

伍林泽, 胡旭红, 傅榕冰, 等. 清热润燥口服液对哮喘小鼠 ILC2s 上下游细胞因子的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31 (9): 1-9.

Wu LZ, Hu XH, Fu RB, et al. Effect of Qingre Runzao oral liquid on chemokines and ILC2s and their upstream and downstream cytokines in asthmatic mice [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 1-9.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 001

清热润燥口服液对哮喘小鼠 ILC2s 上下游细胞因子的影响

伍林泽¹, 胡旭红¹, 傅榕冰¹, 魏义杰², 虎敏¹, 孔令麒¹, 童晓云³, 吴向农³,
吴佳丽⁴, 聂坚¹, 张绍湘⁴, 虎春艳¹, 李宝晶¹, 魏丹霞^{4*}, 黄丰^{1*}

(1. 云南中医药大学, 昆明 650500; 2. 腾冲市中医医院, 云南 腾冲 679100; 3. 云南中医药大学第一附属医院, 昆明 650021;
4. 云南中医药大学第三附属医院, 昆明 650011)

【摘要】 目的 通过清热润燥口服液干预卵清蛋白(OVA)致敏的哮喘小鼠, 观察其对哮喘小鼠Ⅱ型固有淋巴细胞(ILC2s)数量及其上下游细胞因子的影响。**方法** 将 BALB/c 小鼠(雌性)分为空白对照组、模型对照组、阳性对照组(地塞米松组, 1 mg/(kg·d))、清热润燥口服液低、高(4.32、8.64 g/(kg·d))剂量组, 共 40 只。使用 OVA 为致敏剂诱导哮喘小鼠模型, HE 染色观察小鼠肺组织的病理改变; 酶联免疫吸附(ELISA)测定检测小鼠肺泡灌洗液(BALF)中 ILC2s 上下游细胞因子 Eotaxin、IL-25、IL-33、TSLP、IL-4、IL-5 及 IL-6 含量; 免疫组化法检测肺组织 ILC2s 上下游细胞因子 IL-33 和 IL-5 的表达; 流式细胞术和免疫双荧光染色检测肺组织中 ILC2s 的数量及生成。**结果** 与空白对照组比较, 模型对照组小鼠出现肺组织炎性细胞浸润和支气管壁增厚的病理变化, BALF 中 ILC2s 上下游细胞因子 Eotaxin、IL-25、IL-33、TSLP、IL-4、IL-5 及 IL-6 的含量升高($P<0.01$), 肺组织中 ILC2s 上下游细胞因子 IL-33 及 IL-5 的表达升高($P<0.01$)、ILC2s 的数量及生成增多($P<0.01$)。与模型对照组比较, 清热润燥口服液低高剂量明显改善哮喘小鼠肺组织病理损伤, 降低 BALF 中 ILC2s 上下游细胞因子表达($P<0.01$)、下调肺组织中 ILC2s 上下游细胞因子 IL-33 及 IL-5 的表达($P<0.05$, $P<0.01$)和减少 ILC2s 的数量及生成($P<0.01$)。**结论** 清热润燥口服液可以降低 OVA 诱导的哮喘小鼠 ILC2s 的数量及其上下游细胞因子和下调肺组织中 IL-33 及 IL-5 的表达, 进而起到防治哮喘的作用。

【关键词】 哮喘小鼠; 清热润燥口服液; OVA; ILC2s; 细胞因子

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0001-09

Effect of Qingre Runzao oral liquid on chemokines and ILC2s and their upstream and downstream cytokines in asthmatic mice

WU Linze¹, HU Xuhong¹, FU Rongbing¹, WEI Yijie², HU Min¹, KONG Lingqi¹, TONG Xiaoyun³, WU Xiangnong³,
WU Jiali⁴, NIE Jian¹, ZHANG Shaoxiang⁴, HU Chunyan¹, LI Baojing¹, WEI Danxia^{4*}, HUANG Feng^{1*}

(1. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China. 2. Tengchong Hospital of Chinese Medicine, Tengchong 679100. 3. the First Affiliated Hospital of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650021.
4. the Third Affiliated Hospital of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650011)

【基金项目】 国家自然科学基金(82060751); 云南省科学技术厅-云南中医药大学应用基础研究联合专项资金面上项目[2019FF002(-033), 2017FF116(-018)]。

【作者简介】 伍林泽(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然药物作用及机制研究。E-mail: 2502531346@qq.com

【通信作者】 魏丹霞(1970—), 女, 主任医师, 研究方向: 中西医结合内科。E-mail: 1216508769@qq.com

黄丰(1971—), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药免疫药理。E-mail: 14030@ynutcm.edu.cn

* 共同通信作者

【Abstract】 Objective To observe the effects of Qingre Runzao oral liquid on the numbers of type II intrinsic lymphocytes (ILC2s) and their upstream and downstream cytokines in asthmatic mice sensitized by ovalbumin. **Methods** Female BALB/c mice were divided into the blank control group, model control group, positive control group (dexamethasone group, 1 mg/(kg · d)) and low- and high-dose Qingre Runzao oral liquid groups (4.32 and 8.64 g/(kg · d)). The asthma mouse model was induced using ovalbumin as a sensitizer, and pathological changes in lung tissue were observed by hematoxylin and eosin staining. Levels of the upstream and downstream cytokines of ILC2s Eotaxin, interleukin (IL)-25, IL-33, thymic stromal lymphopoietin (TSLP), IL-4, IL-5 and IL-6 were detected in mouse bronchoalveolar lavage fluid (BALF) using enzyme-linked immunosorbent assay. The expression of IL-33 and IL-5 in lung tissue was detected by immunohistochemical method. Flow cytometry and immunofluorescence staining were used to assess the number and production of ILC2s in lung tissue. **Results** Compared with the blank control group, the model control group showed pathological changes of inflammatory cell infiltration in the lung tissue and bronchial wall thickening. Furthermore, levels of the upstream and downstream cytokines Eotaxin, IL-25, IL-33, TSLP, IL-4, IL-5 and IL-6 were increased in BALF ($P < 0.01$). The expression of IL-33 and IL-5 was increased in lung tissue ($P < 0.01$), and the number and production of ILC2s was also increased ($P < 0.01$). Compared with the model control group, both the low and high doses of Qingre Runzao oral liquid significantly improved the pathological injury to lung tissue in asthmatic mice, decreased the expression of upstream and downstream cytokines of ILC2s in BALF ($P < 0.01$), downregulated the expression of IL-33 and IL-5 in lung tissue ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and decreased the number and production of ILC2s ($P < 0.01$). **Conclusions** Qingre Runzao oral liquid can reduce the numbers of ILC2s and their upstream and downstream cytokines in ovalbumin-induced asthmatic mice. It can also downregulate the expression of IL-33 and IL-5 in lung tissue, thus playing a role in the prevention and treatment of asthma.

【Keywords】 asthmatic mice; Qingre Runzao oral liquid; OVA; ILC2s; cytokines

支气管哮喘简称哮喘 (asthma), 是一种临床上常见、多发和难愈的慢性呼吸系统疾病。近年来, 在基因、环境和过敏原等因素的相互作用下哮喘的发病率和死亡率逐年升高, 目前全球范围内有 3~4 亿哮喘患者, 我国成年人中哮喘患者已达到 4570 万人, 对人类健康构成巨大的威胁^[1]。哮喘的发病机制复杂, 且由多种炎性细胞和细胞因子参与, 其中嗜酸性粒细胞趋化因子 Eotaxin, 可以激活嗜酸性粒细胞并将其募集到肺中, 导致患者气道重塑和气道高反应性加重^[2]。此外, 最新研究表明先天性免疫细胞中的固有淋巴样细胞 (innate lymphoid cells, ILCs) 在哮喘的发病过程中也具有重要作用^[3]。来自于骨髓造血干细胞中淋巴样前体细胞的 ILCs 中的 II 型固有淋巴细胞 (type II innate lymphoid cells, ILC2s), 在过敏性鼻炎和哮喘等疾病中的表达水平显著升高。当肺部受到多种炎症因素的刺激时, 上皮源性细胞因子 IL-33 (interleukin-33)、IL-25 (interleukin-25)、胸腺基质淋巴细胞生成素 (thymic stromal lymphopoietin, TSLP) 大量分泌, 并且刺激 ILC2s 表达 2 型 T 辅助淋巴 (Th2) 细胞因子 IL-4 (interleukin-4) 和 IL-5 (interleukin-5) 及促炎因子 IL-6 (interleukin-6)^[4-5], 引起 Th2 型免疫反应, 加重哮喘的气道炎症, 从而促进哮喘的发生。

哮喘属于中医哮证范畴, 其发病机制在中医论述里分为夙根学说, 肺虚、脾虚、肾虚学说和外邪学说等^[6]。在夙根学说中宿痰伏于肺, 说明肺部是哮喘发病的主要部位, 痰是哮喘发病的主要病理因素。云南省荣誉名中医陆家龙认为治疗慢性气道炎症性疾病, 要“养润与通利”并行, 并根据此观点研制出清热润燥口服液。临床证明, 该方具有清肺养阴和润肺止咳等药效, 以及安全有效的特点, 用于治疗慢性支气管炎急性发作和咽炎等疾病, 已在临床上使用了 30 余年^[7-8]。本实验旨在通过清热润燥口服液对 OVA 致敏的哮喘小鼠的趋化因子和 ILC2s 数量及上下游细胞因子的影响, 探讨该方干预哮喘小鼠的可能作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验动物采用健康的清洁级 BALB/c 雌性小鼠 40 只, 6~8 周龄, 体重 (20±2) g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司 [SCXK (辽) 2015-0001], 实验动物质量合格证号为 No. 211002300051473, 动物饲养于云南中医药大学实验动物中心 [SYXK (滇) K2017-0005], 实验经云南中医药大学实验动物伦

理审查委员会批准(R-06202035),并按照实验动物使用的3R原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

组成清热润燥口服液的桑叶、苦杏仁、浙贝母、南沙参、麦冬、芦根、薏苡仁、陈皮、茯苓、冬瓜仁、京半夏、炒谷和炒麦芽均购于云南白药集团,并委托云南中医药大学第三附属医院制剂室制备提供(4.1 g/mL原生药),药物保存于4℃备用;地塞米松和卵清蛋白(OVA)(美国Sigma公司,批号分别为:BCBV3214、9006-59-1);Al(OH)₃粉末(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:38701);小鼠Eotaxin、IL-4、IL-5、IL-6、IL-33和TSLP酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(联科生物技术有限公司,批号分别为:2213080441、2213080441、A20580821、A20680724、A23380314、A26580933);小鼠IL-25(IL-17E)ELISA试剂盒(欣博盛生物科技有限公司,批号:181225-007a);仓鼠抗小鼠CD3ε抗体、大鼠抗小鼠CD4抗体、仓鼠抗小鼠CD11c抗体、大鼠抗小鼠Ly-6G和Ly-6C(Gr-1)抗体、大鼠抗小鼠CD5抗体、大鼠抗小鼠CD19抗体、小鼠抗NK1.1抗体、大鼠抗小鼠CD8α抗体(美国BD Pharmingen公司,批号分别为:553060、553728、553800、553125、553019、553784、553163、553163);Biotin anti-mouse FcεRIα(美国BioLegend公司,批号:134304);Biotin rat anti-mouse TER119和Anti-mouse F4/80 antigen biotin(美国eBioscience公司,批号分别为:13-5921-81、13-5921-81);Liberase TM和DNase I(瑞士Roche公司,批号分别为:35537400、35027800);GATA3和IL-33抗体(武汉Proteintech公司,批号分别为:66400-1-Ig、12372-1-AP);IL-5抗体(美国Signalway公司,批号为:31306-1);KLRG1抗体(美国Fitzgerald公司,批号为:70R-18166)。超声雾化器(德国百瑞公司,型号:INQUA NEB plus);玻片扫描影像系统(深圳市生强科技有限公司,型号:Teksqray SQS-1000);酶标仪(美国美谷分子,型号:Spectra Max plus384);-80℃超低温冰箱(美国赛默飞世尔科技公司,型号:8920);正置光学显微镜、成像系统(日本尼康公司,型号分别为:Nikon Eclipse E100、NIKON DS-U3);流式细胞检测仪(美国BD公司,型号:LSRF orteessa)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组

实验将BALB/c小鼠(雌性)分为5组,每组8

只,空白对照组(C组)、模型对照组(M组)、阳性对照组(地塞米松,DEX组)、清热润燥口服液低剂量组(QRRZ-L组)、清热润燥口服液高剂量组(QRRZ-H组)。

1.3.2 哮喘模型建立及给药方法

于开始建立模型的第1、8、15天,采用腹腔注射的方式,C组每只注射生理盐水0.2 mL,其余各组每只注射OVA混悬液(OVA和Al(OH)₃配制,浓度分别为:1、5 mg/mL)0.2 mL致敏。第21天开始采用灌胃的方式给药7 d,每天1次,C组和M组为生理盐水(10 mL/kg),DEX组为地塞米松溶液(1 mg/(kg·d)),QRRZ-L和QRRZ-H组分别为低(4.32 g/(kg·d))、高(8.64 g/(kg·d))剂量的清热润燥口服液。给药1 h后进行雾化,除C组使用生理盐水雾化外,其余各组使用2% OVA雾化液雾化激发1周(每天每次30 min)。

1.3.3 收集肺泡灌洗液

第28天,1%的戊巴比妥(0.01 mL/g)麻醉小鼠,随后取血处死,开颈部暴露气管,并进行插管,打开胸腔,用动脉夹将右支气管夹闭,用0.3 mL PBS缓冲液抽吸灌洗右肺3遍,灌洗2次后收集。于1000 r/min,4℃离心10 min,取上清液严格按照试剂盒说明书操作步骤检测BALF中Eotaxin、IL-25、IL-33、TSLP、IL-4、IL-5和IL-6的含量。

1.3.4 采集肺组织

收集完肺泡灌洗液后,取右肺中叶用PBS漂洗血液后,于滤纸上吸干残留液体,浸泡于中性甲醛组织固定液中,浸泡36 h后将肺组织用石蜡包埋后切片,进行苏木精-伊红染色(HE染色)、免疫组化染色和免疫双荧光染色;取肺上下叶置入预冷的PBS中,剪碎成小于0.5 cm×0.5 cm的碎块后,加入Liberase TM和DNase I于37℃静置消化1 h后研磨,制成单细胞悬液后进行流式检测肺组织ILC2s的数目。

1.4 统计学方法

实验数据通过SPSS 20.0软件进行统计分析,采用单因素方差分析和t检验的方法进行多组间及组间差异比较,并以P<0.05和P<0.01表示实验结果有显著性差异,数据分析结果以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并用GraphPad Prism 8软件进行作图。

2 结果

2.1 HE染色观察肺组织病理改变

HE染色结果显示:空白对照组肺组织支气管

结构清晰完整,黏膜上皮细胞完整无脱落且排列整齐,几乎没有炎性细胞浸润;模型对照组较空白对照组相比支气管壁增厚,支气管上皮破坏不完整且气管炎性细胞浸润严重;阳性对照组和清热润燥口服液低剂量组较模型对照组相比气道周围的炎性细胞浸润和支气管壁增厚特征有所减轻,如图 1 所示。

2.2 ELISA 检测 BALF 中 Eotaxin、IL-25、IL-33、TSLP、IL-4、IL-5 及 IL-6 的含量

2.2.1 清热润燥口服液对哮喘小鼠 BALF 中 Eotaxin 含量的影响

如图 2 所示,模型对照组 BALF 中 Eotaxin 的含量与空白对照组相比明显升高,具有显著性差异($P<0.01$);与模型对照组相比,阳性对照组和清热润燥口服液高低剂量组均可使 Eotaxin 的含量降低,具有显著性差异($P<0.01$)。

2.2.2 清热润燥口服液对哮喘小鼠 BALF 中 IL-25、IL-33、TSLP 含量的影响

如图 3 所示,模型对照组 BALF 中 IL-25、IL-33、TSLP 的含量与空白对照组相比,明显升高,具有显著性差异($P<0.01$);与模型对照组相比,阳性对照组和清热润燥口服液高低剂量组均可使 IL-25、IL-33、TSLP 的含量降低,具有显著性差异($P<0.01$)。

2.2.3 清热润燥口服液对哮喘小鼠 BALF 中 IL-4、IL-5、IL-6 含量的影响

如图 4 所示,模型对照组 BALF 中 IL-4、IL-5 和 IL-6 的含量与空白对照组相比明显升高,具有显著性差异($P<0.01$);与模型对照组相比,阳性对照组和清热润燥口服液高低剂量组均可使 IL-4、IL-5 和 IL-6 的含量降低,具有显著性差异($P<0.01$)。

2.3 免疫组化法检测肺组织中 ILC2s 上下游细胞因子 IL-33 及 IL-5 的表达

2.3.1 清热润燥口服液对哮喘小鼠肺组织中 ILC2s 上游细胞因子 IL-33 表达的影响

如图 5 所示,模型对照组肺组织中 IL-33 的表达与空白对照组相比明显升高,具有显著性差异($P<0.01$);与模型对照组相比,阳性对照组和清热润燥口服液高低剂量组均下调肺组织中 IL-33 的表达,具有显著性差异($P<0.05, P<0.01$)。

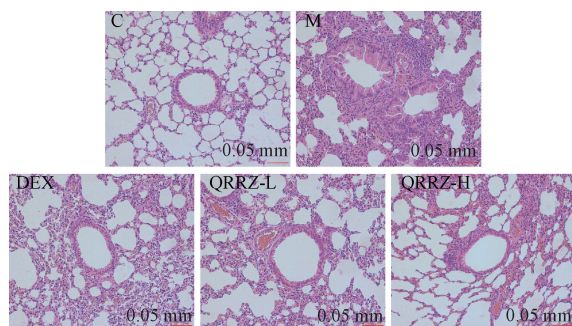
2.3.2 清热润燥口服液对哮喘小鼠肺组织中 ILC2s 下游细胞因子 IL-5 表达的影响

如图 6 所示,模型对照组肺组织中 IL-5 的表达与空白对照组相比明显升高,具有显著性差异($P<$

0.01);与模型对照组相比,阳性对照组和清热润燥口服液高低剂量组均下调肺组织中 IL-5 的表达,具有显著性差异($P<0.01$)。

2.4 流式细胞术检测肺组织中 ILC2s 的数量变化

运用流式细胞术检测清热润燥口服液的高剂量对哮喘小鼠肺组织中 ILC2s 数量的影响。如图 7

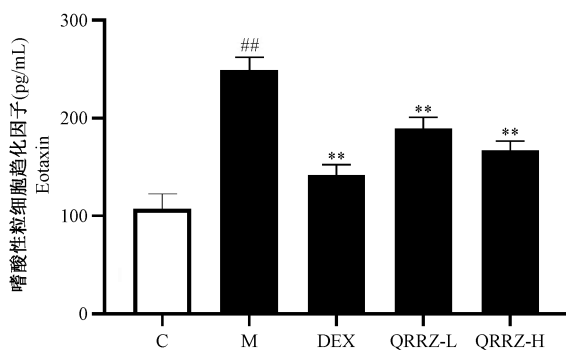


注:C:空白对照组;M:模型对照组;DEX:阳性对照组;QRRZ-L:清热润燥口服液低剂量组;QRRZ-H:清热润燥口服液高剂量组。

图 1 清热润燥口服液对哮喘小鼠肺组织病理变化的影响(HE 染色)

Note. C, Control group. M, Model group. DEX, Dexamethasone group. QRRZ-L, Low-dose group of Qingre Runzao oral liquid. QRRZ-H, High-dose group of Qingre Runzao oral liquid.

Figure 1 Effect of Qingre Runzao oral liquid on pathological changes of lung tissue in asthmatic mice(HE staining)



注:C:空白对照组;M:模型对照组;DEX:阳性对照组;QRRZ-L:清热润燥口服液低剂量组;QRRZ-H:清热润燥口服液高剂量组。与空白对照组相比,^{##} $P<0.01$;与模型对照组相比,^{**} $P<0.01$ 。

图 2 清热润燥口服液对哮喘小鼠 Eotaxin 的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Note. C, Control group. M, Model group. DEX, Dexamethasone group. QRRZ-L, Low-dose group of Qingre Runzao oral liquid. QRRZ-H, High-dose group of Qingre Runzao oral liquid. Compared with control group, ^{##} $P<0.01$. Compared with model group, ^{**} $P<0.01$.

Figure 2 Effect of Qingre Runzao oral liquid on Eotaxin in asthmatic mice

所示,模型对照组肺组织中 ILC2s 数量与空白对照组相比明显增高,具有显著性差异($P<0.01$);与模型对照组相比,阳性对照组和清热润燥口服液高剂量组可使肺组织中 ILC2s 数量降低,具有显著性差异($P<0.01$)。

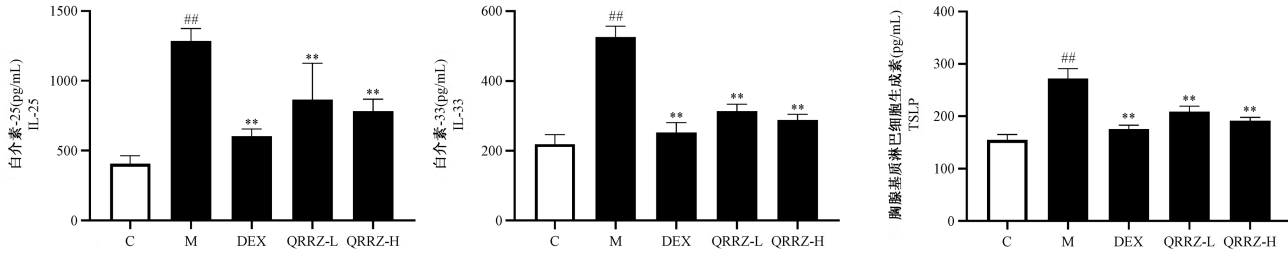
2.5 免疫双荧光染色检测肺组织中 ILC2s 的生成
免疫双荧光染色法检测 GATA3(红)与 KLRG1(绿)的表达,确定 ILC2s 的生成。如图 8 所示,模型对照组肺组织中 ILC2s 与空白对照组相比明显增多;与模型对照组相比,阳性对照组和清热润燥口服液高低剂量组均可降低肺组织中 ILC2s 的生成。

3 讨论

清热润燥口服液经过现代工艺加工和临床疗效研究而成,是由桑叶、苦杏仁、陈皮、浙贝母、南沙参、麦冬、芦根、薏苡仁和茯苓等中药组成的复方制剂,其中桑叶归肺、肝经,清肺润燥;苦杏仁归肺经,化痰、止咳和平喘;陈皮归肺、脾经,理气化痰等,方中诸药配伍,共同发挥其药效。在动物实验的研究

中表明其具有抗炎、祛痰、止咳和平喘的作用^[7-9],利用高效液相色谱法和紫外分光光度法测定该方的橙皮苷、苦杏仁苷和总多糖的含量^[10-12],对本制剂进行有效的质量控制。本实验使用清热润燥口服液治疗 OVA 致敏的哮喘小鼠,探索其可能的作用机制,为哮喘疾病的中医药研究提供参考。

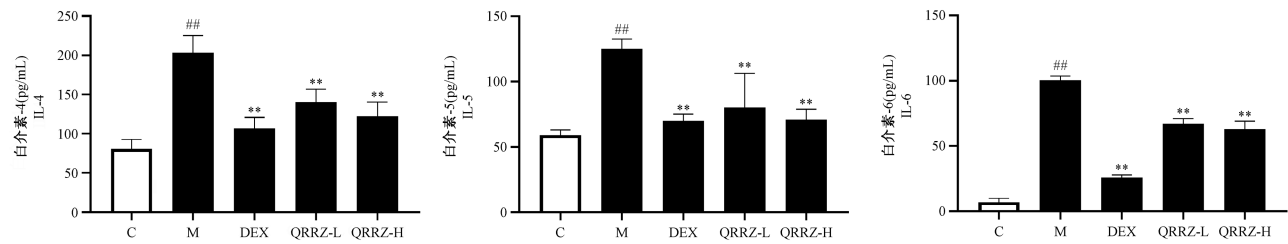
支气管哮喘是以气道高反应性、可逆性的气道阻塞和重塑、黏液高分泌和肺功能下降为主要特征的一种肺部炎症,由嗜酸性粒细胞、T 淋巴细胞、中性粒细胞、肥大细胞和上皮细胞参与^[13]。哮喘的发病机制尚未完全阐明,其中 CD4⁺Thelper (Th) 细胞的 Th1/Th2 细胞比例失衡,导致 Th2 细胞优势应答,产生 IL-4、IL-5 等炎症因子,引起 Th2 型免疫反应,是哮喘重要的发病机制^[14]。哮喘 Th2 型免疫反应的主要特征之一是嗜酸性粒细胞增多、迁移和黏液增生^[13],还会产生趋化因子和多种细胞因子,其中趋化因子 Eotaxin 分子量为 $8\times10^3\sim10\times10^3$,由 73 个氨基酸组成,属于 CC 趋化因子亚家族,是嗜酸性粒细胞的特异性趋化因子,对嗜酸性粒细胞有强大



注: C:空白对照组; M:模型对照组; DEX:阳性对照组; QRRZ-L:清热润燥口服液低剂量组; QRRZ-H:清热润燥口服液高剂量组。与空白对照组相比, ## $P<0.01$; 与模型对照组相比, ** $P<0.01$ 。

图 3 清热润燥口服液对哮喘小鼠 ILC2s 上游细胞因子的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)
Note. C, Control group. M, Model group. DEX, Dexamethasone group. QRRZ-L, Low-dose group of Qingre Runzao oral liquid. QRRZ-H, High-dose group of Qingre Runzao oral liquid. Compared with control group, ## $P<0.01$. Compared with model group, ** $P<0.01$.

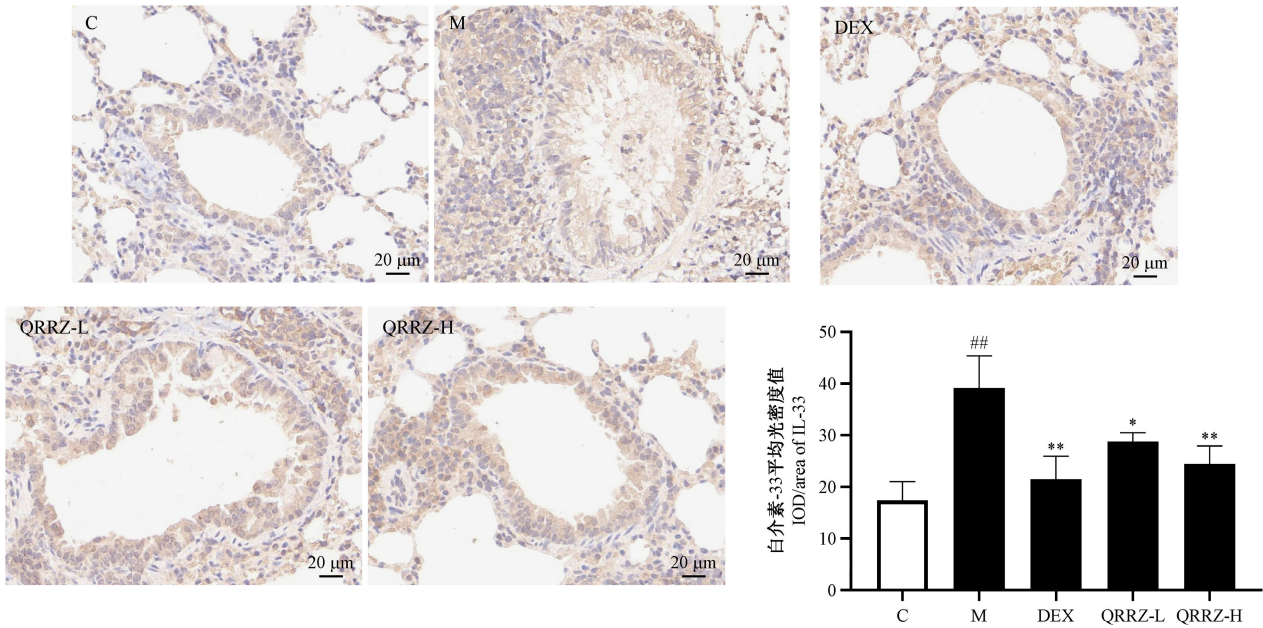
Figure 3 Effect of Qingre Runzao oral liquid on cytokines upstream of ILC2s in asthmatic mice



注: C:空白对照组; M:模型对照组; DEX:阳性对照组; QRRZ-L:清热润燥口服液低剂量组; QRRZ-H:清热润燥口服液高剂量组。与空白对照组相比, ## $P<0.01$; 与模型对照组相比, ** $P<0.01$ 。

图 4 清热润燥口服液对哮喘小鼠 ILC2s 下游细胞因子的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)
Note. C, Control group. M, Model group. DEX, Dexamethasone group. QRRZ-L, Low-dose group of Qingre Runzao oral liquid. QRRZ-H, High-dose group of Qingre Runzao oral liquid. Compared with control group, ## $P<0.01$. Compared with model group, ** $P<0.01$.

Figure 4 Effect of Qingre Runzao oral liquid on cytokines downstream of ILC2s in asthmatic mice

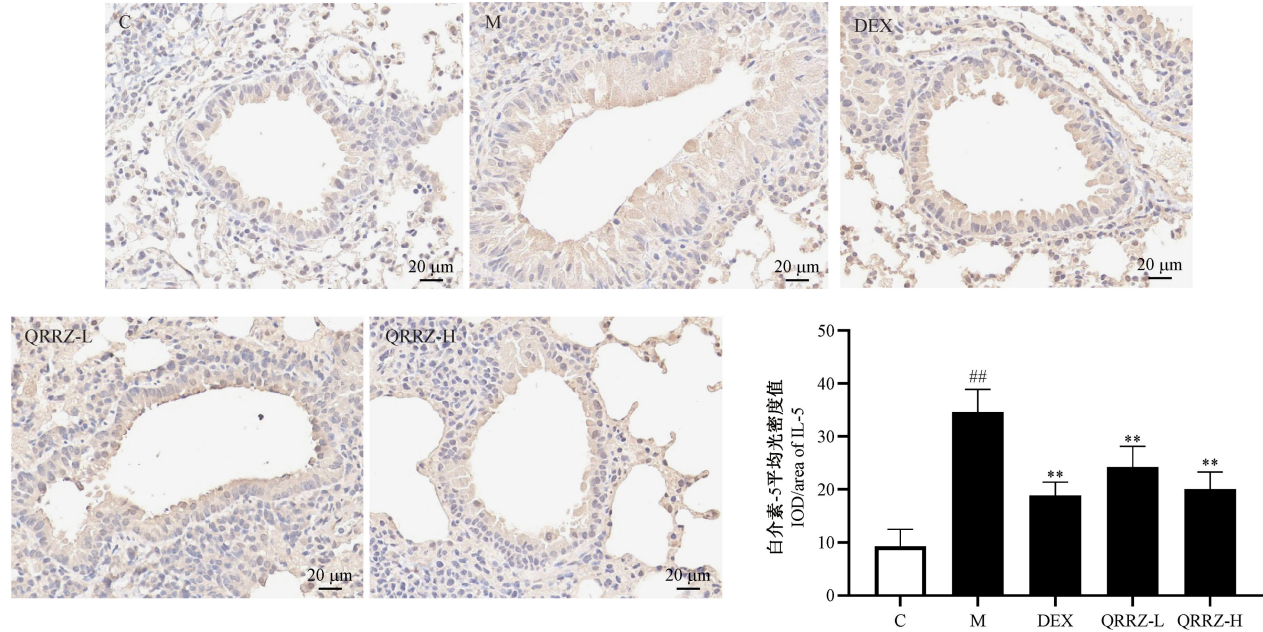


注: C:空白对照组; M:模型对照组; DEX:阳性对照组; QRRZ-L:清热润燥口服液低剂量组; QRRZ-H:清热润燥口服液高剂量组。与空白对照组相比, ^{##} $P<0.01$; 与模型对照组相比, ^{*} $P<0.05$; ^{**} $P<0.01$ 。

图 5 清热润燥口服液对哮喘小鼠肺组织中 ILC2s 上游细胞因子 IL-33 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Note. C, Control group. M, Model group. DEX, Dexamethasone group. QRRZ-L, Low-dose group of Qingre Runzao oral liquid. QRRZ-H, High-dose group of Qingre Runzao oral liquid. Compared with control group, ^{##} $P<0.01$. Compared with model group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$.

Figure 5 Effect of Qingre Runzao oral liquid on the expression of ILC2s upstream cytokine IL-33 in lung tissue of asthmatic mice

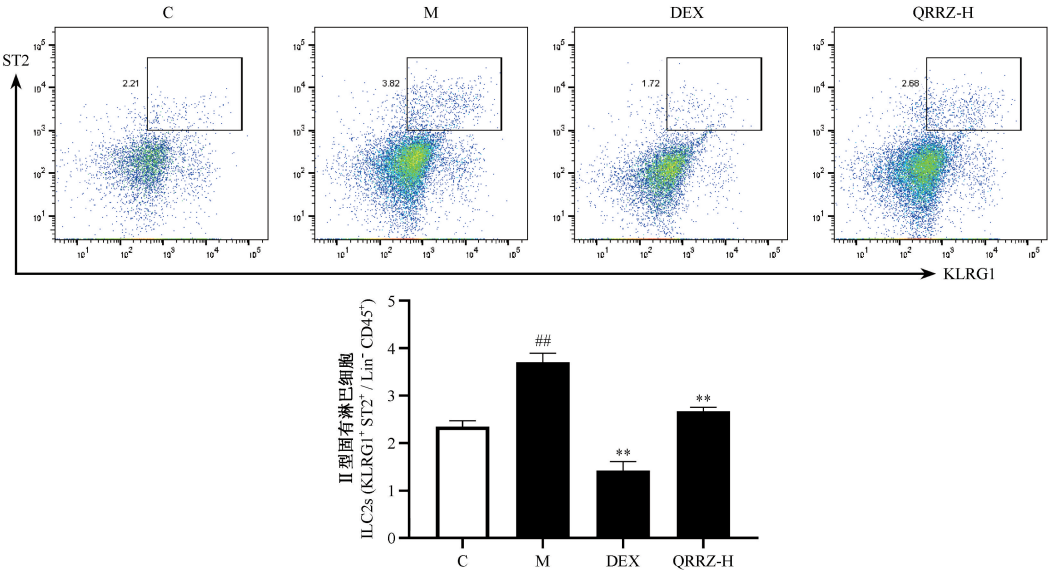


注: C:空白对照组; M:模型对照组; DEX:阳性对照组; QRRZ-L:清热润燥口服液低剂量组; QRRZ-H:清热润燥口服液高剂量组。与空白对照组相比, ^{##} $P<0.01$; 与模型对照组相比, ^{**} $P<0.01$ 。

图 6 清热润燥口服液对哮喘小鼠肺组织中 ILC2s 下游细胞因子 IL-5 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Note. C, Control group. M, Model group. DEX, Dexamethasone group. QRRZ-L, Low-dose group of Qingre Runzao oral liquid. QRRZ-H, High-dose group of Qingre Runzao oral liquid. Compared with control group, ^{##} $P<0.01$. Compared with model group, ^{**} $P<0.01$.

Figure 6 Effect of Qingre Runzao oral liquid on the expression of ILC2s downstream cytokine IL-5 in lung tissue of asthmatic mice

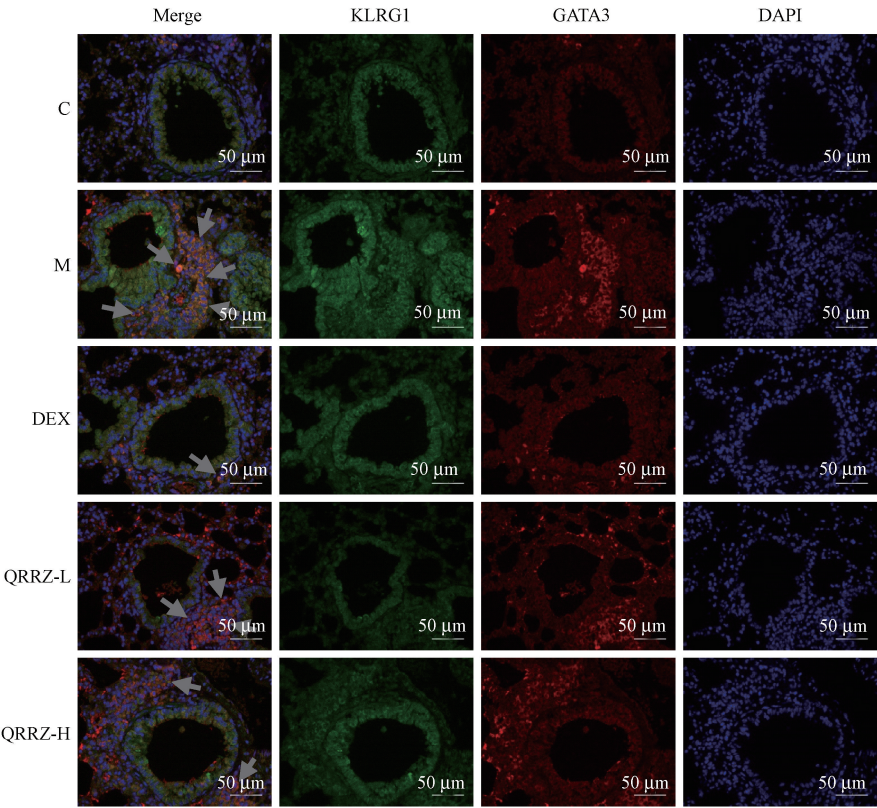


注: C: 空白对照组; M: 模型对照组; DEX: 阳性对照组; QRRZ-H: 清热润燥口服液高剂量组。与空白对照组相比, $^{##}P<0.01$; 与模型对照组相比, $^{**}P<0.01$ 。

图 7 清热润燥口服液对哮喘小鼠肺组织中 ILC2s 数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. C, Control group. M, Model group. DEX, Dexamethasone group. QRRZ-H, High-dose group of Qingre Runzao oral liquid. Compared with control group, $^{##}P<0.01$. Compared with model group, $^{**}P<0.01$.

Figure 7 Effect of Qingre Runzao oral liquid on the amount of ILC2s in the lung tissue of asthmatic mice



注: C: 空白对照组; M: 模型对照组; DEX: 阳性对照组; QRRZ-L: 清热润燥口服液低剂量组; QRRZ-H: 清热润燥口服液高剂量组。

图 8 清热润燥口服液对哮喘小鼠肺组织中 ILC2s 生成的影响

Note. C, Control group. M, Model group. DEX, Dexamethasone group. QRRZ-L, Low-dose group of Qingre Runzao oral liquid. QRRZ-H, High-dose group of Qingre Runzao oral liquid.

Figure 8 Effect of Qingre Runzao oral liquid on ILC2s production in lung tissue of asthmatic mice

的选择性激活作用。与趋化因子受体 CCR3 结合后,发挥活化和募集嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞的功能,引起哮喘患者的支气管粘膜和肺泡周围的炎性细胞浸润,导致支气管上皮损伤。还能诱导白三烯、组胺的生成和肥大细胞的迁移分化,参与哮喘的炎症过程^[15]。实验中对各组小鼠肺切片进行 HE 染色,结果显示(图 1),模型对照组小鼠的支气管上皮粘膜破损不完整、支气管壁增厚及大量的炎性细胞浸润,而清热润燥口服液能减轻上述病理特征。

研究表明,先天性淋巴样细胞 ILCs(根据分泌的细胞因子不同,分为三类:ILC1s、ILC2s 和 ILC3s)中的 ILC2s 与哮喘密切相关。在反式 T 细胞特异性转录因子(GATA-3)及维甲酸受体相关的孤儿受体 α (ROR α)的共同调控下产生,分布在肺、血液、脾和骨髓中,并在哮喘患者的外周血和痰液中高表达,可以产生 TH2 型细胞因子和其他细胞因子,是 Th2 型免疫反应的主要驱动因素,参与过敏性哮喘和特应性皮炎等疾病过程,调节炎症过程和参与组织修复,在哮喘的发病过程中具有重要作用^[16-18]。

ILC2s 的表面表达 IL-17RB、ST2(也称 T1/ST2L)和 TSLPR 受体,当支气管或肺部受到过敏、病毒、寄生虫和炎症因子的刺激时,分泌 IL-25、IL-33 和 TSLP 细胞因子并与 ILC2s 表面受体结合,产生 Th2 型细胞因子^[16]。IL-1 细胞因子家族的 IL-33 可直接激活 ILC2s,是过敏性气道疾病的关键细胞因子,可驱动 Th2 免疫应答^[19]。袁琳洁等^[20]利用 IL-33 滴鼻诱导小鼠哮喘模型,并出现气道高反应性、炎性细胞浸润和肺组织中 ILC2s 细胞数量增多的现象。IL-33 还可通过 p38 MAPK 信号通路刺激肠系膜脂肪中分离的 ILC2s 细胞产生 IL-5、IL-9 等细胞因子,是 ILC2s 产生细胞因子最重要的激活剂之一^[21]。IL-17 细胞因子家族的 IL-25(也称 IL-17E)在哮喘患者的支气管和外周血中较正常人明显升高,临床研究发现,在哮喘患者支气管中随着 IL-25 的表达量升高,患者的嗜酸性粒细胞气道炎症和气道高反应性加重^[22]。IL-25 可刺激 Th2 型细胞因子的表达,还能经鼻腔激发健康小鼠的气道高反应性和气道重塑、杯状细胞和粘膜增生、加重肺支气管和血管周围的嗜酸性粒细胞浸润^[23]。IL-2 细胞因子家族的 TSLP 与 IL-25 和 IL-33 共同刺激 Th2 型细胞因子的产生,参与过敏性哮喘的发病过程和对过敏因子的免疫反应^[24]。在 TSLPR^{-/-}基因

缺陷小鼠诱导的哮喘小鼠中,肺中 ILC2s 的活化和先天性过敏气道炎症反应受到抑制。TSLP 和 IL-33 在体内和体外刺激肺部 ILC2s 产生彼此的受体,对刺激肺部 ILC2s 的产生具有协同作用^[25]。

在 ILC2s 的激活下产生 IL-4 和 IL-5 等 Th2 型细胞因子和具有强大促炎作用的 IL-6,IL-6 是 CD4⁺ T 细胞分化的重要调节因子,能促进 IL-4 产生和抑制 Th1 分化,并在哮喘患者血清中高表达^[26]。IL-4 和 IL-5 在支气管粘膜中高表达,其中 IL-5 可诱导嗜酸性粒细胞的分化与激活,并将其募集到肺中,在募集过程中与 Eotaxin 具有协同作用,然后分泌大量的炎症细胞因子和趋化因子等促炎介质,在嗜酸性炎症中起重要作用^[27]。用人源化抗 IL-5 抗体治疗嗜酸性哮喘患者后,可减少患者血液和痰中的嗜酸性粒细胞表达水平^[28]。IL-4 可刺激 Th2 细胞的分化,与 IL-13 一同促进 B 淋巴细胞向免疫球蛋白-e(IgE)转变,引起肥大细胞和嗜碱性细胞脱颗粒,释放组胺、白三烯、细胞因子和趋化因子等多种炎性介质,促进炎症和过敏疾病的发生^[13,29]。本实验通过检测 BALF 中 ILC2s 相关的细胞因子,发现清热润燥口服液高低剂量可降低趋化因子 Eotaxin 和促炎因子 IL-4、IL-5、IL-6、IL-25、IL-33 和 TSLP 在 BALF 中的含量($P<0.01$)。通过免疫组化染色、流式细胞术和免疫双荧光染色结果,发现清热润燥口服液高低剂量可下调肺组织中 IL-33 及 IL-5 的表达($P<0.05$, $P<0.01$),减少哮喘小鼠肺组织中 ILC2s 的数量及生成($P<0.01$)。提示该方对 OVA 致敏的哮喘小鼠的 ILC2s 数量和其相关细胞因子及 IL-33 和 IL-5 蛋白的表达有一定的调节作用。

综上所述,清热润燥口服液可能通过调节 ILC2s 细胞数量,及 BALF 中相关细胞因子的含量(趋化因子 Eotaxin;上游细胞因子:IL-25、IL-33、TSLP;下游细胞因子:IL-4、IL-5、IL-6)和肺组织中 IL-33 和 IL-5 的表达来干预哮喘;提示该药可能通过降低 ILC2s 的数量及其相关的细胞因子含量和肺组织中 IL-33 和 IL-5 的表达来缓解哮喘小鼠的症状,但清热润燥口服液具体通过 ILC2s 细胞方面对哮喘疾病的影响有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Huang K, Yang T, Xu J, et al. Prevalence, risk factors, and management of asthma in China: a national cross-sectional study [J]. *Lancet*, 2019, 394(10196): 407-418.
- [2] Watanabe K, Suzukawa M, Arakawa S, et al. Leptin enhances

- cytokine/chemokine production by normal lung fibroblasts by binding to leptin receptor [J]. *Allergol Int*, 2019, 68S: S3-S8.
- [3] Toki S, Goleniewska K, Zhang J, et al. TSLP and IL-33 reciprocally promote each other's lung protein expression and ILC2 receptor expression to enhance innate type-2 airway inflammation [J]. *Allergy*, 2020, 75(7): 1606-1617.
- [4] Walker JA, McKenzie AN. Development and function of group 2 innate lymphoid cells [J]. *Curr Opin Immunol*, 2013, 25(2): 148-155.
- [5] McKenzie AN. Type-2 innate lymphoid cells in asthma and allergy [J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2014, 11(5): S263-S270.
- [6] 刘温丽, 史艳平, 张金虎. 支气管哮喘的中医研究进展 [J]. *陕西中医*, 2018, 39(6): 812-814.
- [7] 魏丹霞, 谭艳云, 徐静涛, 等. 清热润燥口服液抗炎、祛痰作用的实验研究 [J]. *云南中医中药杂志*, 2017, 38(5): 78-79.
- [8] 魏丹霞, 陈丽玲, 赵玉雪, 等. 清热润燥口服液止咳、平喘作用及急性毒性实验研究 [J]. *昆明医科大学学报*, 2013, 34(5): 61-64.
- [9] 钟赣生. 中药学 新世纪第 4 版 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016.
- [10] 李月亭, 陈凌云, 余晓玲. HPLC 法测定清热润燥口服液中橙皮苷的含量 [J]. *云南中医中药杂志*, 2016, 37(2): 42-43.
- [11] 李月亭, 陈凌云, 魏丹霞, 等. HPLC 法测定清热润燥口服液中苦杏仁苷的含量 [J]. *中国医药科学*, 2015, 5(23): 69-71.
- [12] 袁小淋, 余晓玲, 魏丹霞, 等. 紫外分光光度法测定清热润燥口服液中总多糖的含量 [J]. *云南中医中药杂志*, 2017, 38(7): 63-65.
- [13] Gandhi NA, Bennett BL, Graham NM, et al. Targeting key proximal drivers of type 2 inflammation in disease [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(1): 35-50.
- [14] 李俊玲. 三子养亲汤对哮喘模型大鼠 Th1/Th2 失衡的干预及相关调节机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2018.
- [15] Ahmadi Z, Hassanshahi G, Khorramdelazad H, et al. An overlook to the characteristics and roles played by eotaxin network in the pathophysiology of food allergies: allergic asthma and atopic dermatitis [J]. *Inflammation*, 2016, 39(3): 1253-1267.
- [16] Aron JL, Akbari O. Regulatory T cells and type 2 innate lymphoid cell-dependent asthma [J]. *Allergy*, 2017, 72(8): 1148-1155.
- [17] van Rijt L, von Richthofen H, van Ree R. Type 2 innate lymphoid cells: at the cross-roads in allergic asthma [J]. *Semin Immunopathol*, 2016, 38(4): 483-496.
- [18] Yu QN, Guo YB, Li X, et al. ILC2 frequency and activity are inhibited by glucocorticoid treatment via STAT pathway in patients with asthma [J]. *Allergy*, 2018, 73(9): 1860-1870.
- [19] Cheon IS, Son YM, Jiang L, et al. Neonatal hyperoxia promotes asthma-like features through IL-33-dependent ILC2 responses [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 142(4): 1100-1112.
- [20] 袁琳洁, 陈诗皓, 安高, 等. IL-33 诱导的小鼠过敏原非依赖性哮喘样模型肺组织免疫细胞及亚群的变化 [J]. *首都医科大学学报*, 2016, 37(5): 561-567.
- [21] Petrova T, Pesic J, Pardali K, et al. p38 MAPK signalling regulates cytokine production in IL-33 stimulated Type 2 Innate Lymphoid cells [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 3479.
- [22] Cheng D, Xue Z, Yi L, et al. Epithelial interleukin-25 is a key mediator in Th2-high, corticosteroid-responsive asthma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, 190(6): 639-648.
- [23] Huang P, Li Y, Lv Z, et al. Comprehensive attenuation of IL-25-induced airway hyperresponsiveness, inflammation and remodelling by the PI3K inhibitor LY294002 [J]. *Respirology*, 2017, 22(1): 78-85.
- [24] Mitchell PD, O'Byrne PM. Biologics and the lung: TSLP and other epithelial cell-derived cytokines in asthma [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 169: 104-112.
- [25] Toki S, Goleniewska K, Zhang J, et al. TSLP and IL-33 reciprocally promote each other's lung protein expression and ILC2 receptor expression to enhance innate type-2 airway inflammation [J]. *Allergy*, 2020, 75(7): 1606-1617.
- [26] Naik SP, P A M, B S J, et al. Evaluation of inflammatory markers interleukin-6 (IL-6) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in asthma [J]. *J Asthma*, 2017, 54(6): 584-593.
- [27] Foster PS, Maltby S, Rosenberg HF, et al. Modeling Th2 responses and airway inflammation to understand fundamental mechanisms regulating the pathogenesis of asthma [J]. *Immunol Rev*, 2017, 278(1): 20-40.
- [28] Patel TR, Sur S. IgE and eosinophils as therapeutic targets in asthma [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2017, 17(1): 42-49.
- [29] 湛孝东, 姜玉新, 李良烽, 等. 不同浓度卵蛋白变应原对小鼠哮喘模型建立的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2012, 20(4): 16-20.

[收稿日期] 2020-09-29