘发病机制十分复杂,一般认为 Th2 细胞应答增强为主的 Th1/Th2 失衡是哮喘发病的重要原因<sup>[14]</sup>。Th2 细胞主要分泌 IL-4, IL-13 等细胞因子<sup>[15]</sup>。IL-4 可以促进 IgE 合成,IL-13 促进 EOS,单核细胞的活化及募集,共同参与哮喘炎症反应<sup>[16]</sup>。TRPA1 和 TRPV1 属于瞬时受体电位离子通道超家族<sup>[17]</sup>。TRPA1 通道可被低温、有毒化学物质(如异硫氰酸烯丙酯)等激活,TRPV1 通道可被热、疼痛、外来刺激物(如辣椒素)等激活,导致钙内流以及



A. 空白组;B. 模型组;C. 厚朴麻黄汤组

图 2 小鼠肺组织 TRPA1, TRPV1 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of expression of TRPA1, TRPV1 protein in lung tissue of mice

厚朴、麻黄、苦杏仁宣肺利气降逆;细辛、干姜、五味子、法半夏祛痰化饮止咳;石膏清热除烦;小麦养心

速激肽、降钙素基因相关肽的释放<sup>[18]</sup>,感觉神经肽作用于呼吸道的一些效应细胞(如平滑肌、胆碱能神经节、黏液腺等),引起细胞旁的轴突反射、支气管收缩、蛋白渗出和炎性细胞趋化<sup>[19]</sup>。如 SP 水平升高可引起动物气道平滑肌收缩,导致微血管渗漏或出现炎性浸润反应<sup>[20]</sup>。PGD<sub>2</sub> 可促使 EOS 募集,引起气道黏液分泌、支气管收缩和气体交换障碍,是哮喘气道炎症和气道高反应性的主要致病因子之一<sup>[21]</sup>。目前有报道 TRPA1, TRPV1 在咳嗽反射<sup>[22]</sup>和哮喘<sup>[23]</sup>气道炎症中发挥作用,TRPA1 基因敲除小鼠哮喘模型中炎症因子减少和气道高反应性减轻<sup>[24]</sup>。课题组前期研究也证实了 TRPA1, TRPV1 通道在哮喘发病过程中发挥了重要的作用<sup>[9,13]</sup>。

本次实验结果证实厚朴麻黄汤可以降低哮喘模型小鼠气道反应性、减轻肺组织的病理损伤、减少炎症细胞浸润,降低 BALF 中 Th2 相关的 IL-4, IL-13 细胞因子水平,同时调控肺组织中 TRPA1, TRPV1 mRNA 和蛋白表达,以及神经因子 PGD<sub>2</sub>, SP 水平,以临床等效量中剂量组改善最为显著。提示厚朴麻黄汤干预哮喘的效应机制除降低 Th2 相关的细胞因子水平外,还涉及了调控 TRPA1, TRPV1 mRNA 和蛋白表达及降低相关神经因子水平,显示出该方复杂的功效机制特点,值得进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 华雯,黄华琼,沈华浩.《支气管哮喘防治指南(2016年版)》解读[J]. 浙江大学学报:医学版,2016,45(5):447-452.

[2] Resiliac J, Grayson M H. Epidemiology of infections and development of asthma[J]. Immunol Allergy Clin North Am, 2019, 39(3): 297-307.

[3] Hetherington K J, Heaney L G. Drug therapies in severe asthma—the era of stratified medicine[J]. Clin Med, 2015, 15(5): 452-456.

[4] 汉·张仲景. 金匱要略[M]. 北京: 中医古籍出版社, 1997: 19.

[5] 张川林, 李希, 严桂珍. 厚朴麻黄汤治疗支气管哮喘急性发作 64 例[J]. 福建中医药, 2016, 47(1): 65-66.

[6] Baker K, Raemdonck K, Dekkak B, et al. Role of the ion channel, transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1), in allergic asthma[J]. Respir Res, 2016, 17(1): 67.

[7] Gallo V, Dijk F N, Holloway J W, et al. TRPA1 gene polymorphisms and childhood asthma [J]. Pediatr Allergy Immunol, 2017, 28(2): 191-198.

[8] YANG H, LI S. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel and neurogenic inflammation in pathogenesis of asthma[J]. Med Sci Monit, 2016, 19(22): 2917-2923.

[9] LIU H, FAN X S, WANG N. Exacerbating effects of PM2.5 in OVA-sensitized and challenged mice and the expression of TRPA1 and TRPV1 proteins in lungs[J]. J Asthma, 2017, 54(8): 807-817.

[10] 许济群. 方剂学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 14, 15.

[11] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.

[12] 汪珊珊, 范欣生, 徐立, 等. 基于正交试验的三拗汤配伍关系研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20): 184-188.

[13] 刘洪, 范欣生, 朱悦. 五拗汤对 PM2.5 诱导加重哮喘小鼠模型的效应及 TRPA1 和 TRPV1 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(8): 997-1003.

[14] 黄桂红, 韦江红, 陈薇, 等. 黄皮叶提取物对哮喘大鼠血清及肺组织 Th1/Th2 平衡的调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(19): 97-100.

[15] Koichi H, Arifumi I, Tomohiro T, et al. Allergic airway inflammation: key players beyond the Th2 cell pathway [J]. Immunol Rev, 2017, 278(1): 145-161.

[16] Gour N, Wills-Karp M. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease[J]. Cytokine, 2015, 75: 68-78.

[17] Smani T, Shapovalov G, Skryma R, et al. Functional and physiopathological implications of TRP channels [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1853(8): 1772-1782.

[18] Gouin O, L'Herondelle K, Lebonvallet N, et al. TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization[J]. Protein Cell, 2017, 8(9): 644-661.

[19] Russo A F. Overview of neuropeptides: awakening the senses? [J]. Headache, 2017, 57(2): 37-46.

[20] 董榕, 刘悦, 薛德彬, 等. P 物质对哮喘大鼠神经内分泌功能的调节[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(1): 95-99.

[21] 袁丽粉, 乔建瓯, 孙淑宁, 等. 前列腺素 D<sub>2</sub> 在哮喘小鼠模型中表达水平的研究[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(9): 1606-1609.

[22] Grobman M E, Krumme S, Dodam J R, et al. The TRPV1 receptor agonist capsaicin is an ineffective bronchoprovocant in an experimental model of feline asthma[J]. J Feline Med Surg, 2015, 17(10): 915-918.

[23] WANG P, LIU H, FAN X, et al. Effect of San'ao decoction on aggravated asthma mice model induced by PM2.5 and TRPA1/TRPV1 expressions [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 236: 82-90.

[24] Caceres A I, Brackmann M, Elia M D, et al. A sensory neuronal ion channel essential for airway inflammation and hyperreactivity in asthma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(22): 9099-9104.

[责任编辑 孙丛丛]