

## 化痰活血方对哮喘小鼠 IL-17A 和 IL-13 的影响

何丽霞<sup>1</sup>, 吴赛春<sup>1</sup>, 李秀存<sup>1</sup>, 涂苑青<sup>1</sup>, 曾静<sup>1</sup>, 李满萍<sup>1</sup>, 杨丽<sup>1</sup>, 童晓云<sup>2</sup>, 黄丰<sup>3\*</sup>

(1. 暨南大学药学院, 广东 广州 510632; 2. 云南中医学院第一附属医院, 云南 昆明 650021; 3. 云南中医学院药学院, 云南 昆明 650500)

**摘要:** 目的 研究化痰活血方(川芎、当归、白芍等)对哮喘小鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞介素 IL-17A、IL-13 和肺组织血管内皮生长因子-2(VEGFR2)表达的影响。方法 小鼠用卵清蛋白(OVA)腹腔注射致敏,并予2% OVA 雾化吸入激发的方式建立哮喘小鼠模型,HE 染色观察肺组织病理炎症,PAS 染色观察肺组织杯状细胞增生情况,酶联免疫法(ELISA)测定 BALF 中细胞因子 IL-17A 和 IL-13 的量,免疫印迹法(Western blot)测定蛋白 VEGFR2 在肺组织中的表达。结果 哮喘组肺部的炎症评分、杯状细胞增生、BALF 中 IL-17A 和 IL-13 与蛋白 VEGFR2 的量均明显高于正常组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与哮喘组比较,化痰活血方组小鼠肺组织病理炎症和杯状细胞增生均减轻,BALF 中 IL-17A 和 IL-13 的量降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),而肺组织中蛋白 VEGFR2 的表达无明显变化( $P > 0.05$ )。结论 化痰活血方可能通过调节 IL-17A 和 IL-13 途径来缓解哮喘小鼠症状。

**关键词:** 化痰活血方; 哮喘; IL-17A; IL-13; 支气管肺泡灌洗液(BALF); 卵清蛋白(OVA)

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)03-0490-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.03.004

## Effects of Huatan Huoxue Decoction on IL-17A and IL-13 in asthmatic mice

HE Li-xia<sup>1</sup>, WU Sai-chun<sup>1</sup>, LI Xiu-cun<sup>1</sup>, TU Yuan-qing<sup>1</sup>, ZENG Jing<sup>1</sup>, LI Man-ping<sup>1</sup>, YANG Li<sup>1</sup>, TONG Xiao-yun<sup>2</sup>, HUANG Feng<sup>3\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. First Affiliated Hospital of Yunnan College of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650021, China; 3. School of Pharmacy, Yunan College of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

**ABSTRACT: AIM** To study the effects of Huatan Huoxue Decoction (*Chuanxiong Rhizoma*, *Angelicae sinensis Radix*, *Paeoniae Radix alba*, etc.) on IL-17A and IL-13 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and the expression of VEGFR2 in lung tissues of asthmatic mice. **METHODS** The asthmatic model of mice was established by the intraperitoneal injection of OVA followed by atomization inhalation of 2% OVA. The degree of inflammation in lung tissue was evaluated by HE and PAS staining, IL-17A and IL-13 were detected by ELISA, and the expression of protein VEGFR2 in lung tissue was measured by Western blot. **RESULTS** Compared with the control group, the score of inflammation, goblet cell hyperplasia, IL-17A and IL-13 in bronchoalveolar lavage fluid and the expression of protein VEGFR2 in the lung tissue of asthma group were significantly higher ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). In the Huatan Huoxue Decoction treatment group, the inflammation in lung tissue and goblet cells hyperplasia were alleviated, and the levels of IL-17A and IL-13 in BALF were decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). However, the expression of protein VEGFR2 showed no obvious change in lung tissue as compared with that in the asthma group ( $P > 0.05$ ). **CONCLUSION** Huatan Huoxue Decoction has certain therapeutic effect on asthmatic mice, which may be through adjusting the pathways of IL-17A and IL-13.

收稿日期: 2015-05-11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81073129, 81560681)

作者简介: 何丽霞(1989—),女,硕士生,从事中药药理研究工作。Tel: 15521371153, E-mail: helixiaok@sina.com

\* 通信作者: 黄丰(1971—),男,博士,副教授,从事中药药理研究工作。Tel: (0871) 65918230, E-mail: 980964462@qq.com

**KEY WORDS:** Huatan Huoxue Decoction; asthma; IL-17A; IL-13; bronchoalveolar lavage fluid (BALF); ovalbumin (OVA)

支气管哮喘是一种复杂的慢性气道炎症疾病,特点主要有气道阻塞、气道炎症细胞浸润和气道高反应性等。研究资料表明,支气管哮喘患者 BALF 中 IL-17 和哮喘小鼠 BALF 中 IL-13 含有量均显著升高<sup>[1-2]</sup>。本课题组前期初步发现,化痰活血方对哮喘小鼠的治疗作用可能与调节其辅助性 T 细胞 Th1/Th2 的失衡有关。文献研究报道,哮喘的发病除与 Th1/Th2 失衡相关外, Foxp3<sup>+</sup> Treg/Th17 失衡在哮喘病程中也发挥着重要作用<sup>[3]</sup>。鉴于此,为了进一步研究化痰活血方治疗作用可能存在的机制,本实验测定哮喘小鼠 BALF 中 IL-17A、IL-13 含有量及肺组织中相关蛋白 VEGFR2 表达的变化。

## 1 材料和方法

1.1 动物 雌性 Balb/c 小鼠,体质量 18~22 g,广东省医学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(粤)2008-0002。

1.2 药物和试剂 化痰活血方由川芎、当归、白芍、桃仁、红花、熟地黄、(白)芥子、苏子、莱菔子组成,购于广州林和药业连锁有限公司祥安药店,并由其代煎浓缩成每 1 mL 含生药 3 g,置 4℃ 冰箱储存备用。醋酸地塞米松片购于浙江仙琚制药股份有限公司。OVA(Ⅱ级)购于美国 Sigma 公司;小鼠 IL-17A ELISA 试剂盒购于联科生物技术有限公司;小鼠 IL-13 ELISA 试剂盒和 GADPH 抗体购于武汉博士德生物工程有限公司;VEGFR2 抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司。

## 2 方法

2.1 动物分组及模型复制 Balb/c 小鼠 48 只,随机分为 6 组,即正常组,模型组,阳性药物(地塞米松)组,化痰活血方低、中、高剂量组,每组 8 只。造模参考文献<sup>[4-5]</sup>,除正常组外,实验第 1、8、15 天给其余各组每只小鼠分别腹腔注射由 0.2 mg OVA 和 1 mg 氢氧化铝粉末制成的混悬液 0.2 mL,第 21 天将小鼠分别放于密闭容器内,予 2% OVA 超声雾化吸入激发,30 min/次,1 次/d,连续雾化 7 d。正常组小鼠腹腔注射和雾化等剂量的生理盐水;阳性药物组、化痰活血方组、中、高剂量组于实验第 9~27 天,分别灌胃 0.001 g/kg 地塞米松和 7.5、15、30 g/kg 化痰活血方,在雾化阶段于激发前 1 h 灌胃给药,共 19 d;于相同时间,正常组和模型组均胃饲生理盐水。初步判断哮

喘模型造模成功的标准为激发时,小鼠出现点头呼吸、呛咳、抓耳挠腮、俯卧少动、腹部节律性收缩等呼吸困难症状。

2.2 标本及病理切片制备 末次激发 24 h 后腹腔注射 10% 水合氯醛(3.5 mL/kg)麻醉小鼠,开胸、暴露双肺,用动脉夹关闭右主支气管,气管插管并固定,用 1 mL 注射器取 0.3 mL 生理盐水,慢慢注入左肺,反复抽吸 3 遍,吸出生理盐水于 EP 管中。重复上述步骤 2 次,共得 BALF 约 0.4 mL,混匀,800 × g、4℃ 离心 15 min,上清液分装于 EP 管中,置 -80℃ 冰箱保存,用于细胞因子 IL-17A、IL-13 含有量的测定。

灌洗左肺完毕后,取右肺中叶,磷酸缓冲液冲洗,滤纸吸干后置 10% 中性福尔马林固定液中固定,制成厚 5 μm 的石蜡切片,分别进行 HE 和气道阿尔辛蓝-过碘酸雪夫氏(AB-PAS)染色,观察肺组织病理学变化和肺气道上皮杯状细胞增生情况,剩下右肺 -80℃ 冰箱保存,用于蛋白 VEGFR2 表达的测定。

参考文献<sup>[6]</sup>,对哮喘小鼠 HE 染色中的肺间质、血管周围和细小气管周围炎症进行评分和半定量分析。AB-PAS 染色步骤及判断标准参考文献<sup>[7-8]</sup>,并做相应调整。切片常规脱蜡,高碘酸氧化 10 min,蒸馏水浸洗;Schiff 氏液作用 10~20 min,偏重亚硫酸钠作用 1 min,共 2 次;苏木精染色 30~60 s;饱和 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 作用 2 min,使其返蓝;流水冲洗后常规乙醇脱水,二甲苯透明;中性树胶封固后 LEICA-DMRA2 显微镜采集每组切片,并用 Image-pro plus 软件测定阳性面积。结果,酸性黏液物质或细胞呈蓝色,中性黏液物质或细胞呈红色,混合黏液物质或细胞呈紫红色。

2.3 BALF 中 IL-17A、IL-13 含有量的检测 按照试剂盒说明书操作,酶标仪波长 450 nm 处读取各孔吸光度(A)值,以标准品 A 值为纵坐标,质量浓度为横坐标作标准曲线,由回归方程可得样品 IL-17A、IL-13 的含有量。

2.4 肺组织蛋白 VEGFR2 表达的检测 肺组织称重 100 mg,加 1 mL RIPA 裂解液,冰上制成匀浆,10 000 × g、4℃ 离心 10 min,取上清液测蛋白浓度,制样。各组小鼠肺组织以 GADPH 为内参,分别取等量样品 40 μg 进行电泳,然后转至聚偏氟乙

烯 (PVDF) 膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 4 ℃ 一抗 VEGFR2 (1 : 1 000)、GADPH 抗体 (1 : 2 000) 孵育过夜, TBST 洗脱, 二抗 (1 : 2 000) 室温孵育 2 h, 加 ECL 发光液后暗室曝光、显影。

2.5 统计分析 所有结果均以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 根据方差齐性检验, 采用相应的单因素方差分析。本实验数据采用 Bonferroni's 分析法,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

3.1 小鼠激发后行为学变化 雾化激发前各组小鼠状态良好。雾化吸入 OVA 后, 模型组小鼠出现头、鼻部瘙痒, 呼吸急促, 毛发竖起, 活动量减少等表现, 多次激发后, 小鼠出现体质量下降, 毛发杂乱无光泽等症状; 正常组小鼠无上述变化; 化痰活血方和地塞米松组小鼠上述哮喘症状均减轻。

3.2 肺组织病理学改变 HE 染色病理图片和病理评分结果显示, 正常组小鼠气道上皮平整, 血管周围有少量的炎性细胞浸润 (图 1A); 模型组小鼠血管周围和细小气管周围有大量的炎性细胞浸润, 管壁增厚和上皮增生 (图 1B), 病理评分显著增高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 化痰活血方高、中剂量组和地塞米松组小鼠肺组织炎性浸润明显减轻 (图 1C ~ F), 且病理评分结果显著降低 ( $P <$

0.05,  $P < 0.01$ ), 见表 1。

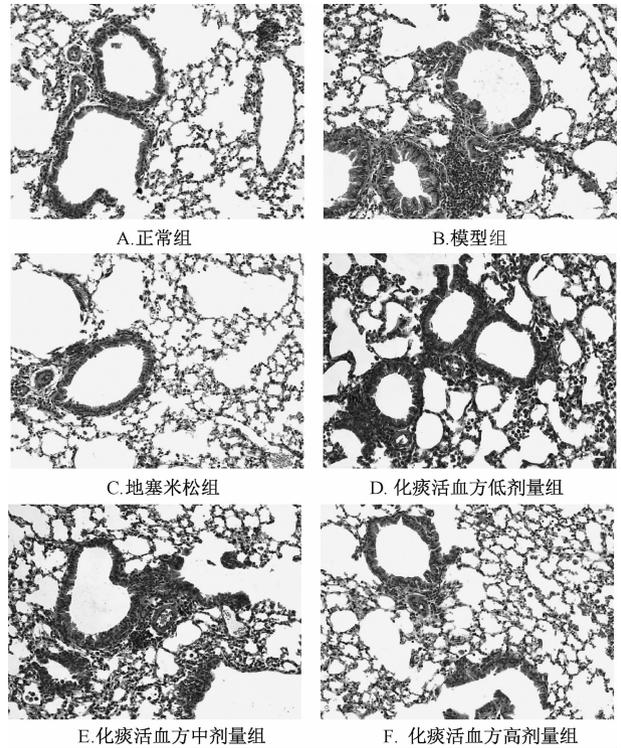


图 1 化痰活血方对哮喘小鼠肺组织病理学改变的影响 ( $\times 200$ )

Fig. 1 Effect of Huatan Huoxue Decoction on change of pathology of lung tissue in asthmatic mice ( $\times 200$ )

表 1 化痰活血方对哮喘小鼠肺组织炎症评分的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

Tab. 1 Effect of Huatan Huoxue Decoction on the score of inflammation in lung tissue of asthmatic mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	肺间质炎症	血管周围炎症	细小气管周围炎症	总分
正常组	-	0.13 ± 0.35	0.38 ± 0.52	0.25 ± 0.46	0.75 ± 0.71
模型组	-	1.38 ± 0.74 <sup>###</sup>	2.13 ± 0.83 <sup>##</sup>	1.50 ± 0.53 <sup>###</sup>	4.63 ± 1.30 <sup>##</sup>
地塞米松组	0.001	0.63 ± 0.52	0.50 ± 0.53 <sup>**</sup>	0.25 ± 0.46 <sup>**</sup>	1.25 ± 0.46 <sup>**</sup>
化痰活血方低剂量组	7.5	1.13 ± 0.64 <sup>#</sup>	1.50 ± 0.53 <sup>#</sup>	1.00 ± 0.76	4.13 ± 0.83 <sup>##</sup>
化痰活血方中剂量组	15	0.88 ± 0.64	1.13 ± 0.83 <sup>*</sup>	0.63 ± 0.52 <sup>*</sup>	2.63 ± 0.92 <sup>###</sup>
化痰活血方高剂量组	30	0.63 ± 0.52	0.63 ± 0.52 <sup>*</sup>	0.50 ± 0.53 <sup>**</sup>	1.75 ± 0.71 <sup>###</sup>

注: 与正常组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

3.3 气道上皮杯状细胞增生 AB-PAS 染色显示, 正常组小鼠无杯状细胞增生 (图 2A)。与正常组小鼠比较, 模型组小鼠气道上皮出现大量杯状细胞增生 (图 2B), 且阳性面积明显高于正常组 ( $P < 0.01$ ); 化痰活血方和地塞米松组小鼠气道杯状细胞增生均减轻 (图 2C ~ F), 与模型组比较, 其阳性面积均显著降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见表 2。

3.4 BALF 中细胞因子 IL-17A 与 IL-13 含有量的变化 ELISA 结果显示, 哮喘组小鼠 BALF 中 IL-

17A、IL-13 的含有量均明显高于正常组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 化痰活血方和地塞米松组小鼠 BALF 中 IL-17A、IL-13 的含有量均低于模型组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表 3。

3.5 肺组织蛋白 VEGFR2 表达的变化 由 Western blot 结果可知, 正常组小鼠肺组织 VEGFR2 有少量表达, 哮喘组小鼠肺组织 VEGFR2 的表达较正常组明显增加; 地塞米松组小鼠肺组织 VEGFR2 的表达明显低于哮喘组; 化痰活血方组小鼠肺组织

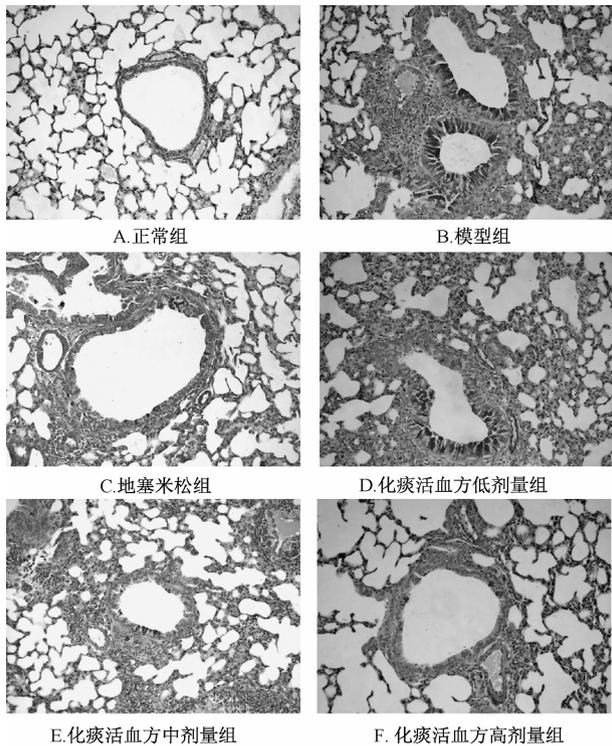


图2 化痰活血方对哮喘小鼠气道杯状细胞增生的影响 (×200)

Fig. 2 Effect of Huatan Huoxue Decoction on hyperplasia of airway goblet cells in asthmatic mice (×200)

VEGFR2 的表达与模型组无明显差异 (图3)。

表2 化痰活血方对哮喘小鼠气道杯状细胞增生阳性面积表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab. 2 Effect of Huatan Huoxue Decoction on positive area expression of hyperplasia of airway goblet cells in asthmatic mice ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	阳性面积/%
正常组	-	1.06 ± 0.17
模型组	-	14.61 ± 2.52 <sup>##</sup>
地塞米松组	0.001	2.81 ± 0.65 <sup>**</sup>
化痰活血方低剂量组	7.5	7.42 ± 2.36 <sup>##**</sup>
化痰活血方中剂量组	15	4.96 ± 0.99 <sup>##**</sup>
化痰活血方高剂量组	30	2.69 ± 0.75 <sup>**</sup>

注: 与正常组比较, <sup>#</sup>*P* < 0.05, <sup>##</sup>*P* < 0.01; 与模型组比较, <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01

#### 4 讨论

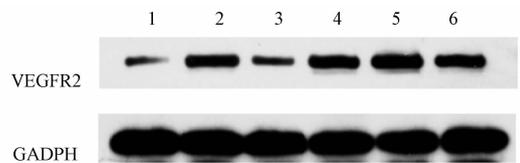
支气管哮喘是以炎性细胞浸润、Th2 细胞群异常活化和气道重塑为特征的慢性气道炎症疾病。IL-17 由 Th17 细胞产生, 与哮喘气道炎症、气道高反应、气道重塑等密切相关。IL-17 可增强 Th2 介导的气道炎症, 并可加速嗜中性粒细胞聚集在气道诱导并激发嗜中性粒细胞慢性炎症。在气道中,

表3 化痰活血方对哮喘小鼠 BALF 中 IL-17A 和 IL-13 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab. 3 Effect of Huatan Huoxue Decoction on IL-17A and IL-13 contents in BALF of asthmatic mice ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	IL-17A/(ng·L <sup>-1</sup> )	IL-13/(ng·L <sup>-1</sup> )
正常组	-	6.35 ± 1.74	47.27 ± 9.60
模型组	-	69.34 ± 12.70 <sup>##</sup>	116.05 ± 12.56 <sup>##</sup>
地塞米松组	0.001	14.27 ± 3.77 <sup>**</sup>	46.26 ± 14.33 <sup>**</sup>
化痰活血方低剂量组	7.5	56.56 ± 7.69 <sup>##*</sup>	99.21 ± 17.31 <sup>##*</sup>
化痰活血方中剂量组	15	40.55 ± 7.25 <sup>##**</sup>	74.91 ± 9.79 <sup>##**</sup>
化痰活血方高剂量组	30	26.65 ± 7.99 <sup>##**</sup>	51.18 ± 13.76 <sup>**</sup>

注: 与正常组比较, <sup>##</sup>*P* < 0.01; 与模型组比较, <sup>\*</sup>*P* < 0.05, <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01



1. 正常组 2. 模型组 3. 地塞米松组 4. 化痰活血方低剂量组 5. 化痰活血方中剂量组 6. 化痰活血方高剂量组

1. normal group 2. model group 3. Dexamethasone group 4. Huatan Huoxue Decoction low dose group 5. Huatan Huoxue Decoction medium dose group 6. Huatan Huoxue Decoction high dose group

图3 化痰活血方对哮喘模型小鼠肺组织 VEGFR2 表达的影响

Fig. 3 Effect of Huatan Huoxue Decoction on expression of VEGFR2 in lung tissue of asthmatic mice

IL-17A 还可聚集活化的炎症细胞, 从而增加哮喘相关的病理因素<sup>[9]</sup>。研究表明, 抑制 Th17 的表达可显著降低 Th2 细胞因子的表达, 并可明显缓解气道炎症与气道高反应性<sup>[10-11]</sup>。IL-17A 可通过上调肝素结合表皮生长因子的过表达和破坏某些组织因子的产生加重气道重构相关的病理变化, 如黏液分泌增多、基底膜细胞增殖等。

血管内皮生长因子 (VEGF) 是一种前炎症细胞因子, 主要介导血管增殖和渗漏, 有 VEGFR1 和 VEGFR2 两种活化受体, 但 VEGFR2 是人 VEGF 信号转导的主要受体。IL-17A 可促进 VEGF 的分泌, 而 VEGF 可与 VEGFR2 结合, 促使下游相关信号通路被激活, 导致胶原蛋白在气道内沉积量增加, 细胞外基质分解被抑制, 促进纤维结缔组织形成及气道平滑肌的增生, 从而加速气道重塑<sup>[12-13]</sup>。VEGF 及其受体可介导 Th2 细胞炎症, 加速血管和血管外炎症的发生, 导致大量炎症细胞迁徙浸润到气道壁, 从而加重哮喘气道炎症, 故治疗哮喘新途

径之一可能是抑制 VEGFR 的产生<sup>[14-15]</sup>。

IL-13 是 Th2 细胞分泌的生物活性介质,自然杀伤细胞、嗜酸性粒细胞在一定环境中也可生成 IL-13。IL-13 可导致气道反应性增加与嗜酸粒细胞浸润和黏液分泌增多,对炎症介质有直接作用。嗜酸性粒细胞(EOS)增多和气道高反应性由 Th2 细胞介导,嗜碱性粒细胞的募集和生长分化及肥大细胞、嗜碱性粒细胞的增多主要通过调节免疫球蛋白 IgE 产生,而诱导 IgE 合成的主要因子是 IL-13,因此,IL-13 与哮喘炎症的启动和维持密切相关。有研究表明,IL-13 表达量高的支气管上皮细胞中杯状上皮细胞增生较明显,PAS 染色阳性细胞明显增多,且上皮下层胶原蛋白沉积增多。IL-17 和 IL-13 与哮喘疾病的发作和恶化有协同作用,IL-17 是强促炎因子,可促进 IL-13 的分泌,从而加重哮喘炎症反应。

历代不少医学家认为,“痰”和“瘀”在哮喘病程中可相互影响,在临床治疗时主张“痰瘀同治”,已取得较好疗效<sup>[16]</sup>。为研究其作用机制,本实验“化痰”方采用经典方剂三子养亲汤为代表,而“活血”方采用经典方剂桃红四物汤为代表进行研究。结果显示,化痰活血方能有效缓解哮喘小鼠肺组织炎性细胞浸润和上皮细胞增生并降低病理评分,控制炎症的发展,PAS 染色结果说明化痰活血方可明显减轻气道上皮杯状细胞增生和降低阳性面积的表达,ELISA 结果显示化痰活血方可减少 IL-17A 和 IL-13 在哮喘小鼠 BALF 中的量,其作用与模型组相比有显著性差异。Western blot 结果显示,化痰活血方对 VEGFR2 在哮喘小鼠肺组织中的表达无明显抑制作用,故推测化痰活血方可能通过调节 IL-17A 和 IL-13 途径而不是 VEGFR 途径来缓解哮喘症状。

综上所述,化痰活血方对哮喘小鼠有一定的治疗作用,从而在一定程度上可以缓解哮喘气道炎症。除了上述的致炎因子外,在哮喘病理变化中也存在负向调控因素,如调节性 T 细胞(CD4 + CD25 + Treg cell)、IL-10 及转化生长因子 TGF- $\beta$ ,其是否能通过这些因素发挥作用值得进一步深入研究。

#### 参考文献:

[1] Molet S, Hamid Q, Davoine F, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to

produce cytokines [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, 108 (3): 430-438.

[2] 程静,梁红艳,姜晓峰.哮喘造模不同阶段的小鼠支气管肺泡灌洗液中 IL-4、IL-12、IL-13 的检测及意义[J]. *中国实验诊断学*, 2013, 17(4): 643-646.

[3] 姜小丽,杨婷,杨宝辉,等.哮喘小鼠中 Foxp3<sup>+</sup>Treg/Th17 的失衡及意义[J]. *免疫学杂志*, 2013, 29(4): 286-290.

[4] Zhou M, Chen H L, Cheng S, et al. Effect of dexamethasone on expression of AGR2 protein in asthmatic mice [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2013, 33(1): 33-36.

[5] 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.

[6] Myou S, Leff A R, Myo S, et al. Blockade of inflammation and airway hyperresponsiveness in immune-sensitized mice by dominant-negative phosphoinositide 3-kinase-TAT [J]. *J Exp Med*, 2003, 198(10): 1573-1582.

[7] 张风,陶艳艳,陈高峰.改良 PAS 染色法在急性肝损伤中的应用[J]. *世界中医药*, 2015, 10(2): 178-181.

[8] 朱惠源,张建立,张国俊,等. PAS 染色法在哮喘大鼠模型杯状细胞染色中的应用[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2012, 28(3): 348-349.

[9] Agache I, Giobanu C, Agache C, et al. Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma [J]. *Respir Med*, 2010, 104(8): 1131-1137.

[10] Park S J, Lee Y C. Interleukin-17 regulation: an attractive therapeutic approach for asthma [J]. *Respir Res*, 2010, 11 (1): 1-11.

[11] Pappu B P, Angkasekwinai P, Dong C. Regulatory mechanisms of helper T cell differentiation: new lessons learned from interleukin 17 family cytokines [J]. *Pharmacol Ther*, 2008, 117(3): 374-384.

[12] Zanini A, Chetta A, Imperatori A S, et al. The role of the bronchial microvasculature in the airway remodelling in asthma and COPD [J]. *Respir Res*, 2010, 11(2): 189-191.

[13] Chakir J, Shannon J, Molet S, et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma; Effect of steroids on TGF- $\beta$ , IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 111 (6): 1293-1298.

[14] Lee Y C, Kwak Y G, Song C H. Contribution of vascular endothelial growth factor to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma [J]. *J Immunol*, 2002, 168(7): 3595-3600.

[15] Grainge C, Dennison P, Lau L, et al. Asthmatic and normal respiratory epithelial cells respond differently to mechanical apical stress [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, 190(4): 477-480.

[16] 毛三宝.化痰活血汤治疗小儿咳嗽变异性哮喘 52 例[J]. *浙江中医杂志*, 2010, 45(5): 338.