

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.14.012

实验研究

固本防哮饮对支气管哮喘缓解期小鼠免疫失衡的影响

刘力维^{1,2}, 赵霞^{1,2*}, 谭敏^{1,2}

(1. 南京中医药大学附属医院, 江苏省南京市秦淮区汉中路 155 号, 210029; 2. 江苏省儿童呼吸疾病 [中医药] 重点实验室)

摘要 **目的** 探讨固本防哮饮治疗支气管哮喘缓解期的可能作用机制。 **方法** 36 只 BALB/c 雌性小鼠随机分为正常组、模型组、孟鲁司特钠组、固本防哮饮预防组、固本防哮饮高剂量组及固本防哮饮等效剂量组, 每组 6 只。除正常组外其余各组采用卵蛋白致敏、雾化联合呼吸道合胞病毒滴鼻诱导建立支气管哮喘缓解期小鼠模型。造模后正常组、模型组给予蒸馏水 20 ml/kg 灌胃, 固本防哮饮等效剂量、高剂量组分别给予 24、36 g/(kg·d) 固本防哮饮灌胃, 孟鲁司特钠组给予孟鲁司特钠片 2.6 mg/(kg·d) 灌胃, 每日 1 次, 共 28 天。固本防哮饮预防组从致敏第 1 天给予 24 g/(kg·d) 的固本防哮饮每日灌胃 1 次, 共 83 天。比较各组小鼠肺组织病理变化, 采用实时定量 PCR 法检测肺组织中胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP)、胸腺基质淋巴细胞生成素受体 (TSLPR)、GATA3 mRNA 表达, Western Blotting 法检测 TSLP、TSLPR、GATA3 蛋白表达水平, 酶联免疫吸附试验测定血清 TSLP、TSLPR 蛋白表达。 **结果** 病理学结果显示, 正常组小鼠气道上皮平整, 支气管管腔光滑, 无明显炎性细胞浸润; 模型组小鼠气道上皮不完整, 肺泡壁增厚, 同时气道黏膜层、黏膜下层以及血管周围组织可见大量炎性细胞浸润; 固本防哮饮各治疗组和孟鲁司特钠组小鼠肺组织病理炎症均较模型组减轻, 且各治疗组病理差异不明显。与正常组比较, 模型组小鼠肺组织 TSLP、TSLPR、GATA3 mRNA 及蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 各给药组小鼠肺组织 TSLP、TSLPR、GATA3 mRNA 及蛋白表达均不同程度降低 ($P < 0.05$)。各组小鼠血清中 TSLP、TSLPR 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。 **结论** 固本防哮饮可改善支气管哮喘缓解期的肺组织病理改变, 其机制可能是抑制肺组织 TSLP、TSLPR、GATA3 表达, 纠正肺组织 Th1/Th2 的偏移, 从而调控机体的免疫功能。

关键词 固本防哮饮; 支气管哮喘; 胸腺基质淋巴细胞生成素; 胸腺基质淋巴细胞生成素受体; 免疫失衡

支气管哮喘 (简称哮喘) 是儿童常见的慢性气道炎症性变态反应性疾病, 有研究显示, 1 型辅助性 T 细胞 (Th1)/2 型辅助性 T 细胞 (Th2) 失衡是哮喘最重要的免疫学异常^[1]。胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP) 在哮喘患者体内高表达, 与 Th2 优势免疫密切相关^[2]。基因组研究发现, TSLP 为哮喘易感基因, 而胸腺基质淋巴细胞生成素受体 (TSLPR, 也称为 CRLF2) 是 TSLP 的特异性膜受体, 两者结合后发挥功能^[3]。临床研究亦发现,

TSLP 的表达程度与哮喘患者肺功能及气道高反应性显著相关^[4]。固本防哮饮作为中医儿科名家江育仁教授的经验方, 临床证明可改善患儿体质, 减少哮喘发作^[5]。前期研究^[6-7]亦证实, 固本防哮饮可改善缓解期慢性气道炎症, 在病理水平减轻气道重塑, 抑制气道杯状细胞增生和黏液分泌相关基因表达, 纠正肺部 Th1、Th2 型炎症因子的异常表达, 同时上调 Th1 细胞特异的转录因子 T-bet。本实验将进一步研究固本防哮饮对哮喘小鼠 TSLP 及免疫的影响及可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及病毒细胞株

清洁级雌性 BALB/c 小鼠, 6~8 周龄, 体重 18~22 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限

基金项目: 国家自然科学基金 (81774367); 江苏省高校自然科学基金重大项目 (15KJA360003); 江苏省研究生科研与实践创新计划 (KYCX18_1553); 江苏省中医药领军人才 (SLJ0224); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

* 通讯作者: zhaoxiahy@126.com, (025) 86559331

公司, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2013-0006。呼吸道合胞病毒 A 亚型 (Long 株) 由江苏省儿童呼吸疾病 (中医药) 重点实验室惠赠。

1.2 药物

孟鲁司特钠片: 10 mg/片, 杭州默沙东药业股份有限公司, 批号: K004567。固本防哮喘组成: 炙黄芪、党参、白术、茯苓、煅牡蛎、蝉蜕、陈皮、防风、辛夷、五味子、甘草, 配伍比例为 5 : 3.33 : 3.33 : 3.33 : 5 : 2 : 2 : 1 : 2 : 2 : 1, 制备成含生药量 3 g/ml 的溶液, 4℃ 储存备用。

1.3 主要试剂与仪器

卵蛋白 (OVA, 批号: 326A058), 美国 Sigma 公司; 硫酸铝钾 (批号: 20120110), 天津科密欧化学试剂有限公司; 兔抗小鼠 TSLP 多克隆抗体 (批号: abs137554)、兔抗小鼠 TSLPR 多克隆抗体 (批号: abs115281)、兔抗小鼠 GATA3 多克隆抗体 (批号: 10417-4-AP), Proteintech 中国公司; 山羊抗兔多克隆二抗 (批号: ab6721), 美国 Abcam 公司; 兔抗 β -actin 多克隆抗体 (批号: YM3214), 美国 Immunoway 公司; 小鼠 TSLP 酶联免疫分析 (ELISA) 试剂盒 (批号: JEB-5360)、TSLPR ELISA 试剂盒 (批号: JEB-45361), 南京金益柏生物科技有限公司; ECL 发光液 (批号: E300-350), 南京基易生物科技有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (批号: 23227), 美国 Thermo Scientific 公司; DEPC 水 (批号: R0021)、苏木精-伊红染色液 (批号: C0105)、RIPA 裂解液 (批号: P0013B), 南京碧云天生物技术有限公司; 总 RNA 提取试剂盒 (批号: 9109)、逆转录试剂盒 (批号: RR306A)、Real-time PCR 定量试剂盒 (批号: RR820A), 加拿大 ABM 公司。

Infinite M200 PRO 微孔板检测仪, 瑞士 TECAN 公司; Biophotometer 紫外分光光度仪, 德国 Eppendorf 公司; PowerPac Basic 电泳槽、Trans-Blot-SD 半干转膜仪、Chemi-Doc 化学发光成像仪, 美国 Bio-Rad 公司; Quant Studio 7 Flex PCR System, 美国 AB 公司; BioPhotometer 蛋白核酸分析仪, 德国 Effendorf 公司; BX43 倒置显微镜, 日本 OLMPUS 公司; 402A 型鱼跃超声雾化器, 江苏鱼跃医疗设备有限公司。

1.4 造模、分组及给药

参照实验前期造模方法^[8]并加以改进, 制备哮喘缓解期小鼠模型。36 只小鼠按体重采用随机数字表法分成正常组、模型组、固本防哮喘预防组、孟鲁司特钠组、固本防哮喘等效剂量组、固本

防哮喘高剂量组, 每组 6 只。适应性饲养 1 周后, 除正常组外其余各组小鼠第 1、8 天给予腹腔注射 0.2 ml 致敏液 (含 OVA 100 μ g, 硫酸铝钾 1 mg, 溶解于生理盐水溶液中) 致敏; 第 15 天将小鼠放入课题组自制亚克力盒中, 以终浓度为 2.5% 的 OVA 雾化液, 吸入 30 min 激发, 连续雾化 14 天, 每日 1 次。然后在第 32、35、38、41、45、48、51、54 天以同样的方法雾化激发, 共激发 22 次, 同时第 29、42、55 天分别以呼吸道合胞病毒 50 μ l/只滴鼻诱导激发。第 56 天正常组、模型组给予蒸馏水 20 ml/kg 灌胃, 固本防哮喘等效剂量、高剂量组分别给予 24、36 g/kg 固本防哮喘灌胃, 孟鲁司特钠组给予孟鲁司特钠片 2.6 mg/kg 灌胃, 每日 1 次, 共 28 天。固本防哮喘预防组从致敏第 1 天给予临床等效剂量 (24 g/kg) 的固本防哮喘每日灌胃 1 次, 共 83 天。正常组以同体积 0.9% 氯化钠溶液代替致敏液、激发液。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 血清 TSLP、TSLPR 蛋白表达 末次激发 24 h 后处死小鼠, 立即摘眼球取血, 4℃、500 g 离心 15 min 获取血清。ELISA 法检测血清中 TSLP、TSLPR 含量, 具体步骤按试剂盒说明书进行。在酶标仪波长 450 nm 上读取吸光度 (A) 值, 通过标准曲线换算成相应浓度。

1.5.2 肺组织病理 末次给药 24 h 后取右中肺置于多聚甲醛中固定用于制备病理。其余肺组织放于液氮中备用。取小鼠右肺中叶, 用 4% 多聚甲醛固定 24 h, 脱水, 常规石蜡包埋, 切片, 片厚 4 ~ 5 μ m, 进行苏木精-伊红染色, 在倒置显微镜下观察。

1.5.3 肺组织 TSLP、TSLPR、GATA3 mRNA 表达 采用 Real-time PCR 法检测, 参照 RNA 抽提试剂盒说明书抽提肺组织总 RNA, 应用紫外分光光度仪测定 A260/A280 值及浓度, A260/A280 值在 1.8 ~ 2.0 为符合纯度要求。依据荧光定量 PCR 引物设计原则设计引物, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, GAPDH: 上游 5'-CGTGTTCCTAC-CCCCAATGT3', 下游 5'-TGTCATACTGGCAG-GTTTCT3', 扩增片段 104 bp; TSLP: 上游 5'-GGAGC-CTCTTCATCCTGCAA3', 下游 5'-CTGGCTTGCTCT-CACAGTCCT 3', 扩增片段 171 bp; TSLPR: 上游 5'-CTGCCATGGCTCTTCTGGA 3', 下游 5'-CTCCAC-CGTCTCCAGGTCAT 3', 扩增片段 110 bp; GATA3: 上游 5'-CTGGCTTGCTCTCACAGTCCT 3', 下游 5'-ACACACTCCCTGCCTTCTGT 3', 扩增片段 138 bp。参照逆转录试剂盒进行逆转录, 所得 cDNA 置于

-20℃ 冰箱中保存备用。按照试剂盒说明书进行扩增。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对结果进行数据处理。

1.5.4 肺组织 TSLP、TSLPR、GATA3 蛋白表达

采用 Western Blotting 检测, 将组织蛋白裂解液加入各组小鼠的肺组织中, 充分研磨, 然后放置冰上 30 min 后, 4℃ 15000 g 离心取上清液, BCA 法测定蛋白浓度, 将上样蛋白浓度定为 $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, 煮沸 5 min 进行蛋白变性; 分别配制分离胶和积层胶, 按照 S1 80V 30 min、S2 110V 60 min 进行电泳; 电泳后进行 25V 30 min 半干法转膜; 转膜后用 5% BSA 封闭, 置摇床上 1 h 后, 用 $1 \times \text{TBST}$ 洗膜 3 次, 分别加入按 1 : 1000 比例稀释的 TSLP、TSLPR、GATA3 一抗, 4℃ 过夜; $1 \times \text{TBST}$ 洗膜 3 次, 常温下用 1 : 1000 稀释的二抗于摇床上孵育 2 h, $1 \times \text{TBST}$ 洗膜 3 次, 每次 5 min, 然后进行条带曝光。用 Image Lab 3.0 软件处理各条带, 以目的蛋白与 $\beta\text{-actin}$ 的灰度比值作为目的蛋白的相对含量。

1.6 统计学方法

采用 Prism 6.0 统计软件, 计量资料符合正态分布采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组独立比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

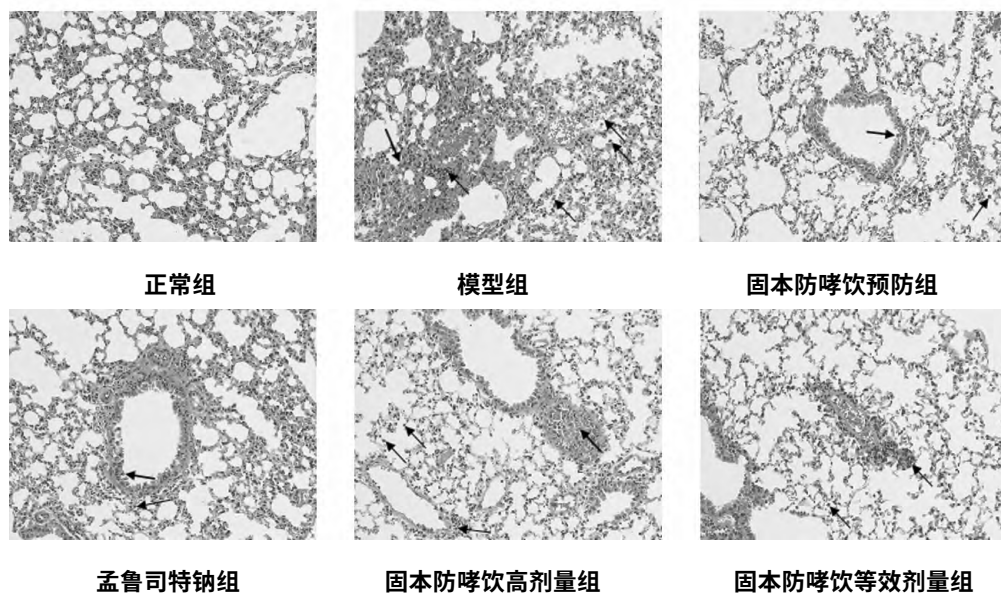
2.1 各组小鼠肺组织病理改变比较

图 1 示, 正常组小鼠气道上皮平整, 无纤毛脱落, 气道黏膜无明显水肿, 支气管管腔光滑, 无闭塞, 气道及周围血管组织无明显炎性细胞浸润, 肺

泡腔内未见炎性分泌物, 气管平滑肌无增厚。模型组小鼠气道上皮不完整, 可见上皮细胞脱落及坏死, 肺泡壁增厚, 同时气道黏膜层、黏膜下层以及血管周围组织可见大量炎性细胞浸润 (黑色箭头所示), 炎性细胞以中性粒细胞、巨噬细胞及嗜酸性粒细胞为主, 气道管腔缩小, 气道腔内可见炎性分泌物, 气管平滑肌明显增厚。固本防哮饮各治疗组和孟鲁司特钠组小鼠肺组织病理均有炎症变化, 但较模型组明显减轻。固本防哮饮高剂量组肺组织中也可见少量上皮细胞坏死, 同时血管周围可见少量炎性细胞浸润, 肺泡腔内可见巨噬细胞及中性粒细胞。固本防哮饮等效剂量组肺组织中肺泡腔内可见少量炎性细胞; 血管周围可见炎性细胞小灶性浸润。固本防哮饮预防组肺组织炎性细胞浸润程度较固本防哮饮高剂量与等效剂量组稍有减轻, 但无明显差异, 组织病理显示肺泡界限清晰, 肺泡壁未见增厚, 支气管上皮细胞仅见少量坏死脱落, 肺泡腔内少量巨噬细胞。

2.2 各组小鼠肺组织中 TSLP、TSLPR、GATA3 mRNA 表达比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组小鼠肺组织 TSLP、TSLPR、GATA3 mRNA 表达显著增高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 固本防哮饮预防组、孟鲁司特钠组、固本防哮饮等效剂量组小鼠肺组织 TSLP、TSLPR、GATA3 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$), 固本防哮饮高剂量组小鼠肺组织 TSLP、TSLPR mRNA 低于模型组, 但 GATA3 mRNA 表达



注: 黑色箭头指示为炎性细胞

图 1 各组小鼠肺组织 HE 病理染色 ($\times 200$)

表 1 各组小鼠肺组织中 TSLP、TSLPR、GATA3 mRNA 相对表达量比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TSLP	TSLPR	GATA3
正常组	6	1	1	1
模型组	6	1.819 ± 0.141*	1.551 ± 0.146*	2.693 ± 0.116*
固本防哮饮预防组	6	1.017 ± 0.199 Δ	1.028 ± 0.040 Δ	2.018 ± 0.043 Δ
孟鲁司特钠组	6	0.984 ± 0.150 Δ	0.813 ± 0.049 Δ ▲	1.819 ± 0.141 Δ
固本防哮饮高剂量组	6	1.378 ± 0.057 Δ	1.017 ± 0.199 Δ	2.265 ± 0.189
固本防哮饮等效剂量组	6	1.160 ± 0.229 Δ	0.773 ± 0.073 Δ ▲	1.787 ± 0.038 Δ ▲

注: TSLP, 胸腺基质淋巴细胞生成素; TSLPR, 胸腺基质淋巴细胞生成素受体; 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与固本防哮饮预防组比较, ▲ $P < 0.05$

表 2 各组小鼠肺组织中 TSLP、TSLPR、GATA3 蛋白相对表达量比较 ($1/\beta$ -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TSLP	TSLPR	GATA3
正常组	6	1.036 ± 0.022	0.213 ± 0.012	0.833 ± 0.1679
模型组	6	1.417 ± 0.061*	1.420 ± 0.240*	1.970 ± 0.090*
固本防哮饮预防组	6	1.150 ± 0.089▲	0.597 ± 0.105 Δ	0.990 ± 0.189 Δ
孟鲁司特钠组	6	0.640 ± 0.042 Δ	0.863 ± 0.070	0.836 ± 0.071 Δ
固本防哮饮高剂量组	6	0.817 ± 0.172 Δ	0.640 ± 0.042 Δ	0.817 ± 0.172 Δ
固本防哮饮等效剂量组	6	1.216 ± 0.035 Δ ▲	0.816 ± 0.283	1.230 ± 0.069 Δ

注: TSLP, 胸腺基质淋巴细胞生成素; TSLPR, 胸腺基质淋巴细胞生成素受体; 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与孟鲁司特钠组比较, ▲ $P < 0.05$

与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与固本防哮饮预防组比较, 孟鲁司特钠组和固本防哮饮等效剂量组小鼠肺组织中 TSLPR mRNA 表达降低, 固本防哮饮等效剂量组 GATA3 mRNA 降低 ($P < 0.05$); 孟鲁司特钠组、固本防哮饮高剂量组、固本防哮饮等效剂量组组间比较, 小鼠肺组织 TSLP、TSLPR、GATA3 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组小鼠肺组织中 TSLP、TSLPR、GATA3 蛋白表达比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组肺组织中 TSLP、TSLPR、GATA3 的蛋白表达均显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 固本防哮饮预防组可显著抑制 TSLPR、GATA3 蛋白表达 ($P < 0.05$), 而 TSLP 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与模型组比较, 孟鲁司特钠组 TSLP、GATA3 蛋白表达显著降低, 固本防哮饮高剂量组 TSLP、TSLPR、GATA3 蛋白表达亦降低, 固本防哮饮等效剂量组 TSLP、GATA3 蛋白表达亦降低 ($P < 0.05$)。与孟鲁司特钠组比较, 固本防哮饮预防组和固本防哮饮等效剂量组 TSLP 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。固本防哮饮预防组和固本防哮饮等效、高剂量组 TSLP、TSLPR、GATA3 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 各组小鼠血清中 TSLP、TSLPR 蛋白表达比较

表 3 示, 各组小鼠血清中 TSLP、TSLPR 蛋白

表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 各组小鼠血清中 TSLP、TSLPR 蛋白表达比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TSLP	TSLPR
正常组	6	41.17 ± 4.97	15.01 ± 4.02
模型组	6	44.44 ± 6.66	18.61 ± 5.27
固本防哮饮预防组	6	41.13 ± 5.32	13.72 ± 2.96
孟鲁司特钠组	6	41.25 ± 10.97	15.96 ± 3.62
固本防哮饮高剂量组	6	41.52 ± 4.60	14.34 ± 3.22
固本防哮饮等效剂量组	6	39.61 ± 6.44	15.97 ± 2.24

注: TSLP, 胸腺基质淋巴细胞生成素; TSLPR, 胸腺基质淋巴细胞生成素受体

3 讨论

固本防哮饮是全国著名儿科专家江育仁针对儿童支气管哮喘缓解期肺脾气虚证所立, 是玉屏风散合二陈汤加减而成, 具有补气健脾化痰之功, 佐以辛夷、蝉蜕辅助防风行散风邪, 兼以通窍; 五味子合煅牡蛎收敛气阴, 兼以益肾, 意求补固肺卫, 健脾化痰。孟鲁司特钠作为儿童哮喘常用控制性药物, 故选为对照药物^[8]。本研究病理结果证实, 固本防哮饮各给药组和孟鲁司特钠组均可减轻肺组织气道炎症及组织损伤, 预防给药大鼠肺组织炎性细胞浸润程度较高剂量与等效剂量干预稍有减轻, 但无明显差异, 这与本课题组前期实验结果^[6-7]一致, 说明固本防哮饮对支气管哮喘小鼠肺组织炎症有一定抑制作用。

现代研究显示,支气管哮喘缓解期的治疗重点在于长期控制,纠正免疫失衡状态,预防感触复发^[8-10]。有研究发现哮喘病理过程由多种辅助性 T 细胞 (Th) 细胞参与其中,哮喘最普遍的表现是以嗜酸性粒细胞为主的炎症,其特征是由 Th2 驱动^[11]。GATA3 是 GATA 转录因子家族的成员之一,被视为 Th2 细胞定向分化的标志,GATA3 表达增加可诱导 Th0 向 Th2 细胞分化,分泌 Th2 细胞因子^[12]。临床试验发现,靶向阻断 GATA3 mRNA 的翻译可在哮喘患者的治疗中得到收益,不仅减弱哮喘早期反应,还减少了迟发症状^[13]。

TSLP 作为一种上皮因子参与过敏反应、病毒感染、肿瘤发展等^[14]。近年研究表明,TSLP 不仅是 Th2 炎症的关键驱动因素,也支持 Th2 细胞产生持续效应及功能,其在哮喘等过敏性疾病中起关键作用^[12,15]。TSLPR 是 TSLP 的异性膜受体,两者结合后启动下游功能^[16]。基因组研究发现,TSLP 为哮喘易感基因,哮喘患者外周单核细胞高表达 TSLP 基因^[17]。临床试验证实,经 TSLP 抗体治疗的患者可减轻过敏原暴露前后的炎症反应^[18]。动物实验也证实,靶向阻断 TSLP 可抑制感染及过敏原暴露引起的 Th2 型免疫反应^[14]。

本研究结果发现,哮喘缓解期模型小鼠肺组织中 TSLP、TSLPR、GATA3 mRNA 及蛋白表达水平均显著高于正常组,说明在停止过敏原刺激 28 天后气道上皮仍分泌 TSLP 因子进而刺激其受体在肺部的表达并维持 Th2 免疫亢进状态。而预防性给予固本防哮饮可以抑制 TSLPR 和 GATA3 在肺组织中的转录及蛋白表达,此外高剂量固本防哮饮在蛋白水平对 TSLP、TSLPR、GATA3 的抑制作用较等效剂量更具优势。孟鲁司特钠组亦可下调 TSLP、TSLPR、GATA3 mRNA 及蛋白表达,且与固本防哮饮各治疗组差异不明显。结合本次实验结果,提示临床治疗哮喘时可根据情况增加固本防哮饮预防性用药时间,也可联合孟鲁司特钠干预增加缓解期对气道炎症的控制作用。

同时,本次实验发现模型组和各干预组小鼠血清 TSLP、TSLPR 与正常组无显著差异。分析存在以下可能:第一,本次实验建立模型意图模拟哮喘缓解期,检测时间点为刺激后 28 天,此时慢性气道炎症是主要病理特征而外周免疫反应不明显。第二,在哮喘中 TSLP 主要由气道上皮及巨噬细胞等免疫细胞分泌^[14],而 TSLPR 主要表达在树突细胞及 2 型先天淋巴细胞表面,在 TSLP 刺激下诱发细

胞成熟,驱动免疫反应性^[19]。因此,与正常组相比模型组血清中 TSLP 表达可能无明显变化。目前,针对 TSLP 在缓解期表达情况的临床研究尚是空白,值得探讨。

综上所述,固本防哮饮可改善支气管哮喘缓解期的肺组织病理改变,其机制可能是抑制肺组织 TSLP、TSLPR、GATA3 表达,纠正肺组织 Th1/Th2 的偏移,从而调控机体的免疫功能,防止哮喘反复发作。

参考文献

- [1] UMETSU DT, MCINTIRE JJ, AKBARI O, et al. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity [J]. Nat Immunol, 2002, 3(8): 715-720.
- [2] SIRACUSA MC, SAENZ SA, HILL DA, et al. TSLP promotes interleukin-3-independent basophil haematopoiesis and type 2 inflammation [J]. Nature, 2011, 477(7363): 229-233.
- [3] SIRACUSA MC, SAENZ SA, HILL DA, et al. Genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for adult asthma in the Japanese population [J]. Nat Genet, 2011, 43(9): 893-896.
- [4] PNIEWSKA E, SOKOLOWSKA M, KUPRYSLIPINSKA I, et al. Exacerbating factors induce different gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from asthmatics, patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy subjects [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2014, 165(4): 229-243.
- [5] 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.
- [6] LU Y, XU JY, ZHANG XH, et al. Gu-Ben-Fang-Xiao decoction attenuates sustained airway inflammation by suppressing ER stress response in a murine asthma remission model of respiratory syncytial virus infection [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 192: 496-509. doi: 10.1016/j.jep.2016.09.039.
- [7] 邢琼琼,赵霞,杨睿雪,等. 固本防哮饮对哮喘缓解期小鼠 T-bet、IFN- γ 和 IL-2 的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(2): 517-520.
- [8] 吴嘉婴,洪建国. 儿童支气管哮喘诊断和防治指南 (2016 年版) 更新要点 [J]. 世界临床药物, 2018, 39(8): 512-517.
- [9] Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention [EB/OL]. (2016-05-01) [2018-09-13]. <http://www.ginaasthma.org>.
- [10] BUSH A. Management of asthma in children [J]. Minerva pediatrica, 2018, 70(5): 444-457.
- [11] CHRISTOU EAA, GIARDINO G, STEFANAKI E, et al. Asthma: an undermined state of immunodeficiency

- [1] . Int Rev Immunol, 2019, 2: 1-9. doi: 10.1080/08830185.2019.1588267.
- [2] WALKER JA, ANJ MK. TH2 cell development and function [J]. Nat Rev Immunol, 2017, 18(2): 121-133.
- [3] KRUG N, HOHLFELD JM, KIRSTEN AM, et al. Allergen-induced asthmatic responses modified by a GATA3-specific DNase [J]. N Engl J Med, 2015, 372(21): 1987-1995.
- [4] BEL EH. Moving upstream-anti-TSLP in persistent uncontrolled asthma [J]. N Engl J Med, 2017, 377(10): 989-991.
- [5] ZHU Z, OH MH, YU J, et al. The role of TSLP in IL-13-induced atopic march [J]. Sci Rep, 2011, 1: 23. doi: 10.1038/srep00023.
- [6] HOLTZMAN MJ, BYERS DE, ALEXANDERBRETT J, et al. The role of airway epithelial cells and innate immune cells in chronic respiratory disease [J]. Nat Rev Immunol, 2014, 14(10): 686-698.
- [7] SMITH SG, GUGILLA A, MUKHERJEE M, et al. Thymic stromal lymphopoietin and IL-33 modulate migration of hematopoietic progenitor cells in patients with allergic asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2015, 135(6): 1594-1602.
- [8] GAUVREAU GM, O'BYRNE PM, BOULET LP, et al. Effects of an anti-TSLP antibody on allergen-induced asthmatic responses [J]. N Engl J Med, 2014, 370(22): 2102-2110.
- [9] LICONALIMÓN P, KIM LK, PALM NW, et al. Corrigendum: TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells [J]. Nat Immunol, 2013, 14(6): 536-542.

Effects of *Guben Fangxiao Decoction* (固本防哮饮) on Immune Imbalance in Mice with Bronchial Asthma during Remission

LIU Liwei^{1,2}, ZHAO Xia^{1,2}, TAN Min^{1,2}

(1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029; 2. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Child Respiratory Diseases [Chinese Medicine])

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of *Guben Fangxiao Decoction* (固本防哮饮) in the treatment of bronchial asthma during remission. **Methods** A total of 36 female BALB/c mice were randomly divided into a normal group, a model group, a montelukast sodium group, a *Guben Fangxiao Decoction* prevention group, a *Guben Fangxiao Decoction* high-dose group and a *Guben Fangxiao Decoction* equivalent dose group, with 6 mice in each group. Except the normal group, the other groups were induced by ovalbumin sensitization, nebulization combined with respiratory syncytial virus to establish a mouse model of bronchial asthma during remission. After the model was established, the normal group and the model group were given 20 ml/kg of distilled water for intragastric administration. The equivalent dose and high dose group of *Guben Fangxiao Decoction* were given 24, 36 g/(kg·d), respectively. In the montelukast sodium group, montelukast sodium tablets were administered 2.6 mg/(kg·d) intragastrically once a day for 28 days. The *Guben Fangxiao Decoction* prevention group was given a daily dose of 24 g/(kg·d) of *Guben Fangxiao Decoction* on the first day of sensitization for 83 days. The pathological changes of lung tissue in mice were compared between the groups. The expression of thymic stromal lymphopoietin (TSLP), thymic stromal lymphopoietin receptor (TSLPR) and GATA3 mRNA was detected by real-time quantitative PCR. Western blotting was used to detect TSLP, TSLPR, GATA3 protein expression levels. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine serum TSLP, TSLPR protein expression. **Results** The pathological results showed that the airway epithelium was smooth in the normal group, the bronchial lumen was smooth, and there was no obvious inflammatory cell infiltration. In the model group, the airway epithelium was incomplete, and the alveolar wall was thickened. The airway mucosa and submucosa could see a large number of inflammatory cell infiltration in the perivascular tissue; the pathological inflammation of lung tissue in the treatment group and the montelukast sodium group were all reduced compared with the model group, and the pathological difference of each treatment group was not obvious. Compared with the normal group, the expression of TSLP, TSLPR and GATA3 mRNA and protein in the lung tissue of the model group was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expressions of TSLP, TSLPR and GATA3 mRNA and protein in lung tissue of each group were decreased ($P < 0.05$). There was no significant difference in the expression of TSLP and TSLPR protein in serum of each group ($P > 0.05$). **Conclusion** *Guben Fangxiao Decoction* can improve the pathological changes of lung tissue in the remission period of bronchial asthma. The mechanism may be to inhibit the expression of TSLP, TSLPR and GATA3 in lung tissue, correct the shift of Th1/Th2 in lung tissue, and regulate the immune function of the body.

Keywords *Guben Fangxiao Decoction* (固本防哮饮); bronchial asthma; thymic stromal lymphopoietin; thymic stromal lymphopoietin receptor; immune imbalance

(收稿日期: 2018-09-13; 修回日期: 2019-04-22)

编辑: 邓 媛