

[5] Shi L, Lei Y, Srivastava R, *et al.* Gallic acid induces apoptosis in human cervical epithelial cells containing human papillomavirus type 16 episomes[J]. *J Med Virol*, 2016, 88 (1): 127-134.

[6] de Cristo Soares Alves A, Mainardes R M, Khalil N M. Nanoencapsulation of gallic acid and evaluation of its cytotoxicity and antioxidant activity[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2015, 60(3): 213-215.

[7] 郭鑫, 李治建, 艾西木江·热甫卡提, 等. 没食子酸对小鼠白色念珠菌感染的影响[J]. *中药药理与临床*, 2014, 30(2): 34-37.

[8] 卜丽梅, 关风英, 乔萍, 等. 没食子酸对大鼠缺血再灌注损伤后细胞凋亡的保护作用及机制研究[J]. *中国实验诊断学*, 2010, 14(11): 1693-1697.

[9] 李彩娜, 沈宁, 刘率男, 等. 谷氨酸钠诱导的肥胖胰岛素抵抗小鼠血糖升高机制研究[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2010, 26(9): 799-802.

[10] 张洁, 许翠萍, 徐泽俊, 等. 不同浓度谷氨酸钠摄入对Wistar 大鼠代谢及胰岛细胞凋亡的影响[J]. *山东大学学报: 医学版*, 2013, 51(7): 25-27, 31.

[11] 刘庆芝, 许翠萍, 孙文鹏, 等. 谷氨酸钠对大鼠血清谷氨酸脱羧酶抗体水平及胰岛细胞凋亡的影响[J]. *山东医药*, 2013, 53(10): 24-25.

[12] 王兴会, 杜克莘, 冯家豪, 等. 谷氨酸钠对小鼠学习记忆功能的影响[J]. *西北药学杂志*, 2012, 27(5): 442-443.

[13] Hochberg I, Hochberg Z. Expanding the definition of hypothalamic obesity[J]. *Obes Rev*, 2010, 11(10): 709-721.

[14] 陈善, 周晓秋, 叶梁, 等. 辛伐他汀对轻中度高血压合并高血脂症患者血清炎症介质、血小板活化功能和血液流变学的影响[J]. *中华高血压杂志*, 2015, 23(5): 477-481.

比较 3 种药对慢性哮喘大鼠的抗哮喘作用

高月娟¹, 孙琳林¹, 王景欣¹, 刘金丽¹, 佟雷^{2*}
(1. 牡丹江医学院附属红旗医院, 黑龙江 牡丹江 157011; 2. 牡丹江医学院, 黑龙江 牡丹江 157011)

摘要: **目的** 研究左归丸、右归丸和玉屏风散的抗哮喘作用及其作用机制差异。**方法** 雄性 Brown Norway 大鼠随机分为 5 组, 卵清白蛋白诱导慢性哮喘模型, 给药组分别灌胃给予左归丸、右归丸、玉屏风散, 正常组和模型组给予生理盐水, 每日给药 1 次, 连续给药 14 d。测定大鼠 Penh 值, 血清辅助性 T 淋巴细胞亚群 Th1、Th2 炎症细胞因子水平及皮质酮 (CROT) 和促肾上腺皮质激素 (ACTH) 蛋白水平。处死大鼠, 取肺组织切片定量测定气道重塑病理变化。RT-PCR 法测定下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) 及肺组织 *TGF-β1*、*Smad3* mRNA 表达水平。**结果** 玉屏风散组、右归丸组 Penh 值显著低于左归丸组。玉屏风散组 Th1 因子显著高于左归丸组, Th2 因子显著低于左归丸组。右归丸组仅白细胞介素 IL-5 显著低于左归丸组。玉屏风散组血清 CROT、ACTH 蛋白及下丘脑 *CRH* mRNA 显著高于左归丸组, 右归丸组 ACTH 蛋白及 *CRH* mRNA 显著高于左归丸组。玉屏风散组肺组织转化生长因子 *TGF-β1*、*Smad3* mRNA 表达水平与左归丸组无显著差异, 右归丸组 *Smad3* mRNA 表达水平显著低于模型组。玉屏风散和左归丸对气道重塑具有显著抑制作用。右归丸杯状细胞数显著低于左归丸组。**结论** 左归丸、右归丸、玉屏风散均具有显著抗哮喘作用。玉屏风散对 Th1/Th2 平衡、下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA 轴) 及 *TGF-β1*/*Smad3* 通路的调节作用均较强; 右归丸对 *TGF-β1*/*Smad3* 通路调节作用弱于左归丸, 对 HPA 轴调节作用强于左归丸。

关键词: 左归丸; 右归丸; 玉屏风散; 哮喘; 机制

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)06-1119-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.06.003

Comparison of three herbal preparations in airway remodeling in rats with chronic asthmatic

收稿日期: 2016-09-27

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81403316); 牡丹江医学院科学技术研究项目 (ZS201527); 黑龙江省卫生和计划生育委员会科研课题 (2016-369)

作者简介: 高月娟 (1981—), 女, 硕士, 主管药师, 从事临床药学教学与科研。E-mail: gaoyuejuan-2009@163.com

*** 通信作者:** 佟雷 (1982—), 男, 硕士, 讲师, 从事药理学教学与科研。Tel: 13504536439, E-mail: tonglei5185@163.com

GAO Yue-juan¹, SUN Lin-lin¹, WANG Jing-xin¹, LIU Jin-li¹, TONG Lei^{2*}
(1. Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China; 2. Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China)

ABSTRACT: **AIM** To research the antiasthmatic effects of Zuogui Pills, Yougui Pills and Yupingfeng Powder and their mechanism of action. **METHODS** Male Brown Norway rats were randomly divided into five groups. OVA was used to induce the model of chronic asthma. Five groups of asthmatic rats were given Zuogui Pills, Yougui Pills, Yupingfeng Powder by gavage once daily for 14 d, respectively. The normal and the model group were given normal saline. Penh value, serum Th1, Th2 inflammatory cytokines, and CROT and ACTH protein levels were determined. Pathological changes of airway remodeling were measured. RT-PCR method was used to measure the expression of *CRH* mRNA in hypothalamus, and *TGF-β1* and *Smad3* mRNA in lung tissues. **RESULTS** Penh values of Yupingfeng Powder group and Yougui Pills group were significantly lower than that of Zuogui Pills group. The Th1 inflammatory cytokine of Yupingfeng Powder group was significantly higher than that of Zuogui Pills group, while the Th2 cytokine was significantly lower than that of Zuogui Pills group. In Yougui Pills group, only IL-5 was significantly lower than that of Zuogui Pills group. Serum CROT, ACTH protein and *CRH* mRNA of Yupingfeng Powder group were significantly higher than those in Zuogui Pills group. No significant difference was found between Yupingfeng Powder group and Zuogui Pills group with regard to *TGF-β1* and *Smad3* mRNA. *Smad3* mRNA of Yougui Pills group was significantly higher than that of the model group. Airway remodeling was significantly reduced by Yupingfeng Powder and Zuogui Pills. The number of goblet cells in Yougui Pills group was significantly lower than that in Zuogui Pills group. **CONCLUSION** All the three formulaes possess significant antiasthma effects. Regulation effects of Yupingfeng Powder on Th1/Th2 balance, HPA and *TGF-β1*/*Smad3* pathway are strong. Compared with Zuogui Pills, Yougui Pills possesses weaker *TGF-β1*/*Smad3* regulative effects and stronger HPA regulative effects.

KEY WORDS: Zuogui Pills; Yougui Pills; Yupingfeng Powder; asthma; mechanism

哮喘是一种以气道高反应为特征的常见呼吸系统疾病。据统计,目前全球有近 2.35 亿人患有哮喘,且发病率仍呈上升趋势^[1],在发展中国家及不发达国家其死亡率较高^[2]。传统抗炎药物(如皮质类固醇药物、白三烯受体拮抗)及支气管扩张药物(如 β2 受体激动剂)每年挽救了成千上万哮喘患者的性命,但仍有 55% 的患者哮喘控制并不理想^[3]。由于哮喘发病机制的复杂性,多靶点药物(包括复方药物)被认为是理想的研发方向之一,但鲜有多靶点的新分子实体药物和复方药物上市^[4]。

中药复方制剂按照君臣佐使的原则组方,重视整体观念,具有多靶点协同作用的特点^[5]。但关于中药复方制剂抗哮喘作用机制的研究多为单一机制的研究,难以揭示其完整的作用机制^[6]。左归丸、右归丸、玉屏风散分别是补肾阴、补肾阳及补气类典型方剂,临床均用于治疗哮喘。其中左归丸、右归丸组方相似度极高。目前关于玉屏风散及右归丸的抗哮喘作用研究较多^[7-8],而关于其作用机制的报道较少。左归丸抗哮喘作用及机制的研究

尚未见报道。左归丸+玉屏风散及右归丸+玉屏风散是我国沈自尹院士治疗哮喘的常用组方。该研究以大鼠建立慢性哮喘模型,并对左归丸、右归丸、玉屏风散的抗哮喘作用及其机制进行研究,以期为临床联合用药提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 SPF 级雄性 Brown Norway 大鼠,8~10 周龄,体质量 200~240 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[许可证号 SCXK(沪)2012-0002]。实验动物购入后检疫 1 周,饲养于 SPF 环境,12 h/12 h 明暗循环,饲喂不含卵清白蛋白(OVA)的灭菌鼠饲料(北京华阜康生物科技股份有限公司,批号 201510220921)和去离子水。实验方案经本单位实验动物伦理委员会批准,实验动物饲养及实验操作符合实验动物伦理学要求。

1.2 试剂及仪器 左归丸、右归丸、玉屏风散药材饮片购自同仁堂药店牡丹江店,本院药剂科制备,按原方用量比例水煎 2 次,药液合并浓缩至 8.5 g 生药/mL。卵清白蛋白(ovalbumin, OVA);

乙酰胆碱、戊巴比妥钠（美国 Sigma 公司）；百日咳菌苗（兰州生物制品研究所有限责任公司）；Trizol 试剂（加拿大 Invitrogen 公司）；异丙醇、乙醇（山东禹王实业有限公司化工分公司）；全身式吸入暴露箱（美国 NatureGene Corp）；NE-U17 型欧姆龙超声波喷雾器（日本 Kyoto 公司）；BUXCO 小动物肺功能无创气道机制检测系统（美国 Buxco 公司）；MICROM HM 315 病理切片机（美康仪器设备〔北京〕有限公司）；MSD[®]大鼠超灵敏试剂盒（美国 Meso Scale Discovery 公司）；大鼠 IgE ELISA 试剂盒（加拿大 GenWay Biotech 公司）；大鼠皮质酮（corticosterone, CROT）及血浆促肾上腺皮质激素（adrenocorticotrophic hormone, ACTH）ELISA 试剂盒（美国 Sigma 公司）；N-180M 双目生物显微镜（宁波永新光学股份有限公司）。

2 方法

2.1 造模及给药 将大鼠随机分为 5 组，每组 6 只，苦味酸标记编号。参考文献方法略作修改建立慢性哮喘模型^[9-10]。模型组和给药组分别于第 0、7、14 天皮下注射含 0.1 mg OVA、100 mg Al(OH)₃ 的生理盐水 200 μ L 致敏，同时腹腔注射 6×10^9 热灭活百日咳菌苗佐剂。第 21、28 天通过超声波雾化器雾化吸入 OVA 气溶胶进行激发。OVA 气溶胶混悬于生理盐水，质量浓度 10 mg/mL，气溶胶微粒直径 0.5 ~ 30 μ m，雾化器输出速度 0.2 mL/min，每次吸入 30 min。正常组以生理盐水致敏激发。

第 29 天开始，各组动物给药如下：正常组及模型组小鼠灌胃生理盐水；给药组分别灌胃左归丸、右归丸、玉屏风散水提取液，按生药计算剂量分别为 14.4、16.2、9.63 g/kg（相当于人体临床日剂量的 7.7 倍）；每日给药 1 次，连续给药 14 d。

2.2 气道反应性测定 末次给药后 24 h，参考文献方法^[11]测定气道反应性。将大鼠置于 Buxco 密封腔内 5 min，清醒状态下记录增强呼吸间歇（enhanced pause, Penh）基线值，然后雾化吸入不同剂量乙酰胆碱（40 mg/kg，雾化吸入 1 min，记录 3 min）测定 Penh 值。气道反应性以雾化吸入后 Penh 值/基线 Penh 值 $\times 100\%$ 表示。

2.3 肺组织病理学观察 末次给药后 24 h，各组大鼠腹腔注射戊巴比妥钠（80 mg/kg）麻醉处死，分离肺组织和脑组织。取右上肺叶 10% 福尔马林固定，常规切片（厚度 4 μ m），分别进行 HE 染色、PAS 染色和 Masson 染色^[12]，用于观察肺组织

炎症及气道重塑相关病理改变。切片由病理技术人员盲法阅片，观察气道杯状细胞数量、胶原沉积面积以及平滑肌和基底膜厚度。杯状细胞数量以每 500 个细胞中的杯状细胞个数表示（ $n/500$ ）。胶原沉积面积以胶原沉积面积（ μm^2 ）/气道上皮长度（ μm ）表示。平滑肌和基底膜厚度测定过程中每个气道取 5 个观察点，取平均值。其余肺组织 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.4 大鼠血液指标检测 末次给药后 24 h，大鼠麻醉处死前，参考文献方法尾静脉采血^[13]，采用试剂盒检测血清 Th1（IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ ）炎症因子、Th2 炎症因子（IL-4、IL-5、IL-13）、皮质酮（corticosterone, CROT）及促肾上腺皮质激素（adrenocorticotrophic hormone, ACTH）水平。

2.5 大鼠肺组织及下丘脑 RT-PCR 检测 取各组大鼠剩余肺组织和下丘脑组织，参考文献方法及引物^[14-15]，RT-PCR 法检测肺组织 *TGF- β 1*、*Smad3* 及下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素（corticotropin releasing hormone, *CRH*）mRNA 含有量。取 50 mg 组织样品剪碎，1 mL Trizol 试剂裂解 8 min，加入氯仿静置 10 min，异丙醇-乙醇沉淀收集 RNA，加入 DEPC 处理水，无 RNA 酶的 DNA 酶处理样品以除去污染的 DNA。cDNA 扩增引物包括：*TGF- β 1*（正向引物 5' -TGCGCCTGCAGAGATTCAAGTCAA-3'，反向引物 5' -AAAGACAGCCACTCAGGCGTATCA-3'，279 bp）、*Smad3*（正向引物 5' -TGAGCTTGAGAAAGCCATCA-3'，反向引物 5' -TGTGTCCCACTGATCTACCG-3'，216 bp）、*CRH*（正向引物 5' -GTGGCTCTGTGCGCCCTGTCT-3'，反向引物 5' -AGCAGCGGGACTTCTGTTGA-3'，277 bp）、 *β -actin*（正向引物 5' -CCTGTACGCCAACACAGTGC-3'，反向引物 5' -ATACCCTGCTTGCTGCTGATCC-3'，207 bp）。RT-PCR 共进行 40 个循环，循环条件如下：95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min，然后 95 $^\circ\text{C}$ 变性 15 s，60 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s，72 $^\circ\text{C}$ 延伸 2 min。 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法定量分析。

2.6 统计分析 数据以平均值 $\pm$ 标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，SPSS 13.0 进行统计处理。组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 视为差异显著， $P < 0.01$ 视为极差异显著。

3 结果

3.1 气道反应性测定结果 采用无创法测定各组大鼠气道反应性。由表 1 可见，模型组大鼠 Penh 值显著高于正常组（ $P < 0.01$ ）。给药组 Penh 值显

表1 各组大鼠气道 Penh 值 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab.1 Penh values of rats in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	Penh/%
正常组	1.06 ± 0.32 ^{##▲▲}
模型组	2.54 ± 0.79 ^{**▲}
左归丸组	1.73 ± 0.60 ^{**#}
右归丸组	1.55 ± 0.14 ^{***#▲}
玉屏风散组	1.28 ± 0.21 ^{***#▲▲}

注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，[#] $P < 0.05$ ，^{##} $P < 0.01$ ；与左归丸组比较，[▲] $P < 0.05$ ，^{▲▲} $P < 0.01$

著低于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其中玉屏风散组 ($P < 0.01$) 和右归丸组 ($P < 0.05$) 显著低于左归丸组。

3.2 肺组织病理学观察结果 各组大鼠肺组织病

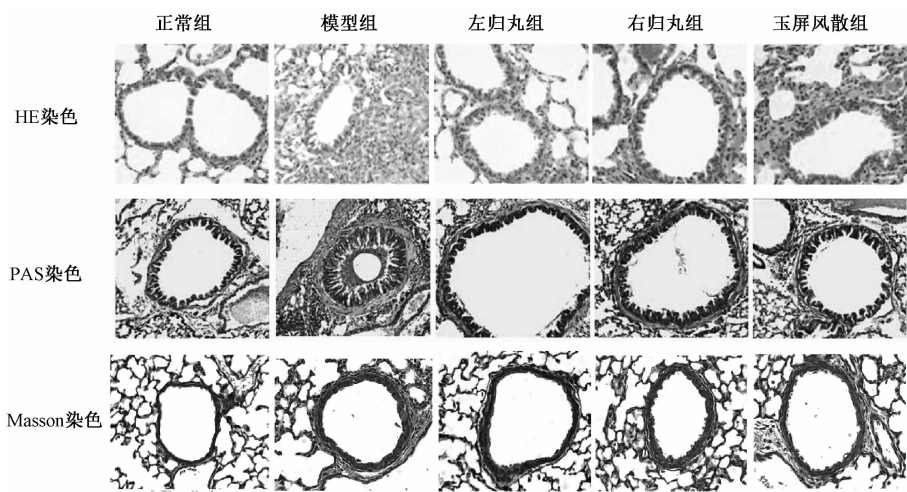


图1 各组大鼠肺组织病理图片 (×200)

Fig.1 Histological images of lung tissues of rats in different groups (×200)

表2 各组大鼠气道显微结构数据 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab.2 Airway microstructure data of rats in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	平滑肌厚度/ μm	基底膜厚度/ μm	胶原沉积面积/ $(\mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-1})$	杯状细胞数/ $(\times 500^{-1})$
正常组	3.17 ± 0.64 ^{##▲▲}	0.77 ± 0.21 ^{##▲▲}	0.46 ± 0.13 ^{##▲▲}	1.03 ± 0.29 ^{##▲▲}
模型组	9.61 ± 2.13 ^{**▲▲}	2.28 ± 0.39 ^{**▲▲}	1.15 ± 0.22 ^{**▲▲}	19.14 ± 4.08 ^{**▲▲}
左归丸组	6.15 ± 0.37 ^{***#}	1.45 ± 0.29 ^{***#}	0.76 ± 0.17 ^{***#}	9.12 ± 0.48 ^{***#}
右归丸组	8.22 ± 0.59 ^{***#▲}	1.74 ± 0.32 ^{***#▲}	1.09 ± 0.24 ^{**▲}	7.01 ± 0.53 ^{***#▲}
玉屏风散组	4.28 ± 0.41 ^{***#▲▲}	1.20 ± 0.13 ^{***#▲}	0.50 ± 0.02 ^{##▲}	3.94 ± 0.81 ^{***#▲▲}

注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，[#] $P < 0.05$ ，^{##} $P < 0.01$ ；与左归丸组比较，[▲] $P < 0.05$ ，^{▲▲} $P < 0.01$

3.3 血清炎症细胞因子测定结果 各组大鼠血清 Th1、Th2 炎症细胞因子的水平，结果见表3。模型组大鼠血清 Th1 炎症细胞因子显著低于正常组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，Th2 炎症细胞因子显著高于正常组 ($P < 0.01$)；玉屏风散组大鼠血清 Th1 炎症细胞因子显著高于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，血清 Th2 炎症细胞因子显著低于模型组 ($P < 0.01$)；左归丸、右归丸组 IL-1 β 与模型组无显著差异，右归丸组 IL-5 显著低于左归丸组 ($P < 0.05$)，2 组其他炎症细胞因子水平无显著差异 ($P > 0.05$)。

3.4 血清 CROT、ACTH 水平及下丘脑 CRH mRNA 测定结果 采用 ELISA 试剂盒测定大鼠 CROT、ACTH 水平，采用 RT-PCR 测定大鼠下丘脑 CRH mRNA 表达水平。模型组 CROT、ACTH 水平和

表3 各组大鼠血清炎症细胞因子蛋白水平 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab. 3 Serum protein levels of inflammatory cytokines of different groups ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Th1 炎症细胞因子/(pg·mL ⁻¹)			Th2 炎症细胞因子/(pg·mL ⁻¹)		
	IL-1β	TNF-α	IFN-γ	IL-4	IL-5	IL-13
正常组	81.7 ± 9.3 ^{#▲}	53.0 ± 6.8 ^{##▲▲}	22.8 ± 3.2 ^{##▲▲}	1.2 ± 0.3 ^{##▲▲}	50.1 ± 7.5 ^{##▲▲}	0.7 ± 0.1 ^{##▲▲}
模型组	69.1 ± 7.6 [*]	16.6 ± 3.2 ^{**▲}	4.1 ± 1.2 ^{**▲}	7.5 ± 1.4 ^{**▲▲}	215.7 ± 18.7 ^{**▲▲}	4.5 ± 0.5 ^{**▲}
左归丸组	72.9 ± 10.2 [*]	22.7 ± 1.9 ^{**#}	8.6 ± 1.7 ^{**#}	4.5 ± 0.8 ^{**##}	171.5 ± 10.1 ^{**##}	3.4 ± 0.6 ^{**#}
右归丸组	73.5 ± 9.1 [*]	25.4 ± 2.8 ^{**#}	9.3 ± 2.3 ^{**#}	4.1 ± 0.5 ^{**##}	143.6 ± 12.8 ^{**##▲}	3.2 ± 0.4 ^{**#}
玉屏风散组	77.1 ± 10.8 ^{*#}	37.2 ± 4.6 ^{**##▲▲}	16.4 ± 2.0 ^{*##▲▲}	2.7 ± 0.2 ^{*##▲}	114.9 ± 15.2 ^{**##▲▲}	1.8 ± 0.4 ^{*##▲▲}

注：与正常组比较，**P* < 0.05，***P* < 0.01；与模型组比较，[#]*P* < 0.05，^{##}*P* < 0.01；与左归丸组比较，[▲]*P* < 0.05，^{▲▲}*P* < 0.01

CRH mRNA 显著低于正常组 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)；玉屏风散组 *CROT*、*ACTH* 水平和 *CRH* mRNA 显著高于模型组 (*P* < 0.01) 和左归丸组 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)，与正常组无显著差异 (*P* > 0.05)。左归丸组 *CROT* 水平和 *CRH* mRNA 显著高于模型组 (*P* < 0.05)，右归丸组 *ACTH* 水平和 *CRH* mRNA 显著高于左归丸组 (*P* < 0.05)。结果见表4。

表4 大鼠血清 CROT、ACTH 水平及下丘脑 CRH mRNA 水平 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab. 4 Serum protein levels of CROT、ACTH and hypothalamus CRH mRNA of rats in different groups ($\bar{x} \pm s, n=6$)

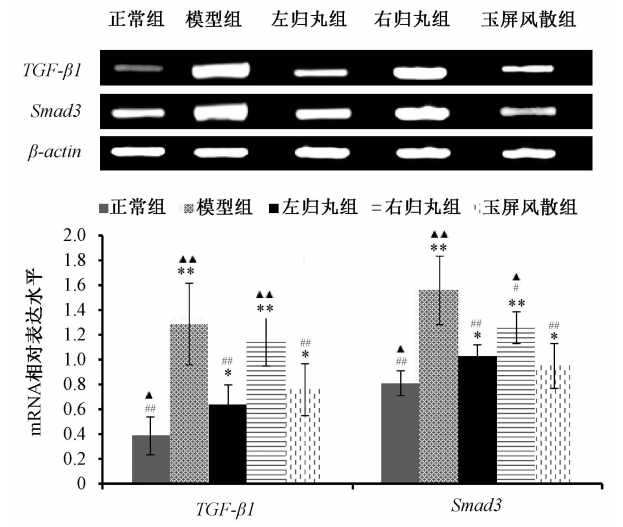
组别	CRH/ β-actin	CROT/ (μg·mL ⁻¹)	ACTH/ (pg·μL ⁻¹)
正常组	4.46 ± 0.53 ^{##▲▲}	1.72 ± 0.26 ^{##▲▲}	3.19 ± 0.44 ^{##▲▲}
模型组	1.99 ± 0.11 ^{**}	1.04 ± 0.19 ^{**▲}	2.06 ± 0.29 ^{**}
左归丸组	2.51 ± 0.40 ^{**#}	1.55 ± 0.23 ^{*#}	2.15 ± 0.16 ^{**}
右归丸组	3.37 ± 0.41 ^{*##▲}	1.62 ± 0.16 ^{##}	2.47 ± 0.20 ^{*#▲}
玉屏风散组	3.92 ± 0.32 ^{##▲▲}	1.97 ± 0.29 ^{##▲▲}	3.25 ± 0.27 ^{##▲▲}

注：与正常组比较，**P* < 0.05，***P* < 0.01；与模型组比较，[#]*P* < 0.05，^{##}*P* < 0.01；与左归丸组比较，[▲]*P* < 0.05，^{▲▲}*P* < 0.01

3.5 肺组织 *TGF-β1*、*Smad3* mRNA 的表达 RT-PCR 测定大鼠肺组织 *TGF-β1* 和 *Smad3* mRNA 表达水平，结果见图2。模型组大鼠肺组织 *TGF-β1* 和 *Smad3* mRNA 表达水平显著高于正常组 (*P* < 0.01)，左归丸组和玉屏风散组 *TGF-β1* 和 *Smad3* mRNA 显著低于模型组 (*P* < 0.01)，右归丸组 *Smad3* mRNA 显著低于模型组 (*P* < 0.05)，显著高于左归丸组 (*P* < 0.05)。

4 讨论及结论

气道高反应、慢性炎症、气道重塑是哮喘的典型特征。其中，气道重塑主要表现为气道平滑肌和基底膜增厚、胶原沉淀以及杯状细胞增多^[16]。近年研究显示，Th1/Th2 失衡、HPA 轴抑制以及 *TGF-β1*/*Smad3* 通路均参与了哮喘的发生和发展^[14-15,17]。哮喘患者 HPA 轴抑制被人为是导致 Th1/Th2 失衡的原因之一^[18]。也有报道显示在慢



注：与正常组比较，**P* < 0.05，***P* < 0.01；与模型组比较，[#]*P* < 0.05，^{##}*P* < 0.01；与左归丸组比较，[▲]*P* < 0.05，^{▲▲}*P* < 0.01

图2 各组大鼠肺组织 *TGF-β1*、*Smad3* mRNA 表达水平
Fig. 2 Expression levels of *TGF-β1* and *Smad3* mRNA in lung tissues of rats in different groups

性炎症状态下，促炎症因子首先会增强 HPA 轴功能，随着炎症的延长，才会对 HPA 轴功能产生抑制，进而减少促肾上腺皮质激素和糖皮质激素水平^[19]。而 *TGF-β1*/*Smad* 信号通路是气道重塑的重要机制之一，同时 *TGF-β1* 也对 Th1/Th2 失衡和炎症的发生发展具有调节作用^[20-21]。可见 3 种机制在哮喘发生发展中存在复杂的相互关系。

该研究以气道反应性和气道重塑病理改变为指标评价了左归丸（补肾阴方）、右归丸（补肾阳方）、玉屏风散（补气方）对哮喘的治疗效果。其中左归丸和右归丸均含同等比例的山药、山茱萸、枸杞子、菟丝子和鹿角胶，二者组方存在相似性。因此，研究中，2 种组方的剂量以山药、山茱萸、枸杞子、菟丝子和鹿角胶为基准进行了标准化。而玉屏风散与左归丸、右归丸不存在相同的药材，因此以临床剂量的同等倍数与左归丸、右归丸进行对比研究。另外，由于气道反应性测试中有创测定方

法中机械通气对肺组织 TGF- β 1/Smad 信号通路存在影响,因此选用了无创测定方法^[22]。由表 1、图 1 和表 2 可见,3 种组方均可降低模型大鼠的气道高反应,抑制气道重塑。其中玉屏风散对气道反应性和气道重塑的抑制作用最强,右归丸对气道高反应的抑制作用高于左归丸,但对气道平滑肌厚度、基底膜厚度、胶原沉积面积的改善作用低于左归丸。提示三者对哮喘的抑制作用和作用机制可能存在差异。

实验进一步对比了 3 种组方对 Th1/Th2 平衡、HPA 轴及 TGF- β 1/Smad3 通路的影响,以比较三者的抗哮喘作用机制差异,初步探究左归丸 + 玉屏风散(适于肾阴虚哮喘患者)、右归丸 + 玉屏风散(适于肾阳虚哮喘患者)联合用药的分子机理。造模后模型组出现 HPA 轴抑制和 TGF- β 1、Smad3 mRNA 表达水平降低,与文献报道一致^[20,23]。OVA 激发后,大鼠 Th1 炎症细胞因子显著降低, Th2 炎症细胞因子显著升高,出现 Th1/ Th2 失衡,与文献报道结果一致^[17]。

由表 3 ~ 4 及图 2 可见,玉屏风散对 Th1/Th2 平衡、HPA 轴及 TGF- β 1/Smad3 通路均具有调节作用,其中对 Th1/Th2 平衡、HPA 轴的调节作用均高于左归丸和右归丸,对 TGF- β 1/Smad3 通路的调节作用与左归丸无显著差异。其中玉屏风散对 HPA 轴的调节作用与文献报道结果一致^[24]。已有研究显示,黄芪具有广泛的药理作用,对过敏性疾病 TGF- β 1/Smad3 通路具有调节作用^[20,25],因此推测玉屏风散中对 TGF- β 1/Smad3 的调节作用可能与方中的黄芪有关。

对比左归丸和右归丸对 Th1/Th2 平衡、HPA 轴及 TGF- β 1/Smad3 通路的影响可见,左归丸对 HPA 轴的调节作用显著低于右归丸,对 Th2 炎症细胞因子中 IL-5 的下调作用显著低于右归丸。但右归丸对 TGF- β 1/Smad3 通路无显著调节作用,该组大鼠 TGF- β 1、Smad3 mRNA 水平显著高于左归丸组。已有文献报道,左归丸对 TGF- β 1 具有下调作用,与本研究结果相符^[26]。

中医理论认为,哮喘是由气机不畅所致,属于本虚标实之证,常用宣畅肺气、补肾纳气等方法进行治疗。肾虚即是哮喘的发病基础,也是哮喘久病不愈的转归。OVA 激发建立的哮喘大鼠存在 HPA 轴抑制现象,其行为学表现符合中医肾阳虚证的特征^[23]。而现代中医研究也认为肾阳虚是哮喘最根本的发病机制^[27]。因此右归丸对 HPA 轴的调节作

用高于左归丸符合中医学理论。但左归丸作为补肾阴药物,对 HPA 轴也具有显著调节作用^[28],其原因尚不清楚。从中医理论角度分析可能与阴阳互根及左归丸组方的“阴中求阳”特征有关^[28-29]。从组方构成推测,二者组方中均含有同等比例的 6 味药材,可能是其具有相似 HPA 轴调节作用的原因,但仍需进一步的拆方研究进行对比分析。

综上所述,玉屏风散抗哮喘作用较强,且对 Th1/Th2 平衡、HPA 轴及 TGF- β 1/Smad3 通路均具有调节作用,而左归丸和右归丸在 HPA 轴调节作用及 TGF- β 1/Smad3 通路调节作用方面存在显著差异。

参考文献:

- [1] Adeloye D, Chan K Y, Rudan I, *et al.* An estimate of asthma prevalence in Africa: a systematic analysis[J]. *Croat Med J*, 2013, 54(6): 519-531.
- [2] Elfatah W A A. The effectiveness of self-control and anxiety management training to reduce anxiety and improve health-related quality of life in children with asthma[J]. *IJHSS*, 2015, 10(1): 61-68.
- [3] Mitchell P D, El-Gammal A I, O'Byrne P M. Emerging monoclonal antibodies as targeted innovative therapeutic approaches to asthma[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2016, 99(1): 38-48.
- [4] Pera T, Penn R B. Bronchoprotection and bronchorelaxation in asthma: New targets, and new ways to target the old ones[J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 164: 82-96.
- [5] 杨义芳, 萧 伟. 基于多成分多靶点的中药药动/药效相关性研究解读与策略[J]. *中草药*, 2013, 44(12): 1521-1528.
- [6] 王化龙, 李振虎, 徐砚通. 中药治疗过敏性疾病的药理作用研究进展[J]. *中草药*, 2015, 46(10): 1542-1555.
- [7] 黄秀君. 玉屏风散辅助治疗小儿咳嗽变异性哮喘临床观察[J]. *新中医*, 2015, 47(10): 141-143.
- [8] 杨倩娥. 右归丸加减治疗老年寒性哮喘临床观察[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2016, 16(32): 153-156.
- [9] Tsuchiya K, Isogai S, Tamaoka M, *et al.* Depletion of CD8⁺ T cells enhances airway remodelling in a rodent model of asthma[J]. *Immunology*, 2009, 126(1): 45-54.
- [10] Camateros P, Tamaoka M, Hassan M, *et al.* Chronic asthma-induced airway remodeling is prevented by toll-like receptor-7/8 ligand S28463[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 175(12): 1241-1249.
- [11] Verheijden K A, Henricks P A, Redegeld F A, *et al.* Measurement of airway function using invasive and non-invasive methods in mild and severe models for allergic airway inflammation in mice[J]. *Front Pharmacol*, 2014, 5(1): 190.
- [12] Wei M, Chu X, Guan M, *et al.* Protocatechuic acid suppresses ovalbumin-induced airway inflammation in a mouse allergic asthma model[J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 15(4):

780-788.

[13] 陆晓华, 徐 蕾, 王国光, 等. 一种新的非麻醉实验大鼠尾静脉采血方法的建立[J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26(3): 195-196.

[14] El-Merhibi A, Lymn K, Kanter I, *et al.* Early oral ovalbumin exposure during maternal milk feeding prevents spontaneous allergic sensitization in allergy-prone rat pups[J]. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012(1): 109-112.

[15] Cai C, Zhang H Y, Le J J, *et al.* Inflammatory airway features and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in asthmatic rats combined with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123(13): 1720-1726.

[16] Bottoms S E, Howell J E, Reinhardt A K, *et al.* TGF- β isoform specific regulation of airway inflammation and remodelling in a murine model of asthma[J]. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9674.

[17] Guo H W, Yun C X, Hou G H, *et al.* Mangiferin attenuates TH1/TH2 cytokine imbalance in an ovalbumin-induced asthmatic mouse model[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100394.

[18] Priftis K N, Papadimitriou A, Nicolaidou P, *et al.* The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in asthmatic children[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2008, 19(1): 32-38.

[19] Segerstrom S C, Miller G E. Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry [J]. *Psychol Bull*, 2004, 130(4): 601-630.

[20] 赵欣欣, 万力生, 李佳曦, 等. 基于 TGF- β 1/Smads 信号通路中医药防治哮喘气道重塑研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016(1): 160-163.

[21] Wan Y Y, Flavell Richard A. ‘Yin-Yang’ functions of TGF- β and Tregs in immune regulation[J]. *Immunol Rev*, 2007, 220: 199-213.

[22] 郭永清, 张玮玮, 郑李娜, 等. 机械通气对大鼠肺组织 TGF- β /Smad 信号通路相关蛋白的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2015, 14(6): 433-435.

[23] 李 耿, 张 喆, 尹西拳, 等. 地黄丸类方对肾虚大鼠 HPA 轴的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(3): 320-324.

[24] 王慧珠, 洪 敏, 桂黎黎, 等. 玉屏风散抗 OVA 致小鼠过敏性哮喘的作用研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(7): 1052-1055.

[25] Zhao, Wang L, Cao A, *et al.* HuangQi Decoction ameliorates renal fibrosis via TGF- β /Smad signaling pathway *in vivo* and *in vitro*[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38: 1761-1774.

[26] Li H M, Gao X, Yan M L, *et al.* Effects of Zuogui Wan on neurocyte apoptosis and down-regulation of TGF- β 1 expression in nuclei of arcuate hypothalamus of monosodium glutamate -liver regeneration rat[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(19): 2823-2826.

[27] 柯新桥, 范 鹏, 朱焱林, 等. 支气管哮喘从肾虚辨论 [J]. 新中医, 2008, 40(4): 3-4.

[28] 龚张斌, 姚建平, 金国琴. 补肾方药对老年大鼠下丘脑-垂体-肾上腺皮质所属组织结构形态变化的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2006, 33(1): 103-104.

[29] 高 洁, 李政木, 黎同明, 等. 从拆方肾气丸对肾虚模型大鼠 HPA 轴的影响初探“阴中求阳”配伍机理[J]. 四川中医, 2007, 25(7): 15-17.