

本文引用: 邓羿馥, 王孟清, 谢静, 胡燕, 曾洁, 罗菁, 姚冰. 五虎汤通过调控 miRNA-146a 改善幼龄哮喘大鼠气道重塑[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(5): 799-806.

# 五虎汤通过调控 miRNA-146a 改善幼龄哮喘大鼠气道重塑

邓羿馥<sup>1,2</sup>, 王孟清<sup>1\*</sup>, 谢静<sup>1\*</sup>, 胡燕<sup>1</sup>, 曾洁<sup>1</sup>, 罗菁<sup>2,3</sup>, 姚冰<sup>1,2</sup>

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208;

3. 深圳市南山区蛇口人民医院, 深圳 154100

**[摘要]** **目的** 探讨五虎汤通过调控 miRNA-146a 对幼龄哮喘大鼠气道重塑的影响。**方法** SPF 级幼龄雌性 SD 大鼠 80 只, 先随机将 20 只作为空白组, 60 只作为造模组。造模组采用卵清白蛋白联合氢氧化铝五点注射法致敏以及卵清白蛋白雾化激发哮喘。两组各随机抽取 10 只检测气道反应性, 评判造模是否成功。造模成功后, 剩下的 10 只空白组大鼠作为正常组, 50 只造模组大鼠随机分为 5 组(模型组、五虎汤低剂量组、五虎汤中剂量组、五虎汤高剂量组、地塞米松组), 每组 10 只。五虎汤高、中、低剂量组分别灌胃五虎汤 4.428、2.214、1.107 g/kg, 地塞米松组灌胃地塞米松 0.075 mg/kg, 正常组及模型组灌胃等容积生理盐水, 1 次/d, 连续 2 周后处理大鼠。气道反应性检测大鼠气道阻力; HE、PAS 及 Masson 染色法分别观察大鼠肺组织气道炎症细胞浸润、气道黏液储备和气道胶原沉积情况; Western blot 法检测基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinases-1, TIMP-1)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)蛋白表达水平; qPCR 法检测 miRNA-146a 及 MMP-9、TIMP-1 mRNA 含量, 并对 miRNA-146a 与 MMP-9、TIMP-1 mRNA 进行相关性分析。**结果** 与空白组比较, 造模组气道阻力显著升高( $P < 0.01$ ), 提示造模成功。与正常组比较, 模型组大鼠肺组织周围炎性细胞浸润, 上皮细胞化生, 炎性黏液较多, 气道壁增厚, 气道胶原广泛沉积; 肺组织  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、MMP-9、TIMP-1、miRNA-146a、MMP-9 mRNA、TIMP-1 mRNA 均显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 五虎汤高、中、低剂量组及地塞米松组气道阻力明显降低( $P < 0.01$ ), 肺组织病理情况明显缓解, 且五虎汤高剂量组及地塞米松组改善更加明显;  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、MMP-9、TIMP-1、miRNA-146a、MMP-9 mRNA、TIMP-1 mRNA 均显著下降( $P < 0.01$ )。五虎汤中、低剂量组  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、miRNA-146a、MMP-9 mRNA、TIMP-1 mRNA 及五虎汤低剂量组 TIMP-1 显著高于地塞米松组( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ ); 五虎汤高、中剂量组  $\alpha$ -SMA、TIMP-1、miRNA-146a、MMP-9 mRNA、TIMP-1 mRNA 及五虎汤高剂量组 TGF- $\beta$ 1 低于五虎汤低剂量组( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ ); 五虎汤高剂量组  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、miRNA-146a、TIMP-1 mRNA 低于五虎汤中剂量组( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ )。Pearson 相关性分析显示, 大鼠肺组织 miRNA-146a 与 MMP-9 mRNA、TIMP-1 mRNA 均有极强正相关性( $r$  分别为 0.956、0.973,  $P < 0.01$ )。**结论** 五虎汤能够有效改善哮喘大鼠气道重塑, 这可能与五虎汤抑制 miRNA-146a 表达, 降低 MMP-9、TIMP-1 及其 mRNA, 以及减少  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 相关。

**[关键词]** 五虎汤; 幼龄哮喘大鼠; miRNA-146a; 气道重塑; 基质金属蛋白酶-9; 金属蛋白酶组织抑制因子-1;  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白; 转化生长因子- $\beta$ 1

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.05.007

## Improvement of Wuhu Decoction on airway remodeling in young asthmatic rats by regulating miRNA-146a

DENG Yijue<sup>1,2</sup>, WANG Mengqing<sup>1\*</sup>, XIE Jing<sup>1\*</sup>, HU Yan<sup>1</sup>, ZENG Jie<sup>1</sup>, LUO Jing<sup>2,3</sup>, YAO Bing<sup>1,2</sup>

**[收稿日期]** 2023-02-20

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(82174437); 湖南省自然科学基金面上项目(2022JJ30037); 湖南中医药大学校级科研项目(2022XYLH014); 湖南中医药大学研究生创新课题项目(2021CX28)。

**[第一作者]** 邓羿馥, 男, 博士研究生, 研究方向: 中医药防治小儿肺系疾病。

**[通信作者]** \* 王孟清, 男, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, E-mail: wmqm2009@sina.com; 谢静, 女, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, E-mail: 982100692@qq.com。

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Shenzhen Nanshan District Shekou People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 154100, China

**[Abstract] Objective** To explore the effects of Wuhu Decoction (WHD) on airway remodeling in young asthmatic rats by regulating miRNA-146a. **Methods** A total of 80 young female SD rats of SPF grade were randomly divided into blank group ( $n=20$ ) and modeling group ( $n=60$ ). To stimulate asthma, the modeling group was sensitized by ovalbumin (OVA) combined with aluminum hydroxide five-point injection and OVA atomization. Ten rats were randomly selected from each group to detect airway responsiveness and evaluate the success of modeling. After successful modeling, the remaining 10 rats in the blank group were considered as the normal group, and 50 rats in the modeling group were randomly subdivided into 5 groups (model group, low-, medium- and high-dose WHD groups, and dexamethasone group), with 10 rats in each group. The high-, medium- and low-dose WHD groups were respectively given WHD 4.428, 2.214, 1.107 g/kg by gavage, the dexamethasone group was given dexamethasone 0.075 mg/kg by gavage, and the normal group and model group were given equal volume physiological saline by gavage, once a day, for 2 consecutive weeks. Then the rats were anaesthetized and tracheotomized. The airway resistance in rats was measured by airway responsiveness; the airway inflammatory cell infiltration, airway mucus reserve, and airway collagen deposition in lung tissue of rats were observed respectively by HE, PAS and Masson staining methods; the expression levels of the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 (TIMP-1),  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) protein were determined by Western blot; the content of miRNA-146a, MMP-9, TIMP-1 mRNA was examined by qPCR and the correlation between miRNA-146a and MMP-9, TIMP-1 mRNA was analyzed. **Results** Compared with the blank group, the airway resistance in the modeling group was significantly higher ( $P<0.01$ ), which indicated the success of modeling. Compared with the normal group, the rats in the model group demonstrated as follows: inflammatory cell infiltration around the lung tissue, epithelial cell metaplasia, more inflammatory mucus, airway wall thickening and extensive deposition of airway collagen; the  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 1, MMP-9, TIMP-1, miRNA-146a, MMP-9 mRNA and TIMP-1 mRNA expressions in lung tissue of rats in the model group were significantly higher ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the airway resistance in high-, medium- and low-dose WHD groups and the dexamethasone group was significantly lower ( $P<0.01$ ), and the pathological condition of lung tissue was significantly alleviated, moreover, the improvement in the high-dose WHD group and the dexamethasone group was more significant; the  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 1, MMP-9, TIMP-1, miRNA-146a, MMP-9 mRNA, TIMP-1 mRNA expressions in high-, medium- and low-dose WHD groups and the dexamethasone group were significantly lower ( $P<0.01$ ). The  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 1, miRNA-146a, MMP-9 mRNA, and TIMP-1 mRNA expressions in medium- and low-dose WHD groups and the TIMP-1 of the rats in low-dose WHD group were significantly higher than those in the dexamethasone group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); the  $\alpha$ -SMA, TIMP-1, miRNA-146a, MMP-9 mRNA, and TIMP-1 mRNA expressions in high- and medium-dose WHD groups and the TGF- $\beta$ 1 expression in high-dose WHD group were lower than those in low-dose WHD group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). The  $\alpha$ -SMA, TIMP-1, miRNA-146a, and TIMP-1 mRNA expressions in the high-dose WHD group were lower than those in medium-dose WHD group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Pearson correlation analysis showed that there was a strong positive correlation between miRNA-146a and MMP-9 mRNA, TIMP-1 mRNA in the lung tissue of rats ( $r=0.956$ ,  $0.973$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion** WHD can effectively improve airway remodeling in asthmatic rats, which may be related to its inhibition of miRNA-146a expression and reduction of MMP-9, TIMP-1, mRNA,  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$ 1 expressions.

**[Keywords]** Wuhu Decoction; young asthmatic rats; miRNA-146a; airway remodeling; matrix metalloproteinase-9; tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1;  $\alpha$ -smooth muscle actin; transforming growth factor- $\beta$ 1

支气管哮喘是一种由多种细胞和细胞因子参与的支气管慢性炎症性疾病,临床上主要表现为喘息、气促、胸闷、咳嗽等症状<sup>[1]</sup>。此病儿童发病率较高,严重影响患儿的身心健康,目前暂无根治性治疗方案<sup>[2]</sup>。

其发病机制复杂,与气道炎症、气道高反应、气道重塑及机体免疫反应密切相关,跟遗传也有一定关系<sup>[3]</sup>。气道重塑由气道壁的多种结构变化组成,包括上皮损伤、上皮纤维化、肌成纤维细胞增生、平滑肌纤

维增加和血管增生等,造成管腔狭窄,是目前治疗哮喘最棘手的问题之一<sup>[4]</sup>。中医治疗哮喘有毒副作用小、疗效佳的优势,逐渐被人们所接受,本课题组前期研究证实,古方五虎汤作为治喘名方,可有效缓解哮喘的气道重塑<sup>[5]</sup>,但具体机制未完全阐明。随着现代研究的深入,研究者们发现哮喘的发生、发展与小分子 RNA(microRNA, miRNA)表达异常相关<sup>[6]</sup>,且 miRNA-146a 是哮喘患者肺组织中表达最明显的一类 miRNA<sup>[7]</sup>。既往研究表明 miRNA-146a 能促进增生细胞凋亡,在一定程度上能达到控制甚至逆转支气管哮喘气道重塑的作用<sup>[8]</sup>,但具体机制尚未完全阐明。中医药通过调控 miRNA-146a 防治哮喘的研究仍处于初步阶段。本研究旨在探讨五虎汤通过调控 miRNA-146a,对幼龄哮喘大鼠肺组织气道重塑的影响,以进一步明确五虎汤治疗哮喘的可能效应机制,为临床提供新的诊疗思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物

SPF 级雌性 SD 大鼠 80 只,3 周龄,体质量(86.3±4.3) g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物资格证书编号:SCXK(湘)2019-0004;室温 18~20 °C,湿度 65%~70%,光照时间 12 h/d,自由进食饮水。实验方案经湖南中医药大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准,伦理批准号:ZYFY20220612。

### 1.2 药物制备

麻黄 2.4 g、苦杏仁 6.0 g、生石膏 9.0 g、生甘草 2.4 g、细茶叶 4.8 g(生产批号分别为 2202080302、2022030505、2201101、TH22050908、SC11443082100 076),购于湖南中医药大学第一附属医院中药房。将所有药物混合,加入 5 倍量蒸馏水,先浸泡 30 min,然后回流提取 40 min,将药液滤净后再加入 5 倍量蒸馏水,再次回流提取 40 min,将前后 2 次煎液混匀,使用旋转蒸发仪浓缩成 2.46 kg/L。

### 1.3 药物与试剂

地塞米松(美国 Sigma 公司,批号:D1758);鸡卵清白蛋白(北京索莱宝科技有限公司,批号:9006-59-1);氯化乙酰胆碱(美国 Selleck 公司,批号:2260-50-7);HE 染色液(湖南艾佳生物科技股份有限公司,批号:P032IH);Masson 和 PAS 染色液(北京索莱宝

科技有限公司,批号分别为:G1285、G1243); $\beta$ -actin 抗体、山羊抗兔二抗(美国 Proteintech 公司,批号:66009-1-Ig,SA00001-4);MMP-9、TIMP-1、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 抗体(英国 Abcam 公司,批号:573145GR3281503-1、GR3231643-1、GR3219232-1);Trizol 试剂、逆转录试剂盒(美国 Thermo 公司,批号:15596026、K1622);qPCR 试剂盒(上海近岸生物科技有限公司,批号:PA0025)。

### 1.4 主要仪器

超声雾化器(南京道芬电子有限公司,型号:S888E);小动物呼吸机与气道阻力和肺顺应性分析软件(美国 BUXCO 公司,型号:DHX-50);显微镜[麦克奥迪(厦门)电气股份有限公司,型号:BA210T];台式冷冻离心机(中国湖南湘仪离心机仪器有限公司,型号:H1650R);电泳仪、转膜仪(中国北京六一生物科技有限公司,型号:DYY-6C、DYCZ-40D);荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo 公司,型号:PIKORE-AL96);透明雾化吸入箱(34 cm×45 cm×50 cm,课题组自制)。

## 2 实验方法

### 2.1 实验动物分组及给药

SPF 级 SD 大鼠 80 只,适应性喂养 3 d 后,采用随机数字表法取 20 只作为空白组,60 只作为造模组,参考文献[9]复制哮喘大鼠模型。将造模组大鼠于试验第 1 天及第 7 天予卵清白蛋白与氢氧化铝佐剂的混合液共 1 mL(含 1 mg 卵清白蛋白和 200 mg 氢氧化铝佐剂)五点(双侧足心、双侧腹股沟皮下、腹腔)注射致敏。于实验第 15 天开始,将大鼠置于密封性良好的雾化箱中,予以 1%卵清白蛋白溶液雾化以激发哮喘。空白组用生理盐水雾化,每次持续 30 min,隔天 1 次,连续 2 周。第 30 天,于两组中各随机取 10 只测气道反应性,气道阻力升高提示造模成功。造模成功后,将造模组剩余的 50 只大鼠随机分为 5 组(模型组、五虎汤低剂量组、五虎汤中剂量组、五虎汤高剂量组及地塞米松组),每组 10 只,剩余 10 只空白组大鼠作为正常组。于第 31 天开始,根据课题组前期实验研究及人与大鼠体表面积比值折算,五虎汤各剂量组分别灌胃相应剂量五虎汤(高、中、低剂量分别为 4.428、2.214、1.107 g/kg),地塞米松组

灌胃 0.075 mg/kg 地塞米松,正常组及模型组采用等容积生理盐水灌胃,每日 1 次,连续 2 周。

## 2.2 气道反应性测定

于末次雾化激发 24 h 后,从空白组和造模组中分别随机抽取 10 只大鼠进行气道反应性测定,验证造模是否成功。末次给药 24 h 后,对各组大鼠进行气道反应性检测。大鼠麻醉后切开气管,进行气管插管后,把大鼠放入体描箱中,连接呼吸机,调整呼吸机参数,频率为 75 次/min,潮气量为 8 mL/kg,记录初始的气道压力、流速以及潮气量变化,待大鼠气道压力平稳后,雾化吸入 0.1 mL 不同浓度的乙酰胆碱(0、6.25、12.5、25、50  $\mu\text{g/mL}$ ),每次吸入乙酰胆碱后,收集吸入后 5 s 至 1 min 的数据,并用动物肺功能分析软件计算出最大肺阻力。

## 2.3 肺组织病理检测

取左侧肺组织放置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,经石蜡包埋、切片,分别用 HE、PAS、Masson 3 种染色方法对本标本染色,镜下观察并拍照,观察肺组织的病理变化。

## 2.4 Western blot 法检测肺组织 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、MMP-9、TIMP-1 蛋白表达水平

取右肺组织提取总蛋白,BCA 法测定蛋白质浓度。蛋白样本经 SDS-PAGE 电泳,转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,分别加入  $\alpha$ -SMA(0.5  $\mu\text{g/mL}$ )、TGF- $\beta$ 1(1:1000)、MMP-9(1:1000)、TIMP-1(1:5000)、 $\beta$ -actin(1:5000)抗体孵育过夜。TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。加入 PBST 稀释 HRP 标记的二抗,室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。采用凝胶成像系统成像扫描,用 Quantity One 4.6.6 软件进行灰度分析。

## 2.5 qPCR 法检测肺组织 miRNA-146a 及 MMP-9、TIMP-1 mRNA 表达情况

取右肺组织约 0.02 g,加入 1 mL Trizol 于匀浆器中充分研磨匀浆,混匀后室温裂解 5 min;加入 200  $\mu\text{L}$  三氯甲烷,剧烈振荡 15 s,室温静置 3 min;12 000 r/min,4  $^{\circ}\text{C}$  离心 15 min,离心半径 9 cm。取上层液,转移到新的 RNase-Free 离心管中;加入等体积的异丙醇,混匀,室温静置 10 min;12 000 r/min,4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min,离心半径 9 cm,去上清液,加入 1 mL 75% 乙醇(无菌 DEPC 处理水配制)洗涤沉淀;12 000 r/min,4  $^{\circ}\text{C}$  离心 3 min,离心半径 9 cm,去上清

液;空气干燥 5~10 min。加入 20~30  $\mu\text{L}$  无菌无酶水溶解沉淀;紫外分光光度计测定浓度,在 260 nm 与 280 nm 处测其吸光度值,并计算其浓度。各指标引物由北京擎科生物科技股份有限公司设计合成,序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列

引物	序列(5'-3')	长度/bp
$\beta$ -actin	正向:ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC	223
	反向:TACTCCTGCTTGCTGATCCAC	
miRNA-146a	正向:GCCTACAGCCATACCACCCGGAA	116
	反向:CCTACAGCACCCGGTATCCCA	
MMP-1	正向:CACTCCCTTGACTCACT	97
	反向:TATCCTCTGTTTAGCA	
TIMP-1	正向:CGCTAGAGCAGATACCACGA	140
	反向:CCAGGTCCGAGTTGCAGAAA	

## 2.6 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件对数据进行处理,结果用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间比较采用单因素方差分析,事后检验采用 LSD 法;相关性分析使用 Pearson 相关检验。 $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 空白组与造模组气道阻力比较

在乙酰胆碱浓度为 0 时,两组气道阻力差异无统计学意义( $P>0.05$ )。造模组大鼠在不同浓度乙酰胆碱(6.25、12.5、25、50  $\mu\text{g/mL}$ )激发下,均比空白组大鼠的气道阻力明显增高( $P<0.01$ ),说明造模成功。详见表 2。

表 2 空白组与造模组气道阻力比较

乙酰胆碱/ $(\mu\text{g/mL})$	[ $\bar{x}\pm s, n=10, \text{cmH}_2\text{O}/(\text{mL}\cdot\text{s})$ ]	
	空白组	造模组
0	2.10 $\pm$ 0.02	2.19 $\pm$ 0.05
6.25	4.71 $\pm$ 0.34	11.57 $\pm$ 0.46**
12.5	6.99 $\pm$ 0.90	14.54 $\pm$ 0.41**
25	8.15 $\pm$ 0.18	18.69 $\pm$ 0.56**
50	10.18 $\pm$ 0.13	22.59 $\pm$ 0.44**

注:与空白组比较,\*\* $P<0.01$ 。

### 3.2 各组大鼠气道阻力比较

在乙酰胆碱浓度为 0 时,各组气道阻力差异无统计学意义( $P>0.05$ )。在其他浓度乙酰胆碱(6.25、12.5、25、50  $\mu\text{g/mL}$ )激发下,模型组大鼠的气道阻力均比正常组大鼠明显增高( $P<0.01$ );与模型组相比,

表3 各组大鼠气道阻力比较 $[\bar{x}\pm s, n=10, \text{cmH}_2\text{O}/(\text{mL}\cdot\text{s})]$ 

乙酰胆碱( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	正常组	模型组	地塞米松组	五虎汤低剂量组	五虎汤中剂量组	五虎汤高剂量组
0	2.11±0.04	2.18±0.04	2.11±0.04	2.14±0.06	2.14±0.05	2.11±0.06
6.25	4.57±0.10	10.57±0.10**	4.75±0.08 <sup>#</sup>	8.71±0.22 <sup>###</sup>	6.71±0.23 <sup>###</sup>	4.88±0.09 <sup>###</sup>
12.5	6.69±0.06	13.86±0.11**	6.97±0.07 <sup>#</sup>	10.08±0.15 <sup>###</sup>	8.33±0.14 <sup>###</sup>	7.14±0.10 <sup>###</sup>
25	8.70±0.06	17.45±0.20**	9.05±0.06 <sup>#</sup>	15.10±0.31 <sup>###</sup>	12.50±0.33 <sup>###</sup>	9.32±0.09 <sup>###</sup>
50	10.16±0.02	21.65±0.11**	11.02±0.20 <sup>#</sup>	18.30±0.18 <sup>###</sup>	15.56±0.37 <sup>###</sup>	11.36±0.26 <sup>###</sup>

注:与正常组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与地塞米松组比较,<sup>###</sup> $P<0.01$ ;与五虎汤低剂量组比较,<sup>▲</sup> $P<0.01$ ;与五虎汤中剂量组比较,<sup>△</sup> $P<0.01$ 。

五虎汤各组及地塞米松组大鼠气道阻力均显著降低( $P<0.01$ );与地塞米松组相比,五虎汤中、低剂量组气道阻力明显升高( $P<0.01$ );与五虎汤低剂量组相比,五虎汤高、中剂量组大鼠气道阻力明显降低( $P<0.01$ );与五虎汤中剂量组相比,五虎汤高剂量组大鼠气道阻力显著下降( $P<0.01$ )。详见表3。

### 3.3 各组大鼠染色情况比较

3.3.1 HE染色观察气道炎症细胞浸润情况 正常组大鼠支气管结构正常,支气管黏膜平整,气管四周无明显炎症细胞浸润;而模型组可见气管四周有明显炎症细胞浸润;五虎汤低、中、高剂量组和地塞米松组大鼠炎症细胞浸润明显减轻。详见图1。

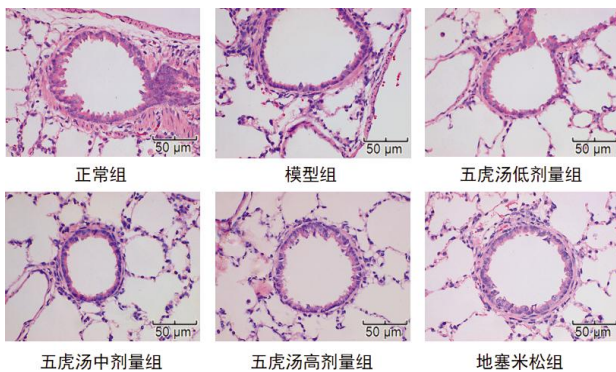


图1 五虎汤对哮喘幼龄SD大鼠肺组织气道炎症的影响(HE,×400)

3.3.2 PAS染色观察气道黏液储备情况 正常组大鼠支气管管腔完整,无明显气道杯状上皮细胞增生,无明显黏液;与正常组相比,模型组大鼠支气管气道杯状上皮细胞增生,黏液较多;与模型组相比,五虎汤低、中、高剂量组以及地塞米松组上述肺组织损伤情况均有所缓解。详见图2。

3.3.3 Masson染色观察气道胶原沉积情况 正常组大鼠支气管形态规则,管腔完整,无明显气道胶原沉积;与正常组相比,模型组大鼠气道壁增厚,气道

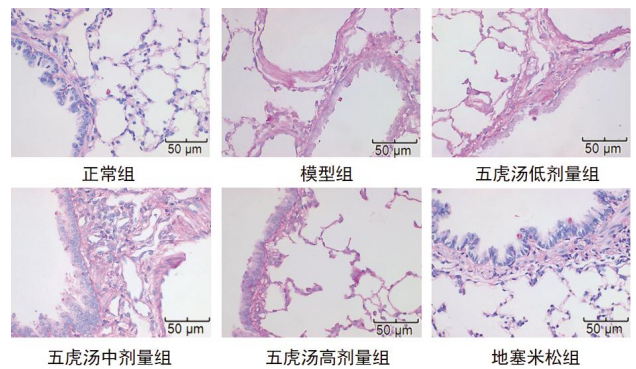


图2 五虎汤对哮喘幼龄SD大鼠肺组织气道黏膜的影响(PAS,×400)

胶原广泛沉积;与模型组相比,五虎汤低、中、高剂量组以及地塞米松组上述肺组织损伤情况均有所缓解。详见图3。

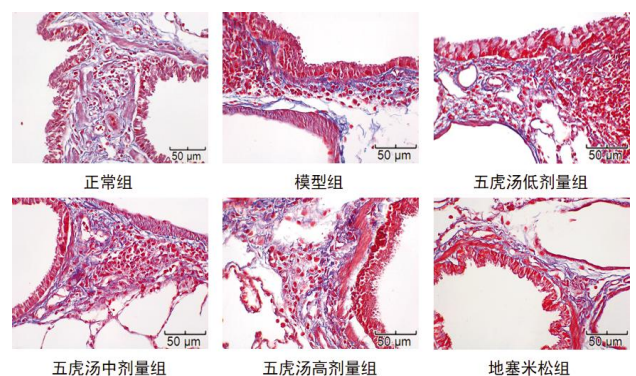


图3 五虎汤对哮喘幼龄SD大鼠肺组织气道胶原沉积的影响(Masson,×400)

3.4 各组大鼠肺组织 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、MMP-9、TIMP-1蛋白表达比较

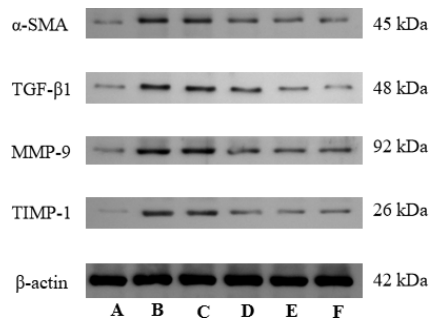
模型组 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、MMP-9、TIMP-1均显著高于正常组( $P<0.01$ );五虎汤低、中、高剂量组及地塞米松组 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、MMP-9、TIMP-1较模型组均显著下降( $P<0.01$ );五虎汤中、低剂量组 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1及五虎汤低剂量组TIMP-1显著高于地塞米松组( $P<0.05, P<0.01$ );五虎汤中、高剂量组

表4 各组大鼠肺组织  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、MMP-9、TIMP-1 蛋白含量比较( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	$\alpha$ -SMA	TGF- $\beta$ 1	MMP-9	TIMP-1
正常组	0.05 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01
模型组	0.19 $\pm$ 0.01**	0.27 $\pm$ 0.05**	0.38 $\pm$ 0.05**	0.41 $\pm$ 0.06**
地塞米松组	0.06 $\pm$ 0.01 <sup>#</sup>	0.06 $\pm$ 0.01 <sup>#</sup>	0.18 $\pm$ 0.01 <sup>#</sup>	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>#</sup>
五虎汤低剂量组	0.14 $\pm$ 0.01 <sup>##</sup>	0.18 $\pm$ 0.01 <sup>##</sup>	0.23 $\pm$ 0.03 <sup>#</sup>	0.20 $\pm$ 0.02 <sup>##</sup>
五虎汤中剂量组	0.11 $\pm$ 0.00 <sup>###</sup>	0.14 $\pm$ 0.00 <sup>###</sup>	0.20 $\pm$ 0.01 <sup>#</sup>	0.10 $\pm$ 0.01 <sup>##</sup>
五虎汤高剂量组	0.09 $\pm$ 0.01 <sup>###</sup>	0.10 $\pm$ 0.01 <sup>###</sup>	0.15 $\pm$ 0.04 <sup>#</sup>	0.06 $\pm$ 0.01 <sup>##</sup>

注:与正常组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与地塞米松组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与五虎汤低剂量组比较,<sup>###</sup> $P<0.01$ ;与五虎汤中剂量组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,<sup>△△</sup> $P<0.01$ 。

$\alpha$ -SMA、TIMP-1 及五虎汤高剂量组 TGF- $\beta$ 1 低于五虎汤低剂量组( $P<0.05$ 、 $P<0.01$ );五虎汤高剂量组  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 低于五虎汤中剂量组( $P<0.05$ 、 $P<0.01$ )。详见表4、图4。

图4 各组大鼠肺组织中  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、MMP-9、TIMP-1 表达蛋白条带图

注:A.正常组;B.模型组;C.五虎汤低剂量组;D.五虎汤中剂量组;E.五虎汤高剂量组;F.地塞米松组。

### 3.5 各组大鼠肺组织 miRNA-146a 及 MMP-9 mRNA、TIMP-1 mRNA 表达情况比较

模型组 miRNA-146a、MMP-9 mRNA、TIMP-1 mRNA 均显著高于正常组( $P<0.01$ );五虎汤低、中、高剂量组及地塞米松组 miRNA-146a、MMP-9 mRNA、TIMP-1 mRNA 均显著低于模型组( $P<0.01$ );五虎汤中、低剂量组 miRNA-146a、MMP-9 mRNA、TIMP-1

mRNA 均高于地塞米松组( $P<0.01$ 、 $P<0.05$ );五虎汤中、高剂量组 miRNA-146a、MMP-9 mRNA、TIMP-1 mRNA 均显著低于五虎汤低剂量组( $P<0.01$ );五虎汤高剂量组 miRNA-146a、TIMP-1 mRNA 低于五虎汤中剂量组( $P<0.05$ )。详见表5。

表5 各组大鼠肺组织 miRNA-146a 及 MMP-9 mRNA、TIMP-1 mRNA 表达情况比较( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	miRNA-146a	MMP-9 mRNA	TIMP-1 mRNA
正常组	1.03 $\pm$ 0.41	0.96 $\pm$ 0.20	0.79 $\pm$ 0.28
模型组	8.96 $\pm$ 1.07**	6.79 $\pm$ 0.87**	4.98 $\pm$ 0.81**
地塞米松组	1.98 $\pm$ 0.40 <sup>#</sup>	1.92 $\pm$ 0.30 <sup>#</sup>	1.30 $\pm$ 0.23 <sup>#</sup>
五虎汤低剂量组	6.53 $\pm$ 1.00 <sup>##</sup>	5.03 $\pm$ 0.68 <sup>##</sup>	3.61 $\pm$ 0.45 <sup>##</sup>
五虎汤中剂量组	3.88 $\pm$ 0.84 <sup>###</sup>	3.07 $\pm$ 0.35 <sup>###</sup>	2.43 $\pm$ 0.33 <sup>###</sup>
五虎汤高剂量组	2.71 $\pm$ 0.37 <sup>###</sup>	2.38 $\pm$ 0.30 <sup>###</sup>	1.85 $\pm$ 0.24 <sup>###</sup>

注:与正常组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与地塞米松组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与五虎汤低剂量组比较,<sup>###</sup> $P<0.01$ ;与五虎汤中剂量组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

### 3.6 肺组织 miRNA-146a 与 MMP-9 mRNA、TIMP-1 mRNA 相关性分析

大鼠肺组织 miRNA-146a 水平与 MMP-9 mRNA、TIMP-1 mRNA 均有极强、正相关性( $r$  分别为0.956、0.973, $P<0.01$ ),MMP-9 mRNA 与 TIMP-1 mRNA 呈极强、正相关性( $r$  为0.947, $P<0.01$ )。详见表6。

表6 肺组织 miRNA-146a、MMP-9、TIMP-1 之间的相关性分析

指标	$r/P$ 值	miRNA-146a	MMP-9 mRNA	TIMP-1 mRNA
miRNA-146a	$r$ 值		0.956	0.973
	$P$ 值		0.000	0.000
MMP-9 mRNA	$r$ 值	0.956		0.947
	$P$ 值	0.000		0.000
TIMP-1 mRNA	$r$ 值	0.973	0.947	
	$P$ 值	0.000	0.000	

## 4 讨论

支气管哮喘是儿科常见的慢性呼吸系统疾病之一,其发病机制复杂,病理改变主要表现为慢性气道炎症、气道高反应性、气道重塑等。气道重塑主要表现为上皮纤维化伴基底膜增厚、成纤维细胞和肌成纤维细胞聚集、纤维生长因子分泌增加、近端气道上皮细胞外基质沉积、气道平滑肌增厚、杯状细胞增生、血管再生等一系列复杂改变<sup>[10-11]</sup>,是哮喘治疗最为棘手的问题。古方五虎汤由麻黄、苦杏仁、生石膏、生甘草、细茶叶组成,具有清肺化痰、止咳平喘之效,本课题组前期研究已经证实,五虎汤可以有效缓解气道重塑<sup>[9]</sup>,但其具体机制尚未完全阐明。

本研究通过卵清白蛋白与氢氧化铝佐剂的混合液五点注射致敏以及卵清白蛋白雾化以激发哮喘,成功建立幼龄大鼠哮喘模型,造模组气道阻力升高,提示造模成功。治疗后发现,五虎汤可有效降低大鼠气道阻力。而肺组织病理学结果提示模型组气管四周可见大量炎症细胞浸润,支气管气道杯状上皮细胞增生,黏液较多,气道壁增厚,气道胶原广泛沉积,而五虎汤各组及地塞米松组上述表现均明显好转,可见五虎汤可明显改善哮喘小鼠的气道重塑及气道炎症,减少黏液储备。

既往研究表明, $\alpha$ -SMA 是反映哮喘气道平滑肌细胞数量的敏感指标,是哮喘早期气道重塑的重要指标之一,能促进胶原的沉积及纤维化,还能诱导肺成纤维细胞聚集,导致细胞外基质过度沉积,加速气道重塑的形成<sup>[12-13]</sup>。此外,TGF- $\beta$ 1 能够刺激支气管哮喘患儿气道平滑肌细胞增殖,诱导气道细胞向纤维细胞转化,促进细胞外基质合成及上皮胶原沉积,进一步促进哮喘气道重塑<sup>[14-15]</sup>。本实验研究表明,幼龄哮喘大鼠肺组织  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 显著上升,进一步说明了气道重塑的形成,与上述研究结果一致,经过五虎汤干预后, $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 值均明显下降,进一步说明了五虎汤对气道重塑有明显的缓解作用。

miRNA 是非蛋白质编码的小分子 RNA,长度约 2125 核糖核苷酸<sup>[16]</sup>。越来越多证据显示,miRNA 参与不同生物进程,包括细胞增殖、变异和凋亡<sup>[17]</sup>。哮喘作为一种多基因遗传病,其发病机制至今仍未阐明<sup>[18]</sup>。而现有的研究显示,miRNA 对靶基因 mRNA 的

调控作用在哮喘的发展和发病机制中起着重要作用<sup>[19]</sup>。miRNA-146a 是哮喘患者肺组织中表达最明显的一类 miRNA,并在哮喘的发展过程中存在异常表达<sup>[7]</sup>。本研究结果显示,模型组 miRNA-146a 表达显著升高,这与汪成伟等<sup>[20]</sup>的研究结果一致。经过五虎汤干预后,miRNA-146a 表达显著降低,说明五虎汤治疗哮喘的效应机制可能与调节 miRNA-146a 相关。

MMP-9 是调节细胞外基质的主要限速酶,与 TIMP-1 共同维持着细胞外基质的正常生长和机体内环境的稳定<sup>[21]</sup>。MMP-9 可以通过降解以 IV 型胶原为主的细胞外基质和血管中的胶原成分,诱导气道平滑肌细胞增殖、分化、迁移至气道壁和血管外,增加平滑肌肌层厚度和促进新生血管形成,引发气道重塑<sup>[22]</sup>。TIMP-1 通过与 MMP-9 发生特异性结合而抑制 MMP-9 的活性,阻碍细胞外基质的降解,使其在气道内过度沉积而引起气道壁增厚,进而导致气道重塑<sup>[23]</sup>。因此,通过调控 MMP-9 和 TIMP-1 可以干预哮喘气道重塑。高凤丽等<sup>[24]</sup>证实,哮喘颗粒可能通过抑制 MMP-9 和 TIMP-1 的表达来减轻哮喘小鼠肺组织病理学改变,改善气道重塑。本研究结果显示,模型组肺组织 MMP-9 和 TIMP-1 蛋白及其 mRNA 表达明显上升,提示 MMP-9、TIMP-1 上升是气道重塑的重要机制,经五虎汤干预后,MMP-9 和 TIMP-1 蛋白及其 mRNA 表达显著降低,提示五虎汤可通过降低 MMP-9 和 TIMP-1 有效改善气道重塑。此外,相关性分析显示,大鼠肺组织 miRNA-146a 水平与 MMP-9 mRNA、TIMP-1 mRNA 均有极强、正相关性,而 miRNA 对 mRNA 有靶向调控作用,因此,五虎汤可能通过 miRNA-146a 靶向调控 MMP-9 mRNA、TIMP-1 mRNA 影响气道重塑的发生发展。

综上所述,五虎汤能够有效改善哮喘大鼠气道重塑,这可能与五虎汤通过抑制 miRNA-146a 的表达,从而降低 MMP-9、TIMP-1 及其 mRNA,以及减少  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 相关。但本实验尚有不足之处,未使用 miRNA-146a 抑制剂及激动剂进行干预,后续将继续从细胞层次进一步对其进行深入研究。

## 参考文献

[1] PAPI A, BRIGHTLING C, PEDERSEN S E, et al. Asthma[J].

- Lancet, 2018, 391(10122): 783-800.
- [2] MURRAY C S, JACKSON D J, TEAGUE W G. Prevention and outpatient treatment of asthma exacerbations in children[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2021, 9(7): 2567-2576.
- [3] CASTILLO J R, PETERS S P, BUSSE W W. Asthma exacerbations: Pathogenesis, prevention, and treatment[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2017, 5(4): 918-927.
- [4] 白诗瑶, 任媛, 李孟露, 等. 支气管哮喘气道血管再生与重塑的研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2020, 40(18): 1399-1404.
- [5] 张鑫, 王孟清, 罗银河, 等. RSV 诱导哮喘小鼠树突细胞自噬机制及五虎汤的干预作用[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(1): 39-45.
- [6] SHARMA R, TIWARI A, MCGEACHIE M J. Recent miRNA research in asthma[J]. Current Allergy and Asthma Reports, 2022, 22(12): 231-258.
- [7] STORLIE C B, BRANDA M E, GIONFRIDDO M R, et al. Prediction of individual outcomes for asthma sufferers[J]. Biostatistics, 2018, 19(4): 579-593.
- [8] 何桂媛, 李文新, 王莉, 等. miR-146 在支气管哮喘发生发展中的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2018, 34(10): 1737-1739.
- [9] 梁磊, 张宇婧, 李淑娣, 等. 搜风愈喘方抑制哮喘大鼠气道重塑的作用机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(1): 50-56.
- [10] CAMORETTI-MERCADO B, LOCKEY R F. Airway smooth muscle pathophysiology in asthma[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2021, 147(6): 1983-1995.
- [11] BOULET L P. Airway remodeling in asthma: Update on mechanisms and therapeutic approaches[J]. Current Opinion in Pulmonary Medicine, 2018, 24(1): 56-62.
- [12] 姚欢欢, 陈吉, 李岚. 桔梗多糖对哮喘小鼠气道炎症和气道重塑的影响[J]. 中国中医药科技, 2020, 27(5): 701-707.
- [13] JEROME J A, WENZEL S E, TREJO BITTAR H E. Digital imaging analysis reveals reduced alveolar  $\alpha$ -smooth muscle actin expression in severe asthma[J]. Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology, 2021, 29(7): 506-512.
- [14] 沈王丰, 肖磊, 梁小红, 等. “平喘汤”通过调控 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路抑制哮喘大鼠气道重塑机制研究[J]. 江苏中医药, 2023, 55(1): 67-72.
- [15] YUAN J, ZHANG W. Expression and significance of TGF- $\beta$ 1 in infant asthma model[J]. Cellular and Molecular Biology, 2022, 68(7): 51-55.
- [16] BUSHATI N, COHEN S M. microRNA functions[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2007, 23: 175-205.
- [17] 郭慧葛, 孙四玉, 林飞, 等. circRNA/miRNA/mRNA 的生物学功能及其对动脉粥样硬化的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(1): 80-87.
- [18] GOMEZ J L. Epigenetics in Asthma[J]. Current Allergy and Asthma Reports, 2019, 19(12): 56.
- [19] LI J, PANGANIBAN R, KHO A T, et al. Circulating microRNAs and treatment response in childhood asthma[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2020, 202(1): 65-72.
- [20] 汪成伟, 王飞, 李东涛, 等. miR-146a 在哮喘患儿痰液中的表达及对哮喘小鼠气道炎症的影响[J]. 解剖科学进展, 2017, 23(6): 583-586.
- [21] 范改焕, 禹香菊, 赵宪文. 支气管哮喘患儿血清 IgE 和痰液 MMP-9、TNF- $\alpha$  表达关系及意义[J]. 实验与检验医学, 2019, 37(1): 82-84.
- [22] BARBARO M P, SPANEVELLO A, PALLADINO G P, et al. Exhaled matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in different biological phenotypes of asthma[J]. European Journal of Internal Medicine, 2014, 25(1): 92-96.
- [23] HE Q, LIU C, SHEN L, et al. Theory of the exterior-interior relationship between the lungs and the large intestine to explore the mechanism of Eriobotrya japonica leaf water extract in the treatment of cough variant asthma[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 281: 114482.
- [24] 高风丽, 李竹英. 平喘颗粒对哮喘小鼠肺组织 MMP-9 和 TIMP-1 水平的影响[J]. 中国中医急症, 2021, 30(2): 230-232, 237.

(本文编辑 周旦)