

- [30] 林梅英, 宋明辉, 杨美成, 等. 食品基质中不同金黄色葡萄球菌肠毒素基因型表达差异研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(17): 6751-6755.
- [31] 周双. 婴儿肠源乳酸菌对小鼠肠道免疫功能和菌群的影响[D]. 邯郸: 河北工程大学, 2020.
- [32] 李海红, 杨振泉, 王晓霖, 等. 乳酸菌表面蛋白对免疫细

- 胞的诱导增殖及粘附抑制效应[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(1): 15-20.
- [33] Golowczyc M A, Mobili P, Garrote G L, et al. Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar enteritidis[J]. Int J Food Microbiol, 2007, 118(3): 264-273.

三拗汤对咳嗽变异性哮喘小鼠 Th17/Treg 免疫平衡的影响

肖渝箫¹, 张亚杰², 王星^{1*}

(1. 中国药科大学药学院, 江苏南京 211198; 2. 南京中医药大学附属南京中医院, 江苏南京 210022)

摘要: 目的 研究三拗汤对咳嗽变异性哮喘小鼠 Th17/Treg 免疫平衡的影响。方法 小鼠通过腹腔注射卵蛋白、氢氧化铝致敏, 并吸入卵蛋白激发法建立咳嗽变异性哮喘模型, 随机分为空白组, 模型组, 孟鲁司特钠组, 三拗汤低、中、高剂量组, HE、F4/80 荧光染色观察肺及支气管组织病理变化、巨噬细胞聚集情况, 流式细胞术分析脾脏组织 Th17、Treg 细胞比例, RT-qPCR 检测肺组织 TGF-β、IL-6、IL-23、IL-10、IL-17A、IL-17F、IL-4、IL-13 mRNA 表达。结果 与模型组比较, 三拗汤各剂量组小鼠气管、支气管及血管周围炎性细胞浸润量减少, 杯状细胞化减轻, 上皮下纤维化和平滑肌体积增加现象缓解, F4/80 荧光强度减弱; 肺组织 TGF-β、IL-17A、IL-17F、IL-4、IL-6、IL-13 mRNA 表达降低 ($P<0.05$); 脾脏 Th17 细胞比例、Th17/Treg 比值降低 ($P<0.05$)。结论 三拗汤可改善咳嗽变异性哮喘小鼠气管及肺组织炎性病理变化及气道痉挛状态, 其机制与调节 Th17/Treg 免疫平衡及相关细胞因子有关。

关键词: 三拗汤; 咳嗽变异性哮喘; Th17/Treg 免疫平衡; F4/80

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)04-1300-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.04.046

咳嗽变异性哮喘是一种特殊类型的哮喘, 咳嗽为其唯一或主要临床表现, 表现为刺激性干咳, 程度剧烈, 以夜间咳嗽为主, 通常不伴有明显喘息、气促等症状, 感冒、冷空气、灰尘、油烟等原因可导致咳嗽加重^[1], 本病发生率近年来有上升趋势, 是慢性咳嗽 (尤其是儿童慢性咳嗽) 占比最高的疾病 (41.95%), 而且约 30% 可发展为典型哮喘^[2-3]。目前认为, 咳嗽变异性哮喘是由多种因素相互作用所致, 包括社会及环境、遗传、感染、免疫等, 以免疫因素为主, 大多数研究表明本病在病理生理学特征及相关的免疫-炎症反应机制方面与典型哮喘具有相似性^[4-5]。经典理论认为, Th1/Th2 比例失衡是哮喘发病的主要免疫机制, 但近年来大量的临床和基础研究发现, Th17/Treg 失衡也是重要机制^[6]。

中医将咳嗽变异性哮喘归属于“咳嗽”范畴, 属“风咳”“痉咳”等^[7]。国医大师王烈认为, 本病发病机制及特点与哮喘相似, 但又不同于哮喘的喘息气促之症, 因此

将其命名为“哮咳”^[8]。三拗汤出自《太平惠民和剂局方》, 由麻黄、杏仁、甘草组成, 具有宣肺散寒、止嗽平喘功效, 是历代治疗哮喘的经典方剂, 本研究观察该方对 Th17/Treg 细胞免疫平衡调控作用, 并进一步探讨其止咳平喘机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 60 只, 体质量 18~22 g, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (沪) 2018-0006, 实验前在标准实验室条件下饲养 1 周。

1.2 试剂与药物 三拗汤为实验室自制, 方法为取麻黄 6 g、杏仁 6 g、甘草 6 g, 加 10 倍量水浸泡后回流提取, 过滤后浓缩至 100 mL, 即得。孟鲁司特钠咀嚼片 (批号 S015289) 购自美国默沙东公司。卵清白蛋白 (ovalbumin, OVA) (批号 1002638270)、氢氧化铝 (批号 21645-51-2) 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 小鼠 Treg 细胞染色试剂盒

收稿日期: 2021-06-21

基金项目: 江苏省卫生健康委科研项目 (LGY2020021); 中国药科大学国家级大学生创新创业训练计划项目 (202110316010Z)

作者简介: 肖渝箫 (2001—), 女, 研究方向为药理学。Tel: 18994132009, E-mail: yuxiao1798@163.com

*通信作者: 王星 (1985—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为中药药理学。Tel: 15365186608, E-mail: star10000@sina.com

网络出版日期: 2022-02-17

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20220217.1643.002.html>

(批号 KTR201-25)、小鼠 Th17 细胞染色试剂盒(批号 KTH217-25)均购自杭州联科生物技术有限公司。

1.3 仪器 ABI 7500 型 PCR 仪(美国 ABI 公司); FC500 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司); 单细胞制备仪(美国 BD 公司); BX43 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司); 402B 型超声雾化器(江苏鱼跃医疗设备有限公司)。

2 方法

2.1 分组与造模 将小鼠随机分为 6 组, 分别为空白组, 模型组, 孟鲁司特钠组, 三拗汤低、中、高剂量组, 每组 10 只, 饲养 1 周, 第 1、7、14 天, 空白组小鼠腹腔注射 200 μL 生理盐水, 其余各组小鼠腹腔注射 200 μL 致敏液(OVA 100 μg 、氢氧化铝 20 μg)。参照文献[9]报道及前期研究结果, 末次注射 1 周后除空白组外, 其余各组小鼠均以 0.5% OVA 进行超声雾化处理, 每天 30 min, 连续 14 d, 雾化后孟鲁司特钠组(1.5 mg/kg)及三拗汤低、中、高剂量组(2.7、5.4、10.8 g/kg)小鼠灌胃给予相应药物, 空白组和模型组小鼠灌胃给予等容量生理盐水, 每天 1 次, 连续 14 d。

2.2 小鼠气管、肺组织病理学观察 最后 1 次给药激发后 24 h, 每组随机选取 3 只小鼠, 颈椎脱臼处死后解剖取气管、肺组织, 制片, 分别进行 HE 染色、F4/80 免疫荧光染色。

2.3 RT-qPCR 法检测细胞因子 mRNA 表达 取小鼠肺组织 500 mg, 加 1 mL Trizol 试剂后低温匀浆, 提取总 RNA 并检测其表达, 参照 HiScript III RT SuperMix for qPCR 试剂盒体系进行反转录合成 cDNA。PCR 反应体系为 20 μL , 包括 2 \times ChamQ SYBR qPCR Master Mix 10.0 μL 、正反向引物各 0.4 μL 、cDNA 模板 6 μL , 引物序列见表 1。采用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪两步法, 扩增标准为①预变性, 95 °C 30 s; ②PCR 反应, 95 °C 4 s, 60 °C 34 s, 共 40 个循环。采用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪软件进行数据分析, 以 GAPDH 为内参, $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算 mRNA 相对表达。

2.4 小鼠脾脏组织 Treg、Th17 细胞比例检测

2.4.1 单细胞制备 将小鼠脾脏置于单细胞制备仪中匀浆, 收集匀浆液, 检测细胞密度为 $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8/\text{mL}$, PBS 重悬待测。

2.4.2 Treg 细胞比例检测 取“2.4.1”项下细胞悬液, 加入 CD4-FITC、CD25-APC 后孵育 15 min, 加入固定破膜剂避光孵育 30 min 后再加入破膜缓冲液、Foxp3-PE 孵育 30 min, PBS 重悬后检测。

2.4.3 Th17 细胞比例检测 取“2.4.1”项下细胞悬液, 加入 PMA、BFA 后在 37 °C 下培养 6 h, 加入 CD3-FITC、CD4-percp-cy5.5 抗体后避光孵育 15 min, 加入 PBS 混匀, 加入固定剂破膜剂 A、固定剂破膜剂 B、IL-17-PE 抗体孵育 15 min, PBS 培养液重悬后检测。

2.5 统计学分析 通过 SPSS 23.0 软件进行处理, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

表 1 引物序列

基因	序列(5'→3')	长度/bp
<i>IL-6</i>	正向 GCTACCAAATGGATATAATCAGGA 反向 CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA	78
<i>IL-10</i>	正向 CTGAGGCCTGTCATCGATT 反向 AGGTCTGGACTCCAGCAGA	213
<i>IL-23</i>	正向 AATGCTATGGCTGTGCCCTG 反向 CGGATCCTTTGCAAGCAGAAC	261
<i>IL-17A</i>	正向 GGAGAGCTTCATCTGTCTCTG 反向 TTGGCCTCAGTGTGTTGGACA	112
<i>IL-17F</i>	正向 CCGTGAACACGCCATGGTCA 反向 GAGGACACTCCCAGCCTTC	128
<i>TGF-β1</i>	正向 GTGTGGAGCAACATGTGAACTCTA 反向 TTGGTTCAAGCCACTGCCGTA	143
<i>IL-4</i>	正向 TCACAGCAACGAAGAACACCA 反向 CAGGCATCGAAAAGCCCCAA	158
<i>IL-13</i>	正向 ACATCACACAAGACCAGACTC 反向 AGGCCATGCAATATCCTCTGG	151
<i>GADPH</i>	正向 CATGGCCTCCGTGTTCTA 反向 CCTGCTTCACCACTTCTGAT	104

3 结果

3.1 小鼠一般状态 空白组小鼠未见异常; 模型组小鼠出现喷嚏、搓鼻、呼吸急促、腹肌抽搐、抓耳挠腮、咬尾、烦躁易激、皮毛粗糙无光泽等情况; 各给药组小鼠在 OVA 雾化刺激后虽也有搓鼻、腹肌抽搐等症状, 但与模型组比较症状减轻。

3.2 三拗汤对小鼠气管、肺组织病理变化的影响 空白组小鼠气管、肺组织结构完整, 未见病理变化; 模型组小鼠气管、支气管、血管周围可见大量炎性细胞浸润, 并出现杯状细胞增生、上皮下纤维化、平滑肌体积增加; 与模型组比较, 孟鲁司特钠组、三拗汤各剂量组小鼠肺组织、气道炎性细胞浸润减少, 以三拗汤中剂量组更明显, 并且支气管壁结构基本完整, 见图 1。

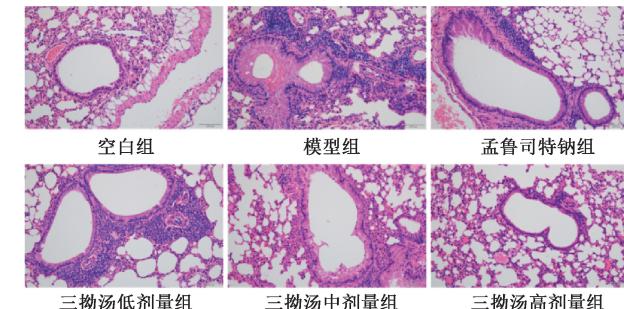
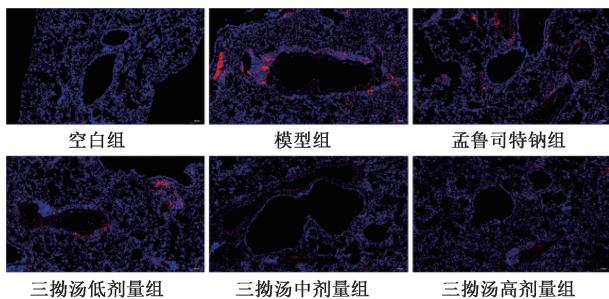
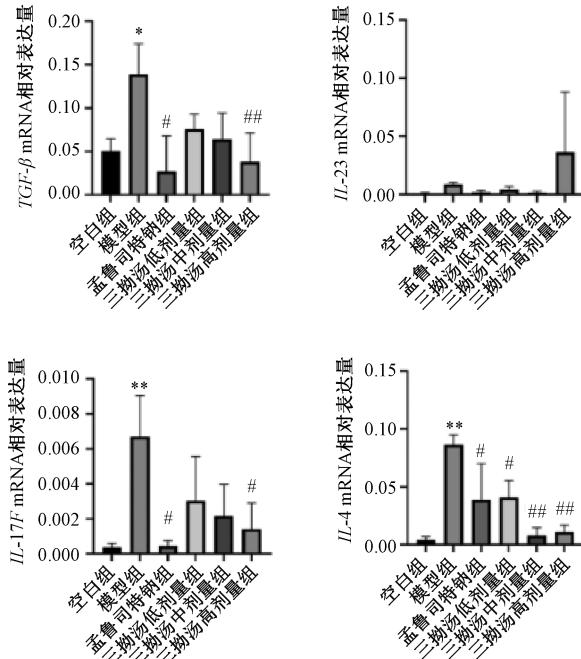


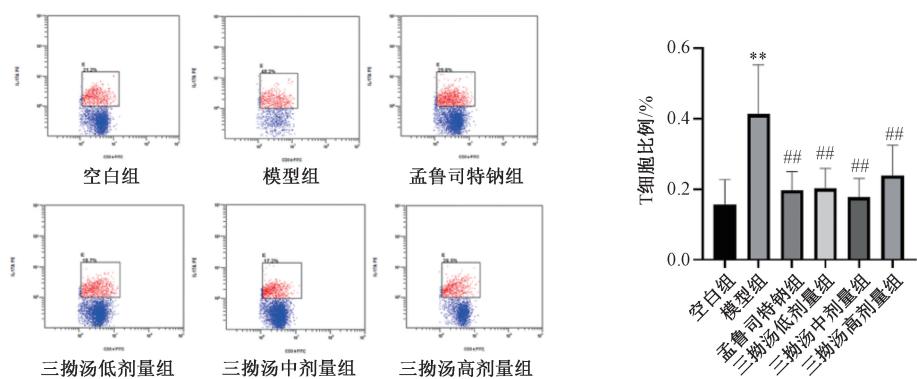
图 1 各组小鼠气管、肺组织 HE 染色 ($\times 200$)

3.3 三拗汤对小鼠气管、肺组织 F4/80 免疫荧光染色的影响 空白组、三拗汤中剂量组小鼠未见红光荧光标记的巨噬细胞大量聚集, 模型组小鼠气道周围可见红色荧光标记, 其余各组小鼠荧光强度低于模型组, 见图 2。

3.4 三拗汤对小鼠各细胞因子 mRNA 表达的影响 与空白组比较, 模型组小鼠 *TGF-β*、*IL-10*、*IL-17A*、*IL-17F*、*IL-4*、*IL-6*、*IL-13* mRNA 表达升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组比较, 三拗汤各剂量组小鼠 *TGF-β*、*IL-17A*、*IL-17F*、*IL-*

图2 各组小鼠气管、肺组织F4/80染色($\times 200$)

注：与空白组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图3 三拗汤对小鼠各细胞因子mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s$, n=6)

注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。

图4 三拗汤对小鼠脾脏Th17细胞比例的影响($\bar{x}\pm s$, n=6)

组比较，三拗汤各剂量组小鼠 Th17/Treg 比值降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见图 6。

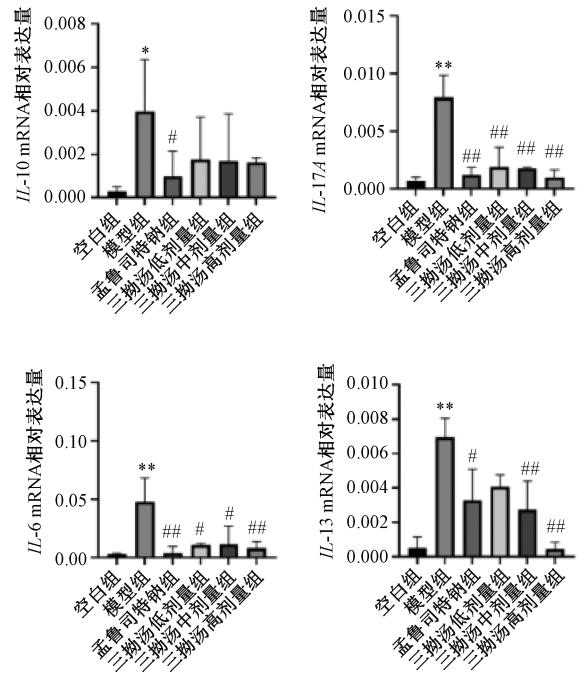
4 讨论

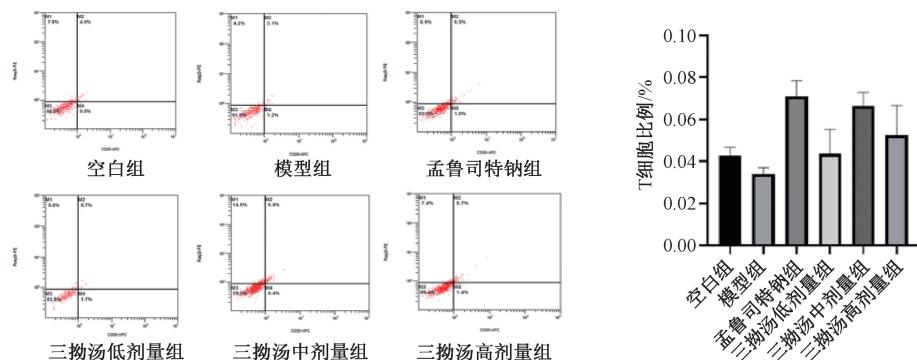
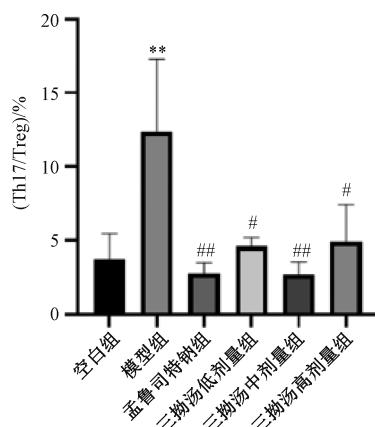
咳嗽变异性哮喘的发病机制较为复杂，基于免疫因素在其发病过程中起到的重要作用，相关研究从多个角度证明了咳嗽变异性哮喘的发病不仅与经典 Th1/Th2 平衡有关，

也受到 Th17/Treg 免疫平衡的调控。三拗汤及其加味方临幊上广泛用于治疗支气管哮喘、咳嗽变异性哮喘，过去研究者对其作用机制的探究主要着眼于气道炎症、气道高反应性等方向^[10-11]。而近年来的研究表明中医药也能通过调控 Treg/Th17 免疫平衡及其相关细胞因子治疗咳嗽变异性哮喘^[12]，这为进一步探索三拗汤治疗咳嗽变异性哮喘的机制

4、IL-6、IL-13 mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与模型组比较，三拗汤各剂量组小鼠 IL-23、IL-10 mRNA 表达无明显变化 ($P>0.05$)，见图 3。

3.5 三拗汤对小鼠脾脏 Th17、Treg 细胞比例及 Th17/Treg 平衡的影响 与空白组比较，模型组小鼠 Th17 细胞比例升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，三拗汤各剂量组小鼠 Th17 细胞比例降低 ($P<0.01$)，见图 4。各组小鼠 Treg 细胞比例比较，差异无统计学意义 ($P>0.05$)，见图 5。与空白组比较，模型组小鼠 Th17/Treg 比值升高 ($P<0.01$)；与模型



图5 三拗汤对小鼠脾脏Treg细胞比例的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=6)

注: 与空白组比较, ** P<0.01; 与模型组比较, #P<0.05, ##P<0.01。

图6 三拗汤对小鼠脾脏Th17/Treg比值的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=6)

提供了思路。

Treg细胞是一类控制体内自身免疫反应性的T细胞新亚群, 主要功能是抑制免疫效应细胞, 维持机体的免疫稳态, 其主要分泌TGF-β、IL-10等细胞因子, 能抑制炎症反应, 其中TGF-β对Treg细胞的分化至关重要^[13-14], 在哮喘机制研究中, 高表达的TGF-β被报道较多^[12,15]。Th17细胞是一种重要的促炎细胞, 其分泌的细胞因子IL-17是主要促炎因子之一, 具有很强的诱发炎症作用, 又称为前炎性因子^[16], 其加重局部炎症反应的机制为诱导支气管上皮细胞、平滑肌细胞活化, 促使支气管细胞IL-6、IL-8水平增加, 从而进一步聚集和活化中性粒细胞, 并导致多种炎症因子的分泌, 如IL-21、IL-22、IL-23、IL-6等^[17]。

Th17与Treg同属效应T细胞亚群, 在功能上互相拮抗, 表现为Th17诱发炎症, 而Treg抑制炎症。它们也受到多种因子的调控, 其中IL-6和TGF-β细胞因子水平主要决定了Th17和Treg细胞比例, TGF-β是这两种T细胞分化的共同因子, 它单独作用时初始T细胞向Treg分化; IL-6和TGF-β同时存在时, 则促进Th17细胞的分化; 而同时, Th17细胞的稳态和扩增又受到IL-23因子的调节^[18-20]。此外, 同为炎症因子, IL-4、IL-13也与IL-17相关联, 它们可通过促进巨噬细胞、单核细胞对于呼吸道黏膜的损伤和吞噬作用加剧黏膜高反应性, 这两种因子作为Th2主要分泌

的细胞因子, 是导致哮喘发作的重要因素^[21-22]。

F4/80蛋白高表达于成熟活跃的巨噬细胞中, 研究显示其表达与TGF-β等细胞因子以及Treg、Th17细胞有密切关系。F4/80可通过促进巨噬细胞成熟、提高TGF-β表达, 从而对转化为Th17与Treg产生影响^[23]。本实验发现, F4/80与TGF-β水平的增减趋势一致, 进一步证明了抗炎治疗作用可能是由抑制亢进的Th17细胞功能而引起。

本实验采用卵蛋白、氢氧化铝腹腔注射致敏并吸入卵蛋白激发法建立咳嗽变异性哮喘小鼠模型, 造模后小鼠出现喷嚏、搓鼻、呼吸急促、腹肌抽搐等行为, 较好模拟出了咳嗽变异性哮喘临床特征; 病理形态学也显示气管、支气管及肺组织血管周围有大量炎性细胞浸润, 并出现杯状细胞增生、上皮下纤维化和平滑肌体积增加。结果显示, 模型组肺组织中TGF-β、IL-17A、IL-17F、IL-4、IL-6、IL-13 mRNA表达上升, F4/80荧光强度增强, 脾脏Th17细胞比例上升, Th17/Treg比例升高, 提示以上细胞因子在咳嗽变异性哮喘疾病诱发过程中具有关键作用; 进一步分析可知其导致疾病的机制为促进炎症细胞因子及F4/80高表达, 加之IL-6和TGF-β水平同时升高, 使Th17/Treg平衡中以Th17免疫反应占优势。三拗汤干预后, 气管及肺组织炎症及气管痉挛病变减轻, F4/80蛋白表达减弱, TGF-β恢复到正常水平, IL-17A、IL-17F、IL-4、IL-6、IL-13 mRNA表达降低; 脾脏中Th17细胞比例降低, 且Th17/Treg比例随之降低, 提示三拗汤可通过降低模型小鼠IL-17A、IL-17F、IL-4、IL-6、IL-13等促炎因子mRNA表达, 调节F4/80、TGF-β状态, 使Th17/Treg平衡中以Treg免疫反应占优势, 从而调节Th17/Treg免疫失衡, 改善咳嗽变异性哮喘症状。

综上所述, 三拗汤可减轻咳嗽变异性哮喘小鼠呼吸急促等症状, 改善气管及肺组织炎性病理损伤及气道痉挛状态, 其作用机制与调节Th17/Treg免疫平衡及相关细胞因子有关。

参考文献:

- [1] 陈灏珠, 林果为, 王吉耀, 等. 实用内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 1200.
- [2] 袁东, 唐素萍, 陈强, 等. 中国儿童慢性咳嗽病因构成比多中心研究[J]. 中华儿科杂志, 2012, 50(2):

- 83-92.
- [3] Yu X M, Kong L J, Jiang W J, et al. Etiologies associated with chronic cough and its clinical characteristics in school-age children [J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(7): 3093-3102.
- [4] 吴艳玲, 张海邻. 儿童咳嗽变异性哮喘诊治进展 [J]. 中华儿科杂志, 2016, 54(4): 314-317.
- [5] Liu M X, Liu K X, Zhu N, et al. Inflammatory mediators in induced sputum and airway hyperresponsiveness in cough variant asthma during long-term inhaled corticosteroid treatment [J]. *Mediators Inflamm*, 2012, 2012: 403868.
- [6] 龚臣, 邓静敏. Th17/Treg 在支气管哮喘发病机制中的作用及研究进展 [J]. 中华哮喘杂志 (电子版), 2013, 7(3): 41-45.
- [7] 魏肖云, 汪受传. 汪受传教授从风论治小儿咳嗽变异性哮喘经验 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(7): 2403-2405.
- [8] 孙丽平. 王烈教授防治小儿哮喘病创新性理论体系研究 [J]. 中国中西医结合儿科学, 2009, 1(1): 61-62.
- [9] Hua S, Liu F G, Wang M M. Emodin alleviates the airway inflammation of cough variant asthma in mice by regulating the notch pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 5621-5629.
- [10] 章晶晶, 李梦雯, 范欣生, 等. 三拗汤对 OVA 诱导哮喘小鼠模型的效应及 TRPV2 表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(11): 2619-2625.
- [11] 马春华, 汪姗姗, 马世平, 等. 三拗汤对哮喘小鼠变应性气道炎症的影响及其成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19): 149-153.
- [12] 杜丽娟, 何成诗, 由凤鸣, 等. 敏咳煎对咳嗽变异性哮喘大鼠 Treg/Th17 细胞及相关细胞因子的影响 [J]. 辽宁中医药杂志, 2017, 44(3): 601-603.
- [13] Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance [J]. *Eur J Immunol*, 2010, 10(7): 1830-1835.
- [14] Vernal R, Garcia Sanz J A. Th17 and Treg cells, wonew lymphocyte subpopulation with a key role in the immune response against infection [J]. *Infect Disord Drug Targets*, 2008, 8(4): 207-220.
- [15] Halwani R, Al-Muhsen S, Al-Jahdali H, et al. Role of transforming growth factor- β in airway remodeling in asthma [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 44(2): 127-133.
- [16] Eastaff-Leung N, Mabarrack N, Barbour A, et al. Foxp3⁺ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease [J]. *J Clin Immunol*, 2010, 30(1): 80-89.
- [17] 舒皎洁, 刘思伯, 刘国梁, 等. 支气管哮喘患者外周血 Th17/Treg 及相关细胞因子的表达及临床意义 [J]. 中国当代医药, 2019, 26(8): 18-21.
- [18] Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming [J]. *Nat Rev Immunology*, 2008, 8(5): 337-348.
- [19] 张奕, 张兰英, 欧阳瑤. Th17/Treg 失衡与肺部疾病发病机制的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2017, 14(35): 20-24.
- [20] Ferraro A, Socci C, Stabilini A, et al. Expansion of Th17 cells and functional defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymphnodes in patients with type 1 diabetes [J]. *Diabetes*, 2011, 60(11): 2903-2913.
- [21] Licona-Limon P, Kim L K, Palm N W, et al. TH2, allergy and group2 innate lymphoid cells [J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(6): 536-542.
- [22] 孟庆翔, 梁勇. 变应性疾病 2型免疫反应研究进展 [J]. 国际耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2014, 38(2): 89-94.
- [23] Li L C, Tian Y, Xiao J, et al. Dexmedetomidine promotes inflammation resolving through TGF- β 1 secreted by F4/80⁺ Ly6G⁺ macrophage [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 95: 107480.