

妇科千金片对盆腔炎大鼠 TLR2/4-NF- κ B 信号通路影响的研究

袁建菱, 李萍, 文琦琪, 刘丽, 陈小丽, 王艳
(湖南中医药大学, 湖南长沙 410208)

〔摘要〕 目的 观察妇科千金片对盆腔炎大鼠子宫 Toll 样受体 2(TLR2)、Toll 样受体 4(TLR4)、核转录因子 kappaB (NF- κ B)mRNA 表达的影响,探讨妇科千金片调控 TLR2/4-NF- κ B 信号通路对盆腔炎大鼠的抗炎机制。**方法** 通过子宫注射混合菌液建立盆腔炎大鼠模型,将 60 只雌性 SD 大鼠随机分为 5 组,每组 12 只,即:空白组、假手术组、模型组、妇科千金片组、罗红霉素组,分别予以相应药物干预,运用免疫组化检测子宫组织中 TLR2、TLR4、NF- κ B 的灰度值;运用实时荧光定量 PCR 检测子宫组织中 TLR2、TLR4、NF- κ B 的 mRNA 表达变化。**结果** 与空白组、假手术组比较,模型组的 TLR2、TLR4、NF- κ B 灰度值显著降低 ($P<0.01$),TLR2、TLR4、NF- κ BmRNA 的表达均显著升高 ($P<0.01$),表明模型成功;与模型组比较,妇科千金片组、罗红霉素组 TLR2、TLR4、NF- κ B 灰度值均显著升高 ($P<0.01$),TLR2、TLR4、NF- κ BmRNA 均显著降低 ($P<0.01$)。**结论** 妇科千金片对盆腔炎大鼠抗炎的作用机制,可能是通过调控 TLR2/4-NF- κ B 炎性介质变化信号通路的传导而实现的。

〔关键词〕 妇科千金片;盆腔炎;Toll 样受体 2;Toll 样受体 4;核转录因子 kappaB

〔中图分类号〕R285.5;R271 **〔文献标识码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.11.004

Effect of Fuke Qianjin Tablets on TLR2/4-NF- κ B Signaling Pathway in Pelvic Inflammatory Model Rats

YUAN Jianling, LI Ping, WEN Qiqi, LIU Li, CHEN Xiaoli, WANG Yan
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 Objective To observe the effect of Fuke Qianjin tablets on the expression of TLR2, TLR4, NF- κ B in pelvic inflammatory model rats, and to investigate its anti-inflammatory mechanism of TLR2/4-NF- κ B signaling pathway on the pelvic inflammatory rats. **Methods** The 60 female SD rats were injected with the mixture of the uterus to establish the model of the rats with pelvic inflammatory disease. Then the rats were randomly divided into 5 groups, 12 rats in each group, namely: blank group, sham operation group, model group, Fuke Qianjin tablets group, roxithromycin group, which were given corresponding drug intervention. The gray values of TLR2, TLR4, NF- κ B were detected by immunohistochemistry, and the expression of TLR2,TLR4, NF- κ B mRNA of uterus was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** Compared with the blank group, sham operation group, the gray values of TLR2, TLR4 and NF- κ B in model group were decreased significantly ($P<0.01$), the expression of TLR2, TLR4 and NF- κ B mRNA were significantly increased ($P<0.01$). Compared with the model group, the gray values of TLR2, TLR4 and NF- κ B in Fuke Qianjin tablets group and roxithromycin group were significantly increased ($P<0.01$), the TLR2, TLR4 and NF- κ B mRNA were significantly lower ($P<0.01$). **Conclusion** Mechanism of anti-inflammation of Fukeqianjin tablets on pelvic inflammatory model rats may be through the regulation of TLR2/4-NF- κ B inflammatory medium signaling pathway.

〔Keywords〕 Fukeqianjin tablets; pelvic inflammatory disease; TLR2; TLR4; NF- κ B

〔收稿日期〕2015-11-30

〔基金项目〕湖南省科技厅资助项目(2014SK3005)。

〔作者简介〕袁建菱,女,硕士,讲师,主要从事中药新药的研究与开发,E-mail:jly888666@163.com。

妇科千金片是国家中药保护品种,由千斤拔、金樱根、穿心莲、单面针、十大功劳、鸡血藤、当归、党参组成,具有清热祛湿、补血益气的功效。近10年来研究发现妇科千金片具有抑菌、抗炎、镇痛、补益气血、提高免疫力等作用。研究表明:妇科千金片对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、乙型溶血性链球菌和白色念珠菌均有抑菌作用,对环磷酰胺所致免疫低下的小鼠,具有增加血清溶血抗体、提高细胞吞噬百分率和吞噬指数的作用^[1]。本课题组前期研究显示:妇科千金片能提高机体免疫能力,调节炎症机体血清中细胞因子,促进Ig分子生成^[2],调节盆腔组织中炎症因子的表达,抑制核转录因子 κ B(NF- κ B)所引起的级联反应,减轻机体组织炎症损伤^[3]。

TLR2、TLR4在炎症反应中起着重要的信号转导作用,可通过TLR受体信号通路调控炎症免疫反应,从而达到调节炎症的目的^[4]。由此可以提出以下假设:妇科千金片抑制TLR基因表达可以作为抗炎免疫的靶点,其机制是通过TLR2/4-NF- κ B-信号通路调控炎症性介质变化。

本研究在课题组以往临床、动物研究工作的基础上采用妇科千金片,以盆腔炎模型大鼠为受试对象,运用免疫组化和荧光定量PCR技术,从细胞和分子水平探讨妇科千金片对盆腔炎大鼠抗炎的作用机制,现将结果报道如下。

1 材料

1.1 动物

SPF级成年雌性Sprague Dawley大鼠60只,体质量200~220 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号:SYXK2013(湘)-0005。

1.2 试剂与药物

PBS、BSA、SABC、DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物工程有限公司);TLR2、TLR4、NF- κ B抗体(Proteintech公司),DAB显色试剂盒(武汉博士德生物公司);引物(南京金斯瑞公司);TLR2、TLR4、NF- κ B总RNA提取试剂盒(Invitrogen公司);逆转录试剂盒(vazyme公司);PCR试剂盒(Fermentas公司);妇科千金片:批号:201412054(株洲千金药业有限公司);罗红霉素分散片:150 mg/片,批号:1502121(江苏神龙药业有限公司)。

1.3 主要仪器

TGL16M台式高速冷冻离心机(湖南长沙市科威实业有限公司);MIASE图像分析系统(北航公司);紫外分光光度计(麦克奥迪实业集团有限公

司);480型DNA热循环仪(Perkin Elmer公司);DYCP-31C型电泳仪(北京六一仪器);7500荧光定量PCR仪(Applied Biosystems公司)。

2 方法

2.1 动物分组

将60只雌性SD大鼠,按照随机数字表分为5组,即:空白组、假手术组、模型组、妇科千金片组、罗红霉素组(西药对照组),每组12只。

2.2 造模方法^[5]

除空白组与假手术组外,将实验大鼠分别称质量,腹部常规消毒,用10%水合氯醛350 mg/kg腹腔注射麻醉大鼠,腹部分别用碘伏和75%酒精消毒,下腹部正中切口约2 cm,暴露子宫,用1 mL注射器针头在子宫分叉处分别向左右两侧子宫向卵巢方向缓慢注入0.2 mL含 3×10^9 个/mL的混合菌液,注毕,分层缝合伤口,消毒术区。大鼠造模术后第4天随机分为妇科千金片组、罗红霉素组。按大鼠与人等效剂量换算方法计算出各大鼠给药剂量:妇科千金片组1.89 g/kg;罗红霉素组:罗红霉素82.74 mg/kg。各药均配成10 mL/kg给药溶液,每天定时经口灌胃给药治疗,每日1次,连续21 d。假手术组,手术操作同上,朝卵巢方向注射等量0.9%生理盐水,空白组不予任何处理。模型成功标准:采用HE染色,光镜下观察子宫组织病理改变情况,以确定造模是否成功。

2.3 取材方法

大鼠给药治疗结束后的第2天清晨禁食,10%水合氯醛350 mg/kg腹腔注射麻醉。剖开腹腔后,取双侧子宫,一侧组织于10%中性甲醛固定于4℃保存,用于免疫组化检测;一侧组织放置于冻存管中,标号后存于-80℃冰箱中,用于Real-time PCR检测。

2.4 检测方法

2.4.1 免疫组化图像采集与分析 把所截取的子宫进行石蜡包埋,制成厚约5 μ m的切片。操作应严格按照试剂盒说明书的步骤实施:(1)切片常规脱蜡至水化(步骤:每15 min用纯二甲苯清洗1次,共清洗2次;100%、95%、80%梯度酒精水化各5 min;自来水清洗5 min;每隔5 min蒸馏水清洗1次,共2次);(2)将1份30% H_2O_2 和10份蒸馏水倒入一起,室温下静置10 min,以灭活内源性酶。蒸馏水洗3次。热修复抗原:把切片放入0.01M枸橼酸盐缓冲液(PH6.0)后,用微波炉加热至沸腾3次,每次间隔5 min。冷却后PBS(PH7.2)洗涤2次;(3)加入

5%的 BSA 封闭液,室温 20 min。甩去多余液体,不洗;(4)滴加适当稀释一抗大鼠 TLR2、TLR4、NF- κ B 单克隆抗体(1:100),37 °C 1 h。PBS(PH7.2)洗 2 分钟 \times 3 次;(5)滴加适量生物素化山羊抗兔 IgG,37 °C 温箱 20 min。PBS(PH7.2)洗 2 min \times 3 次;(6)滴加试剂 SABC,37 °C 20 min。PBS (PH7.2) 洗 5 min \times 4 次;(7)DAB 显色:使用 DAB 显色试剂盒。取试剂盒中 A、B、C 试剂各 1 滴,加入到 1 mL 蒸馏水中,摇匀后滴在切片上。

免疫组化图像分析 所有图像均采用 MIAPS 医学图像分析系统进行分析,用阳性细胞的数量表示灰度值,再以灰度值来表示抗原的表达量。每个切片重复测量 3 次,然后取平均值进行统计。

2.4.2 Real-time PCR 法检测大鼠子宫组织 TLR2、TLR4、NF- κ B mRNA 表达 Trizol 提取细胞总 RNA,操作步骤按试剂盒说明书执行,RNA 纯度运用紫外分光光度计测定。引物在 NCBI 上搜索目的基因的序列,经 Blast 进行同源性分析,分析结果显示引物特异性好,无明显非特异性扩增。本实验用 β -action 作为内参照。(该引物及内参照 β -action 引物均委托南京金斯瑞合成,运用 primer5.0 软件设计)。NF- κ B-F:GCTCACGTACATCTCAGAGGGTTGG,NF- κ B-R:TCCTCATTCTCATCGGCTGCTTTT,产物长度:138 bp;TLR4-F:CATTGCTGCCAACATCATCC,TLR4-R:CCAGAGCGGCTACTCAGAACT,产物长度:144 bp;TLR2 -F:TTCTCAATGGGTTCCAGCAA,TLR2 -R:ACGCAGTGAGTGGTGCAAGTAT,产物长度:102 bp; β -action-F:GAACGGGAAGCTGCTCATCAA, β -action-R:TGATGACCCTTTTGGCTCCG,产物长度:174 bp。PCR 反应条件为:95 °C 10 min;95 °C 10 s,59 °C 50 s,读板,40 个循环;熔解曲线 60~95 °C,结束反应。PCR 仪器自动生成标准曲线和熔解曲线。

选择数据分析方式:本检测采用相对定量法检验基因的表达变化。本实验中目的基因与内参的扩增效率基本一致,故应用 $\Delta\Delta$ CT 法进行相对定量分析。比较 5 组子宫中 TLR2、TLR4、NF- κ B mRNA 的表达量,以空白组子宫中 TLR2、TLR4、NF- κ B mRNA 的表达量作为标准对照。按照下列公式计算各组样本中 TLR2、TLR4、NF- κ B mRNA 的相对表达量^[6]。 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示的是实验组目的基因的表达相对于空白组的变化倍数, $\Delta\Delta CT=(目的基因 CT 值-内对照基因 CT 值)实验组-(目的基因 CT 值-内对照基因 CT 值)对照组$,目的基因的相对含量= $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。

2.5 统计方法

所有数据均输入计算机,用 SPSS 17.0 软件进行处理。各检测指标统计数据均以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间两两比较若方差齐时选择 LSD 法,方差不齐时选择 Tamhane 法进行方差分析。

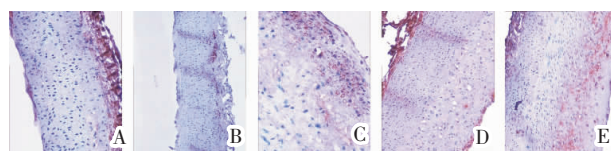
3 结果

3.1 动物死亡情况

在实验过程中,共有 8 只大鼠死亡,其中 3 只死于麻醉意外,2 只死于术后感染,3 只在干预治疗过程中不明原因猝死。(空白组死亡 1 只,假手术组 2 只,模型组死亡 2 只,妇科千金片组 2 只,罗红霉素组 1 只)。

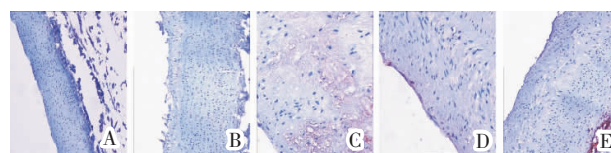
3.2 妇科千金片对盆腔炎大鼠子宫 TLR2、TLR4、NF- κ B 抗原活性的影响

与空白组、假手术组比较,模型组 TLR2、TLR4、NF- κ B 灰度值均显著降低 ($P<0.01$),与模型组比较,妇科千金片组、罗红霉素组 TLR2、TLR4、NF- κ B 灰度值均显著升高 ($P<0.01$),表明妇科千金片、罗红霉素均对盆腔炎大鼠具有一定的治疗作用;且妇科千金片组与罗红霉素组比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$),显示妇科千金片、罗红霉素对盆腔炎的疗效相当。见图 1-3、表 1。



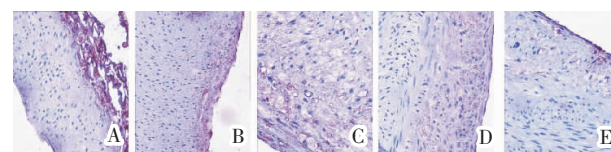
A.空白组;B假手术组;C.模型组;D.妇科千金组;E.罗红霉素组

图 1 各组免疫组化 TLR2 表达光镜图($\times 200$ 倍)



A.空白组;B假手术组;C.模型组;D.妇科千金组;E.罗红霉素组

图 2 各组免疫组化 TLR4 表达光镜图($\times 200$ 倍)



A.空白组;B假手术组;C.模型组;D.妇科千金组;E.罗红霉素组

图 3 各组免疫组化 NF- κ B 表达光镜图($\times 200$ 倍)

3.3 妇科千金片对盆腔炎大鼠子宫 TLR2、TLR4、NF- κ B mRNA 表达的影响

与空白组、假手术组比较,模型组 TLR2、

表1 各组大鼠子宫 TLR2、TLR4、NF- κ B 表达的灰度值比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TLR2 灰度值	TLR4 灰度值	NF- κ B 灰度值
空白组	11	179.50 \pm 22.15	162.54 \pm 17.47	155.62 \pm 14.61
假手术组	10	164.95 \pm 9.34	153.48 \pm 7.25	147.54 \pm 7.71
模型组	10	82.21 \pm 6.34 ^{###}	91.27 \pm 6.64 ^{###}	86.94 \pm 5.62 ^{###}
妇科千金组	10	145.27 \pm 4.81 ^{##}	137.74 \pm 8.62 ^{##}	131.48 \pm 11.76 ^{##}
罗红霉素组	11	139.53 \pm 7.64 ^{##}	127.59 \pm 4.34 ^{##}	121.37 \pm 4.59 ^{##}
F 值		8.59	4.43	5.57
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

注:与空白组比较,## P <0.05,### P <0.01;与假手术组比较,▲ P <0.05,▲▲ P <0.01;与模型组比较,※ P <0.01。

TLR4、NF- κ B mRNA 的表达均显著升高(P <0.01);与模型组比较,妇科千金片组、罗红霉素组 TLR2、TLR4、NF- κ B mRNA 均显著降低(P <0.01),表明妇科千金片、罗红霉素治疗药物均对盆腔炎大鼠子宫的 TLR2、TLR4、NF- κ B mRNA 表达具有一定下调作用;且妇科千金片组与罗红霉素组比较,差异无统计学意义(P >0.05),显示妇科千金片、罗红霉素对盆腔炎的疗效相当。见表2。

表2 各组大鼠子宫 TLR2、TLR4、NF- κ B mRNA 表达的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TLR2 mRNA	TLR4 mRNA	NF- κ B mRNA
空白组	11	1.45 \pm 0.67	1.37 \pm 0.24	1.24 \pm 0.23
假手术组	10	1.67 \pm 0.326	1.49 \pm 0.38	1.49 \pm 0.16
模型组	10	3.86 \pm 0.43 ^{###}	3.64 \pm 0.43 ^{###}	2.98 \pm 0.26 ^{###}
妇科千金组	10	2.25 \pm 0.27 ^{##}	1.93 \pm 0.31 ^{##}	2.21 \pm 0.32 ^{##}
罗红霉素组	11	2.43 \pm 0.32 ^{##}	1.97 \pm 0.27 ^{##}	2.14 \pm 0.29 ^{##}
F 值		31.52	35.14	36.98
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

注:与空白组比较,## P <0.01;与假手术组比较,▲▲ P <0.01;与模型组比较,※ P <0.01。

4 讨论

Toll 样受体(TLR)首先在果蝇中发现。已经证实哺乳动物也存在 TLR 同源域,被命名为 TLR 家族。TLR 是一组跨膜受体蛋白质,包括胞外丰富的亮氨酸序列和胞内与白介素-1(IL-1)受体信号域显著同源的尾状结构域,称为 Toll/IL-1 同源域。配体与 TLR 聚合活化后,接头蛋白髓样因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88)与 TLR 胞内尾状结构结合,激活丝裂原激活蛋白激酶和 NF- κ B 通路。这样,TLR 介导的信号诱导了编码促炎因子的基因大量表达。目前为止,人类 TLR 家族有 12 名成员已被

发现,其中以表达 TLR4 为主,尚有少量的 TLR2。研究表明,TLR 可能是细菌感染与炎症形成的一个桥梁,TLR 在炎症形成中的信号通路有条主线:TLR-NF- κ B 信号通路调控炎性介质变化^[4]。

NF- κ B 作为一种普遍存在的转录因子,是多种信号转导途径的汇聚点,不仅参与介导了免疫应答病毒复制、细胞凋亡和增殖的多种基因的表达,而且在调节炎症反应的基因表达中起关键作用。已证实 NF- κ B 可高效诱导多种细胞因子(如 IL-1、IL-6、IL-8、TNF- α)、黏附分子(如 ICAM1、VCAM1、ELAM1)、趋化因子和急性期反应蛋白的基因蛋白的基因表达,同时对参与炎症级联瀑布效应的多种酶的基因表达具有重要的调控作用^[7]。

有研究^[8-9]取三七提取物(含三七总皂苷和三七氨酸)进行治疗用大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及消化性链球菌的混合菌液复制出恒河猴子宫内膜炎出血模型,发现三七复合有效成分可以抑制:阻断 NF- κ B 的信号通路,降低 TNF- α mRNA 的表达,抑制炎症性细胞因子 TNF- α 的生成。丁青^[10-11]等用三七复合成分治疗子宫内膜炎患者,发现三七复合成分可以调节 MMP-1 和 TIMP-1 系统的平衡;有效降低炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的含量,降低 NF- κ B p65 的转录及蛋白表达量,抑制 NF- κ B p65 的核因子 DNA 结合活性。从而促进子宫内膜炎细胞的修复,三七复合有效成分能促使炎症细胞转归,有效保护细菌脂多糖对培养细胞的损伤,有长效持续性保护细胞形态完整性功能。本课题组前期已研究证实,妇科千金片能改善盆腔炎大鼠盆腔组织的炎症病变,有保护盆腔组织作用^[12-13],减少细胞凋亡,降解细胞外基质抑制炎症反应^[14]。

本实验通过免疫组化检测证实妇科千金片能使盆腔炎大鼠子宫的 TLR2、TLR4、NF- κ B 的灰度值显著升高,灰度值的高低与蛋白表达的强弱成反比关系,表明盆腔炎模型大鼠子宫的 TLR2、TLR4、NF- κ B 表达水平显著降低。运用实时荧光定量 PCR 技术检测结果表明,妇科千金片对盆腔炎大鼠模型的干预,使 TLR2/4-NF- κ B 信号通路中 TLR2、TLR4、NF- κ B mRNA 表达明显下降,抑制了因 NF- κ B 激活而产生的一系列炎症反应,从而表明妇科千金片对盆腔

炎大鼠抗炎的作用,其机制可能是通过调控 TLR2/4-NF- κ B 炎性介质变化信号通路的传导而实现的。

参考文献:

- [1] 袁兴辉,尹 胜,刘向东.妇科千金片临床研究总结[J]. 医学信息,2011,(7):3249-3250.
- [2] 袁建菱,郭建生,曾贵荣,等.妇科千金片对急性盆腔炎模型大鼠血清 IgA、IgG、IgM 的影响[J].湖南中医药大学学报,2010,30(9):87-89.
- [3] 袁建菱,郭建生,曾贵荣,等.妇科千金片对大鼠盆腔炎子宫、卵巢、输卵管 aspase-3 表达的影响 [J]. 湖南中医药大学学报,2012,32(12):58-60.
- [4] Geng HL, LU HQ, Zhong RQ, et al. Increased expression of Toll like receptor 4on Peripheral-blood mononuclear cells in Patients with coronary arteriosclerosis disease [J]. Clinical and Experimental Immunology, 2006,143(2):269-273.
- [5] 潘振宇,李勇敏.妇炎宁片对细菌性盆腔炎大鼠免疫功能及盆腔炎的影响[J]湖南中医杂志,2013,29(10):124-126.
- [6] Micheal W, Pfaffl. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. Nucleic Acids Research,

2001,29(9):469-475.

- [7] 胡系伟,闻心培.细胞因子与感染[J].贵州医药,2004,25(2):187-188.
- [8] 尤昭玲,马红霞,陈俊明,等.恒河猴子宫内膜炎出血模型的建立[J].中国比较医学杂志,2003,13(5):310-312.
- [9] 马红霞,尤昭玲,王若光,等.三七复合有效成分对恒河猴细菌感染子宫出血模型内膜组织 NF- κ B 活性的影响[J].中国中医药信息杂志,2004,11(7):599-601.
- [10] 丁 青,尤昭玲.三七复合有效成分对子宫内膜炎症细胞 MMP-1 和 TIMP-1 及 VEGF 的影响 [J]. 中国中医药科技,2007,14(12):118-120.
- [11] 丁 青,尤昭玲.三七复合有效成分对子宫内膜炎症细胞 NF- κ B 及 TNF- α 、IL-1 β 变化的影响 [J]. 中国中医药科技,2007,14(12):113-115.
- [12] 袁建菱,郭建生,曾贵荣,等.妇科千金片对大鼠盆腔炎子宫超微结构的研究[J]. 中国保健营养杂志,2013,23(1):49-50.
- [13] 袁建菱,郭建生,曾贵荣,等.妇科千金片对盆腔炎模型大鼠组织病理改变的研究[J].中国中医药导刊,2012,14(2):623-624.
- [14] 袁建菱,郭建生,曾贵荣,等.妇科千金片对盆腔炎模型大鼠血清中 IL-2、IL-6、IL-8 含量的影响 [J]. 中华中医药杂志,2013,28(1):250-252.

(本文编辑 杨 瑛)

(上接第 8 页) 气道反应、抑制气道重塑等,从而防治哮喘^[13]。

本实验证实,咳喘宁口服液,尤其是中剂量组对治疗 RSV 诱发的哮喘大鼠疗效较为显著,通过上调 IFN- γ 水平、降低 IL-4 水平表达从而降低气道炎症反应,维持 Th1/Th2 平衡来调节机体免疫。咳喘宁治疗支气管哮喘可能与其能够抑制气道平滑肌增殖、影响哮喘气道重塑关系密切,同时也为“伏痰、瘀”理论在病毒诱发哮喘中的作用机制提供了实验依据。

参考文献:

- [1] Xu YP, Szilvia Szep, Lu Z, et al. The antioxidant role of in The pathogenesis of cystic fibrosis and other inflammation-related diseases[J]. ProcNatl Acad Sci USA,2009,106(48):20515-20519.
- [2] 王孟清,罗银河,陈锡军,等.咳喘宁治疗病毒诱发小儿哮喘的临床研究[J].新中医,2007,39(4):16-17.
- [3] Openshaw PJ, Yamaguchi Y, Tregoning JS. Childhood infections, the developing immune system and the origins of asthma[J]. Allergy Clin Immunol,2004,11(6):1275-1277.
- [4] Zheng JS, Zhu C, Su MS, Li CC, Jin XH, Chen XF. The etiological analysis of respi-ratory tract when acute asthma attacked

of the following children under 5 years old [J]. Journal of Wenzhou Medical College,2005,35(6):483-484.

- [5] Lee JJ, Dimina D, Macias MP, et al. Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils [J]. Science, 2004, 305(5691): 1773-1776.
- [6] 管敏昌,汤卫红,王惠庭,等.尾加压素 II 在哮喘小鼠气道重塑中的表达[J].中国卫生检验杂志,2013,23(8):1912-1914.
- [7] 赵德育,秦厚兵.支气管哮喘患儿长期吸入糖皮质激素的安全性研究进展与对策[J].中华实用儿科临床杂志,2013,28(4):249-251.
- [8] 肖长江.小儿热哮微观辨证及清肺平喘法的疗效机理研究[D].长沙:湖南中医学院,2001.
- [9] 刘丽娜,杨季国,程东庆.呼吸道合胞病毒诱发的哮喘小鼠模型的建立[J].浙江中医药大学学报,2007,31(2):154-155,157.
- [10] Salmon M, Walsh DA, Koto H, et al. Repeated allergen exposure of sensitized Brown-Norway rats induces airway cell DNA synthesis and remodeling[J]. Eur Respir J, 1999, 14(3): 633-641.
- [11] 刘建博,张玉芳,等.射麻止咳汤对哮喘大鼠支气管平滑肌细胞增殖的影响[J].广州中医药大学学报,2010,27(6):595-597.
- [12] 刘 媛,黄 茂,等.组织贴块法建立人气道平滑肌细胞体外培养模型的研究[J].现代生物医学进展,2011,11(11):2065-2067.
- [13] 唐力琼,李 英,罗银河,等.咳喘宁对 RSV 诱发哮喘大鼠 ACAM-1 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2016,36(10):27-30.

(本文编辑 杨 瑛)