小青龙汤干预哮喘寒饮蕴肺证气道炎症的机制研究Δ

王　彬[1*]，赵明哲[1]，孙羽扬[1]，颜培正[2,3#]（1.山东中医药大学药学院，济南　250355；2.山东中医药大学中医文献与文化研究院，济南　250355；3.山东中医药大学中医药经典理论教育部重点实验室，济南　250355）

中图分类号　R965；R285　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2025）13-1574-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2025.13.04

摘　要　目的　基于肺腺癌转移相关转录本1（MALAT1）探讨小青龙汤对哮喘寒饮蕴肺证气道炎症的影响及其潜在的作用机制。**方法**　将40只Wistar大鼠按随机数字表法分为空白组、模型组、地塞米松组（阳性对照，1 mg/kg）、小青龙汤组（2.72 g/kg），每组10只。建立哮喘寒饮蕴肺证大鼠模型，从造模第2天开始给予相应药物，每天1次，连续21 d。观察大鼠肺组织病理变化，检测大鼠肺功能，测定大鼠血清中超氧化物歧化酶（SOD）、丙二醛（MDA）、干扰素γ（IFN-γ）、肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素13（IL-13）水平和肺组织中MALAT1、TNF-α、IL-13、IFN-γ、瞬时受体电位M2型（TRPM2）mRNA表达水平以及TRPM2蛋白表达水平。将20只C57BL/6J野生型小鼠和20只C57BL/6J *MALAT1*$^{(-/-)}$小鼠按随机数字表法分为野生模型组、野生小青龙汤组、*MALAT1*$^{(-/-)}$模型组、*MALAT1*$^{(-/-)}$小青龙汤组，每组10只。建立哮喘寒饮蕴肺证小鼠模型，造模第2天开始给予小青龙汤，每天1次，连续21 d。检测小鼠血清中SOD、MDA、IFN-γ、TNF-α、IL-13水平和肺组织中TRPM2 mRNA及其蛋白表达水平。**结果**　大鼠实验结果显示，与模型组比较，给药组大鼠气道阻力，功能残气量，血清中IL-13、TNF-α、MDA水平，肺组织中炎症浸润和胶原纤维化程度、IL-13、TNF-α、TRPM2表达量均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）；呼气流峰值，呼气中期流速，血清中SOD、IFN-γ水平，肺组织中IFN-γ、MALAT1表达量均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。小鼠实验结果显示，与野生模型组比较，野生小青龙汤组小鼠血清中IL-13、TNF-α、MDA水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），IFN-γ、SOD水平均显著升高（$P<0.01$）；与野生小青龙汤组比较，*MALAT1*$^{(-/-)}$小青龙汤组小鼠血清中SOD、IFN-γ水平均显著降低（$P<0.01$），IL-13、TNF-α、MDA水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）；肺组织中TRPM2 mRNA及其蛋白表达量均显著升高（$P<0.05$）。**结论**　小青龙汤可通过调控MALAT1的表达，调控氧化应激反应，抑制TRPM2的激活，减少体内促炎因子的释放，从而减轻气道炎症反应。

关键词　小青龙汤；气道炎症；氧化应激；哮喘；寒饮蕴肺证；肺腺癌转移相关转录本1；瞬时受体电位M2型

Study on the mechanism of Xiaoqinglong decoction in intervening in airway inflammation of asthma with syndrome of cold retention accumulation in lung

WANG Bin[1], ZHAO Mingzhe[1], SUN Yuyang[1], YAN Peizheng[2,3]（1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Institute of Chinese Medical Literature and Culture, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 3. Key Lab of Traditional Chinese Medicine Classic Theory, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effects and potential mechanisms of Xiaoqinglong decoction on airway inflammation in asthma with syndrome of cold retention accumulation in lung based on the metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1). **METHODS** Forty Wistar rats were randomly divided into blank group, model group, dexamethasone group (positive control, 1 mg/kg), and Xiaoqinglong decoction group (2.72 g/kg), with 10 rats in each group. A rat model of asthma with syndrome of cold retention accumulation in lung was established, and the corresponding drugs were administered once daily starting from the second day of modeling for 21 consecutive days. Lung histopathological changes and lung function were evaluated. The levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), interferron-γ (IFN-γ), tumor necrosis factor α (TNF-α), and interleukin-13 (IL-13) in serum were measured, and the mRNA expression levels of MALAT1, TNF-α, IL-13, IFN-γ, and transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) in lung tissue were determined. Twenty C57BL/6J wild-type mice and twenty C57BL/6J *MALAT1*$^{(-/-)}$ mice were randomly divided into wild-type model group, wild-type Xiaoqinglong decoction group, *MALAT1*$^{(-/-)}$ model group, and *MALAT1*$^{(-/-)}$ Xiaoqinglong decoction group, with 10 mice in each group. The same asthma model was established, and Xiaoqinglong decoction was administered

Δ **基金项目**　国家自然科学基金青年科学基金项目（No. 82004233）；山东省中医药科技项目（No.Q-2023042，No.Q-2023122，No.MR20241737）；2023年齐鲁扁仓中医药人才培育项目（鲁卫函〔2024〕78号）

＊ **第一作者**　博士研究生。研究方向：中药学。E-mail：919612621@qq.com

通信作者　讲师，硕士生导师，博士。研究方向：中药药理学。E-mail：yan_peizheng@163.com

once daily for 21 days starting from the second day of modeling. The serum levels of SOD, MDA, IFN-γ, TNF-α and IL-13 were measured, along with the mRNA and protein expression levels of TRPM2 in lung tissue. **RESULTS** The results of the rat experiment showed that, compared with model group, the airway resistance, functional residual capacity, the serum levels of IL-13, TNF-α and MDA as well as inflammatory infiltration and collagen fiber deposition in lung tissue, and the expressions of IL-13, TNF-α and TRPM2 in lung tissue were all significantly decreased in the treatment group ($P<0.05$ or $P<0.01$). The peak expiratory flow, forced expiratory flow at 50% of forced vital capacity, the serum levels of SOD and IFN-γ, and the expression levels of IFN-γ and MALAT1 in lung tissue were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). The results of the mice experiment demonstrated that, compared with the wild-type model group, serum levels of IL-13, TNF-α and MDA in wild-type xiaoqinglong decoction group were significantly reduced ($P<0.05$ or $P<0.01$), while serum IFN-γ levels and SOD activity were significantly increased ($P<0.01$). Compared with the wild-type Xiaoqinglong decoction group, the *MALAT1*$^{(-/-)}$ Xiaoqinglong decoction group showed significantly decreased serum IFN-γ levels and SOD activity ($P<0.01$), along with significantly increased levels of IL-13, TNF-α and MDA ($P<0.05$ or $P<0.01$), as well as significantly elevated TRPM2 mRNA and protein expression in lung tissue ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Xiaoqinglong decoction may alleviate airway inflammation by regulating the expression of MALAT1, modulating oxidative stress, inhibiting TRPM2 activation, and reducing the release of pro-inflammatory cytokines.

KEYWORDS Xiaoqinglong decoction; airway inflammation; oxidative stress; asthma; syndrome of cold retention accumulation in lung; metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1; transient receptor potential melastatin 2

支气管哮喘（以下简称“哮喘”）作为一种气道异质性疾病，主要的病理特点为气道炎症、气道重塑及黏液高分泌，其本质是以多种炎症细胞浸润以及呼吸道高反应性为特征的慢性非特异炎症性疾病[1]。糖皮质激素是目前临床应用最广、控制气道炎症效果较好的药物[2]，但尚无法根治哮喘，且易引发众多不良反应。因此，寻找安全、有效的治疗方法仍是目前哮喘治疗过程中迫切需要解决的问题。

哮喘患者体内普遍缺氧，而缺氧状态会导致机体的氧化应激水平升高，且氧化应激过程的代谢产物会介入哮喘的炎症诱发过程，导致组织损伤、气道炎症加重、气道高反应增强等一系列病理生理改变[3-4]。肺腺癌转移相关转录本1（metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1，MALAT1）是一种在哺乳动物细胞核中大量表达且高度保守的长链非编码RNA（lncRNA）。研究显示，MALAT1参与调节氧化应激反应，可调控内源性抗氧化通路——核转录因子红系2相关因子2（nuclear factor-erythroid 2-related factor 2，Nrf2）的活性，MALAT1过表达可显著上调Nrf2蛋白水平，促进Nrf2的核转位，抑制促炎因子的表达和活性氧（reactive oxygen species，ROS）的积累[5-6]。

传统中医范畴定义哮喘为“哮”病，其临床最常见的证候为寒饮蕴肺证。寒饮蕴肺证是肺系疾病中常见的水饮伏肺的病证，在哮喘发病中所占比例最大，且症状最为严重[7]。小青龙汤出自张仲景所著《伤寒杂病论》，具有温化寒饮、止咳平喘的作用，被广泛用于治疗肺部及呼吸道疾病。近代药理研究发现，小青龙汤可以通过抗过敏、抑制气道重塑、降低气道反应性等作用来减轻哮喘患者症状[8-10]，但其治疗哮喘寒饮蕴肺证的详细机制尚不明确。MALAT1虽可直接参与调控氧化应激反应，但其是否参与哮喘寒饮蕴肺证中的氧化应激反应尚未见报道，有待进一步研究。因此，本研究拟明确小青龙汤是否可以通过调控MALAT1来干预氧化应激，从而治疗哮喘寒饮蕴肺证，以期为哮喘靶向药的制备提供思路，为小青龙汤的临床应用提供数据支持。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有：W001型雾化仪（江苏富林医疗设备有限公司），PL-203型电子天平（美国Mettler Toledo公司），Eclipse E10型正置光学显微镜、DS-U3型成像系统（日本Nikon株式会社），Finepointe-NAM型动物肺功能无创气道机制检测系统（美国Buxco公司），Rt2100c型酶标仪（美国Rayto公司），EPS型电泳仪、Tanon-60型凝胶成像系统（上海天能科技有限公司），NanoDrop2000型超微量分光光度计（美国Thermo Fisher Scientific公司），CFX型荧光定量PCR仪（美国Bio-Rad公司）。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用的主要药品与试剂有：麻黄饮片（亳州市沪谯药业有限公司，批号19040102），白芍饮片（济南众和中药饮片有限公司，批号210902），炙甘草饮片（青岛天成中药饮片有限公司，批号210802），桂枝、五味子、细辛饮片（安徽三和堂药业有限公司，批号分别为A210816、A210816、180710），半夏、干姜饮片（河北汉草堂药业有限公司，批号分别为200401、2004211），地塞米松磷酸钠注射液（辰欣药业股份有限公司，批号7211055，规格2 mg/mL），氢氧化铝（国药集团化学试剂有限公司，批号SJ000389），卵清蛋白（北京索莱宝生物科技有限公司），肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor α，TNF-α）、γ干扰素（interferon-γ，IFN-γ）酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（美国Abcam公司，批号分别为9680014130921、9680003060721），白细胞介素13（inter-

leukin-13，IL-13）ELISA试剂盒、兔源瞬时受体电位M2型（transient receptor potential melastatin 2，TRPM2）多抗（武汉博士德生物工程有限公司，批号分别为54517261228、A01013-1），超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）（WST-1法）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）（TBA法）测定试剂盒（南京建成生物工程研究所，批号分别为A001-3-2、A003-1-1），lncRNA MALAT1 ELISA试剂盒（江苏晶美生物科技有限公司，批号202301）。

1.3 实验动物

40只雄性6周龄SPF级Wistar大鼠（体重190～210 g）和20只雄性8周龄SPF级野生型C57BL/6J小鼠（体重18～20 g）均购自北京维通利华实验动物技术有限公司，动物生产许可证号为SCXK（京）2016-0006；4只（雌雄各半）SPF级C57BL/6J *MALAT1*$^{(-/-)}$小鼠购自赛业（固安）生物技术有限公司，动物生产许可证号为SCXK（冀）2021-003。动物购入后，于山东中医药大学动物实验中心饲养、繁殖；动物房昼夜12 h光/12 h暗交替，相对湿度为40%～60%，温度为20～25 ℃，饲养期间使其自由摄食和饮水。动物的使用与操作均符合山东中医药大学实验动物福利伦理审查委员会关于实验动物操作与动物福利的要求，且本研究通过了该委员会伦理审核，伦理编号：SDUTCM20210917001、SDUTCM20231007001。

2 方法

2.1 药液制备

小青龙汤冻干粉的制备与含量测定参照本课题组前期发表的方法[11]。参照《方剂学》（第5版）确定小青龙汤的煎煮剂量：麻黄9 g，白芍9 g，干姜3 g，炙甘草6 g，桂枝6 g，五味子3 g，半夏9 g，细辛9 g。具体煎煮方式如下：称取麻黄9 g，加432 mL水浸泡30 min，以武火煎煮微沸后改用文火煎煮20 min；按处方量称取其余药材，加432 mL水浸泡30 min后，加入到上述麻黄煎液中，以武火煎沸后用文火煎煮40 min，将煎煮液过滤获得滤液，药渣再加342 mL水煎煮40 min后过滤。将2次滤液合并，减压浓缩，冻干，称质量（得率为14.26%），保存于干燥器中，备用。

2.2 大鼠实验

2.2.1 分组、造模与给药

将40只大鼠按照随机数字表法分为空白组、模型组、地塞米松组（阳性对照）和小青龙汤组，每组10只。将大鼠适应性饲养1周后，根据本课题组前期造模方法[12－13]并改进后进行造模：（1）哮喘造模——除空白组外，其余各组大鼠均在实验第1、8天腹腔注射1 mL抗原液（含卵清蛋白100 mg+氢氧化铝100 mg）；从实验第15天开始，用1%卵清蛋白雾化激发，每天30 min，持续8 d，以建立哮喘模型。空白组大鼠用生理盐水代替进行相应处理。（2）寒饮蕴肺证造模——除实验第1、8天外，其余时间内，造模大鼠雾化后每天置于0 ℃恒温冰箱中冷处理3 h，同时给予24 h冰水混合物喂养，进行“形寒”与“饮冷”的刺激。

自实验第2天开始，各组大鼠开始给药，每天1次，连续21 d。小青龙汤组大鼠灌胃小青龙汤冻干粉2.72 g/kg（根据人和动物体表面积折算的等效剂量）；阳性对照组大鼠灌胃地塞米松1 mg/kg（参考前期预实验结果和文献设置[14－15]），空白组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水。

2.2.2 动物取材及处理

末次给药后，大鼠禁食不禁水12 h，麻醉大鼠，腹主动脉取血，室温静置2 h，将血样以3 500 r/min离心15 min，取上清液，置于－80 ℃冰箱中暂存。取血结束后，用颈椎脱臼法处死大鼠，取其左下叶肺组织固定在4%多聚甲醛中，其余肺组织置于－80 ℃冰箱中保存。

2.2.3 肺功能检测

分别在实验第1天开始前和第22天给药后1 h，每组随机选取5只大鼠，应用动物肺功能无创气道机制检测系统对大鼠肺功能进行检测，具体指标包括：气道阻力（airway resistance，Raw）、功能残气量（functional residual capacity，FRC）、呼气流峰值（peak expiratory flow，PEF）和呼气中期流速（forced expiratory flow at 50% of forced vital capacity，FEF50%）。

2.2.4 肺组织病理形态学观察

取“2.2.2”项下固定于4%多聚甲醛中的肺组织（每组随机选取3只大鼠的肺组织），制备石蜡切片（厚度3 μm），常规进行HE、Masson染色，制片后置于显微镜下检查，采集图像并观察大鼠肺组织气道结构、炎症浸润及胶原纤维沉积情况。应用Image J软件对Masson染色照片中纤维化（阳性染色呈蓝色）面积进行测算，计算纤维化百分比[纤维化百分比＝纤维化染色面积/总面积×100%]。

2.2.5 血清中SOD活力和MDA含量测定

取“2.2.2”项下冻存的血清（每组随机选取3只大鼠的血清），常规解冻后，按ELISA试剂盒说明书的步骤，测定各组大鼠血清中SOD活力和MDA含量。

2.2.6 血清中TNF-α、IL-13、IFN-γ水平检测

取“2.2.2”项下冻存的血清（每组随机选取3只大鼠的血清），常规解冻后，按照试剂盒说明书方法测定血清中炎症因子TNF-α、IL-13、IFN-γ的水平。

2.2.7 肺组织中MALAT1表达量检测

取“2.2.2”项下冻存的肺组织1 g（每组随机选3只大鼠的肺组织），加入9 mL磷酸盐缓冲液制备组织匀浆，将组织匀浆以3 000 r/min离心20 min，收集上清液。按照试剂盒说明书操作，测定大鼠肺组织中MALAT1表达量。

2.2.8　肺组织中TNF-α、IL-13、MALAT1、IFN-γ、TRPM2 mRNA表达检测

取“2.2.2”项下冻存的肺组织30 mg（每组随机选3只大鼠的肺组织），采用Trizol试剂提取组织中总RNA，测定总RNA的纯度和浓度。按照逆转录试剂盒的要求，将其逆转录为cDNA模板并进行PCR扩增。扩增体系（总体积20 μL）为：2×SYBR Green qPCR Master Mix 10 μL，上、下游引物各0.4 μL，cDNA模板4 μL，Water Nuclease-Free 5.2 μL。扩增条件为：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性10 s，60 ℃退火30 s，40个循环。以*GAPDH*为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目标基因的mRNA相对表达水平。引物序列及扩增产物大小见表1。

表1　大鼠引物序列及扩增产物大小

基因	序列（5′→3′）	产物长度/bp
TNF-α	F：CCAGGTTCTCTTCAAGGGACAA	80
	R：GGTATGAAATGGCAAATCGGCT	
IL-13	F：GCAACAGCAGCATGGTATGGAG	124
	R：GCCATTCAATATCCTCTGGGTC	
MALAT1	F：GGCTCCGCTGTGCTACATTA	107
	R：TGTTTTGTTGGCCTTGGGGT	
IFN-γ	F：GGAACTGGCAAAAGGACGGT	130
	R：AGGTGCGATTCGATGACACTTA	
TRPM2	F：CCAATCTCCGACGAAGCAATA	203
	R：AATGTGCTGCTCGTGGGTGTAA	
GAPDH	F：CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	R：GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	

2.2.9　肺组织中TRPM2蛋白表达量检测

取“2.2.2”项下冻存的肺组织40 mg（每组随机选3只大鼠的肺组织），加入500 μL裂解液，提取组织中总蛋白，采用BCA试剂盒测定总蛋白浓度。将蛋白高温变性，然后上样进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（在电压70 V下电泳25 min，然后在电压120 V下电泳40 min）分离，电泳结束后转移（电流300 mA，转膜时间100 min）至PVDF膜上，以5%脱脂奶粉室温封闭2 h；TBST缓冲液洗膜3次、每次5 min，加入TRPM2一抗（稀释比例1∶1 000），4 ℃孵育过夜；TBST缓冲液洗膜3次、每次5 min，加入二抗（稀释比例1∶10 000），室温孵育2 h；采用化学发光法显影，Image J软件分析蛋白条带灰度值，以TRPM2条带与内参（β-actin）条带灰度值的比值表示TRPM2蛋白的表达量。

2.3　小鼠实验

2.3.1　分组、造模与给药

将20只野生型C57BL/6J小鼠和繁殖好的20只C57BL/6J *MALAT1*$^{(-/-)}$小鼠分别按随机数字表法分为野生模型组、野生小青龙汤组、*MALAT1*$^{(-/-)}$模型组、*MALAT1*$^{(-/-)}$小青龙汤组，每组各10只。各组小鼠在实验前同步适应性饲养1周，确保环境与条件一致。参照“2.2.1”项下方法进行哮喘和寒饮蕴肺证造模，对小鼠注射0.2 mL抗原液，于0 ℃恒温冰箱中冷处理2 h，其他条件同大鼠实验。自实验第2天开始，各组小鼠开始给药，每天1次，连续21 d。小青龙汤给药组小鼠灌胃小青龙汤冻干粉4.28 g/kg（根据人和动物体表面积折算的等效剂量），模型组小鼠灌胃等体积生理盐水。

2.3.2　样本取材及处理

末次给药后，对小鼠禁食不禁水12 h后麻醉，摘眼球取血。将血样于室温静置2 h，然后以3 500 r/min离心15 min，取上清液，置于－80 ℃冰箱中暂存。脱颈椎处死小鼠，取其肺组织置于－80 ℃冰箱中保存。

2.3.3　指标检测

每组随机选5只小鼠的血清，按“2.2.5”项下方法测定血清中SOD活力、MDA含量，按“2.2.6”项下方法测定血清中TNF-α、IL-13、IFN-γ水平。在野生小青龙汤组、*MALAT1*$^{(-/-)}$模型组、*MALAT1*$^{(-/-)}$小青龙汤组中各取3只小鼠的肺组织，分别按照“2.2.8”“2.2.9”项下方法检测肺组织中TRPM2 mRNA及其蛋白的表达水平（内参为β-actin）。TRPM2的引物序列及扩增产物大小见表2。

表2　小鼠引物序列及扩增产物大小

基因	序列（5′→3′）	产物长度/bp
TRPM2	F：AAGGGAACCTGACCTGCTTG	92
	R：CAGCGGAATCTCCACACCAT	
β-actin	F：AGTGTGACGTTGACATCCGTAAAG	139
	R：ATCCACATCTGCTGGAAGGTGGAC	

2.4　统计学方法

采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。计量资料均符合正态分布，以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步组间两两比较采用LSD-*t*检验；同组间实验前后比较采用配对*t*检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3　结果

3.1　大鼠实验结果

3.1.1　肺功能检测结果

实验第1天（造模前），各组大鼠的各项肺功能指标差异均无统计学意义（$P>0.05$）。与同组实验第1天以及与实验第22天的空白组比较，实验第22天时模型组大鼠的Raw和FRC均显著升高（$P<0.01$），PEF和FEF50%均显著降低（$P<0.01$），提示造模成功。实验第22天时，与模型组比较，药物组大鼠的Raw和FRC均显著降低（$P<0.01$），PEF和FEF50%均显著升高（$P<0.01$）。结果见表3。

表3　各组大鼠实验第1、22天时的肺功能比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	Raw/[cmH_2O/(s·mL)]		FRC/mL		PEF/(mL/s)		FEF50%/(mL/s)	
	实验第1天	实验第22天	实验第1天	实验第22天	实验第1天	实验第22天	实验第1天	实验第22天
空白组	0.49±0.12	0.47±0.01	1.12±0.08	1.01±0.15	25.14±0.81	25.33±0.86	20.75±0.84	21.34±1.02
模型组	0.50±0.02	1.37±0.05^{ab}	1.24±0.04	2.44±0.19^{ab}	24.25±0.10	17.38±0.72^{ab}	19.86±0.67	14.30±0.51^{ab}
地塞米松组	0.50±0.01	0.29±0.02^{c}	1.11±0.08	1.64±0.10^{c}	23.67±1.36	19.94±0.50^{c}	21.59±1.37	18.87±0.54^{c}
小青龙汤组	0.45±0.01	0.44±0.01^{c}	1.06±0.08	1.23±0.04^{c}	23.59±1.20	21.81±1.24^{c}	19.10±0.91	18.18±0.06^{c}

a：与同组实验第1天比较，$P<0.01$；b：与实验第22天的空白组比较，$P<0.01$；c：与实验第22天的模型组比较，$P<0.01$。

3.1.2　肺组织HE染色结果

空白组大鼠肺组织结构完整，支气管纤毛排列整齐，管腔内无炎症细胞浸润，肺泡腔内无异常。与空白组比较，模型组大鼠肺支气管及肺泡周围有大量炎症细胞浸润，肺组织嗜酸性粒细胞增多，支气管管壁增厚，纤毛形态异常粘连，管腔内可见黏液物增多、血细胞渗出；肺泡塌陷严重，肺泡腔有少量液体渗出，部分破裂融合。与模型组比较，地塞米松组大鼠支气管周围炎症细胞浸润情况有所改善，纤毛粘连减少；小青龙汤组明显可见肺组织损伤有所缓解，支气管纤毛粘连减轻，肺泡结构相对完整，炎症细胞浸润减少。结果见图1。

3.1.3　肺组织Masson染色结果

与空白组[(1.94±0.34)%]比较，模型组大鼠肺组织纤维化百分比[(24.22±2.40)%]显著升高（$P<0.01$），肺组织被大量的胶原纤维附着。与模型组比较，地塞米松组和小青龙汤组大鼠肺组织纤维化百分比[分别为(10.02±2.52)%、(6.27±0.41)%]均显著降低（$P<0.01$），且以小青龙汤组的变化更为明显。结果见图2。

3.1.4　血清中氧化应激指标及炎症因子水平测定结果

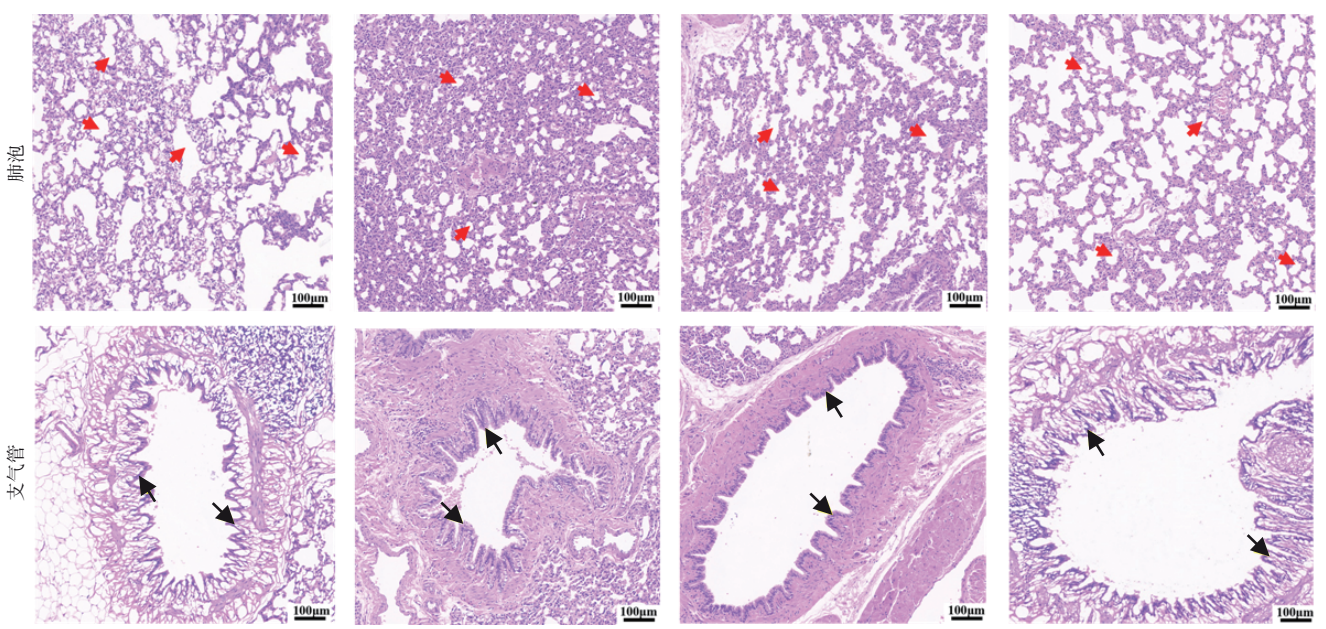
与空白组比较，模型组大鼠血清中MDA、TNF-α和IL-13水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），SOD、IFN-γ水平均显著降低（$P<0.01$）；与模型组比较，地塞米松组和小青龙汤组大鼠血清中MDA、TNF-α、IL-13水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），SOD（地塞米松组除外）、IFN-γ水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见表4。

3.1.5　肺组织中MALAT1表达量检测结果

与空白组(461.03±17.61)比较，模型组大鼠肺组织中MALAT1表达量(347.68±40.16)显著降低（$P<0.01$）；与模型组比较，地塞米松组和小青龙汤组大鼠肺组织中MALAT1表达量（分别为464.30±44.06、550.48±42.02）均显著升高（$P<0.01$），且以小青龙汤组的变化更为明显。

3.1.6　肺组织中TNF-α、IL-13、MALAT1、IFN-γ、TRPM2 mRNA表达检测结果

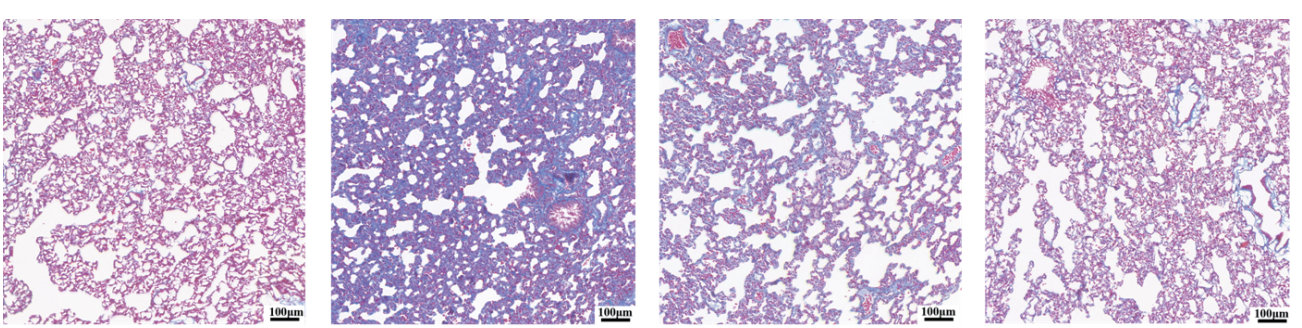
与空白组比较，模型组大鼠肺组织中IL-13、TNF-α、TRPM2 mRNA的相对表达量均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），MALAT1、IFN-γ mRNA的相对表达量均显著



A.空白组　B.模型组　C.地塞米松组　D.小青龙汤组

红色箭头：肺泡；黑色箭头：纤毛。

图1　各组大鼠肺组织病理观察HE染色显微图



A.空白组　B.模型组　C.地塞米松组　D.小青龙汤组

图2　各组大鼠肺组织病理观察Masson染色显微图

表4　各组大鼠血清中氧化应激指标和炎症因子水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	氧化应激指标		炎症因子		
	MDA/（nmol/mL）	SOD/（U/mL）	TNF-α/（pg/mL）	IL-13/（pg/mL）	IFN-γ/（pg/mL）
空白组	90.00±4.41	88.69±11.60	162.47±21.74	48.99±22.41	595.34±168.11
模型组	143.33±25.17[a]	67.60±3.53[b]	221.73±12.10[b]	97.65±25.55[b]	108.37±88.32[b]
地塞米松组	84.44±16.44[c]	80.81±5.49	138.13±26.24[c]	82.18±13.48[d]	456.81±130.19[d]
小青龙汤组	90.56±5.36[d]	85.43±6.66[d]	44.56±15.83[c]	65.61±30.54[d]	288.67±161.60[d]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与空白组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.01$；d：与模型组比较，$P<0.05$。

降低（$P<0.01$）；与模型组比较，地塞米松组和小青龙汤组大鼠肺组织中IL-13、TNF-α、TRPM2 mRNA的相对表达量均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），地塞米松组大鼠肺组织中MALAT1 mRNA的相对表达量及小青龙汤组大鼠肺组织中MALAT1、IFN-γ mRNA的相对表达量均显著升高（$P<0.01$）。结果见表5。

表5　各组大鼠肺组织中IL-13、TNF-α、IFN-γ、MALAT1和TRPM2 mRNA的相对表达量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	IL-13	TNF-α	IFN-γ	TRPM2	MALAT1
空白组	1.00±0.07	1.00±0.02	1.01±0.18	1.01±0.18	1.00±0.05
模型组	1.32±0.03[a]	1.77±0.07[a]	0.35±0.23[b]	2.64±0.24[b]	0.58±0.11[b]
地塞米松组	0.96±0.28[c]	1.57±0.05[d]	0.57±0.01	1.65±0.02[d]	1.05±0.09[d]
小青龙汤组	0.72±0.14[d]	0.81±0.05[d]	2.11±0.29[d]	1.66±0.05[d]	1.38±0.08[d]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与空白组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.05$；d：与模型组比较，$P<0.01$。

3.1.7　肺组织中TRPM2蛋白表达检测结果

与空白组（0.86±0.01）比较，模型组大鼠肺组织中TRPM2蛋白表达量（1.18±0.08）显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，地塞米松组和小青龙汤组大鼠肺组织中TRPM2蛋白表达量（分别为0.75±0.03、0.62±0.04）均显著降低（$P<0.01$）。结果见图3。

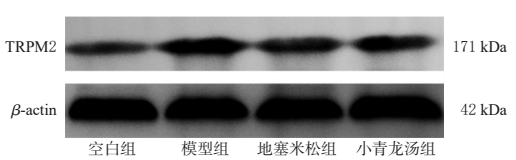


图3　各组大鼠肺组织中TRPM2蛋白的电泳图

3.2　小鼠实验结果

3.2.1　血清中氧化应激指标及炎症因子水平测定结果

与野生模型组比较，野生小青龙汤组小鼠血清中MDA、IL-13、TNF-α水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），SOD、IFN-γ水平均显著升高（$P<0.01$）；与野生小青龙汤组比较，*MALAT1*$^{(-/-)}$小青龙汤组小鼠血清中MDA、IL-13、TNF-α水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），SOD、IFN-γ水平均显著降低（$P<0.01$）。结果见表6。

3.2.2　肺组织中TRPM2 mRNA表达量检测结果

与野生小青龙汤组（1.00±0.24）比较，*MALAT1*$^{(-/-)}$小青龙汤组小鼠肺组织中TRPM2 mRNA的表达量（2.19±0.35）显著升高（$P<0.05$）；与*MALAT1*$^{(-/-)}$模型组（4.88±0.69）比较，*MALAT1*$^{(-/-)}$小青龙汤组小鼠肺组织中TRPM2 mRNA的表达量显著降低（$P<0.05$）。

表6　野生型和*MALAT1*$^{(-/-)}$小鼠血清中氧化应激指标和炎症因子表达量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	氧化应激指标		炎症因子		
	MDA/（nmol/mL）	SOD/（U/mL）	IL-13/（pg/mL）	TNF-α/（pg/mL）	IFN-γ/（pg/mL）
野生模型组	10.32±0.69	19.07±0.80	30.13±4.35	37.28±5.35	69.79±7.86
野生小青龙汤组	3.32±0.45[a]	25.54±1.03[a]	13.28±4.87[b]	12.79±3.62[a]	240.66±12.29[a]
MALAT1$^{(-/-)}$模型组	11.80±1.38	19.90±3.10	40.52±7.18	53.39±4.53	70.14±8.40
MALAT1$^{(-/-)}$小青龙汤组	8.36±1.02[c]	21.99±0.69[c]	31.87±6.56[d]	38.58±5.95[c]	122.35±12.56[c]

a：与野生模型组比较，$P<0.01$；b：与野生模型组比较，$P<0.05$；c：与野生小青龙汤组比较，$P<0.01$；d：与野生小青龙汤组比较，$P<0.05$。

3.2.3　肺组织中TRPM2蛋白表达量检测结果

与*MALAT1*$^{(-/-)}$模型组（1.17±0.14）比较，*MALAT1*$^{(-/-)}$小青龙汤组小鼠肺组织中TRPM2蛋白表达量（0.99±0.16）显著降低（$P<0.05$）；与野生小青龙汤组（0.84±0.19）比较，*MALAT1*$^{(-/-)}$小青龙汤组小鼠肺组织中TRPM2蛋白表达量显著升高（$P<0.05$）。结果见图4。



图4　野生型和*MALAT1*$^{(-/-)}$小鼠肺组织中TRPM2蛋白相对表达量的电泳图

4　讨论

哮喘的发病机制复杂，寒饮蕴肺证是哮喘中最常见、症状最重的一类证候，其主要病理特征与寒邪束肺、饮停肺络有关，表现为气道高反应性、呼吸受限等[16]。本研究通过大鼠模型验证了小青龙汤对哮喘寒饮蕴肺证的显著改善作用。肺功能和病理结果显示，哮喘寒饮蕴肺证大鼠肺功能下降、气道阻力升高，伴随明显的炎症细胞浸润及胶原纤维沉积，符合“寒饮蕴肺”所致气道阻滞、肺络不通的病理特点。经小青龙汤干预后，大鼠各项肺功能指标显著改善，肺组织胶原纤维显著减少，肺组织病理损伤减轻。

气道高反应性、气道重塑或可逆性气流限制常由气道炎症引起，故气道炎症被认为是哮喘的核心病理改变[17-18]，控制气道炎症是治疗哮喘的关键。本研究结果显示，经小青龙汤干预后，模型组大鼠血清中TNF-α、IL-13水平均有不同程度下降，IFN-γ水平升高，表明小青龙汤可有效抑制气道炎症。另外，哮喘患者体内氧化应激水平升高，氧化应激产生的代谢产物会介入哮喘的炎症诱发过程[19]。MDA含量反映机体内脂质过氧化的程度，间接表达细胞氧化损伤的程度；其常与SOD的测定相结合，而SOD活力可间接反映机体清除自由基的能力[20]。本研究结果显示，哮喘寒饮蕴肺证大鼠体内氧化损伤明显，MDA含量升高，SOD活力下降；经小青龙汤干预后，大鼠血清内MDA含量显著降低，SOD活力显著升高，提示“形寒”“饮冷”诱导下的哮喘具有明显的氧化应激反应，而小青龙汤可有效逆转这一反应，增强抗氧化能力，缓解组织损伤。

研究表明，MALAT1与肺系疾病的发生和发展密切相关，与炎症调控亦有关[21]。为验证关键分子机制，本研究通过大鼠实验，初步探讨了小青龙汤发挥作用的可能途径。研究结果显示，经小青龙汤干预后，大鼠肺组织中MALAT1表达量显著升高，TRPM2 mRNA及其蛋白表达量均显著降低。TRPM2通道作为氧化应激感受器，参与免疫细胞调节的炎症反应；TRPM2通道被激活后，会介导炎症因子释放及细胞损伤，加剧炎症反应和组织损伤[22]。本研究通过体内敲除*MALAT1*基因，进一步验证小青龙汤的作用机制。结果显示，在*MALAT1*缺失背景下，小青龙汤的治疗效果明显减弱；与野生小青龙汤组比较，*MALAT1*$^{(-/-)}$小青龙汤组小鼠体内MDA、IL-13、TNF-α水平均升高，IFN-γ水平降低，SOD活力下降，TRPM2 mRNA和蛋白表达量显著升高，提示MALAT1可能为小青龙汤调控氧化应激与炎症的关键靶点。

综上所述，小青龙汤可能通过lncRNA MALAT1调控氧化应激反应，抑制TRPM2的激活，进而减轻气道炎症反应。但小青龙汤对哮喘寒饮蕴肺证气道炎症的干预作用可能涉及其他通路，尚需进一步完善；且本研究受实验条件等因素影响，各项指标检测的样本量相对较小，尤其是使用的*MALAT1*$^{(-/-)}$小鼠获取成本较高，导致实验样本受限。但本实验通过严格的随机化分组及多项指标交叉验证，可增强结果的可靠性。笔者将在未来的研究中进一步扩大样本量，以提升研究的严谨性与应用价值。

参考文献

[1] MAUER Y，TALIERCIO R M. Managing adult asthma：the 2019 GINA guidelines[J]. Cleve Clin J Med，2020，87(9)：569-575.

[2] 范新凤，李艳玲，孙晓宝，等. 孟鲁司特钠咀嚼片联合布地奈德混悬液治疗急性期支气管哮喘患儿的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志，2023，39(3)：320-323.

[3] PAN T，ZHU Q J，XU L X，et al. Knocking down TRPM2 expression reduces cell injury and NLRP3 inflammasome activation in PC12 cells subjected to oxygen-glucose deprivation[J]. Neural Regen Res，2020，15(11)：2154-2161.

[4] LUO Y，YU X，MA C，et al. Effects of calcium-binding sites in the S2-S3 loop on human and *Nematostella vectensis* TRPM2 channel gating processes[J]. J Zhejiang Univ-Sc B，2019，20(12)：972-982.

[5] RADHAKRISHNAN R，KOWLURU R A. Long noncoding RNA MALAT1 and regulation of the antioxidant defense system in diabetic retinopathy[J]. Diabetes，2021，70(1)：227-239.

[6] 李红旗. 外泌体lncRNA-MALAT1靶向Nrf2调控树突状细胞成熟在动脉粥样硬化中的作用和机制研究[D]. 合肥：安徽医科大学，2019.

[7] HYRKÄS H，IKÄHEIMO T M，JAAKKOLA J J K，et al. Asthma control and cold weather-related respiratory symptoms[J]. Respir Med，2016，113：1-7.

[8] 解玉，刘成，郑含笑，等. 小青龙汤对哮喘小鼠气道重塑过程中TGF-β_1和IL-13表达的影响[J]. 上海中医药杂志，2016，50(5)：83-86.

[9] 吴奎，王彦，毕玉田，等. 小青龙汤对哮喘小鼠气道变应性炎症作用的研究[J]. 重庆医学，2014，43(17)：2145-2148.

[10] 郑永艳，周园，周联，等. 小青龙汤抗过敏作用及其机制研究[J]. 时珍国医国药，2017，28(5)：1052-1055.

[11] WANG B，FAN X X，SUN Q W，et al. Xiaoqinglong decoction enhances autophagy to antagonist airway inflammation induced by cold in asthmatic rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med，2022，2022：3943343.

[12] 范晓璇，颜培正，张庆祥. 黄芪甲苷通过LC3/Beclin 1干预哮喘寒饮蕴肺证大鼠细胞自噬的机制[J]. 中华中医药杂志，2024，39(11)：6037-6042.

[13] 颜培正，孟庆岩，刘燕，等. 中药剂量对哮喘病寒饮蕴肺证大鼠肺功能的影响[J]. 辽宁中医杂志，2016，43(4)：843-845.

[14] 向双娣，程林辉，喻强强，等. 益气温阳护卫汤调控PI3K/Akt/mTOR自噬途径治疗支气管哮喘大鼠机制[J]. 中国实验方剂学杂志，2023，29(14)：38-46.

[15] 赵爱斌，汪岩. 大鼠灌胃注射用地塞米松磷酸钠肠道吸收情况的研究[J]. 山西职工医学院学报，2018，28(1)：36-37.

[16] HYRKÄS-PALMU H，JAAKKOLA M S，MÄKIKYRÖ E M S，et al. Subtypes of asthma and cold weather-related respiratory symptoms[J]. Int J Environ Res Public Health，2022，19(14)：8790.

[17] CONDELLO M，PELLEGRINI E，CARAGLIA M，et al. Targeting autophagy to overcome human diseases[J]. Int J Mol Sci，2019，20(3)：725.

[18] MCALINDEN K D，DESHPANDE D A，GHAVAMI S，et al. Autophagy activation in asthma airways remodeling[J]. Am J Respir Cell Mol Biol，2019，60(5)：541-553.

[19] 文颖. HIF-1α、氧化应激状态与支气管哮喘的相关性研究[D]. 太原：山西医科大学，2021.

[20] 胡凡艳. 七氟醚预处理对肺叶切除术患者单肺通气诱导的氧化应激损伤的影响[D]. 济南：山东大学，2012.

[21] ZHANG M，ZHANG X Y，CHU X Y，et al. Long noncoding RNA MALAT1 plays a protective role in bronchopulmonary dysplasia via the inhibition of apoptosis and interaction with the Keap1/Nrf2 signal pathway[J]. Transl Pediatr，2021，10(2)：265-275.

[22] 张占琴，王辉，蒋永泼. TRPM2基因敲除通过调控GSK3β改善脂多糖诱导小鼠抑郁样行为[J]. 实用医学杂志，2021，37(10)：1245-1249，1256.

（收稿日期：2025-02-24　修回日期：2025-06-05）

（编辑：林　静）