

本文引用:江智豪,胡燕,王孟清,丁伊,邓奕,邓梦婷.五虎汤通过干预炎症记忆对咳嗽变异性哮喘小鼠的治疗作用[J].湖南中医药大学学报,2021,41(4):512-517.

五虎汤通过干预炎症记忆对咳嗽变异性哮喘小鼠的治疗作用

江智豪¹,胡燕^{2*},王孟清²,丁伊¹,邓奕¹,邓梦婷¹

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

【摘要】目的 探讨五虎汤对咳嗽变异性哮喘(cough variant asthma, CVA)小鼠可能的作用机制。**方法** 将70只BALB/c小鼠分为空白组、CVA组、CVA再激发组、地塞米松组和五虎汤低、中、高剂量组,每组10只。除空白组外,其余各组采用鸡卵蛋白(ovalbumin, OVA)致敏法激发建立CVA模型。休息30d后,空白组与CVA组用生理盐水进行新一轮雾化,其余组用OVA进行新一轮雾化激发。五虎汤低、中、高剂量组分别灌胃1.6、3.2、6.4 g/kg五虎汤,地塞米松组腹腔注射1.82 mg/kg地塞米松,空白组、CVA组、CVA再激发组灌胃等体积生理盐水,1次/d,连续10d后处理小鼠。分离肺组织制作病理切片,行HE及PAS染色;采集肺泡灌洗液进行细胞计数;并用ELISA法检测血清IgE、IFN- γ 及IL-4、IL-5、IL-23的含量;流式细胞术检测肺组织中记忆T细胞CD4⁺Tm亚群的比例。**结果** 肺组织HE及PAS病理染色显示:空白组小鼠肺部无炎性细胞浸润;CVA组小鼠肺部有少许的炎性细胞浸润;CVA再激发组小鼠气道炎症、官腔狭窄表现更为明显;五虎汤各剂量组及地塞米松组小鼠的气道炎症均有不同程度的缓解。肺泡灌洗液中细胞计数结果显示:CVA组较空白组升高;CVA再激发组较CVA组升高;五虎汤各剂量组及地塞米松组降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);五虎汤各剂量组与地塞米松组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。ELISA检测结果显示:CVA组的IL-4、IL-5、IL-23、IgE水平较空白组上升($P<0.05$),IFN- γ 水平较空白组下降($P<0.05$);CVA再激发组的IL-4、IL-5、IL-23、IgE水平较CVA组上升($P<0.05$),IFN- γ 水平较CVA组下降($P>0.05$);五虎汤各剂量组及地塞米松组与CVA再激发组比较,出现各细胞因子水平的回调,差异均有统计学意义($P<0.05$);五虎汤各剂量组与地塞米松组相比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。流式细胞术检测肺部组织CD4⁺Tm亚群结果显示:记忆性T细胞的占比情况,CVA组与空白组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);CVA再激发组与CVA组相比则明显上升,差异有统计学意义($P<0.05$);五虎汤各剂量组及地塞米松组均减低,与CVA再激发组相比,差异有统计学意义($P<0.05$);五虎汤各剂量组与地塞米松组相比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 五虎汤可通过降低记忆性T细胞、减少IgE和炎性细胞因子的分泌、纠正细胞因子失衡,从而调控炎症记忆而发挥治疗CVA的作用。

【关键词】 咳嗽变异性哮喘;五虎汤;T细胞;炎症记忆

【中图分类号】R256.1

【文献标志码】A

【文章编号】doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.04.004

Therapeutic Effect of Wuhu Decoction on Mice with Cough Variant Asthma by Intervening Inflammatory Memory

JIANG Zhihao¹, HU Yan^{2*}, WANG Mengqing², DING Yi¹, DENG Yijue¹, DENG Mengting¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

【Abstract】Objective To explore the possible mechanism of Wuhu Decoction on mice with cough variant asthma (CVA). **Methods** 70 BALB/c mice were divided into blank group, CVA group, CVA re-challenge group, dexamethasone group and Wuhu Decoction low, medium and high dose groups, with 10 mice in each group. Except the blank group, the other groups were

【收稿日期】2020-12-30

【基金项目】国家自然科学基金项目(81774368);湖南中医药大学校级科研基金项目(2019XJJ0512);湖南省研究生科研创新资助项目(CX20190580);湖南省教育厅科研项目(20B440);2017年省级财政中医药项目(rsk01002)。

【作者简介】江智豪,男,在读本科生,研究方向:小儿肺系疾病。

【通讯作者】*胡燕,女,主治医师,硕士,E-mail:51125158@qq.com。

stimulated by the ovalbumin sensitization method to establish the CVA model. After resting for 30 days, the blank group and CVA group were given a new round of nebulization with normal saline, and the other groups were given a new round of nebulization with OVA. The Wuhu Decoction low, medium, and high dose groups were administered with 1.6, 3.2, and 6.4 g/kg Wuhu Decoction, respectively, the dexamethasone group was intraperitoneally injected with 1.82 mg/kg dexamethasone, and the blank group, CVA group, and CVA re-challenge group were intragastrically treated with the same volume of normal saline, once a day, for 10 consecutive days. Lung tissues were separated to make pathological sections, then HE and PAS staining were performed; alveolar lavage fluid was collected for cell count; and ELISA method was used to detect serum IgE, IFN- γ and IL-4, IL-5, IL-23 content; flow cytometry was used to detect the proportion of CD4⁺ Tm subsets of memory T cells in lung tissue. **Results** The HE and PAS pathological staining of lung tissues showed that the lung of mice of the blank group had no inflammatory cell infiltration; the lung of mice of the CVA group had a little inflammatory cell infiltration; the airway inflammation and stenosis of the CVA group was more obvious; the airway inflammation of the mice in each dose group of Wuhu Decoction and the dexamethasone group all alleviated to varying degrees. The cell count results in alveolar lavage showed that the CVA group was higher than that of the blank group; the CVA re-challenge group was higher than that of the CVA group; each dose group of Wuhu Decoction and the dexamethasone group were lower, the differences were statistically significant ($P<0.05$); compared with the dexamethasone group, each dose group of Wuhu Decoction were no statistically significant differences ($P>0.05$). ELISA test results showed that the levels of IL-4, IL-5, IL-23 and IgE in the CVA group were higher than those in the blank group ($P<0.05$), and the level of IFN- γ was lower than that in the blank group ($P<0.05$); the levels of IL-4, IL-5, IL-23, and IgE of CVA re-challenge group were higher than those in the CVA group ($P<0.05$), and the level of IFN- γ was lower than the CVA group ($P>0.05$); each dose group of Wuhu Decoction and dexamethasone group compared with the CVA re-challenging group, there were a callback in the levels of each cytokine, and the differences were statistically significant ($P<0.05$); compared with the dexamethasone group, each dose group of Wuhu Decoction were no statistically significant differences ($P>0.05$). The results of CD4⁺ Tm subgroups in lung tissues detected by flow cytometry showed that the proportion of memory T cells was not statistically significant between the CVA group and the blank group ($P>0.05$); compared with the CVA group, the ratio of the CVA re-challenge group was increased significantly, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); each dose group of Wuhu Decoction and the dexamethasone group decreased, compared with the CVA re-challenge group, the differences were statistically significant ($P<0.05$); compared with the dexamethasone group, each dose group of Wuhu Decoction were no significant difference ($P>0.05$). **Conclusion** Wuhu Decoction can treat CVA by reducing memory T cells, reducing the secretion of IgE and inflammatory cytokines, and correcting cytokine imbalance, thereby regulating inflammatory memory.

[**Keywords**] cough variant asthma; Wuhu Decoction; T cell; inflammatory memory

咳嗽变异性哮喘(cough-variant asthma, CVA)是引起儿童反复或慢性咳嗽的重要原因,临床上表现为4周以上的咳嗽,无感染征象,不伴有喘息^[1]。当前的流行病学调查显示,CVA占中国儿童慢性咳嗽的比例高达41.95%^[2]。CVA治疗不及时,导致症状迁延不愈,不仅影响患儿的生长发育,还有1/3比例CVA患儿发展为典型的哮喘^[3]。CVA由多种因素共同作用,发病机制复杂,被认为是一种特殊类型的早期哮喘^[4],气道的慢性炎症为其主要病理表现^[5]。在临床中发现,咳嗽反复的CVA患儿存在炎症记忆的现象,即第二次就诊时临床表现较第一次发病更强烈,本病在中医学中属于哮喘“苗期”,主张早期采取措施进行治疗^[6],以中药五虎汤治疗取得了良好的疗效^[7]。本次研究在动物实验中构建CVA小鼠模型,对CVA病程中是否存在炎症记忆及五虎汤是否通过干预炎症记忆发挥作用进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级雌性BALB/c小鼠,4~5周龄,体质量15~18 g。所有动物均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。实验方案经湖南中医药大学动物实验伦理委员会批准,伦理审批号:2020072202。

1.1.2 药物 五虎汤的组成药材由湖南中医药大学第一附属医院药房提供。根据古籍记载与临床应用,单剂五虎汤的用量拟定为:炙麻黄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。把药物混合加入5倍剂量的蒸馏水中,首先浸泡30 min,然后回流提取40 min,将煎煮液滤净后再加入5倍量蒸馏水,再回流提取40 min,将前后两次煎液混匀,使用旋转蒸发仪浓缩成含生药

2.46 kg/L的五虎汤灌胃药液。地塞米松(批号:S1039,美国Sigma公司);鸡卵清蛋白(ovalbumin, OVA,批号:9006-59-1,上海Solarbio公司);氯化乙酰胆碱(批号:2260-50-6,美国Selleck公司)。

1.1.3 主要试剂及仪器 苏木精-伊红染色液(批号:P032IH),中性树胶(批号:P033IH),二甲苯(批号:10023418),无水乙醇(批号:10009218)均购自国药控股湖南有限公司;IL-4(批号:E20181109001)、IL-5(批号:E20181109017)、IL-23(批号:E20181109019)、IFN- γ (批号:E20180713006)与总IgE(批号:E20181109003)ELISA试剂盒均购自上海晶天生物科技有限公司。

MACSQuant Analyzer 流式细胞仪(型号:130-092-197,德国Miltenyi公司);超声雾化器(型号:S888E,南京道芬电子有限公司);小动物呼吸机(型号:DHX-50,美国BUXCO公司);生物组织摊烤片机(型号:YT-6C,孝感宏翔生物医械技术有限公司);透射电子显微镜(型号:HT7700,日立高新技术公司);台式离心机(型号:12008007,金坛市大地自动化仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组 将小鼠编号后,随机分为空白组15只、造模组65只,从两组中分别随机选5只小鼠以小动物呼吸机检测气道反应性,验证造模是否成功,再将造模组分为CVA组、CVA再激发组、地塞米松组和五虎汤低、中、高剂量组。共7组,每组10只。

1.2.2 动物模型建立及给药 采用OVA和氢氧化铝联合激发致敏建立CVA小鼠模型^[8-9]。所有小鼠适应性喂养7d后,在第1、7、14天,空白组小鼠腹腔注射生理盐水200 μ L/只,其他各组小鼠腹腔注射200 μ L的致敏液(含OVA 100 μ g,氢氧化铝20 μ g,溶解于生理盐水之中)以致敏。末次致敏7d之后,将空白组放入自制的雾化箱内以10 mL的生理盐水进行超声雾化,其余各组小鼠则以10 mL的1.5% OVA进行超声雾化激发,30 min/d,连续激发10 d。休息30 d后,空白组与CVA组用10 mL生理盐水替代1.5% OVA进行新一轮雾化,同时给予生理盐水灌胃。其余组小鼠则用10 mL 1.5% OVA再进行新一轮雾化激发,本轮雾化前1 h,CVA再激发组给予生理盐水灌胃,五虎汤低、中、高剂量组灌胃1.6、3.2、6.4 g/kg的五虎汤药液,地塞米松组腹腔注射1.82 mg/kg地塞米松,连续10 d后取材检测。

1.2.3 气道反应性检测 将小鼠麻醉,待小鼠四肢松弛后,将小鼠固定消毒,外科剪切开颈部皮肤,暴露气管,予静脉留置针行颈静脉穿刺固定,V字形剪开气管,用深静脉穿刺针做气管插管,接小动物呼吸机,行气管切开插管固定。呼吸机参数调整至呼吸频率75次/min,潮气量为8 mL/kg。记录气道压力、气道流量和潮气量的变化。待小鼠气道压力稳定后用0.1 mL不同浓度的乙酰胆碱(0、6.25、12.5、25、50 μ g/mL)雾化。吸入乙酰胆碱后,收集吸入5 s至1 min的数据,以计算机动物肺功能分析软件检测基础吸气相气道阻力和用药后的气道阻力,以气道阻力的变化代表气道反应性。

1.2.4 肺组织病理检测 将小鼠胸腔打开,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两种染色方法对标本染色,镜下观察并拍照。

1.2.5 BALF中细胞计数 实验结束后,打开小鼠胸腔,暴露主支气管及肺组织,以PBS进行离体肺泡灌洗,回收BALF,测定细胞总数及嗜酸性粒细胞百分比。

1.2.6 ELISA法测定细胞因子水平 采集小鼠外周血血清,依据ELISA试剂盒说明书的方法步骤测定小鼠血清中总IgE及IL-4、IL-5、IL-23、IFN- γ 的水平。

1.2.7 流式细胞术检测各组肺组织记忆T细胞亚群 将新鲜肺组织碾碎,制成混悬液,参考文献^[10]对肺组织中CD4⁺Tm细胞所占比例进行流式细胞术检测,每组重复测3次。

1.3 统计学方法

应用SPSS 25.0软件进行统计分析,数据均采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,两组之间比较满足正态分布者采用 t 检验,多组之间比较,首先进行正态分布检验,若符合正态分布,两组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐者采用LSD检验,不齐者用Dunnett's T3检验,若不满足则用秩和检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 空白组与CVA组小鼠气道阻力值比较

乙酰胆碱浓度为0 μ g/mL时,空白组与CVA组气道阻力值差异无统计学意义($P>0.05$);随着吸入乙酰胆碱浓度的逐渐增加,两组气道阻力值增高,乙酰胆碱浓度为6.25、12.5、25、50 μ g/mL时,CVA

组的气道阻力值明显高于空白组($P<0.05$),气道阻力值增高代表气道反应性增强,是CVA的重要标志,表明造模成功。见表1。

表1 空白组与CVA组小鼠气道阻力比较

乙酰胆碱/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	气道阻力/ $(\text{cmH}_2\text{O}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{S}^{-1})$	
	空白组	CVA组
0	2.05±0.18	2.26±0.21
6.25	3.52±0.35	10.78±1.03**
12.5	5.97±0.68	13.37±0.93**
25	8.28±0.91	20.28±1.18**
50	10.94±0.74	26.48±2.08**

注:与空白组比较,** $P<0.01$

2.2 各组小鼠肺组织病理变化情况

空白组的小鼠支气管结构正常,支气管黏膜平整,无黏液腺增生及黏膜的基底膜增厚,管腔内未见纤毛上皮剥离,平滑肌厚度均匀,未见炎性细胞浸润;而CVA组可见黏膜上皮层中杯状细胞增多,黏液腺增生,黏膜的基底膜增厚,黏膜下组织水肿;CVA再激发组见管壁平滑肌肥大,黏膜下及肥厚的肌层内有嗜酸性粒细胞及单核细胞浸润;在五虎汤各剂量组和地塞米松组小鼠肺组织损伤明显减

轻,炎症细胞浸润程度较CVA再激发组明显减轻。见图1。

空白组的上皮杯状细胞产生和黏液分泌正常;CVA组PAS染色阳性细胞显著增加;CVA再激发组PAS染色阳性细胞显著增加;五虎汤各剂量组以及地塞米松组上皮杯状细胞产生和黏液分泌明显降低。见图2。

2.3 各组小鼠BALF中白细胞计数及嗜酸性粒细胞百分率比较

与空白组比较,CVA组白细胞计数显著增加,嗜酸性粒细胞(eosinophilic, Eos)百分率明显上升,差异有统计学意义($P<0.05$);与CVA组比较,CVA再激发组白细胞计数及Eos的百分率增高,差异有统计学意义($P<0.05$);五虎汤低、中、高组以及地塞米松组的白细胞计数及Eos的百分率均低于CVA再激发组,差异有统计学意义($P<0.05$);五虎汤各剂量组与地塞米松组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);五虎汤各剂量组间未呈现典型的量效关系,组间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

2.4 各组小鼠血清IL-4、IL-5、IL-23、IFN- γ 及IgE水平比较

与空白组比较,CVA组中的IL-4、IL-5、IL-23、

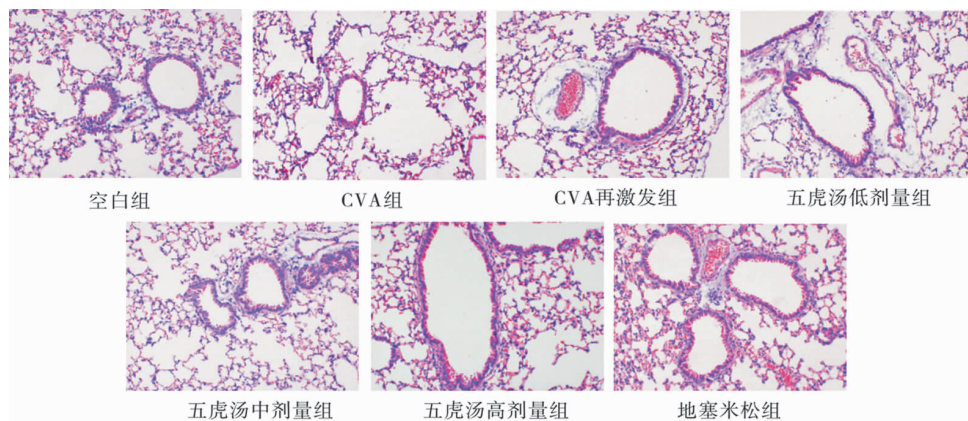


图1 各组小鼠肺部HE染色情况($\times 200$)

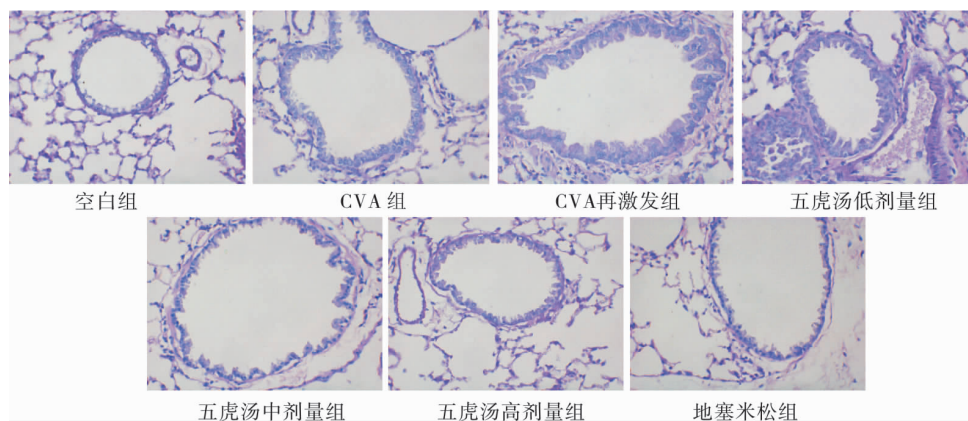


图2 各组小鼠肺部PAS染色情况($\times 200$)

表 2 各组小鼠白细胞计数及 Eos 百分率($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	白细胞计数/ $\times 10^5$	Eos 百分率/%
空白组	1.24 \pm 0.42	0.65 \pm 0.05
CVA 组	2.56 \pm 0.35*	8.85 \pm 0.52*
CVA 再激发组	4.16 \pm 0.56 Δ	13.36 \pm 0.60 Δ
五虎汤低剂量组	1.50 \pm 0.51 $\#$	4.63 \pm 0.48 $\#$
五虎汤中剂量组	1.37 \pm 0.45 $\#$	4.35 \pm 0.43 $\#$
五虎汤高剂量组	1.46 \pm 0.64 $\#$	4.51 \pm 0.45 $\#$
地塞米松组	1.31 \pm 0.39 $\#$	4.17 \pm 0.35 $\#$

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与 CVA 组比较, $\Delta P<0.05$;与 CVA 再激发组比较, $\#P<0.05$

IgE 升高,IFN- γ 明显下降,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 CVA 组比较,CVA 再激发组中的 IL-4、IL-5、IL-23、IgE 明显上升,差异有统计学意义($P<0.05$),IFN- γ 稍有降低,差异无统计学意义($P>0.05$);五虎汤各剂量组以及地塞米松组中的 IL-4、IL-5、IL-23、IgE 均低于 CVA 再激发组,IFN- γ 高于 CVA 再激发组,差异均有统计学意义($P<0.05$);五虎汤各剂量组与地塞米松组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);五虎汤各剂量组未呈现典型的量效关系,组间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

2.5 各组小鼠记忆 T 细胞亚群检测结果比较

CVA 组记忆性 T 细胞所占比例与空白组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);与 CVA 组相比,CVA 再激发组记忆性 T 细胞亚群明显增多,差异有统计学意义($P<0.05$);与 CVA 再激发组比较,五虎汤各剂量组及地塞米松组记忆性 T 细胞所占比例均降低,差异有统计学意义($P<0.05$);五虎汤各剂量组与地塞米松组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);五虎汤各剂量组未呈现典型的量效关系,组间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

3 讨论

儿童 CVA 多由尘螨、冷空气、雾霾等致敏因素引起,与免疫变态反应密切相关^[1]。CVA 患儿反复而

又长期地与过敏物质接触是导致缠绵难愈的重要原因^[12]。免疫记忆是免疫系统“记忆”过去致敏原的能力,表现为再次接触到与初次感染相同的致敏物质时,免疫系统的应答比初次应答更快速、强烈和持久^[13]。免疫记忆主要由 CD4⁺ T_H1 记忆 T 细胞来实现,有研究^[14]表明,哮喘中经过致敏的记忆 T 细胞可以存在气道黏膜与淋巴中数年之久。当前,虽未见 T 细胞炎症记忆在 CVA 中的报道,但很多专家认为 CVA 本质上属于支气管哮喘的早期阶段,与哮喘存在类似的发病机制^[15],考虑 CVA 反复发作的特点,我们推测 CVA 的发生与 T 细胞的炎症记忆有密切的关联。

古方五虎汤为小儿治喘名方,出自朱丹溪所著的《幼科全书》,由炙麻黄、苦杏仁、生石膏、生甘草、细茶叶五味药物组成,有清肺止咳的功效,是小儿肺系疾病的常用方剂^[6]。朱丹溪《医部全录·小儿哮喘嗽门》谓此方为“发散之剂,一服神效”;万全在《幼科发挥》中称:“麻黄、杏仁、甘草各等分加生石膏、腊茶叶,名五虎,神效”。五虎汤善于平喘,以往的研究多集中在五虎汤治疗以喘息为主的小儿肺炎、哮喘上^[17],近些年本课题组在临床中发现,反复发作的 CVA 患儿,虽没有喘息症状,但属于哮喘的苗期,多数表现为痰热闭肺证候,此类患儿应用五虎汤也取得了很好的疗效,推测五虎汤可通过干预免疫记忆发挥对哮喘苗期的治疗作用。本实验通过 OVA 和氢氧化铝激发致敏建立 CVA 小鼠模型,气道反应性检测与 HE、PAS 染色结果显示造模成功。经五虎汤治疗后小鼠的气道炎症均有不同程度的缓解,BALF 中细胞计数显示白细胞计数及嗜酸性粒细胞百分率降低,说明在 CVA 病程中存在二次免疫应答更强烈的现象。记忆型 T 细胞所分泌的炎性因子是气道炎症的重要指标,T 细胞所介导的炎症记忆中是否存在炎性因子分泌的失衡,进一步检测结果显示,其中 IL-4、IL-5 由 Th2 细胞产生,可促进 IgE 产生,从而刺激嗜酸性粒细胞增殖、活化,进而分泌

表 3 各组小鼠血清炎性因子表达量($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	IL-4/(pg·mL ⁻¹)	IL-5/(pg·mL ⁻¹)	IL-23/(pg·mL ⁻¹)	IFN- γ /(pg·mL ⁻¹)	IgE/(ug·mL ⁻¹)
空白组	11.24 \pm 1.02	15.19 \pm 1.37	13.84 \pm 1.42	46.76 \pm 4.85	12.55 \pm 1.43
CVA 组	25.71 \pm 1.90*	32.60 \pm 3.35*	22.24 \pm 2.37*	7.56 \pm 0.65*	51.37 \pm 4.75*
CVA 再激发组	42.81 \pm 4.76 Δ	54.26 \pm 5.73 Δ	30.45 \pm 2.78 Δ	6.24 \pm 0.46	83.16 \pm 6.26 Δ
五虎汤低剂量组	14.50 \pm 1.23 $\#$	19.47 \pm 1.53 $\#$	16.30 \pm 1.73 $\#$	31.50 \pm 2.44 $\#$	33.28 \pm 2.37 $\#$
五虎汤中剂量组	13.77 \pm 1.40 $\#$	18.55 \pm 1.35 $\#$	15.27 \pm 1.35 $\#$	36.37 \pm 3.25 $\#$	29.74 \pm 2.25 $\#$
五虎汤高剂量组	14.86 \pm 1.24 $\#$	19.29 \pm 1.64 $\#$	15.76 \pm 1.54 $\#$	33.76 \pm 2.64 $\#$	31.56 \pm 3.08 $\#$
地塞米松组	13.16 \pm 1.21 $\#$	17.31 \pm 1.18 $\#$	14.82 \pm 1.63 $\#$	38.71 \pm 3.91 $\#$	25.36 \pm 2.19 $\#$

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与 CVA 组比较, $\Delta P<0.05$;与 CVA 再激发组比较, $\#P<0.05$

表4 各组小鼠肺组织记忆T细胞所占比例($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	CD4 ⁺ Tm 细胞/%
空白组	8.81±0.67
CVA组	8.58±0.71
CVA再激发组	42.73±3.86 [△]
五虎汤低剂量组	35.62±3.37 [#]
五虎汤中剂量组	23.96±2.52 [#]
五虎汤高剂量组	22.64±2.31 [#]
地塞米松组	32.47±3.04 [#]

注:与CVA组比较,[△] $P<0.05$;与CVA再激发组比较,[#] $P<0.05$

多种炎症介质引起气道慢性炎症^[18]。IFN- γ 由Th1细胞产生,可抑制Th2细胞因子的产生、降低气道高反应性以及减少肺内嗜酸性粒细胞的浸润^[19]。有研究^[20]表明,IL-17、IL-23之间具有紧密联系,两者可能共同参与了CVA的病理生理过程,CVA患儿血清IL-17、IL-23的水平明显增高,IL-23主要由树突状细胞、巨噬细胞分泌,可能通过促进记忆性T淋巴细胞增殖。而IL-23/Th17轴在CVA的发生发展中也起着重要的作用^[19]。本研究结果显示,CVA再激发组较CVA组的IL-4、IL-5、IL-23、IgE水平上升,IFN- γ 水平下降,经五虎汤治疗后细胞因子的失衡缓解,提示CVA病程中的免疫记忆,可影响Th1/Th2与IL-23/Th17轴平衡,诱发更强烈的气道炎症,五虎汤可影响炎症细胞因子缓解气道炎症。

当前对T细胞炎症记忆的研究较少,具体产生机制并不清楚,但比较明确的是肺部的CD4⁺ Tm记忆T细胞在参与气道的持续炎症反应中起关键作用^[22-23]。CD44⁺和CD62L为CD4⁺记忆T细胞的表面标志物,课题组通过流式细胞术检测肺部组织CD4⁺ Tm亚群,结果显示,CVA组记忆性T细胞所占比例与空白组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),与CVA组相比,CVA再激发组记忆性T细胞亚群则明显上升($P<0.05$),经五虎汤治疗后记忆性T细胞所占比例均减低。由此推测,五虎汤缓解气道炎症的作用是通过影响记忆性T细胞的炎症记忆发挥的作用。

综上所述,本研究结果表明CVA病程中存在记忆性T细胞参与的炎症记忆,使病情缠绵难愈,五虎汤能够有效干预这种记忆改善CVA模型小鼠的气道炎症,发现一方面为五虎汤的临床应用提供了有力的实验依据;另一方面为儿童CVA的研究提供了新的研究思路,下一步课题组将继续开展相关的体内、体外实验,对炎症记忆在CVA的作用机制作进一步研究。

参考文献

- [1] 中华医学会儿科学分会呼吸学组.儿童支气管哮喘诊断与防治指南(2016年版)[J].中华儿科杂志,2016,54(3):167-181.
- [2] 中国儿童慢性咳嗽病因构成比研究协作组.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):83-91.
- [3] 刘秋海,徐浩岑,邢燕如,等.咳嗽变异性哮喘在儿童慢性咳嗽中发病率的调查研究[J].中国医刊,2014,12(6):67-69.
- [4] TODOKORO M, MOCHIZUKI H, TOKUYAMA K, et al. Childhood cough variant asthma and its relationship to classic asthma[J]. Annals of Allergy, Asthma & Immunology, 2003, 90(6): 652-659.
- [5] PADEM N, SALTOUN C. Classification of asthma[J]. Allergy and Asthma Proceedings, 2019, 40(6): 385-388.
- [6] 丁利忠,孙丽平,王延博.加强哮喘苗期患儿合理用药和中医健康教育的思考[J].中国中西医结合儿科学,2016,8(3):359-361.
- [7] 李海霞,任晓丹,张勇华,等.五虎汤加减时辰给药对热性哮喘患儿血清TGF- β 1、IL-13的影响[J].中医药导报,2019,25(6):89-91.
- [8] 王春燕,隆红艳.黄龙止咳口服液对咳嗽变异性哮喘模型小鼠的作用机制研究[J].天津中医药大学学报,2020,39(3):330-335.
- [9] 张宁宁,吴力群,霍婧伟,等.加味六安煎对咳嗽变异性哮喘大鼠气道重塑病理形态学的影响[J].北京中医药大学学报,2020,43(1):50-55.
- [10] 李燕燕,李凯述,朱建波.记忆T细胞在哮喘小鼠不同时间的表达量[J].中国临床药理学杂志,2020,36(8):950-952,993.
- [11] 黄圣荣,夏 镭,何 英,等.儿童咳嗽变异性哮喘发作诱因及预防[J].浙江预防医学,2014,26(6):615-617.
- [12] 郎亚琴,杨一华.227例儿童咳嗽变异性哮喘的过敏原分析[J].浙江预防医学,2013,25(2):68-69,73.
- [13] 汪兴泽.有关免疫记忆的若干问题探讨[J].生物学教学,2020,45(1):65-67.
- [14] 唐薪俊,徐 侃,陈智鸿.记忆T细胞与支气管哮喘[J].中华结核和呼吸杂志,2015,38(1):69-71.
- [15] 鲍一笑,陈 嫒.儿童咳嗽变异性哮喘诊治[J].中国实用儿科杂志,2016,31(3):173-175.
- [16] 屈 悦,屈文萍,李 瑶,等.基于网络药理学的麻黄-甘草药对治疗小儿哮喘作用机制[J].辽宁中医杂志,2020,47(8):22-28,222.
- [17] 李 华,王孟清.小儿支气管哮喘的中医药治疗进展[J].中医临床研究,2011,3(21):121-122.
- [18] 潘阳琼,陈 豪,黄 哈,等.滋阴清燥汤对咳嗽变异性哮喘发作期患儿IgE、IL-4、IL-5水平的影响及安全性分析[J].中医学报,2020,48(3):38-42.
- [19] 范广来,徐 妍,马希贵,等.哮喘患儿血清IFN- γ 、IL-4、IL-10水平及与肺功能的关系[J].中国现代医学杂志,2020,30(7):48-52.
- [20] 陈 勤,赵金华.咳嗽变异性哮喘患儿血清IL-17与IL-23水平测定及意义[J].青岛大学医学院学报,2016,52(6):686-687,691.
- [21] 古智兵.髓系抑制细胞及IL-23/Th17轴与儿童咳嗽变异性哮喘的相关性研究[J].现代医学,2015,43(3):336-339.
- [22] 王彰晖,王曾礼.支气管哮喘小鼠肺局部淋巴细胞的炎症记忆[J].中华结核和呼吸杂志,2004,27(10):672-677.
- [23] 李艳春,赵丽娜,华树成.记忆T细胞在支气管哮喘中的作用[J].中国实验诊断学,2013,17(12):2290-2293.