

• 药理与临床 •

五虎汤对 RSV 诱导的哮喘小鼠模型树突细胞自噬和炎症因子 IL-17A 和 IL-17F 水平的影响

张鑫¹, 王孟清^{2*}, 罗银河³, 江智豪¹

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

3. 湖南中医药大学 中医学国内一流建设学科, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 探讨五虎汤对呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)诱导的哮喘小鼠模型树突细胞自噬和炎症因子白细胞介素-17A(interleukin-17A, IL-17A)、白细胞介素-17F(interleukin-17F, IL-17F)的影响。方法 采用 RSV 联合鸡卵清蛋白(ovalbumin, OVA)建立哮喘小鼠模型,将小鼠随机分为对照组、模型组及五虎汤低、中、高剂量(1.6、3.2、6.4 g/kg)组和地塞米松(1.82 mg/kg)组、雷帕霉素(1 mg/kg)组,连续给药 14 d 后采用苏木-伊红(HE)染色法观察各组小鼠肺组织病理变化,电镜观察肺组织自噬小体变化,Western blotting 法检测肺组织树突细胞中微管相关蛋白轻链 3I(microtubule-associated protein light chain 3I, LC3I)和 LC3II 表达,ELISA 法检测肺泡灌洗液中 IL-17A、IL-17F 的水平。SD 大鼠随机分为对照组及五虎汤低、中、高(1.1、2.2、4.4 g/kg)组,各给药组 ig 相应药物,2 次/d,连续给药 7 d 后腹主动脉取血,离心取血清,灭活后滤过。将分离的树突细胞与 CD4⁺T 细胞共培养,采用 RSV 联合 OVA-17 肽建立 RSV 诱导的树突细胞自噬模型,流式细胞术检测五虎汤含药血清对 CD4⁺T 细胞增殖与 T 细胞活化标志物 CD69 表达的影响。结果 模型组小鼠气道狭窄,血管周围有大量炎症细胞浸润,肺组织自噬小体增加,自噬蛋白 LC3II/LC3I 表达水平显著升高($P<0.01$),IL-17A 和 IL-17F 水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,五虎汤组肺组织炎症表现减轻,肺组织自噬小体增加,LC3II/LC3I 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$),IL-17A 和 IL-17F 水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01)。RSV 联合 OVA-17 肽诱导的树突细胞自噬模型中,与对照组比较,模型组 CD4⁺T 细胞增殖与 CD69 表达均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,五虎汤中、高剂量含药血清组 CD4⁺T 细胞增殖与 CD69 表达显著降低($P<0.05$ 、 0.01)。结论 RSV 可诱导小鼠肺组织树突细胞自噬水平升高,上调 IL-17A 和 IL-17F 水平,从而介导炎症反应;五虎汤可通过上调 RSV 诱导的哮喘小鼠肺组织树突细胞自噬水平,下调 IL-17A 和 IL-17F 水平,从而改善哮喘气道炎症。

关键词: 五虎汤; 呼吸道合胞病毒; 树突细胞; 自噬; IL-17A; IL-17F

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)03-0718-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.03.014

Effect of Wuhu Decoction on autophagy in dendritic cells and levels of inflammatory factors IL-17A and IL-17F in RSV-induced asthmatic mice

ZHANG Xin¹, WANG Meng-qing², LUO Yin-he³, JIANG Zhi-hao¹

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

3. Domestic First-Class Construction Discipline of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To observe the effect of Wuhu Decoction (五虎汤) on dendritic cells autophagy, inflammatory factor interleukin-17A (IL-17A), and interleukin-17F (IL-17F) in RSV-induced asthmatic mice. **Methods** Asthmatic mice model was established by RSV and ovalbumin (OVA). Mice were randomly divided into control group, model group, Wuhu Decoction low-,

收稿日期: 2020-09-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81774368); 湖南省自然科学基金资助项目(2018JJ6114); 湖南省研究生科研创新资助项目(CX20190580); 湖南中医药大学中医学国内一流学科建设学科项目(4901-020002002)

作者简介: 张鑫(1987—),男,博士研究生,从事小儿肺系疾病的研究。Tel: 13787084380 E-mail: 54689853@qq.com

*通信作者: 王孟清(1963—),男,教授,从事中医药防治小儿呼吸系统疾病的研究。Tel: (0731)85600456 E-mail: wmqwmq2009@sina.com

medium-, high-dose (1.6, 3.2, 6.4 g/kg) groups, dexamethasone (1.82 mg/kg) group and rapamycin (1 mg/kg) group. After given with drugs for 14 d, HE staining was used to observe the pathology of lung, electron microscope was used to observe autophagosome changes of lung, Western blotting was used to detect the expressions of microtubule-associated protein light chain 3I (LC3I) and LC3II in dendritic cells, ELISA was used to detect the level of IL-17A and IL-17F in bronchoalveolar lavage fluid. SD rats were randomly divided into control group, Wuhu Decoction low-, medium- and high-dose (1.1, 2.2, 4.4 g/kg) groups, each administration group were given corresponding drugs, 2 times/d, after given with drugs for 7 d, blood was collected from the artery, the serum was collected by centrifugation and filtered after inactivation. Dendritic cells and CD4⁺T cells were co-cultured, RSV and OVA-17 peptide were used to establish RSV-induced dendritic cells autophagy model. CD4⁺T cell proliferation and CD69 expression were detected by flow cytometry. **Results** In model group, airways of mice were narrowed, a large number of inflammatory cells were infiltrated around the blood vessels, autophagosomes in lung tissue was increased, autophagy protein LC3II/LC3I expressions were significantly increased ($P < 0.01$), IL-17A and IL-17F levels were significantly increased ($P < 0.01$); Compared with model group, lung tissue inflammation of mice in Wuhu Decoction group was reduced, lung tissue autophagosomes was increased, LC3II/LC3I protein expressions were significantly increased ($P < 0.01$), levels of IL-17A and IL-17F were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$). In RSV combined with OVA-17 peptide-induced autophagy model of dendritic cells; Compared with control group, CD4⁺T cell proliferation and CD69 expression in model group were significantly increased ($P < 0.01$); Compared with model group, CD4⁺T cell proliferation and CD69 expression in drug-containing serum middle- and high- dose groups were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** RSV could induce the autophagy of dendritic cells in lung tissue of mice, and upregulate the expression of IL-17A and IL-17F, thereby mediating the inflammatory response; Wuhu Decoction could upregulate the autophagy of dendritic cells in lung tissue of mice induced by RSV, downregulate levels of IL-17A and IL-17F, thereby improving asthmatic airway inflammation.

Key words: Wuhu Decoction; respiratory syncytial virus; dendritic cells; autophagy; IL-17A; IL-17F

支气管哮喘是气道慢性炎症性疾病, 近年儿童哮喘呈逐年增加的趋势^[1]。儿童哮喘与呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV) 密切相关, 研究表明超过 85% 的儿童哮喘与 RSV 感染有关^[2]。RSV 感染人体后, 肺中的抗原提呈细胞摄取抗原, 树突细胞被激活, 此外, 树突细胞自噬功能的改变也会影响其抗原提呈功能, 进而影响 T 细胞分泌的炎症因子, 从而诱发哮喘^[3-6]。辅助性 T 细胞 1 (T helper 1, Th1)、辅助性 T 细胞 2 (T helper 2, Th2) 细胞分泌的细胞因子和辅助性 T 细胞 17 (T helper 17, Th17) 分泌的白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 在哮喘的炎症反应中发挥着重要作用^[7]。五虎汤为治喘名方, 可显著改善哮喘患儿的气道炎症, 课题组前期研究表明五虎汤可通过作用树突细胞, 从而调节 Th1、Th2 细胞分泌的细胞因子水平^[8-9]。本研究通过体内和体外实验探讨五虎汤对 RSV 诱导的哮喘小鼠树突细胞自噬的影响, 以及对 Th17 细胞分泌的炎症因子 IL-17A 和 IL-17F 水平的影响, 揭示五虎汤改善哮喘气道炎症的机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 88 只, 6~8 周龄, 体质量 (20±2) g; SPF 级 SD 雄性大鼠 12 只, 6 周龄, 体质量 (200±5) g, 购自湖南斯莱克景达

动物实验有限公司, 许可证号 SCXK (湘) 2016-0002。转基因 OT2 小鼠 3 只, 4 周龄, 体质量 (18±2) g, 购自美国 Jackson Laboratory, 许可证号 2061A00649。动物饲养于湿度 (55±5) %、温度 (22±2) °C、12 h 亮/12 h 暗循环条件下, 自由饮食饮水。动物实验经湖南中医药大学动物伦理委员会批准 (批准号 20180810-02)。

1.2 细胞

RSV 病毒株和人喉表皮样癌 Hep-2 细胞由武汉大学医学院病毒学研究所提供。

1.3 药材

麻黄、苦杏仁、生石膏、甘草、细茶叶由湖南中医药大学第一附属医院药房提供, 经刘绍贵主任药师鉴定分别为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf 的干燥草质茎、蔷薇科植物山杏 *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. 的干燥成熟种子、硫酸盐类矿物硬石膏族石膏、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎、山茶科植物茶 *Camellia sinensis* (L.) O. Ktze. 的嫩叶。

1.4 药品与试剂

鸡卵清蛋白 (ovalbumin, OVA, 批号 MP6110-1G) 购自上海懋康生物科技有限公司; 小鼠外周血淋巴细胞分离液试剂盒 (批号 P8620) 购自北京索莱宝科技有限公司; 乙酰胆碱 (批号

2260-50-6) 购自上海禾午生物科技有限公司; 雷帕霉素(批号 S1039, 质量分数>98%) 购自美国 Selleck 公司; 地塞米松(批号 D1756, 质量分数为99%)、DMSO(批号 D2650-100ML) 购自美国 Sigma 公司; 苏木精-伊红(HE) 染色液(批号 P032IH)、中性树胶(批号 P033IH)、二甲苯(批号 10023418)、无水乙醇(批号 10009218) 购自国药控股湖南有限公司; 微管相关蛋白轻链 3I (microtubule-associated protein light chain 3I, LC3I) 抗兔单抗(批号 4599S)、微管相关蛋白轻链 3II (LC3II) 抗兔单抗(批号 3868S) 购自美国 CST 公司; β -actin 抗小鼠单抗(批号 YM3028) 购自美国 Immunoway 公司; IL-17A、IL-17F ELISA 试剂盒(批号分别为 E20181109021、E20181109024) 购自上海晶天生物科技有限公司; PBS 缓冲液(批号 LM1711)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 批号 0500)、RPMI 1640 培养基(批号 0002)、重组人粒巨噬细胞集落刺激因子(批号 kx30-GM)、重组人白细胞介素 4(批号 rh114)、Opti-MEM 培养基(批号 1967689) 购自赛百慷(上海) 生物技术股份有限公司; PE/Cy7 抗小鼠 CD69 抗体(批号 104511)、APC 抗小鼠 CD3 抗体(批号 100235)、PE 抗小鼠 CD4 抗体(批号 100407) 购自美国 Biolegend 公司; CD11cPerCP-Cyanine5.5/APC/PE 抗体(批号 130-102-413)、小鼠 CD4(L3T4) 微珠(批号 130-117-043)、肺分离试剂盒、CD11c MicroBeads UltraPure 购自德国 Miltenyi 公司; 红细胞裂解液(批号 S371KJ) 购自上海源培生物科技股份有限公司; 荧光染料 CFSE(批号 HY-D0938) 购自美国 MCE 公司; OVA-17 肽(批号 BP015382) 购自武汉百意欣生物技术有限公司。

1.5 仪器

S888E 超声波雾化器(南京道芬电子有限公司); DHX-50 小动物呼吸机(成都仪器厂); YT-6C 生物组织摊铺机(孝感宏翔生物医械技术有限公司); BE41 光学显微镜(苏州胜视电子设备有限公司); DYY-6C 电泳仪(北京六一仪器厂); YH-C3001 电子天平(五鑫衡器有限公司); TS-2 水平脱色摇床(上海皖宁公司); EASY15 纯水仪(力康生物医疗科技控股有限公司); 12008007 台式离心机(金坛市大地自动化仪器厂); DK-600S 恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司); BC-J160S 细胞培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); 75004250 高速离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);

DS-Ri2 高级分析倒置显微镜(美国 Nikon 公司); MACSQuant Analyzer 流式细胞仪(德国 Miltenyi 公司); Transwell 小室(6.5 mm)、T25 细胞培养瓶(美国 Corning 公司)。

2 方法

2.1 五虎汤的制备

依据朱丹溪《幼科全书》中的药物与剂量配方, 取麻黄 2.4 g、杏仁 6.0 g、生石膏 9.0 g、生甘草 2.4 g、细茶叶 4.8 g, 加入 5 倍量蒸馏水浸泡 30 min, 回流提取 40 min, 滤过, 再加入 5 倍量蒸馏水, 回流提取 40 min, 合并 2 次提取液, 用旋转蒸发仪浓缩成 2.46 kg/L(以生药量计) 原液。原液用作高剂量组, 原液以等体积生理盐水稀释作为中剂量组, 原液以 3 倍体积生理盐水稀释作为低剂量组。

2.2 RSV 诱导哮喘小鼠模型的建立

78 只 BALB/c 小鼠适应性饲养 7 d 后, 随机分为对照组(14 只)和模型组(64 只), 参照课题组前期研究^[9]造模。于实验第 1、2 天, 模型组小鼠鼻腔滴入 0.1 mL RSV (2.4×10^6 PFU/mL), 同时 ip 0.25 mL 1% OVA(以生理盐水配制); 对照组小鼠鼻腔滴入 0.1 mL Hep-2 细胞滴, 同时 ip 等体积生理盐水。自实验第 9 天, 每天 9:00 时将小鼠放入雾化吸入箱中, 模型组给予 1% OVA 雾化以激发哮喘, 对照组给予等体积生理盐水雾化, 隔天 1 次, 每次 30 min, 连续 14 d。

致敏前后每 3 天称定小鼠体质量, 并观察小鼠有无搔鼻、点头样喘息等行为学变化。最后 1 次造模 24 h 后分别从对照组和模型组随机取 4 只小鼠, 进行气道反应性实验。小鼠麻醉后待四肢松弛, 固定消毒, 外科剪开颈部皮肤, 暴露气管, 用静脉留置针行颈静脉穿刺并固定, V 行剪开气管, 予深静脉穿刺针行气管插管, 接小动物呼吸机切开气管插管固定。呼吸机参数调整为呼吸频率为 75 次/min, 潮气量为 8 mL/kg。记录气道压力、气道流量和潮气量的变化。小鼠气道压力稳定后给予 0.1 mL 不同质量浓度(0、6.25、12.50、25.00、50.00 μ g/mL) 乙酰胆碱雾化, 收集吸入乙酰胆碱 5~60 s 的数据, 采用动物肺功能分析软件计算用药后的最大肺阻力, 与对照组比较, 模型组肺阻力显著升高则表明造模成功。

2.3 分组与给药

将造模后的小鼠随机分为对照组、模型组、地塞米松(1.82 mg/kg) 组、雷帕霉素(1 mg/kg) 组、

五虎汤低剂量(1.6 g/kg, 相当于临床 1/2 剂量)组、五虎汤中剂量(3.2 g/kg, 相当于临床等效剂量)组、五虎汤高剂量(6.4 g/kg, 相当于临床 2 倍剂量)组, 每组 10 只。五虎汤组 ig 五虎汤(20 mL/kg), 并 ip 生理盐水; 地塞米松、雷帕霉素组 ip 0.4 mL 相应药物, 并 ig 等体积生理盐水; 对照组和模型组 ig 等体积生理盐水, 并 ip 等体积生理盐水, 1 次/d, 连续 14 d。

2.4 五虎汤对 RSV 小鼠肺泡灌洗液中 IL-17A 和 IL-17F 水平的影响

末次给药后 48 h, 小鼠脱颈椎处死, 分离肌肉, 暴露气管, 在气管上剪一个 T 形口, 插入自制的气管, 注入 1 mL PBS 至肺部组织, 轻揉后吸出, 2500 r/min 离心 10 min, 吸取上清液。按照 IL-17A、IL-17F ELISA 试剂盒说明书检测小鼠肺泡灌洗液中 IL-17A 和 IL-17F 水平。

2.5 五虎汤对 RSV 小鼠肺组织病理的影响

取小鼠肺组织, 将 1 mL 4%多聚甲醛注入气管, 全肺浸泡 4%多聚甲醛 24 h。常规石蜡包埋、切片后进行 HE 染色, 观察肺组织的病理变化。

2.6 五虎汤对 RSV 小鼠肺组织中自噬小体的影响

取小鼠肺组织, 用 2.5%戊二醛缓冲液固定 4 h, 再用 0.1 mol/L 磷酸洗涤 10 min, 重复 3 次。1%锇酸固定 2 h, 梯度乙醇脱水、环氧树脂包埋, 于 30 °C 烘箱中过夜后再于 60 °C 烘箱内放置 12 h, 切片(厚 100 nm)后用醋酸铀、硝酸铅染色, 于透射电镜下观察肺组织中的自噬小体。

2.7 五虎汤对 RSV 小鼠肺组织树突细胞中自噬相关蛋白表达的影响

2.7.1 肺组织中树突细胞的分离 小鼠肺组织剪碎后, 将小鼠肺组织解离成单细胞混悬液, 在 MACS SmartStrainers 中去除细胞团块, 采用 CD11c MicroBeadsUltraPure 分选磁珠从肺单细胞混悬液中分选获得树突细胞。

2.7.2 Western blotting 法检测树突细胞中自噬相关蛋白的表达 树突细胞提取总蛋白, BCA 法测定蛋白质量浓度, 蛋白样本经 SDS-PAGE 电泳, 转至 PVDF 膜, 5%牛奶封闭 1 h, 分别加入 LC3I (1:2000)、LC3II (1:1000)、 β -actin (1:5000) 抗体孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。采用凝胶成像系统成像扫描, 用 Quantity One 软件进行灰度分析。

2.8 树突细胞的分离与鉴定

将 10 只 BALB/c 小鼠脱颈椎处死, 浸泡于 75% 酒精中。于无菌操作台分离小鼠股骨、胫骨, 剥除结缔组织, 暴露髓腔, 用 PBS 缓冲液反复冲洗髓腔, 收集骨髓滤液, 离心后弃上清, 加入红细胞裂解液裂解 2 min, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, PBS 缓冲液洗涤后加入 RPMI 1640 培养基(含 10 ng/mL 重组人粒巨噬细胞集落刺激因子、1 ng/mL 重组人白细胞介素 4、1% FBS、1%双抗), 接种于 6 孔板中培养。第 3 天起每天更换一半培养基, 第 7 天收集细胞, 以 PBS 缓冲液调整树突细胞密度至 1×10^6 个/mL, 加入 CD11cPerCP-Cyanine5.5/APC/PE 抗体, 采用流式细胞仪进样分析。

2.9 五虎汤含药血清的制备与剂量筛选

2.9.1 五虎汤含药血清的制备 将 12 只 SD 大鼠随机分为对照组及五虎汤低剂量(1.1 g/kg, 相当于临床 1/2 剂量)、中剂量(2.2 g/kg, 相当于临床等效剂量)、高剂量(4.4 g/kg, 相当于临床 2 倍剂量)组, 每组 3 只。对照组 ig 生理盐水(10 mL/kg), 各给药组 ig 等体积药物, 2 次/d, 连续 7 d。末次给药后禁食, 各组大鼠腹主动脉取血, 离心取上清液, 血清灭活后滤过, 分别用作空白血清和五虎汤低、中、高剂量含药血清, 于 -80 °C 保存备用。

2.9.2 含药血清最佳剂量的筛选 树突细胞以含 RSV 的 Opti-MEM 培养基培养 24 h, 以 PBS 洗涤后, 随机分为空白血清组和含药血清低、中、高剂量组。各组分别加入 5%、10%、20%、30%含药血清, 孵育 24 h 后采用台盼蓝染色法计算细胞存活率。

2.10 CD4⁺T 细胞分离和 CFSE 标记

3 只 OT2 小鼠脱颈椎处死, 浸泡于 75%乙醇中。于无菌操作台取小鼠脾脏, 研磨过 200 目筛网, 收集滤液, 1500 r/min 离心 5 min, 弃上清。取 4 支 15 mL 离心管, 每管加入 4 mL 小鼠外周血淋巴细胞分离液, 将外周血细胞沉淀加入离心管中, 加入 10 mL PBS 洗涤细胞, 离心 10 min, 弃上清, 滤过后收集滤液, $250 \times g$ 离心 10 min。每 1×10^7 个细胞加入 90 μ L Buffer 溶液(PBS、pH 7.2、0.5%牛血清白蛋白、2 mmol/L EDTA)和 10 μ L CD4 抗体, 于 4 °C 孵育 10 min, 用于免疫磁珠分选。

无菌操作台中, 将分选柱吸附在分选器上, 分选柱下放置 15 mL 离心管, 向分选柱中加入 3 mL Buffer 溶液待其自然滤过, 将分选柱置于 15 mL 离心管中, 向分选柱中加入 5 mL Buffer 溶液, 待所有液体全部

滤下时,使用助推器推下分选柱内残余液体,离心管内液体即为CD4⁺T淋巴细胞悬液。1000 r/min离心5 min,弃上清,加入5 mL PBS洗涤,加入含10% FBS的RPMI 1640培养基重悬细胞悬液,接种于T25细胞培养瓶中。用含0.1% BSA的PBS溶液调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,加入1 μL CFSE储存液,于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育30 min,于冰上孵育5 min,1000 r/min离心5 min,弃上清,重复3次。

2.11 五虎汤对CD4⁺T细胞增殖和T细胞活化标志物CD69表达的影响

“2.8”项中分离的树突细胞以 $1 \times 10^4/\text{孔}$ 接种于Transwell小室下室,“2.10”项中分离的CD4⁺T细胞以 $1 \times 10^5/\text{孔}$ 接种于Transwell小室上室。设置对照组,模型组,五虎汤低、中、高剂量含药血清组,雷帕霉素(10 ng/mL)组,对照组加入完全培养基,其他组加入含RSV的Opti-MEM培养基,培养24 h, PBS洗涤后加入OVA-17肽,培养24 h,构建RSV诱导的树突细胞自噬模型。对照组与模型组加入空白血清,含药血清低、中、高剂量组分别加入20%相应含药血清,雷帕霉素组加入雷帕霉素,培养24 h。收集细胞,分别加入CD4-PE、CD3-APC和CD69-PE/Cy7抗体,流式细胞术分析CD4⁺T细胞的增殖与CD69的表达情况。

2.12 统计分析

实验数据采用SPSS 25.0软件进行统计分析,数据结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组数据比较,满足正态性和方差齐性,用配对 t 检验,多组比较满足正态性和方差齐性的计量资料采用One-way ANOVA,各组间两两比较采用LSD法,方差不齐者用Dunett's检验。

3 结果

3.1 RSV诱导哮喘小鼠模型的验证

与对照组比较,模型组小鼠体重减轻,出现呼吸快、搔鼻、竖毛、耸肩、上肢缩抬、点头样喘息等行为学改变。如表1所示,与对照组比较,吸入不同质量浓度(0、6.25、12.50、25.00、50.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$)乙酰胆碱后,模型组小鼠肺阻力显著增加($P < 0.01$),表明造模成功。

3.2 五虎汤对RSV小鼠肺组织病理变化的影响

如图1所示,对照组小鼠支气管腔壁完整,未见脱落的上皮细胞,支气管黏膜平整,平滑肌无炎性细胞浸润;模型组小鼠支气管腔壁增厚,气道变窄,气道和血管周围有大量的炎症细胞浸润,以

表1 对照组与模型组小鼠肺阻力比较($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 1 Comparison of airway reactivity in mice between control group and model groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

乙酰胆碱/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	肺阻力/ $(\text{cm H}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	
	对照	模型
0	2.13 ± 0.20	2.45 ± 0.19
6.25	3.91 ± 0.40	$11.14 \pm 1.11^{**}$
12.50	6.44 ± 0.72	$15.91 \pm 1.00^{**}$
25.00	9.09 ± 0.83	$21.90 \pm 1.22^{**}$
50.00	12.71 ± 0.69	$29.42 \pm 2.12^{**}$

与对照组比较: $^{**}P < 0.01$

$^{**}P < 0.01$ vs control group

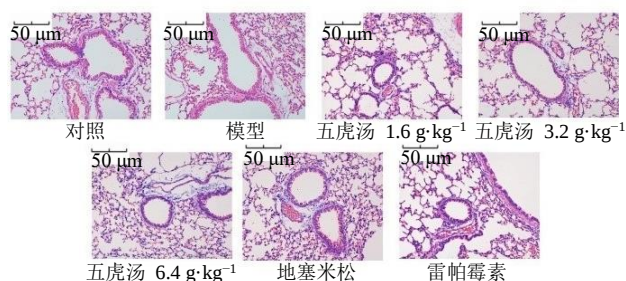


图1 五虎汤对RSV小鼠肺组织病理的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Wuhu Decoction on lung pathology of RSV mice (HE, ×200)

嗜酸粒细胞和中性粒细胞为主;五虎汤各剂量组、地塞米松组、雷帕霉素组小鼠肺组织炎症表现均减轻,支气管腔内可见少量黏液和脱落,炎性细胞浸润较模型组明显减轻。

3.3 五虎汤对RSV小鼠肺组织自噬小体的影响

如图2所示,与对照组比较,模型组、各给药组小鼠肺组织自噬小体增多。

3.4 五虎汤对RSV小鼠肺组织树突细胞中自噬相关蛋白表达的影响

如图3和表2所示,与对照组比较,模型组小鼠树突细胞中LC3II/LC3I蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,五虎汤低、中、高剂量组

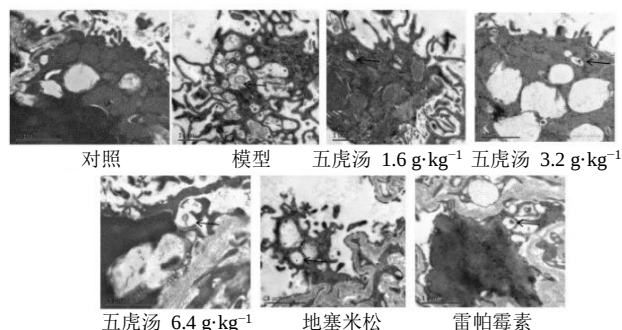


图2 五虎汤对RSV小鼠肺组织自噬小体的影响

Fig. 2 Effect of Wuhu Decoction on pulmonary autophagosome of RSV mice

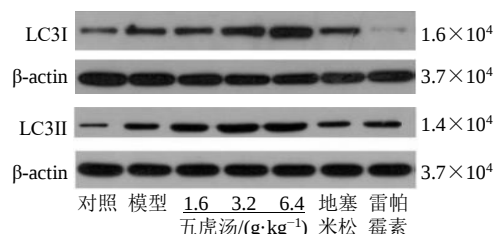


图3 五虎汤对RSV小鼠肺组织树突细胞中LC3I和LC3II蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of Wuhu Decoction on expressions of LC3I and LC3II in dendritic cells in lungs of RSV mice

表2 五虎汤对RSV小鼠肺组织树突细胞中LC3I和LC3II蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Wuhu Decoction on expressions of LC3I and LC3II in dendritic cells in lungs of RSV mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量		
		LC3I	LC3II	LC3II/LC3I
对照	—	0.32 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.26 ± 0.01
模型	—	0.54 ± 0.04**	0.40 ± 0.05**	0.73 ± 0.06**
五虎汤	1.6	0.54 ± 0.01	0.95 ± 0.01 ^{△△}	1.75 ± 0.06 ^{△△}
	3.2	0.85 ± 0.02 ^{△△}	1.29 ± 0.01 ^{△△}	1.51 ± 0.04 ^{△△}
	6.4	1.10 ± 0.02 ^{△△}	1.28 ± 0.01 ^{△△}	1.16 ± 0.02 ^{△△}
地塞米松	0.00 182	0.58 ± 0.03	0.43 ± 0.06	0.74 ± 0.09
雷帕霉素	0.00 100	0.11 ± 0.01 ^{△△}	0.63 ± 0.02 ^{△△}	6.03 ± 0.71 ^{△△}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group

表3 五虎汤对RSV小鼠肺泡灌洗液中IL-17A和IL-17F水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Wuhu Decoction on levels of inflammatory cytokines IL-17A and IL-17F in bronchoalveolar lavage fluid of RSV mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-17A/(ng·L ⁻¹)	IL-17F/(ng·L ⁻¹)
对照	—	58.69 ± 7.65	59.39 ± 6.96
模型	—	182.39 ± 8.30**	140.39 ± 3.11**
五虎汤	1.6	121.46 ± 5.55 ^{△△}	132.53 ± 4.36
	3.2	111.37 ± 7.81 ^{△△}	109.93 ± 10.49 ^{△△}
	6.4	148.13 ± 10.90 ^{△△}	117.80 ± 15.15 [△]
地塞米松	0.00 182	103.13 ± 10.99 ^{△△}	97.00 ± 9.13 ^{△△}
雷帕霉素	0.00 100	86.37 ± 11.69 ^{△△}	87.97 ± 5.36 ^{△△}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group

剂量组 IL-17A 水平显著降低 ($P < 0.01$)。

3.6 树突细胞的分离与鉴定

从小鼠骨髓中分离的树突细胞在培养基中悬浮生长, 培养至第7天, 如图4所示, 镜下可见细胞边缘有树突样突起, 具有典型的树突细胞形态。如图5所示, 从小鼠骨髓中分离培养的树突细胞纯度为99.3%。

3.7 五虎汤含药血清最佳剂量的筛选

如图6所示, 20%五虎汤含药血清对细胞存活率较高, 选取20%含药血清进行后续实验。

和雷帕霉素组小鼠树突细胞中 LC3II/LC3I蛋白表达水平显著增高 ($P < 0.01$)。

3.5 五虎汤对RSV小鼠肺泡灌洗液中IL-17A和IL-17F水平的影响

如表3所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺泡灌洗液中 IL-17A 和 IL-17F 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 地塞米松组、雷帕霉素组、五虎汤中、高剂量组小鼠肺泡灌洗液中 IL-17A 和 IL-17F 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 五虎汤低

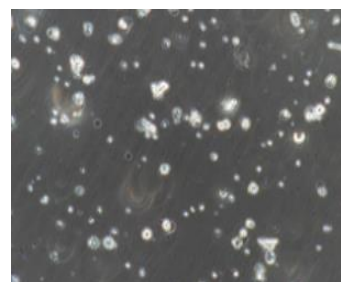


图4 小鼠骨髓来源树突细胞的形态 (×200)

Fig. 4 Morphology of mice bone marrow derived dendritic cells (×200)

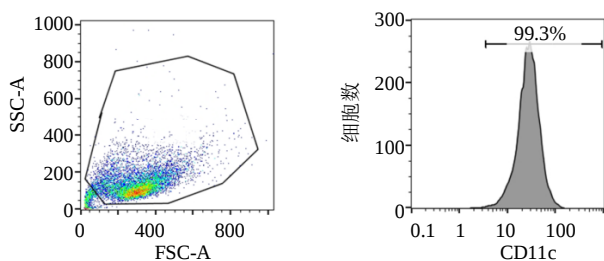
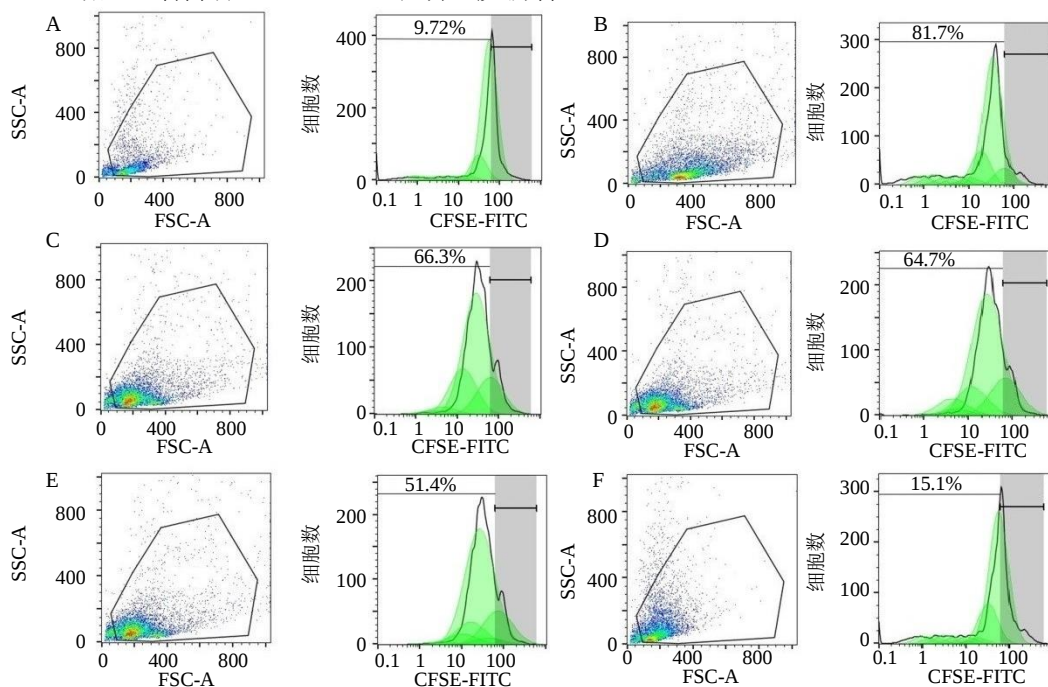


图5 小鼠骨髓来源树突细胞的鉴定

Fig. 5 Identification of mice bone marrow-derived dendritic cells

3.8 五虎汤对 CD4⁺T 细胞增殖和 CD69 表达的影响

如图 7、8 和表 4 所示,与对照组比较,模型组 CD4⁺T 细胞增殖和 T 细胞活化标志物 CD69 表达显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,中、高剂量含药血清组和雷帕霉素组 CD4⁺T 增殖和 CD69 表达显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01),低剂量含药血清组 CD4⁺T 增殖显著降低 ($P<0.01$)。表明五虎汤含

图7 对照组 (A), 模型组 (B), 五虎汤低、中、高剂量含药血清组 (C~E) 和雷帕霉素组 (F) CD4⁺T 细胞的流式结果Fig. 7 Flow results of CD4⁺T cells in control group (A), model group (B), drug-containing serum low, medium, high dose of Wuhu Decoction group (C—E) and rapamycin group (F)

密切相关^[10-11]。抗原的识别与递呈、炎症细胞的趋化、T 细胞的分化及其细胞因子的产生是哮喘炎症反应的重要环节^[12]。树突细胞为肺中最重要的抗原呈递细胞,成熟后可提呈抗原,激活分化初始 T 细胞^[13]。研究表明,哮喘患者的树突细胞与自体 T 细胞共培养促进 T 细胞分泌 IL-4、IL-5、IL-9 和 IL-13,

药血清在体外具有抑制 RSV 诱导的 T 细胞增殖活化的能力。

4 讨论

气道炎症是支气管哮喘重要的发病机制,树突细胞介导的 CD4⁺T 淋巴细胞的增殖活化与气道炎症

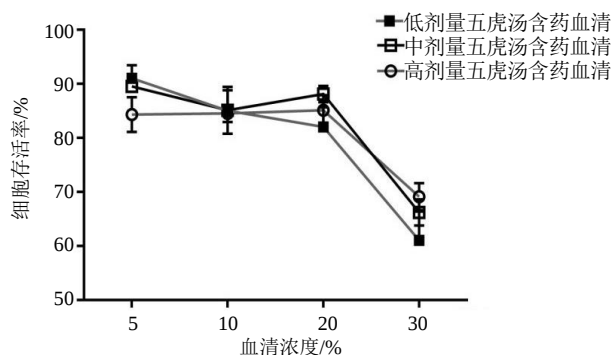


图6 五虎汤含药血清对树突细胞活力的影响

Fig. 6 Effect of drug-containing serum of Wuhu Decoction on dendritic cell activity

提示树突细胞通过影响 T 细胞分泌的炎症因子,诱发气道炎症,从而参与哮喘发病^[14]。自噬是细胞利用溶酶体降解自身物质以适应生存环境的过程,病毒感染诱发机体细胞自噬,机体可通过提高自噬清除病毒^[15]。自噬影响树突细胞的抗原提呈功能,树突细胞摄取、加工提呈抗原需要高水平的内吞和溶

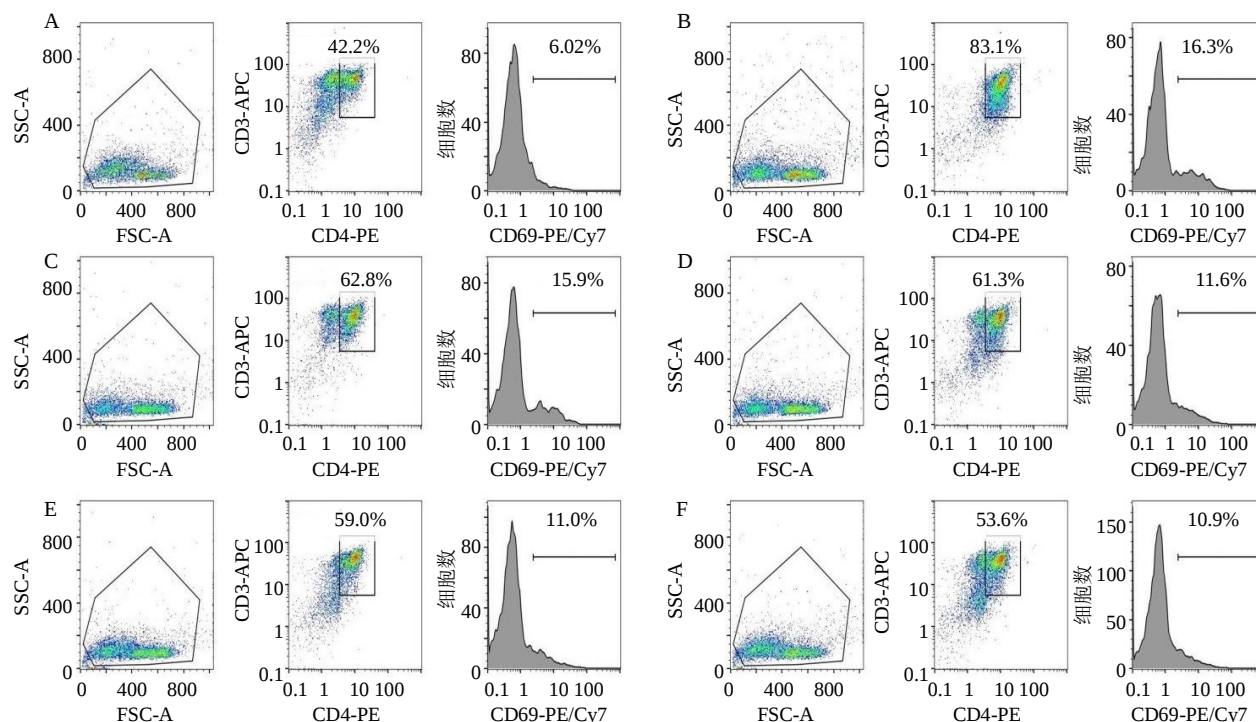


图 8 对照组 (A), 模型组 (B), 五虎汤低、中、高剂量含药血清组 (C~E) 和雷帕霉素组 (F) 的 CD69 表达的流式结果
Fig. 8 Flow cytometry of CD69 expression in control group (A), model group (B), drug-containing serum low, medium, high dose of Wuhu Decoction group (C—E), and rapamycin group (F)

表 4 五虎汤对 CD4⁺T 细胞增殖和 CD69 表达的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Wuhu Decoction on proliferation of CD4⁺T cells and expression of CD69 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	CD4 ⁺ T/%	CD69 相对表达量
对照	9.72±0.22	6.26±0.18
模型	81.70±0.42**	16.73±0.37**
含药血清	66.30±0.54△△	15.57±0.47
	52.40±0.33△△	10.70±0.64△
	54.90±0.29△△	11.67±0.69△
雷帕霉素	18.10±0.40△△	10.63±0.19△△

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: △ $P<0.05$ △△ $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group; △ $P<0.05$ △△ $P<0.01$ vs model group

酶体活性, 树突细胞自噬功能紊乱引起的 T 细胞炎症因子分泌变化可能是哮喘的发病机制之一[16-17]。

五虎汤是治疗儿童哮喘的名方, 由麻黄、杏仁、石膏、甘草、细茶叶组成, 有清肺平喘的功效。本研究采用 RSV 与 OVA 建立哮喘小鼠模型, 以自噬诱导剂雷帕霉素作为阳性对照, 观察五虎汤是否可以通过影响小鼠肺中树突细胞的自噬水平治疗哮喘, 结果表明 RSV 诱导的哮喘小鼠肺部可见炎症细胞浸润, 各给药组小鼠肺部炎症减轻; 模型组小鼠肺树突细胞自噬标志蛋白 LC3II/LC3I 表达水平显著升高 ($P<0.01$), 雷帕霉素和五虎汤组树突细胞的

自噬水平进一步升高 ($P<0.01$), 提示五虎汤可以提高哮喘小鼠肺中树突细胞细胞的自噬水平。

IL-17 是 Th17 细胞分泌的重要细胞因子, 具有募集粒细胞、促进其他炎症细胞因子释放的作用[18-19]。IL-17 参与机体多种炎症与免疫性疾病, 在 RSV 诱导的哮喘小鼠肺组织中 IL-17 水平明显升高[20-21]。IL-17 家族包含 IL-17A~F, IL-17F 与 IL-17A 的同源性达 50%, 二者功能类似[22-23]。IL-17A 可通过促进成纤维细胞和气管上皮细胞释放细胞因子活化中性粒细胞, 并使中性粒细胞在气道募集, 还可促进气管上皮细胞黏蛋白表达, 促进黏液分泌[24]。IL-17F 可刺激支气管上皮细胞促进细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1) 表达, 并刺激 IL-17 分泌使炎症细胞募集, 同时对气道高反应性与气道重塑有重要影响[25-26]。IL-17A 和 IL-17F 通过促进前炎症细胞因子的释放来放大炎症反应, 均可作为 T 细胞诱导炎症反应的早期启动因子, 研究认为 IL-17A 在类风湿性关节炎发病中更为重要, IL-17F 对消化道嗜齿枸橼酸杆菌感染与免疫的机制更为重要[27-28]。本研究结果显示, RSV 诱导的哮喘小鼠肺泡灌洗液中 IL-17A 和 IL-17F 水平均显著升高 ($P<0.01$), 经五虎汤治疗后二者水平均显著降低

($P < 0.05$ 、 0.01)，以五虎汤中剂量为佳，IL-17A 水平的变化较 IL-17F 更为显著，推测在 RSV 诱导的哮喘模型中 IL-17A 可能更适合作为病情变化的指标。

为了进一步研究炎性因子 IL-17A、IL-17F 的变化是否由树突细胞自噬直接介导，体外采用 RSV 感染树突细胞与 T 细胞共培养，发现 $CD4^+$ T 细胞增殖水平和 T 细胞活化标志物 CD69 表达升高，五虎汤含药血清与自噬诱导剂雷帕霉素组 $CD4^+$ T 细胞增殖和 CD69 的表达均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，表明五虎汤可通过作用树突细胞，抑制过度活化增殖的 T 细胞。

综上所述，树突细胞的自噬水平与细胞因子 IL-17A 和 IL-17F 的分泌有关，RSV 可诱导哮喘小鼠肺组织树突细胞自噬水平升高，使 IL-17A、IL-17F 水平上升，介导炎症反应。五虎汤可通过上调 RSV 诱导的哮喘小鼠的自噬水平，进而降低 IL-17A、IL-17F 等炎性细胞因子的表达，改善气道炎症，从而发挥治疗 RSV 诱发哮喘的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- Tesse R, Borrelli G, Mongelli G, et al. Treating pediatric asthma according guidelines [J]. *Front Pediatrics*, 2018, 6(23): 234-236.
- Knudson C J, Varga S M. The relationship between respiratory syncytial virus and asthma [J]. *Vet Pathol*, 2015, 52(1): 97-106.
- Morris S, Swanson M S, Lieberman A, et al. Autophagy-mediated dendritic cell activation is essential for innate cytokine production and APC function with respiratory syncytial virus responses [J]. *J Immunol*, 2011, 187(8): 3953-3961.
- Jyothula S S, Eissa N T. Autophagy and role in asthma [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2013, 19(1): 30-35.
- Ghislat G, Lawrence T. Autophagy in dendritic cells [J]. *Cell Mol Immunol*, 2018, 15(11): 944-952.
- 邓常文, 夏福灿, 姜岩岩, 等. 抑制树突状细胞的自噬改善小鼠哮喘病情 [J]. 第二军医大学学报, 2016, 37(3): 265-272.
- 吕文漪, 王伟, 陈彦. IL-17 家族与哮喘 [J]. 微生物学免疫学进展, 2017, 45(4): 61-64.
- 黄婷, 王孟清, 罗银河, 等. 五虎汤对婴幼儿哮喘患儿外周血树突状细胞表面共刺激分子表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(10): 889-891.
- 帅云飞, 李鑫, 王孟清, 等. 五虎汤对病毒诱发幼年哮喘大鼠炎性细胞因子表达影响 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(1): 145-146.
- Yu H C, Chiang B L. Toll-like receptor 2 ligation of mesenchymal stem cells alleviates asthmatic airway inflammation [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 142(1): 284-287.
- Upham J W, Xi Y. Dendritic cells in human lung disease: Recent advances [J]. *Chest*, 2017, 151(3): 668-673.
- Farrag M A, Almajhdi F N. Human respiratory syncytial virus: Role of innate immunity in clearance and disease progression [J]. *Viral Immunol*, 2016, 29(1): 11-26.
- Cook P C, MacDonald A S. Dendritic cells in lung immunopathology [J]. *Semin Immunopathol*, 2016, 38(4): 449-460.
- 毛光宇, 杨炯, 陈宏斌, 等. 过敏性哮喘患者树突细胞表型及分泌细胞因子的研究 [J]. 中华内科杂志, 2005, 44(3): 206-209.
- Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(10): 722-737.
- Ghislat G, Lawrence T. Autophagy in dendritic cells [J]. *Cell Mol Immunol*, 2018, 15(11): 944-952.
- 邓常文, 夏福灿, 姜岩岩, 等. 抑制树突状细胞的自噬改善小鼠哮喘病情 [J]. 第二军医大学学报, 2016, 37(3): 265-272.
- 周宏斌, 陈志华, 李雯. Th17 细胞及白细胞介素 17A 在慢性气道炎症性疾病中的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(3): 560-564.
- Ranjan A, Biswas S, Mallick B N. Cytomorphometric changes in the dorsal raphe neurons after rapid eye movement sleep deprivation are mediated by noradrenalin in rats [J]. *Behav Brain Funct*, 2010, 6: 62.
- 黄冬梅, 肖红, 谭建新. 白细胞介素 17 及其对哮喘的影响研究进展 [J]. 医学综述, 2012, 18(12): 1835-1837.
- Newcomb D C, Boswell M G, Reiss S, et al. IL-17A inhibits airway reactivity induced by respiratory syncytial virus infection during allergic airway inflammation [J]. *Thorax*, 2013, 68(8): 717-723.
- 刘帅, 余南岚, 向和东, 等. IL-17 与肺部感染性疾病的相关性研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(4): 772-774.
- 许依婷. IL-17A 和 IL-17F 基因多态性与中国中部地区汉族人群哮喘易感的相关研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2016.
- 王熠杰. IL-17A 对哮喘气道嗜酸性粒细胞炎症的影响及其免疫机制研究 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2017.
- Ota K, Kawaguchi M, Matsukura S, et al. Potential involvement of IL-17F in asthma [J]. *J Immunol Res*, 2014, 2014: 602846.
- 隋博文, 翟平平, 李明虎, 等. 射干麻黄汤对急性哮喘小鼠模型 IL-17A 及 IL-17F 表达的影响 [J]. 中医药学报, 2017, 45(4): 53-56.
- Dubin P J, Kolls J K. Interleukin-17A and interleukin-17F: A tale of two cytokines [J]. *Immunity*, 2009, 30(1): 9-11.
- Marwa O S, Kalthoum T, Wajih K, et al. Association of IL17A and IL17F genes with rheumatoid arthritis disease and the impact of genetic polymorphisms on response to treatment [J]. *Immunol Lett*, 2017, 183: 24-36.

[责任编辑 李亚楠]