

乔梁,胡山岗,李荣霞. 基于 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路探讨温阳化饮方对支气管哮喘寒饮蕴肺证大鼠的作用机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 93-100.

Qiao L, Hu SG, Li RX. Wenyanguayin decoction ameliorates the airway remodeling associated with bronchial asthma and syndrome of cold fluid accumulation in the lungs of rats via the ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 93-100.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.08.014

基于 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路探讨温阳化饮方对支气管哮喘寒饮蕴肺证大鼠的作用机制

乔梁¹, 胡山岗¹, 李荣霞^{2*}

(1.河南省中医院急诊科, 郑州 450002; 2.青海省人民医院急救中心, 西宁 810007)

【摘要】 目的 探讨温阳化饮方对支气管哮喘寒饮蕴肺证大鼠的作用以及对 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路的调节作用。方法 将 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、对照组、实验组 ($n=15$); 先以卵蛋白 (OVA) 致敏刺激和雾化进行造模形成支气管哮喘模型大鼠, 后以冰水喂养给以“饮冷”刺激, 冰箱冷冻给以“形寒”刺激进行寒饮蕴肺证造模。实验组和对照组大鼠以剂量为 30 mg/kg 的温阳化饮方和雷帕霉素溶液 (以医用生理盐水进行溶解) 进行灌胃给药, 正常组和模型组以等剂量的医用生理盐水灌胃, 连续灌胃 22 d。小动物肺功能分析仪测定大鼠的肺功能; TUNEL 检测肺组织中的细胞凋亡; ELISA 法检测血清中细胞因子白细胞介素 6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的含量; Western blot 检测肺组织中 p-ERK1/2、p-p38 MAPK、凋亡相关蛋白 Bax、Bcl2 的表达。结果 与正常组相比, 模型组大鼠吸气时的气道阻力 (R_{insp}) 和呼气时的气道阻力 (R_{exp}), 血清中 IL-6 和 TNF- α 的含量, 细胞凋亡率, p-ERK1/2、p-p38 MAPK、Bax 的表达出现明显升高, 肺胸通气时的动态顺应性 (C_{dyn})、Bcl-2 的表达出现明显下降 (均 $P<0.05$), 与模型组相比, 对照组和实验组大鼠 R_{insp} 和 R_{exp}、血清中 IL-6 和 TNF- α 的含量, 细胞凋亡率, p-ERK1/2、p-p38 MAPK、Bax 的表达出现明显下降, C_{dyn}、Bcl-2 出现明显升高 (均 $P<0.05$)。结论 在支气管哮喘寒饮蕴肺证大鼠模型中, 温阳化饮方能明显抑制炎症因子的释放, 降低肺组织的细胞凋亡, 这可能与抑制 ERK1/2 和 p38MAPK 信号有关。

【关键词】 温阳化饮方; 支气管哮喘寒饮蕴肺证; ERK1/2 和 p38MAPK 信号

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0093-08

Wenyanguayin decoction ameliorates the airway remodeling associated with bronchial asthma and syndrome of cold fluid accumulation in the lungs of rats via the ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways

QIAO Liang¹, HU Shangang¹, LI Rongxia^{2*}

(1. Emergency Department, Henan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China.

2. Emergency Center, Qinghai People's Hospital, Xining 810007)

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism whereby Wenyanguayin decoction ameliorates airway remodeling in rats with bronchial asthma and syndrome of cold fluid accumulation, focusing on the ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways. **Methods** Sprague Dawley rats were randomly allocated to normal, model, control, and experimental groups ($n=15$ each). Ovalbumin sensitization, stimulation, and atomization were used to induce bronchial asthma in the model rats, then iced water feeding was stimulated by “cold drinking” and freezing in a refrigerator was stimulated by

【作者简介】 乔梁 (1975—), 男, 主治医师, 本科, 研究方向: 重症医学。E-mail: 179362337@qq.com

【通信作者】 李荣霞 (1978—), 女, 主任医师, 本科, 研究方向: 重症医学。E-mail: 923140188@qq.com

“form cold” to model the syndrome of cold drink accumulating in the lung. Rats in the experimental and control groups were administered 30 mg/kg Wenyanghuayin decoction or rapamycin in physiological saline by gavage, respectively, and the normal and model groups were administered the same volume of normal saline for 22 consecutive days. A small and micro animal lung function analyzer was used to assess the lung function of the rats. TUNEL staining was used to detect cell apoptosis in lung tissue. ELISA kits were used to measure the serum concentrations of interleukin (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Western blot was used to measure the expression of p-ERK1/2, p-p38 MAPK, the apoptosis-related protein Bax, and Bcl2 in lung tissue. **Results** Compared with the normal group, the airway resistance during inhalation (Rinsp) and expiration (Rexp), the serum concentrations of IL-6 and TNF- α , the rate of apoptosis, and the expression of p-ERK1/2, p-p38 MAPK, and Bax were significantly higher, and the dynamic compliance (Cdyn) and expression of Bcl-2 were significantly lower (all $P < 0.05$) in the model group than in the control group. The Rinsp and Rexp, serum IL-6 and TNF- α , apoptosis rate, and expression of p-ERK1/2, p-p38 MAPK, and Bax were significantly lower; and the Cdyn and the expression of Bcl-2 were significantly higher than in the control and experimental groups (all $P < 0.05$). **Conclusions** In a rat model of airway remodeling during bronchial asthma and syndrome of cold fluid accumulation in the lung, Wenyanghuayin decoction significantly inhibits the release of proinflammatory factors and reduces lung cell apoptosis, which may be mediated via inhibition of ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways.

[Keywords] Wenyanghuayin decoction; airway remodeling of bronchial asthma with syndrome of cold fluid accumulation; ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathway

支气管哮喘是主要是炎症反应导致的累及肺组织和气管的迁延不愈的慢性疾病。临床上主要表现为胸闷、反复咳嗽、呼吸急促、喘息等症状,尚无根治性治疗手段,严重影响患者的生活质量,甚至是危及患者生命的安全。近年来,该病的发病率随工业化进程导致的环境污染的加剧而逐年上升^[1]。传统的中医药技术在控制呼吸系统炎症性反应方面具有明显的优势。支气管哮喘在中医上被称为“哮”病。寒饮蕴肺证是“哮”病中最为常见的临床证候,机体阳气不足,肺主行水功能失调,水饮蕴积与肺,使患者出现肺阳不足,宣降失常,痰阻气滞,逐渐发展成寒饮滞留于肺^[2]。

中医师在长期的一线探索中,已经证实^[3]厚朴麻黄汤、小青龙汤等中药方剂具有宣发肃降,温补阳气,蠲化凝痰等疗效。中医传统名方——温阳化饮方主要由麻黄、五味子、桂枝、干姜、甘草、生白芍等味中药组成,是用来控制阳虚寒饮内停证候的常用方法。颜培正等^[4]研究证实温阳化饮方能明显改善“形寒饮冷”的哮喘病寒饮蕴肺证大鼠的肺功能,降低模型大鼠的死亡率。但是未深入探讨本药方对疾病的作用机制。

细胞外信号调节蛋白激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2) 和 p38 丝裂原激活蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinases, p38MAPK) 是真核生物体内将胞外信号传递进胞核内的与炎症性应激密切相关的通路之一。研究表明 ERK1/2 和 p38MAPK 信号在细胞的炎症性应激

中参与调控炎症因子的分泌与释放,并且调节应激中细胞的分化和凋亡^[5]。已有大量的动物研究表明 ERK1/2 和 p38MAPK 信号在变应性鼻炎、鼻窦炎、支气管哮喘以及慢性阻塞性肺等慢性呼吸系统疾病中表达异常^[6]。本研究通过建立支气管哮喘寒饮蕴肺证大鼠模型,从炎症角度以及气道组织结构变化入手,基于 ERK1/2 和 p38MAPK 信号,来探讨温阳化饮方对支气管哮喘寒饮蕴肺证的作用机制,为中医药传统名方的临床应用提供实验数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠,8~10 周龄,体重 (180±20) g,共计 60 只,从河南省实验动物中心采购 [SCXK(豫)2017-0001],动物饲养在河南天致药业有限公司的 SPF 级实验动物房内 [SYXK(豫)2020-0007];本研究中所有动物实验操作均在 3R 原则的指导下给与实验动物人道主义关怀,本研究经本院实验动物管理伦理委员会审核批准 (IACUC 2020-068)。

1.2 主要试剂与仪器

温阳化饮方 (由我院主任医师的处方,主要由麻黄、五味子、桂枝、干姜、甘草、生白芍、黄芪、人参各 10 g,细辛 5 g,黄芪 25 g 等组成,在我院的中药房抓取,并由专业中药师进行常规煎煮)。雷帕霉素 (西罗莫司胶囊,0.5 mg×20 粒,华北制药股份有限公司,国药准字:H20100079)。

卵清白蛋白 (ovalbumin, OVA, 每瓶 25 g, 美国 Sigma 公司, 生产批号: 350741); p-ERK1/2 (生产批号: 59042190)、p-p38 MAPK (生产批号: 59364925) 抗体 (美国 abcam 公司); 兔抗大鼠磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) (生产批号: TD90M-21) 抗体 (美国 Thermo 公司); TUNEL 试剂盒 (生产批号: 45G6007) (北京华夏远洋科技有限公司); 苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, HE) 试剂盒 (生产批号: YN-093M) (上海碧云天生物技术公司); 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (生产批号: BS-0934) (美国 Amresco 公司)。

OLYMPUS 生物显微镜 (生产批号: 6489M, Olympus 公司, 日本); -80℃ 深冷冰箱 (生产批号: 4BG5-02, 维根斯公司, 德国); Leica RM2135 组织切片机 (生产批号: V5679-0A, Leica 公司, 德国); 高速低温离心机 (生产批号: 18-00 MH, 北京六一仪器厂); 微小动物超声雾化器 (生产批号: 2XS73, Delong America 公司, 加拿大)。

1.3 实验方法

1.3.1 支气管哮喘寒饮蕴肺证大鼠模型的构建

(1) 支气管哮喘模型大鼠的造模步骤

大鼠经适应性喂养一周后, 随机分为正常组、模型组、对照组、实验组 ($n=15$)。参照文献^[7]对大鼠先进行致敏刺激, 即在第 1、8 天腹腔注射 1 mL 的抗原液 (主要有 100 mg OVA、100 mg 氢氧化铝以及 5×10^9 个已经灭活的百日咳杆菌疫苗组成), 正常组大鼠腹腔注射等剂量的医用生理盐水; 从第 15 天开始, 造模大鼠在微小动物超声雾化器上进行雾化激发, 即雾化液为: 1% OVA, 频次为: 每天一次, 持续时长为: 20 min, 不间断进行 8 d, 正常组大鼠的雾化液为医用生理盐水, 时长和频次同上。

(2) 中医中大鼠寒饮蕴肺证模型的造模步骤

除第 1、8 天外, 每天需给大鼠施加“饮冷”刺激, 即每天在 8:00AM-8:00PM 时间段中, 给大鼠 0℃ 的冰水混合物, 随后施加“形寒”刺激: 将大鼠每天放置在预先设定 0℃ 的冰箱中 3 h, 待大鼠机体恢复正常后, 准备 25℃ 上下的水, 让大鼠在其中游泳, 当其精疲力竭, 使鼻孔没入水中时, 将其捞出; 从第 15 天开始, 各组大鼠每日经雾化激发后, 放置在预先设定 0℃ 的冰箱中 3 h, 待大鼠机体恢复正常后, 准备 25℃ 上下的水, 让大鼠在其中游泳 15 min, 维持 8 d。正常组大鼠不用进行“饮冷”、“形寒”刺激,

期间所有大鼠以标准基础饲料喂养^[8]。

1.3.2 各组大鼠的药物干预

本研究中大鼠的用药剂量根据成人 (60 kg) 温阳化饮方煎剂日用药量进行计算^[9], 得出实验组大鼠的温阳化饮方的剂量约为 30 mg/kg, 本研究所用药方煎剂经本课题组专门医师在医院药房统一煎煮, 给大鼠进行药物处理前均在 25℃ 恒温水箱内放置 10 min。从造模开始第 2 天开始, 实验组和对照组大鼠以剂量为 30 mg/kg 的温阳化饮方和雷帕霉素溶液 (以医用生理盐水进行溶解) 进行灌胃给药, 正常组和模型组以等剂量的医用生理盐水灌胃, 连续灌胃 22 d。

1.3.3 各组大鼠肺功能的测定

造模过程中观察并记录各组大鼠的日常状态和习惯, 主要包括体重、饮水量、饮食量、精神状态、呼吸状况、活动量等。在进行肺功能测试时大鼠禁食不禁水 24 h, 腹腔注射 75 mg/kg 的戊巴比妥钠进行麻醉, 小动物肺功能分析仪测定大鼠肺功能^[10], 呼吸比: 15:10, 呼吸机参数为: 每分钟 75 次, 记录各组大鼠吸气时的气道阻力 (R_{insp})、呼气时的气道阻力 (R_{exp})、肺胸通气时的动态顺应性 (C_{dyn})。

1.3.4 各组大鼠的肺以及气管组织的病理学改变

测试完毕后, 留取 5 mL 血, 处死大鼠, 无菌剥离大鼠的肺以及气管组织, 经液氮分封存后, 放置在深冷冰箱中待测。取出各组 0.5 cm×0.5 cm 大小的肺以及气管组织, 采用 10% 的甲醛固定 24 h 切片, HE 染色, 光镜下观察病理改变。

1.3.5 电镜观察各组大鼠肺和气管组织的超微结构改变

取出各组 0.5 cm×0.5 cm 大小的肺以及气管组织, 分别制成 0.3 cm×0.5 cm 大小的超薄组织切片: 2.5% 戊二醛固定 8 h, 清洗 3 次后, 梯度浓度乙醇脱水, 置于 -20℃ 冰箱中干燥过夜, 透射电镜下观察各组大鼠的肺和气管组织超微病理结构改变。

1.3.6 TUNEL 染色检测各组大鼠肺组织中的细胞凋亡

取出各组 0.5 cm×0.5 cm 大小的肺组织, 经固定, 冰冻切片, 梯度乙醇浸洗, 风干后 3% 双氧水-甲醇浸泡, 清洗, 依次采用 0.1% TritonX-100, 0.1% 缓冲液浸泡, 清洗后, 加入 TUNNEL 反应液, 暗湿盒反应, 漂洗, 脱水, 透明, 封片, 荧光显微镜下观察。

1.3.7 ELISA 法检测各组大鼠血清中细胞因子白细胞介素 6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 的含量

取出 50% 的各组大鼠的血清,冰上解冻,根据 IL-6 和 TNF- α 试剂盒要求,绘制目标蛋白的标准曲线后,进行测定。

1.3.8 Western blot 检测各组大鼠肺组织中 p-ERK1/2、p-p38MAPK、凋亡相关蛋白 Bax、Bcl2 的表达水平

从冰箱中取出 10% 大鼠肺组织,采用常规方法提取总蛋白,测定蛋白浓度后,准确量取 50 μ g,电泳将蛋白分离,转膜,脱脂奶粉封闭,以(1:500)比例稀释后,维持 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育,次日,加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗(1:1500),经显色,曝光、显影、定影后,以 GAPDH 为内参来表示蛋白的表达水平。

1.4 统计学方法

数据统计采用 SPSS 16.0 软件,作图工具采用 Graphpad5.01,采用平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示符合正态分布的计量资料,采用单因素方差分析进行多组间比较,若差异存在统计学意义,则进一步组间两两比较采用 Dunnett 检验,当 $P<0.05$ 表示差异显著,具有统计学意义。

2 结果

2.1 实验过程中各组大鼠的一般情况

正常组大鼠精神状态良好,呼吸正常,活动量较多,反应机敏,皮毛浓密且富有光泽,进食、饮水规律,形体健壮,口、鼻等器官内无异常分泌物。模型组大鼠精神状态不佳,进食、饮水较少,喜静懒动,好扎堆,反应迟缓,皮毛粗糙,暗淡,脱落明显,呼吸急促,伴有咳嗽,骚鼻等行为,口、鼻等部位,均出现较多的粘性分泌物,大便不成形,不规律,形体日趋消瘦。对照组大鼠精神状态较模型组明显改善,饮食、饮水较为规律,呼吸较为平稳,偶有咳嗽,口、鼻的粘性分泌物明显减少,皮毛稍见脱落,体重较模型组明显增加。实验组大鼠的反应较为灵敏,已经无扎堆状况,呼吸节律趋于均匀,大小便趋于正常,饮水、饮食量较模型组明显增加,大鼠的体重增加明显。

2.2 各组大鼠肺功能的比较

各组大鼠肺功能检测结果显示,与正常组相比,模型组大鼠 Rinsp 和 Rexp 出现明显升高, Cdyn 出现明显下降(均 $P<0.05$),与模型组相比,对照组和实验组大鼠 Rinsp 和 Rexp 出现明显下降, Cdyn 出现明显升高(均 $P<0.05$),对照组和实验组相比,差异不具有统计意义($P>0.05$),见图 1。

2.3 各组大鼠肺组织的病理学损伤和超微结构的改变

HE 染色结果显示,正常组大鼠肺组织细胞排列规整,肺泡大小均匀,结构完整,未见炎性细胞浸润;模型组大鼠肺组织肺泡腔内大量炎性细胞填充,肺泡壁增厚明显,正常肺泡结构数量明显减少,间质充血明显,周围组织肿胀明显;对照组和实验组大鼠的肺组织病理损伤明显缓解,偶见炎性细胞渗出,肺泡结构趋于正常,见图 2。

电镜下观察各组大鼠的肺组织的超微结构改变结果显示,正常组大鼠肺组织内肺泡数量丰富,间质细胞内的线粒体排列规整,嵴结构完整,染色质的状态正常,核膜未见异常;模型组大鼠肺组织的线粒体数量明显减少,嵴结构排列紊乱,重叠、溶解明显,核膜缺损明显,染色质固缩严重;对照组和实验组大鼠肺组织的线粒体的数量明显有所回升,嵴结构的数量较模型组明显增加,嵴间腔明显减小,排列趋于正常,见图 3。

2.4 各组大鼠气管组织的病理学损伤和超微结构的改变

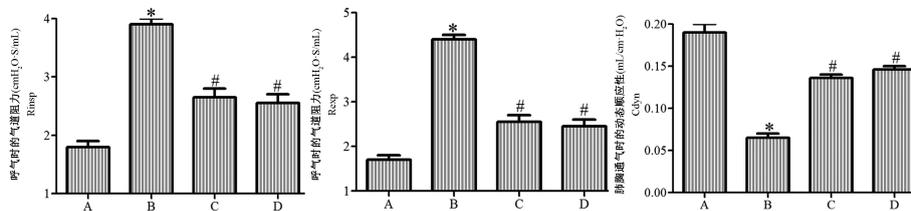
HE 染色结果显示,正常组大鼠气管组织结构完整,纤毛排列整齐,长度均一,支气管管腔通畅,平滑肌厚度均匀,未见异常;模型组大鼠气管粘膜上皮细胞可见明显的粘液物,支气管管腔内可见大量的炎性细胞填充,多处出现渗血点,纤毛粘连严重;对照组和实验组大鼠的气管组织的炎性损伤明显缓解,气管粘膜上皮细胞的纤毛排列趋于规整,稍见出血点和渗出物,但气管组织的病理损伤较模型组明显减轻,见图 4。

电镜下观察各组大鼠的气管组织的超微结构改变结果显示,正常组大鼠气管组织粘膜上皮细胞内,线粒体结构完整,嵴结构清晰可辨,核质界限清晰;模型组大鼠气管组织粘膜上皮细胞肿胀明显,线粒体失去正常结构,嵴结构或变短,或缺损,或消失,核质界限不明,染色质固缩严重;对照组和实验组大鼠气管组织的线粒体的数量明显有所回升,嵴结构趋于正常,核质界限趋于分明,核仁较为明显,见图 5。

2.5 TUNEL 检测各组大鼠肺组织细胞的凋亡

TUNEL 结果显示,与正常组相比,模型组大鼠肺组织的细胞凋亡率明显升高($P<0.05$),与模型组相比,对照组和实验组大鼠肺组织的细胞凋亡率明显下降($P<0.05$),对照组和实验组相比,差异不具有统计意义($P>0.05$),见图 6。

Western blot 结果显示,与正常组相比,模型组

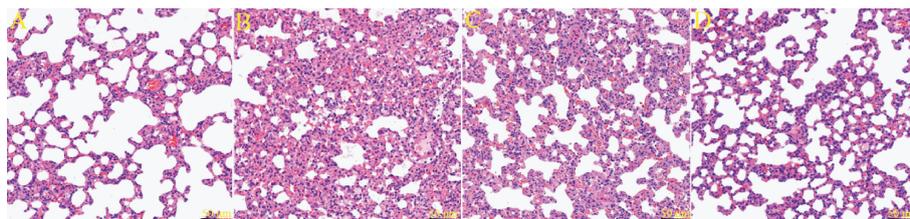


注:A:正常组;B:模型组;C:对照组;D:实验组。与正常组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,# $P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠的肺功能

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Control group. D, Experimental group. Compared with the normal group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$.

Figure 1 Lung function of rats in each group

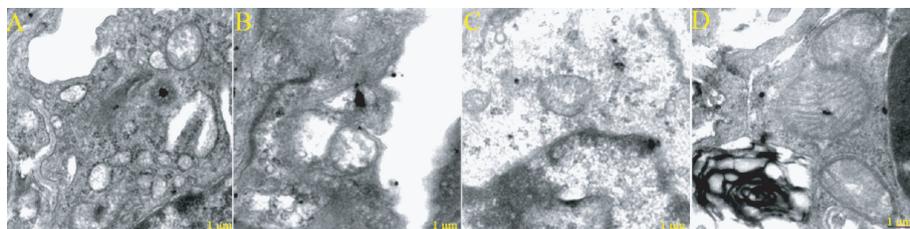


注:A:正常组;B:模型组;C:对照组;D:实验组。

图 2 肺组织病理改变

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Control group. D, Experimental group.

Figure 2 Pathological changes of lung tissue

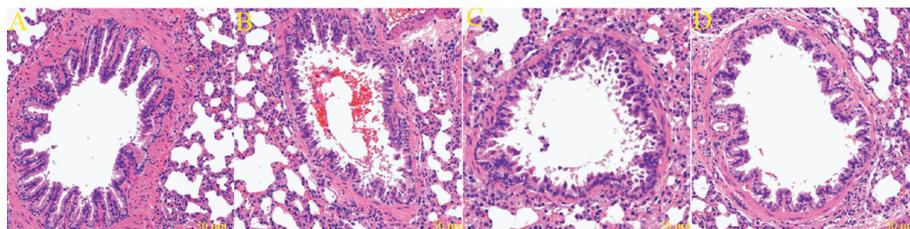


注:A:正常组;B:模型组;C:对照组;D:实验组。

图 3 肺组织超微结构改变

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Control group. D, Experimental group.

Figure 3 Ultrastructural changes in lung tissue



注:A:正常组;B:模型组;C:对照组;D:实验组。

图 4 气管组织病理改变

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Control group. D, Experimental group.

Figure 4 Pathological changes of tracheal tissue

大鼠肺组织中 Bcl-2 的表达明显下降, Bax 的表达明显升高(均 $P < 0.05$), 与模型组相比, 对照组和实验组大鼠肺组织中 Bcl-2 的表达明显升高, Bax 的表达明显下降(均 $P < 0.05$), 对照组和实验组相比, 差异不具有统计意义($P > 0.05$), 见图 7。

2.6 ELISA 测定各组大鼠血清中 IL-6 和 TNF- α 的含量

ELISA 结果显示, 与正常组相比, 模型组血清中 IL-6 和 TNF- α 的水平明显升高($P < 0.05$), 与模型组相比, 对照组和实验组大鼠血清中 IL-6 和 TNF- α 的水平明显下降($P < 0.05$), 对照组和实验组相比, 差异不具有统计意义($P > 0.05$), 见图 8。

2.7 Western blot 检测肺组织中 p-ERK1/2、p-p38 MAPK 的表达

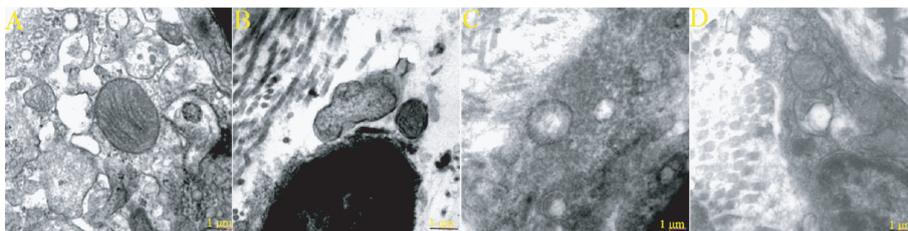
Western blot 结果显示, 与正常组相比, 模型组大鼠肺组织中 p-ERK1/2、p-p38 MAPK 的表达明显升高($P < 0.05$), 与模型组相比, 对照组和实验组大鼠肺组织中 p-ERK1/2、p-p38 MAPK 的表达明显降低($P < 0.05$), 对照组和实验组相比, 差异不具有统计意义($P > 0.05$), 见图 9。

3 讨论

支气管哮喘是一种异质性的炎症性慢性疾病,

主要的病灶点位于气道以及两侧肺叶。该病受季节变化影响, 多在夜间或凌晨使患者出现气促、胸闷、呼吸困难、反复咳嗽等症状, 并且该病迁延不愈, 容易反复发作, 临床上尚无立竿见影的治疗手段, 严重影响患者的生活质量^[11]。目前该病的发病人群趋于低龄化, 发病率呈不断增长的趋势, 严重影响我国的社会公共卫生事业的可持续性发展。虽然西医西药技术在哮喘全球防治倡议(Global Initiative for Asthma, GINA)的规范下有所突破, 但是难以使全部患者从中受益^[12]。因此积极探索新的治疗方案在临床上具有重要意义。

中医大家张仲景在《伤寒论》以及《金匮要略》中明确将支气管哮喘归为“哮证”“喘证”的范畴。寒饮蕴肺证在临床上最为常见^[13]。传统的中医理论认为寒饮蕴肺证由外感于寒, 邪气诱发脏腑尤其是肺功能失调, 痰饮内伏与肺, 痰积气道, 浊气难以宣降所致。历史上的中医名家对该证的治疗主要以“宣肺平喘, 温化寒痰”的指导下, 以攻邪为主, 对患者施以祛痰利气, 扶正温阳治疗^[14]。闫伟等^[15]研究表达小青龙汤能明显抑制气道炎症性反应, 提高支气管哮喘寒饮蕴肺证大鼠的机体免疫能力。桂素梅等^[16]临床观察表明小青龙汤能明显缓解寒饮内停证哮喘发作期患儿的临床症状。本研

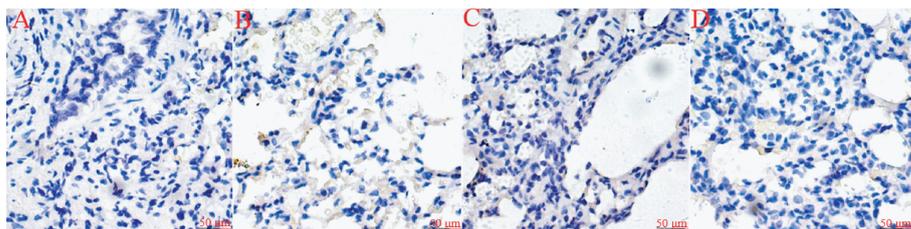


注: A: 正常组; B: 模型组; C: 对照组; D: 实验组。

图 5 气管组织超微结构改变

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Control group. D, Experimental group.

Figure 5 Ultrastructural changes of tracheal tissue



注: A: 正常组; B: 模型组; C: 对照组; D: 实验组。与正常组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 6 TUNEL 染色

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Control group. D, Experimental group. Compared with the normal group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$.

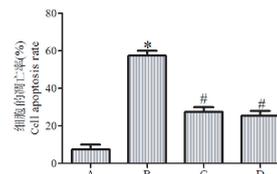
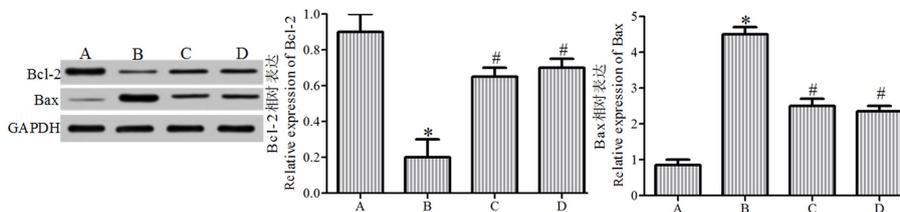


Figure 6 TUNEL staining

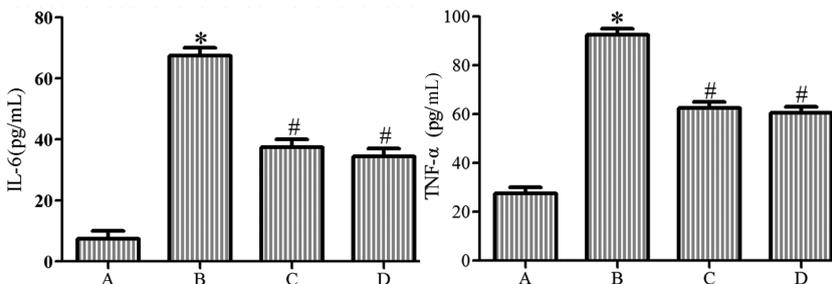


注:A:正常组;B:模型组;C:对照组;D:实验组。与正常组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 7 大鼠肺组织中 Bcl-2、Bax 的表达

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Control group. D, Experimental group. Compared with the normal group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$.

Figure 7 Expression of Bcl-2 and Bax in rat lung tissue

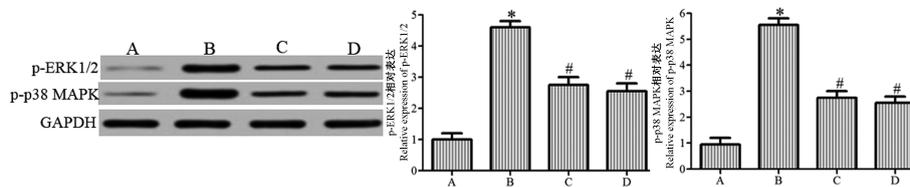


注:A:正常组;B:模型组;C:对照组;D:实验组。与正常组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 8 各组大鼠血清中 IL-6 和 TNF-α 的含量

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Control group. D, Experimental group. Compared with the normal group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$.

Figure 8 Levels of IL-6 and TNF-α in serum of rats in each group



注:A:正常组;B:模型组;C:对照组;D:实验组。与正常组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 9 肺组织中 p-ERK1/2、p-p38 MAPK 的表达

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Control group. D, Experimental group. Compared with the normal group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$.

Figure 9 Expression of p-ERK1/2 and p-p38 MAPK in rat lung tissue

究中采用的温阳化饮方是在长期的临床探索中的自拟方,本汤剂在传统的小青龙汤的基础上佐以人参、黄芪构成。人参、黄芪具有温补肺阳,调中益气的功效,本药方具有强化温阳化饮的作用,本研究结果显示,实验组大鼠在实验过程的日常行为明显比模型组有所改善,肺功能明显恢复,肺组织和气管组织的病理损伤和超微结构损伤明显缓解,证实了药物对疾病的治疗作用。

阐明药物的作用位点,不仅有利于揭示疾病的

病理机制,并且能更为有力的推动中药的开发以及临床应用。研究显示 ERK1/2 和 p38MAPK 信号在机体内广泛参与调控细胞的增殖、炎症应激、细胞凋亡以及免疫调节等生理病理过程^[17]。研究表明上、下呼吸道以及肺组织等气道组织在进行炎症性应激时,ERK1/2 被激活发生磷酸化,将炎症信号级联放大转录入核,调节 IL-6 和 TNF-α 等多种促炎因子基因的表达^[18]。Meng 等^[19]研究证实,在过敏性哮喘小鼠中,抑制 ERK1/2 信号的磷酸化,能明显改

善小鼠的气道炎症。研究证实在应激条件下,磷酸化后的 p38MAPK 激活相关效应因子的转录基因的表达,一方面推动中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的募集,强化炎性因子的分泌与释放;另一方面磷酸化后的 p38MAPK 是启动细胞凋亡开关(Bcl-2、Bax)的重要因素^[20]。赵嘉涵等^[21]研究表明阻断 p38MAPK 的激活,抑制 p38MAPK 的磷酸化,能明显减轻大鼠在肠缺血再灌注中肺组织的病理损伤。Nie 等^[22]研究证实在脂多糖诱导的急性肺损伤中,p38MAPK 特异性抑制剂能明显降低肺组织的细胞凋亡,缓解肺组织的病理损伤。本研究中实验组大鼠肺组织中的细胞凋亡率以及血清中 IL-6 和 TNF- α 的含量明显降低,肺组织中 ERK1/2、p38MAPK 的磷酸化明显受阻,推断温阳化饮方对支气管哮喘大鼠寒饮蕴肺证的干预作用通过 ERK1/2 和 p38MAPK 信号实现的。

综上所述,在支气管哮喘寒饮蕴肺证大鼠模型中,温阳化饮方能明显抑制炎性因子的释放,降低肺组织的细胞凋亡,这可能与抑制 ERK1/2 和 p38MAPK 信号有关。但是考虑到个人的体质的辩证关系以及对药物的敏感程度,临床上应用治疗支气管哮喘寒饮蕴肺证时需要严格遵守医师的医嘱,进行抓药或者煎煮。

参考文献:

[1] Böll S, Ziemann S, Ohl K, et al. Acid sphingomyelinase regulates T_H 2 cytokine release and bronchial asthma [J]. *Allergy*, 2020, 75(3): 603-615.

[2] 常兴, 张恬, 颜培正, 等. 雾霾的致病机制及其与哮喘寒饮蕴肺证的关系探析 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(8): 3310-3312.

[3] 孟泳, 崔应麟, 李彬. 厚朴麻黄汤对哮喘小鼠血清 IgE、IL-4、IL-13 及半胱氨酰白三烯水平的影响 [J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2017, 52(2): 193-196.

[4] 颜培正, 孟庆岩, 刘燕, 等. 中药剂量对哮喘病寒饮蕴肺证大鼠肺功能的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(4): 843-845.

[5] Zhang L, Liu P, Wen W, et al. IL-17A contributes to myocardial ischemic injury by activating NLRP3 inflammasome in macrophages through AMPK α /p38MAPK/ERK1/2 signal pathway in mice [J]. *Mol Immunol*, 2019, 105(1): 240-250.

[6] Pelaia C, Vatrella A, Sciacqua A, et al. Role of p38-mitogen-activated protein kinase in COPD: pathobiological implications and therapeutic perspectives [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2020, 14(5): 485-491.

[7] 颜磊, 薛中峰, 郭亚蕾. 苍耳子挥发油对支气管哮喘大鼠气道炎症的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(8): 915-920.

[8] 刘燕, 颜培正, 张庆祥. 温阳化饮方通过调节 MMP-9 活性干预支气管哮喘寒饮蕴肺证气道重塑的机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(1): 279-283.

[9] 陈晶, 侯志涛, 梅婷婷, 等. 温阳化饮、益气活血法对慢性心力衰竭大鼠自噬-凋亡机制的影响 [J]. *中国中医药科技*, 2018, 25(2): 168-170, 183.

[10] 申萌萌, 南亚楠, 唐磊, 等. 麦门冬汤对肺纤维化大鼠肺功能及内质网应激作用的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2019, 42(1): 37-43.

[11] Zhou J, Lu Y, Li F, et al. *In vitro* and *in vivo* Antiallergic Effects of Taurine on Allergic Rhinitis [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2020, 181(6): 404-416.

[12] Rajan S, Gogtay NJ, Konwar M, et al. The global initiative for asthma guidelines (2019): change in the recommendation for the management of mild asthma based on the SYGMA-2 trial-A critical appraisal [J]. *Lung India*, 2020, 37(2): 169-173.

[13] 冯贞贞, 谢洋, 春柳, 等. 基于隐结构结合系统聚类的新型冠状病毒肺炎中医常见证候特征研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2020, 32(5): 537-543.

[14] 杨勤军, 杨程, 童佳兵, 等. 近 30 年中医药治疗支气管哮喘临床用药规律数据挖掘研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2019, 42(8): 697-704.

[15] 闫伟, 刘明, 张庆祥. 小青龙汤对支气管哮喘寒饮蕴肺证大鼠 1,25 二羟维生素 D3 水平的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(11): 2806-2809.

[16] 桂素梅, 何平, 杨若俊. 小青龙汤合三子养亲汤对小儿哮喘发作期寒饮内停证的疗效评价 [J]. *健康前沿*, 2018, 27(11): 190.

[17] Li T, Wu YN, Wang H, et al. Dapk1 improves inflammation, oxidative stress and autophagy in LPS-induced acute lung injury via p38MAPK/NF- κ B signaling pathway [J]. *Mol Immunol*, 2020, 120(4): 13-22.

[18] Zou M, Zhang G, Zou J, et al. Inhibition of the ERK1/2-ubiquitous calpains pathway attenuates experimental pulmonary fibrosis *in vivo* and *in vitro* [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 391(1): 111886.

[19] Meng P, Chen ZG, Zhang TT, et al. IL-37 alleviates house dust mite-induced chronic allergic asthma by targeting TSLP through the NF- κ B and ERK1/2 signaling pathways [J]. *Immunol Cell Biol*, 2019, 97(4): 403-415.

[20] Li G, Dai Y, Tan J, et al. SB203580 protects against inflammatory response and lung injury in a mouse model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(2): 1656-1662.

[21] 赵嘉涵, 贾雨涵, 汤雅婷, 等. 参麦注射液对肠缺血/再灌注肺损伤大鼠肺组织 p38MAPK 及凋亡相关基因表达的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2019, 35(1): 65-68, 73.

[22] Nie Y, Wang Z, Chai G, et al. Dehydrocostus Lactone suppresses LPS-induced Acute lung injury and macrophage activation through NF- κ B signaling pathway mediated by p38 MAPK and akt [J]. *Molecules*, 2019, 24(8): 1510.