

引用:孔定,董晓斐. 咳喘宁对 RSV 诱发哮喘豚鼠 GSK-3 β 和 β -catenin 信号通路表达的影响[J]. 湖南中医杂志, 2020, 36(9):155-157.

咳喘宁对 RSV 诱发哮喘豚鼠 GSK-3 β 和 β -catenin 信号通路表达的影响

孔 定¹, 董晓斐²

(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙, 410208;

2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙, 410007)

[摘要] 目的:探讨咳喘宁防治呼吸道合胞病毒(RSV)诱发支气管哮喘的作用机制。方法:将60只2月龄豚鼠(雌雄各半)随机分为空白对照组,咳喘宁低、中、高剂量组,西药组,每组各10只(雌雄各半)。用RSV悬液滴鼻吸入后,卵清蛋白雾化豚鼠诱发哮喘模型,以地塞米松联合利巴韦林为阳性对照药,观察咳喘宁低、中、高剂量干预后糖原合成酶激酶3 β (GSK-3 β)、 β -连环蛋白(β -catenin)的蛋白表达情况。结果:在RSV诱发的哮喘豚鼠肺组织中,与空白对照组比较,模型组肺组织中GSK-3 β 表达明显减少, β -catenin蛋白表达明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,咳喘宁低、中、高剂量组及西药组豚鼠肺组织中GSK-3 β 表达增加, β -catenin表达减少,差异具有统计学意义($P < 0.05$);西药组与咳喘宁低、中、高剂量组各项指标比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:咳喘宁对RSV诱导的哮喘豚鼠具有抑制作用,其机制可能与WNT/ β -catenin信号通路有关。

[关键词] 哮喘;咳喘宁;GSK-3 β ; β -catenin; 实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2020.09.064

Effect of Kechuanning on the expression of the GSK-3 β and β -catenin signaling pathways in guinea pigs with asthma induced by respiratory syncytial virus

KONG Ding¹, DONG Xiaofei²

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China;

2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the mechanism of action of Kechuanning in the prevention and treatment of bronchial asthma induced by respiratory syncytial virus (RSV). Methods: A total of 60 guinea pigs (30 male and 30 female guinea pigs), aged 2 months, were randomly divided into blank control group, low-, middle-, and high-dose Kechuanning groups, and Western medicine group, with 10 guinea pigs (5 male and 5 female guinea pigs) in each group. Guinea pigs were given intranasally administered RSV suspension and ovalbumin aerosol to establish a model of asthma, and dexamethasone and ribavirin were used as positive control drugs to observe the protein expression of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) and β -catenin after the intervention with low-, middle-, and high-dose Kechuanning. Results: In the lung tissue of guinea pigs with asthma induced by RSV, compared with the blank control group, the model group had a significant reduction in the expression of GSK-3 β and a significant increase in the expression of β -catenin in lung tissue ($P < 0.05$). Compared with the model group, the low-, middle-, and high-dose Kechuanning groups and the Western medicine group had a significant increase in the expression of GSK-3 β and a significant reduction in the expression of β -cate-

基金项目:湖南省中医药管理局重点项目(201513);湖南省教育厅重点项目(15A145);湖南中医药大学中医药国内一流建设学科(4901-020000200207)

第一作者:孔定,女,2018级硕士研究生,研究方向:中医药防治小儿肺系疾病

通讯作者:董晓斐,女,主任医师,研究方向:中医药防治小儿肺系疾病, E-mail: 1511927414@qq.com

nin in lung tissue ($P < 0.05$). There were significant differences in these indices between the Western medicine group and the low-, middle-, and high-dose Kechuanning groups ($P < 0.05$). Conclusion: Kechuanning has an inhibitory effect on guinea pigs with asthma induced by RSV, which may be associated with the WNT/ β -catenin signaling pathway.

[**Keywords**] asthma; Kechuanning; glycogen synthase kinase-3 β ; β -catenin; experimental study

小儿哮喘是一种发病机制非常复杂的常见呼吸道疾病,其中合并病毒感染的哮喘其发病率呈逐年上升的趋势,而呼吸道合胞病毒(RSV)是引起小儿哮喘最常见的病原体^[1]。咳喘宁由著名古方五虎汤加减而成,既往研究表明,咳喘宁具有减轻气道炎症、改善通气功能和抗病毒的作用,临床疗效显著^[2-4],但其对哮喘的作用和机制仍待进一步研究。Wnt/ β -catenin信号通路可以激活树突状细胞,产生炎症因子,抑制炎症反应及气道反应性。本研究通过检测咳喘宁对RSV诱发哮喘模型豚鼠中糖原合成酶激酶3 β (GSK-3 β)、 β -连环蛋白(β -catenin)的蛋白表达情况,探讨咳喘宁治疗哮喘合并病毒感染的内在机制,为其临床应用提供依据。

1 实验材料

1.1 动物 选取200~300 g清洁级健康2月龄豚鼠,雌雄各30只,由长沙市天勤生物技术有限公司提供,实验动物合格证号:SCXK(湘)2014-0010。

1.2 药物 咳喘宁口服液(湖南中医药大学第一附属医院药剂室提供,主要由炙麻黄、杏仁、生石膏、细茶和甘草等中药组成,100 ml/瓶,含生药1.0 g/ml);利巴韦林注射液(湖北天药业股份有限公司,批准文号:国药准字H19993162,规格:10 ml/支);地塞米松注射液(山西晋新双鹤药业有限责任公司,批准文号:国药准字H14021152,规格:2 ml/支)。

1.3 主要仪器和试剂 水平摇床(北京市六一仪器厂,WD-9405B)、电泳仪(BIO-RAD,041BR162047)、化学发光系统(长沙市文发科学仪器设备有限公司,CheemiDoc XRS+Imager)、多功能酶标仪(PerkinElmer,EnSpire)、恒温摇床(上海福玛,KYC-100)、医用超声雾化吸入器(上海四菱医用恒温设备有限公司,402AI)、高速冷冻离心机(德国Hermle,Z32HK)、Biosharp PVDF膜(长沙丽欣生物科技有限公司 Millipore 0.45 μ m);BCA蛋白定量试剂盒(长沙丽欣生物科技有限公司);卵清蛋白(长沙丽欣生物科技有限公司);RSV毒株(武汉东新阳生物技术有限公司); β -catenin/CTNHB1 Antibody、GSK3 beta Antibody、 β -actin、HRP-羊抗兔 IgG(长沙丽欣生物科技有限公司)。

2 实验方法

2.1 动物分组与造模 将60只清洁级豚鼠适应性喂养1周后,按照随机数字表法将其分为空白对照组10只和造模组50只,造模成功后随机分为模型组,咳喘宁低、中、高剂量组,西药组,每组各10只(雌雄各半)。参照文献[5-6],

采用RSV诱发支气管哮喘模型。方法:RSV悬液滴鼻,1次/d,连续滴鼻2 d后继续喂养4 d,期间观察豚鼠的感染症状。后将卵清蛋白(OVA)雾化吸入,隔天1次,连续干预2周,期间豚鼠若出现喷嚏、抓鼻、鼻腔可见分泌物、呼吸频率加快、点头样呼吸、腹肌抽搐、甚至站立不稳即提示造模成功。

2.2 给药方法 各组均从造模成功后开始进行药物干预。咳喘宁组以咳喘宁雾化,高、中、低剂量组每次剂量分别为0.4 g/kg、0.8 g/kg、1.2 g/kg,将其加蒸馏水,使雾化总量均为20 ml;西药组以地塞米松联合利巴韦林雾化吸入,利巴韦林剂量为每次0.45 mg/kg,地塞米松剂量为每次0.7 mg/kg,溶于蒸馏水使雾化总量均为20 ml;模型组以等量蒸馏水雾化吸入。以上雾化时间均为7 d,每天2次,每次20 min。

2.3 指标检测 所有动物均在雾化治疗7 d后统一予以腹腔注射水合氯醛麻醉并取肺组织于冻存管中,置-80℃保存。采用Western blot检测GSK-3 β 和 β -catenin,取200 mg肺组织加入蛋白酶抑制剂研磨打碎裂解,离心取上清液至EP管中,于-80℃保存。稀释BSA标准品,配置BCA工作液,加标准蛋白及待测样品,再将预先配置好的AB液加入到各个孔中,放入37℃恒温箱中孵育30 min,用酶标仪测定OD值。配胶后电泳分离,将蛋白转移至PVDF膜上,脱脂奶粉封闭,漂洗后加一抗4℃过夜,漂洗后二抗室温孵育2 h,漂洗后ECL曝光成像,用Image-Pro plus 6.0软件分析,以目的蛋白与内参 β -actin的灰度值作为蛋白的表达。

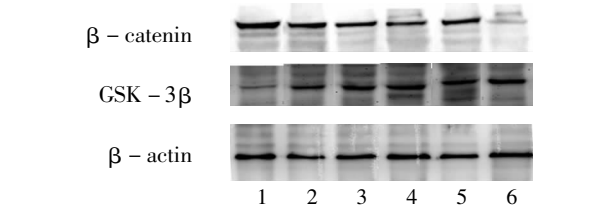
2.4 统计学方法 采用SPSS 21.0统计学软件进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对样本数据进行正态性及方差齐性检验,方差齐时用单因素方差分析,不齐时采用秩和检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

在造模及治疗过程中,每组豚鼠均有死亡,最后每组余6只,并纳入检测。各组肺组织 β -catenin及GSK-3 β 表达比较:Western blot检测显示,目的蛋白与内参 β -actin灰度值相比,与空白对照组比较,模型组肺组织中GSK-3 β 表达明显减少, β -catenin蛋白表达明显增加。与模型组比较,咳喘宁低、中、高剂量组及西药组豚鼠肺组织中GSK-3 β 表达增加, β -catenin表达减少,差异具有统计学意义。且西药组与咳喘宁低、中、高剂量组各项指标的差异均有统计学意义。(见表1、图1)

表1 肺组织β-catenin及GSK-3β表达比较($\bar{x} \pm s$)				
组别	只数	GSK-3β/β-actin	β-catenin/β-actin	
空白对照组	6	61.014 ± 0.028	0.456 ± 0.113	
模型组	6	0.485 ± 0.057 ^a	1.334 ± 0.192 ^a	
哮喘宁低剂量组	6	0.585 ± 0.077 ^{abc}	1.103 ± 0.069 ^{abc}	
哮喘宁中剂量组	6	0.798 ± 0.060 ^{abc}	0.817 ± 0.101 ^{abc}	
哮喘宁高剂量组	6	0.923 ± 0.060 ^{abc}	0.672 ± 0.080 ^{abc}	
西药组	6	0.715 ± 0.058 ^{ab}	0.957 ± 0.072 ^{ab}	

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与西药组比较,^c $P < 0.05$ 。



注:1—模型组;2—哮喘宁低剂量组;3—哮喘宁中剂量组;4—哮喘宁高剂量组;5—西药组;6—空白对照组。

图1 各组豚鼠肺组织β-catenin及GSK-3β表达变化

4 讨论

根据临床表现,支气管哮喘可归属于中医学“哮喘”“喘证”的范畴。《医学正传》中有言:“喘以气息言,哮以声响名。”哮喘是一种发作性痰鸣气喘疾患,以喉中哮鸣有声、呼吸气促困难为特征,甚则喘息不能平卧;喘证则是以呼吸困难为主,表现为张口抬肩、鼻翼煽动、不能平卧等^[7]。导致哮喘的直接病因较为复杂,其中寒、热、痰、饮、瘀血往往相互纠缠,相兼致病。中医药在哮喘治疗中,具有多环节、多靶点、综合调节的作用特点^[8]。

哮喘宁口服液(我院自制药物),是根据五虎汤化裁而成,五虎汤源自《仁斋直指方论》卷八方,由《伤寒论》名方“麻杏石甘汤”加细茶组成,具有清宣肺热、平喘祛痰、解表散寒之功,治疗伤寒喘急,宜发表者。方中麻黄是平喘良药,味辛苦、性温,能入肺经,宣肺气,平咳喘,其主要成分为麻黄碱,具有抗炎、平喘和抗过敏的功效;杏仁味苦、性微温,能降肺气,止咳平喘;二药一宣一降,可祛除外邪,畅通气道,从而降低气道反应性,共为君药。石膏味辛甘、性大寒,功在清泄肺热,兼能抑制麻黄温燥之性,为佐药;细茶叶味苦甘、性寒,功在清神化痰;甘草镇咳平喘,具有抗炎、抗变态反应作用,共为本方使药。而我院在五虎汤的基础上,添加大青叶、桃仁、黄芪等药,扩增了其疗效,能更好地适用于病毒诱发的哮喘。其中黄芪扶正祛邪,能增强机体免疫功能,增强病毒诱导干扰素的能力,抑制病毒,并具有类似激素样作用;大青叶清热抗炎,具有抗病毒作用,可清除哮喘的激发因素;桃仁活血化瘀、改善微循环及炎症病灶,可止咳平喘;诸药合用,共奏发表清热、化痰平喘、清除哮喘激发因素、降低气道反应性等功效^[9]。

既往有研究表明,Wnt信号通路与哮喘的关系十分密

切,参与了炎症气道疾病的发病,在哮喘患者的气道中有显著增加,若抑制该通路,气道重塑程度明显降低^[10]。气道上皮细胞分泌的Wnt/β-catenin是强有力的树突状细胞(dendritic cell,DC)激活因子,气道Wnt/β-catenin的表达水平可以控制Th细胞的局部分化,Wnt/β-catenin能诱导DC调节初始CD4+T淋巴细胞向Th2细胞分化,从而产生Th2细胞因子、白细胞介素(IL)-4、IL-5、IL-13和癌坏死因子-α(TNF-α),IL-10和春干扰素-γ(IFN-γ)的生成^[11]。而β-catenin是Wnt信号通路中的核心蛋白,GSK-3β调控β-catenin的降解,Wnt信号通路是否激活取决于GSK-3β水平^[12]。Wnt/β-catenin信号通路可调控气道炎症和高反应性,同时Wnt/β-catenin又可抑制炎症和减少病毒的细胞因子。本研究进一步证实,RSV诱发的哮喘豚鼠肺组织中的GSK-3β表达减少,β-catenin蛋白表达增加,哮喘宁干预后上调了哮喘豚鼠肺组织中的GSK-3β蛋白表达,下调了β-catenin蛋白表达,初步证明了哮喘宁治疗病毒诱发的小儿哮喘具有较好的疗效,其机制可能与Wnt/β-catenin信号通路中的β-catenin与GSK-3β调节有关。

参考文献

[1] 连鹏强,安妮,郑平等. 婴幼儿喘息性疾病与呼吸道感染的相关性分析[J]. 中国当代医药,2019,26(22):107-109.

[2] 李英,龚细妹,舒兰,等. 哮喘宁对RSV诱发哮喘大鼠肺泡灌洗液EOS计数及IL-17、IL-8含量的影响[J]. 中医药导报,2016,22(14):32-35.

[3] 谭维,李英,罗银河,等. 哮喘宁对RSV诱发哮喘大鼠血清IL-4、IFN-γ的调节作用及对支气管平滑肌增殖活性的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2016,36(11):5-8,17.

[4] 王孟清,罗银河,陈锡军,等. 哮喘宁治疗病毒诱发小儿哮喘的临床研究[J]. 新中医,2007,39(4):16-17.

[5] HAN J,KATSUYUKI T,GELFAND EW. The role of RSV infection in asthma initiation and progression:findings in a mouse model[J]. Pulm Med,2011,2011(6):748038.

[6] 陈兴宇,罗银河,王孟清,等. 哮喘宁对病毒诱发哮喘大鼠气道重塑及肺组织p-ERK1/2蛋白表达的影响[J]. 中国病理生理杂志,2019,35(7):1268-1275.

[7] 周仲瑛. 中医内科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2007:26-27.

[8] 帅云飞. 五虎汤对呼吸道合胞病毒诱发幼年哮喘大鼠Naive CD4⁺T细胞分化的影响[D]. 长沙:湖南中医药大学,2015:69-68.

[9] 王孟清,罗银河,陈锡军,等. 哮喘宁治疗病毒诱发小儿哮喘的临床研究[J]. 新中医,2007,39(4):16-17.

[10] 黄悦,张维溪. Wnt通路在哮喘气道重塑中的作用及维生素D调控[J]. 医学研究杂志,2019,48(2):12-14.

[11] 杨侠,张进召,张洁,等. 树突状细胞Wnt/β-catenin信号通路对哮喘小鼠气道变态反应性炎症的调控作用[J]. 西安交通大学学报:医学版,2017,38(3):416-421.

[12] RUNXIA S,WEI L,YING L,et al. Cdc42-interacting protein 4 silencing relieves pulmonary fibrosis in STZ-induced diabetic mice via the Wnt/GSK-3β/β-catenin pathway[J]. Experimental Cell Research,2017,359(1):284-290.

(收稿日期:2019-11-17)