

实验研究

翘苓清肺剂对哮喘大鼠气道平滑肌细胞外信号调节激酶通路的影响

张秋玲¹ 韩超¹ 徐俊² 杨柳² 梁慧玲¹ 杨洁颖¹

(1 广州市中医医院, 广州, 510130; 2 暨南大学药学院, 广州, 510632)

摘要 目的:探讨翘苓清肺剂在改善哮喘气道炎症及其可能的作用机制。方法:选取雌性SD大鼠50只,制备哮喘大鼠模型并随机分成5组,即正常组、模型组、地塞米松组 and 翘苓清肺剂低、高剂量组。分别采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞介素-1(IL-1)、IL-5及干扰素- γ (IFN- γ)的含量,并观察肺组织病理学改变;用免疫组织化学染色法观察细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)在肺组织内的表达,转化生长因子(TGF)- β_1 在支气管组织内的表达;用实时定量-聚合酶链反应(Real-time PCR)测定气道平滑肌组织中ERK mRNA含量。结果:模型组中ERK蛋白含量及mRNA水平,TGF- β_1 蛋白表达较正常组有显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,各干预组均能明显降低ERK mRNA及TGF- β_1 蛋白水平($P < 0.05$)。结论:翘苓清肺剂可明显改善哮喘大鼠的呼吸道症状,对气道具有保护作用,其作用机制可能与调节IL-4/IFN- γ 平衡失调、抑制ERK通路的磷酸化,减轻气道炎症有关。

关键词 翘苓清肺剂;气道炎症;ERK信号通路;转化生长因子- β_1

Study on Effects of Qiaoqin Qingfei Formula on ERK Pathway in Airway Smooth Muscle Cell of Asthmatic Rat

Zhang Qiuling¹, Han Chao¹, Xu Jun², Yang Liu², Liang Huiling¹, Yang Jieying¹

(1 Guangzhou Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510130, China; 2 School of Pharmacy,

Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract Objective: To investigate the Qiaoqin Qingfei Formula in improving airway inflammation and its possible mechanism. **Methods:** Fifty female SD rats with asthma were randomly divided into 5 groups; normal group, model group, dexamethasone group and, low and high dose group of Qiaoqin Qingfei Formula. The contents of interleukin-1 (IL-1), interleukin-5 (IL-5) and interferon gamma (IFN- γ) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected with ELISA method after administration. The proteins expression of the Erk1/2 of the lung tissues and the TGF- β_1 of the bronchial tissues were analyzed by Western blot method and the mRNA expression of ERK1/2 of the bronchial tissues were analyzed by Real-time PCR. **Results:** Compared with normal group, the mRNA expression of ERK and the protein expression of TGF- β_1 were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, all the treatment groups significantly decreased the expression of the ERK mRNA and the protein of TGF- β_1 ($P < 0.05-0.01$). **Conclusion:** Qiaoqin Qingfei Formula can significantly improve the symptoms of respiratory tract which has a protective effect on asthmatic rats. Its mechanism may be related to the inhibition of the phosphorylation of ERK signaling pathway, regulation of IL-4/IFN- γ imbalance and reduction of inflammatory cell infiltration.

Key Words Qiaoqin Qingfei Formula; Airway inflammation; ERK signal pathways; TGF- β

中图分类号:R289.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.07.037

支气管哮喘(哮喘)是由肥大细胞、嗜酸性粒细胞等多种炎症反应细胞参与的以慢性气道炎症反应和气道高反应性为特征的慢性呼吸道系统疾病。细胞外信号调节激酶(Extracellular-signal Regulated Kinase, ERK)是丝裂原活化激酶(MAPKs)家族中的重要成员之一,广泛参与细胞增殖、分化、凋亡等多种生理病理过程,作为一个重要的第二信号转导通路,

参与了哮喘气道慢性炎症反应、气道高反应性(AHR)和气道平滑肌的增殖等多种病理生理过程^[1-2]。近年来国内外有关ERK通路在哮喘发病机制中作用已成为研究热点之一。翘苓清肺剂为我院呼吸内科总结多年临床经验所拟的验方,并制成院内制剂临床使用20余年,治疗急慢性支气管炎临床疗效显著,深受广大病患欢迎。研究发现,其在防治

基金项目:广州市中医药、中西医结合项目(20152A011012);广州市中医药、中西医结合项目(20172A010009);广东省中医药局科技项目(20171224)

作者简介:张秋玲(1975.08—),女,本科,主管中药师,研究方向:医院药材鉴定、药房配剂,院内制剂等,E-mail:149792978@qq.com

哮喘方面也有良好效果。本研究拟通过卵清蛋白(OVA)诱导大鼠制备哮喘的动物病理模型,观察翘芩清肺剂对大鼠气道炎症的影响及初步探讨其可能的作用机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 选取 SPF 级 SD 大鼠 50 只,雌性,6~8 周龄,体重 150~180 g,由广东省医学实验动物中心提供(实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2013-0002)。实验动物许可证号:SCXK(粤)2012-2017。实验室常规饲养条件 20~25 °C 室温,自由饮食。

1.1.2 药物 翘芩清肺剂(下简称翘芩,由广州市中医医院制备,2.5 kg 生药量/L);地塞米松(浙江仙琚制药股份有限公司,批号:140692)。

1.1.3 试剂与仪器 Sigma 卵清鸡白蛋白(OVA)(USA,批号:A5253);生理盐水(常州兰陵制药有限公司,批号:H52020069);氢氧化铝干粉(广州化学试剂厂,批号:20191201-2);8%和10%免疫印迹预制胶(弗德生物有限公司,批号:20150501);TGF- β 抗体(Cell Signaling,批号:3711S);BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:PO012S);RIPA 蛋白裂解液(武汉博士德生物技术有限公司,批号:10C09A05);IFN- γ 、IL-4、IL-5 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);Western Blotting Luminol Reagent(PIERCE);预染蛋白质 Marker(Fermentas);PrimeScript^R RT reagent Kit、SYBR^R Premix Ex TaqTM (TaKaRa);PVDF 膜(Bio-Rad);RNAiso Plus(Takara-宝生物工程(大连)有限公司,批号:AA1607-1);曝光胶片(富士);蛋白酶抑制剂混合物(Cocktail, 100 \times);APS、TEMED(Sigma-Aldrich);Tween-20(Aresco);其余试剂均为国产分析纯以上。JJ-12J 型脱水机(武汉俊杰电子有限公司);402AI 型超声雾化器(鱼跃股份有限公司);RM2016 型病理切片仪(上海徕卡仪器有限公司);JB-P5 型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);KD-P 型组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);JB-L5 型冻台(武汉俊杰电子有限公司);IS-RDD3 型恒温振荡器(美国 Crystal Technology 公司);M-114 型显微镜(OPTIKA);ST16R 型高速冷冻离心机(美国 Thermo Sorvall 公司);凝胶电泳、电转仪(美国 Bio-RAD 公司);PB602-L 型电子分析天平(瑞士 METTLER 公司);UV-7504 型单光束紫外可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司);Safire2 型全波长多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 随机选取 50 只大鼠,经 7 d 适应性饲养后,采用文献^[3-4]方法制备哮喘模型。适应性饲养 1 周后,按大鼠体重随机分成 5 组:对照组、模型组、地塞米松组、翘芩高剂量组和低剂量组,每组 10 只。模型及药物组大鼠在实验第 1、8 天分别腹腔注射 10% 卵清蛋白(OVA)混悬液 1 mL 致敏,正常组给予生理盐水腹腔注射 1 mL。从第 15 天起,将大鼠置于密闭有机玻璃箱中用超声雾化器喷雾,任大鼠自行吸入,进行激发造模。每次喷雾 1% OVA 混悬液(正常组用生理盐水代替)。1 次/d,30 min/次,连续 2 周。

1.2.2 给药方法 自大鼠首次致敏第 2 天开始,各组动物均以相应药物灌胃。第 15 天开始在给药 30 min 后进行激发,(地塞米松组自第 15 天后,隔天给药);1 次/d,共 4 周:正常组:生理盐水 5 mL/(kg·d);模型组:生理盐水 5 mL/(kg·d);地塞米松组:0.27 mg/(kg·d);翘芩高剂量组:26 g/(kg·d);翘芩低剂量:6.5 g/(kg·d)。

1.2.3 标本采集及相关检测 连续给药 2 周后,于末次激发后 24 h 内进行腹腔麻醉(4% 戊巴妥钠,1 mL/kg 体重)取材:1)肺泡灌洗液(BALF):打开大鼠胸腔后,选取右肺进行支气管肺泡灌洗术,把 0.9% 氯化钠注射液 5 mL,以 2.5 mL/次注入气管内,缓慢反复抽吸,将灌洗液留取 3~4 mL,于 4 °C、2 000 r/min 离心 15 min,取上清液用于白细胞介素 4(IL-4)、白细胞介素-5(IL-5)及干扰素- γ (IFN- γ)的含量测定,具体步骤按酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒说明操作。2)肺组织:迅速打开大鼠胸腔,分离肺组织,以 10% 甲醛固定 24 h,常规脱水,石蜡包埋切片。3)气道组织:打开颈部皮肤,分离气管,切取气管至支气管段,冰冻切片,以 10% 甲醛内固定 24 h,常规石蜡切片。

1.2.3.1 肺组织病理观察 左上叶肺组织切片,苏木精-伊红(HE)染色后于镜下观察肺部病理变化。

1.2.3.2 免疫组织化学技术检测肺中 ERK1/2 及气道中转化生长因子(TGF)- β 蛋白的表达 检测步骤按说明书进行,依次为肺组织石蜡切片常规脱蜡至水,抗原修复,冷却后用磷酸缓冲盐溶液(PBS)(pH7.4)洗涤,置于 H₂O₂ 溶液(3%)中避光室温孵育,用 PBS 洗涤以消除内源性过氧化物酶活性。切片甩干,滴加牛血清白蛋白(BSA)(3%)后室温封闭 10 min,PBS 洗涤,滴加一抗,孵育后再滴加二抗,PBS 洗涤,洗涤,显色,复染细胞核,D. W. 洗涤后脱

水封片。

1.2.3.3 气道组织 ERK1/2 mRNA 表达的检测
用于实时 PCR 实验的引物序列如下表 1 所示。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

基因	Reverse primer 5'-3'	Forward primer 5'-3'
ERK1/2	TTCACGGCACCTTATTT	CTCAAGCCTTCCAACCTC
β -Actin	GACTCATCGTACTCTGCTTGC	GATTACTGCTCTGCTCTCTAGC

取样品(剪取每组肺组织约 30 mg)剪碎,冷冻研磨,用 Trizol 一步法提取总 RNA,按相应试剂盒操作说明书进行逆转录。逆转录反应(37 °C, 30 min);令逆转录酶失活(85 °C, 10 s);95 °C, 30 s(预变性);PCR 反应(95 °C, 5 s, 60 °C, 30 s, 共 40 个循环);解离(95 °C, 15 s;60 °C, 60 s);溶解曲线(65 °C 下 30 s)。

实时 PCR 扩增后,确认融解及扩增曲线良好,运用 $\Delta\Delta ct$ 法对数据进行统计分析。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,所有实验数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 翘芩清肺剂对气道炎症及肺部病理变化的影响 模型组肺泡间质明显增厚并伴随大量淋巴细胞浸润,支气管杯状细胞明显增殖,部分见脱落,固有层明显增厚并淋巴浸润明显,黏膜层明显增厚并纤维化,可见部分黏液腺增生;血管黏膜层纤维性增生;血管支气管管腔中可见黏液渗出形成黏液栓。各药物干预组固有层增厚程度较轻,黏膜层增厚较模型组减轻。其中,地塞米松组支气管结构完整,管径正常,管壁细胞排列紊乱,管周有少量炎性反应细胞浸润,上皮细胞及杯状细胞增殖减少;翘芩清肺剂组支气管黏膜上皮细胞及杯状细胞的增殖减少,支气管稍变形,炎性反应细胞浸润明显减少,管壁及平滑肌厚度明显减小,以上改变随翘芩清肺剂剂量的加大而减轻。对照组肺组织形态结构清晰完整,气管杯状细胞无明显增殖及脱落,血管结构完整,周围无明显炎性反应细胞浸润。见图 1A-E。

2.2 翘芩清肺剂对支气管肺泡灌洗液(BALF)中 IL-4、IL-5 及 IFN- γ 水平的影响 与对照组比较,模型组 BALF 中 IL-4、IL-5 的表达水平明显增加,IFN- γ 表达水平明显下降($P < 0.05$)。与模型组比较,经药物干预后,各药物组均能显著降低 IL-4 的表达及 IL-4/IFN- γ 的比值($P < 0.05$)。其中,翘芩清肺剂降低 IL-4 表达的作用随着剂量加大而增强。翘芩

清肺剂高剂量组及地塞米松组均可明显降低 IL-5 水平($P < 0.05$),IFN- γ 水平增加($P < 0.05$),但翘芩清肺剂低剂量组则对其无明显影响($P > 0.05$)。见表 2。

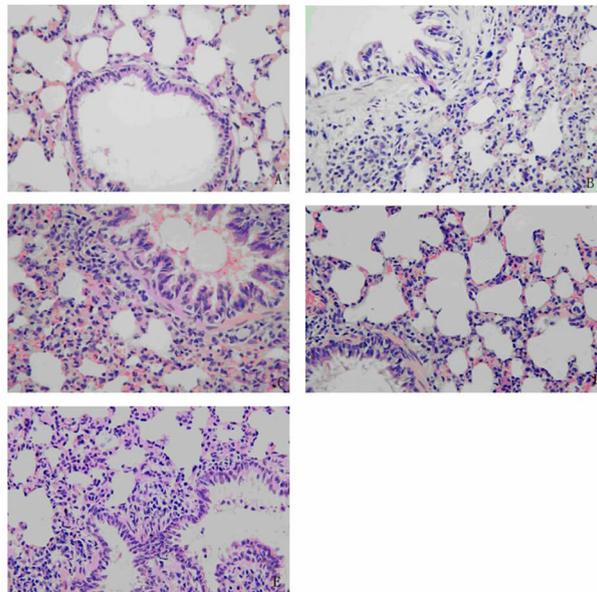


图 1 肺组织(HE 染色 $\times 20$)

注:A 对照组;B 模型组;C 地塞米松组;D 翘芩低剂量组;E 翘芩高剂量组

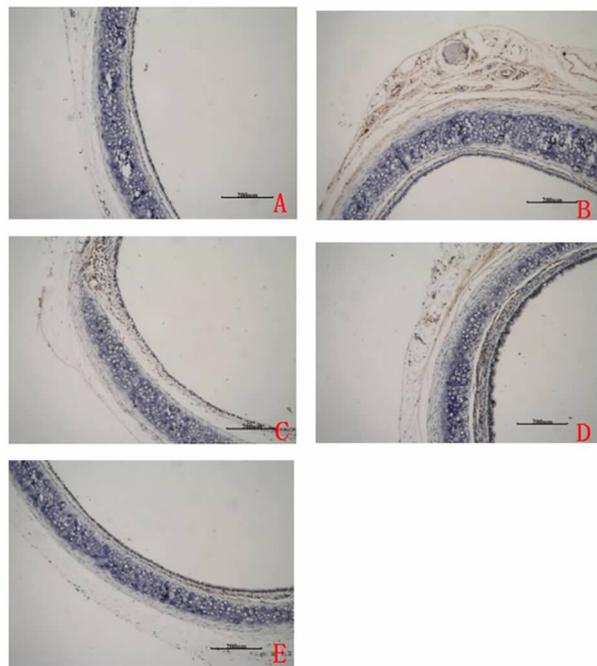


图 2 免疫组织化学染色法检测气道组织中 TGF- β_1 蛋白表达($\times 20$)

注:A 对照组;B 模型对照组;C 地塞米松组;D 翘芩低剂量组;E 翘芩高剂量组

2.3 翘芩清肺剂对气道中 TGF- β_1 及肺中 p-ERK1/2 蛋白表达的影响 与对照组比较,模型组大鼠肺

表2 翘芩清肺剂对哮喘大鼠 BALF 中 IL-4、IL-5 及 IFN- γ 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量[g/(kg·d)]	IL-4(ng/L)	IL-5(ng/L)	IFN- γ (μ g/L)	IL-4/IFN- γ
对照组	—	161.49 \pm 6.47	44.08 \pm 3.35	2.95 \pm 0.023	0.055 \pm 0.003
模型组	—	202.06 \pm 1.43*	47.67 \pm 3.67*	2.62 \pm 0.042*	0.077 \pm 0.001*
地塞米松组	2.7 $\times 10^{-4}$	176.69 \pm 16.36* Δ	44.67 \pm 2.05 Δ	2.80 \pm 0.110* Δ	0.063 \pm 0.006* Δ
翘芩清肺剂高剂量组	26	168.72 \pm 14.50* Δ	44.17 \pm 2.19 Δ	2.79 \pm 0.110* Δ	0.061 \pm 0.006* Δ
翘芩清肺剂低剂量组	6.5	183.98 \pm 22.31* Δ	47.09 \pm 2.85 Δ \square	2.67 \pm 0.086* \square	0.068 \pm 0.008* Δ

注:—为无数据;与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$;与地塞米松组比较, $\square P < 0.05$

表3 翘芩清肺剂对气道组织中 TGF- β_1 及肺组织中 p-ERK1/2 免疫组化染色切片的阳性表达 IOD/总 IOD 比值

组别	剂量[g/(kg·d)]	气道 TGF- β_1 阳性表达 IOD/总 IOD ($\bar{x} \pm s$)	p-ERK1/2 阳性表达 IOD/总 IOD ($\bar{x} \pm s$)
对照组	—	0.24 \pm 0.012*	0.342 \pm 0.092
模型组	—	0.634 \pm 0.036	0.714 \pm 0.086*
地塞米松组	2.7 $\times 10^{-4}$	0.425 \pm 0.041 Δ	0.449 \pm 0.031 Δ
翘芩清肺剂高剂量组	6.5	0.413 \pm 0.053 Δ	0.641 \pm 0.008
翘芩清肺剂低剂量组	26	0.359 \pm 0.066 Δ	0.632 \pm 0.099

注:—为无数据;与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

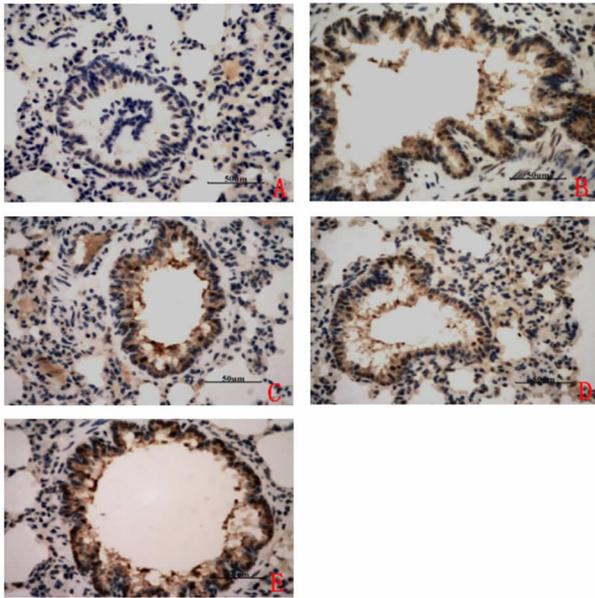


图3 免疫组化染色法检测肺组织中 p-ERK1/2 蛋白表达情况($\times 20$)

注:A 对照组;B 模型对照组;C 地塞米松组;D 翘芩低剂量组;E 翘芩高剂量组

组织中的 p-ERK1/2 及气道组织中 TGF- β_1 的蛋白表达明显增高($P < 0.05$);地塞米松组相对于模型组肺组织中 p-ERK1/2 的蛋白表达显著下降($P < 0.005$);翘芩组相对于模型组 p-ERK1/2 蛋白表达均有下降趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。药物组中的 TGF- β_1 蛋白表达均有明显降低($P < 0.05$);翘芩组降低 TGF- β_1 蛋白表达的作用略优于地塞米松组,且随剂量的增加作用有所增大,但药物组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2、3(A-E)、表 3。

3.4 翘芩清肺剂对气道组织中 ERK1/2 mRNA 表达的影响 与对照组比较,模型组的 ERK1/2 mRNA 含量显著增多($P < 0.05$);与模型组比较,各药物组均能明显降低 ERK1/2 mRNA 的表达($P < 0.05$);其中以翘芩高剂量组作用为最优,与翘芩低剂量组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4。

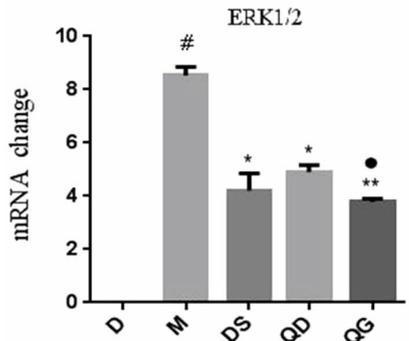


图4 翘芩清肺剂对气道组织中 ERK1/2 mRNA 影响的 CT 值 $\Delta\Delta$ CT 法结果柱状图

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

3 讨论

哮喘是由多种炎症反应递质和多种炎症反应细胞参与的慢性气道炎症,有研究者认为,气道重塑可能与气道炎症并存,并进一步导致慢性炎症的发生和持续存在^[5],其中气道平滑肌细胞增殖肥大占有重要地位。TGF- β_1 是目前发现的活性最强的促气道纤维化因子,气道平滑肌在 TGF- β_1 的刺激下,可诱发细胞炎症反应递质高分泌及收缩蛋白合成增加等,进而出现气道重塑、气道高反应性等一系列表现^[6-7]。在哮喘发病过程中,以 TGF- β 为代表的细

胞因子表达紊乱,从而激活相关信号通路,影响细胞的屏障功能是哮喘重要的病理机制之一,也是导致随后发生的气道高反应性、气道重塑的一个重要环节。

目前发现 ERK 在气道平滑肌上广泛分布并主要以 ERK1、ERK2 2 种亚型存在。ERK1/2 的磷酸化表示 ERK 信号通路被激活,其磷酸化的一系列底物可激活多种效应蛋白,并广泛参与细胞增殖、分化、凋亡等多种生理病理过程。研究结果表明 ERK 通路哮喘发病机制过程密切相关,并参与了哮喘气道高反应性、气道慢性炎症等的发生、发展^[1-2]。据此,本实验我们观察了翘芩清肺剂对 ERK 通路的影响,以期探讨翘芩清肺剂改善哮喘气道炎症反应可能的作用机制。

翘芩清肺剂为我院临床应用 20 余年的院内纯中药复方制剂,疗效确切,无明显不良反应。方中主要成分为连翘、黄芩、板蓝根、荆芥、杏仁等,全方清肺化痰,疏风清热。目前我们研究已证实,翘芩清肺剂对 OVA 诱导的大鼠哮喘发作具有抑制作用,可与临床疗效相印证。研究结果显示,翘芩清肺剂可明显地改善气道炎症反应,减轻支气管细胞增殖及平滑肌增厚,其作用机制可能与降低哮喘时过高的 PAF 与 ET 表达,纠正了 Th1/Th2 失衡有关^[6-7]。

从本实验结果可见,相对于对照组,ERK1/2、TGF- β_1 蛋白的表达、BALF 液中的 IL-4、IL-5 表达在模型组中显著增高,IFN- γ 表达则明显降低;用药后,各药物组均能明显降低病鼠肺中 ERK1/2 mRNA 及气道中 TGF- β_1 的表达水平;其中翘芩清肺剂高剂量组、翘芩清肺剂低剂量组降低 ERK1/2 mRNA 及 TGF- β_1 表达的作用与地塞米松组相当;翘芩清肺剂低剂量组降低 TGF- β_1 的蛋白表达效果与高剂量组相当。各药物组均能降低 IL-4 的含量及 IL-4/IFN- γ 的比值。其中地塞米松组及翘芩清肺剂高

剂量组可明显降低 IL-5 的表达,增加 IFN- γ 的表达,而翘芩清肺剂低剂量组对其则无明显作用。

其中,ERK 的气道表达的放免及 PCR 结果表明,翘芩清肺剂可明显降低 ERK mRNA 的表达,而放免结果虽 ERK 的蛋白表达均有所下降,但比较无统计学意义。由此推测,翘芩清肺剂可显著抑制 ERK1/2 mRNA 复制和(或)DNA 转录,而 ERK 的蛋白合成因迟于 RNA 和 DNA 的复制和转录,故未见 ERK 蛋白表达的差异显著性。由此说明,拟观察翘芩清肺剂对哮喘 ERK 蛋白变化的影响,需要更长的时间。

综上所述,我们认为,翘芩清肺剂防治哮喘的作用可能是通过降低 TGF- β_1 的表达,下调 p-ERK1/2 mRNA 水平,调节 ERK 信号通路的传导,减轻气道纤维化及气道平滑肌细胞的增殖,减缓炎症反应的发生发展等而实现的。

参考文献

- [1]徐妍,张焕萍. TNF- α 对哮喘模型大鼠气道平滑肌细胞增殖及 ERK1/2 活性的影响[J]. 中国比较医学杂志,2009,19(7):23-28,后插6.
- [2]石岩,孙萍. 细胞外信号调节激酶通道与支气管哮喘的研究进展[J]. 实用临床医学,2013,14(7):137-139.
- [3]Lee M, Kim S, Kwon OK, et al. Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of resveratrol, a polyphenolic stilbene, in a mouse model of allergic asthma[J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9(4):418-424.
- [4]Sakaguchi S. Regulatory T cells; key controllers of immunologic self-tolerance[J]. Cell, 2000, 101(5):455-458.
- [5]Bush A. How early do airway inflammation and remodeling occur? [J]. Allergol Int, 2008, 57(1):11-19.
- [6]韩超,齐春丽,潘竞镛,等. 翘芩清肺剂对哮喘大鼠 Th1/Th2 细胞因子失衡的影响[J]. 中国现代应用药学杂志, 2013, 30(11):1178-1182.
- [7]韩超,齐春丽,潘竞镛,等. 翘芩清肺剂对哮喘大鼠平喘作用与变态及血管活性因子关系的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4):176-179.

(2018-04-18 收稿 责任编辑:杨觉雄)