

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.01.010

三七总皂苷对支气管哮喘小鼠气道炎症及气道重建的影响*

聂修鹏^{1,2#} 毛小琴^{2#} 李丰良² 彭静³ 牛华^{2△}

(1 昆明理工大学生命科学与技术学院 云南 昆明 650500; 2 云南省第一人民医院检验科 云南 昆明 650032;

3 云南中医学院病原生物学与免疫学实验室 云南 昆明 650032)

摘要 目的:探讨三七总皂苷对支气管哮喘小鼠气道炎症及气道重建的影响。**方法:**选择昆明种小鼠 24 只,将其随机分为三七总皂苷(PNS)治疗组、阳性对照组(哮喘组)和阴性对照组,每组 8 只。小鼠腹腔内注射氢氧化铝-卵清蛋白悬浊液(OVA-Al(OH)₃)进行致敏,致敏完成后用 2%卵清蛋白溶液(OVA)雾化激发,在激发前 30 分钟给药治疗,雾化激发 6 周。建模完成后,做心肺组织灌流,取左肺固定做 H&E 染色,镜下观察评估气道病理学改变(气道狭窄阻塞率、气道上皮坏死糜烂率、上皮细胞杯状化生率、炎性细胞浸润率及平滑肌增生率);行免疫组织化学染色,用图像分析软件半定量测量转化生长因子- β 1(TGF- β 1)的含量;行特殊染色,用图像分析软件测量基底膜厚度;取右肺组织,利用酶联免疫吸附法(ELISA)测定肺组织匀浆白介素-17(IL-17)因子的水平。**结果:**①各组小鼠经心肺组织灌流后,与哮喘组比较,三七治疗组小鼠的肺部红肿减轻,肺表颜色较正常组略微泛红。②三七治疗组气道狭窄率、上皮细胞坏死率、炎细胞浸润率、平滑肌增生率均显著低于哮喘组($P<0.05$),但与正常组比较无显著性差异($P>0.05$)。③三七治疗组气道上皮细胞 TGF- β 1 含量显著低于哮喘组($P<0.001$),肺组织白介素-17 含量降低至哮喘组一半以下($P>0.05$),与对照组相比均无显著性差异($P=0.94, P=0.23$)。④哮喘组、三七组和对对照组小鼠的支气管基底膜厚度分别为 (0.7893 ± 0.014) 、 (0.7216 ± 0.016) 、 (0.5655 ± 0.012) μm ,哮喘组显著高于三七组和对对照组,均具有显著性差异($P<0.05$)。**结论:**三七总皂苷可以有效改善支气管哮喘小鼠的气道重建,并抑制其气道炎性。

关键词:支气管哮喘;转化生长因子;白介素-17;基底膜厚度

中图分类号:Q95-3;R562.25 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)01-39-06

The Effects of Panax Notoginseng Saponins on Airway Inflammation and Remodeling in a Mouse Model of Bronchial Asthma*

NIE Xiu-peng^{1,2#}, MAO Xiao-qin^{2#}, LI Feng-liang², PENG Jing³, NIU Hua^{2△}

(1 Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan, 650500, China;

2 Department of Clinical Laboratory, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan, 650032, China;

3 Pathogenic biology and Immunology Laboratory, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming, Yunnan, 650032, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effects of Panax notoginseng saponins on the airway inflammation and remodeling in a mouse model of bronchial asthma. **Methods:** Twenty-four Kunming mice were selected and randomly divided into Panax notoginseng saponins treatment (PNS) group, positive control group (asthma group) and control group. Each group was fed eight mice. Mice were sensitized by intraperitoneal (i.p.) injections of OVA-AL(OH)₃ suspension and exposed to 2% OVA solution for challenge after sensitization. 0.5 h before challenge for 6 weeks. After the completion of modeling, the cardiopulmonary tissues were removed for tissue perfusion. The left lung was removed for staining by hematoxylin and eosin (H&E) to assess airway pathological alteration under a light microscopy (the ratio of airway stenosis, the ratio of erosion and necrosis of airway epithelial cells, the ratio of goblet cell metaplasia, the ratio of inflammatory cell infiltration and the ratio of smooth muscle hyperplasia). The levels of TGF- β 1 was detected by immunohistochemical staining, and analyzed using a Leica imaging system and computerized image analysis software to semi-quantified. The levels of IL-17 in right lung tissue supernatants were measured by ELISA. **Results:** ① After cardiopulmonary perfusion, in PNS group, the red and swollen in lung tissue was alleviated in comparison with the asthma group, and a little red in comparison with the control group. ② In PNS group, the ratio of airway stenosis, the ratio of erosion and necrosis of airway epithelial cells, the ratio of goblet cell metaplasia, the ratio of inflammatory cell infiltration and the ratio of smooth muscle hyperplasia were significantly lower than those of the asthma group ($P<0.05$). But no significant difference was observed between PNS group and control group ($P>0.05$). ③ The expression of TGF- β 1 in PNS group was significantly lower than that of the asthma group ($P<0.001$). The level of IL-17 in PNS group decreased to less than a half of asthma group ($P>0.05$). No significant difference was found when compared with the control group ($p=0.94, p=0.23$). ④ The thickness of airway basement membrane of asthma group, PNS group and control group were (0.7893 ± 0.014) , (0.7216 ± 0.016) , and $(0.5655\pm 0.012)\mu\text{m}$ respectively, which was significantly higher in the Asthma group than those of the PNS group and control group ($P<0.05$). **Conclusion:** PNS could effectively alleviate the process of airway reconstruction and inhibit the airway inflammation in a mouse model of

* 基金项目: 云南省应用基础研究计划项目(2011FB217, 2011FB216)

为共同第一作者

作者简介: 聂修鹏(1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药新制剂的药理作用;

毛小琴(1975-), 女, 副主任医师, 硕士生导师, 副教授, 研究方向: 病原微生物医学检验

△ 通讯作者: 牛华(1963-), 女, 主任医师, 硕士生导师, 教授, 主要研究方向: 临床医学检验, E-mail: huanu9980@163.com

(收稿日期: 2014-05-09 接受日期: 2014-06-30)

bronchial asthma.

Key words: Bronchial asthma; TGF- β 1; IL-17; Thickness of basement membrane

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R562.25 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)01-39-06

前言

气道炎症是各型各期支气管哮喘(简称哮喘)的主要病理学特征之一。慢性炎症导致支气管周及血管周出现各种炎性细胞,炎性细胞、损坏的上皮细胞及肥大的腺体产生多种炎症介质、细胞因子、粘液及痰液。当哮喘患者受到过敏原或其他刺激后,气道管腔出现明显过强或过早的收缩反应,致使气道内气流阻力增大,即气道高反应性^[1]。气道炎症及气道高反应性长期反复发作,导致气道组织病变而发生重建。IL-17是由Th17细胞和先天免疫细胞产生,可刺激多种促炎介质的产生^[2],从而募集中性粒细胞等多种免疫细胞到达气道炎症部位,加剧自身过敏炎症反应。此外,IL-17也参与诱导MUC粘蛋白基因的表达^[3],使气道上皮杯状细胞及肥大细胞黏液分泌量增加。TGF- β 1是一种多功能的细胞因子,在多种细胞内均可表达分泌,在气道重建的过程中起主导作用,不仅直接促进成纤维细胞的生长与分化,诱导平滑肌增生,而且间接抑制蛋白激酶网络中的一些蛋白因子,使平滑肌细胞分泌蛋白的降解减少,导致网状基底膜下胶原沉积、气道壁增厚^[4]。

目前,治疗哮喘有抗过敏炎症疗法和抗TGF- β 1抗体疗法,糖皮质激素是目前治疗哮喘最有效的抗炎药之一,但大剂量或者长期使用不仅会使基底膜增厚,而且会引起严重的副作用^[5]。研究发现,使用抗TGF- β 1抗体治疗在气道重建的进程中会增强气道高反应性,也会增加肺部成纤维细胞外基质胶原沉积^[6]。中医学认为,宿痰伏肺是哮喘的夙根^[7]。痰浊阻滞气机,阻碍血液流通,则血郁为淤;瘀血阻滞,痰瘀互结,则气道狭窄,脉络不通,肺气郁滞;日久更致津液运行受碍,肺气亏虚,缠绵难愈。从现代医学角度而言,在哮喘气道重塑过程中,大量炎症介质的产生、细胞外基质的沉积可以理解为中医所谓的“宿痰”之邪的形成。因此,中医祛痰化痰疗法与现代医学抗炎、调节细胞免疫治疗哮喘不谋而合。

三七根 *Panax notoginseng* (Burk.) F.H.Chen(五茄科,人参属)是我国名贵的中药材,其有效的生物活性成分三七总皂苷能促进血液循环、活血化瘀、抗血栓、抗炎、抗肿瘤和提高免疫力等^[8]。目前,尚未有文献报道三七总皂苷用于治疗哮喘。本研究通过观察和分析三七总皂苷对支气管哮喘小鼠气道炎症、气道重建、气道内TGF- β 1、IL-17表达和基底膜厚度的影响,旨在探讨三七总皂苷用于治疗支气管哮喘的价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

选定昆明种雌性小鼠24只为实验动物,6~8周龄,体重(20.0 $\pm$ 2)g,由昆明医科大学实验动物学部提供;地塞米松磷酸钠注射液5mg/mL,由山东新华制药股份有限公司提供;鸡卵清蛋白(OVA)、氢氧化铝AL(OH)₃由Sigma公司提供;变性裂解液由上海生工公司提供(产品号PL014);白介素-17细胞因子(IL-17)ELISA试剂盒由武汉博士德公司提供;蛋白定量试剂盒由美国BIO-RAD公司提供;转化生长因子- β 1(TGF- β 1)抗体由美国R&D公司提供;链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶由丹麦DaKo公司提供;基底膜六胺银染色试剂盒

由北京世济合力公司提供。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 动物分组和模型的制备 将24只小鼠随机分为三七总皂苷(PNS)治疗组、阳性对照组(哮喘组)和阴性对照组,每组8只。三七总皂苷治疗组和哮喘组在第1天和第15天腹腔注射0.5mL卵清蛋白-氢氧化铝混悬液(OVA-AL(OH)₃)(含15 μ g OVA,40mg AL(OH)₃)致敏,第22天用2%卵清蛋白-生理盐水雾化激发。三七总皂苷治疗组雾化吸入激发前30min腹腔注射PNS 0.5mL(100mg/kg/d),哮喘组雾化吸入前30min腹腔注射0.5mL生理盐水。隔天雾化一次,每次45min,一共激发6周。正常对照组致敏和激发的过程相同,均用生理盐水代替OVA^[9]。

1.2.2 标本采集和处理 建模完成后麻醉小鼠,剪开胸腔,将心肺组织连同一起取出,做灌流冲洗。用注射器将生理盐水注入左心室,一定力度按压注射器,待渗出清液肺组织灌洗干净后,取左肺,用10%中性福尔马林固定液固定24小时,进行组织脱水、透明、浸蜡、包埋、切片,做常规H&E染色。取右肺组织冻存于液氮中备用。

1.2.3 免疫组织化学检测 TGF- β 1 的表达水平 石蜡切片(3 μ m)脱蜡和水化后,用蒸馏水冲洗三次,每次3分钟。沸水浴20分钟,对组织抗原进行修复。每张切片加50 μ L双氧水室温避光孵育10分钟。加入50 μ L一抗(TGF- β 1)室温下孵育30分钟。逐滴滴加50 μ L链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液,常温下孵育30分钟。滴加新鲜配制的DAB显色剂,苏木素复染,1:100盐酸酒精分化,TBST液冲洗返蓝。直接吹干,二甲苯透明,中性树胶封固,显微镜下观察结果。

1.2.4 特殊染色测定基底膜厚度 切片(3 μ m)脱蜡至水,操作步骤按照基底膜六胺银染色试剂盒说明书进行。

1.2.5 图像的采集及数据的获得 使用德国Leica成像系统采集图像。HE染色切片,在光学显微镜下观察气道病理学改变,利用病理学评分方法^[10]统计气道阻塞发生率,气道坏死率,气道上皮细胞杯状化生率,炎性细胞浸润率,平滑肌增生率。用计算机图像处理软件Image-Pro Plus 6.0半定量测定TGF- β 1含量,测定每张切片上观察到的支气管上皮细胞,其染色吸光度(AOD)平均值表示其含量(n=8)。用计算机图像处理软件Image-Pro Plus 6.0测定基底膜厚度,沿着每个支气管周的基底膜进行测量,测量每张切片上的所有观察到的支气管基底膜,其平均值表示基底膜的厚度(n=8)。

1.2.6 ELISA 法测定肺组织中 IL-17 因子水平 在液氮罐中取出冻存的肺组织,融化后吸去水分,加液氮充分研磨,待匀浆中没有明显的组织块,滴加裂解液继续研磨2分钟。将研磨液在冰上进行超声破碎,超声2s,孵化8s,共5min。将破碎液涡旋1min,冰上冷却2min,重复5次,随后在冰上振荡一小时。4 $^{\circ}$ C,12000 $\times$ g离心一小时,取上清,-80 $^{\circ}$ C保存^[11]。全蛋白的定量测定按照DIO-RAD蛋白定量试剂盒说明书进行,随后取等质量的蛋白质溶液,IL-17因子水平的测定按照ELISA试剂盒说明书进行。

1.3 统计学分析

各组数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用Graphpad prism 5软件处理数据,两组间均数比较用t检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组小鼠肺大体观的比较

做心肺组织灌流前,肺部成均一深红色(图 1A)。灌流完成

后,哮喘组肺部组织有明显的红肿、血块和血点(图 1B);三七总皂苷治疗组肺部呈微红色,有细微的红血丝(图 1C);对照组肺部组织干净,清晰,呈白色(图 1D)。这表明 PNS 对肺部组织有一定的活血化瘀的效果。

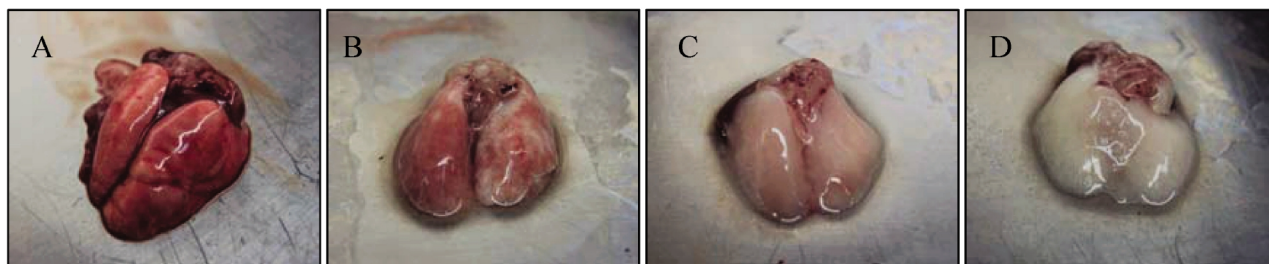


图 1 各组小鼠心肺组织灌流前后的肺大体观的对比图(A-未灌流,B-哮喘组,C-三七组,D-正常组)

Fig. 1 Comparison of the lung gross appearance of mice in different groups before and after cardiopulmonary perfusion (A-untreated, B-Asthma group, C-PNS group, D-Control group)

2.2 三组小鼠肺 H&E 染色结果的比较

H&E 染色后行镜下观察,哮喘组小鼠气道周围有大量炎性细胞浸润,包括嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞;气道上皮细胞发生杯状化生、坏死糜烂,肥大细胞产生粘液;气道壁增厚,平滑肌增生明显(图 2A)。三七总皂苷治疗组小鼠气道及血管周围有少量炎性细胞浸润,气道上皮细胞完整,

气道轮廓清晰(图 2B)。对照组小鼠整个肺部组织结构完整,清晰(图 2C)。由病理学计分方法统计得出:与哮喘组相比较,三七组气道狭窄率、气道上皮细胞坏死率、炎性细胞浸润率及平滑肌增生率均显著降低,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)(图 3),而其与正常组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),这表明三七总皂苷对哮喘小鼠的气道炎症及结构变化有一定的抑制或改善作用。

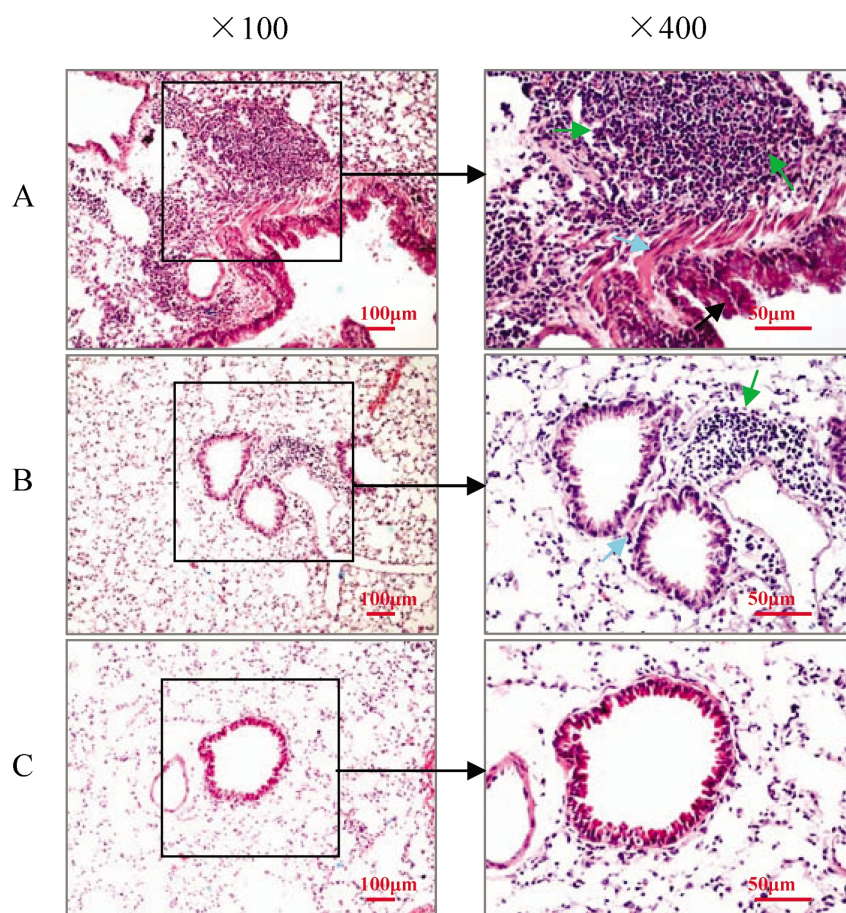


图 2 各组小鼠肺部组织切片 H&E 染色图比较(绿色箭头指示炎性细胞浸润;黑色箭头指示气道上皮细胞坏死、杯状化生;蓝色箭头指示平滑肌增生)(A-哮喘组,B-三七组,C-正常组)

Fig. 2 Comparison of the HE staining results of lung of mice in each group (Green arrow expressed inflammatory cells infiltration; Black arrow expressed airway epithelial cell necrosis, goblet cell metaplasia; Blue arrow expressed smooth muscle hyperplasia) (A-Asthma group, B-PNS group, C-Control group)

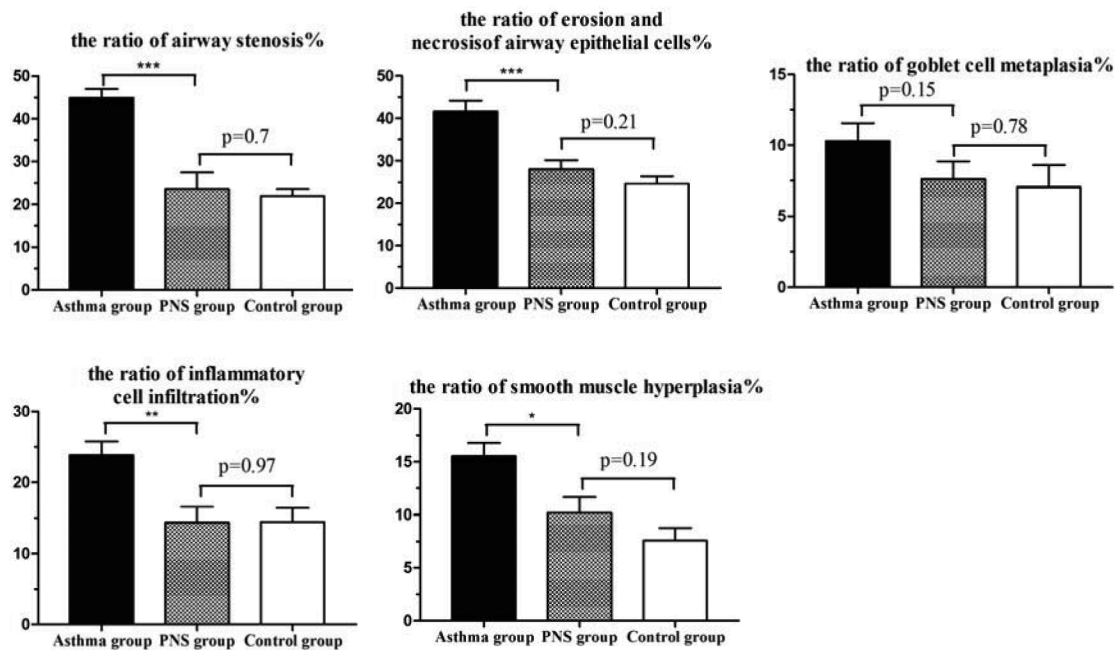


图3 各组小鼠气道病理学改变结果的比较

Fig. 3 Comparison of the changes of airway pathological of mice in each group

Note: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001, n=8.

2.3 各组小鼠气道上皮细胞中 TGF-β1 含量的比较

免疫组织化学染色后观察到哮喘组气道上皮细胞大面积染成棕色(AOD=0.1564±0.004),三七组少量气道上皮细胞染成棕黄色(AOD=0.0983±0.005),正常对照组气道上皮细胞染色较浅(AOD=0.0979±0.0039)。从散点分布图比较哮喘组与三七治疗组气道上皮细胞 TGF-β1 含量比较有显著性差异,三七组显著低于哮喘组(P<0.001),而三七组与对照组相比没有显著性差异(P=0.94),这表明三七总皂苷能显著降低哮喘小鼠支气管

管上皮细胞 TGF-β1 的含量,可达正常水平。

2.4 各组小鼠肺基底膜厚度的比较

小鼠肺部组织经特殊染色后,在 400× 光镜下观察,可见气道支气管基底膜被染成金属丝状(绿色方框内),用软件测定哮喘组基底膜厚度为(0.7893±0.014) μm,三七组为(0.7216±0.016) μm,对照组为(0.5655±0.012) μm,三七组显著高于哮喘组和对照组,均具有显著性差异(P<0.05)。这表明三七总皂苷可以有效抑制哮喘小鼠气道支气管基底膜的增厚(图 5)。

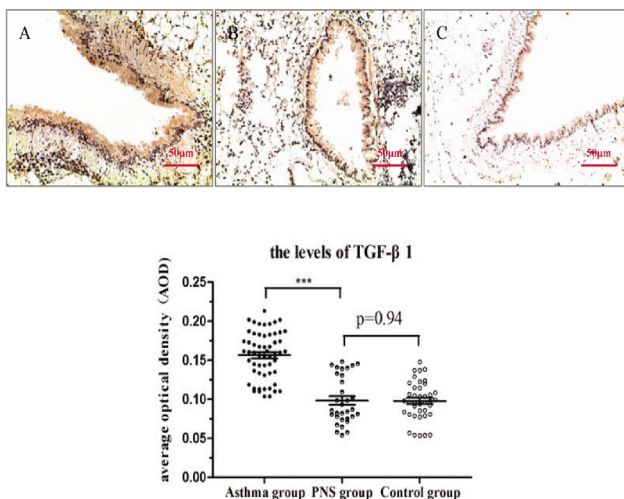


图4 各组小鼠肺组织 TGF-β1 免疫组织化学染色图片

及散点分布图比较(400×)(A-哮喘组,B-三七组,C-正常组)

Fig. 4 Comparison of the TGF-β1 expression of lung detected by immunohistochemical staining and the scatter distribution of mice

in each group (400×)(A-Asthma group, B-PNS group, C-Control group)

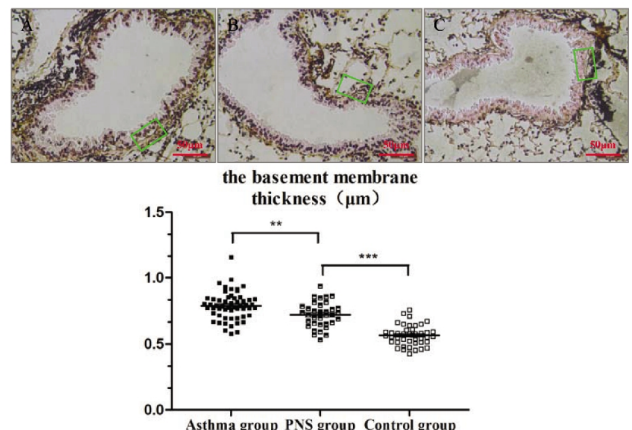


图5 各组小鼠气道基底膜厚度对比图及其厚度散点分布图比较(400×)

Fig. 5 Comparison of airway basement membrane thickness and the scatter distribution of mice in each group (400×)

(A-哮喘组,B-三七组,C-正常组)注:**P<0.01,***P<0.001,与三七组比较,n=8。

(A-Asthma group, B-PNS group, C-Control group)

Note: **P<0.01, ***P<0.001, compared with PNS group, n=8.

2.5 各组小鼠肺组织白介素-17水平的比较

经 ELISA 测得哮喘组肺组织 IL-17 的水平为 $4.381 \pm 1.316 \text{ pg/mg} \times 100$, 三七组为 $2.082 \pm 0.243 \text{ pg/mg} \times 100$, 正常组为 $1.719 \pm 0.160 \text{ pg/mg} \times 100$, 各组之间比较均无显著性差异 ($P > 0.05$), 但三七组 IL-17 水平接近哮喘组 1/2, 接近正常对照组含量水平, 表明三七总皂苷对哮喘肺组织 IL-17 的表达有一定的抑制作用(图 6)。

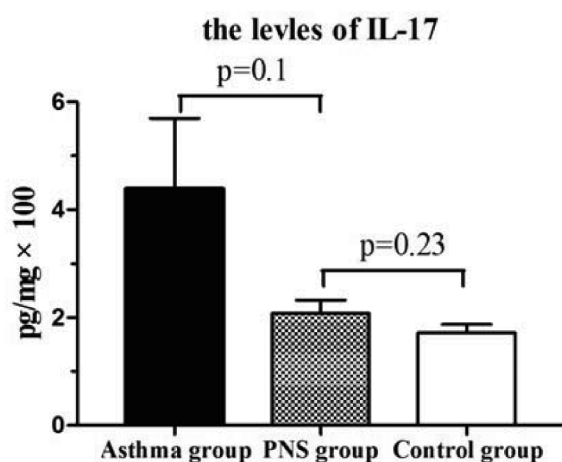


图 6 各组小鼠肺组织 IL-17 水平的比较, n=8

Fig. 6 Comparison of the IL-17 level of lung in each group mice, n=8

3 讨论

三七总皂苷含有的四种主要生物活性成分是人参皂苷 Rg1, Rb1, Rd 和三七皂苷 R1^[2], 其主要的药理功效是具有抗炎和活血化瘀作用。根据近年来国内外的研究报道, 推测其可能的作用机制是对抗肺部血管内游离的自由基, 清除气道上的炎症细胞, 减缓组织细胞凋亡^[3]。在本实验中, 三七治疗组肺部组织 IL-17 水平明显降低, 炎性细胞浸润率显著减少, 也印证了其具有的抗炎作用。另外三七总皂苷还可以抑制血小板的凝聚^[4], 防止微血栓的形成, 从我们对肺部灌流的结果可以清楚地看到三七能改善肺组织红肿。三七总皂苷的清淤作用表现在其能抑制成纤维细胞的增殖^[5], 避免了因气道结构组织增生而产生的胶原蛋白沉积在网状基底膜内, 从而抑制了气道壁的增厚。用三七治疗哮喘小鼠可使气道上皮细胞转化生长因子-β1 水平控制在正常水平内, 其结果是气道平滑肌增生不明显, 对网状基底膜厚度也有显著的降低作用。

慢性支气管炎哮喘患者的气道结构逐渐发生病理学改变, 最终导致气道重建。气道重建包括四个方面: 气道上皮细胞杯状化生、气道腺体增生导致气道内产生大量粘液、痰液^[6]; 气道上皮细胞坏死糜烂导致大量细胞核崩解、胞浆聚集^[7]; 气管及血管周围炎性细胞浸润, 产生大量炎性因子导致粘膜水肿^[8]; 气道平滑肌增生肥大、肌成纤维细胞大量产生导致胶原蛋白沉积、基底膜增厚, 其共同作用导致气道狭窄、气流受阻, 结果产生持续性的气道高反应性。本研究结果显示, 三七总皂苷处理的哮喘小鼠肺部组织淤青明显改善, 无大面积红肿出现, 炎性细胞数量减少, 气道上皮细胞结构完整, 无大面积坏死细胞聚集, 平滑肌细胞无明显增生现象; 气道狭窄率、气道上皮细胞坏

死率、炎性细胞浸润率及平滑肌增生率以及气道支气管基底膜均较对照哮喘哮喘明显降低, 这表明三七总皂苷能有效改善哮喘小鼠的气道重建。

Th17 细胞是近来发现的独立于 Th1、Th2 细胞免疫的 CD4⁺T 细胞新亚型^[9], IL-17 是由 Th17 细胞和先天免疫细胞产生的可刺激多种促炎介质的产生^[2], 从而募集中性粒细胞等多种免疫细胞到达气道炎症部位, 加剧自身过敏炎症反应的细胞因子。当哮喘发生时, IL-17 表达增加, 可引起炎症因子和趋化因子的高表达, 从而扩大机体免疫应答, 过高的免疫效应使哮喘患者的病情恶化。哮喘患者的气道上皮长期处于损伤破坏状态, IL-17 效应机制会诱导组织修复因子的表达^[20], 使气道壁得到持续反复修复, 加速了气道壁的增厚。本研究也表明哮喘小鼠肺组织中 IL-17 的表达显著升高, 而三七总皂苷对哮喘肺组织 IL-17 的表达有一定的抑制作用。

国外研究报道 TGF-β1 的表达与气道基底膜厚度、成纤维细胞数及哮喘发作的严重程度呈正相关^[21]。TGF-β1 由损坏的上皮细胞分泌, 通过 TGF-β 受体激活的 Smad 途径, TGF-β1 可以促使成纤维细胞转变成肌成纤维细胞^[22], 并进一步诱导平滑肌分裂素和内皮素-1 的产生^[23], 进而使肌成纤维细胞表型发生转化, 生成平滑肌细胞。活化的肌成纤维细胞和平滑肌细胞产生 I 型、III 型胶原蛋白, 致使基底膜网状结构改变, 包括胶原 III、V 型以及少量的胶原 I 型和纤维连接蛋白的增加^[24]。本研究结果显示经三七总皂苷处理的哮喘小鼠 TGF-β1 含量显著低于哮喘小鼠 ($P < 0.001$), 且接近正常小鼠。

目前, 临床上使用三七注射液治疗消化道出血、眼前房出血, 三七皂苷冻干粉针治疗冠心病、脑血栓、高胆固醇血症^[25]等都表现出优异的疗效。许多研究表明, 活血化瘀药物能有效阻止纤维母细胞合成胶原蛋白, 软化和吸收增生性病变组织^[26]。而气道重建表现为平滑肌增殖和基底膜增厚, 这符合中医学微观辨证意义上“瘀”的特征, 中医上祛除“宿痰”治疗哮喘也显示出较好的疗效。本研究提示三七总皂苷可以抑制气道炎症, 改善气道上皮细胞及其周围平滑肌细胞结构的紊乱, 同时对与哮喘相关的细胞因子及胞外蛋白的分泌有良好的抑制作用。

参考文献(References)

- [1] Busse WW, Lemanske RF, Jr. Asthma[J]. N Engl J Med, 2001, 344(5): 350-362
- [2] Bellini A, Marini MA, Bianchetti L, et al. Interleukin (IL)-4, IL-13, and IL-17A differentially affect the profibrotic and proinflammatory functions of fibrocytes from asthmatic patients[J]. Mucosal Immunol, 2012, 5 (2):140-149
- [3] Fujisawa T, Velichko S, hai PT, et al. Regulation of airway MUC5AC expression by IL-1β and IL-17A; the NF-κappaB paradigm [J]. J Immunol, 2009, 183(10):6236-6243
- [4] Shi Y, Dong Y, Duan Y, et al. Substrate stiffness influences TGF-β1-induced differentiation of bronchial fibroblasts into myofibroblasts in airway remodeling [J]. Mol Med Rep, 2013, 7(2): 419-424
- [5] Shimoda T, Obase Y, Kishikawa R, et al. Impact of inhaled corticosteroid treatment on 15-year longitudinal respiratory function changes in adult patients with bronchial asthma [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2013, 162(4): 323-329

- [6] Royce SG, Tan L, Koek AA, et al. Effect of extracellular matrix composition on airway epithelial cell and fibroblast structure: implications for airway remodeling in asthma[J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2009, 102(3):238-246
- [7] Liu YQ, Zhao Y, Liu MM, et al. Interaction effects of breastfeeding and passive smoking on asthma and asthma related symptoms among children [J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2013, 47(6): 523-528
- [8] Sun H, Yang Z, Ye Y. Structure and biological activity of protopanaxatriol-type saponins from the roots of *Panax notoginseng* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2006, 6(1):14-25
- [9] Locke NR, Royce SG, Wainwright JS, et al. Comparison of airway remodeling in acute, subacute, and chronic models of allergic airways disease[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 36(5):625-632
- [10] Cosio M, Ghezzi H, Hogg JC, et al. The relations between structural changes in small airways and pulmonary-function tests [J]. *N Engl J Med*, 1978, 298(23):1277-1281
- [11] Wu Y, Zhou J, Zhang X, et al. Optimized sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis of soluble proteins from chicken bursa of Fabricius[J]. *Proteome Sci*, 2009, 7:38
- [12] Zeng M, Pan L, Qi S, et al. Systematic review of recent advances in pharmacokinetics of four classical Chinese medicines used for the treatment of cerebrovascular disease [J]. *Fitoterapia*, 2013, 88C:50-75
- [13] He NW, Zhao Y, Guo L, et al. Antioxidant, antiproliferative, and pro-apoptotic activities of a saponin extract derived from the roots of *Panax notoginseng* (Burk.) F.H. Chen [J]. *J Med Food*, 2012, 15(4): 350-359
- [14] Yao Y, Wu WY, Guan SH, et al. Proteomic analysis of differential protein expression in rat platelets treated with notoginsenosides [J]. *Phytomedicine*, 2008, 15(10):800-807
- [15] Dai JP, Chen XX, Zhu DX, et al. *Panax notoginseng* saponins inhibit areca nut extract-induced oral submucous fibrosis in vitro [J]. *J Oral Pathol Med*, 2014, 43(6):464-470
- [16] Kanoh S, Tanabe T, Rubin BK. IL-13-induced MUC5AC production and goblet cell differentiation is steroid resistant in human airway cells [J]. *Clin Exp Allergy*, 2011, 41(12):1747-1756
- [17] Boero S, Silvestri M, Ullmann N, et al. Modulation by flunisolide of tumor necrosis factor- α -induced stimulation of airway epithelial cell activities related to eosinophil inflammation [J]. *J Asthma*, 2010, 47(4): 381-387
- [18] Baluk P, Tammela T, Ator E, et al. Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation [J]. *Clin Invest*, 2005, 115(2):247-257
- [19] Kawaguchi M, Kokubu F, Fujita J, et al. Role of interleukin-17F in asthma [J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2009, 8(5):383-389
- [20] Li G, Yuan K, Yan C, et al. 8-Oxoguanine-DNA glycosylase 1 deficiency modifies allergic airway inflammation by regulating STAT6 and IL-4 in cells and in mice [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(2):392-401
- [21] Shi Y, Dong Y, Duan Y, et al. Substrate stiffness influences TGF- β 1-induced differentiation of bronchial fibroblasts into myofibroblasts in airway remodeling [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(2): 419-424
- [22] Camara J, Jarai G. Epithelial-mesenchymal transition in primary human bronchial epithelial cells is Smad-dependent and enhanced by fibronectin and TNF- α [J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2010, 3(1): 2
- [23] Boxall C, Holgate ST, Davies DE. The contribution of transforming growth factor- β and epidermal growth factor signalling to airway remodelling in chronic asthma [J]. *Eur Respir J*, 2006, 27(1):208-229
- [24] Ichimaru Y, Krimmer DI, Burgess JK, et al. TGF- β enhances deposition of perlecan from COPD airway smooth muscle [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 302(3):325-333
- [25] Tang ZS, Guo LW, Wang B, et al. Optimization of PNS/TGCO components effect on experimental Qi stagnation and blood stasis type of coronary heart disease with increase-decrease baseline geometric proportion design method [J]. *Journal of Chinese Medical Materials*, 2010, 33(9):1439-1442
- [26] Han M, Wen JK, Zhou XX. Effect of yiqi huoxue huayu recipe on vascular collagen turnover and relevant gene expression [J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medical*, 2004, 24(2): 136-139

(上接第 20 页)

- [21] WHO. Environmental Health Criteria 10 Carbon Disulfide[C]. Geneva: World Health Organizing, 1979
- [22] Li C, Taneda S, Taya K, et al. Effects of in utero exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on testicular function in immature male rats[J]. *Toxicology letters*, 2009, 185:1-8
- [23] Hougaard K S, Jensen K A, Nordly P, et al. Effects of prenatal exposure to diesel exhaust particles on postnatal development, behavior, genotoxicity and inflammation in mice [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2008, 5: 3
- [24] 杨文秀. 苯乙烯对生殖内分泌和动情周期的影响[J]. *癌变·畸变·突变*, 1995, (6):358-360
Yang Wen-xiu. Effect of styrene on reproductive endocrine and estrous cycle [J]. *Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis*, 1995, (6):358-360
- [25] Navas-Acien A, Sharrett AR, Sibergeld EK, et al. Arsenic exposure and cardiovascular disease: A systematic review of the epidemiologic evidence[J]. *Am J Epidemiol*, 2005, 162:103-104