

# 冬凌草甲素对急性哮喘小鼠 Th17/Treg 细胞平衡的影响

王兴兰 张建勇

**【摘要】 目的** 探讨冬凌草甲素对急性哮喘小鼠辅助性 T 细胞 17/调节性 T 淋巴细胞 (Th17/Treg) 平衡的影响及可能的作用机制。**方法** 将雌性清洁级 BALB/c 小鼠 100 只随机分为 4 组,分别为正常组、模型组、冬凌草甲素 10 mg/kg 干预组(低剂量干预组)和冬凌草甲素 20 mg/kg 干预组(高剂量干预组)四组,每组各 25 只。建立鸡卵清白蛋白(OVA)诱导的急性哮喘模型,造模成功后,低剂量干预组腹腔注射冬凌草甲素 10 mg/kg,高剂量干预组腹腔注射冬凌草甲素 20 mg/kg。正常组以 PBS 代替 OVA 进行致敏、生理盐水代替 OVA 激发。计数支气管肺泡灌洗液(BALF)细胞总数、嗜酸粒细胞百分比;采用 HE 染色对炎症细胞浸润情况及肺组织病理学改变进行观察;ELISA 方法检测气道炎症相关细胞因子 IL-17、IL-22、IL-10、IL-35 的表达水平;AB-PAS 染色后观察粘液物质分泌及气道上皮杯状细胞增生的情况。**结果** 与正常组相比,模型组、干预组的促炎因子表达水平(IL-17 及 IL-22)、气道上皮杯状细胞和粘液物质阳性相对着色面积均明显升高( $P < 0.05$ ),抑炎因子(IL-10、IL-35)表达水平均明显减低( $P < 0.05$ ),差异有统计学意义;与模型组相比,干预组的促炎因子表达水平(IL-17 及 IL-22)、气道上皮杯状细胞和粘液物质阳性相对着色面积均明显降低( $P < 0.05$ ),抑炎因子 IL-10、IL-35 表达水平明显升高( $P < 0.05$ );与低剂量干预组比较,高剂量干预组的促炎因子表达水平(IL-17 及 IL-22)、气道上皮杯状细胞和粘液物质阳性相对着色面积均降低( $P < 0.05$ ),抑炎因子 IL-10、IL-35 表达水平均升高( $P < 0.05$ )。**结论** 冬凌草甲素能减轻急性哮喘小鼠气道炎症反应,可能是通过抑制促炎因子 IL-17、IL-22 分泌及促进抑炎因子 IL-10、IL-35 分泌,从而导致 Th17/Treg 细胞失衡来实现的。

**【关键词】** 冬凌草甲素; 哮喘; Th17/Treg 细胞; 作用机制

[中图分类号]R285.5 [文献标识码]A DOI:10.3969/j.issn.1002-1256.2022.13.001

**Influence of oridonin on Th17/Treg cell balance in acute asthmatic mice** Wang Xinglan, Zhang Jianyong.

Zunyi medical college, Zunyi, Guizhou, 563006, China.

Corresponding author: Zhang Jianyong, Email: zjy9453@Sina.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of oridonin on the balance of T helper 17/regulatory T lymphocytes (Th17/Treg) in acute asthma mice and its possible mechanism of action. **Methods** Female clean-grade BALB/c mice were randomly divided into 4 groups, namely normal group, model group, Rubescensine 10 mg/kg intervention group (low-dose intervention group), and Rubescensine 20 mg/kg intervention group (high-dose intervention group). A chicken ovalbumin (OVA)-induced acute asthma model was established. After successful modeling, the low-dose intervention group was injected with oridonin 10 mg/kg intraperitoneally, and the high-dose intervention group was intraperitoneally injected with oridonin 20 mg/kg. The normal group was sensitized with PBS instead of OVA, and challenged with normal saline instead of OVA. The total number of cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and the percentage of eosinophils were counted. HE staining was used to observe the infiltration of inflammatory cells and pathological changes in lung tissue. ELISA was used to detect airway inflammation-related cytokines IL-17, IL-22, IL-10, and IL-35. After AB-PAS staining, the secretion of mucous substances and the hyperplasia of airway epithelial goblet cells were observed. **Results** Compared with the normal group, the expression levels of pro-inflammatory factors (IL-17 and IL-22), the airway epithelial goblet cells and the positive relative staining area of mucous substances in the model group and the intervention group were significantly increased ( $P < 0.05$ ), the expression levels of anti-inflammatory factors (IL-10, IL-35) were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and the difference was statistically significant. Compared with the model group, the expression levels of pro-inflammatory factors (IL-17 and IL-22) in the intervention group, airway epithelial goblet cells and the positive relative staining area of mucous substances were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and the expression levels of anti-inflammatory factors IL-10 and IL-35 were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the low dose intervention group, the expression levels of pro-inflammatory factors (IL-17 and IL-22), the positive relative staining area of airway epithelial goblet cells and mucous substances in the high-dose intervention group were decreased ( $P < 0.05$ ), and the expression levels of anti-inflammatory factor

IL-10 and IL-35 were increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Rubescensine could reduce the airway inflammatory response of acute asthma mice, which may be by inhibiting the secretion of pro-inflammatory factors IL-17 and IL-22 and promoting the secretion of anti-inflammatory factors IL-10 and IL-35, thereby leading to Th17/Treg cell imbalance.

**【Keywords】** Rubescensine; Asthma; Th17/Treg cell; Mechanism of action

支气管哮喘 (Bronchial Asthma, 简称哮喘) 是由多种炎症细胞及炎症介质参与的慢性气道炎症性疾病, 是全球最常见的慢性呼吸系统疾病之一<sup>[1]</sup>。至今为止, 全球约有 3 亿哮喘患者, 我国约占总人数的 1/3, 哮喘对患者生活质量影响大, 已成为重要的社会公共卫生问题之一<sup>[2]</sup>。哮喘的发病机理复杂, 目前尚未完全明确, 研究表明多种免疫细胞、免疫分子及多条炎症相关的信号通路与疾病的发生发展密切相关<sup>[3]</sup>。其中, 免疫系统异常在哮喘发病机制中扮演了重要的角色<sup>[4]</sup>。自上个世纪 80 年代起, 辅助性 T 细胞 1 型/辅助性 T 细胞 2 型 (Th1/Th2) 细胞失衡学说长期以来被作为哮喘的重要发病机制, 过度应答的 Th2 细胞被认为是哮喘发病的首要因素, Th1 可抑制 Th2 细胞的分化与激活, 在哮喘中起保护作用<sup>[5-6]</sup>。但亦有研究发现, 若将体外大量增殖的 Th1 细胞回输至鸡卵蛋白 (ovalbumin, OVA) 致敏的哮喘大鼠体内, 与对照组相比, 却能显著增强 Th2 细胞介导的气道炎症<sup>[7]</sup>。由此看出, 哮喘的发病机制不能仅归结于 Th1/Th2 的失衡。近年来, 许多学者研究发现哮喘患者体内还存在辅助性 T 细胞 17 (Th17)/调节性 T 淋巴细胞 (Treg 细胞) 平衡, Th17/Treg 细胞的失衡亦为哮喘的重要发病机制<sup>[8]</sup>。Th17 可分泌多种细胞因子, 如白介素 17 (IL-17)、白介素 12 (IL-22)、白介素 23 (IL-23), 其中最为重要的是 IL-17, IL-17 可通过受体介导的信号途径诱导多种细胞产生白介素 8 (IL-8)、白介素-6 (IL-6)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激 (ulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、趋化因子 (chemokines, CXCL) 等细胞因子, 趋化、激活中性粒细胞在局部的浸润<sup>[9]</sup>。调节性 T 细胞 (Regulatory T cells, Treg) 于上世纪 90 年代被发现, 属于可发挥免疫调控效应的 T 淋巴细胞亚群, 可分泌多种抑炎细胞因子如白介素 (IL-10)、白介素 (IL-35) 等, 从而抑制效应 T 细胞的激活, 对自身免疫性、过敏性疾病发挥保护性作用<sup>[10]</sup>。Th17 及 Treg 细胞功能上互相拮抗、分化调控中互相制衡, 共同来维持机体的免疫稳态, 在哮喘中发挥重要作用<sup>[11]</sup>。Th17/Treg 细胞平衡一定程度上反映了机体免疫系统耐受状态, 可作为哮喘免疫失衡的一个重要评价指标<sup>[12]</sup>。

冬凌草甲素是从冬凌草当中提取出的贝壳烯二萜类天然有机化合物, 占冬凌草有效成分的 90% 以

上, 具有抗肿瘤、抗炎、免疫调节等功能<sup>[13]</sup>。陈叶等<sup>[14]</sup>研究表明, 冬凌草甲素可通过调节 Th1/Th2 细胞失衡来抑制哮喘小鼠的气道高反应性及气道炎症。对于冬凌草甲素是否能调节 Th17/Treg 细胞平衡, 目前国内外尚无相关研究报道。本实验旨在研究冬凌草甲素对急性哮喘小鼠 Th17/Treg 细胞平衡的影响以及可能的机制, 为哮喘的诊治提供新的思路。

### 一、材料与方法

1. 实验材料: (1) 实验动物: 清洁级 6-8 周龄雌性 BALB/C 小鼠, 体重 16-20 g, 平均 (18.11±0.66 g), 由重庆第三军医大学实验动物中心提供 [SCXK (渝) 2012-0005]。 (2) 药品与试剂: 冬凌草甲素 (上海士丰生物制品有限公司), OVA (Ⅱ级、Ⅴ级, 美国 Sigma 公司), 氢氧化铝凝胶 (美国 Sigma 公司), 小鼠 IL-17、IL-22、IL-10、IL-35 ELISA 试剂盒 (美国 R&D 公司), 多聚赖氨酸 (北京中杉生物技术有限公司), 阿利辛蓝-过碘酸雪夫 (alcian blue/periodic acid schiff, AB-PAS) 染色试剂盒 (福州迈新生物技术开发有限公司), 二甲亚砷 (北京中杉生物技术有限公司), 4% 多聚甲醛 (庆川东化工有限公司), 无水乙醇、二甲苯、盐酸 (重庆川东化工有限公司)。 (3) 仪器: 压缩式雾化器 NE-C900 (欧姆龙大连有限公司), 自制雾化箱 (长 27 cm×宽 24 cm×高 11 cm), Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件 (美国 Media Cybernetics 公司), Multiskan spectrum 酶标仪 (美国 Thermo scientific 公司)。

2. 方法: (1) 急性哮喘模型的建立: 分别于实验第 1 天、第 13 天, 腹腔 (40 μg OVA+1 mg 氢氧化铝) 联合皮下 (20 μg OVA+1 mg 氢氧化铝) 注射致敏。第 19-23 天, 将小鼠放于自制雾化箱内, 以超声雾化器进行雾化, 10% OVA 盐水气溶胶吸入激发, 每天 1 次, 每次 30 分钟, 末次激发 24 小时后处死小鼠。 (2) 分组给药: 将清洁级雌性 BALB/c 小鼠随机分为正常组、模型组、冬凌草甲素 10 mg/kg 干预组 (低剂量干预组) 和冬凌草甲素 20 mg/kg 干预组 (高剂量干预组) 四组, 每组各 25 只。实验组: 致敏过程同模型组, 低剂量干预组及高剂量干预组分别于激发前 30 分钟腹腔注 10 mg/kg 及 20 mg/kg 冬凌草甲素。正常组: 致敏过程以磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 代替 OVA 腹腔联合皮下注射, 以生理盐水雾化吸入激发, 相关参数与模型组相同。

(3)肺组织病理学观察:制备肺组织石蜡切片,进行苏木素-伊红染色(HE 染色),参照 Henderson 等<sup>[26]</sup>方法完成气道炎症细胞浸润评分。见表 1。(4)肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)细胞总数及白细胞分类计数:取小鼠 BALF 10 μl,予 2%冰醋酸进行破膜处理后,滴于细胞计数板,低倍镜下按照细胞计数原则在计数板 4 个大方格,16 个小方格内计数,计算公式为细胞总数 =  $n/4 \times 10^4/L$  ( $n$  = 四个大方格内的白细胞总数)。计数后将剩余的 BALF 离心(4 ℃, 1200 r/min, 10 分钟);吸取出离心后的 BALF 上清液,留取 50 μl BALF 和沉淀用移液器将细胞充分混匀,再取其中 20 μl 进行涂片后行瑞氏吉姆萨染色,单盲法在油镜下计数 200 个细胞,分类计数各组嗜酸粒细胞所占百分比。(5)用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定细胞因子 IL-17、IL-10、IL-22、IL-35 的表达水平:按照试剂盒说明书完成操作(①试剂盒室温平衡 20 min 取出所需板条,②标准品的稀释与加样,③温育,④

加酶,⑤再温育,⑥显色,⑦终止),最后用全波长酶标仪于 450 nm 处测量各孔的吸光度,绘制标准曲线,计算 IL-17、IL-22、IL-10、IL-35 的表达水平。(6)气道组织 AB-PAS 染色:按照试剂盒说明书完成操作(①验组织切片脱蜡至水,蒸馏水水洗 2 分钟。②阿利新蓝染色液染色 15 分钟。③蒸馏水洗 3 次,每次 2 分钟。④放入过碘酸溶液中进行氧化 5 分钟。⑤ Schiff Reagent 浸染 18 分钟。⑥ 倾去 Schiff Reagent,流水冲洗 10 分钟。⑦用酸性酒精分化 5 秒,充分水洗。⑧用 Scott 蓝化液反蓝 30 秒,水洗 3 分钟。⑨逐级常规乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封固),分别用正常组小鼠脾脏、大肠作为阴性和阳性对照。

3.统计学处理:使用 SPSS 17.0 软件,根据资料属性对各组数据完成统计,以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两样本均数比较采用独立样本  $t$  检验;多样本均数比较采用单因素方差分析进行检验,方差齐者使用 LSD 检验,方差不齐者使用 Dunnett's T3 检验。

表 1 气管周围炎症细胞浸润评分

炎症浸润程度	无炎症细胞浸润	少许炎症细胞浸润	分布不均的较多炎症细胞浸润	出现大量炎性细胞,偶有成团	大量炎性细胞浸润并聚集成团
得分	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分

## 二、结果

1.HE 染色病理学改变:正常组:肺组织形态正常,支气管壁与肺泡壁结构清晰、完整,气管平滑肌及基底层无增厚,管腔通畅,黏膜上皮完整无脱落,无明显炎症反应。模型组:气管、血管周围以嗜酸粒细胞浸润为主,肺间质可见炎症细胞浸润,气道上皮细胞及杯状细胞增生,黏膜脱落不完整。干预组:支气管壁、肺泡壁结构较完整,气道上皮见少量杯状细胞增生,支气管及血管周围炎症细胞浸润程度较模型组减轻,且高剂量干预组较低剂量干预组减轻更为明显。支气管周围炎症细胞浸润评分结果:干预组较模型组明显降低,但高于正常组;低剂量干预组高于高剂量干预组,以上组间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果见图 1(附图 ABCD),表 2。

表 2 各组急性哮喘小鼠支气管周围炎症的病理评分比较

组别	气道数( $n$ )	支气管周围炎症细胞浸润( $\bar{x} \pm s$ , 分)
正常组( $n = 25$ )	25	0.41±0.14
模型组( $n = 25$ )	25	3.34±0.27 <sup>#</sup>
低剂量干预组( $n = 25$ )	25	2.02±0.23 <sup>*</sup>
高剂量干预组( $n = 25$ )	25	1.84±1.10 <sup>**</sup>

注:与正常组相比较,<sup>#</sup>、<sup>\*</sup>、<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup>、<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ ;与低剂量组比较,<sup>\*\*</sup>  $P < 0.05$

2. BALF 细胞总数及白细胞分类计数:正常组: BALF 细胞总数少,白细胞分类计数以单核细胞为主。模型组: BALF 细胞总数显著增加,细胞分类计数以嗜酸粒细胞、中性粒细胞为主,白细胞总数、嗜酸性粒细胞百分比均较正常组明显增多,两组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。干预组 BALF 细胞总数、嗜酸性粒细胞及中性粒细胞细胞百分比较模型组明显减低( $P < 0.05$ ),较正常组增加( $P < 0.05$ )。低剂量干预组 BALF 的细胞总数、嗜酸性粒细胞百分比高剂量干预组高( $P < 0.05$ )。见表 3。

3. BALF 测定 IL-17、IL-22、IL-10、IL-35 表达水平:模型组及干预组中 IL-17、IL-22 表达水平较正常组高;IL-10、IL-35 表达水平较正常组低( $P < 0.01$ )。干预组 IL-17、IL-22 较模型组低,IL-10、IL-35 表达水平较模型组高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。低剂量干预组 IL-17、IL-22 较高剂量干预组高,IL-10、IL-35 表达水平较高剂量干预组低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 4。

4.阿利辛蓝-过碘酸雪夫(alcian blue/periodic acid schiff, AB-PAS)染色检测气道黏液物质分泌情况:正常组小鼠的气道组织偶见少许杯状细胞,几乎无黏液分泌。模型组及干预组气道黏液物质染色阳性相对面积均较正常组显著增高( $P < 0.01$ )。干预组



气道黏液物质染色阳性相对面积均较模型组明显减少( $P<0.01$ )。低剂量干预组气道黏液物质染色阳性

相对面积较高剂量干预组增高( $P<0.01$ )。见表 5, 图 2(附图 A-F)。

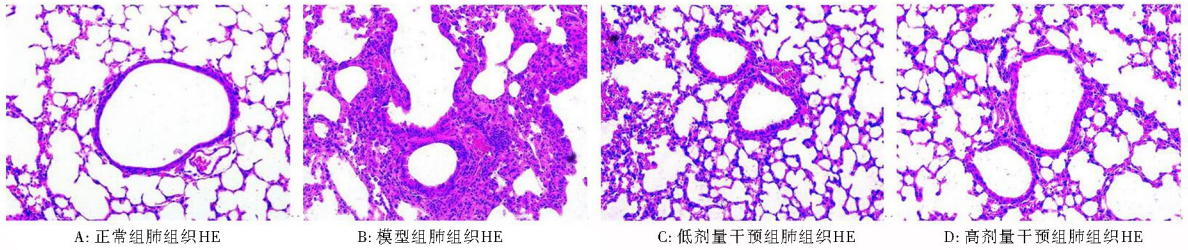


图 1 各组小鼠 HE 染色病理改变

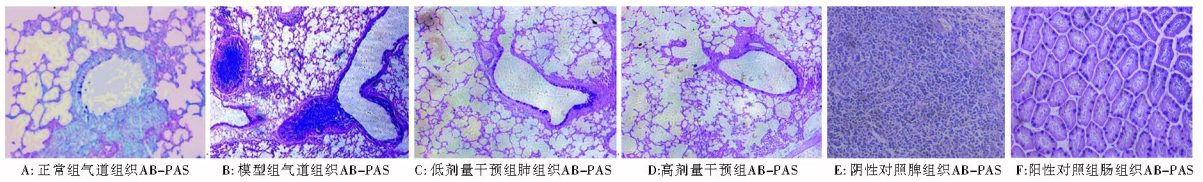


图 2 AB-PAS 染色观察气道黏液物质的分泌情况

表 3 各组急性哮喘小鼠 BALF 的细胞总数及细胞分类计数的变化( $\bar{x}\pm s$ )

组别	细胞总数 ( $\times 10^4/ml$ )	白细胞分类计数百分比(%)			
		嗜酸粒细胞	单核细胞	淋巴细胞	中性粒细胞
正常组( $n=25$ )	21.46 $\pm$ 4.90	0.75 $\pm$ 2.45	78.22 $\pm$ 8.75	17.31 $\pm$ 5.09	5.00 $\pm$ 4.74
模型组( $n=25$ )	104.09 $\pm$ 17.42 <sup>a</sup>	23.00 $\pm$ 3.35 <sup>a</sup>	35.00 $\pm$ 4.36 <sup>a</sup>	21.3 $\pm$ 4.85 <sup>a</sup>	25.63 $\pm$ 4.24 <sup>a</sup>
低剂量干预组( $n=25$ )	76.13 $\pm$ 10.2 <sup>b</sup>	16.29 $\pm$ 6.18 <sup>b</sup>	47.86 $\pm$ 3.91 <sup>b</sup>	14.86 $\pm$ 3.18 <sup>b</sup>	23.38 $\pm$ 4.85 <sup>b</sup>
高剂量干预组( $n=25$ )	53.80 $\pm$ 10.20 <sup>c</sup>	13.86 $\pm$ 2.23 <sup>c</sup>	49.43 $\pm$ 5.23 <sup>c</sup>	15.4 $\pm$ 2.82 <sup>c</sup>	21.57 $\pm$ 4.07 <sup>c</sup>

注:与正常组比较,<sup>a、b、c</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>b、c</sup> $P<0.01$ ;与低剂量干预组比较,<sup>c</sup> $P<0.01$

表 4 各组急性哮喘小鼠 BALF 的 IL-10、IL-35、IL-17 及 IL-22 含量的变化( $\bar{x}\pm s$ , pg/ml)

组别	IL-17	IL-22	IL-10	IL-35
正常组( $n=25$ )	27.7 $\pm$ 3.06	17.74 $\pm$ 1.46	320.22 $\pm$ 11.13	2.97 $\pm$ 0.44
模型组( $n=25$ )	51.15 $\pm$ 3.68 <sup>d</sup>	38.84 $\pm$ 4.16 <sup>d</sup>	260.96 $\pm$ 7.79 <sup>d</sup>	0.81 $\pm$ 0.16 <sup>d</sup>
低剂量干预组( $n=25$ )	45.02 $\pm$ 2.20 <sup>e</sup>	32.84 $\pm$ 3.42 <sup>e</sup>	280.00 $\pm$ 13.08 <sup>e</sup>	1.26 $\pm$ 0.28 <sup>e</sup>
高剂量干预组( $n=25$ )	40.33 $\pm$ 3.27 <sup>f</sup>	27.85 $\pm$ 3.72 <sup>f</sup>	296.66 $\pm$ 12.09 <sup>f</sup>	1.71 $\pm$ 0.45 <sup>f</sup>

注:与正常组比较,<sup>d、e、f</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>e、f</sup> $P<0.05$ ,与低剂量干预组比较,<sup>f</sup> $P<0.01$

表 5 各组小鼠气道的上皮杯状细胞及黏液物质阳性相对着色面积( $\bar{x}\pm s$ , %)

组别	气道组织黏液物质阳性相对着色面积
正常组( $n=25$ )	0.45 $\pm$ 0.11
模型组( $n=25$ )	37.82 $\pm$ 7.26 <sup>g</sup>
低剂量干预组( $n=25$ )	26.54 $\pm$ 4.71 <sup>h</sup>
高剂量干预组( $n=25$ )	19.44 $\pm$ 3.02 <sup>j</sup>

注:与正常组比较,<sup>g、h、j</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>h、j</sup> $P<0.05$ ;与低剂量干预组比较,<sup>j</sup> $P<0.01$

**讨论** 哮喘是一种以气道炎症、气道阻塞、气道高反应性为主要特征的异质性疾病。目前认为多种免疫细胞、免疫分子及多条炎症相关信号通路参与了哮喘的发生与发展,其中 T 淋巴细胞介导的免疫反应对哮喘炎症的引发和扩增起关键作用<sup>[15]</sup>。

Th1/Th2 失衡通过调节细胞因子的产生而在哮喘气道炎症中发挥作用的机制已得到广泛认可<sup>[14]</sup>。Th17、Treg 细胞为不同于 Th1、Th2 的两个 T 细胞群体亚群, Th17、Treg 细胞均由初始的 CD4<sup>+</sup> T 细胞分化而来,在功能上相互拮抗,共同维系着机体的免疫稳态<sup>[16]</sup>,研究认为 Th17/Treg 平衡学说可能是 Th1/Th2 平衡学说的重要补充<sup>[17]</sup>。Th17/Treg 失衡在过敏、感染、肿瘤及自身免疫损伤等病理过程中发挥重要作用<sup>[13]</sup>。深入研究 Th17/Treg 细胞平衡可进一步揭示哮喘的发病机制,为哮喘的治疗提供新的思路。

既往研究显示冬凌草甲素具有抗肿瘤、抗增值、抗炎和抗病毒等作用<sup>[18]</sup>。冬凌草甲素在我国治疗炎症性疾病已有数百年的历史,是我国临床使用最广泛的中草药之一。有研究指出,冬凌草甲素可通

过调节 Th1/Th2 细胞平衡减轻哮喘小鼠气道炎症及气道高反应性<sup>[14]</sup>,而冬凌草甲素是否能调节 Th17/Treg 细胞平衡而减轻气道炎症,目前国内外均无相关报道。本实验通过两种不同剂量的冬凌草甲素干预 OVA 诱导的急性哮喘小鼠,计数 BALF 细胞总数、嗜酸粒细胞百分比,观察肺组织病理学改变、炎症细胞浸润情况,检测气道炎症相关细胞因子 IL-17、IL-22、IL-10、IL-35 表达水平,观察气道上皮杯状细胞增生及黏液物质分泌情况。本实验结果得出,不同剂量的冬凌草甲素均可抑制促炎因子 IL-17、IL-22 及促进抑炎因子 IL-10、IL-35 的分泌,从而减轻哮喘小鼠气道炎症,且高剂量干预组效果优于低剂量组。IL-17、IL-22 主要由 Th17 细胞分泌,IL-10、IL-35 主要由 Treg 细胞分泌,我们推测冬凌草甲素可能通过影响 IL-17、IL-22、IL-10、IL-35 等细胞因子,从而调节 Th17/Treg 细胞平衡发挥抗炎作用。众所周知,地塞米松是治疗哮喘非常有效的药物,因此本实验在设立实验组时,应增加地塞米松干预组,便可以对比冬凌草甲素干预组和地塞米松干预组对哮喘小鼠气道影响作用的大小,从而更好地判断冬凌草甲素对哮喘小鼠气道炎症的影响是否显著。另外本实验仅研究了两种不同浓度冬凌草甲素对哮喘小鼠气道炎症的影响,未涉及多个浓度,那么冬凌草甲素对其影响的程度跟浓度具体的相关性还有待进一步研究,因此继续深入研究冬凌草甲素对急性哮喘 Th17/Treg 细胞平衡的影响或将为哮喘的治疗提供新的思路。

#### 参 考 文 献

- [1] Mishra V, Banga J, Silveyra P. Oxidative stress and cellular pathways of asthma and inflammation; Therapeutic strategies and pharmacological targets[J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 181: 169-182.
- [2] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(2016年版)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2016, 39(9): 16.
- [3] Barcik W, Boutin RCT, Sokolowska M, et al. The Role of Lung and Gut Microbiota in the Pathology of Asthma[J]. *Immunity*, 2020, 52(2): 241-255.
- [4] Zhang Q, Wang LR, Chen BH, et al. Propofol inhibits NF-kappa B

- activation to ameliorate airway inflammation in ovalbumin(OVA)-induced allergic asthma mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 51: 158-164.
- [5] Diao M, Min J, Guo F, et al. Effects of salbutamol aerosol combined with magnesium sulfate on T-lymphocyte subgroup and Th1/Th2 cytokines of pediatric asthma[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(1): 117-120.
- [6] Wang J, Li F, Ding J, et al. Investigation of the anti asthmatic activity of Oridonin on a mouse model of asthma[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(3): 2000-2006.
- [7] Ihn H, Dong HK, Sangseok OH, et al. Identification of a Th17 cell-specific gene induced during Th17 differentiation[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2014, 75(11): 2138-2141.
- [8] Yang CH, Tian JJ, Ko WS, et al. Oligo-fucoidan improved unbalance the Th1/Th2 and Treg/Th17 ratios in asthmatic patients: An ex vivo study[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(1): 3-10.
- [9] Yasuda K, Takeuchi Y, Hirota K. The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases[J]. *Semin Immunopathol*, 2019, 41(3): 283-297.
- [10] 李二威. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞分泌的 IL-10、IL-35 在过敏性哮喘中作用机制的初步研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2015.
- [11] Wang YC, Liu MJ, Zhu GY, et al. Significance of Th17/Treg imbalance in children with primary immune thrombocytopenia[J]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 2016, 18(3): 238-242.
- [12] Gap L. The Balance of Th17 versus treg cells in autoimmunity[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 730-744.
- [13] Ding Y, Ding C, Ye N, et al. Cheminform abstract: discovery and development of natural product oridonin - inspired anticancer agents[J]. *Euro J Med Chem*, 2016, 122(43): 102-117.
- [14] 陈叶, 胡智立, 贺守第, 等. 冬凌草甲素对急性哮喘小鼠 Th1 细胞/Th2 细胞平衡的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(7): 651-653.
- [15] Liang P, Peng S, Zhang M, et al. Huai Qi Huang corrects the balance of Th1/Th2 and Treg/Th17 in an ovalbumin-induced asthma mouse model [J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(6): BSR20171071.
- [16] Zou XL, Chen ZG, Zhang TT, et al. Th17/Treg homeostasis, but not Th1/Th2 homeostasis, is implicated in exacerbation of human bronchial asthma[J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2018, 14: 1627-1636.
- [17] Fasching P, Stradner M, Graninger W, et al. Therapeutic potential of targeting the Th17/Treg axis in autoimmune disorders [J]. *Molecules*. 2017 Jan 14; 22(1): 13-37.
- [18] Yang H, Gao Y, Fan X, et al. Oridonin sensitizes cisplatin-induced apoptosis via AMPK/Akt/mTOR - dependent autophagosome accumulation in A549 cells[J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 769.

(收稿日期: 2022-03-28)