

固本防哮饮对小鼠哮喘缓解期 TLR4 及 TLR7 的调节作用

卓月, 袁雪晶*, 纪建建

(南京中医药大学附属医院, 南京 210029)

[摘要] **目的:**观察固本防哮饮对哮喘缓解期小鼠模型 Toll-样受体 (TLR) 4, TLR7, 核转录因子- κ B p65 (NF- κ B p65), NF- κ B抑制蛋白 α (I κ B α) 的调节作用, 探讨固本防哮饮治疗哮喘缓解期的机制。**方法:**呼吸道合胞病毒 (RSV) 联合鸡卵蛋白 (OVA) 对 3 周龄 BALB/c 小鼠制备哮喘缓解期模型, 将 60 只小鼠分为空白组、模型组、地塞米松组 (0.001 g·kg⁻¹) 以及固本防哮饮低、中、高剂量 (6.5, 13, 26 g·kg⁻¹) 组, 分别进行干预, 共给药 28 d, 每天 1 次。给药结束后处死小鼠, 苏木素-伊红 (HE) 染色观察哮喘小鼠肺组织病理形态学变化, 并对肺部炎症情况进行评分; 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测小鼠肺组织 TLR4, TLR7, I κ B α 及肺组织细胞核内 NF- κ B p65 蛋白表达水平; 免疫荧光共聚焦观察 NF- κ B p65 在细胞核表达情况。**结果:**与空白组比较, 模型组小鼠肺组织有明显炎症细胞浸润及支气管狭窄 ($P < 0.01$), 同时小鼠肺组织细胞核内 NF- κ B p65 分布显著增多 ($P < 0.01$), 表达明显增高 ($P < 0.05$), TLR4, TLR7, I κ B α 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 固本防哮饮各剂量组能显著缓解小鼠肺组织炎症浸润 ($P < 0.01$), 降低肺组织核蛋白 NF- κ B p65 的表达 ($P < 0.01$), 核蛋白 NF- κ B p65 入核情况减轻 ($P < 0.01$), 同时显著增加 TLR4, TLR7, I κ B α 蛋白的表达 ($P < 0.01$)。**结论:**固本防哮饮能够缓解气道炎症, 并且可能是通过调节 TLR4, TLR7, NF- κ B p65, I κ B α 实现其治疗作用。

[关键词] 固本防哮饮; 玉屏风散; 哮喘缓解期; Toll-样受体 (TLR) 4; TLR7

[中图分类号] R289; R256.12; R563; R364.5; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)10-0057-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190940

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190117.1349.015.html>

[网络出版时间] 2019-01-18 14:05

Regulatory Effect of Guben Fangxiao Decoction on Expression of TLR4 and TLR7 in Mice with Asthma Remission

ZHUO Yue, YUAN Xue-jing*, JI Jian-jian

(Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the regulatory effect of Guben Fangxiao decoction on Toll-like receptor (TLR) 4, TLR7, nuclear factor-kappa B p65 (NF- κ B p65) and NF- κ B inhibitor protein alpha (I κ B α) in mice with asthma remission, in order to explore the mechanism of Guben Fangxiao decoction in treating asthma remission. **Method:** Respiratory syncytial virus (RSV) combined with chicken ovalbumin (OVA) was used to build asthma remission model in 3-week-old BALB/c mice. Sixty mice were divided into blank group, model group, dexamethasone group (0.001 g·kg⁻¹), low, medium and high-dose Guben Fangxiao decoction group (6.5, 13, 26 g·kg⁻¹), respectively. Intervention was given once a day for 28 days. After administration, the mice were put to death. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of lung tissue and score the pulmonary inflammation. Western blot was used to detect the expressions of TLR4, TLR7, I κ B α and nuclear NF- κ B p65 in lung tissue of mice. Immunofluorescence was used to observe the expression of NF- κ B p65 in cellnucleuses. **Result:** Compared with blank group, the lung tissue of model group showed obvious

[收稿日期] 20181108(014)

[基金项目] 江苏省“六大人才高峰”高层次人才 B 类资助项目(2016-WSN-059)

[第一作者] 卓月, 在读硕士, 从事中医儿科学研究, E-mail: 1954409441@qq.com

[通信作者] *袁雪晶, 博士, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 从事儿童哮喘、紫癜、抽动症等研究, E-mail: yuanxuejing2007@126.com

inflammatory cell infiltration ($P < 0.01$) and bronchial stenosis, the nuclear distribution of NF- κ B p65 increased significantly ($P < 0.01$), and the expressions of TLR4, TLR7 and I κ B α proteins increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, Guben Fangxiao decoction could significantly alleviate the inflammatory infiltration of lung tissue in mice ($P < 0.01$), reduce the expression of nuclear protein NF- κ B p65 ($P < 0.01$), relieve the nuclear entry of nuclear protein NF- κ B p65 ($P < 0.01$), and increase the expressions of TLR4, TLR7 and I κ B α proteins ($P < 0.01$). **Conclusion:** Guben Fangxiao decoction can alleviate airway inflammation, and its therapeutic effect may be achieved by regulating TLR4, TLR7, NF- κ B p65 and I κ B α .

[Key words] Guben Fangxiao decoction; Yupingfeng San; asthma remission period; Toll-like receptor (TLR) 4; TLR7

支气管哮喘是多种细胞因子参与的慢性气道炎症疾病,遗传与环境因素被认为是该病的主要病因,近年来研究发现 RSV 病毒与哮喘的发病具有密切关系^[1]。但其具体病因及发病机制仍不明确,因此,哮喘的治疗手段仍有局限,依然是困扰当今的医学难题。固本防哮饮是江苏省中医院江育仁教授治疗儿童哮喘缓解期的经验方,由经典名方玉屏风散化裁而来,具有补肺固表,健脾化痰的功效。该方针对哮喘缓解期肺脾气虚的特点,通过补肺固表、健脾化痰以达到治疗哮喘的目的。通过临床观察发现该方在治疗儿童缓解期哮喘有显著效果,与同时期西药治疗比较效果仍然显著^[2-3]。本课题组早期通过临床疗效观察以及进一步将固本防哮饮与穴位敷贴治疗相结合^[4],发现其在治疗哮喘缓解期的显著功效,同时观察固本防哮饮对哮喘缓解期小鼠的影响时,通过研究 Th1, Th2 的标志性因子 γ -干扰素 (IFN- γ),白细胞介素-4 (IL-4)^[5],发现固本防哮饮对缓解期哮喘的治疗可能是通过调节辅助性 T 细胞 (Th) 1/Th2 平衡实现的。

Toll-样受体 (TLR) 在病毒诱导的天然免疫中发挥重要作用^[6-7],并且与哮喘的发生密切相关^[8],其中 TLR4, TLR7 是天然免疫的重要分子,与哮喘关系密切^[8-9],同时可以共同介导核转录因子- κ B (NF- κ B)/NF- κ B 抑制蛋白 (I κ B) 激酶 (IKK)/I κ B α 信号通路^[10],前期课题组已经发现 NF- κ B 介导的信号通路在哮喘发展中的作用^[11],而固本防哮饮能通过抑制该信号通路发挥其抗炎及调节免疫的作用,本文主要从该通路出发,通过检测小鼠肺组织 TLR4, TLR7, NF- κ B p65, I κ B α 蛋白表达以进一步探究固本防哮饮对哮喘缓解期的治疗作用及其机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 60 只,3 周龄,体质量 13 ~ 18 g,购于南京市江宁区青龙山动物养殖场,动物合格证号 SCXK (苏) 2007-0001,饲养

于南京中医药大学实验动物中心,本实验经过南京中医药大学实验动物伦理委员会批准,编号 201810A021,符合实验动物伦理委员会指导原则。呼吸道合胞病毒 (RSV) A 亚型 (Long 株) 来源于南京中医药大学中医儿科研究所。

1.2 药物 固本防哮饮由炙黄芪 15 g,党参片 10 g,白术 10 g,茯苓 10 g,煅牡蛎 15 g,蝉蜕 10 g,陈皮 6 g,防风 6 g,辛夷 6 g,五味子 6 g 和生甘草 3 g 11 味药组成,经江苏省中医院张芹副主任中药师鉴定为正品。饮片均购自江苏省中医院,并由江苏省中医院药剂科加工制备。取 8 倍量冷水浸药 30 min,煎 30 min (沸后),滤过;第 2 煎加 6 倍量水煎 30 min,将 2 次煎液过滤合并浓缩,调至含生药 2 kg·L⁻¹ 的溶液,密封于无菌量瓶,4 ℃ 储存备用。地塞米松片 (上海上药信谊药厂有限公司,批号 015170403)。

1.3 试剂 卵蛋白 (美国 Sigma 公司,批号 A5503);BCA 蛋白定量试剂盒,RIPA 裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 P0012, P0013B);ECL 发光液 (南京基易生物科技有限公司,批号 E300310);蛋白 Marker (美国 Bio-Rad 公司,批号 161-0394);核蛋白提取试剂盒 (美国 Epigentek 公司,批号 OP-0002);兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 多克隆抗体,兔抗 I κ B α 多克隆抗体 (美国 Immunoway 公司,批号分别为 YM3215, YM3718);兔抗 TLR4 多克隆抗体,兔抗 TLR7 多克隆抗体,兔抗 NF- κ B p65 多克隆抗体 (武汉 Proteintech 公司,批号分别为 19811-1-AP, 17232-1-AP, 10745-1-AP);山羊抗兔多克隆二抗免疫球蛋白 (Ig) G-HRP (南京福麦斯生物公司,批号 FMS-RB01);苏木素-伊红 (HE) 染色液 (武汉塞维尔生物科技有限公司,批号 G1005)。

1.4 仪器 402A 型鱼跃双头超声雾化器 (上海董李贸易有限公司);AF103 型制冰机 (美国 Scotsman

公司);MM400 型混合球磨仪(德国 Retsch 公司);5810R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);Power Pac Basic 型垂直电泳仪,Trans-Blot Turbo 全能型蛋白转印系统,Chemi-Doc 型化学发光成像仪(美国 Bio-Rad 公司);Infinite M200 PRO 型微孔板检测仪(瑞士 TECAN 公司);Histostar 型组织包埋机,Finesse E+ 型半自动石蜡切片机(美国 Thermo Fisher 公司);ASP300S 型全自动真空组织脱水机,ST5010 型全自动染色化,TCSSP5 型激光共聚焦显微镜,LEICA CM 1950 型冷冻切片机(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 造模 参照文献[5]及前期实验方法,稍加改进。小鼠适应性饲养 5 d,用微量移液器吸取病毒液(RSV 病毒活力为 $TCID = 1 \times 10^{-6}$)50 μ L 注入小鼠鼻腔,6 h 后腹腔注射卵蛋白及硫酸钾铝混合液(卵蛋白 100 μ g 和硫酸钾铝 1 mg 混合溶于生理盐水 0.2 mL 中)致敏,分别在第 1 天和第 11 天致敏,同时第 11 天雾化吸入卵蛋白(卵蛋白按 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶于生理盐水中)30 min 激发,连续雾化 7 d,从第 19 天开始,每隔 2 d 为 1 个激发周期,每个激发周期激发 1 次,共进行 6 周,第 60 天为末次激发。空白组小鼠以生理盐水致敏和激发。此造模方案已经过本课题组前期多次实验验证,是比较成熟的方案,此次主要通过小鼠肺组织病理炎症浸润情况判断哮喘造模效果^[11-13],以小鼠支气管管腔明显狭窄,气道上皮不完整,支气管周围炎症细胞浸润明显,表明造模成功。

2.2 动物分组及给药 实验第 45 天将模型小鼠随机分为空白组,模型组,地塞米松组及固本防哮饮低、中、高剂量组,分别进行灌胃给药,每组 10 只,空白组与模型组生理盐水 0.2 mL 灌胃给药,地塞米松按照 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶于生理盐水中^[12],按照 $0.001 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量给药,固本防哮饮水煎剂低、中、高剂量按照 6.5,13,26 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药^[11],按照人和小鼠体质量换算,相当于 5 岁儿童用药剂量,共给药 28 d,每天上午 9:00 给药 1 次。

2.3 HE 染色观察小鼠肺组织病理形态学变化 小鼠麻醉处死后,取出右中肺组织用 4% 多聚甲醛固定,乙醇脱水包埋蜡片及常规 HE 染色,光学显微镜下观察肺支气管形态及周围炎症改变,并对肺部炎症水平进行评分^[13]。具体分级及评分方法,观察每张切片至少 3 个具有代表性的高倍视野,以每个视野中肺组织炎症细胞所占的比例,可得出气道上皮细胞和肺组织的炎症程度,每个视野中肺组织炎症细胞所占比例, < 15% 为正常范围,属 0 级;

16% ~ 30% 为轻度,属 1 级;31% ~ 60% 为中度,属 2 级;> 61% 为重度,属 3 级。0,1,2,3 级分别对应 1,2,3,4 分。

2.4 免疫荧光共聚焦观察 NF- κ B p65 在肺组织细胞核表达 用冷冻切片机将新鲜肺组织制作为冷冻切片,置于室温晾干 15 min,然后浸泡磷酸盐缓冲液(PBS)10 min 去除冰冻切片包埋剂 OCT,1% triton-X 100 室温通透 30 min,用 PBS 清洗后加入 5% 山羊血清进行封闭,封闭结束后孵育 NF- κ B p65 一抗(按照 1:200 稀释一抗于 5% 山羊血清中)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒过夜,第 2 天室温 1 h 孵育荧光二抗(按照 1:200 稀释二抗于 5% 山羊血清中),PBS 清洗后加荧光染料(DAPI)复染核,用含抗荧光淬灭剂封片液封片,共聚焦显微镜下观察。用软件 Image J 对图像进行处理,并计算出 NF- κ B p65 与细胞核重叠部分占两者总分布的比值。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺组织 TLR4,TLR7,NF- κ B p65,I κ B α 蛋白的表达 取一定量组织加 RIPA 裂解液在球磨仪上充分研磨后,冰上裂解 1 h,提取组织蛋白;NF- κ B p65 蛋白采用核蛋白提取试剂盒说明要求提取核蛋白,提取后对蛋白均置于 4 $^{\circ}\text{C}$,14 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,然后进行蛋白变性及 BCA 蛋白定量,定量质量浓度为 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取总量 30 μ g 的蛋白样品在分离胶为 8%,积层胶为 5% 的聚丙烯酰胺凝胶恒压垂直电泳,电压为 80 V,当样品到达分离胶后,调整电压为 110 V。用半干法将胶上的蛋白转移至 PVDF 膜,转膜条件为 20 V 40 min。加 Tris-HCl 缓冲盐溶液(TBST)在摇床上清洗 3 次,每次 10 min,用 5% 脱脂奶粉在摇床上封闭 1 h,再次用 TBST 清洗 3 次后开始在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 TLR4,TLR7,NF- κ B p65,I κ B α ,GAPDH 一抗(1:1 000)过夜,TBST 清洗后室温在摇床上孵育二抗(1:5 000)1 h,孵育结束后再次 TBST 清洗 3 次,加 ECL 发光液曝光机上显影、定影,扫描胶片,采用 Image Lab 软件进行结果分析。

2.6 统计学方法 数据处理采用 SPSS 22.0 统计软件。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较应用单因素方差统计分析,等级资料采用 Ridit 分析,采用 LSD-*t* 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

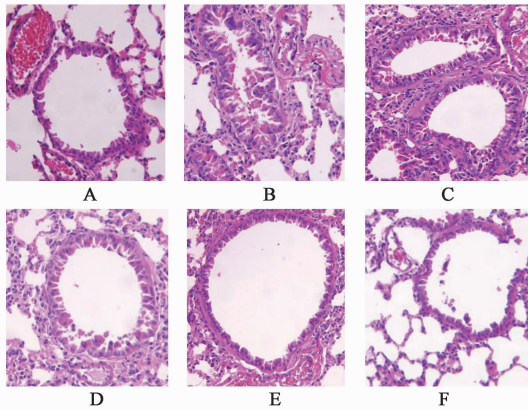
3.1 对小鼠肺组织病理的影响 空白组小鼠肺脏、支气管完整,管壁周围未见明显炎细胞浸润,黏膜未见明显充血水肿,管壁和平滑肌厚度正常,肺间质未见明显炎症浸润;模型组小鼠肺组织可见支气管

管腔明显狭窄,气道上皮不完整,支气管周围炎症细胞浸润明显,气道平滑肌增厚以及肺泡壁充血增厚;地塞米松组肺组织仍有炎症细胞浸润,肺组织结构有一定程度损伤,气道平滑肌仍有增厚,肺间质有一定程度的浸润;固本防哮饮组小鼠肺组织结构完整,支气管壁炎性浸润和平滑肌厚度明显减小,肺间质炎症浸润较少。与空白组比较,模型组小鼠肺组织炎症浸润明显加重($P < 0.05$),气道周围平滑肌增厚;与模型组比较,地塞米松组及固本防哮饮中、高剂量组小鼠肺组织炎症均明显缓解($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 1,表 1。

表 1 固本防哮饮对小鼠肺组织 HE 染色切片炎症程度影响
Table 1 Effect of Guben Fangxiao decoction on degree of inflammation in HE sections of mice lung tissue

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	肺组织炎症细胞浸润程度				
		0 级	1 级	2 级	3 级	R 值
空白	-	2	10	9	0	0.3069
模型	-	0	2	15	16	0.6628 ²⁾
地塞米松	0.001	2	8	9	4	0.4148 ⁴⁾
固本防哮饮	6.5	0	4	15	12	0.6058
	13	1	8	12	8	0.5004 ³⁾
	26	2	10	6	4	0.3793 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。



A. 空白组; B. 模型组; C. 地塞米松组; D. 固本防哮饮低剂量组; E. 固本防哮饮中剂量组; F. 固本防哮饮高剂量组(图 2,3 同)

图 1 固本防哮饮对小鼠肺组织病理学影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Guben Fangxiao decoction on lung histopathology in mice(HE, ×400)

3.2 对小鼠肺组织 NF- κ B p65 在细胞核表达的影响 与空白组比较,模型组 NF- κ B p65 与细胞核共定位部分分布显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,地塞米松组与固本防哮饮给药组 NF- κ B p65 与细胞核共定位部分显著减少($P < 0.01$)。见图 2,表 2。

3.3 对小鼠肺组织 TLR4, TLR7, I κ B α 蛋白及核蛋白 NF- κ B p65 表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠肺组织 TLR4, TLR7, I κ B α 蛋白表达明显降低($P < 0.05, P < 0.01$), NF- κ B p65 蛋白表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,固本防哮饮各剂量组及地塞米松组 TLR4, TLR7, I κ B α 蛋白表达量明显增加($P < 0.05, P < 0.01$), NF- κ B p65 蛋白表达显著降低($P < 0.01$)。见图 3,表 3。

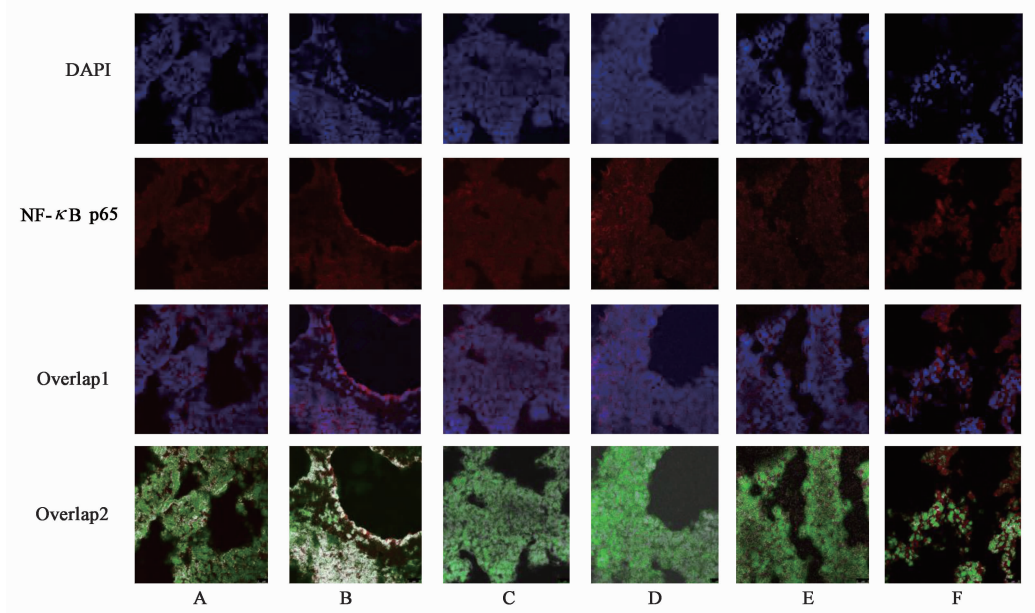


图 2 固本防哮饮对小鼠肺组织 NF- κ B p65 在细胞核表达的影响

Fig. 2 Effect of Guben Fangxiao decoction on nuclear expression of NF- κ B p65 in lungs of mice

表 2 固本防哮饮对小鼠肺组织 NF-κB p65 进入细胞核分布的影响
Table 2 Effect of Guben Fangxiao decoction on distribution of NF-κB p65 into nucleus of lungs in mice

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	NF-κB p65 与细胞核重叠部分占二者总面积的比值/%			R 值 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
		第一组	第二组	第三组	
		空白	-	3.194	
模型	-	7.120	7.283	7.937	7.46 ± 0.36 ²⁾
地塞米松	0.001	4.090	1.592	5.568	4.47 ± 1.41 ⁴⁾
固本防哮饮	6.5	7.066	4.842	6.046	6.12 ± 0.91 ⁴⁾
	13	4.922	2.400	5.455	4.67 ± 1.16 ⁴⁾
	26	1.372	1.521	4.434	3.25 ± 1.57 ⁴⁾

表 3 固本防哮饮对哮喘缓解期小鼠肺组织蛋白 TLR4, TLR7, IκBα 及肺组织核蛋白 NF-κB p65 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Guben Fangxiao decoction on expressions of TLR4, TLR7, IκBα and NF-κB p65 in lung tissue of mice during asthma remission ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IκBα/GAPDH	NF-κB p65/GAPDH	TLR4/GAPDH	TLR7/GAPDH
空白	-	1.17 ± 0.16	1.32 ± 0.14	1.46 ± 0.18	1.31 ± 0.13
模型	-	0.23 ± 0.07 ²⁾	2.16 ± 0.16 ²⁾	0.82 ± 0.59 ²⁾	0.90 ± 0.08 ¹⁾
地塞米松	-	0.46 ± 0.08	1.58 ± 0.30 ⁴⁾	1.15 ± 0.17	0.73 ± 0.09
固本防哮饮	6.5	0.30 ± 0.12	1.59 ± 0.01 ⁴⁾	1.09 ± 0.28	0.90 ± 0.06
	13	0.64 ± 0.12 ³⁾	2.01 ± 0.09	0.70 ± 0.08	1.05 ± 0.21
	26	0.97 ± 0.26 ⁴⁾	1.50 ± 0.01 ⁴⁾	1.58 ± 0.19 ⁴⁾	1.38 ± 0.23 ³⁾

喘的主要特征,其中气道慢性炎症又是哮喘发病的基础^[14]。患者接触过敏原后,通过抗原呈递激活 T 淋巴细胞, T 淋巴细胞通过分泌白介素激活 B 细胞,产生大量的免疫球蛋白 (Ig) E, 免疫球蛋白引起嗜酸性粒细胞的聚集,大量的嗜酸性粒细胞释放出炎症因子进一步加重哮喘。激活的 T 淋巴细胞即 Th 根据分泌的细胞因子的不同分为不同的亚群,临床及实验研究发现,哮喘的发生与 Th1/Th2 失衡密切相关^[15],主要表现为 Th2 过表达而 Th1 相对抑制, Th2 分泌的 IL-4, IL-5, IL-6 和 IL-10 能够促进 IgE, 嗜酸性粒细胞和其他炎症因子的产生,进一步加重炎症。而 Th1 途径所调控的对哮喘的保护机制主要是通过 INF-γ 的合成阻止 IgE 和嗜酸性粒细胞的合成,从而减轻气道炎症水平。

TLR4, TLR7 是产生固有免疫的重要分子,他们能通过髓样分化蛋白抗原 88 (MyD88) 依赖途径介导炎症激活 Th1 细胞免疫反应^[16]。TLR4, TLR7 分别表达于细胞膜和细胞内涵体,共同介导 MyD88 依赖性的通路, MyD88 能促进 IL-1 受体相关激酶 4 (IRAK4) 和 IRAK-1 的相互作用, P-转化生长因子激

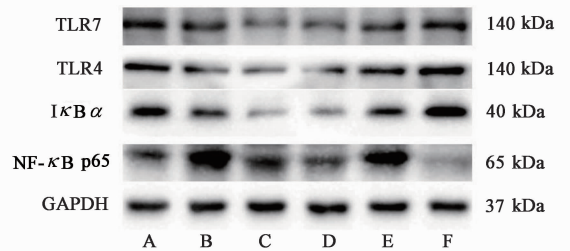


图 3 小鼠肺组织 TLR4, TLR7, IκBα 蛋白及核蛋白 NF-κB p65 表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of expressions of TLR4, TLR7, IκBα and nuclear protein NF-κB p65 in lungs of mice

4 讨论

慢性气道炎症、气道高反应性和气道重塑是哮

活酶 (TAK1) 能在细胞质被激活,导致了 IKKs 的活化。IKK 的激活造成了 IκBα 的磷酸化、降解及 NF-κB 的释放, NF-κB 由细胞质进入细胞核,活化下游炎症级联反应,促进炎症细胞因子和趋化因子的表达,最终引起炎症反应^[17-19]。国内外的不少研究表明 TLR4, TLR7 在哮喘发病中起保护性作用^[20],并且将他们的激动剂运用于缓解哮喘的研究已取得不少进展^[21-22]。WANG 等^[23]研究地塞米松缓解哮喘的机制时发现,通过增加 TLR4 的表达能显著改善气道炎症和气道高反应性; Nadeem 等^[22]发现 TLR7 激动剂能通过 Nrf2 介导的抗氧化保护作用缓解哮喘反应。同时 TLR4 和 TLR7 均能识别 RSV 病毒^[24],并且能够在它的刺激下激活人体天然免疫系统,有相当的研究发现在婴幼儿中感染率极高的 RSV 病毒与哮喘有极大的关联。本次实验造模过程中使用 RSV 病毒一方面更加有利于哮喘模型的建立,另一方面它与哮喘发病的密切关联,使哮喘模型更加贴近儿童哮喘的临床实际情况。

固本防哮饮作为江苏省中医院江育仁教授治疗缓解期哮喘多年经验方,疗效确切,临床应用可减

少、减轻哮喘发作,增强患儿体质,提高患儿的生存质量和哮喘缓解率。该方在玉屏风散及异功散的基础上加减,由炙黄芪、党参片、白术、茯苓、煅牡蛎、蝉蜕、陈皮、防风、辛夷、五味子和生甘草组成,具有补肺固表,健脾化痰的功效。哮喘缓解期宜治本,多以扶正为主,目前固本防哮饮治疗哮喘作用机制的研究多集中在调节 Th1/Th2 平衡及提高免疫力方面^[5],而本实验研究 TLR4,TLR7 介导的信号通路以探讨固本防哮饮的治疗作用,正是旨在调节 Th1/Th2平衡以实现治疗哮喘的目的。

本实验中模型组小鼠肺部炎症显著,共聚焦显微镜下发现模型组小鼠肺组织 NF- κ B p65 共定位分布最多最集中,说明模型组肺组织细胞核 NF- κ B p65 表达量最多,入核更多,而 NF- κ B p65 在炎症中起作用主要是通过由细胞质进入细胞核进而活化下游炎症分子实现的^[25],与病理结果一致。核蛋白 NF- κ B p65 水平也是在模型组分布较高,给药后明显降低,与以上结果吻合。TLR4,TLR7,I κ B α 水平在模型组表达较低,在空白组和固本防哮饮高剂量组表达较高,说明固本防哮饮可以通过增加 TLR4,TLR7,I κ B 的表达而起到治疗哮喘的作用。

综上所述,本研究发现固本防哮饮能够治疗缓解期哮喘,其作用机制之一可能是通过提高 TLR4,TLR7 的表达以活化 Th1 细胞,以调节 Th1/Th2 平衡。NF- κ B 介导的炎症在哮喘发病中作用突出,越来越多的研究将其作为研究哮喘发病及治疗的重点^[26],固本防哮饮能通过降低 NF- κ B p65 的表达以达到降低肺部炎症的目的,进而缓解哮喘。为了进一步了解固本防哮饮在该通路的作用机制,还需要多途径、多靶点进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Sigurs N, Aljassim F, Kjellman B, et al. Asthma and allergy patterns over 18 years after severe rsv bronchiolitis in the first year of life[J]. Thorax,2010, 65(12):1045-1052.

[2] 袁雪晶,孙轶秋,王素梅,等. 固本防哮饮联合定喘贴膏治疗儿童哮喘缓解期疗效评价[J]. 世界中医药,2016,11(9):1654-1658.

[3] 余晓芬. 固本防哮饮与西药治疗儿童哮喘缓解期肺气虚证的临床比较[J]. 医学理论与实践,2014,27(6):747-748.

[4] 袁雪晶,孙轶秋,王素梅,等. 固本防哮饮联合穴位敷贴治疗儿童哮喘缓解期 100 例临床研究[J]. 中华中医药杂志,2010,25(12):2306-2309.

[5] 袁雪晶,夏晨,汪受传. 固本防哮饮对哮喘缓解期小鼠的治疗作用[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(3):257-260.

[6] Komal D, Manoj K B, Gourango P, et al. Tlrs/nlrs: shaping the landscape of host immunity[J]. Int Rev Immunol,2018,37(1):3-19.

[7] 杜海霞,周惠芬,何昱,等. 银花平感颗粒和三拗汤体内抗甲型流感病毒的免疫机制研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(5):1028-1033.

[8] Papaioannou A I, Spathis A, Kostikas K, et al. The role of endosomal toll-like receptors in asthma[J]. Eur J Pharmacol, 2017,808: 14-20.

[9] Astrid C L, Eder M, Torrejón M, et al. Asthma with bronchial hypersecretion: expression of mucins and toll-like receptors in sputum and blood[J]. J Asthma Allergy, 2017, doi:10.2147/JAA.S142200.

[10] Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF kappa B system[J]. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2016, 8(3):227-241.

[11] 袁雪晶,曹建梅,许慧洁. 固本防哮饮对幼龄小鼠哮喘缓解期模型 IKK/I κ B/NF- κ B 信号途径的调节作用[J]. 中成药,2016,38(2):409-414.

[12] 刘亚南,赵霞,陆远,等. 固本防哮饮对哮喘缓解期小鼠 IKK/NF- κ B 信号通路的调控作用[J]. 辽宁中医杂志,2016,43(6):1309-1312.

[13] 王力宁,王英,黄小琪,等. 六味地黄颗粒对哮喘大鼠气道炎症的抑制作用及对肺组织干扰素- γ 信使 RNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(10):108-112.

[14] Woodruff P G, Modrek B, Choy D F, et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009,180(5):388-395.

[15] Rogala B, Bozek A, Gluck J, et al. Prevalence of IgE-mediated allergy and evaluation of Th1/Th2 cytokine profiles in patients with severe bronchial asthma[J]. Postepy Dermatol Alergol, 2015,32(4):274-280.

[16] JIN B, SUN T, YU X H, et al. The effects of tlr activation on t-cell development and differentiation[J]. Clin Dev Immunol,2012,2012(1):836485.

[17] Amin Z, Momtchilo R. Dual role of Toll-like receptors in human and experimental asthma models[J]. Front Immunol, 2018, doi:10.3389/fimmu.2018.01027.

[18] 董小君,王永辉,侯渊,等. 风湿宁对风寒湿痹证 CIA 大鼠模型滑膜组织中 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(10):123-129.

[19] 李晨,俞媛,范尧夫,等. 芍药安肠汤对溃疡结肠炎大鼠 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的影响[J]. 中国实

验方剂学杂志, 2014, 20(7):151-155.

- [20] Zahra A, Nima R. Toll-like receptors as targets for allergen immunotherapy [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2015, 15(6):568-574.
- [21] Hatchwell L, Collison A, Girkin J, et al. Toll-like receptor 7 governs interferon and inflammatory responses to rhinovirus and is suppressed by IL-5-induced lung eosinophilia [J]. *Thorax*, 2015, 70(9):854-861.
- [22] Nadeem A, Siddiqui N, Al-Harbi N O, et al. TLR-7 agonist attenuates airway reactivity and inflammation through Nrf2-mediated antioxidant protection in a murine model of allergic asthma [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 73:53-62.
- [23] WANG Z R, WANG Q, SUI Y, et al. Dexamethasone alleviates allergic asthma immature rat through Toll like receptor 4 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(1):184-189.
- [24] Kim T H, Lee H K. Innate immune recognition of respiratory syncytial virus infection [J]. *BMB Rep*, 2014, 47(4):184-191.
- [25] Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1(6):a001651.
- [26] Edwards M R, Bartlett N W, Clarke D, et al. Targeting the nf-kappab pathway in asthma and chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Pharmacol Ther*, 2008, 121(1):1-13.

[责任编辑 孙丛丛]