

固本防哮饮对哮喘缓解期小鼠气道杯状细胞增生与黏液分泌相关基因的调控作用

陆远, 赵霞*

(江苏省儿童呼吸疾病(中医药)重点实验室, 南京中医药大学中医儿科学研究所, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 探讨中药复方固本防哮饮对哮喘缓解期小鼠气道杯状细胞增生与黏液分泌相关基因 IRE1 β 、SPDEF、AGR2 和 mCLCA3 的影响。方法 结合前期研究采用卵蛋白(OVA)致敏和 OVA-呼吸道合胞病毒(RSV)联合诱导激发 BALB/c 雌性小鼠, 建立哮喘缓解期动物模型, 随机分为正常组, 模型组, 固本防哮饮低、中、高剂量组, 孟鲁司特钠组及地塞米松组。qPCR 法检测肺组织中 IRE1 β 、SPDEF、AGR2 和 mCLCA3 mRNA 表达水平。结果 模型组小鼠肺组织中 IRE1 β 、SPDEF、AGR2 mRNA 表达显著高于正常组($P < 0.05$), 而 mCLCA3 mRNA 表达显著低于正常组($P < 0.05$); 固本防哮饮高、中、低剂量组, 孟鲁司特钠组及地塞米松组小鼠肺组织中 IRE1 β 、SPDEF、AGR2 mRNA 水平较模型组存在不同程度的下降, 而固本防哮饮低剂量组和孟鲁司特钠组小鼠肺组织中 mCLCA3 mRNA 表达显著高于正常组($P < 0.05$)。结论 固本防哮饮防治哮喘抑制气道杯状细胞增生和减少黏液分泌的作用机制可能是通过降低 IRE1 β 、SPDEF、AGR2 mRNA 表达所致。

关键词: 固本防哮饮; 哮喘缓解期; 气道; 杯状细胞增生; 黏液高分泌

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-0482(2017)02-0207-05

:10.14148/j.issn.1672-0482.2017.0207

LU Yuan, ZHAO Xia*

(Jiangsu Key Laboratory of Pediatric Respiratory Disease, Institute of Pediatrics, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China)

To investigate the effects of Guben Fangxiao Decoction on mRNA expression of airway goblet cells hyperplasia and mucus hypersecretion-associated genes like IRE1 β , SPDEF, AGR2, and mCLCA3 in mice model with asthma at remission stage.

Based on the previous study, OVA sensitization combined with RSV sensitization was applied to establish the asthma model on BALB/c female mice, which were randomly divided into the normal group, model group, Guben Fangxiao Decoction of low, middle and high dose groups, montelukast sodium group and dexamethasone group. qPCR was applied to detect the expression of IRE1 β , SPDEF, AGR2 and mCLCA3 mRNA in the lung tissue.

The expressions of IRE1 β , SPDEF and AGR2 mRNA in the lung tissue of the model group were significantly higher than those of the normal group($P < 0.05$), while the mCLCA3 mRNA expression was much lower than the normal group($P < 0.05$). The mCLCA3 mRNA expressions in the lung tissue of Guben Fangxiao Decoction with low, middle and high dosage groups, montelukast sodium group and dexamethasone group experienced decline to different degree. Whereas the mCLCA3 mRNA levels in the Guben Fangxiao Decoction Low dose group and montelukast sodium group were significantly higher than those of the normal group($P < 0.05$).

Gubenfangxiao Decoction can significantly attenuate RSV-OVA-induced airway goblet cells hyperplasia and mucus hypersecretion in murine asthma remission model. These effects may be mediated, at least partially, by suppressing the mRNA expression of IRE1 β , SPDEF and AGR2.

Guben Fangxiao Decoction; asthma remission; airway; goblet cell hyperplasia; mucus hypersecretion

哮喘是以广泛多变的可逆性气道阻塞、非特异性气道高反应、慢性气道炎症为特征的异质性疾病,

收稿日期: 2016-10-25; 修稿日期: 2017-01-05

基金项目: 江苏省自然科学研究重大项目(15KJA360003); 国家自然科学基金(81473723); 江苏省研究生创新课题(KYZZ15_0269)

作者简介: 陆远(1988-), 男, 江苏苏州人, 南京中医药大学 2014 级博士研究生。* 通信作者: zhaoxiah@126.com

具有喘息、气促、胸闷和咳嗽的呼吸道症状,其强度可随时间而变化^[1]。气道杯状细胞增生与黏液高分泌是哮喘典型的病理生理特征,是造成哮喘发作时气道阻塞的重要因素^[2]。正常状态下,气道杯状细胞分泌黏液以抵御外来吸入性病原,同时黏液可被气道表面纤毛细胞运动肃清。虽然短期内黏液分泌量增加是气道的保护性机制,但是病理性黏液高分泌是一个更为持续的过程,通常伴随着气道杯状细胞增生^[3]。因此,抑制杯状细胞增生,减少黏液高分泌是改善气道阻塞、降低哮喘危象发生的有效手段。然而目前没有特异性抑制哮喘气道黏液高分泌的有效治疗手段和药物^[4-5]。中药复方固本防哮饮为我国著名中医儿科专家江育仁教授的经验方,由玉屏风散合异功散加减而来,具有补肺固表,健脾化痰的作用,临床运用多年治疗哮喘安全有效并可降低复发率^[6]。Huang 等^[7]通过肺组织病理学观察发现固本防哮饮可显著抑制哮喘缓解期小鼠气道杯状细胞增生与黏液分泌,但是仍缺少深入的机制研究。课题组近期实验研究发现固本防哮饮可通过抑制内质网应激下蛋白质未折叠反应下游的 IRE1 α (inositol-requiring enzyme 1 α)通路,进而减轻哮喘缓解期小鼠慢性气道炎症^[8]。IRE1 β 作为内质网应激受体 IRE1 α 亚型^[9],与哮喘气道黏液高分泌与杯状细胞增生密切相关^[10]。因此,固本防哮饮抑制哮喘缓解期小鼠气道杯状细胞增生与黏液分泌,可能与调控 IRE1 β 基因表达有关。基于 Affymetrix 基因芯片数据库的 Celsius 分析^[11],气道杯状细胞分化与黏液生成过程中 IRE1 β 的表达与 SPDEF(SAM pointed domain ETS factor)、AGR2(anterior gradient 2)和 mCLCA3(mouse calcium-activated chloride channel regulator 3)基因表达密切相关。本实验拟研究固本防哮饮对气道杯状细胞增生与黏液高分泌相关基因——IRE1 β 、SPDEF、AGR2 和 mCLCA3 的影响,探讨固本防哮饮化痰作用防治哮喘的机理。

1 材料

1.1 动物

清洁级雌性 BALB/c 小鼠,6~8 周龄,质量 18~22 g,购于昭衍(苏州)新药研究中心有限公司,动物许可证号:SCXK(苏)2013-0003。

1.2 药物

孟鲁司特钠片(10 mg/片,由杭州默沙东药业股份有限公司提供,批号:K004567);地塞米松片

(0.75 mg/片,由辰饮药业股份有限公司提供,批号:121203203);固本防哮饮:由炙黄芪、党参、白术、茯苓、煅牡蛎、蝉蜕、陈皮、防风、辛夷、五味子和生甘草等 11 味药组成,经南京中医药大学中药资源产业化过程协同创新中心刘圣金副教授鉴定其均为正品,按 5 : 3.33 : 3.33 : 3.33 : 5 : 2 : 2 : 1 : 2 : 2 : 1 的比例配伍,先取 8 倍量冷水浸药 30 min,煎 30 min(沸后),滤过;第 2 煎加 6 倍量水煎 30 min,将 2 次煎液过滤合并浓缩,分别调至含生药 3 g/mL 的溶液,密封于无菌量瓶,4 °C 储存备用。卵蛋白(Ovalbumin, OVA)购于美国 Sigma 公司。DMEM 培养基,胎牛血清购于 Gibco 公司。人喉癌上皮细胞(Hep-2)和呼吸道合胞病毒 A2 型(Long 株)购于武汉国家典型培养物保藏中心,均保存于江苏省儿童呼吸疾病(中医药)重点实验室。

1.3 试剂

Trizol:美国 Invitrogen 公司;DEPC:南京凯基生物科技发展有限公司;逆转录试剂盒:大连 Takara 公司;qPCR 定量试剂盒:大连 Takara 公司。

2 方法

2.1 呼吸道合胞病毒(RSV)制备及病毒毒力测试

1)病毒制备:以人喉癌上皮细胞(Hep-2)为宿主扩增呼吸道合胞病毒 A2 型(Long 株),细胞培养及 RSV 扩增 Hep-2 采用含 10% 小牛血清(FBS)的 DMEM 培养液,于 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度下培养。采用对数生长期细胞,Hep-2 以每孔 1.5~2 × 10⁵ L⁻¹ 接种 24 孔板,汇合至单层后弃培养液,PBS 漂洗 2 遍,接种病毒液 200 μ L,吸附 1.5 h。加入适量含 2% 小牛血清的维持液继续培养 3~5 d。待融合病变达 80% 以上,反复冻融 3 次,离心收集上清(即病毒液),分装后于 -70 °C 保存备用。

2)病毒毒力测试:以细胞病变法测定 RSV 对 Hep-2 的半数感染量(TCID₅₀),Hep-2 接种于 96 孔板,待长成单层时,除正常细胞对照组外,接种各种稀释度的病毒液(用维持液 10 倍梯度稀释 8 个浓度)。吸附 1.5 h 后,弃病毒液,加入 2% 胎牛血清的维持液继续培养,逐日观察病变程度并记录,以最高稀释度不再出现新病变时为终点。Karber 法计算病毒 TCID₅₀。

2.2 造模、分组及给药

参照前期研究造模方法^[7],加以改进制备哮喘缓解期动物模型。小鼠经适应性饲养 1 周后,第 1、8 天将除正常组外的小鼠给予腹腔注射 0.2 mL 致

敏液(其中包含 OVA 100 μg , 硫酸铝钾 1 mg, 溶解于生理盐水中)致敏, 第 15 天时将小鼠放入雾化器的有机玻璃盒中, 以 2.5% OVA 溶解于生理盐水中雾化吸入 30 min 激发, 连续雾化 14 d, 每日 1 次。第 32~54 天以同样的方法每隔 2 d 雾化激发 1 次, 每次均为 30 min 共 22 次, 期间在第 29、42、55 天时分别以 RSV 50 μL /只滴鼻诱导激发。正常组(con)均以同体积生理盐水代替 OVA 溶液致敏、RSV 滴鼻诱导激发。末次激发后(第 56 天), 将除正常组外的小鼠分为模型组(model, 蒸馏水 20 mL/kg)、孟鲁司特钠组(mont, 2.6 mg/kg)、地塞米松组(dex, 1 mg/kg)、固本防哮饮高剂量组(high, 36 g/kg)、固本防哮饮中剂量组(middle, 24 g/kg)、固本防哮饮低剂量组(low, 12 g/kg), 每日灌胃 1 次, 共 30 d, 正常组以等体积蒸馏水灌胃。末次给药后 24 h, 麻醉脱颈椎处死小鼠, 取肺组织放于液氮中, 备用。肺病理结果显示^[8]: 末次 RSV 滴鼻后, 造模小鼠肺组织中炎症评分、杯状细胞增生和气道周围胶原沉积均

显著高于正常小鼠, 说明哮喘造模成功。停止激发 30 d 后, 模型组小鼠仍表现出轻、中度的气道炎症, 包括气道与血管周围炎性细胞浸润。然而, 此时模型组小鼠气道周围未见明显杯状细胞增生与胶原沉积, 考虑自限性恢复, 说明哮喘缓解期小鼠即使使气道粘液高分泌与气道重塑等典型症状消失, 气道慢性炎症依然存在。

2.3 qPCR 法检测肺组织 IRE1 β 、SPDEF、AGR2 和 mCLCA3 mRNA 表达 参照 RNA 抽提试剂盒说明书要求抽提总 RNA。应用紫外分光光度计测定 A260/A280 比值及浓度, A260/A280 比值在 1.8~2.0 之间为符合纯度要求。依据荧光定量 PCR 引物设计原则设计引物^[4], 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 序列见表 1, 对已提取的 mRNA 进行逆转录, 所得 cDNA 产物置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。按照试剂盒说明书进行操作扩增。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 对实时定量 PCR 结果进行数据处理。

表 1 IRE1 β 、SPDEF、AGR2 和 mCLCA3 基因引物序列

Gene	Forward Prime (5'-3')	Reverse Prime (5'-3')	Product/bp
IRE1 β	GCCGCTCATTTCAGATCAC	CAGGAAATGCCATCGGTGC	198
SPDEF	ACGGATGGTGAGGTGGACT	TGCCTTCTCCTTGTGAGC	127
AGR2	GACGAATGCCACACAGTC	CAGGAGAAAGGTGCTTGTCAG	122
mCLCA3	TGAACTGGGAGGCAACACTT	CGGGGATGAACACAGACAC	122
GAPDH	CGTGTTCCACCCCAATGT	TGTCATACTGGCAGGTTTCT	104

2.4 统计学方法

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据处理和作图采用 Prism 5.0 统计软件, 多组间比较采用单因素方差分析, 多重比较采用 Dunnett's post hoc 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 RSV 感染 Hep-2 细胞的 TCID₅₀ 测定结果

出现细胞融合病变情况如表 2 所示, 根据 Karber 公式: $\lg\text{TCID}_{50} = L - d(s - 0.5)$, 其中 L: 最高稀释度对数, D: 稀释度对数间的差, S: 阳性孔比率总和; 故 TCID_{50} 效价 = $10^{4.167} / 50 \mu\text{L}$, 即将 RSV 病毒稀释 $10^{4.167}$ 倍接种 $50 \mu\text{L}$ 可使 50% Hep-2 细胞病变。Hep-2 细胞典型病变如图 1 所示。

3.2 固本防哮饮对小鼠肺组织中 IRE1 β 、SPDEF、AGR2 和 mCLCA3 mRNA 表达的影响

由图 2 可知, 模型组小鼠肺组织中 IRE1 β 、SPDEF、AGR2 mRNA 表达显著高于正常组 ($P < 0.05$), 而 mCLCA3 mRNA 表达显著低于正常组 (P

< 0.05); 固本防哮饮高、中、低剂量组, 孟鲁司特钠组及地塞米松组小鼠肺组织中 IRE1 β 、SPDEF、AGR2 mRNA 水平较模型组存在不同程度的下降, 而固本防哮饮低剂量组和孟鲁司特钠组小鼠肺组织中 mCLCA3 mRNA 表达显著高于正常组 ($P < 0.05$)。以上结果提示固本防哮饮防治哮喘抑制气道杯状细胞增生和减少黏液分泌的作用机制可能是通过降低 IRE1 β 、SPDEF、AGR2 mRNA 表达所致。

表 2 呼吸道合胞病毒组织培养半数感染量测定观察结果

病毒液稀释度	出现 CPE 的细胞管(阳性管)的比率
10^0	1
10^{-1}	1
10^{-2}	1
10^{-3}	1
10^{-4}	0.667
10^{-5}	0
10^{-6}	0
10^{-7}	0

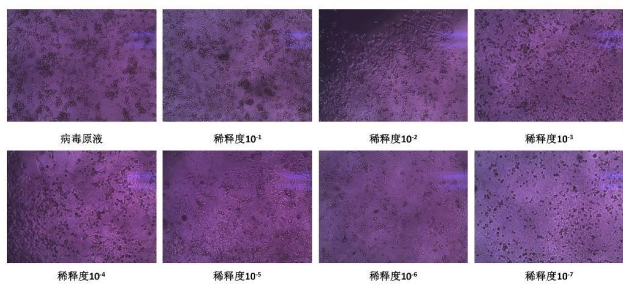
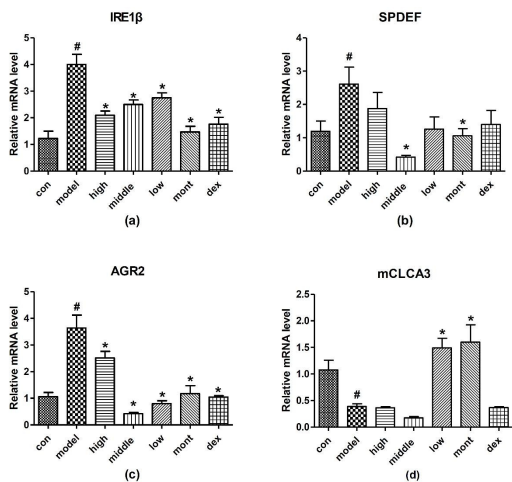


图 1 RSV 感染 96 h 后 Hep-2 细胞 CPE 病变图 (×200)



注:与正常组比较, # $P < 0.05$;与模型组比较, * $P < 0.05$ 。

图 2 各组小鼠 IRE1β、SPDEF、AGR2 和 mCLCA3 mRNA 的表达

4 讨论

气道黏液主要由呼吸道表面分布的杯状细胞和黏膜下腺体所分泌,杯状细胞增生和腺体肥大是哮喘典型的病理生理特征,与其伴随的气道黏液高分泌是哮喘发病率和致死率的主要因素^[3]。研究发现哮喘患者肺功能的下降与气道对黏液肃清功能的减弱密切相关^[12]。哮喘患者气道中大量分泌的黏液与炎性渗出物结合而形成高黏度的痰栓,难以咳出并易阻塞呼吸道^[13]。此类高黏度痰栓常在哮喘持续状态死亡病例的尸检中发现,其组成除气道黏液外,包含血浆蛋白、血清白蛋白、DNA 和蛋白聚糖等^[14]。血浆渗出物会刺激气道内黏液分泌,而白蛋白和 DNA 与粘蛋白聚合物结合后会使得黏液黏度增加^[15]。除堵塞气道外,黏液还可导致哮喘另一临床特征——气道高反应性的发生,并可能与相对轻度的支气管痉挛叠加,显著加重气道狭窄^[16]。因此,抑制黏液高分泌、增加气道对黏液的肃清作用是祛除顽痰、改善气道阻塞、提高哮喘患者肺功能的重要治疗思路,这一思路与中医治疗哮喘“伏痰”的理论相契合。

中医认为肺气不足则不能输布津液,脾脏虚弱则无力运化水湿、肾阳不足则难以蒸化水液,以致津液停聚成痰,伏藏于肺成为宿根,当“伏痰”遇外感触发,痰随气升,气因痰阻,相互搏结,壅塞气道,通畅不利,肺气宣降失常,引动停积痰液,而致痰鸣如吼,气息喘促。

因此,哮喘“伏痰”作祟与肺脾肾三脏不足的内因密切相关。中药复方固本防哮饮是全国著名儿科专家江育仁教授治疗哮喘缓解期的经验方,治则注重祛除伏痰、扶正固表、减少复发,在益气固表代表方“玉屏风散”和健脾化痰代表方“异功散”的基础上增加祛风固表,敛肺止咳的药物。方中黄芪为君药,意在补肺脾之气;臣药白术、党参、茯苓、陈皮,意在健脾化痰;佐以防风、辛夷、蝉蜕开窍祛邪、宣畅肺气,五味子敛肺止咳;使药煅牡蛎收敛止汗,甘草调和诸药。全方补中兼疏,补而不留邪,祛邪不伤正,共奏补肺固表,健脾化痰之功。

气道杯状细胞增生和黏液高分泌相关基因与哮喘病程进展关系密切。IRE1β 表达于人类与小鼠气道的杯状细胞中,可提高气道中主要分泌型粘蛋白 MUC2 转录后的蛋白折叠效率^[10,17]。SPDEF 作为气道杯状细胞增生的另一个转录调节因子,可抑制脂多糖诱导后中性粒细胞聚集和对细菌的清除作用^[18]。内质网蛋白 AGR2 属于二硫化物异构酶家族,可正向调控气道黏液蛋白 MUC5AC、MUC5B 的高分泌^[19]。小鼠中 mCLCA3 表达的下降可抑制气道杯状细胞增生,而其过表达可增加杯状细胞数量^[20]。然而,Robichaud A 等^[21]通过体内和体外实验将 mCLCA3 进行敲出或抑制后,气道和肺上皮细胞的黏液高分泌状态并未改善,说明 mCLCA3 在过敏性哮喘实验模型中对气道黏液高分泌并非至关重要,可能解释了本次实验研究中各组小鼠 mCLCA3 的 mRNA 水平并未符合 IRE1β、SPDEF、AGR2 的表达趋势。本研究发现固本防哮饮可抑制哮喘缓解期小鼠气道杯状细胞增生与黏液高分泌相关基因 IRE1β、SPDEF、AGR2 的转录后表达水平,可能与复方化痰功效的潜在分子生物学机制有关。

参考文献:

[1] Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention[EB/OL]. <http://www.ginasthma.org>, 2014.

[2] ROGERS DF. The airway goblet cell [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, 35(1): 1-6.

[3] ROGERS DF. Physiology of airway mucus secretion and patho-

- physiology of hypersecretion [J]. *Respir Care*, 2007, 52(9): 1134-1149.
- [4] ROGERS DF. Airway mucus hypersecretion in asthma: an undervalued pathology? [J]. *Curr Opin Pharm*, 2004, 4(3): 241-250.
- [5] ROGERS DF. Mucoactive agents for airway mucus hypersecretory diseases [J]. *Respir Care*, 2007, 52(9): 1176-1197.
- [6] 袁雪晶,孙铁秋.固本防哮饮联合穴位敷贴治疗儿童哮喘缓解期100例临床研究 [J].*中华中医药杂志*,2010,25(12):2306-2309. YUAN XJ, SUN YQ. Clinical research of Gubenfangxiao decoction combined with acupoint application on chronic asthmatic children in 100 cases [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2010, 25(12), 2306 - 2309.
- [7] HUANG Z, GAO L, ZHAO X, et al. Effect of Gubenfangxiao decoction on respiratory syncytial virus-induced asthma and expression of asthma susceptibility gene orosomucoid 1-like protein 3 in mice [J]. *J Tradit Chin Med*, 2016, 36(1): 101-106.
- [8] LU Y, XU JY, ZHANG XH, et al. Gu-Ben-Fang-Xiao decoction attenuates sustained airway inflammation by suppressing ER stress response in a murine asthma remission model of respiratory syncytial virus infection [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 192: 496-509.
- [9] IWAWAKI T, HOSODA A, OKUDA T, et al. Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(2): 158-164.
- [10] MARTINO MB, JONES L, BRIGHTON B, et al. The ER stress transducer IRE1 β is required for airway epithelial mucin production [J]. *Mucosal Immunol*, 2013, 6(3): 639-654.
- [11] DAY A, CARLSON MR, DONG J, et al. Celsius: a community resource for Affymetrix microarray data [J]. *Genom Biol*, 2007, 8(6): 1.
- [12] HESSELINK AE, VAN DER WINDT DA, Penninx BW, et al. What predicts change in pulmonary function and quality of life in asthma or COPD? [J]. *J Asthma*, 2006, 43(7): 513-519.
- [13] ROGERS DF, EVANS TW. Plasma exudation and oedema in asthma [J]. *Br Med Bull*, 1992, 48(1): 120-134.
- [14] SHEEHAN JK, RICHARDSON PS, FUNG DC, et al. Analysis of respiratory mucus glycoproteins in asthma: a detailed study from a patient who died in status asthmaticus [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995, 13(6): 748-756.
- [15] LIST SJ, FINDLAY BP, FORSTNER GG, et al. Enhancement of the viscosity of mucin by serum albumin [J]. *Biochem J*, 1978, 175(2): 565-571.
- [16] LAI HY, ROGERS DF. Mucus hypersecretion in asthma: intracellular signalling pathways as targets for pharmacotherapy [J]. *Curr Opin Aller Clin Immunol*, 2010, 10(1): 67-76.
- [17] TSURU A, FUJIMOTO N, TAKAHASHI S, et al. Negative feedback by IRE1 β optimizes mucin production in goblet cells [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2013, 110(8): 2864-2869.
- [18] KORFHAGEN TR, KITZMILLER J, CHEN G, et al. SAM-pointed domain ETS factor mediates epithelial cell - intrinsic innate immune signaling during airway mucous metaplasia [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2012, 109(41): 16630-16635.
- [19] SCHROEDER BW, VERHAEGHE C, PARK SW, et al. AGR2 is induced in asthma and promotes allergen-induced mucin overproduction [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 47(2):178-185.
- [20] NAKANISHI A, MORITA S, IWASHITA H, et al. Role of gob-5 in mucus overproduction and airway hyperresponsiveness in asthma [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2001, 98: 5175 - 5180.
- [21] ROBICHAUD A, TUCK SA, KARGMAN S, et al. Gob-5 is not essential for mucus overproduction in preclinical murine models of allergic asthma [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 33(3): 303-314.

(编辑:董宇)