

川芎嗪调节 TGF- β /Smad 信号通路对哮喘小鼠气道炎症和气道重塑的影响

史雅旭¹, 戴曦¹, 王丽娇², 伍娟³, 江山⁴, 杨小琼^{1*}

1. 西南医科大学附属医院 呼吸内一科, 四川 泸州 646000

2. 眉山市人民医院 呼吸内科, 四川 眉山 620010

3. 四川省第二中医医院 呼吸内科, 四川 成都 610000

4. 都江堰市人民医院 呼吸与危重医学科二病区, 四川 成都 611830

摘要: **目的** 探讨川芎嗪调节 TGF- β /Smad 信号通路对哮喘小鼠的气道炎症和气道重塑的影响及其作用机制。**方法** 选取 40 只健康雌性 BALB/c 小鼠, 随机分为对照、模型、川芎嗪、地塞米松组, 每组各 10 只。采用卵清白蛋白 (OVA) + 氢氧化铝混合液腹腔注射致敏、OVA 滴鼻激发构建小鼠慢性哮喘模型, 在激发同时川芎嗪、地塞米松组小鼠分别于每日滴鼻激发前 30 min ip 川芎嗪注射液 80 mg/kg 或地塞米松注射液 2 mg/kg, 模型组小鼠 ip 等量生理盐水。小鼠处死后取肺组织行 HE 染色观察评估肺组织病理变化, Masson 染色观察评估小鼠肺组织气道重塑, ELISA 法检测血清中免疫球蛋白 E (IgE)、白细胞介素-5 (IL-5)、转录因子 GATA-3 及转化生长因子- β (TGF- β) 表达水平, 免疫印迹法检测小鼠肺组织中 TGF- β 1 和 Smad2、Smad7 表达水平。**结果** 与模型组比较, 川芎嗪组小鼠气道改变明显减轻, 气管壁炎性细胞浸润减少, 气道壁、平滑肌层和基底膜增厚减轻。川芎嗪组气道周围炎症和肺泡炎症评分显著降低 ($P < 0.05$)。川芎嗪组基底膜层、平滑肌层厚度明显降低, 气道壁内外径比值明显升高 ($P < 0.05$)。川芎嗪组小鼠血清中 IgE、IL-5、GATA-3 和 TGF- β 1 水平明显降低 ($P < 0.05$)。川芎嗪组小鼠肺组织中 TGF- β 1、Smad2 表达均降低, 而 Smad7 表达增加 ($P < 0.05$)。**结论** 川芎嗪可改善哮喘小鼠气道重塑, 其机制是通过调节 TGF- β /Smad 信号通路来实现的。

关键词: 川芎嗪; TGF- β 1/Smads 通路; 哮喘; 气道重塑

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2019)01-0020-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.01.005

Effect of ligustrazine on airway inflammation and airway remodeling in asthmatic mice by regulating TGF- β /Smad signaling pathway

SHI Ya-xu¹, DAI Xi¹, WANG Li-jiao², WU Juan³, JIANG Shan⁴, YANG Xiao-qiong¹

1. Department of Respiratory, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

2. Department of Respiratory, Meishan City People's Hospital, Meishan 620010, China

3. Department of Respiratory, the Second Chinese Medicine Hospital of Sichuan Province, Chengdu 610000, China,

4. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Dujiangyan People's Hospital, Chengdu 611830, China

Abstract: Objective To investigate the effect of ligustrazine on airway inflammation and airway remodeling in mice asthma models by regulating TGF- β /Smad signaling pathway and explore its mechanism. **Methods** Healthy female BALB/c mice were randomly divided into control group, model group, ligustrazine group, and dexamethasone group, and each group had 10 mice. The model was established by ip OVA + $Al_2(OH)_3$ mixture, and nasal instillation of OVA. Mice in the ligustrazine and dexamethasone groups were ip administered with Ligustrazine Injection 80 mg/kg, or Dexamethasone Injection 2 mg/kg 30 min before nasal instillation. Mice in model group were ip with the same amount of saline. Pathological changes of lung tissue in mice were observed by HE staining, airway remodeling in lung tissue of mice were observed by Masson staining, the levels of IgE, IL-5, GATA-3, and TGF- β 1 in serum were detected by ELISA, and the expression levels of TGF- β 1, Smad2, and Smad7 in lung tissue of mice were detected by Western blotting method. **Results** Compared with the model group, the airway changes were significantly relieved, the infiltration of inflammatory cells in tracheal wall of mice in the ligustrazine group were reduced, and the thickening of airway wall, smooth muscle

收稿日期: 2018-09-22

作者简介: 史雅旭, 女, 呼吸内科硕士研究生, 研究方向哮喘。E-mail: 503377684@qq.com

*通信作者 杨小琼, 副教授。E-mail: 596635352@qq.com

layer, and basement membrane were decreased. Compared with the model group, the scores of airway inflammation and alveolar inflammation of mice in the ligustrazine group were significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with the model group, the ratio of inner and outer diameter of the airway wall of mice in the ligustrazine group was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, serum IgE, IL-5, GATA-3 and TGF- β 1 levels in the ligustrazine and dexamethasone groups were significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expressions of TGF- β 1 and Smad2 in lung tissues of mice in the ligustrazine group were decreased, but the expressions of Smad7 were increased ($P < 0.05$). **Conclusions** Ligustrazine can improve airway remodeling in asthma by regulating the TGF- β /Smad signaling pathway.

Key word: ligustrazine; TGF- β 1/Smads pathway; asthma; airway remodeling

全世界约有 3 亿人患有哮喘, 预计随着城市化进程, 2025 年哮喘患病人数将增加到 4 亿。中国儿童和成人哮喘患病率低于发达国家, 但近 30 年来一直呈上升趋势。多基因多态性、PM_{2.5}、PM₁₀、二氧化硫、二氧化氮、烟草和煤炭燃烧、室内污染和吸入变应原都是导致哮喘的危险因素^[1-2]。哮喘同时也是 2 型糖尿病、慢性阻塞性肺疾病、脑卒中的危险因素^[3-5], 因此积极防治哮喘及预防其并发症刻不容缓。

支气管哮喘是由多种炎性细胞参与的慢性炎症性疾病, 其病理发展依靠嗜酸性粒细胞、肥大细胞、平滑肌细胞、气道上皮细胞、T 淋巴细胞的共同参与和级联激活, 使患者出现发作性的呼吸困难, 最终导致不同程度的气流阻塞和肺功能下降。近年来, 相关研究表明哮喘的主要发病机制由气道炎症、气道高反应性和气道重塑构成, 其主要病理变化包括气道上皮细胞变化和黏液腺增生、气道平滑肌细胞增殖和迁移、气道壁血管再生等^[6]。Th2 细胞数量增加、功能活化, 细胞因子大量分泌是气道炎症启动和维持的关键因素, 其中尤以白细胞介素-5 (IL-5)、免疫球蛋白 E (IgE)、转录因子 GATA-3 的作用突出^[7-8]。研究表明, 哮喘的发展与转化生长因子- β (TGF- β) 关系尤为密切, 它在参与上皮炎症损伤修复的同时也诱发了气道重塑^[9]。而 Smad 蛋白是 TGF- β 信号传导系统的重要成员, 作为 TGF- β 受体复合物的下游信号调节蛋白, 广泛参与调控细胞的增殖、转化、合成、分泌和凋亡, 直接介导 TGF- β 胞内信号传导^[10]。川芎嗪是从传统活血化瘀中药川芎中提取的有效成分, 具有抑制炎症、调节免疫、抗纤维化等药理活性作用, 目前有研究提出川芎嗪能够减少相关炎症因子的分泌, 减轻气道炎症, 改善哮喘患者的支气管高反应性^[11]。为了进一步研究川芎嗪在哮喘中的治疗作用及机制, 本实验通过建立小鼠哮喘模型, 探讨川芎嗪在哮喘小鼠气道炎症和气道重塑中发挥的作用及其相关机

制, 以期临床防治哮喘提供更多试验数据和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试药和动物

注射用灭菌生理盐水、卵清白蛋白 (OVA, 美国 Sigma 公司)、氢氧化铝 ($Al_2(OH)_3$, 成都市科龙化工试剂厂)、盐酸川芎嗪 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司生产, 质量分数 $\geq 98\%$, 货号 F1515034)、地塞米松磷酸钠注射液 (上海通用药业股份有限公司生产, 规格 1 mL : 5 mg, 产品批号 1801233)、ELISA 试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司)。

Balb/c 小鼠, 雌性, 40 只, 6~8 周龄, 体质量 18~22 g, 购于重庆腾鑫比实验动物销售有限公司, 使用合格证号 SCXK (京) 2014-0004, 饲养于西南医科大学 SPF 级动物实验中心。

1.2 方法

1.2.1 分组、造模和给药 将 40 只健康雌性 BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组、川芎嗪组和地塞米松组, 每组各 10 只。根据 Kianmeher 等^[12]的方法制备哮喘模型。模型组、川芎嗪组、地塞米松组在第 1、7、14 天每只小鼠分别 ip 致敏液 [OVA 100 μ g/mL + $Al_2(OH)_3$ 10 mg/mL 混悬液] 0.2 mL 致敏, 对照组小鼠 ip 等量生理盐水。模型组、川芎嗪组、地塞米松组小鼠在第 14 天开始 ip 5% 水合氯醛 40 mg/kg 麻醉, 经滴鼻滴入激发液 (OVA 2 mg/mL) 50 μ L/只, 连续激发 6 d, 观察到小鼠出现喘息、呼吸急促、抽搐、烦躁不安、大小便失禁等症状, 提示激发成功。在激发的同时川芎嗪组、地塞米松组小鼠分别于每日滴鼻激发前 30 min ip 川芎嗪注射液 80 mg/kg 或地塞米松磷酸钠注射液 2 mg/kg^[13], 模型组小鼠 ip 等量生理盐水。

1.2.2 肺组织病理学观察 所有小鼠在末次激发后 24 h 内麻醉, 眼眶取血后处死小鼠, 暴露胸腔, 分离小鼠左肺组织, 置于 4% 多聚甲醛中固定, 常规

以脱水、石蜡包埋、切片，行苏木素-伊红（HE）染色、Masson 染色。显微镜下观察分析各组小鼠气道炎症水平，同时应用 Image-pro plus 6.0 图像分析

软件分别测量基底膜层厚度、平滑肌层厚度和气道壁内外径。按照炎症评分标准^[14]分别对 4 组小鼠予以评分，炎症评分标准见表 1。

表 1 炎症评分标准

Table 1 Standard of inflammation score

分数	气道及气道周围炎症	肺泡炎症
0	无炎症细胞	正常
1	少许炎症细胞	肺泡壁正常，肺泡内可见少许巨噬细胞
2	炎症细胞成环状，层厚为 1 个细胞	肺泡壁轻度增厚，肺泡内可见较细胞多的巨噬细胞、嗜酸性粒细胞
3	炎症细胞成环状，层厚为 2~4 个细胞	肺泡壁显著增厚，肺泡内 30%~50% 可见多核巨细胞、嗜酸性粒细胞
4	炎症细胞成环状，层厚 > 4 个细胞	肺泡壁显著增厚，肺泡内 > 50% 可见多核巨细胞、嗜酸性粒细胞。
5	—	完全实变

1.2.3 血清 IgE、IL-5、GATA-3 和 TGF- β 1 检测 将小鼠血液收集于枸橼酸抗凝管中，4℃、3 000 r/min 条件下离心 10 min，收集上层血浆，采用 ELISA 法检测小鼠血浆中 IgE、IL-5、GATA-3、TGF- β 1 水平。

1.2.4 肺组织中 TGF- β 1、Smad2、Smad7 蛋白表达检测 取适量右肺组织，投入液氮中，置于研磨钵中，并加入适量液氮研磨至粉末状，加入适量蛋白裂解液，于冰上裂解 30 min，在 4℃、13 000 r/min 条件下离心 15 min，收集上清液，使用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒测定样品中蛋白浓度后，按比例加入 5×蛋白上样缓冲液，充分混匀，100℃煮沸 10 min，备用。按步骤完成上样、电泳、转膜、封闭抗体、孵育一抗、二抗、显影、条带分析，比较不同组间的上述蛋白表达水平。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表

示，采用单因素方差分析（one-way ANOVA）比较组间差异。方差齐时组间比较采用 LSD 法分析，方差不齐时则采用 Games-Howell 法分析。

2 结果

2.1 各组小鼠肺组织病理变化和炎症评分

对照组小鼠肺组织无炎症变化；模型组小鼠可见气道管腔变窄，气道壁、平滑肌层和基底膜层增厚，上皮细胞坏死、脱落，黏膜下、气道管壁周围可见炎性细胞浸润；与模型组小鼠比较，川芎嗪组、地塞米松组小鼠气道改变明显减轻，气管壁炎性细胞浸润减少，气道壁、平滑肌层和基底膜层增厚减轻，见图 1。

与对照组小鼠比较，模型组小鼠气道周围炎症、肺泡炎症评分均显著升高（ $P < 0.05$ ）；与模型组比较，川芎嗪组、地塞米松组小鼠气道周围炎症和肺泡炎症评分均显著降低（ $P < 0.05$ ），见表 2。

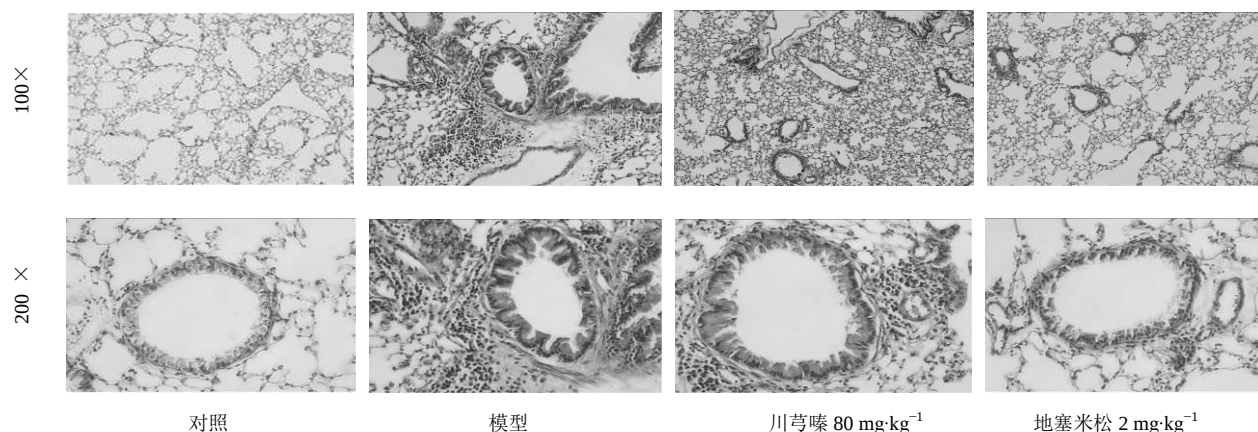


图 1 小鼠气道及肺泡组织病理学检测（HE 染色）

Fig. 1 Pathological examination of airway and alveoli in mice (HE staining)

表 2 各组小鼠气道周围和肺泡炎症评分 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Peripheral airway and alveolar inflammation score of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	气道及气道周 围炎症评分	肺泡炎症评 分
对照	—	0.88 ± 0.35	0.75 ± 0.46
模型	—	4.38 ± 0.74*	4.50 ± 0.76*
地塞米松	2	2.25 ± 0.46 [#]	2.13 ± 0.65 [#]
川芎嗪	80	3.38 ± 0.52 [#]	3.25 ± 0.71 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

2.2 各组小鼠肺内气道重塑情况比较

对各组小鼠肺组织行 Masson 染色并观察比较,

结果见图 2。

与对照组小鼠比较, 模型组基底膜层、平滑肌层厚度显著增加, 气道壁内外径比明显减小 ($P < 0.05$); 与模型组小鼠比较, 川芎嗪组、地塞米松组基底膜层、平滑肌层厚度明显降低, 气道壁内外径比值明显升高 ($P < 0.05$), 见表 3。

2.3 各组小鼠血清中 IgE、IL-5、GATA-3 和 TGF-β1 水平比较

与对照组比较, 模型组小鼠血清中 IgE、IL-5、GATA-3 和 TGF-β1 水平均明显增高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 川芎嗪组、地塞米松组小鼠血清中 IgE、IL-5、GATA-3 和 TGF-β1 水平均明显降低 ($P < 0.05$), 见表 4。

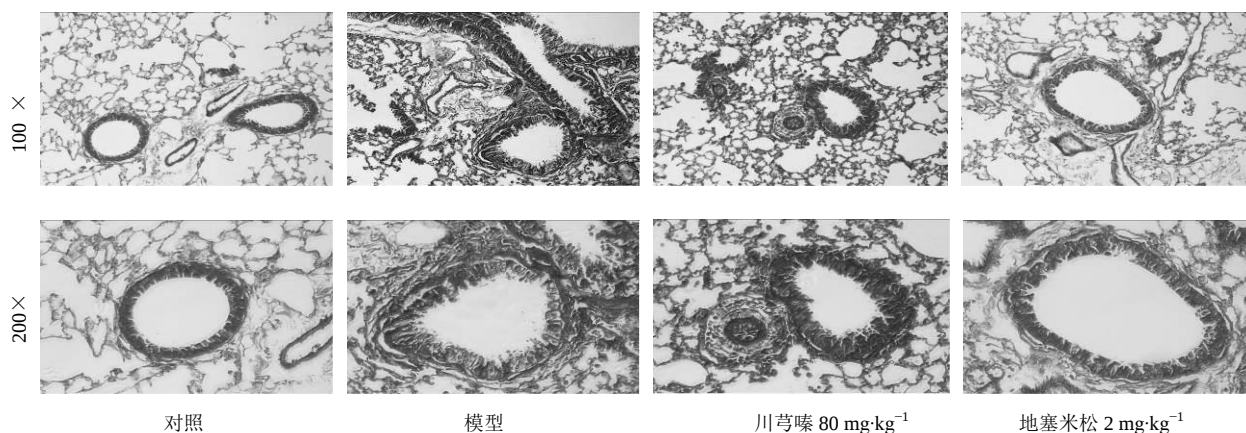


图 2 各组小鼠肺组织 Masson 染色

Fig. 2 Masson staining of lung tissue of mice in each group

表 3 各组小鼠气道重塑情况比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Comparison on airway remodeling of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	基底膜层/μm	平滑肌层/μm	气管壁内外径比
对照	—	10.01 ± 1.75	10.54 ± 1.05	0.800 ± 0.033
模型	—	19.10 ± 1.59*	18.35 ± 1.47*	0.634 ± 0.040*
地塞米松	2	10.87 ± 1.58 [#]	11.38 ± 1.21 [#]	0.774 ± 0.037 [#]
川芎嗪	80	11.60 ± 1.33 [#]	11.74 ± 1.23 [#]	0.755 ± 0.062 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

表 4 各组血清 IgE、IL-5、GATA-3、TGF-β1 比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Comparison on the serum of IgE, IL-5, GATA-3, TGF-β1 in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IgE/(ng·mL ⁻¹)	IL-5/(pg·mL ⁻¹)	GATA-3/(pg·mL ⁻¹)	TGF-β1/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	609.07 ± 37.08	11.86 ± 0.99	22.57 ± 1.35	194.11 ± 15.95
模型	—	2 657.41 ± 156.49*	48.89 ± 4.41	45.52 ± 1.87*	1 119.61 ± 88.00*
地塞米松	2	1 029.87 ± 89.58 [#]	21.70 ± 1.46 [#]	28.23 ± 1.72 [#]	383.44 ± 35.67 [#]
川芎嗪	80	1 767.86 ± 221.25 [#]	29.17 ± 2.27 [#]	37.91 ± 2.56 [#]	682.18 ± 33.45 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

2.4 各组小鼠肺组织中 TGF- β 1、Smad2、Smad7 蛋白表达水平比较

通过 Western blotting 法检测 TGF- β 1、Smad2、Smad7 蛋白在各组小鼠肺组织中的表达水平, 见图 3。运用相关软件测量条带灰度值, 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织中 TGF- β 1、Smad2 表达均明显增高, 而 Smad7 表达明显减少 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 川芎嗪组、地塞米松组小鼠肺组织中 TGF- β 1、Smad2 表达均降低, 而 Smad7 表达增加 ($P < 0.05$), 见表 5。

3 讨论

哮喘作为慢性变态反应性疾病, 其病理生理过程的最终结果是导致不可逆性气流受阻, 由于多种

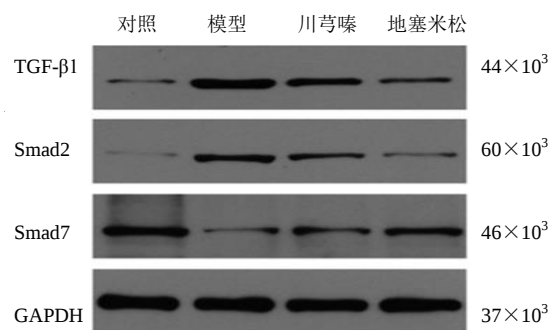


图 3 各组小鼠肺组织中 TGF- β 1、Smad2 和 Smad7 蛋白条带相对灰度值比较

Fig. 3 Comparison on relative gray values of TGF- β 1, Smad2 and Smad7 protein bands in lung tissue of mice

表 5 各组小鼠肺组织中 TGF- β 1、Smad2、Smad7 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 5 Comparison on protein expression of TGF- β 1, Smad2 and Smad7 levels in lung tissue of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TGF- β 1/GAPDH	Smad2/GAPDH	Smad7/GAPDH
对照	—	0.095 ± 0.050	0.068 ± 0.012	0.712 ± 0.064
模型	—	0.656 ± 0.049*	0.591 ± 0.074*	0.137 ± 0.055*
地塞米松	2	0.251 ± 0.015 [#]	0.179 ± 0.058 [#]	0.382 ± 0.098 [#]
川芎嗪	80	0.456 ± 0.073 [#]	0.370 ± 0.042 [#]	0.279 ± 0.056 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

炎症细胞、因子的参与, 慢性炎症导致持续性的气道上皮组织损伤和修复, 在病程后期出现气道管腔狭窄、平滑肌增厚、气道上皮下纤维化、血管生成和黏膜腺体增多等气道重塑改变, 在哮喘患者的发生发展中起着关键作用。目前已知 Th1/Th2 型细胞的比例、功能失衡是引起哮喘发作的重要环节, 哮喘发作时 Th1 型免疫反应减弱, Th2 型免疫反应增强^[15]。Th2 亚群主要分泌 IL-4、IL-5、IL-13 等细胞因子。IL-4 作用于 B 淋巴细胞, 促进其分泌 IgE, 而 IL-5 可特异性诱导嗜酸性粒细胞活化并释放相关炎症因子导致气道黏膜损伤^[16]。另一方面, IL-5 的表达与 GATA-3 密切相关。GATA-3 是 Th2 型淋巴细胞的特异性转录因子, 是调节 T 细胞发育、分化和 Th1/Th2 平衡的关键因子之一, 它参与了 Th2 型细胞因子的转录过程^[17]。Garn^[18]等通过 GATA-3 有效缓解哮喘小鼠的气道炎症。本实验中, 使用川芎嗪干预的小鼠气道和肺泡炎症均明显减轻; 结果发现, 川芎嗪干预后明显降低了哮喘小鼠血清中 IgE、IL-5、GATA-3 水平, 证实川芎嗪在哮喘中有良好的降低炎症因子、调节免疫细胞的功能。

TGF- β 的亚型有 3 种, 其中以 TGF- β 1 的生物学活性最为明显。近年来研究表明, TGF- β 1 主要通过 TGF- β 1/Smads 信号通路发挥其生物学效应, Smad 蛋白是 TGF- β 信号传导中的重要成员, Smad 蛋白家族可分为受体调节型蛋白 (1、2、3、5 型)、通用调节型蛋白 (4 型) 和抑制型蛋白 (6、7 型)^[19]。在气道重塑过程中, TGF- β 1 能诱导上皮细胞损伤, 促进新生血管, 诱导气道平滑肌细胞增殖肥大, 增加细胞外基质合成, 同时诱导气道上皮成纤维细胞分化, 促进纤维黏蛋白、胶原沉积^[20]。研究发现, TGF- β 1 与细胞表面的跨膜受体 T β R^{II} 结合转变为 T β R^I, 在磷酸化作用下活化 Smad2, 启动相关基因的转录, 继而诱导细胞外基质的合成。但是当 Smad7 上调并与 T β R^I 结合时, Smad2 活化会受到抑制, TGF- β 1 信号传递受阻^[21]。

目前在临床上仍较多采用吸入糖皮质激素和 (或) β_2 受体激动剂, 即可够控制大多数哮喘患者的症状, 但对激素抵抗型、依从性较差的患者疗效欠佳, 所以本研究旨在探讨在支气管哮喘治疗中其他药物的应用效果。中西医结合的综合治疗方案是

我国防治哮喘病的特色之一,从川芎中分离提纯得到的酰胺类生物碱是一种新型的钙离子拮抗剂,具有抗血小板聚集、改善循环、扩张血管、增加血流量等作用,从而其在心血管疾病、哮喘等多方面发挥重要作用^[22-24]。川芎嗪可调节 Th1/Th2 细胞亚群的平衡,同时抑制炎症细胞因子释放,使支气管平滑肌松弛,从而减轻支气管哮喘的炎症反应,起到一定的治疗效果。实验结果提示,川芎嗪明显减少血清中 IgE、IL-5、GATA-3、TGF- β 1 水平,减少了嗜酸性细胞、肥大细胞和 T 淋巴细胞的浸润,提示川芎嗪可以有效调节 Th1/Th2 比例平衡,调节了哮喘气道炎症反应^[25-26]。更重要的是,川芎嗪在一定程度上减轻了支气管基底膜层和平滑肌层的增厚,使气管内外径比值增加,改善了气管狭窄,并且进一步缓解哮喘症状。在进一步的机制研究中发现,川芎嗪正是通过调节 TGF- β 1/Smads 信号通路平衡,从而降低肺组织中 TGF- β 1、Smad2 蛋白表达,上调 Smad7 蛋白表达,发挥其抑制哮喘气道重塑的作用。

综上所述,川芎嗪可改善支气管哮喘气道重塑,其机制是通过调节 TGF- β /Smad 信号通路实现的,为川芎嗪在哮喘临床治疗上提供了实验依据。

参考文献

- [1] To T, Stanojevic S, Moores G, et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey [J]. *BMC Public Health*, 2012, 12(1): 204-204.
- [2] Chen Y, Wong G W, Li J. Environmental exposure and genetic predisposition as risk factors for asthma in China [J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2016, 8(2): 92-100.
- [3] Mueller N T, Koh W P, Odegaard A O, et al. Asthma and the risk of type 2 diabetes in the Singapore Chinese Health Study [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2013, 99(2): 192-199.
- [4] Aanerud M, Carsin A E, Sunyer J, et al. Interaction between asthma and smoking increases the risk of adult airway obstruction [J]. *Eur Respir J*, 2015, 45(3): 635-643.
- [5] Wen L Y, Ni H, Li K S, et al. Asthma and risk of stroke: A systematic review and meta-analysis [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2016, 25(3): 497-503.
- [6] Schmidt M, Mattoli S. A mouse model for evaluating the contribution of fibrocytes and myofibroblasts to airway remodeling in allergic asthma [J]. *Methods Mol Biol*, 2013(1032): 235-255.
- [7] Rogala B, Bozek A, Gluck J, et al. Prevalence of IgE-mediated allergy and evaluation of Th1/Th2 cytokine profiles in patients with severe bronchial asthma [J]. *Postepy Dermatol Alergol*, 2015, 32(4): 274-280.
- [8] Zhang Y, Zhang Y, Gu W, et al. TH1/TH2 cell differentiation and molecular signals [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014(841): 15-44.
- [9] Al-Alawi M, Hassan T, Chotirmall S H. Transforming growth factor β and severe asthma: a perfect storm [J]. *Respir Med*, 2014, 108(10): 1409-1423.
- [10] Koćwin M, Jonakowski M, Przemecka M, et al. The role of the TGF-SMAD signalling pathway in the etiopathogenesis of severe asthma [J]. *Pneumonol Alergol Pol*, 2016, 84(5): 290-301.
- [11] Alves M F, da Fonseca D V, de Melo S A L, et al. New therapeutic targets and drugs for the treatment of asthma [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2018, 18(8): 684-696.
- [12] Kianmehr M, Ghorani V, Boskabady M H, et al. Animal model of asthma, various methods and measured parameters: A methodological review [J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2016, 15(6): 445-465.
- [13] 刘 丽. 川芎嗪对致敏大鼠气道炎症和气道重塑的作用和机制 [D]. 太原: 山西医科大学, 2009.
- [14] Johnathan M, Gan S H, Ezumi M F, et al. Phytochemical profiles and inhibitory effects of Tiger Milk mushroom (*Lignosus rhinocerus*) extract on ovalbumin-induced airway inflammation in a rodent model of asthma [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016(16): 167.
- [15] Lloyd C M, Hessel E M. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(12): 838-848.
- [16] Seumois G, Zapardiel-Gonzalo J, White B, et al. Transcriptional profiling of Th2 cells identifies pathogenic features associated with asthma [J]. *J Immunol*, 2016, 197(2): 655-664.
- [17] Erpenbeck V J, Hagenberg A, Krentel H, et al. Regulation of GATA-3, c-maf and T-bet mRNA expression in bronchoalveolar lavage cells and bronchial biopsies after segmental allergen challenge [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2006, 139(4): 306-316.
- [18] Garn H, Renz H. GATA-3-specific DNase-A novel approach for stratified asthma therapy [J]. *Eur J Immunol*, 2017, 47(1): 22-30.
- [19] Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system [J]. *EMBO J*, 2000, 19(8): 1745-1754.
- [20] Gagliardo R, Chanez P, Gjomarkaj M, et al. The role of transforming growth factor- β 1 in airway inflammation of childhood asthma [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*,

- 2013, 26(3): 725-738.
- [21] Rezaei H B, Kamato D, Ansari G, *et al.* Cell biology of Smad2/3 linker region phosphorylation in vascular smooth muscle [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39(8): 661-667.
- [22] 朱继学, 林爱华. 川芎嗪的临床新用途 [J]. 中国医药指南, 2011, 9(25): 309-310.
- [23] 罗伟华. 川芎嗪的临床应用及其制剂研究进展 [J]. 中国现代药物应用, 2017, 11(18): 191-193.
- [24] 李玉梅, 杨欣欣, 韩旭, 等. 川芎嗪与黄芪甲苷配伍对人脐静脉内皮细胞血管生成的作用及机制探讨 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 722-727.
- [25] Ji N F, Xie Y C, Zhang M S, *et al.* Ligustrazine corrects Th1/Th2 and Treg/Th17 imbalance in a mouse asthma model [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 21(1): 76-81.
- [26] 严鸿, 方红. T-bet/GATA3 与哮喘的相关性及川芎嗪治疗哮喘的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(1): 264-266.