

## 三子养亲汤对支气管哮喘模型大鼠尿皮质素及肺表面活性蛋白-D表达的影响

余洪刚<sup>1</sup>, 付大海<sup>1</sup>, 宋超<sup>1</sup>, 唐俊峰<sup>2</sup>, 马静维<sup>3\*</sup>

1. 西安市中医医院 肺病科, 陕西 西安 710012

2. 陕西中医药大学 中药药理学研究室, 陕西 咸阳 712000

3. 宝鸡市中医医院 呼吸内科, 陕西 宝鸡 712000

**摘要:**目的 探讨三子养亲汤(SZ)对大鼠实验性支气管哮喘的保护作用及潜在机制。方法 以卵清蛋白(OVA)致敏和激发诱发支气管哮喘,将大鼠随机分为5组:对照组、模型组、地塞米松(阳性药,1 mg/kg)组、SZ治疗(200 mg/kg)组和SZ单给药(不造模,200 mg/kg)组。试剂盒法检测血清免疫球蛋白E(IgE)水平。ELISA试剂盒法检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中的炎性生物标志物白细胞介素(IL)-4、IL-5、IL-13、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ );Dunger's稀释液染色法进行BALF中嗜酸性粒细胞计数;试剂盒法检测BALF中氧化氮应激生物标记物丙二醛(MDA)和谷胱甘肽(GSH)水平、超氧化物歧化酶(SOD)的活性;实时荧光定量PCR法检测BALF中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)RNA水平。以Western blotting法检测肺匀浆中肺表面活性蛋白-D(SP-D)表达水平;免疫组化测定肺中尿皮质素(UCN)的表达。HE染色法观察大鼠肺组织病理学变化。**结果**与模型组比较,SZ治疗可显著降低血清IgE水平( $P < 0.05$ );显著降低BALF中MDA含量,同时显著提高SOD活性和GSH含量( $P < 0.05$ );显著降低BALF中IL-4、IL-5、IL-13、IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 水平( $P < 0.05$ );显著降低肺组织中SP-D和UCN的蛋白表达( $P < 0.05$ );HE染色结果表明,SZ显著改善模型大鼠肺组织炎症病变。**结论** SZ可通过下调SP-D和UCN表达改善OVA诱导的支气管哮喘。

**关键词:** 三子养亲汤;支气管哮喘;尿皮质素;肺表面活性蛋白-D;炎症;氧化应激

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2020)11-2187-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.11.007

## Effect of Sanzi Yangqin Decoction on urine corticosteroids and pulmonary surfactant protein-D expression in bronchial asthma rats

YU Honggang<sup>1</sup>, FU Dahai<sup>1</sup>, SONG Chao<sup>1</sup>, TANG Junfeng<sup>2</sup>, MA Jingwei<sup>3</sup>

1. Department of Lung Diseases, Xi'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710012, China

2. Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmacology, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712000, China

3. Department of Respiratory Medicine, Baoji Hospital of Traditional Chinese Medicine, Baoji 712000, China

**Abstract: Objective** Investigate the protective effect and mechanism of Sanziyangqin Decoction (SZ) on experimental bronchial asthma in rats. **Methods** Bronchial asthma was sensitized and stimulated with ovalbumin (OVA). Rats were randomly divided into five groups, including normal control group, model group, DEXA (positive drug, 1 mg/kg) group, SZ treatment (200 mg/kg) and SZ control (200 mg/kg) group. The level of serum immunoglobulin E (IgE) was detected by kit method. Interleukin (IL)-4, IL-5, IL-13, tumor necrosis factor -  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected by ELISA kit; Dunger's dilution staining method was used to count eosinophils in BALF; the levels of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and the activity of superoxide dismutase (SOD) in BALF were detected by kit method; the level of inducible nitric oxide synthase (iNOS) RNA in BALF was detected by real-time quantitative PCR. The expression of pulmonary surfactant protein-D (SP-D) in lung homogenate was detected by Western blotting, and the expression of urinary corticosteroids (UCN) was detected by immunohistochemistry. He staining was used to observe the pathological changes of lung tissue. **Results** Compared with the model group, SZ treatment significantly reduced the serum IgE level ( $P < 0.05$ ), significantly reduced the MDA content in BALF,

收稿日期: 2020-07-31

基金项目: 西安市科技计划项目(201805103YX11SF37)

第一作者: 余洪刚, 硕士, 研究方向为中医药对肺系病的治疗, 肺间质纤维化方向。E-mail: xianyuhongg@163.com

\*通信作者: 马静维, 女(1985—), 本科, 主治医师, 研究方向为呼吸与危重症、肺癌。Tel: 18009172327 E-mail: 695828820@qq.com

significantly increased the SOD activity and GSH content ( $P < 0.05$ ), significantly reduced the levels of IL-4, IL-5, IL-13, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in BALF ( $P < 0.05$ ), significantly reduced the protein expression of SP-D and UCN in lung tissue ( $P < 0.05$ ); HE staining showed that SZ significantly improved the model inflammatory changes of lung tissue in model rats. **Conclusion** SZ can improve the bronchial asthma induced by ovalbumin by regulating the expression of SP-D and UCN.

**Key words:** Sanziyangqin Decoction; bronchial asthma; urocortin; surfactant protein-D; inflammation; oxidative stress

支气管哮喘是普遍存在的严重健康问题,全球有3亿不同年龄和种族的人患有哮喘,全球每250名哮喘患者中就有1人死于哮喘,其发病率逐年上升。其除受生活方式、环境因素和经济状况影响外,遗传因素在哮喘中也起重要作用<sup>[1-2]</sup>。支气管哮喘是气道的慢性炎症,其特征在于支气管反应过度 and 气道重塑<sup>[3]</sup>,T淋巴细胞被激活,产生高水平的白细胞介素(IL)、 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),而嗜酸性粒细胞的激活则导致反应过度 and 气道重塑<sup>[4-5]</sup>。目前临床常用疗法,如吸入皮质类固醇和长效 $\beta_2$ 激动剂等疗效不理想,同时可能加重病情<sup>[6]</sup>,因此,急需具有新型作用机制的药物来治疗哮喘。中药方剂三子养亲汤(SZ)临床治疗哮喘疗效确切<sup>[7-8]</sup>,同时具有较高的安全性,然而其作用机制尚不明确,本研究拟通过大鼠哮喘模型阐明SZ潜在的作用机制,为其临床应用提供一定的理论基础。

## 1 材料

### 1.1 药物及主要试剂

SZ 制备:莱菔子(*Semen Raphani*)、白芥子(*Semen Sinapis*)、紫苏子(*Perillae Fructus*)各12 g,由陕西省中药材公司提供合格药材,并经陕西中医药大学唐俊峰鉴定,分别为十字花科植物萝卜 *Raphanus sativus* L. 的干燥成熟种子,白芥 *Sinapis alba* L. 的干燥成熟种子,唇形科植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 的果实。将紫苏子、莱菔子、白芥子3味药按1:1:1混合后加10倍量水,煎煮2次,将2次提取液过滤,加热浓缩成生药1 g/mL,有效成分芥子碱硫氰酸盐含量达到药典规定<sup>[9]</sup>,合格药液于4 °C保存备用。

卵清蛋白(OVA)(批号A5503,规格1 g,质量分数62%~88%),氢氧化铝[Al(OH)<sub>3</sub>](批号239186,规格25 g,质量分数99%)及地塞米松(批号D4902,规格25 mg,质量分数 $\geq 97\%$ ),美国Sigma公司。TNF- $\alpha$  ELISA试剂盒(美国Ray Biotech);免疫球蛋白E(IgE) ELISA试剂盒(美国Express Biotech);IL-5 ELISA试剂盒(Cusabo Biotech Co., LTD);IL-4、IL-13、IFN- $\gamma$ 和诱导型一氧化氮合酶(iNOs)ELISA试剂盒购自美国Sigma公司;丙二醛(MDA)比色试剂

盒购自CliniLab公司;谷胱甘肽(GSH)和超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒购自Biodiagnostic公司;肺表面活性蛋白-D(SP-D)蛋白一抗(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA);二抗(Bio-Rad, Hercules, CA, USA);RNA提取试剂盒(美国Qiagen);cDNA逆转录试剂盒(美国Fermentas)。光学显微镜(德国Leica Microsystems)

### 1.2 实验动物

雄性Wistar大鼠,体质量160~170 g,购自上海斯莱克公司,实验动物生产许可证号SCXK(沪)2017-0005。在实验开始前,于无病原体的稳定环境条件下,温度为(25 $\pm$ 2)°C,湿度为(60 $\pm$ 10)%,光照/黑暗周期为12 h/12 h,饲养2周。

## 2 方法

### 2.1 造模与分组

将OVA以200  $\mu$ g/mL的质量浓度溶于生理盐水中,然后以1:1的比例以Al(OH)<sub>3</sub>(10 mg/mL)沉淀。根据文献所述方法<sup>[10]</sup>,在第1、2、3、11天向大鼠腹腔内注射1 mL的OVA/Al(OH)<sub>3</sub>悬浮液以致敏。在第20天用乙醚麻醉大鼠,然后在实验的第20、21、22天连续3 d将溶解于300  $\mu$ L生理盐水中的1.5 mg OVA滴入鼻腔开口处诱发哮喘。对照组以生理盐水代替OVA。

将大鼠随机分为5组(每组8只):对照组(等体积生理盐水)、模型组、地塞米松(阳性药,1 mg/kg)<sup>[11]</sup>组、SZ治疗(200 mg/kg,临床等效剂量<sup>[12]</sup>)组和SZ单给药(不进行造模,200 mg/kg)组。造模同时,每天ig给药1次。

### 2.2 血清收集及IgE水平检测

在第23天实验结束后,眼眶后静脉丛收集血液样本,低温离心机中以3 000 r/min离心10 min,获得血清样品,储存在-20 °C。根据ELISA试剂盒说明书检测血清IgE水平。

### 2.3 支气管肺泡灌洗液(BALF)收集及指标检测

采血后,脱颈处死动物,通过将插管原位插入气管中获得BALF样品,将BALF样品于4 °C下,1 000 r/min离心15 min,回收率范围为54.32%~63.71%,将上清液保存在-80 °C。通过ELISA试剂

盒法检测 BALF 中 IL-4、IL-5、IL-13、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  和 iNOs 水平。

将细胞沉淀重悬于 100  $\mu$ L 磷酸盐缓冲液中,使用 Dunger's 稀释液将嗜酸性颗粒染色,从而裂解白细胞(WBCs)和红细胞(RBCs)后,使用血细胞计数器测定沉淀中的嗜酸性粒细胞<sup>[13]</sup>。

## 2.4 肺组织匀浆制备及氧化应激指标检测

分离肺,并用 5 mL 预冷生理盐水洗净,然后压在 2 张滤纸之间。右肺用于制备组织匀浆,而左肺用于组织病理学研究。使用均质器在预冷生理盐水中制备肺匀浆,并在 4  $^{\circ}$ C 下 2 000 r/min 离心 20 min,将得到的上清液保存在 -80  $^{\circ}$ C。试剂盒法检测 GSH、MDA 含量和 SOD 活性。

## 2.5 Western blotting 检测 SP-D 蛋白表达

使用 RIBA 裂解缓冲液裂解匀浆肺组织(50 mg),4  $^{\circ}$ C 下离心 20 min 后,收集上清。将样品于 95  $^{\circ}$ C 下煮 5 min 使蛋白变性,然后以 20 mg 上样量加至 7% SDS-PAGE 凝胶中,转移至硝酸纤维素膜上。使用 5% BSA 将膜在室温下封闭 1 h,4  $^{\circ}$ C 与稀释度为 1:1 000 的一抗孵育过夜。洗涤后与二抗室温下孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次。BCA 法显色曝光, Image J 软件进行灰度分析。

## 2.6 qRT-PCR 法检测 iNOS 表达

使用 RNA 提取试剂盒从细胞沉淀中分离总 RNA,然后根据说明通过 cDNA 逆转录试剂盒转录为 cDNA,并扩增(iNOS 上游引物 5'-GACCAGAACTGTCTCACCTG-3',下游引物 5'-CGAACATCGAACGTCTCACA-3'; $\beta$ -actin 上游引物 GGCTGTATTCCCCTCCATCG,下游引物 CCAGTTGGTAACAATGCCATGT)。使用比较阈值循环法(CT),分析 mRNA 表达水平。

## 2.7 免疫组织化学法分析尿皮质素(UCN)

参照文献方法<sup>[14]</sup>,将包埋在石蜡中的组织样品

重新水化,并在 4  $^{\circ}$ C 下与抗 UCN 一抗孵育过夜,洗涤载玻片后与二抗孵育。在光学显微镜下观察,对染色强度进行评估。

## 2.8 组织病理学研究

大鼠脱颈后,解剖左肺,用等渗生理盐水洗涤并压在两张滤纸之间。干燥的肺保存于 10% 盐水溶液中,使用梯度浓度的乙醇进行脱水后,包埋在石蜡中。按文献所述方法使用苏木精-伊红(HE)染色<sup>[15]</sup>。

## 2.9 统计分析

应用软件 SPSS 22.0 进行统计学分析,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,使用方差单向分析(ANOVA)进行统计分析。

## 3 结果

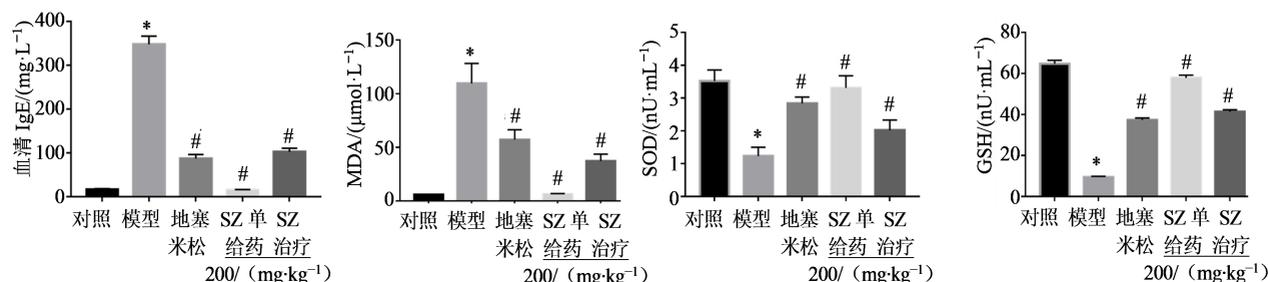
### 3.1 SZ 对血清 IgE 及肺组织氧化应激指标的影响

与对照组比较,模型组血清中 IgE 水平显著增加( $P < 0.05$ );与模型组比较,地塞米松治疗的大鼠血清 IgE 水平显著降低( $P < 0.05$ );同样,SZ 治疗可显著降低 IgE 水平( $P < 0.05$ )。与对照组比较,SZ 单给药组无显著性差异。

与对照组比较,OVA 激发后 MDA 的肺组织含量显著增加,而 SOD 活性和 GSH 含量显著下降( $P < 0.05$ )。与模型组比较,地塞米松和 SZ 治疗后,可显著降低 MDA 含量,同时显著提高 SOD 活性和 GSH 含量( $P < 0.05$ )。SZ 单给药组与对照组之间无显著性差异。结果见图 1。

### 3.2 SZ 对 BALF 中细胞因子水平的影响

与对照组比较,模型组 BALF 中 Th2 细胞因子(IL4、IL-5 和 IL-13)、Th1 细胞因子(IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$ )水平显著增加( $P < 0.05$ );地塞米松或 SZ 治疗后,IL-4、IL-5、IL-13、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  水平显著降低( $P < 0.05$ )。与对照组比较,SZ 单给药组中各细胞因子表达水平无明显差异。结果见表 1。



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

图 1 SZ 对 IgE 及氧化应激指标的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Fig. 1 Effect of SZ on IgE and oxidative stress index( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

表1 SZ对OVA诱发的支气管哮喘大鼠BALF中细胞因子表达水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 1 Effect of SZ on expression of cytokines in BALF of rats with OVA induced bronchial asthma ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

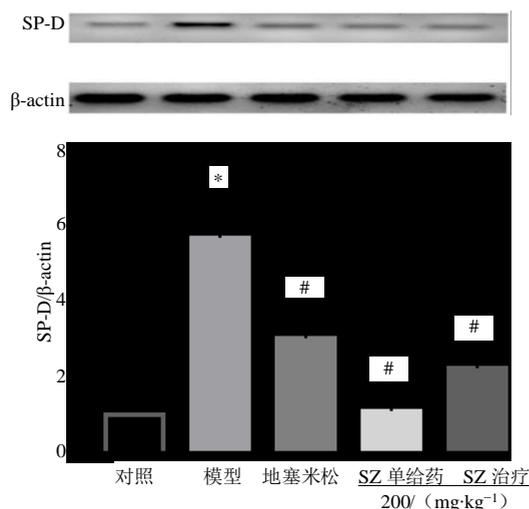
组别	剂量/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	Th2细胞因子/(pg·mL <sup>-1</sup> )			Th1细胞因子/(pg·mL <sup>-1</sup> )	
		IL-4	IL-5	IL-13	TNF-α	IFN-γ
对照	—	17.26±0.89	15.08±0.70	34.50±1.62	24.04±1.03	24.04±1.03
模型	—	191.04±8.08*	121.66±4.30*	208.30±1.60*	127.09±5.28*	127.09±5.28*
地塞米松	1	62.60±3.20#	61.91±3.71#	80.40±6.13#	64.40±5.16#	64.40±5.16#
SZ单给药	200	22.70±1.70#	15.96±1.36#	36.25±2.04#	32.96±1.22#	32.96±1.22#
SZ治疗	200	74.85±6.30#	62.92±5.90#	75.76±4.04#	70.72±5.16#	70.72±5.16#

与对照组比较: \*P<0.05; 与模型组比较: #P<0.05

\*P<0.01 vs control group; #P<0.05 vs model group

### 3.3 SZ对SP-D蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组中SP-D的蛋白表达显著增加(P<0.05);与模型组比较,地塞米松或SZ治疗后大鼠SP-D表达显著降低(P<0.05)。SZ单给药组与对照组比较无显著差异。结果见图2。



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

图2 SZ对OVA诱导的支气管哮喘大鼠BALF中SP-D蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Fig. 2 Effect of SZ on SP-D protein expression in BALF of rats with OVA induced bronchial asthma ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

### 3.4 SZ对BALF中iNOS及嗜酸性粒细胞水平的影响

与对照组比较, OVA诱发哮喘后iNOS和嗜酸性粒细胞水平显著升高(P<0.05);地塞米松或SZ治疗后, BALF中iNOS和嗜酸性粒细胞水平均显著降低(P<0.05)。SZ单给药组与对照组比较无显著差异。结果见表2。

表2 SZ对OVA诱导的支气管哮喘大鼠BALF中iNOS和嗜酸性粒细胞水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 2 Effects of SZ on iNOS and AEC levels in BALF of rats with OVA induced bronchial asthma ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

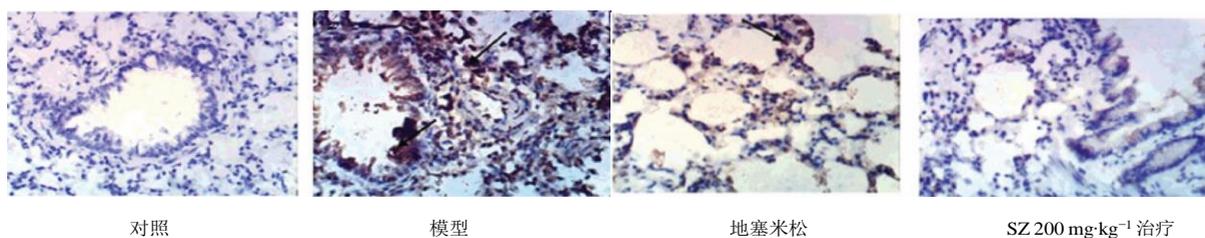
组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	iNOS/β-actin	嗜酸性粒细胞计数
对照	—	1.03±0.01	1.16±0.12
模型	—	18.90±1.89*	76.48±6.93*
地塞米松	1	5.05±0.55#	11.46±1.13#
SZ单给药	200	1.22±0.12#	0.78±0.06#
SZ治疗	200	5.87±0.55#	4.88±0.49#

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

### 3.5 SZ对肺组织UCN表达的影响

用UCN抗体免疫染色后,与对照组比较,模型组棕色染色强度明显增加,表明蛋白表达高于对照组。与模型组比较,地塞米松和SZ治疗后,其染色强度明显降低。结果见图3。



对照

模型

地塞米松

SZ 200 mg·kg<sup>-1</sup> 治疗

图3 免疫组化分析SZ对OVA诱导的支气管哮喘大鼠UCN的影响

Fig. 3 Immunohistochemical analysis of effect of SZ on OVA induced UCN in asthmatic rats

### 3.6 SZ在组织病理学改变中的作用

对照组HE切片的显微镜检查显示,支气管和肺泡的组织学结构正常;而模型组的切片显示,支气管和肺泡结构发生改变,支气管周围和血管周围的囊中有大量炎症细胞,支气管内部存在炎症细胞

浸润。使用地塞米松和SZ预处理后,肺部结构显著改善,炎症细胞明显减少。SZ单给药组的切片显示正常的肺部结构,轻度的血管周围炎症,支气管周围单核细胞,未发现局灶性气肿且未检测到支气管内浸润(图4)。

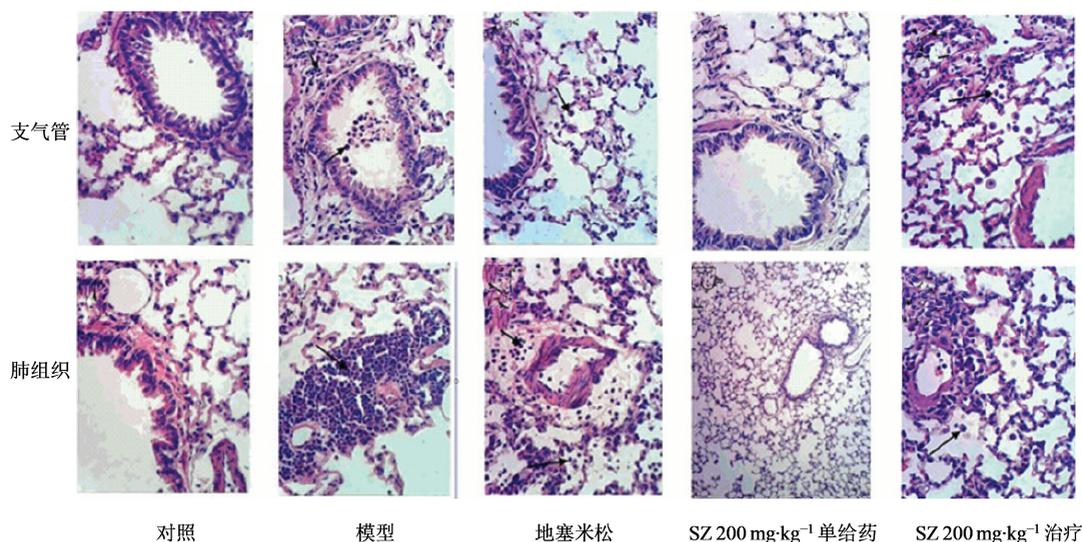


图4 组织病理学观察SZ对支气管哮喘的作用

Fig. 4 Histopathological observation of effect of SZ on bronchial asthma

## 4 讨论

在本研究中,以抗哮喘参考药物地塞米松作为对比,在大鼠中研究了SZ对OVA诱导的支气管哮喘的可能保护作用。OVA是诱导支气管哮喘的金标准,其通过增加血清IgE的水平<sup>[16]</sup>,而IgE是通过炎症细胞脱粒引起哮喘的。IgE与其受体结合后,会导致支气管收缩和炎症介质的释放<sup>[3]</sup>。本研究中,与对照组比较,模型组的血清IgE显著升高,地塞米松显著降低了血清IgE水平,与Huang等<sup>[17]</sup>报道一致。同时,与模型组比较,SZ显著降低血清IgE,验证SZ抗哮喘的作用。

除此之外,OVA还可诱导Th1和Th2细胞。有研究显示,Th2细胞除可通过诱导细胞因子IL-4、IL-5和IL-13收缩平滑肌外,还可通过诱导IgE的产生、嗜酸性粒细胞的激活和黏液分泌,促进气道高反应性和气道炎症<sup>[5,18]</sup>。Th1细胞被认为可诱导TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 表达,在哮喘的发病过程中发挥作用<sup>[4]</sup>。其中TNF- $\alpha$ 被认为是气道炎症中的关键细胞因子,通过诱导促炎性介质以及吸引中性粒细胞和嗜酸性粒细胞来刺激炎症反应<sup>[4]</sup>。本研究发现,OVA刺激显著增加BALF中IL-4、IL-5、IL-13、TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 的水平,而SZ处理后,可显著降低上述指标水平,进一步验证SZ的抗哮喘作用。

氧化应激在哮喘的发病机制中同样起着至关重要的作用。氧化应激指标的检测表明,OVA显著增加了MDA含量,这是严重氧化应激和脂质过氧化的结果。此外,肺中GSH含量和SOD活性显著下降,这可能归因于脂质过氧化作用。OVA刺激可改变氧化还原稳态、降低抗氧化防御机制、诱导高反应性羟基自由基的产生、脂质过氧化的刺激和细胞损伤<sup>[19-20]</sup>。SZ在该研究中亦表现出抗氧化潜力,其可促进MDA含量降低以及SOD活性和GSH水平的提高。

SP-D的表达依赖于IL-4/IL-13,IL-4/IL-13缺陷小鼠在变应原攻击后SP-D的表达没有增加<sup>[21]</sup>。本研究发现,地塞米松或SZ治疗后SP-D表达显著降低,这可能与地塞米松和SZ均可显著抑制IL-4和IL-13有关。硝化应激通过上调iNOS在气道炎症和反应过度中起作用<sup>[22]</sup>,OVA可显著增加BALF中iNOS的水平。地塞米松或SZ治疗可显著降低BALF中的iNOS水平。此结果与Korhonen等<sup>[23]</sup>一致,后者将其归因于NF-KB介导的iNOS转录的抑制。OVA刺激可增加肺中UCN的表达,该蛋白通过肥大细胞脱粒以及T和B淋巴细胞的增殖而导致肺部炎症<sup>[24]</sup>。地塞米松可显著降低肺组织中UCN的表达<sup>[25]</sup>,本研究首次发现SZ可调控UCN表达,与

模型组比较, SZ显著降低UCN表达。并通过组织病理学检查验证发现, SZ可显著改善支气管哮喘肺部结构。

SZ在支气管哮喘治疗方面具有重要价值,其可能是通过调控UCN及SP-D发挥抗哮喘作用,本研究可为SZ的临床应用提供一定的参考。

#### 参考文献

- [1] Nunes C, Pereira A M, Morais-Almeida M. Asthma costs and social impact [J]. *Asthma Res Pract*, 2017, 3: 1.
- [2] Alzahrani Y A, Becker E A. Asthma control assessment tools [J]. *Respir Care*, 2016, 61(1): 106-116.
- [3] Samitas K, Delimpoura V, Zervas E, et al. Anti-IgE treatment, airway inflammation and remodelling in severe allergic asthma: current knowledge and future perspectives [J]. *Eur Respir Rev*, 2015, 24(138): 594-601.
- [4] Cazzola M, Polosa R. Anti-TNF-alpha and Th1 cytokine-directed therapies for the treatment of asthma [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2006, 6(1): 43-50.
- [5] Nakagome K, Nagata M. Pathogenesis of airway inflammation in bronchial asthma [J]. *Auris Nasus Larynx*, 2011, 38(5): 555-563.
- [6] Thomson N C. New and developing non-adrenoreceptor small molecule drugs for the treatment of asthma [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2017, 18(3): 283-293.
- [7] 方 莉, 徐秀萍, 汪芳军, 等. 三子养亲汤和盐酸氨溴索治疗毛细支气管炎的疗效比较 [J]. *中国生化药物杂志*, 2017, 37(2): 52-54, 58.
- [8] 利永聪. 三子养亲汤加味治疗支气管哮喘 82 例临床观察 [J]. *实用中医内科杂志*, 2013, 27(3): 30-31.
- [9] 金 典, 刘佳玲, 王丽娟, 等. 采用 HPLC 法检测三子养亲汤水煎液中主要成分含量 [J]. *中药与临床*, 2018, 9(4): 29-31.
- [10] Abdel-Fattah M M, Salama A A, Shehata B A, et al. The potential effect of the angiotensin II receptor blocker telmisartan in regulating OVA-induced airway remodeling in experimental rats [J]. *Pharmacol Rep*, 2015, 67(5): 943-951.
- [11] Mohammad Shahi M, Rashidi M R, Mahboob S, et al. Protective effect of soy protein on collagen-induced arthritis in rat [J]. *Rheumatol Int*, 2012, 32(8): 2407-2414.
- [12] 杨增祥. 三子养亲汤加减对支气管哮喘患者中医证候积分及肺功能的影响 [J]. *山西医药杂志*, 2020, 49(7): 866-868.
- [13] Ghai C L. *A Textbook Of Practical Physiology* [M]. India: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd., 2013.
- [14] Abdelfattah M S, Elmallah M I Y, Ebrahim H Y, et al. Prodigiosins from a marine sponge-associated actinomycete attenuate HCl/ethanol-induced gastric lesion via antioxidant and anti-inflammatory mechanisms [J]. *PLoS One*, 2019, 14(6): e0216737.
- [15] Kłeczek P, Mól S, Jaworek-Korjakowska J. *The accuracy of H&E stain Unmixing Techniques When Estimating Relative Stain Concentrations* [M]. Cham: Springer International Publishing, 2017: 87-97.
- [16] Kimura Y, Koya T, Kagamu H, et al. A single injection of a sustained-release prostacyclin analog (ONO-1301MS) suppresses airway inflammation and remodeling in a chronic house dust mite-induced asthma model [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 721(1/2/3): 80-85.
- [17] Huang W C, Chan C C, Wu S J, et al. Matrine attenuates allergic airway inflammation and eosinophil infiltration by suppressing eotaxin and Th2 cytokine production in asthmatic mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1): 470-477.
- [18] Lin T Y, Poon A H, Hamid Q. Asthma phenotypes and endotypes [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2013, 19(1): 18-23.
- [19] Tiwari M, Dwivedi U N, Kakkar P. *Tinospora cordifolia* extract modulates COX-2, iNOS, ICAM-1, pro-inflammatory cytokines and redox status in murine model of asthma [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(2): 326-337.
- [20] Yosri H, Elkashef W F, Said E, et al. Crocin modulates IL-4/IL-13 signaling and ameliorates experimentally induced allergic airway asthma in a murine model [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 50: 305-312.
- [21] Qaseem A S, Sonar S, Mahajan L, et al. Linking surfactant protein SP-D and IL-13: implications in asthma and allergy [J]. *Mol Immunol*, 2013, 54(1): 98-107.
- [22] Sugiura H, Ichinose M. Oxidative and nitrate stress in bronchial asthma [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10(4): 785-797.
- [23] Korhonen R, Lahti A, Hämäläinen M, et al. Dexamethasone inhibits inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production by destabilizing mRNA in lipopolysaccharide-treated macrophages [J]. *Mol Pharmacol*, 2002, 62(3): 698-704.
- [24] Wu Y Q, Zhou H, Xu Y Y, et al. Enhanced expression of urocortin in lung tissues of rats with allergic asthma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341(2): 532-540.
- [25] Kageyama K, Hanada K, Nigawara T, et al. Inhibitory effects of glucocorticoids on urocortin-mediated increases in interleukin-6 gene expression in rat aortic smooth muscle cells [J]. *Peptides*, 2007, 28(5): 1059-1067.