

# 基于 IL-23/Th-17 信号通路探讨运脾泻肺化痰汤对幼龄哮喘大鼠气道炎症、黏液高分泌的影响

王文洲<sup>1</sup>,高倩倩<sup>1</sup>,陈竹<sup>2</sup>

(1. 贵州中医药大学第二临床医学院, 贵州 贵阳 550002;

2. 贵州中医药大学第二附属医院, 贵州 贵阳 550001)

**摘要:**目的 基于 IL-23/Th-17 信号通路探讨运脾泻肺化痰汤对幼龄哮喘大鼠气道炎症、黏液高分泌影响。方法 将 40 只雌雄均等的幼龄 SD 大鼠, 随机等分为 4 组: 正常组(Normal group)、模型组(Model group)、运脾泻肺化痰汤组(TCM group)和布地奈德组(Budesonide group), 每组 10 只。采用分段致敏及激发, 实验第 1、8 天 Medel group、TCM group 及 Budesonide group 利用腹腔注射卵清白蛋白联合氢氧化铝凝胶致敏; 实验第 15 天开始吸入 1% 卵清蛋白雾化激发, 隔天 1 次, 共 7 次。第 16 天开始造模并同时给药, 正常组、模型组、运脾泻肺化痰汤灌胃量均为 2 mL, 前两组予以 0.9% 氯化钠, 后者予运脾泻肺化痰汤。布地奈德组予 0.01% 布地奈德雾化吸入 20 min, 连续 4 周。末次激发后 24 h 内进行模型鉴定及取材。HE、PAS 染色观察肺组织病理改变, ELISA 检测肺泡灌洗液及血清中白细胞介素-17、白细胞介素-23 炎症水平, WB 检测肺组织 MUC5AC 蛋白含量, qPCR 检测肺组织中的 IL-17、IL-23 及 MUC5AC mRNA 相对表达量。IHC 测量肺部 IL-17、IL-23 水平。对 BALF 中白细胞总数、嗜酸性粒细胞及中性粒细胞进行计数。结果 与正常组比较, 模型组血清及肺泡灌洗 IL-17、IL-23 水平升高( $P < 0.001$ ,  $P < 0.0001$ ), IL-17、IL-23 免疫组化半定量及转录水平增加, MUC5A 基因及蛋白表达升高( $P < 0.05$ ), 运脾泻肺化痰汤组、布地奈德组较模型组下降( $P < 0.05$ ), 模型组 BALF 中白细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞计数均升高( $P < 0.001$ ,  $P < 0.0001$ ), 各治疗组中性粒细胞、嗜酸性粒细胞差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 运脾泻肺化痰汤降低血清及肺泡灌洗中 IL-23、IL-17 水平, 减少炎细胞迁移、气道炎症浸润及杯状细胞增生从而抑制 MUC5AC 过表达, 减轻气道黏液高分泌及气道炎症。

**关键词:**支气管哮喘; 运脾泻肺化痰汤; 白细胞介素-17; 白细胞介素-23; 黏蛋白 5AC

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1719(2024)10-0193-05

## Effect of Yunpi Xiefei Huatan Decoction (运脾泻肺化痰汤) on Airway Inflammation and Mucus Hypersecretion in Young Asthmatic Rats Through IL-23/Th-17 Signal Pathway

WANG Wenzhou<sup>1</sup>, GAO Qianqian<sup>1</sup>, CHEN Zhu<sup>2</sup>

(1. Second Clinical Medical College of Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang 550002, Guizhou, China;

2. The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, Guizhou, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the effect of YunpiXiefeiHuatan Decoction on airway inflammation and mucus hypersecretion in young asthmatic rats based on the IL-23/Th-17 signaling pathway. **Methods** Forty female young SD rats of equal weight were randomly divided into 4 groups: Normal group, Model group, YunpiXiefeiHuatan Decoction group (TCM group), and Budesonide group, with 10 rats in each group. Segmented sensitization and challenge were employed. On the 1st and 8th days of the experiment, the Model group, TCM group, and Budesonide group were sensitized via intraperitoneal injection of ovalbumin combined with aluminum hydroxide gel. Inhalation of 1% ovalbumin atomization challenge was initiated on the 15th day of the experiment, once every other day, for a total of 7 times. Modeling and administration began on the 16th day. The Normal group and Model group were gavaged with 2 mL of 0.9% sodium chloride, the TCM group was gavaged with 2 mL of YunpiXiefeiHuatan Decoction, and the Budesonide group was given 0.01% budesonide inhalation for 20 minutes, continuously for 4 weeks. Model identification and sample collection were carried out within 24 hours after the last challenge. HE and PAS staining were utilized to observe the pathological changes of lung tissue. ELISA was used to detect the inflammatory levels of interleukin-17 and interleukin-23 in bronchoalveolar lavage fluid and serum. WB was used to detect the protein content of MUC5AC in lung tissue. qPCR was used to detect the relative expression levels of IL-17, IL-23, and MUC5AC mRNA in lung tissue. IHC was used to measure the levels of IL-17 and IL-23 in the lungs. The total number of white blood cells, eosinophils, and neutrophils in BALF was counted. **Results** Compared with the Normal group, the levels of IL-17 and IL-23 in the serum and bronchoalveolar lavage of the Model group increased ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.0001$ ), the semi-quantitative and transcriptional levels of IL-17 and IL-23 in immunohistochemis-

**基金项目:**国家自然科学基金地区科学基金资助项目(81860868);贵州省科技厅项目(〔2020〕1Y365)

**作者简介:**王文洲(1995-),男,贵州贵定人,医师,博士在读,研究方向:从事中医药防治小儿肺脾疾病。

**通讯作者:**陈竹(1976-),女,贵州贵阳人,主任医师,硕士,研究方向:中医药防治小儿肺脾疾病, E-mail:918236355@qq.com。

try rose, and the expression of the MUC5A gene and protein increased ( $P < 0.05$ ). The YunpiXiefeiHuatan Decoction group and the Budesonide group decreased compared with the Model group ( $P < 0.05$ ). The counts of white blood cells, eosinophils, and neutrophils in BALF of the Model group increased ( $P < 0.001, P < 0.0001$ ). There was no statistical difference in neutrophils and eosinophils in each treatment group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** YunpiXiefeiHuatan Decoction reduces the levels of IL-23 and IL-17 in the serum and bronchoalveolar lavage, reduces the migration of inflammatory cells, airway inflammatory infiltration, and goblet cell hyperplasia, thereby inhibiting the overexpression of MUC5AC, and alleviates airway mucus hypersecretion and airway inflammation.

**Keywords:** asthma; Yunpi-xiefei-huatan decoction; Interleukin-17; Interleukin-23; MUC5AC

哮喘是全球健康问题,影响全球约 3 亿人,哮喘作为儿童常见呼吸系统慢性疾病具有较高的发病率及致死率<sup>[1]</sup>。哮喘病理机制复杂,至今仍未明晰。哮喘本质为气道慢性炎症,也是哮喘病理改变的根本所在。近年研究发现 IL-23/Th17 炎症轴在哮喘病理进程中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。IL-23 诱导 Th17 细胞分化 IL-17,后者通过促进炎症细胞如嗜酸性粒细胞、中性粒细胞向肺组织迁移,导致局部炎症因子释放增多,加剧气道重塑的形成<sup>[3]</sup>。气道黏液高分泌作为哮喘重要病理改变之一,与气道慢性炎症有关<sup>[4]</sup>。气道黏液高的病理改变源自杯状细胞过度增生及大量黏液异常分泌,MUC5AC 被认为是黏液高分泌的重要靶点。如前所述,从 IL-23/Th17 下游出发,IL-17 特异性抗体有望起到较好的疗效,但其在临床试验中未取得良好的预期疗效<sup>[5]</sup>。运脾泻肺化痰汤是我院名中医黄建业教授经验方,治疗哮喘安全有效,前期动物实验研究证实该方可调节哮喘黏液高分泌<sup>[6]</sup>。介于 IL-23/Th17 炎症轴与哮喘病理过程的紧密联系。探讨该炎症轴是否参与哮喘黏液高分泌调控抑制黏蛋白 5AC 表达。因此本文以运脾泻肺化痰汤为研究对象,探讨其对 IL-23/Th17 炎症轴调控作用及对黏蛋白 5AC 的影响。

## 1 材料

1.1 实验动物 SPF 级幼龄雌雄均等的 SD 大鼠 40 只,3~4 周龄,体质量( $95 \pm 5$ )g,适应性喂养 1 周。所有动物均由湖南长沙市天勤生物技术有限公司提供,动物许可证号:SCXK(湘)2014-0011。

1.2 实验药品与试剂 运脾泻肺化痰汤(由胆南星 10 g,全瓜蒌 10 g,半夏 6 g,杏仁 6 g,茯苓 6 g 等 10 味中药组成);中药颗粒源自贵州中医药大学第二附属医院药剂科;吸入用布地奈德混悬液,澳大利亚 AstraZeneca Pty Ltd.,批准文号:国药准字 H20140475,批号:LOT 320334,产品规格:2 mL:1 mg × 5 支;卵清蛋白(ovalbumin,OVA),美国 Sigma 公司,批号:9006591;大鼠白细胞介素 23(IL-23),武汉伊莱瑞特,批号:E-EL-R0478c;大鼠白细胞介素 17(IL-17)检测试剂盒,武汉云克隆科,批号:E-EL-R0478c;BCA 试剂盒,上海碧云天,批号:P0011。

1.3 实验仪器 脱水机、组织烤片机、包埋机:购自武汉俊杰公司;逆转录仪、PCR 仪:均购自北京东胜创新生物科技有限公司。WesternBlot 电泳仪,转膜仪,酶标仪,均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。显微镜:购自日本奥林巴斯公司。

## 2 方法

2.1 造模方法 分为致敏及激发两个造模阶段。判

定阳性标准:实验过程中大鼠出现抓耳挠腮、流鼻涕、躁动不安、搓抓、腹肌抽搐等症状时表示造模成功。参照前期研究造模,致敏阶段:除正常组外,余下三组在实验第 1 天和第 8 天腹腔注射 OVA(100 mg) + Al(OH)<sub>3</sub>(100 mg)混合液 1 mL;激发阶段:第 15 天起正常组予生理盐水雾化,隔天 1 次,共 7 次。余下 3 组以 1% OVA 雾化发,时间同前<sup>[7]</sup>。

2.2 分组及给药 按随机数字表将 40 只 SD 大鼠随机分为正常组(Normal group)、模型组(Model group)、运脾泻肺化痰汤组(TCM group)和布地奈德组(Budesonide group),每组 10 只。造模后第 16 天开始治疗,给药剂量参考《药理实验与方法》,根据人与动物体表面积换算,成人按 70 kg 体质量计算,成人每日给药量约 3 g/kg<sup>-1</sup>,每只动物按低、中、高剂量换算约为 10、20、40 g/kg<sup>-1</sup>,目前大鼠体质量 200 g,按 1 mL/100 g 换算为 2 mL/200 g。中药组灌胃运脾泻肺化痰汤 2 mL,布地奈德组(0.01% 布地奈德 2 mL + 0.9% NS 8 mL)雾化吸入 20 min,哮喘模型组和正常组灌胃 0.9% 生理盐水 2 mL,1 次/d 定时完成,连续 4 周<sup>[6]</sup>。

2.3 BALF(Bronchoalveolar lavage fluid,BALF)收集与炎性细胞计数 利用 2% 戊巴比妥腹腔麻醉大鼠,待大鼠原始反射消失后,置于无菌台上操作。手术剪分离颈部皮肤组织,寻找主支气管,利用头皮针软管进行气管插管,结扎右侧主支气管,左肺用 5 mL 的生理盐水灌洗,反复两次,回收率约 80%。吸取回收液,经离心机 3000 r/min 5 min 离心,取沉淀。将沉淀转移新的 EP 管中,再次利用 PBS 清洗 1 次,最后用移液器取细胞沉 200 μL,滴入细胞板进行细胞计数,滴加吉姆萨染色液,光镜下分类计算白细胞总数、嗜酸性粒细胞及中性粒细胞总数。

2.4 外周血液、肺泡灌洗液中 ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)检测 收集各组大鼠腹主动脉血液,经 3000 r/min 室温下离心 20 min,吸取上清,分装于 1.5 mL EP 管中,置入 -80 °C 冰箱保存。检测时,室温下恢复,根据试剂盒说明书稀释标准品及待测样品,在酶标仪 450 nm 吸光度下检测 OD 值,根据标准品吸光度,制备标准曲线,最后根据不同组结果将 OD 值代入标准曲线公式中计算 IL-17、IL-23 含量。

2.5 HE(Hematoxylin-eosin staining,HE)及 PAS(Schiff periodic acid shiff,PAS)染色 HE 染色观察支气管、肺泡结构形态及炎性浸润。PAS 染色观察杯状细胞及黏液分泌情况。取适量右下肺组织用 4% 多聚甲醛固定,在不同酒精梯度中脱水,二甲苯透明,石蜡

包埋,切成 5 微米切片,按操作说明切片经脱蜡、水化等步骤后,分别经用苏木精和伊红染色或经 Schiff 染液然后固定在载玻片上,重复脱水、透明步骤,最后用中性树胶封片。

**2.6 蛋白印迹试验 (Western Blot, WB)** 根据说明书利用肺组织匀浆,提取大鼠肺组织蛋白,根据目的蛋白选择合适浓度的 SDS - PAGE 凝胶电泳,稳压 120V。电泳完成后开始转膜,转膜前甲醛激活 PVDF 膜,湿转适当时间。转膜结束后,利用 5% 脱脂奶粉配制封闭液,室温摇床封闭 PVDF 膜 2 h。封闭结束后 TBST 清洗,随后加入 MUC5AC(1:200)一抗,放入 4 °C 冰箱过夜。经过一夜后, TBST 洗膜,随后加入稀释好的二抗,室温下孵育 1 h,重复洗膜。最后,采用超敏 ECL 试剂助显影, BiO - RAD 化学发光凝胶成像仪最终显影。

**2.7 以 qPCR (Quantitative Real - time PCR, qPCR) 检测** 检测各组 IL - 17、IL - 23 mRNA 的表达水平,以甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶 (GAPDH) 作为内参。取大鼠右肺适量新鲜肺组织,总 RNA 提取及 cDNA 合成分别采用 Trizol 法提取、逆转录试剂盒说明操作。PCR 扩增设置:95 °C 10 min(预变性);95 °C 15 s(变性),60 °C 60 s(退火延申),40 个循环。记录结果 CT 值,用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算各组样本中 IL - 17 和 IL - 23 基因的表达量。

**2.8 免疫组化 (Immunohistochemistry, IHC) 及 IL - 17、IL - 23 的检测** 取适量肺组织,经包埋、切片步骤同 HE 染色,利用微波煮沸联合抗体修复液进抗原修复。修复后将组织切片取出,自然冷却后,利用组化笔圈定滴加抗体区域并防止抗体稀释液流出。正常组 PBS 替代一抗,其余各组分别滴加 IL - 17、IL - 23 抗体(1:100)。取 3 个视野,重复 3 张切片结果。采用 Image Pro Plus6.0 分析光密度值 (IOD),取其平均值。阴性为无明显棕色或褐色,弱阳性为淡棕褐色,阳性为棕褐色,强阳性为明显棕褐色。

**2.9 统计学处理** SPSS 26.0 对数据进行统计分析,满足正态分布的计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,不同两组间比较采用 *t* 检验。多组间比较符合正态度分布,用单因素方差分析,并进行 LSD 检验。相关性分析采用皮尔逊 (pearson) 相关性分析, GraphPad Prism 9 进行可视化展示。

**3 结果**

**3.1 各组大鼠肺泡灌洗液及外周血中 IL - 17、IL - 23 表达** 模型组与正常组比较外周血液、肺泡灌洗液 (BALF) 中 IL - 17、IL - 23 水平升高 ( $P < 0.001, P < 0.0001$ )。与模型组比较,运脾泻肺化痰汤组及布地

奈德组外周血液、BALF 液中 IL - 17、IL - 23 水平下降 ( $P < 0.01, P < 0.001$ )。运脾泻肺化痰汤组及布地奈德组外周血及肺泡灌洗液中 IL - 23、IL - 17 差异不具有统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见插页 VIII 图 1。

**3.2 各组大鼠肺泡灌洗液中炎性细胞计数** 模型组较正常组白细胞升高 ( $P < 0.001$ ),嗜酸性粒细胞、中性粒细胞明显升高 ( $P < 0.0001$ )。与模型组比较,运脾泻肺化痰汤组、布地奈德组白细胞、嗜酸性粒细胞及中性粒细胞总数下降 ( $P < 0.0001$ ),运脾泻肺化痰汤组及布地奈德组中性粒细胞、嗜酸性粒细胞无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。见表 1、插页 VIII 图 2、封三图 3。

表 1 各组大鼠细胞分类计数 ( $\bar{x} \pm s$ ) 单位:例 (%)

组别	n	WBC ( $\times 10^7$ )	EOS ( $\times 10^7$ )	N ( $\times 10^7$ )
正常组	8	59.40 ± 7.56	2.65 ± 0.44	63.13 ± 21.22
模型组	8	89.44 ± 17.87 <sup>###</sup>	67.5 ± 10.35 <sup>****</sup>	145.60 ± 31.20 <sup>####</sup>
运脾泻肺化痰汤组	8	46.86 ± 13.19 <sup>####</sup>	27.75 ± 9.57 <sup>****</sup>	79.75 ± 24.78 <sup>****</sup>
布地奈德组	8	34.19 ± 6.72 <sup>####</sup>	20.75 ± 3.01 <sup>****</sup>	68.00 ± 25.11 <sup>****</sup>

注:###与正常组比较,  $P < 0.001$ ,####与正常组比较,  $P < 0.0001$ ;\*\*\*\*与模型组比较,  $P < 0.0001$ 。

**3.3 各组炎症基因、黏液高分泌基因表达及相关性分析** 与正常组相比,模型组 IL - 17 及 IL - 23 基因的表达水平升高 ( $P < 0.05$ );与型组相比,运脾泻肺化痰汤组、布地奈德组 IL - 17、IL - 23、MUC5AC 基因的表达水平均下降 ( $P < 0.05$ );与布地奈德组相比,运脾泻肺化痰汤组 IL - 17 基因表达量降低 ( $P < 0.05$ ), IL - 23、MUC5AC 基因表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。相关性分析, IL - 17 与 IL - 23 mRNA 相关性,  $r = 0.9492, P < 0.0001$ ; IL - 23 与 MUC5AC mRNA 相关性,  $r = 0.7570, P < 0.0001$ ; IL - 17 与 MUC5AC mRNA 相关性,  $r = 0.8195, P < 0.0001$ 。IL - 17、IL - 23、MUC5AC 基因之间具有正相关关系。见表 2,图 4 - 图 5。

表 2 各组大鼠 IL - 17、IL - 23、MUC5AC 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	IL - 17	IL - 23	MUC5AC
正常组	6	1.08 ± 0.13	1.06 ± 0.16	1.04 ± 0.05
模型组	6	4.11 ± 0.26 <sup>*</sup>	4.54 ± 0.31 <sup>*</sup>	3.36 ± 0.19 <sup>*</sup>
运脾泻肺化痰汤组	6	1.96 ± 0.21 <sup>#Δ</sup>	2.58 ± 0.16 <sup>#</sup>	2.12 ± 0.16 <sup>#</sup>
布地奈德组	6	2.37 ± 0.16 <sup>#</sup>	2.81 ± 0.17 <sup>#</sup>	1.90 ± 0.08 <sup>#</sup>

注: \* 与正常组比较,  $P < 0.05$ ; # 与模型组比较,  $P < 0.05$ ; Δ 与布地奈德组比较,  $P < 0.05$ 。

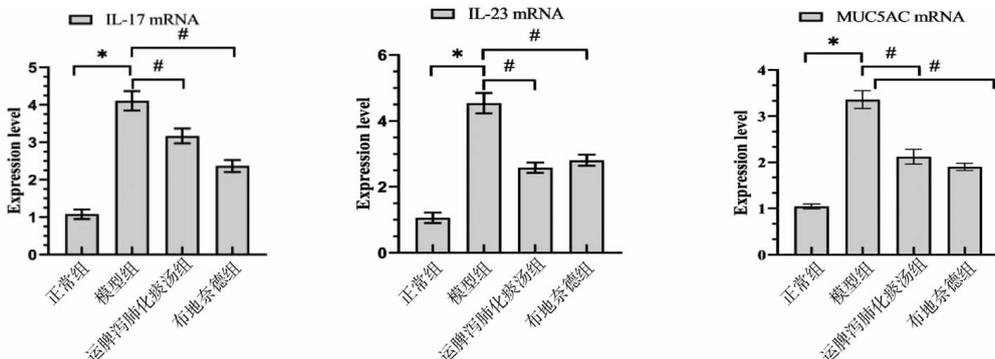
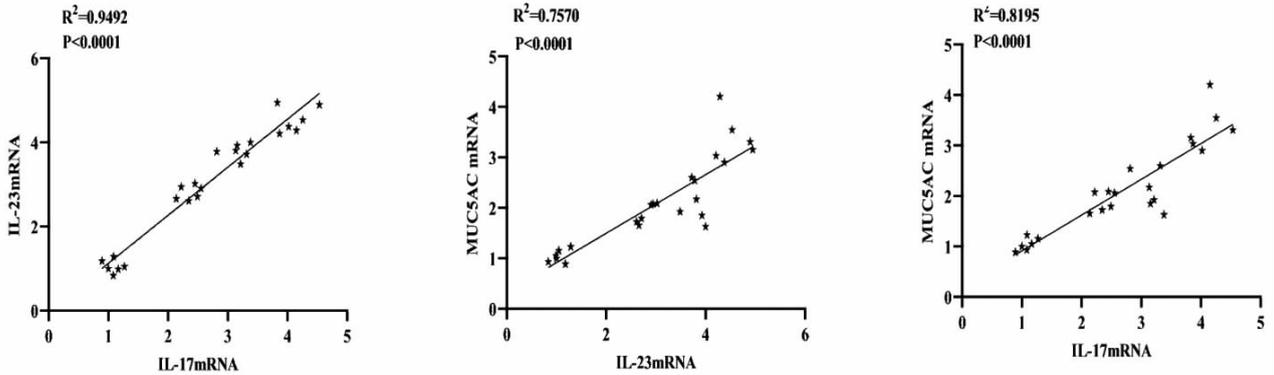


图 4 各组大鼠 IL - 17、IL - 23、MUC5AC 基因表达比较



注:IL-17 与 IL-23 相关性, $r=0.9492$ , $P<0.0001$ ;IL-23 与 MUC5AC 相关性, $r=0.7570$ , $P<0.0001$ ;IL-17 与 MUC5AC 相关性, $r=0.8195$ , $P<0.0001$ 。

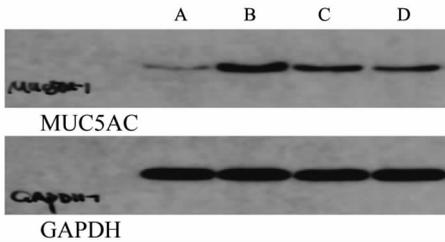
图 5 各组大鼠 IL-17、IL-23、MUC5AC 基因之间相关性分析

3.4 各组大鼠 MUC5AC 蛋白表达 模型组较正常组 MUC5AC 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ ), 运脾泻肺化痰汤组、布地奈德组均较模型组下降 ( $P < 0.05$ )。运脾泻肺化痰汤组与布地奈德组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 4、图 6 - 图 7。

表 4 各组大鼠 MUC5AC 蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s$ ) 单位:例/%

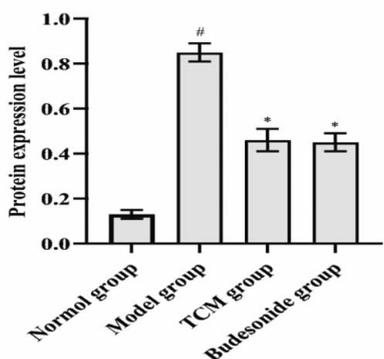
组别	n	MUC5AC
正常组	6	0.13 ± 0.02
模型组	6	0.85 ± 0.04*
运脾泻肺化痰汤组	6	0.46 ± 0.05#
布地奈德组	6	0.45 ± 0.04#

注: \* 与正常组比较, $P < 0.05$ ; # 与模型组比较, $P < 0.05$ 。



注:GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶;MUC5AC: 黏蛋白 5AC; A. 正常组;B. 模型组;C. 运脾泻肺化痰汤组;D. 布地奈德组。

图 6 各组大鼠 MUC5AC 蛋白印迹



注:GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶;MUC5AC: 黏蛋白 5AC; A. 正常组;B. 模型组;C. 运脾泻肺化痰汤组;D. 布地奈德组。

图 7 各组大鼠 MUC5AC 蛋白印迹差异图

3.5 各组大鼠 HE 染色 正常组形态结构完整。模

型组形态结构紊乱,支气管管腔狭窄,气道上皮细胞脱落,肺泡融合,周围结缔组织增厚。运脾泻肺化痰汤组、布地奈德组较模型组支气管管腔狭窄改善,结缔组织增生减轻、肺泡结构相对完整。见封三图 8。

3.6 各组大鼠 PAS 染色 正常组未见明显黏液分泌及杯状细胞增生。模型组可见到支气管壁大量糖原分泌呈深红色颗粒,提示杯状细胞增生明显,管腔周围见蓝色黏液分泌增多。运脾泻肺化痰汤组及布地奈德组大鼠可见少量杯状细胞增生、深红色颗粒范围减少提示糖原分泌减少及蓝色范围减提示黏液分泌减少。见封三图 9。

3.7 各组大鼠免疫组化染色比较 结果显示,正常组未见明显棕褐色。模型组较正常组 IL-17 表达升高,棕褐色范围明显增多 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比运脾泻肺化痰汤组、布地奈德组棕褐色范围范围明显减弱见淡褐色表达,提示 IL-17 表达明显减弱 ( $P < 0.05$ )。正常组肺组织少见棕褐色颗粒,提示 IL-23 表达较低。模型组见大量深褐色颗粒,提示较模型组 IL-23 表达明显增加 ( $P < 0.05$ ),与模型组比较,运脾泻肺化痰汤组、布地奈德组棕褐色面积明显减少且呈淡褐色,提示 IL-23 表达明显下降较 ( $P < 0.05$ )。见封三图 10。

#### 4 讨论

运脾泻肺化痰汤由古方清气化痰丸加减而成,是本院著名中医黄建业教授的独创方剂。运脾泻肺化痰汤能够减少儿童气道痰液的形成,也可以缓解哮喘患者痰多难咯、痰鸣难除的症状<sup>[8]</sup>。早期的动物实验显示,运脾泻肺化痰汤能缓解肺组织炎症<sup>[9]</sup>。炎症刺激可促进黏液高分泌,而黏液高分泌与黏蛋白 5AC 表达上调有关<sup>[10]</sup>。但炎症细胞及其分泌的炎性介质与黏蛋白 5AC 之间关系复杂,细胞信号转导通路机制未完全阐明。

Th17 细胞是一种新型 CD4<sup>+</sup> 细胞亚群,其受体广泛分布于巨噬细胞、树突状细胞、单核细胞等,参与机体炎症及免疫应答反应<sup>[11]</sup>。Th17 分化衍生多种细胞因子,如 IL-17A (IL-17) 等,其中以 IL-17 为主要的细胞因子,IL-17 参与 Th2 细胞因子激活及分化,

扰乱 Th1/Th2 免疫分化平衡,导致经典的哮喘气道炎症免疫反应<sup>[12]</sup>。同时 IL-17 刺激气道上皮细胞促进 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  表达,促进中粒细胞浸润<sup>[13]</sup>。IL-23 属于 IL-12 家族成员之一,其受体表达于 Th17 细胞表面,结合其特异性受体 IL-23R,可促进 IL-17 分泌,IL-23 与 IL-17 密切相关组成了 IL-23/Th17 炎症轴,可诱导嗜酸性粒细胞和中性粒细胞浸润,参与气道炎症,从而促进哮喘病发生、发展<sup>[14]</sup>。

慢性气道炎症是哮喘的重要病理特征,此次实验利用 OVA 雾化 + 氢氧化铝联合致敏建立经典哮喘模型,病理染色提示肺组织炎症浸润明显,大量杯状细胞增生符合慢性气道炎症改变。检测肺泡灌洗液、外周血液中炎症因子并进行肺组织免疫组化分析,发现 IL-17、IL-23 在外周血液、肺组织中高表达。研究发现 IL-23、IL-17 水平存在浓度依赖性。IL-23 受体缺乏的 T 细胞 IL-17 分化减少,IL-23 可促进 IL-17 产生,IL-17 源自 Th17 细胞亚群分化而来,他们之间密切关系,组成了 IL-23/Th17 炎症轴<sup>[15]</sup>。IL-23/Th17 炎症轴在哮喘气道炎症中具有重要作用,利用 IL-23 中和抗体可抑制嗜酸性粒细胞聚集,减少相关炎症介质释放<sup>[16]</sup>。实验发现模型组大鼠肺泡灌洗液中白细胞、嗜酸性粒细胞增多,可能与 IL-23/Th17 炎症轴促进嗜酸性粒细胞浸润有关。布地奈德组、运脾泻肺化痰汤组治疗后嗜酸性粒细胞下降,此外肺组织中中性粒细胞数目亦下降,提示运脾泻肺化痰汤可同时抑制中性粒细胞及嗜酸性粒细胞浸润。

黏蛋白 5AC 在气道中主要来源于支气管上皮中的杯状细胞,黏蛋白 5AC 是黏液分泌的主要蛋白,其表达上调是导致黏液分泌增多的主要原因,黏液分泌旺盛可导致气道阻塞,进一步影响肺通气功能,导致阻塞性肺通气功能障碍,作为哮喘急性发作期气流受限的重要病理特征<sup>[17]</sup>。白晶等<sup>[18]</sup>利用低浓度 IL-17 刺激鼻黏膜上皮细胞,MUC5ACmRNA 表达上升,提示 MUC5AC 合成、分泌与气道炎症刺激密切相关,气道炎症可促进黏液高分泌。IL-17 活化与 IL-23 刺激 Th17 细胞分化有关,即与 IL-23/Th17 炎症轴调控相关。此次实验通过 qPCR 研究证实哮喘组大鼠肺组织黏蛋白 5AC 分泌增多与 IL-23/Th17 之间存在相关性。经 pearson 相关性分析,IL-23、IL-17 及 MUC5AC 基因转录水平呈正相关关系,且肺泡灌洗及外周血清 IL-17、IL-23 升高,病理染色观察到肺组织大量糖原颗粒在支气管壁分泌,提示杯状细胞增生明显。因此证实 IL-23/Th17 炎症轴对 MUC5AC 分泌具有重要调节作用,它们之间可以相互促进,具有正向调节关系。运脾泻肺化痰汤干预后,肺组织病理改善,肺泡灌洗液、外周血清、肺组织 IL-23、IL-17 水平及 MUC5AC 表达趋势下调一致。因此,运脾泻肺化痰汤可能通过抑制 IL-23/Th17 炎症轴改善气道炎症及黏液高分泌。

参考文献

[1] ASHER M I,RUTTER C E,BISSELL K,et al. Worldwide trends in

the burden of asthma symptoms in school - aged children: Global Asthma Network Phase I cross - sectional study[J]. Lancet,2021,398 (10311):1569 - 1580.

[2] ELAIDY S M,ESSAWY S S,HUSSAIN M A,et al. Modulation of the IL-23/IL-17 axis by fenofibrate ameliorates the ovalbumin/lipopolysaccharide - induced airway inflammation and bronchial asthma in rats[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol,2018,391 (3): 309 - 321.

[3] GUERRA E S,LEE C K,SPECHT C A,et al. Central Role of IL-23 and IL-17 Producing Eosinophils as Immunomodulatory Effector Cells in Acute Pulmonary Aspergillosis and Allergic Asthma[J]. PLoS Pathog,2017,13(1):1006 - 1025.

[4] PENG J,YANG X O,CHANG S H,et al. IL-23 signaling enhances Th2 polarization and regulates allergic airway inflammation[J]. Cell Res,2010,20(1):62 - 71.

[5] ÖSTLING J,VAN GEEST M,SCHOFIELD J,et al. IL-17 - high asthma with features of a psoriasis immunophenotype[J]. J Allergy Clin Immunol,2019,144(5):1198 - 1213.

[6] 陈娜,陈竹,张远,等. 运脾泻肺化痰汤对哮喘模型大鼠肺组织表皮生长因子受体和黏蛋白 5AC 表达的影响[J]. 国际中医中药杂志,2021,43(9):880 - 886.

[7] 张芷瑞,陈竹,陈娜,等. 运脾泻肺化痰汤对幼龄哮喘大鼠气道黏液高分泌的影响. 中国临床药理学杂志,2021,37(18):2460 - 2462,2467.

[8] 陈竹,彭玉,杨见辉,等. 清气化痰汤治疗小儿痰热壅肺型哮喘 30 例疗效观察[J]. 中医儿科杂志,2014,10(4):18 - 21.

[9] 陈竹,彭玉,庞平,等. 清气化痰汤对哮喘小鼠肺部炎症的影响[J]. 重庆医学,2017,46(25):3473 - 3476.

[10] TAJIRI T,MATSUMOTO H,JINNAI M,et al. Pathophysiological relevance of sputum MUC5AC and MUC5B levels in patients with mild asthma[J]. Allergol Int,2022,71(2):193 - 199.

[11] YASUDA K,TAKEUCHI Y,HIROTA K. The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases[J]. Semin Immunopathol,2019,41(3):283 - 297.

[12] MENG X T,SHI Y Y,ZHANG H,et al. The Role of Th17 Cells and IL-17 in Th2 Immune Responses of Allergic Conjunctivitis[J]. J Ophthalmol,2020,12(2):691 - 718.

[13] ALLEN J E,SUTHERLAND T E,RÜCKERL D. IL-17 and neutrophils:unexpected players in the type 2 immune response[J]. Curr Opin Immunol,2015,3(2):99 - 106.

[14] BUNTE K,BEIKLER T. Th17 Cells and the IL-23/IL-17 Axis in the Pathogenesis of Periodontitis and Immune - Mediated Inflammatory Diseases[J]. Int J Mol Sci,2019,20(14):88 - 103.

[15] ZHONG Z,SU G,KIJLSTRA A,et al. Activation of the interleukin - 23/interleukin - 17 signalling pathway in autoinflammatory and autoimmune uveitis[J]. Prog Retin Eye Res,2021,20(12):108 - 166.

[16] WU A Y,PEEBLES R S. The emerging role of IL-23 in asthma and its clinical implications[J]. Expert Rev Clin Immunol,2022,3(2): 1 - 5.

[17] SACO T V,BREITZIG M T,LOCKEY R F,et al. Epigenetics of Mucus Hypersecretion in Chronic Respiratory Diseases[J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2018,58(3):299 - 309.

[18] 白晶,苗北平,夏文彤,等. 白细胞介素 - 17A 对鼻黏膜上皮细胞表达黏蛋白 MUC5AC 的刺激作用及分子机制[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科,2013,20(6):319 - 322.