DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.11.015

射干麻黄汤“鼻肺同治”调控T淋巴细胞改善小鼠气道高反应的免疫机制

赵竞一,闫新宇,王曼,郭苏影,董寒毅,王俊阁
(首都医科大学附属北京中医医院,北京 100010)

摘要:目的 观察射干麻黄汤对气道高反应(AHR)小鼠模型上、下气道T淋巴细胞亚群的影响,分析其“鼻肺同治”控制AHR的生物学基础。方法 采用T细胞β受体基因敲除小鼠提纯γδT细胞;采用卵清蛋白气道致敏的AHR模型小鼠,平均随机分为正常对照组(Ctrl组)、气道高反应模型组(AHR组)、过继免疫γδT细胞组(AIT组)、射干麻黄汤干预组(SGMHD组)、射干麻黄汤+过继免疫组(SMA组),AIT组予以每日γδT细胞尾静脉注射,SGMHD组予以每日射干麻黄汤灌胃,SMA组予以每日γδT细胞尾静脉注射联合射干麻黄汤灌胃,干预7 d。观察各组小鼠鼻黏膜和肺组织中T淋巴细胞亚群标志物干扰素-γ(IFN-γ)、白细胞介素-4(IL-4)、视黄酸相关孤儿受体γt(RORγt)、叉头状转录因子P3(FoxP3)及γδT细胞受体(γδTCR)分布情况,外周血Th1、Th2、Th17、Treg、γδT细胞及其细胞因子的表达水平。结果 与Ctrl组相比,AHR组鼻黏膜和肺组织中IFN-γ、IL-4、FoxP3、RORγt、γδTCR表达较高,外周血Th2、Th17、γδT细胞比例较高,IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-5及IL-17浓度均较高,IL-10、TGF-β则表达较低;与AHR组相比,AIT组、SGMHD组及SMA组鼻黏膜IFN-γ、IL-4、RORγt、γδTCR表达较低,肺组织IL-4、γδTCR较低,外周血Th1比例较高,Th17、γδT较低,SGMHD组和SMA组IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-5及IL-17浓度较低,IL-10、TGF-β较高。结论 明确了射干麻黄汤“鼻肺同治”改善AHR模型小鼠的作用,其机制与全面调控T淋巴细胞亚群有关。研究为揭示射干麻黄汤治疗AHR作用机制、促进临床应用奠定基础。

关键词:射干麻黄汤;气道高反应;气道炎症;T淋巴细胞;细胞因子
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)11-0064-05

Immunological Mechanism of Shegan Mahuang Decoction(射干麻黄汤) in Modulating T Lymphocytes to Improve Airway Hyperresponsiveness in Mice through Simultaneous Treatment of Nose and Lung

ZHAO Jingyi, YAN Xinyu, WANG Man, GUO Suying, DONG Hanyi, WANG Junge
(Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100010, China)

Abstract: *Objective* To observe the effect of Shegan Mahuang Decoction(射干麻黄汤) on T lymphocyte subsets in upper and lower airways of airway hyperresponsiveness(AHR) mice, and analyze the biological basis of simultaneous treatment of nose and lung in AHR treatment. *Methods* Gammadelta(γδ) T cells were purified from beta T receptor knockout mice. AHR model mice sensitized with ovalbumin were randomly attributed into normal control group(Ctrl), AHR group(AHR), γδ T cells adoptive immunization group(AIT), Shegan Mahuang Decoction group(SGMHD), Shegan Mahuang Decoction and adoptive immunization group(SMA). AIT group was injected γδ T cells via tail vein daily, SGMHT group was given Shegan Mahuang Decoction daily by gavage, and SMA group was given daily γδ T cell tail vein injection combined with Shegan Mahuang Decoction by gavage for 7 days. T lymphocyte subsetsmarkers in nasal mucosa and lung of mice were detected, including interferon-γ(IFN-γ), interleukin-4(IL-4), retinoic acid related orphan receptor γt(RORγt), forkhead transcription factor P3(Fox P3) and γδ T cell receptor(γδ TCR). The ratios of Th1, Th2, Th17, Treg and γδT cells, and the corresponding cytokines in peripheral blood were also measured. *Results* The results showed that compared with those in the Ctrl group, the expressions of IFN-γ, IL-4, FoxP3, RORγt and γδ TCR of nasal mucosa and lung were higher in AHR group, with higher proportions of Th2, Th17 and γδ T cells, higher concentrations of IL-2, IL-4, IL-5 and IL-17, and lower concentrations of IL-10 and TGF-β. Compared with those in the AHR group, the expressions of IFN-γ, IL-4, FoxP3, RORγt and γδ TCR of nasal mucosa were lower in the AIT, SGMHD

基金项目:国家自然科学基金项目(82174448,82374529);北京市自然科学基金面上项目(7222269)
作者简介:赵竞一(1989-),男,山东潍坊人,主治医师,硕士,研究方向:经方治疗气道变态反应性疾病。
通讯作者:王俊阁(1967-),男,河北沧州人,主任医师、教授,博士研究生导师,博士,研究方向:经方治疗气道变态反应性疾病。E-mail:wangjunge@bjzhongyi.com。

and SMA groups, with lower levels of IL-4 and γδ TCR in lung, higher ratio of Th1 and lower ratios of Th17 and γδ T cells in peripheral blood. The levels of IL-2, IL-4, IL-5 and IL-17 of SGMHT and SMA groups were lower expressed, however the levels of IL-10 and TGF-β were higher. *Conclusion* The study clarified the effect of Shegan Mahuang Decoction on AHR mice through simultaneous treatment of nose and lung. The underlying mechanism was related to the comprehensive regulation of T lymphocyte subsets. The study laid a foundation for revealing mechanisms of Shegan Mahuang Decoction in the treatment of AHR and promoting its clinical practice.

Keywords: Shegan Mahuang Decoction (射干麻黄汤); airway hyperresponsiveness; airway inflammation; T lymphocytes; cytokines

气道高反应(airway hyper reactivity, AHR)是变应性鼻炎、变应性哮喘、急/慢性支气管炎和新型冠状病毒感染等多种气道过敏性、感染性疾病的共同病理生理特征[1-2],以过敏原或其他病原体刺激时出现气道过度收缩为主要表现,引发咳嗽、喘息及呼吸困难等症状,严重时危及患者生命。AHR 常伴有气道重塑等不可逆性改变,可诱发阻塞性肺气肿、肺纤维化等严重呼吸系统疾病[3],故控制 AHR 是治疗气道过敏性和感染性疾病的重要环节。AHR 发生机制十分复杂,研究发现辅助性 T 细胞 1 型(T helper 1, Th1)/辅助性 T 细胞 2 型(T helper 2, Th2)、辅助性 T 细胞 17 型(T helper 17, Th17)/调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)免疫失衡是 AHR 发病机制中的主要环节[4-5]。我们的前期研究[6-7]表明,贯通固有免疫和适应性免疫进程的 γδT 细胞对呼吸道黏膜具有重要的免疫监视和维护稳态作用,在呼吸道黏膜受刺激或损伤的情况下,γδT 细胞激活并产生多种细胞因子如白细胞介素(interleukin, IL)、干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)及转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)等,调控 Th1/Th2 和 Treg/Th17 免疫反应,促进气道损伤。

中医古籍中虽无关于“气道高反应”的记载,但从其发病特点来看,AHR 宜属于“哮证”范畴,病位在肺,与脾肾相关。病因以痰为主,平素痰伏于肺,发时痰气搏结、肺失宣降、壅阻气道,加之脾失健运、继而痰浊内生,上干于肺,发为“哮证”。《金匮要略·肺痿肺痈咳嗽上气病脉证治第七》载:“咳而上气,喉中水鸡声,射干麻黄汤主之。”射干麻黄汤是临床治疗咳喘的常用方,也是治疗 AHR 的重要方剂[8]。现代药理学研究也表明射干麻黄汤具有解痉平喘、减轻气道炎症反应的作用[9-11]。本研究通过实验观察射干麻黄汤对 AHR 模型小鼠上、下气道淋巴细胞及其细胞因子的影响,分析射干麻黄汤“鼻肺同治”控制 AHR 的现代生物学基础。

1 实验材料

1.1 实验动物

敲除 T 细胞 β 受体基因(T cell receptor beta knock out, TCRβ-KO)的雄性 C57BL/6 小鼠 5 只,购自上海南方模式生物科技股份有限公司,目录号 NM-KO-190437。SPF 级 6 周大小雄性健康 C57BL/6 小鼠(体质量 18 ~ 20 g)40 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,试验动物许可证号 SYXK(京)2022-0015。所有小鼠在试验前适应性饲养 1 周,给予自由进食及饮水,温度范围 23 ~ 26 ℃,相对湿度 50% ~ 70%,12 h 光亮/黑暗循环。

1.2 主要仪器设备

ELx800 全自动酶标仪(BioTek);FACSCalibur 流式细胞仪(BD Biosciences);Benchmark XT 全自动免疫组化仪(Roche);Allegra X-15R 离心机(Beckman);HistoCore PEGASUS 组织脱水机、HistoCore Arcadia 包埋机、HistoCore BIOCUT 切片机(Leica);ECLIPSE Si 正置显微镜(上海尼康精机有限公司);DHG-9140A 鼓风干燥箱(上海一恒公司)。

1.3 药物与试剂

中药饮片射干、细辛、五味子、紫菀、款冬花、姜半夏、大枣购自首都医科大学附属北京中医医院药事部。

小鼠 TCRγ/δ$^+$T 细胞分离试剂盒(批号 5801254120),德国 miltenyi 公司;卵清蛋白(OVA,批号 85907798),氢氧化铝(批号 74525124),美国 Sigma 公司;IL-4(批号 9365301)、IL-10(批号 8487472)、IL-17(批号 9484202)、IL-23(批号 9095944)、TNF-α(批号 8910411)、IFN-γ(批号 8330300)、TGF-β1(批号 8576699)ELISA 试剂盒、鼠单抗 CD4 PerCP-Cy5.5(批号 17088756)及鼠单抗 CD8 PE-Cy7(批号 19752857),IL-4 APC(批号 27235041)、IFN-γ FITC(批号 18708171)、IL-17 PE(批号 32387275)、FoxP3 PE-Cy5(批号 11322232),美国 ThermoFisher 公司;RPMI1640 培养基(批号 31800022),GIBCO 公司;佛波酯/莫能霉素混合物(批号 212521257),中国联科生物;鼠 T 淋巴细胞亚群抗体 Cocktail(批号 7752962),美国 BD 公司;鼠单抗 γδ-TCR 抗体(批号 1330048),美国 ImmunoTech 公司;RORγt(批号 540964)、FoxP3(批号 315693)、CD3 FITC(批号 745694)、γδTCR(批号 948037)抗体,中国 Abcam 公司。

2 实验方法

2.1 射干麻黄汤水煎剂制备

射干麻黄汤药用:射干 9 g,麻黄 9 g,细辛 6 g,五味子 9 g,紫菀 9 g,款冬花 9 g,姜半夏 9 g,大枣 10 g,生姜 9 g。上述剂量饮片置于烧瓶内加蒸馏水浸泡 30 min,再加蒸馏水没过饮片 3 cm,电热套煮沸后继续煎煮 20 min,用 4 层无菌纱布过滤药液;加入蒸馏水至没过饮片,电热套煮沸后继续煎煮 15 min,用 4 层无菌纱布过滤药液。合并两次过滤药液,小火浓缩至 100 mL,4 ℃冷藏备用。使用射干麻黄汤期间每 7 d 制备一次。

2.2 动物分组、干预及采样

2.2.1 过继免疫 γδT 细胞悬液制备 TCRβ-KO 小鼠以 2% 戊巴比妥钠麻醉后剥离脾脏,置 200 目滤网上,使用注射器针芯轻柔研磨、过滤,室温 1500 r/min、离心半径为 10 cm 离心 10 min 后弃上清,裂解红细胞,PBS 重复洗涤细胞,得到脾脏单细胞悬液。采用 TCRγ/δ$^+$T 细胞分离试剂盒分选出小鼠脾脏 γδT 细胞,调整细胞浓度在 2×10^5 ~ 1×10^6/mL,备用。

2.2.2 动物造模及样本采集 健康小鼠按体质量区组后使用 Excel 软件随机分为正常对照组(Ctrl 组)、气道高反应模型组

(AHR 组)、过继免疫 γδT 细胞组(AIT 组)、射干麻黄汤干预组(SGMHD 组)、射干麻黄汤 + 过继免疫组(SMA 组)5 组,每组 8 只。除 Ctrl 组外,其余小鼠均在第 1、7、14 天给予 0.2 mL 致敏溶液(OVA 50 μg、氢氧化铝 2 mg,0.05 mg/mL)腹腔注射致敏,在第 21 ~ 27 天每天以 1% OVA 20 μL 滴鼻激发,Ctrl 组小鼠给予等量 1 × PBS 代替。SGMHD 组每日激发后 1 h 给予射干麻黄汤水煎剂灌胃(0.103 mg/g),AIT 组每日激发后 1 h 经尾静脉注射 γδT 细胞悬液 0.5 mL,SMA 组每日激发后 1 h 给予射干麻黄汤水煎剂灌胃及尾静脉注射 γδT 细胞悬液。末次干预 24 h 后给予所有小鼠麻醉(2% 戊巴比妥钠 0.1 mL/20 g 腹腔注射),腹主动脉采血 0.5 mL,保存于肝素抗凝管,12 h 内行流式细胞学检测;另取 0.5 mL 腹主动脉血,室温 3000 r/min、离心半径为 10 cm 离心 10 min 后,取上清置于 -80 ℃保存。麻醉后 12 h 内剥离小鼠鼻部皮肤,分离双侧鼻腔,分离双侧鼻甲及鼻中隔黏膜,制备 4 μm 石蜡切片。沿胸腹正中线剪开腹腔和胸骨柄,取左侧完整肺组织并置于 4% 多聚甲醛溶液内固定,用于病理检测。

2.3 观察指标及方法

2.3.1 鼻黏膜及肺组织病理学检测 采用免疫组化法检测鼻黏膜及肺组织中细胞因子 IFN - γ、IL - 4、视黄酸受体相关孤儿受体 γt(retinoic acid receptor - related orphan receptor γt,RORγt)、叉头状转录因子 P3(forkhead box protein P3,FoxP3)及 γδT 细胞受体(γδ T cellreceptor,γδTCR)的表达。鼻黏膜及肺组织经 4 μm 石蜡切片,60 ℃烘烤 2 h,二甲苯脱蜡 10 min × 2 次、无水乙醇 3 min × 2 次、95% 乙醇 2 min × 2 次、80% 乙醇 2 min、70% 乙醇 2 min,高温高压抗原修复,滴加血清封闭 20 min 后加入相应一抗于 4 ℃孵育过夜。滴加二抗、37 ℃孵育 1 h,二氨基联苯胺显色 1 min,自来水冲洗终止反应,苏木素复染 1 min,无水乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,Image J2 软件分析单位面积阳性细胞表达的平均光密度值。免疫组化染色黄色或棕黄色为阳性,细胞核染为蓝色。

2.3.2 外周血 T 淋巴细胞亚群检测 采用流式细胞术检测外周血 T 淋巴细胞亚群水平。抗凝血加入 2 mL PBS 及淋巴细胞分离液,3000 r/min(离心半径为 10 cm)离心 10 min 并吸取淋巴细胞,重悬于含 10% 血清 RPMI - 1640 的培养基中,台盼蓝染色确保细胞存活率大于 95%。调整细胞浓度至 2×10^5 个/mL,分装于 24 孔培养板,加入 10 μL 佛波酯(12.5 μg/mL)及莫能霉素(0.35 mg/mL)混合物后置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 4 h,间隔 1 h 混匀。流式管收集细胞,PBS 重悬后加入 5 μL 鼠单抗 CD4 PerCP - Cy5.5 及 CD8 PE - Cy7 抗体,4 ℃避光孵育 30 min,细胞固定、破膜后分别加入 5 μL IL - 4 APC、IFN - γ FITC、IL - 17 PE、FoxP3 PE - Cy5 抗体,再次 4 ℃避光孵育 30 min,PBS 洗涤并重悬细胞后上机检测。对于 γδT 细胞检测,在佛波酯及莫能霉素刺激后分别加入鼠单抗 CD3 FITC 及 γδTCR 抗体染色。使用 FlowJo 10.8 软件分析 Th1、Th2、Th17、Treg 及 γδT 细胞百分率。

2.3.3 外周血细胞因子检测 外周血上清液放至室温后 6000 r/min、离心半径为 10 cm 离心 15 min 去除碎片,使用 ELISA 试剂盒将样品稀释 10 倍,在已进行酶标包被的 96 孔板中加入不同浓度标准品及稀释后的样品,检测 IL - 2、IL - 4、IL - 5、IL - 10、IL - 17、IFN - γ 及 TGF - β 在 450 nm 波长下各孔吸光光度值,并计算样品浓度。操作步骤按照试剂盒说明书进行。

2.3.4 统计学方法 采用 GraphPad Prism 9.0 进行数据录入及统计,计量资料符合正态分布,使用 one - way ANOVA 检验,组间多重比较使用 Tukey 法。$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 鼻黏膜免疫组化染色结果

小鼠鼻黏膜免疫组化结果显示,各组小鼠鼻黏膜 IFN - γ、IL - 4、FoxP3、RORγt、γδTCR 表达差异均存在极显著统计学意义($P < 0.001$)。其中,AHR 组 IFN - γ、IL - 4、FoxP3、RORγt、γδTCR 表达均高于正常对照组($P < 0.01$ 或 0.001);与 AHR 组相比,AIT 组、SGMHD 组及 SMA 组鼻黏膜 IFN - γ、IL - 4、RORγt、γδTCR 表达较低($P < 0.05$、0.01 或 0.001),AIT 组 FoxP3 表达较低($P < 0.05$)。见表 1。

3.2 肺组织免疫组化染色结果

小鼠肺组织免疫组化结果显示,各组小鼠肺组织 IFN - γ、IL - 4、FoxP3、RORγt、γδTCR 表达差异均存在极显著统计学意义($P < 0.001$)。其中,AHR 组 IFN - γ、IL - 4、FoxP3、RORγt、γδTCR 表达均高于正常对照组($P < 0.001$);与 AHR 组相比,AIT 组、SGMHD 组及 SMA 组肺组织 IL - 4、γδTCR 表达较低($P < 0.001$),AIT 组 IFN - γ 表达较低($P < 0.05$),SGMHD 组、SMA 组 FoxP3 表达较低($P < 0.001$)。见表 2。

3.3 外周血 T 淋巴细胞亚群检测结果

AHR 组小鼠造模成功后外周血 Th2、Th17、γδT 细胞比例显著高于正常对照组小鼠($P < 0.001$);与 AHR 组相比,AIT 组、SGMHD 组及 SMA 组外周血 Th1 细胞比例较高($P < 0.01$ 或 0.001),Th17、γδ T 细胞比例较低($P < 0.01$ 或 0.001)。AIT 组 Treg 细胞比例低于 AHR 组($P < 0.05$)。各组间 Th2 细胞比例无明显统计学差异。见表 3。

3.4 血清细胞因子水平检测结果

与正常对照组相比较,AHR 组小鼠外周血 IFN - γ、IL - 2、IL - 4、IL - 5 及 IL - 17 浓度均较高($P < 0.01$ 或 0.001),IL - 10、TGF - β 则显著低于正常对照组($P < 0.001$)。与 AHR 组相比,AIT 组 IFN - γ、IL - 2、IL - 4 及 IL - 17 浓度较高($P < 0.05$、0.01 或 0.001),TGF - β 浓度较低($P < 0.001$)。SGMHD 组及 SMA 组 IFN - γ、IL - 2、IL - 4、IL - 5 及 IL - 17 浓度均显著低于 AHR 组,IL - 10、TGF - β 浓度则较高($P < 0.001$)。见表 4。

4 小结与讨论

本研究通过观察射干麻黄汤对 AHR 模型小鼠的干预效果,分析射干麻黄汤调控上下气道、外周血淋巴细胞亚群和血清细胞因子水平的作用。实验结果显示,射干麻黄汤可调节 AHR 模型小鼠的鼻黏膜、肺组织和外周血 Th1、Th2、Th17、Treg 和 γδT 细胞亚群比例,纠正细胞比例失衡,并调整多种外周血细胞因子浓度,改善小鼠炎性状态。

目前普遍认为,气道炎症是 AHR 的首要机制[12],主要病理表现为气道内嗜酸性粒细胞(eosinophil,EOS)、T 淋巴细胞等多种炎症细胞浸润和聚集[13]。2 型免疫应答是气道炎症尤其是过敏性气道疾病的发生途径,由 Th2 及 2 型固有淋巴细胞产生的IL - 4、IL - 5等细胞因子诱导EOS和肥大细胞(mast

表 1 各组小鼠鼻黏膜 T 淋巴细胞亚群蛋白免疫组化平均光密度值($\bar{x} \pm s$)

组别	IFN－γ	IL－4	FoxP3	RORγ	γδTCR
Ctrl 组	0.126 ± 0.024	0.151 ± 0.036	0.140 ± 0.021	0.132 ± 0.025	0.101 ± 0.022
AHR 组	0.308 ± 0.053***	0.323 ± 0.048***	0.208 ± 0.033**	0.294 ± 0.030***	0.232 ± 0.035***
AIT 组	0.229 ± 0.052#	0.185 ± 0.031###	0.153 ± 0.039#	0.160 ± 0.019###	0.140 ± 0.030###
SGMHT 组	0.157 ± 0.058###	0.172 ± 0.025###	0.213 ± 0.047	0.161 ± 0.018###	0.143 ± 0.040###
SMA 组	0.173 ± 0.072###	0.216 ± 0.045##	0.207 ± 0.043	0.157 ± 0.031###	0.141 ± 0.052###
F 值	14.0	27.0	6.8	53.0	14.0
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：**与 Ctrl 组比较，$P<0.01$；***与 Ctrl 组比较，$P<0.001$；#与 AHR 组比较，$P<0.05$；##与 AHR 组比较，$P<0.01$；###与 AHR 组比较，$P<0.001$。

表 2 各组小鼠肺组织 T 淋巴细胞亚群蛋白免疫组化平均光密度值($\bar{x} \pm s$)

组别	IFN－γ	IL－4	FoxP3	RORγ	γδTCR
Ctrl 组	0.026 ± 0.005	0.023 ± 0.006	0.169 ± 0.022	0.119 ± 0.029	0.085 ± 0.024
AHR 组	0.314 ± 0.058***	0.246 ± 0.048***	0.341 ± 0.056***	0.301 ± 0.037***	0.272 ± 0.051***
AIT 组	0.232 ± 0.049b#	0.170 ± 0.040###	0.353 ± 0.032	0.281 ± 0.031	0.138 ± 0.024###
SGMHT 组	0.343 ± 0.063	0.123 ± 0.020###	0.181 ± 0.023###	0.300 ± 0.037	0.165 ± 0.035###
SMA 组	0.357 ± 0.065	0.125 ± 0.022###	0.175 ± 0.023###	0.291 ± 0.043	0.161 ± 0.041###
F 值	54.0	55.0	62.0	39.0	28.0
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：***与 Ctrl 组比较，$P<0.001$；#与 AHR 组比较，$P<0.05$；###与 AHR 组比较，$P<0.001$。

表 3 各组小鼠不同 T 细胞亚群细胞比例($\bar{x} \pm s$) 单位：%

组别	Th1	Th2	Th17	Treg	γδT
Ctrl 组	3.21 ± 0.87	0.67 ± 0.30	1.35 ± 0.47	17.34 ± 1.10	3.52 ± 0.43
AHR 组	3.33 ± 0.59	1.71 ± 0.30***	4.09 ± 1.17***	15.87 ± 1.14	5.58 ± 0.78***
AIT 组	8.20 ± 1.59###	1.65 ± 0.38	1.55 ± 0.30###	14.04 ± 1.27b#	3.60 ± 0.53###
SGMHT 组	5.27 ± 0.84##	1.62 ± 0.25	1.36 ± 0.46###	14.82 ± 1.42	4.24 ± 0.94##
SMA 组	5.45 ± 0.85##	1.47 ± 0.28	1.30 ± 0.25###	16.99 ± 0.96	4.21 ± 0.60##
F 值	33.0	16.0	30.0	11.0	12.0
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：***与 Ctrl 组比较，$P<0.001$；#与 AHR 组比较，$P<0.05$；##与 AHR 组比较，$P<0.01$；###与 AHR 组比较，$P<0.001$。

表 4 Elisa 法检测各组小鼠血清不同细胞因子浓度结果($\bar{x} \pm s$) 单位：pg/mL

组别	IFN－γ	IL－2	IL－4	IL－5	IL－10	IL－17	TGF－β
Ctrl 组	80.91 ± 22.56	53.19 ± 10.97	56.11 ± 10.24	75.69 ± 14.02	121.70 ± 16.76	21.04 ± 4.12	225.40 ± 45.86
AHR 组	120.80 ± 23.70**	165.40 ± 36.68***	169.40 ± 38.77***	195.20 ± 30.18***	38.05 ± 11.52***	49.90 ± 7.77***	33.97 ± 6.52***
AIT 组	71.37 ± 12.01###	120.40 ± 27.35##	132.10 ± 30.53#	169.00 ± 37.18	23.22 ± 7.08	31.71 ± 5.20###	126.20 ± 26.52###
SGMHT 组	67.01 ± 16.63###	73.78 ± 10.10###	70.98 ± 10.65###	103.20 ± 20.40###	84.38 ± 15.95###	21.53 ± 2.38###	161.20 ± 26.17###
SMA 组	67.51 ± 16.70###	74.66 ± 13.17###	71.78 ± 12.37###	104.17 ± 16.34###	84.45 ± 12.98###	22.32 ± 5.78###	162.32 ± 28.30###
F 值	12.0	33.0	34.0	32.0	71.0	42.0	45.0
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：**与 Ctrl 组比较，$P<0.01$；***与 Ctrl 组比较，$P<0.001$；#与 AHR 组比较，$P<0.05$；##与 AHR 组比较，$P<0.01$；###与 AHR 组比较，$P<0.001$。

cell，MC）活化，并促使 B 细胞产生免疫球蛋白 E（immunoglobulin E，IgE）。除此之外，Th17 细胞及其分泌的 IL－17 在气道炎症中同样发挥了重要作用，包括诱导中性粒细胞（neutrophil，NEU）和 EOS 聚集、刺激黏蛋白基因表达从而形成气道黏液高分泌、促进气道周围胶原沉积[14]。而 Treg 细胞可以通过 IL－10、TGF－β 依赖方式参与抗炎过程并降低 AHR[15]。γδT 细胞是 T 细胞的一种特殊亚群，呈现出气道黏膜优势性增殖[16]，在免疫应答早期 γδT 细胞作为固有免疫和适应性免疫的桥梁诱导树突状细胞成熟，同时分泌 Th1、Th2、Th17 相关细胞因子，促使 2 型炎症反应进展[17]，对 AHR 的发生具有重要推动作用。

射干麻黄汤出自《金匮要略》，是治疗寒饮咳喘的重要方剂。方中射干、紫菀、款冬、半夏苦泄降气，麻黄、细辛、生姜辛散发表，五味子酸收敛肺，半夏、细辛消痰化饮，大枣调和、安中，诸药配伍，使散中有收，祛邪而不伤正，共奏宣肺祛痰、下气止咳之效。临床上射干麻黄汤常用于治疗典型哮喘、咳嗽变异型哮喘等伴有气道高反应的慢性气道炎症性疾病[18－19]，研究表明射干麻黄汤在治疗气道炎症方面具有多成分、多靶点、多通路的特点。单味药有效成分研究显示，射干麻黄汤中包含野

鸢尾黄素、麻黄碱、伪麻黄碱、射干苷、β－谷甾醇、半夏多糖、细辛脂素、紫菀酮、款冬花总倍半萜等[20－22]，其中麻黄碱可通过 IL－2、IL－4 等细胞因子促进 EOS、MC 及 NEU 凋亡，抑制炎症介质释放，减轻气道组织肿胀[23]；β－谷甾醇及半夏多糖可抑制 Th2 细胞激活并下调其释放的炎症因子，具有显著的抗炎作用[21－22]；细辛脂素可减轻气道嗜酸性粒细胞浸润，降低 IgE 水平，从而减轻气道高反应性[24－25]。本研究发现射干麻黄汤显著降低 AHR 模型小鼠鼻黏膜和肺组织 IL－4、γδTCR 表达水平，提高外周血 Th1 细胞比例、降低 Th17 及 γδT 细胞比例，降低外周血 IFN－γ、IL－2、IL－4、IL－5 及 IL－17 水平，并提高 IL－10、TGF－β 水平。

值得注意的是，本研究显示无论 γδT 细胞过继免疫、射干麻黄汤治疗还是二者联合干预，与 AHR 组小鼠相比，仅有鼻黏膜和肺组织中 IL－4 表达显著降低，各干预组外周血中 Th2 细胞比例均未出现明显减少，提示射干麻黄汤对 AHR 的 2 型免疫反应调节作用可能集中在气道局部。过敏性鼻炎和哮喘是以 AHR 为主的两种气道慢性炎症，根据“同一气道、同一疾病”概念[26]，近年来提出了过敏性鼻炎哮喘综合征的诊断名称，指同时发生的临床或亚临床上、下呼吸道过敏性症状[27]。《素问·阴阳应象大论篇》曰：“肺主鼻，在窍为鼻”；《诸病源候论》云：“若肺脏调和，则鼻气通利，而知臭香”。鼻在上在外，为肺气出入的通道，肺藏于里，鼻与肺上下相应，相关一体，相互影响。本研究结果提示射干麻黄汤对 AHR 模型小鼠鼻黏膜和肺组织 T 淋巴细胞亚群具有同向调节作用，可抑制 γδT 细胞、Th2 细胞介导的免疫应答，为其“鼻肺同治”的现代科学内涵提供了理论基础。

参考文献

[1] HAMMAD H, LAMBRECHT B N. The basic immunology of asthma [J]. Cell, 2021, 184(9): 2521－2522.
[2] ASSAF S, STENBERG H, JESENAK M, et al. Asthma in the era of COVID－19[J]. Respir Med, 2023, 218: 107373.
[3] DUAN Q R, ZHOU Y, YANG D. Endoplasmic reticulum stress in airway hyperresponsiveness [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 149: 112904.
[4] WANG Y, LIAO K, LIU B, et al. GITRL on dendritic cells aggravates house dust mite－induced airway inflammation and airway hyperresponsiveness by modulating CD4$^+$ T cell differentiation[J]. Respir Res, 2021, 22(1): 46.
[5] JI T, LI H. T－helper cells and their cytokines in pathogenesis and treatment of asthma[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1149203.
[6] 赵竞一，闫新宇，艾建伟，等. 鼻敏煎对变应性鼻炎模型小鼠 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 中医杂志，2021，62(13)：1164－1168，1178.
[7] 赵竞一，韩金帅，王曼，等. 鼻敏煎对小鼠 γδT 细胞的作用机制[J]. 北京中医药，2021，40(9)：963－967.
[8] 张志杰，黄贵锐，张诗瑜，等. 9 个常用经典名方治疗成人支气管哮喘疗效的网状 Meta 分析. 世界中医药，2024，19(8)：1092－1098，1107.
[9] LIN C C, WANG Y Y, CHEN S M, et al. Shegan－Mahuang Decoction ameliorates asthmatic airway hyperresponsiveness by downregulating Th2/Th17 cells but upregulating CD4$^+$ FoxP3 + Tregs[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 253: 112656.
[10] HAN Y Q, GUO W J, LI X X, et al. LC－MS－based metabolomics reveals the in vivo effect of Shegan Mahuang Decoction in an OVA－induced rat model of airway hyperresponsiveness[J]. Mol Omics, 2022, 18(10): 957－966.
[11] 李露露，潘洁霓，郑杭彬，等. 基于运用网络药理学探析加味射干麻黄汤治疗急性支气管炎的作用机制. 大众科技，2023，25(3)：93－98.
[12] MENZIES－GOW A, MCBRIEN C N, BAKER J R, et al. Update in asthma and airway inflammation 2018[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2019, 200(1): 14－19.
[13] KOMLÓSI Z I, VAN DE VEEN W, KOVÁCS N, et al. Cellular and molecular mechanisms of allergic asthma[J]. Mol Aspects Med, 2022, 85: 100995.
[14] XIA W, BAI J, WU X, et al. Interleukin－17A promotes MUC5AC expression and goblet cell hyperplasia in nasal polyps via the Act1－mediated pathway[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98915.
[15] ZHANG B B, ZENG M N, ZHANG Q Q, et al. Ephedrae Herba polysaccharides inhibit the inflammation of ovalbumin induced asthma by regulating Th1/Th2 and Th17/Treg cell immune imbalance[J]. Mol Immunol, 2022, 152: 14－26.
[16] YAO Y E, QIN C C, YANG C M, et al. γδT17/γδTreg cell subsets: a new paradigm for asthma treatment[J]. J Asthma, 2022, 59(10): 2028－2038.
[17] VICTOR J R, LEZMI G, LEITE－DE－MORAES M. New insights into asthma inflammation: focus on iNKT, MAIT, and γδT cells[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2020, 59(3): 371－381.
[18] 胥媛. 射干麻黄汤治疗小儿咳嗽变异性哮喘的临床观察[J]. 临床医学，2020，40(8)：115－117.
[19] 朱唯芳，朱维佳，顾娟，等. 加味射干麻黄汤与常规西医疗法治疗支气管哮喘的随机对照研究[J]. 第二军医大学学报，2016，37(6)：771－775.
[20] 李秋慧，单晓晓，叶卫东，等. 射干麻黄汤的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志，2023，48(8)：2068－2076.
[21] HU M, LIU Y, WANG L, et al. Purification, characterization of two polysaccharides from Pinelliae rhizoma praeparatum cum alumine and their anti－inflammatory effects on mucus secretion of airway epithelium[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(14): E3553.
[22] LYU Y, CHEN X, XIA Q, et al. Network pharmacology－based study on the mechanism of Pinellia ternata in asthma treatment[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 9732626.
[23] MA C H, MA Z Q, FU Q, et al. Ma Huang Tang ameliorates asthma though modulation of Th1/Th2 cytokines and inhibition of Th17 cells in ovalbumin－sensitized mice[J]. Chin J Nat Med, 2014, 12(5): 361－366.
[24] WU J, LIU Y, HU J, et al. Protective activity of asatone against ovalbumin－induced allergic asthma[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2020, 13(10): 2487－2494.
[25] CHANG H Y, CHEN Y C, LIN J G, et al. Asatone prevents acute lung injury by reducing expressions of NF－[formula: see text] B, MAPK and inflammatory cytokines[J]. Am J Chin Med, 2018, 46(3): 651－671.
[26] GIAVINA－BIANCHI P, AUN M V, TAKEJIMA P, et al. United airway disease: current perspectives[J]. J Asthma Allergy, 2016, 9: 93－100.
[27] PAIVA FERREIRA L K D, PAIVA FERREIRA L A M, MONTEIRO T M, et al. Combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS)[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 74: 105718.