

·实验研究·

本文引用: 叶勇, 赵凡, 贺思雨, 童毅, 朱沁泉, 张涤. 基于 JAK-STAT 信号通路探究降气平喘汤干预支气管哮喘的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(10): 1754-1763.

基于 JAK-STAT 信号通路探究降气平喘汤干预 支气管哮喘的作用机制

叶勇¹, 赵凡², 贺思雨², 童毅², 朱沁泉², 张涤^{2*}

1. 湖南中医药大学第一中医临床学院, 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** 基于 Janus 激酶-信号传导及转录激活因子(janus-activated kinase-signal transducers and activators of transcription, JAK-STAT)信号通路探究降气平喘汤干预支气管哮喘的作用机制。**方法** 选用 SD 雄性大鼠 48 只, 随机分为空白组(等体积蒸馏水)、模型对照组(等体积蒸馏水)、泼尼松组[醋酸泼尼松片 6.3 mg/(kg·d)], 中药低量组[降气平喘汤 3.96 mL/(kg·d)], 中药中量组[降气平喘汤 7.92 mL/(kg·d)], 中药高量组[降气平喘汤 15.84 mL/(kg·d)], 每组 8 只。除空白组外, 各组均于第 0, 7 天用卵清蛋白(ovalbumin, OVA)致敏溶液腹腔注射致敏, 第 14 天开始用 OVA 致敏溶液连续雾化 14 d。造模成功后连续灌胃给药 14 d。取肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)及肺组织进行 HE 染色、Masson 染色、免疫组织化学病理学检测; ELISA 法检测 BALF 中白细胞介素(interleukin, IL)-5、IL-13、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)含量; Western blot 法检测肺组织中 JAK1、JAK2、STAT3、p-STAT3、STAT5、p-STAT5 蛋白表达水平; RT-PCR 法检测肺组织中 JAK1、JAK2 mRNA 表达水平。**结果** 模型对照组大鼠出现肺泡壁增厚, 肺泡塌陷和支气管、血管厚度增厚, 大量炎症细胞浸润及上皮细胞紊乱、脱落、支气管纤维结缔组织增生, 肺脏组织纤维化, 大量胶原纤维沉积。与泼尼松组相比, 中药低、中、高量组 α -平滑肌肌动蛋白(α -Smooth muscle actin, α -SMA)、JAK1 蛋白表达水平和 p-STAT3/STAT3、p-STAT5/STAT5 升高($P<0.05$), 中药低、中量组 IL-5、IL-13 含量及 JAK2 蛋白表达水平升高($P<0.05$), 中药低量组 TNF- α 含量和 JAK1、JAK2 mRNA 表达水平升高($P<0.05$), IFN- γ 含量降低($P<0.05$)。与中药低量组相比, 中药中、高量组 α -SMA、JAK1、JAK2 蛋白表达水平和 p-STAT3/STAT3、p-STAT5/STAT5 降低($P<0.05$), IFN- γ 含量升高($P<0.05$), 中药高量组 TNF- α 、IL-5、IL-13 含量降低($P<0.05$)。与中药中量组相比, 中药高量组 α -SMA、JAK2 蛋白表达水平、p-STAT3/STAT3、p-STAT5/STAT5 降低($P<0.05$), IL-5 含量降低($P<0.05$)。**结论** 降气平喘汤可能通过调节 Th1/Th2 细胞因子平衡, 进而调节 JAK-STAT 信号通路转导来改善支气管哮喘气道炎症及缓解气道重塑。

[关键词] 支气管哮喘; 降气平喘汤; JAK-STAT 信号通路; Th1/Th2 平衡; 作用机制

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.10.006

Exploring the mechanism of action of Jiangqi Pingchuan Decoction in intervening bronchial asthma based on the JAK-STAT signaling pathway

YE Yong¹, ZHAO Fan², HE Siyu², TONG Yi², ZHU Qinquan², ZHANG Di^{2*}

1. The First Clinical School of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

[Abstract] **Objective** To exploring the mechanism of action of Jiangqi Pingchuan Decoction (JQPCD) in intervening bronchial asthma based on the Janus activated kinase-signal transducers and activators of transcription (JAK-STAT) signaling pathway. **Methods** A total of 48 male SD rats were randomized into blank group (with equal volume of distilled water), model control group (with

[收稿日期] 2024-05-24

[基金项目] 湖南省自然科学基金(2024JJ6355); 张涤儿科研究所专项(99-16)。

[通信作者] * 张涤, 男, 主任医师, 博士生导师, E-mail: 2655357548@qq.com。

equal volume of distilled water), prednisone group [with prednisone acetate tablets 6.3 mg/(kg·d)], low- [with JQPCD 3.96 mL/(kg·d)], medium- [with JQPCD 7.92 mL/(kg·d)], and high-dose Chinese medicine groups [with JQPCD 15.84 mL/(kg·d)], with 8 rats in each group. Except for the blank group, all groups were sensitized by intraperitoneal injection of ovalbumin (OVA) sensitization solution on days 0 and 7. From day 14 on, they were continuously nebulized with the OVA sensitization solution for 14 days. After the successful modeling, continuous gavage was administered for 14 days, and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissue were taken for HE staining, Masson staining, and immunohistochemical pathological testing; ELISA was used to determine the levels of interleukin (IL)-5, IL-13, tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interferon- γ (IFN- γ) in BALF; Western blot was applied to examine the protein expression levels of JAK1, JAK2, STAT3, p-STAT3, STAT5, and p-STAT5 in the lung tissue; RT-PCR was used to check the expression levels of JAK1 and JAK2 mRNA in the lung tissue. **Results** The model control group of rats showed thickening of alveolar walls, collapse of alveoli, thickening of bronchi and blood vessels, infiltration of a large number of inflammatory cells, disorder and shedding of epithelial cells, proliferation of bronchial fibrous connective tissue, fibrosis of lung tissue, and deposition of a large amount of collagen fibers. Compared with the prednisone group, the levels of α -smooth muscle actin (α -SMA), JAK1 protein expression, and p-STAT3/STAT3, p-STAT5/STAT5 were increased in the low-, medium-, and high-dose Chinese medicine groups ($P<0.05$). Additionally, the levels of IL-5, IL-13, and JAK2 protein expression were increased in the low- and medium-dose Chinese medicine groups ($P<0.05$). The levels of TNF- α and JAK1, JAK2 mRNA expression were also increased in the low-dose Chinese medicine group ($P<0.05$), while the content of IFN- γ was decreased ($P<0.05$). Compared with the low-dose Chinese medicine group, the expression levels of α -SMA, JAK1, JAK2 proteins and p-STAT3/STAT3, p-STAT5/STAT5 were decreased in the medium- and high-dose Chinese medicine groups ($P<0.05$), while the content of IFN- γ was increased ($P<0.05$). The levels of TNF- α , IL-5, and IL-13 were decreased in the high-dose Chinese medicine group ($P<0.05$). Compared with the medium-dose Chinese medicine group, the high-dose Chinese medicine group showed a decrease in α -SMA, JAK2 protein expression levels, p-STAT3/STAT3, and p-STAT5/STAT5 ($P<0.05$), as well as a decrease in IL-5 content ($P<0.05$). **Conclusion** JQPCD may improve airway inflammation and alleviate airway remodeling in bronchial asthma by regulating the balance of Th1/Th2 cytokines, thereby modulating the JAK-STAT signaling pathway transduction.

[**Keywords**] bronchial asthma; Jiangqi Pingchuan Decction; JAK-STAT signaling pathway; Th1/Th2 balance; mechanism of action

支气管哮喘(以下简称哮喘)是儿童时期最常见的慢性呼吸系统疾病,常伴有阻塞性睡眠呼吸暂停、胃食管反流、过敏性鼻炎等疾病^[1-4]。哮喘可发生在所有年龄段,尤其是14岁以下的儿童^[5]。在中国0~14岁的儿童中,大约有3.0%的儿童患有哮喘^[6]。近年来,随着工业的发展和环境污染的恶化,哮喘的发病率仍在不断上升^[7]。哮喘的发病机制极为复杂,虽然大多数儿童可以通过激素治疗控制症状,但仍需长期使用以巩固治疗,少数儿童甚至会面临危及生命的病情恶化风险^[8-9]。在治疗哮喘的过程中,一些药物会引起不良反应,如血压升高、胃溃疡、肾功能损害等^[10]。因此,开发安全有效的抗哮喘药非常重要。

张涤教授认为,儿童哮喘的发病乃外因作用于内因的结果,即内有宿痰伏肺、外有实邪触发为其关键病机;病位主要在肺、脾、肾三脏;治疗上以止咳化痰、降气平喘、祛邪为主要治则;方用自拟方“降气平喘汤”。降气平喘汤是张涤教授基于临床经验、理论基础总结的自拟方,方由经典名方《摄生众妙方·定

喘汤》化裁而来。方中麻黄、杏仁、白果宣降相宜,止咳平喘,共为君药;桑白皮、地骨皮可清泻肺热,降肺中伏火;葶苈子苦泄辛散,功专泻肺之实而下气平喘,紫苏子降气化痰而止咳平喘,款冬花、紫菀润肺下气、辛开肺郁、化痰浊而咳止,瓜蒌皮清肺热、润肺燥、导痰浊下行,甜叶菊生津、防止邪热过伤津液,以上诸药共为臣药;桔梗载药上行于肺为佐药;甘草调和诸药为使药。诸药相合,宣降相宜,一以恢复肺气宣发肃降功能为旨,宣肃如常则咳喘自平;一着力于化痰、排痰,痰化则咳止。因此,本研究拟通过探究降气平喘汤干预哮喘的作用机制,为中医药干预哮喘提供一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 实验动物

SPF级SD雄性大鼠48只,体质量300~350 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司。饲养于湖南中医药大学第一附属医院动物实验中心,温度20~25℃,湿度50%~70%;动物合格证号:SCXK(湘)2019-

0004。实验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,实验伦理编号:ZYFY20221111-73。

1.2 实验药物

降气平喘汤(湖南中医药大学第一附属医院制剂中心,批号:20230815,规格:100 mL/瓶);醋酸泼尼松片(生产自浙江仙琚制药股份有限公司,批号:LA23262,规格:5 mg/片)。

1.3 主要实验试剂

卵清蛋白(ovalbumin, OVA)(北京索莱宝科技有限公司,批号:A8041);氢氧化铝(上海麦克林生化科技股份有限公司,批号:A800852); α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:80008-1-RR);HRP 标记山羊抗兔 IgG(赛默飞世尔科技公司,批号:#31460);DAB 显色液(福州迈新生物技术开发有限公司,批号:DAB-1031);肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)ELISA 试剂盒、全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒、Western 洗涤液、ECL 发光液、Janus 激酶 2(janus-activated kinase 2, JAK2)抗体、信号传导及转录激活因子 5(singal transducers and activators of transcripion 5, STAT5) 抗体、p-STAT5 抗体、羊抗兔 IgG-HRP(沈阳万类生物科技有限公司,批号:WLE05、WLA019、WLA004、WLA013、WLA025、WLA006、WL02188、WL01881、WL05088、WLA023);白细胞介素(interleukin, IL)-5、IL-13、 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物技术有限公司,批号:E-EL-R0558、E-EL-R0563、E-EL-R0009);JAK1 抗体、STAT3 抗体、p-STAT3 抗体(安诺伦生物科技有限公司,批号:AF5012、AF6294、AF3293);TRIpure(美国伯腾仪器有限公司,批号:RP1001)。

1.4 主要实验仪器

电热恒温培养箱(天津泰斯特仪器有限公司,批号:DH36001B);石蜡切片机(德国徕卡公司,批号:RM2235);电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司,批号:QH01-9030A);超纯水系统(力康生物医疗科技控股集团,批号:NW10LVF);显微镜型号、显微镜拍照系统(奥林巴斯有限公司,批号:BX53、DP73);微量移液器(芬兰百得有限公司,批号:Proline);酶标仪(美国伯腾仪器有限公司,批号:ELX-800);紫外分光光度计(赛默飞世尔科技公

司,批号:NANO one);荧光定量 PCR 仪(柏业贸易有限公司,批号:Exicycler 96)等。

1.5 哮喘模型建立

取 SD 雄性大鼠 48 只,随机分为正常组大鼠 8 只和哮喘模型组大鼠 40 只。正常组大鼠及哮喘模型组大鼠于第 0、7 天分别给大鼠腹腔注射生理盐水及 OVA 致敏溶液 0.2 mL,OVA 致敏溶液配制方法为:0.5 g OVA+0.5 g 氢氧化铝+100 mL 生理盐水;第 14 天将大鼠放入雾化器的有机玻璃盒中,正常组大鼠及模型组大鼠分别以生理盐水及 OVA 致敏溶液雾化吸入 30 min 激发,每天 1 次,连续雾化激发并给药 14 d。以大鼠出现烦躁不安、呼吸急促、易激惹、搔鼻抓耳等症状为阳性反应,提示造模成功^[7]。

1.6 实验分组及给药

正常组大鼠作为空白组,哮喘模型组大鼠随机分为 5 组,记为模型对照组、泼尼松组、中药低量组、中药中量组、中药高量组,每组 8 只。各组均通过灌胃给药,遇激发日则在激发前 1 h 给予灌胃,每天 1 次,连续干预 14 d。根据儿童及成人之间体表面积换算公式计算给药,然后按照成人与动物之间的药物换算公式计算给药^[8]。空白组和模型对照组给予等体积蒸馏水;泼尼松组给予醋酸泼尼松片 6.3 mg/kg;中药低量组给予降气平喘汤 3.96 mL/kg;中药中量组给予降气平喘汤 7.92 mL/kg;中药高量组给予降气平喘汤 15.84 mL/kg。

1.7 实验取材

支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)收集:各组大鼠于末次激发后 24 h 麻醉,用大头针将头部及四肢固定后用 75%乙醇行常规消毒,剪开大鼠颈部外皮,逐层剥离至看见主支气管,在环形软管(近头处)用止血钳夹闭,环形软管(近头处)剪出小口后加以固定。将 1 mL 生理盐水注入肺中,不断按压肺部,缓慢回抽,备用。肺组织收集:剪开大鼠前胸前外皮,暴露肺部,大鼠肺脏放入多聚甲醛溶液中固定以备切片。

1.8 指标观察

1.8.1 观察大鼠生理反应 观察各组大鼠毛发、饮食、精神状态、呼吸频率等情况。

1.8.2 HE 染色观察肺组织形态结构 肺组织常规石蜡包埋切片(厚度约 5 μ m),温箱烘干后再置于 60 $^{\circ}$ C 烘箱烘烤 30 min,依次于二甲苯、无水乙醇中浸泡脱蜡,梯度乙醇水合;蒸馏水浸泡后苏木素、伊

红染液进行染色;梯度乙醇、无水乙醇脱水,二甲苯透明、中性后树脂封片。随后于显微镜下观察染色效果及拍照。

1.8.3 Masson 染色观察肺组织胶原结构 肺组织常规石蜡包埋切片及切片脱蜡、水合;切片用 Regaud 苏木精染液染核 6 min 后分别用自来水、1%盐酸乙醇、蒸馏水清洗;纸擦干切片后用丽春红酸性品红液浆染 1 min、1%磷钼酸水溶液分化 5 min、苯胺蓝复染 5 min,用 0.2%冰醋酸水溶液浸洗。常规梯度乙醇、无水乙醇脱水,二甲苯透明、中性后树脂封片后于显微镜下观察染色效果及拍照。

1.8.4 免疫组织化学检测 α -SMA 蛋白表达水平 石蜡切片烤片后脱蜡、水合,切片加入微波炉里加热至沸腾的抗原修复液(9 mL 柠檬酸缓冲液,41 mL 柠檬酸钠缓冲液于 450 mL 蒸馏水混合),持续小火加热 10 min 后自然冷却至室温,PBS 浸泡 5 min,3次; H_2O_2 室温孵育,PBS 冲洗后加 1% BSA,室温孵育。加入一抗(1:200),4 °C 过夜,PBS 浸泡 5 min,3 次;加二抗(1:500),37 °C 孵育 60 min,PBS 冲洗后加入 100 μ L DBS 显色试剂,待颜色变深后于水中终止;加苏木素复染 3 min,1%盐酸乙醇分化 3 s,自来水返蓝 20 min。常规脱水、透明、封片后于显微镜下观察染色效果及拍照。

1.8.5 ELISA 法检测 BALF 中细胞因子含量 根据 ELISA 试剂盒产家的要求操作,紫外分光光度计于 450 nm 进行测定,然后计算离心后 BALF 中 IL-5、IL-13、TNF- α 、IFN- γ 细胞炎症因子含量。

1.8.6 Western blot 检测肺组织中 JAK1、JAK2、STAT3、p-STAT3、STAT5、p-STAT5 蛋白表达水平 肺组织加入蛋白裂解液,在 4 °C 下以 12 000 r/min 离心 10 min(离心半径 8 cm),分离上清液,即为蛋白抽提物。蛋白抽提物加入 BCA 蛋白标准液,用移液器反复吹打,37 °C 反应 20 min,溶液由绿色变为紫色后设定读取波长为 570 nm 进行读数,计算样本的蛋白浓度。组装电泳装置,聚丙烯酰胺凝胶制备用;用 5 \times Loading Buffer 和 PBS 稀释蛋白样品,煮沸 5 min 后进行电泳。PVDF 转膜,取出膜于封闭液中,脱色摇床上振荡封闭 1 h。加入一抗(1:500 或 1:1 000)4 °C 孵育过夜,用 TBST 清洗 4 次,每次 5 min;加入二抗(1:5 000),37 °C 孵育 45 min,用 TBST 清洗 6 次,每次 5 min。滴加新鲜配制的 ECL 混合溶

液发光检测,暗室曝光,用凝胶图象处理系统(Gel-Pro-Analyzer 软件)进行分析。

1.8.7 RT-PCR 检测肺组织中 JAK1、JAK2 mRNA 表达水平 取肺组织磨浆后依次加入 TRIpure 裂解液、氯仿,在 4 °C 下以 10 000 r/min 离心 10 min(离心半径 8 cm)取无色水相层;加等体积异丙醇混匀后-20 °C 过夜,离心弃上清液;加 75%乙醇,离心弃上清液;再加 RNase-free ddH₂O,充分混匀,沉淀完全溶解后即为本样本总 RNA。使用紫外分光光度计 NANO one 测定各样本中 RNA 的浓度。将 RNA 进行反转录得到 cDNA,反应体系如下,模板 RNA:1 μ g、All-in-One First-Strand SuperMix:4 μ L、dsDNase:1 μ L、Nuclease-Free Water To 20 μ L。

将上述 cDNA 用通用生物股份有限公司合成 PCR 引物进行 PCR 扩增,反应程序及引物序列详见表 1。反应程序:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 15 s。用荧光定量 PCR 仪进行荧光定量分析。以 β -actin 为内参,数据以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为准。

表 1 引物序列

Table 1 Primer Sequence

基因名称	序列	长度/bp
JAK1	正向:TGGCAGCCTGTCTACTCTA	19
	反向:TTCATCGTCCTTGTAATCC	
JAK2	正向:CGGAAGACTGCCGAGACCA	19
	反向:ATCCACCCGAAGGAAAGG	
β -actin	正向:GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTAGC	25
	反向:GGCCGACTCATCGTACTCCTGCTT	

1.9 统计学分析

采用 Graph Pad Prism9.5 软件对实验结果进行统计学及可视化分析,计量资料均使用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,数据符合正态分布且符合方差齐性检验采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD 法。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠生理反应变化

空白组哮喘模型建立期间及干预后可见大鼠体毛光滑柔亮,饮食量、反应、呼吸频率、精神状态等正常。模型对照组、泼尼松组及中药低、中、高量组哮喘模型建立期间及干预后大鼠体毛暗淡无光、干枯、糟

乱, 纳食量减少, 反应迟缓, 出现口唇发绀, 呼吸急促、点头样呼吸、哮鸣音, 烦躁不安、易激惹, 搔鼻抓耳等症状。用药干预后, 泼尼松组、中药高量组上述症状明显减轻, 中药中量组症状减轻, 中药低量组症状无明显减轻。

2.2 各组大鼠肺组织病理变化

2.2.1 降气平喘汤对大鼠肺组织形态结构的影响

空白组可见气管、血管厚度正常, 未见炎性细胞浸润, 肺泡充盈, 肺泡壁厚度正常。模型对照组可见肺泡壁增厚, 肺泡塌陷和支气管、血管厚度增厚, 大量炎性细胞浸润。泼尼松组、中药高量组炎性细胞数量

较模型对照组明显减少。中药中量组肺泡壁、支气管、血管厚度、炎性细胞数量较模型对照组稍减少。中药低量组肺泡壁、支气管、血管厚度、炎性细胞数量较模型对照组无明显变化。详见图 1。

2.2.2 降气平喘汤对大鼠肺组织胶原结构的影响

空白组可见上皮细胞、支气管纤维结缔组织正常, 少许淡蓝色胶原纤维沉积; 模型对照组可见上皮细胞紊乱、脱落、支气管纤维结缔组织增生, 肺脏组织纤维化, 大量胶原纤维沉积; 泼尼松组可见少量胶原纤维沉积; 中药低、中、高量组随着剂量的加重, 胶原纤维沉积量逐渐减少。详见图 2。

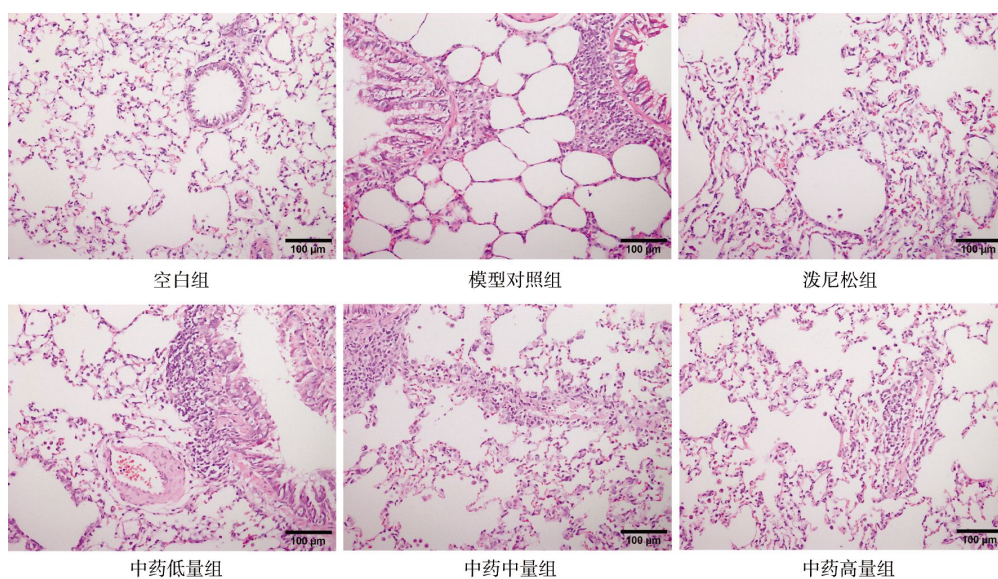


图 1 各组大鼠肺组织 HE 染色($\times 200$, 标尺: $100 \mu\text{m}$)

Fig.1 HE staining of lung tissue in each group of rats ($\times 200$, scale: $100 \mu\text{m}$)

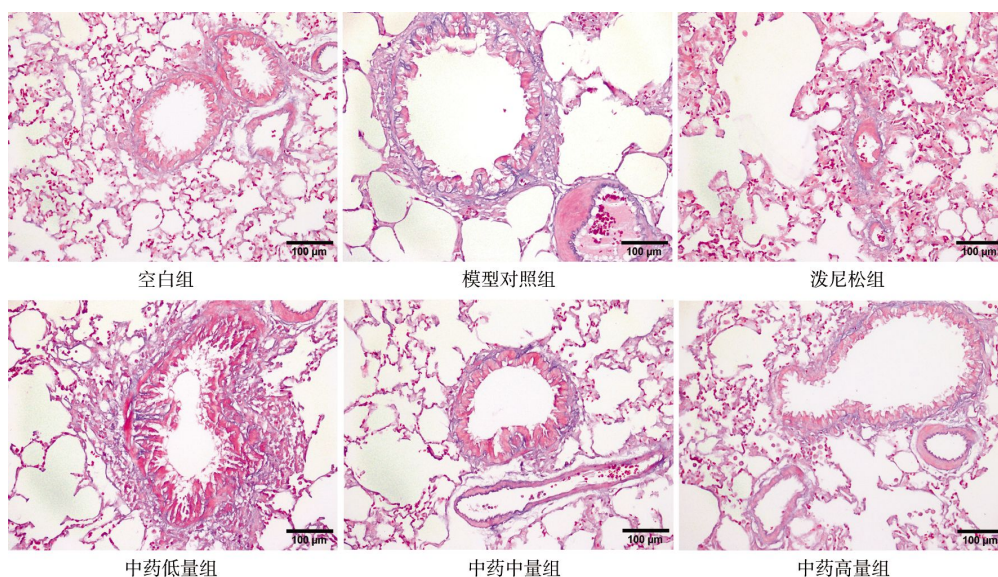


图 2 各组大鼠 Masson 染色($\times 200$, 标尺: $100 \mu\text{m}$)

Fig.2 Masson staining in each group of rats ($\times 200$, scale: $100 \mu\text{m}$)

与空白组相比,模型对照组纤维化面积占比升高($P<0.05$);与模型对照组相比,泼尼松组和中药低、中、高量组纤维化面积占比下降($P<0.05$);与泼尼松组相比,中药低、中、高量组纤维化面积占比升高($P<0.05$);与中药低量组相比,中药中、高量组纤维化面积占比下降($P<0.05$);与中药中量组相比,中药高量组纤维化面积占比降低($P<0.05$)。详见图3。

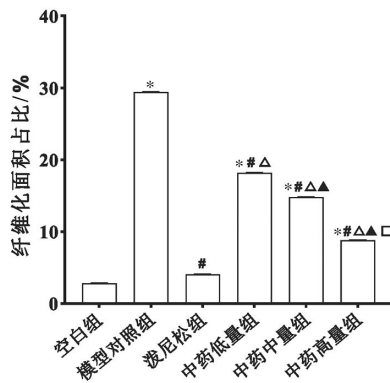


图3 Masson染色各组纤维化面积占比

Fig.3 Proportion of fibrosis area in each Masson staining group

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型对照组比较,# $P<0.05$;与泼尼松组比较, Δ $P<0.05$;与中药低量组比较, \blacktriangle $P<0.05$;与中药中量组比较, \square $P<0.05$ 。

2.2.3 降气平喘汤对大鼠肺组织 α -SMA 蛋白表达水平的影响 与空白组相比,模型对照组 α -SMA 蛋白表达水平升高($P<0.05$);与模型对照组相比,泼尼松组和中药低、中、高量组 α -SMA 蛋白表达水平下降($P<0.05$);与泼尼松组相比,中药低、中、高量组

α -SMA 蛋白表达水平升高($P<0.05$);与中药低量组相比,中药中、高量组 α -SMA 蛋白表达水平下降($P<0.05$);与中药中量组相比,中药高量组 α -SMA 蛋白表达水平下降($P<0.05$)。详见图4—5。

2.3 降气平喘汤对 Th1 细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 含量影响

与空白组相比,模型对照组 TNF- α 含量升高($P<0.05$)、IFN- γ 含量下降($P<0.05$);与模型对照组相比,泼尼松组和中药高量组 TNF- α 含量下降($P<0.05$),泼尼松组和中药中、高量组 IFN- γ 含量升高($P<0.05$);与泼尼松组相比,中药低量组 TNF- α 含量升高($P<0.05$)、IFN- γ 含量下降($P<0.05$);与中药低量组相比,中药高量组 TNF- α 含量下降($P<0.05$),中药中、高量组 IFN- γ 含量升高($P<0.05$)。详见图6。

2.4 降气平喘汤对 Th2 细胞因子 IL-5、IL-13 含量影响

与空白组相比,模型对照组 IL-5、IL-13 含量升高($P<0.05$);与模型对照组相比,泼尼松组及中药中、高量组 IL-5、IL-13 含量降低($P<0.05$);与泼尼松组相比,中药低、中量组 IL-5、IL-13 含量升高($P<0.05$);与中药低量组相比,中药高量组 IL-5、IL-13 含量降低($P<0.05$);与中药中量组相比,中药高量组 IL-5 含量降低($P<0.05$)。详见图7。

2.5 降气平喘汤对 JAK1、JAK2 蛋白表达水平的影响

与空白组相比,模型对照组 JAK1、JAK2 蛋白表达水平升高($P<0.05$);与模型对照组相比,泼尼松组和

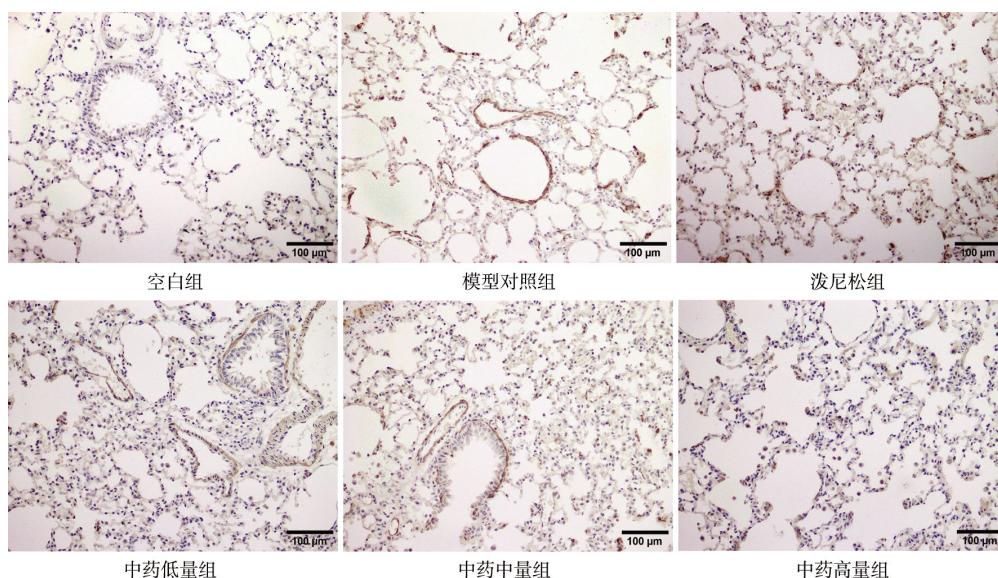


图4 各组 α -SMA 蛋白免疫组织化学图($\times 200$,标尺:100 μ m)

Fig.4 Immunohistochemical images of α -SMA proteins in each group ($\times 200$, scale: 100 μ m)

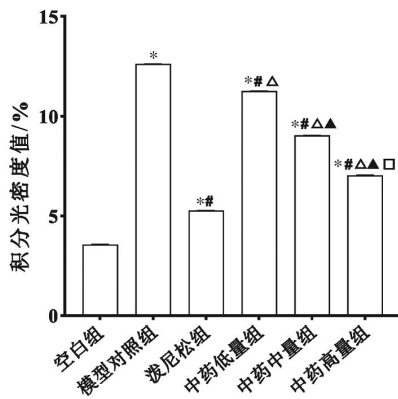


图 5 各组 α-SMA 积分光密度值

Fig.5 Integral optical density values of α-SMA in each group

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型对照组比较,# $P<0.05$;与泼尼松组比较,△ $P<0.05$;与中药低量组比较,▲ $P<0.05$;与中药中量组比较,□ $P<0.05$ 。

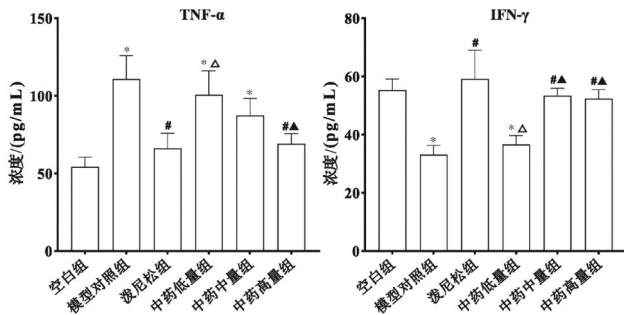


图 6 降气平喘汤对哮喘模型大鼠 TNF-α、IFN-γ 水平的影 响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig.6 Effects of JQPCD on TNF-α and IFN-γ levels in asthma model rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型对照组比较,# $P<0.05$;与泼尼松组比较,△ $P<0.05$;与中药低量组比较,▲ $P<0.05$ 。

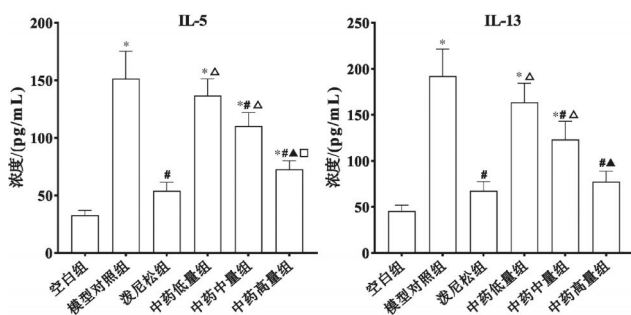


图 7 降气平喘汤对哮喘模型大鼠 IL-5、IL-13 水平的影 响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig.7 Effects of JQPCD on IL-5 and IL-13 levels in asthma model rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型对照组比较,# $P<0.05$;与泼尼松组比较,△ $P<0.05$;与中药低量组比较,▲ $P<0.05$;与中药中量组比较,□ $P<0.05$ 。

中药中、高量组 JAK1 蛋白表达水平降低($P<0.05$), 泼尼松组和中药低、中、高量组 JAK2 蛋白表达水平降低($P<0.05$);与泼尼松组相比,中药低、中、高量组 JAK1 蛋白表达水平升高($P<0.05$),中药低、中量组 JAK2 蛋白表达水平升高($P<0.05$);与中药低量组相比,中药中、高量组 JAK1、JAK2 蛋白表达水平均降低($P<0.05$);与中药中量组相比,中药高量组 JAK2 蛋白表达水平降低($P<0.05$)。详见图 8。

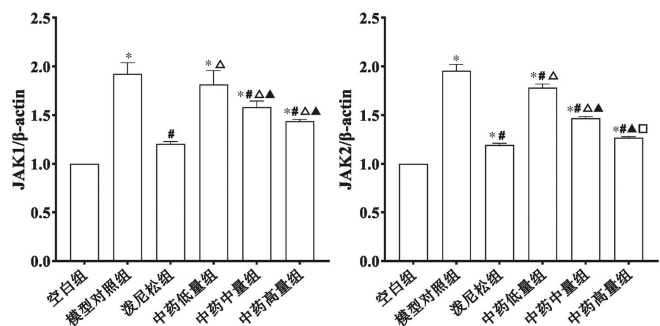
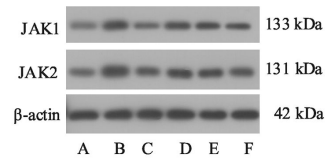


图 8 降气平喘汤对哮喘模型大鼠 JAK1、JAK2 蛋白表达的影 响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig.8 Effects of JQPCD on protein expression levels of JAK1 and JAK2 in asthma model rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

注:A.空白组;B.模型对照组;C.泼尼松组;D.中药低量组;E.中药中量组;F.中药高量组。与空白组比较,* $P<0.05$;与模型对照组比较,# $P<0.05$;与泼尼松组比较,△ $P<0.05$;与中药低量组比较,▲ $P<0.05$;与中药中量组比较,□ $P<0.05$ 。

2.6 降气平喘汤对 STAT3、p-STAT3、STAT5、p-STAT5 蛋白表达水平的影响

空白组、模型对照组、泼尼松组及中药低、中、高量组各组间 STAT3、STAT5 蛋白表达水平无统计学差异($P>0.05$)。与空白组相比,模型对照组 p-STAT3/STAT3、p-STAT5/STAT5 升高($P<0.05$);与模型对照组相比,泼尼松组及中药低、中、高量组 p-STAT3/STAT3、p-STAT5/STAT5 降低($P<0.05$);与泼尼松组相比,中药低、中、高量组 p-STAT3/STAT3、p-STAT5/STAT5 升高($P<0.05$);与中药低量组相比,中药中、高量组 p-STAT3/STAT3、p-STAT5/STAT5 降低($P<0.05$);与中药中量组相比,中药高量组 p-STAT3/STAT3、p-STAT5/STAT5 降低($P<0.05$)。详见图 9。

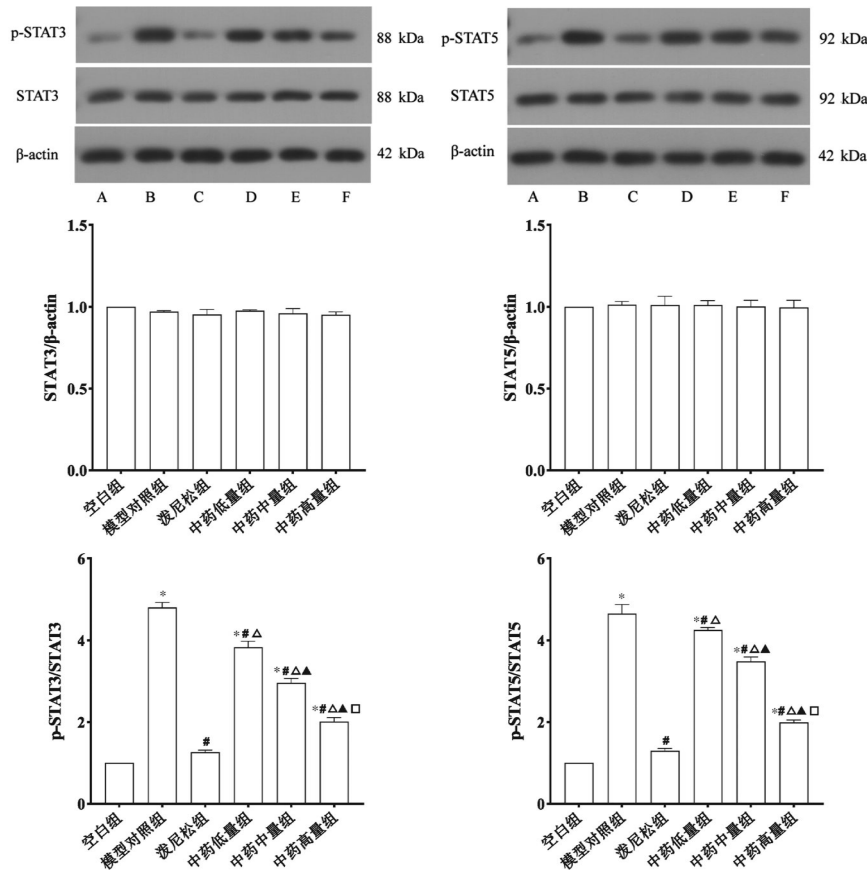


图9 降气平喘汤对哮喘模型大鼠 STAT3、p-STAT3、STAT5、p-STAT5 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig.9 Effects of JQPCD on the protein expression levels of STAT3, p-STAT3, STAT5, and p-STAT5 in asthma model rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

注:A.空白组;B.模型对照组;C.泼尼松组;D.中药低量组;E.中药中量组;F.中药高量组。与空白组比较,* $P<0.05$;与模型对照组比较,# $P<0.05$;与泼尼松组比较,^ $P<0.05$;与中药低量组比较,▲ $P<0.05$;与中药中量组比较,□ $P<0.05$ 。

2.7 降气平喘汤对 JAK1、JAK2 mRNA 表达水平影响

与空白组相比,模型对照组 JAK1、JAK2 mRNA 表达水平升高($P<0.05$);与模型对照组相比,泼尼松组和中药高量组 JAK1、JAK2 mRNA 表达水平降低($P<0.05$);与泼尼松组相比,中药低量组 JAK1、JAK2 mRNA 含量升高($P<0.05$)。详见图 10。

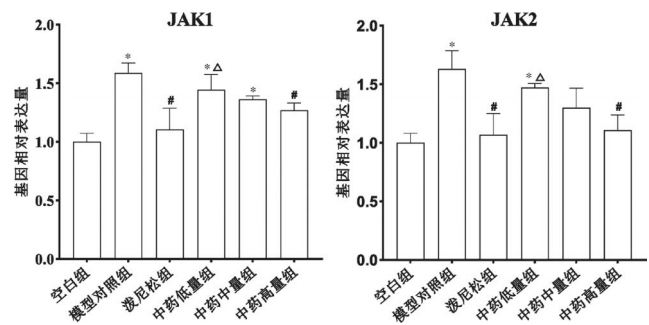


图10 降气平喘汤对哮喘模型大鼠 JAK1、JAK2 mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig.10 Effects of JQPCD on JAK1 and JAK2 mRNA expression in asthma model rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型对照组比较,# $P<0.05$;与泼尼松组比较,^ $P<0.05$ 。

3 讨论

哮喘常因基因及环境因素之间的复杂作用而发作;前者包括遗传背景、哮喘或其他特异性疾病的家族史等^[12-13];后者包括生活环境、海拔高度、气候条件、饮食、过敏原等^[14-16]。哮喘的发病机制极为复杂,目前多认为哮喘是一种炎症性疾病^[15]。诸多研究表明,Th1/Th2 失衡是导致哮喘的重要机制^[16-17]。

本研究观察模型对照组大鼠生理反应出现体毛暗淡无光、干枯、糟乱,纳食量减少等症状,表明经 OVA 致敏的大鼠为哮喘模型,符合现有的研究结果。而随着降气平喘汤剂量的增加,上述哮喘相关症状

逐渐减轻,表明降气平喘汤可以改善哮喘模型大鼠生理反应变化。

HE 染色结果提示,在哮喘发作期间,炎症细胞浸润到支气管周围,参与炎症反应。经醋酸泼尼松及降气平喘汤干预后,炎症细胞浸润减少;且随着降气

平喘汤剂量的增加,炎症细胞浸润依次减少,组织损伤程度逐渐减轻,表明降气平喘汤可以有效减少肺组织的炎性渗出,改善组织损伤。Masson 染色结果提示,经 OVA 致敏的哮喘模型大鼠具有气道上皮纤维化的病理变化,经醋酸泼尼松及降气平喘汤干预后,胶原纤维沉积的面积减小,且具有剂量依赖性。表明降气平喘汤可以改善哮喘模型大鼠气道上皮纤维化的病理变化。

α -SMA 是存在于平滑肌细胞中一种丰富的蛋白质,其肌动蛋白丝可以产生细胞收缩和张力,维持细胞的结构和功能,与气道重塑及哮喘严重程度密切相关^[18]。研究发现,采用 OVA 致敏的哮喘大鼠模型 α -SMA 增加,具有气道炎症及气道重塑的表型^[19-20]。免疫组织化学结果提示,经 OVA 致敏的哮喘模型具有气道重塑表型,经醋酸泼尼松及降气平喘汤干预后, α -SMA 蛋白表达下降,且具有剂量依赖性。表明降气平喘汤可通过减少 α -SMA 蛋白表达来缓解气道重塑的作用。

哮喘是一种由过度活化的 Th2 细胞介导的慢性炎症性疾病,Th1 免疫应答常被认为是哮喘等过敏性疾病的保护因素^[21]。其中,Th1 细胞分化的关键细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 在其中发挥了重要作用^[22]。研究表明,哮喘的发生通常伴随着免疫系统的失衡,从 Th1 向 Th2 倾斜导致 IFN- γ 产生不足^[23];TNF- α 增强气道平滑肌收缩,这可能有助于气道高反应性的发展^[24]。当变应原进入低气道时,树突状细胞将变应原呈递给 Th2 细胞,Th2 细胞分泌 IL-5、IL-13,IL-5 促进嗜酸性粒细胞向肺部聚集,IL-13 直接致敏气道平滑肌收缩,刺激上皮细胞分泌黏蛋白,并诱导纤维化。ELISA 结果提示,与空白组相比,模型对照组 TNF- α 、IL-5、IL-13 水平升高,IFN- γ 水平下降,表明 TNF- α 、IL-5、IL-13 具有促进炎症反应的作用,IFN- γ 具有抑制炎症反应的作用;经醋酸泼尼松及降气平喘汤干预后,发现中药低量组无明显干预作用,泼尼松组及中药中、高量组 TNF- α 、IL-5、IL-13 水平下降,IFN- γ 水平升高,且干预效果无明显差异;上述结果表明降气平喘汤可以通过调节 Th1、Th2 炎症因子平衡来减轻气道炎症反应。

当过敏原等抗原出现后,幼稚的 CD4⁺辅助性 T 细胞在不同细胞因子的刺激下分化成不同的亚群,而分化过程主要由谱系特异性转录因子如 Th1、Th2

驱动^[25],其分泌的 TNF- α 、IFN- γ 、IL-5、IL-13 细胞因子是 JAK-STAT 信号通路的关键因子,可通过不同的 JAK 和 STAT 蛋白信号传导来参加哮喘的病理过程^[22]。诸多实验研究表明,炎症因子及 JAK/STAT 信号通路与哮喘的发生发展密切相关^[26-28]。本研究通过运用 Western blot 法检测 JAK1、JAK2 及 STAT3、STAT5、p-STAT3、p-STAT5 蛋白表达水平。结果发现,与空白组相比,模型对照组 JAK1、JAK2 蛋白表达水平及 p-STAT3/STAT3、p-STAT5/STAT5 升高;经过降气平喘汤干预后,与模型对照组相比,中药中、高量组 JAK1、JAK2 蛋白表达水平及 p-STAT3/STAT3、p-STAT5/STAT5 明显下降,其中中药高量组在 JAK2 蛋白及 p-STAT3/STAT3、p-STAT5/STAT5 较中药中量组更低。另外,本研究也采用 RT-PCR 检测了 JAK1、JAK2 mRNA 的相对表达水平。结果表明,与空白组相比,模型对照组 JAK1、JAK2 mRNA 的相对表达水平升高;经过降气平喘汤干预后,与模型对照组相比,中药高量组的 JAK1、JAK2 mRNA 的相对表达水平下降;表明 OVA 致敏的哮喘模型大鼠可能与 JAK-STAT 信号通路有关,而降气平喘汤可以通过调节 JAK1、JAK2、p-STAT3、p-STAT5 蛋白表达水平及 JAK1、JAK2 基因表达水平来改善哮喘炎症情况。

综上所述,降气平喘汤可能通过调节 Th1/Th2 细胞因子平衡,进而调节 JAK-STAT 信号通路转导来改善哮喘气道炎症及缓解气道重塑。本研究通过 OVA 诱导大鼠哮喘模型,研究降气平喘汤干预哮喘的作用机制,体现了中医药可以通过疾病的作用靶点来干预疾病,但仍有一定的不足,后续本研究团队将加用抑制剂和激动剂来进一步证实降气平喘汤通过调节 JAK-STAT 信号通路转导干预哮喘。

参考文献

- [1] 朱沁泉,陈创,张涤.基于中医传承辅助系统的张涤教授治疗儿童哮喘急性发作期组方用药经验挖掘[J].湖南中医药大学学报,2021,41(2):280-285.
- [2] 朱亚敏,杜莉,王焕辉,等.阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征合并重症哮喘的研究现状和挑战[J].中国全科医学,2024,27(25):3192-3196.
- [3] 刘松,马建岭,史利卿,等.基于两样本孟德尔随机化分析哮喘与胃食管反流病因果关系的研究[J].华西医学,2024,39(4):546-552.

- [4] 成晨, 柳荫, 赵淑玲, 等. 粉尘螨滴剂联合维生素D滴剂辅助治疗儿童哮喘伴过敏性鼻炎临床观察[J]. 中国药业, 2024, 33(16): 116-119.
- [5] GBD DISEASES AND INJURIES COLLABORATORS. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. *Lancet*, 2020, 396(10258): 1204-1222.
- [6] ZHOU X J, QIN Z, LU J, et al. Efficacy and safety of salmeterol/fluticasone compared with montelukast alone (or add-on therapy to fluticasone) in the treatment of bronchial asthma in children and adolescents: A systematic review and meta-analysis[J]. *Chinese Medical Journal*, 2021, 134(24): 2954-2961.
- [7] 刘敏, 黄鹤归, 徐宏峰, 等. 白芥子涂方对哮喘治疗中的免疫调节作用研究[J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(13): 1541-1547.
- [8] CLOUTIER M M, DIXON A E, KRISHNAN J A, et al. Managing asthma in adolescents and adults: 2020 asthma guideline update from the national asthma education and prevention program[J]. *JAMA*, 2020, 324(22): 2301-2317.
- [9] KERCSMAR C M, SHIPP C. Management/comorbidities of school-aged children with asthma[J]. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 2019, 39(2): 191-204.
- [10] NOUTSIOS G T, FLOROS J. Childhood asthma: Causes, risks, and protective factors; a role of innate immunity[J]. *Swiss Medical Weekly*, 2014, 144: w14036.
- [11] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1439-1442.
- [12] HIZAWA N. Common pathogenesis underlying asthma and chronic obstructive pulmonary disease—insights from genetic studies[J]. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 2024, 19: 633-642.
- [13] TASHIRO H, KURIHARA Y, KUWAHARA Y, et al. Impact of obesity in asthma: Possible future therapies[J]. *Allergology International*, 2024, 73(1): 48-57.
- [14] YANG W W, YANG Y J, HE L, et al. Dietary factors and risk for asthma: A Mendelian randomization analysis[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1126457.
- [15] HABIB N, PASHA M A, TANG D D. Current understanding of asthma pathogenesis and biomarkers[J]. *Cells*, 2022, 11(17): 2764.
- [16] LIU L Y, GAO Y, SI Y H, et al. MALT1 in asthma children: A potential biomarker for monitoring exacerbation risk and Th1/Th2 imbalance-mediated inflammation[J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2022, 36(5): e24379.
- [17] PENG W P, XU Y, ZHOU Y H, et al. Sanzi Yangqin Decoction alleviates allergic asthma by modulating Th1/Th2 balance: Coupling network pharmacology with biochemical pharmacology[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022, 2022: 9037154.
- [18] JIANG D Y, DEY T, LIU G. Recent developments in the pathobiology of lung myofibroblasts[J]. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 2021, 15(2): 239-247.
- [19] LI Z, CHENG T, GUO Y N, et al. CD147 induces asthmatic airway remodeling and activation of circulating fibrocytes in a mouse model of asthma[J]. *Respiratory Research*, 2024, 25(1): 6.
- [20] 田金娜, 陈迪, 李建保, 等. 丹龙定喘汤对哮喘小鼠肺组织 HMGB1、 α -SMA 及炎症因子的影响[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(3): 1347-1351.
- [21] ZHU J B, LIU X Y, WANG W X, et al. Altered expression of regulatory T and Th17 cells in murine bronchial asthma[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2017, 14(1): 714-722.
- [22] LUO W H, HU J D, XU W F, et al. Distinct spatial and temporal roles for Th1, Th2, and Th17 cells in asthma[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 974066.
- [23] MIJAČ S, BANIĆ I, GENČ A M, et al. The effects of environmental exposure on epigenetic modifications in allergic diseases[J]. *Medicina*, 2024, 60(1): 110.
- [24] RYAN J F, HOVDE R, GLANVILLE J, et al. Successful immunotherapy induces previously unidentified allergen-specific CD4⁺ T-cell subsets[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(9): E1286-E1295.
- [25] CHEN W J, CAO Y X, ZHONG Y Y, et al. The mechanisms of effector Th cell responses contribute to Treg cell function: New insights into pathogenesis and therapy of asthma[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 862866.
- [26] LYU X J, LIU J J, LIU Z R, et al. Anti-inflammatory effects of reticuline on the JAK2/STAT3/SOCS3 and p38 MAPK/NF- κ B signaling pathway in a mouse model of obesity-associated asthma[J]. *The Clinical Respiratory Journal*, 2024, 18(1): e13729.
- [27] BADI Y E, SALCMAN B, TAYLOR A, et al. IL1RAP expression and the enrichment of IL-33 activation signatures in severe neutrophilic asthma[J]. *Allergy*, 2023, 78(1): 156-167.
- [28] 余保, 申严, 卓宋明. 黄芩素对哮喘小鼠气道平滑肌细胞增殖、迁移及 JAK/STAT 通路的影响[J]. 广西医科大学学报, 2021, 38(9): 1692-1697.

(本文编辑 田梦妍)