

健脾补肺方对幼龄哮喘大鼠 cAMP/PKA/CREB 信号通路的影响

王雅娟¹, 高华武¹, 朱和平², 王舒舒¹, 邹莹莹¹, 李泽庚^{3*}

(1. 安徽中医药大学 中西医结合学院, 合肥 230012;

2. 芜湖市中医医院, 安徽 芜湖 241000; 3. 安徽中医药大学, 合肥 230012)

【摘要】 目的:观察健脾补肺方对卵蛋白(OVA)致敏并攻击复制的幼龄哮喘大鼠模型气道炎症、高反应性及环磷酸腺苷(cAMP)信号通路活性的影响。方法:雄性SD大鼠75只,随机选取15只作为正常组,剩余大鼠随机分为哮喘模型组、健脾补肺方组(8.37 g·kg⁻¹·d⁻¹),氨茶碱组(40 mg·kg⁻¹·d⁻¹)和地塞米松组(0.1 mg·kg⁻¹·d⁻¹),每组15只。用0.2% OVA的氢氧化铝凝胶10点致敏,并以1% OVA生理盐水溶液雾化攻击复制幼龄大鼠哮喘模型,并给予相应的药物处理。小动物肺功能仪观察大鼠气道高反应(AHR)变化,支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞计数及分类计数观察炎症细胞数量变化,苏木素-伊红(HE),马松(Masson)和碘酸雪夫氏(PAS)染色观察肺组织病理学变化;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中白细胞介素(IL)-4, IL-5, IL-13, γ 干扰素(IFN- γ),肿瘤坏死因子(TNF)- α 和血浆中cAMP水平变化;免疫组化法观察肺组织蛋白激酶A(PKA)蛋白表达变化,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)观察肺组织环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(CREB) mRNA和蛋白表达变化。结果:与正常组比较,模型组大鼠气道阻力(RL)明显增加而Cdyn明显降低($P < 0.05$),BALF中白细胞总数和嗜酸性粒细胞比例显著升高,外周血IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α 水平显著升高而IFN- γ 水平显著降低($P < 0.01$),肺组织病理改变明显;cAMP水平显著下降,肺组织中PKA和CREB的表达显著下调($P < 0.01$)。与模型组比较,健脾补肺方可以抑制AHR,降低BALF中的白细胞总数和嗜酸性粒细胞比例及RL($P < 0.05$),改善大鼠肺组织病理改变,增加Cdyn(Cdyn),上调大鼠血清中cAMP水平和肺组织中PKA和CREB表达($P < 0.01$)。结论:健脾补肺方能够改善幼龄哮喘大鼠的AHR,抑制气道炎症,减轻肺组织损伤,其机制可能与上调cAMP/PKA/CREB通路活性相关。

【关键词】 健脾补肺方; 哮喘; 气道高反应(AHR); 环磷酸腺苷(cAMP); 蛋白激酶A(PKA); 环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(CREB)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)19-0088-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211805

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210806.1654.003.html>

[网络出版日期] 2021-08-09 9:01

Effect of Jianpi Bufei Prescription on cAMP/PKA/CREB Signaling Pathway in Juvenile Asthma Rats

WANG Ya-juan¹, GAO Hua-wu¹, ZHU He-ping², WANG Shu-shu¹, ZOU Ying-ying¹, LI Ze-geng^{3*}

(1. Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine,

Hefei 230012, China; 2. Wuhu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhu 241000, China;

3. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the effect of Jianpi Bufei prescription (JPBFP) on airway inflammation, airway hyperresponsiveness (AHR), and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling

[收稿日期] 20210411(010)

[基金项目] 安徽省高校自然科学基金项目(KJ2015A023);安徽省自然科学基金项目(1508085QH161);安徽省博士后研究项目(2016B095)

[第一作者] 王雅娟,博士,副教授,从事呼吸及抗炎免疫药理学研究,Tel:0551-68129165,E-mail:wangyajuan8003@126.com

[通信作者] *李泽庚,硕士,教授,从事呼吸系统疾病临床和基础研究,Tel:0551-68129004,E-mail:li6609@126.com

pathway activity in ovalbumin (OVA)-sensitized and challenged juvenile asthma rats. **Method:** Seventy-five male SD rats were randomly divided into a blank group ($n=15$) and an experimental group ($n=60$). The rats in the experimental group were sensitized by aluminum hydroxide gel containing 0.2% OVA and stimulated by aerosol inhalation of normal saline containing 1% OVA to induce an asthma model, followed by assignment into the following groups: a model group ($n=15$), a JPBFP group ($n=15$, $8.37 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), an aminophylline group ($n=15$, $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), and a dexamethasone group ($n=15$, $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). AHR was detected by the pulmonary function analyzer, changes in inflammatory cells by white blood cell (WBC) count and differential blood count in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and pathological changes of lung tissues by hematoxylin-eosin (HE), Masson, and periodic acid-schiff (PAS) staining. The interleukin (IL)-4, IL-5, IL-13, interferon (IFN)- γ , and tumor necrosis factor (TNF)- α levels in serum and the cAMP level in plasma were tested by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Protein kinase A (PKA) expression in lung tissues was detected by immunohistochemistry. The cAMP-response element-binding protein (CREB) mRNA and protein expression in lung tissues was detected by the real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot. **Result:** Compared with the blank group, the model group showed increased lung resistance, decreased pulmonary compliance ($P<0.05$), elevated WBC count and proportion of eosinophils in BALF ($P<0.05$), up-regulated levels of IL-4, IL-5, IL-13, and TNF- α in peripheral blood, declining IFN- γ level ($P<0.01$), severe pathological changes of lung tissues, dwindled cAMP, and down-regulated PKA and CREB expression ($P<0.01$). Compared with the model group, JPBFP inhibited AHR, reduced WBC count and proportion of eosinophils in BALF and lung resistance ($P<0.05$), improved pathological changes of lung tissues, increased pulmonary compliance, and up-regulated cAMP in serum and PKA and CREB expression in lung tissues ($P<0.01$). **Conclusion:** JPBFP can improve AHR, inhibit airway inflammation, and alleviate lung injury in asthma rats. Its mechanism may be related to the up-regulation of the activity of the cAMP/PKA/CREB signaling pathway.

[Keywords] Jianpi Bufe prescription; asthma; airway hyperresponsiveness (AHR); cyclic adenosine monophosphate (cAMP); protein kinase A (PKA); cAMP-response element-binding protein (CREB)

哮喘是儿童呼吸系统的常见疾病,其发生、发展及恶化与遗传因素、环境因素、反复病毒或支原体感染、慢性鼻炎、长期和(或)大剂量使用短效 β_2 受体激动剂引起 β_2 受体下调等因素引发的气道高反应(AHR)有关^[1]。中医学中哮喘属于“哮病”“喘证”范畴,肺、脾、肾三脏功能不足,致痰饮留伏,外邪引发,触动伏痰,痰阻气道,发为哮喘^[2]。小儿“脾常不足”“肺常虚”在哮喘缓解期表现尤为突出,基于中医数据挖掘的方法探讨现代中医药治疗儿童哮喘缓解期的用药规律和组方特点发现,治疗药物基本以补气药、止咳平喘化痰药和理气健脾药物之间相配伍研究者理论研究与实践基础上发现小儿哮喘主要责之于伏痰难化、诱因难避和肺脾气虚^[3];故以化痰、健脾、补肺为基本大法,由此提出基于新安医学理论的难治性哮喘“益气健脾补肺,化痰止咳定喘”观点,体现了“治痰先治气”的治疗方法^[1],在临床上用于儿童哮喘缓解期取得了较好的疗效,但目前还未见其对于哮喘治疗作用机制的深

入研究报道。

环磷酸腺苷(cAMP)是 β_2 肾上腺素受体的下游信号,也是介导气道平滑肌松弛及抑制气道炎症的重要信使,一直以来,cAMP含量下降及cAMP与环磷酸鸟苷(cGMP)比值降低被认为是促进哮喘发生发展的重要原因之一。cAMP能够调节多种目的基因的转录,这一作用主要通过蛋白激酶A(PKA)和其下游的效应分子如cAMP反应元件结合蛋白(CREB)发挥。无活性的PKA由2个调节蛋白亚基R和两个催化亚基C促成的四聚体,其功能是激发底物磷酸化,以cAMP为第二信使的信号通路通过活化PKA是下游靶蛋白磷酸化。CREB是一段由30 bp左右的DNA片段构成的cAMP应答序列,能够刺激基因转录,主要对cAMP信号发生应答反应。cAMP/PKA/CREB通路的活性变化与肿瘤、细胞分化、免疫、炎症等多种生物效应,包括哮喘中的气道炎症和重塑密切相关^[4]。同时,cAMP/PKA/CREB通路也是众多哮喘治疗药物的共同作用靶

点, CREB 还可能介导了哮喘中 β_2 受体的下调, 与 AHR 发生相关^[5-9]。

健脾补肺方临床用于哮喘缓解期疗效确切, 动物实验研究发现其对于哮喘模型大鼠的气道炎症和气道重塑具有抑制作用, 并能够改善大鼠肺功能及一定程度的调节机体免疫, 对血管内皮生长因子(VEGF), 转化生长因子(TGF)- β , 血小板衍生生长因子(PDGF)等生长因子及细胞外调节蛋白激酶(ERK)1/2信号通路活性具有明显影响, 但关于此方对于气道炎症及其可能机制的深入研究还未见报道^[10-13]。本实验在建立幼大鼠龄哮喘模型的基础上, 研究健脾补肺方对幼龄哮喘大鼠的气道炎症, AHR, 炎症细胞数量以及cAMP信号通路活性的影响, 为明确健脾补肺方的抗哮喘作用及阐明其作用机制提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠, SPF级, 雄性, 体质量80~100 g, 3~4周龄, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 动物合格证号SCXK(沪)2008-0016, 由安徽中医药大学动物实验动物中心饲养。环境为温度(22±2) °C, 湿度50%~80%, 自由摄食饮水, 光照每12 h明暗交替。动物实验设计经安徽中医药大学伦理委员会论证, 符合动物伦理学要求(动物伦理编号AHUCM-rats-008)。

1.2 药物与试剂 健脾补肺方(方剂组成为炙黄芪10 g, 太子参8 g, 炒白术8 g, 茯苓6 g, 陈皮6 g, 炙甘草6 g, 葶苈子6 g, 薏苡仁10 g, 砂仁5 g, 桔梗8 g, 山药10 g, 白扁豆10 g), 购自安徽中医药大学第一附属医院中药房(药材均经安徽中医药大学第一附属医院药学部张明生主任中药师鉴定, 符合2020年版《中华人民共和国药典》要求); 卵白蛋白(OVA), 焦碳酸二乙酯(DEPC), 乙酰甲胆碱(Mch)(美国Sigma公司, 批号分别为A5253, 20150802554, 79H1505); 氨茶碱片(天津力生制药股份有限公司, 批号150522); 地塞米松磷酸钠注射液(芜湖康奇制药有限公司, 批号150211); 大鼠 γ 干扰素(IFN- γ), 白细胞介素4(IL-4), IL-5, IL-13, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 大鼠cAMP酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(上海源叶生物科技有限公司, 批号分别为20161108, 20161108, 20161108, 20161108, 20161108, 20161108); 苏木素, 伊红(美国Baso公司, 批号分别为BA4041, BA4022); 碘酸雪夫氏(PAS, 美国Solarbio公司, 批号G1280); 马松(Masson, 北京雷根生物技术有限公司, 批号

DC0033); TRIzol(美国Invitrogen公司, 批号135303); 三氯甲烷、无水乙醇、异丙醇(上海苏懿化学试剂有限公司, 批号均为20151020); QuantiFast SYBR Green 聚合酶链式反应(PCR)试剂盒(德国Qiagen公司, 批号151033144); 逆转录试剂盒, 预染蛋白Marker, ECL超敏发光试剂盒(美国Thermo公司, 批号分别为00330969, 00495577, QF220648); RIPA细胞裂解液, 一抗二抗去除液(碧云天生物技术有限公司, 批号分别为P0013B, P0025); 兔抗CREB一抗(美国Bioworld公司, 批号CJ36131); 山羊抗兔CREB二抗, EDTA修复液, 磷酸盐缓冲液(PBS), DAB显色剂, 小鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin)一抗, 山羊抗小鼠 β -肌动蛋白(β -actin)二抗, 通用型二抗试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号分别为129256, WK163613-2, WK163307-1, K136821F, 17AV0303, 127655, K136830B); 苏木素(珠海贝索生物技术有限公司, 批号716092); 兔抗大鼠PKA(北京博奥森生物技术有限公司, 批号AD17852061)。

1.3 仪器 980型雾化吸入器(上海新天缘医疗设备有限公司); V5.0型动物肺功能仪(南京美易科技有限公司); JB-4型磁力搅拌器(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司); Olympus BX51型显微镜(日本Olympus公司); TGL-18R型冷冻离心机(珠海黑马医学仪器有限公司); TDL-40B型低速离心机(上海飞鸽离心机); RT-6000型酶标仪, RT-3100型洗板机(深圳市雷杜生命科学股份有限公司); 免疫组化分析系统(江苏省捷达科技发展有限公司, JD801系列医学影像分析系统); LX300型微量离心机(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); PVDF膜(美国Millipore公司); RM2135型切片机(德国Leica公司); ZT-12M型自动脱水机, YB-7B型石蜡包埋(浙江亚光科技股份有限公司); JW-3021HR型高速台式冷冻离心机(安徽嘉文仪器装备有限公司); K960型普通PCR仪(杭州晶格科学仪器有限公司); 紫外凝胶成像系统(北京科创锐新生物科技有限公司); PIKOREAL 96型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Thermo公司); EPS300型电泳仪, VE-180型电泳槽, VE-186型转膜仪(上海天能科技有限公司); X胶片(美国Kodak公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药 SD大鼠适应性喂养1周后, 分为正常组、哮喘模型组、健脾补肺方组、氨茶碱组、地塞米松组, 每组15只。哮喘模型采用

0.2%OVA的氢氧化铝凝胶10点致敏,并以1%的OVA生理盐水溶液雾化攻击复制,用新鲜配制的10%氢氧化铝凝胶溶入OVA,OVA的终质量分数为0.2%,对哮喘模型组和给药组动物进行10点致敏法包括两前后足跖4点,两腹股沟2点,颈部1点,背部左、中、右3点,每点皮下注射0.2%OVA白凝胶0.05 mL,腹腔注射0.5 mL,共计1 mL/只^[14]。致敏第14天开始用1%的OVA雾化(1~5 m partica1)吸入30 min进行攻击,持续7 d,同时每次攻击前0.5 h灌胃给予各治疗药物(地塞米松组为腹腔注射给药),每天1次,持续7 d,大鼠给药剂量以临床人用量为依据,参考《药理实验方法学》^[15],按人和动物间体表面积折算的等效剂量比值,健脾补肺方组给予健脾补肺方(以临床人用量为依据,成人1剂/d,约合生药1.55 g·kg⁻¹·d⁻¹,大鼠用量换算为8.37 g·kg⁻¹·d⁻¹,取10剂中药,煎煮2次,合并浓缩至约1 100 mL,配成0.837 g·mL⁻¹的药液,每天按10 mL·kg⁻¹给药),氨茶碱组给予氨茶碱片40 mg·kg⁻¹(每片含氨茶碱0.1 g,取4片药溶于100 mL 5%的葡萄糖溶液中,配成4 g·L⁻¹的药液,每天按10 mL·kg⁻¹给药),地塞米松组给予地塞米松注射液0.1 mg·kg⁻¹(每1 mL含地塞米松5 mg,取1 mL用5%的葡萄糖溶液配成500 mL质量浓度为0.01 g·L⁻¹的药液,每天按10 mL·kg⁻¹给药)。

2.2 大鼠AHR测定 致敏大鼠末次攻击24 h后将大鼠用6%水合氯醛6 mL·kg⁻¹腹腔注射麻醉,行气管插管后,置于密闭的自制身体容积描记器内。用动物肺功能仪记录麻醉大鼠雾化吸入Mch前后的气道阻力(RL)和肺顺应性(Cdyn)。实验时吸入的Mch由超声雾化器雾化,吸入质量浓度依次为0.5, 1.0, 2.0, 4.0 g·L⁻¹,每一质量浓度雾化吸入20 s,间隔5~10 min后吸入下一个质量浓度,观察并记录吸入后5 min内RL和Cdyn的变化。

2.3 大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中炎症细胞数量和比例的测定 致敏大鼠末次攻击后24 h股动脉放血处死,放入75%乙醇浸泡消毒,剪开胸腔,结扎右肺,行气管插管,用D-Hank's液5 mL分3次对左肺进行支气管肺泡灌洗,回收BALF,回收率达90%。以1:3比例加入白细胞计数液,用细胞计数板计数白细胞总数,再以1 500 r·min⁻¹离心10 min(离心半径16 cm,下同)弃去上清液,取沉淀涂片20 μL,苏木素-伊红(HE)染色后进行白细胞分类计数。

2.4 大鼠肺组织形态学改变观察 大鼠股动脉放

血处死,取肺组织,10%甲醛固定,常规石蜡包埋,HE,PAS,Masson染色观察肺组织形态学变化。

2.5 大鼠血清及肺组织中Th1,Th2型细胞因子含量的测定 致敏大鼠末次攻击后24 h股动脉放血处死,留取血清按ELISA试剂盒说明书进行检测;取肺组织,加入冷生理盐水匀浆后1 500 r·min⁻¹离心15 min取上清按ELISA试剂盒说明书检测,测定的细胞因子包括IL-4,IL-5,IL-13,IFN-γ,TNF-α。

2.6 大鼠血浆及肺组织中cAMP含量的测定 同2.5项方法取取血,血液经抗凝处理,1 500 r·min⁻¹离心10 min取上层血浆按ELISA试剂盒说明书检测cAMP含量。

2.7 大鼠肺组织中PKA蛋白表达测定 在组织上滴加3%H₂O₂,室温孵育20 min,PBS冲洗3遍,将切片甩干,加PKA一抗(兔抗大鼠,1:200),盖上孵育盒盖子,37℃孵育90 min。PBS冲3遍,将片子甩干,加二抗(即用型),盖上孵育盒盖子,37℃孵育30 min,PBS冲3遍,甩干,加DAB显色剂,显微镜下观察,着色后即可终止显色。苏木素染色1 min,自来水冲洗干净,放入1%HCL中,后自来水冲洗,过3道无水乙醇,每道3 min,苯酚-二甲苯3 min,3道二甲苯,每道3 min,中性树胶封片。显微镜下观察拍照,棕色为阳性表达的位置。利用数字扫描仪进行整张片子扫描到电脑里,然后利用数字扫描的读片软件对需要的图片进行截图,用捷达JD801系列医学影像分析系统进行平均光密度分析。

2.8 Real-time PCR法检测大鼠肺组织中CREB mRNA表达量 取各组大鼠肺组织约0.5 g加TRIzol 1 mL冰浴中匀浆,冰上放置5 min,使核蛋白复合体完全分离;4℃12 000×g离心10 min,取上清;加入三氯甲烷0.2 mL,震荡15 s使其充分接触,冰上放置5 min;4℃12 000×g离心15 min,用移液枪小心吸取上层液相溶液(约0.5 mL)转移至洁净离心管中;加入等体积(约0.5 mL)异丙醇,震荡,放置10 min;4℃12 000×g离心10 min,沉淀即为RNA;移去上清,加入75%乙醇1 mL,涡旋后4℃7 500×g离心5 min,弃上清(洗RNA沉淀);将RNA沉淀溶于DEPC水50 μL中,置于-80℃冰箱保存备用;取RNA溶液2 μL溶于DEPC水溶液98 μL中,混合均匀后,经核酸紫外分析仪检测,根据吸光度A₂₆₀/A₂₈₀,确定样品中RNA纯度,比值介于1.8~2.0的样品全部用双蒸水配制成2 g·L⁻¹的RNA溶液保存备用。二步法Real-time PCR检测CREB mRNA的表达,RT反应体系为Mix 1.0 μL, Gene Special

Primer 1.0 μL (即 Primer), RNase Free dH_2O 4.0 μL , Primer Script Buffer2 4.0 μL , 42 $^\circ\text{C}$, 15 min; 85 $^\circ\text{C}$ 5 s 完成逆转录反应。Real-time PCR 反应体系为 2 \times SYBR Green mixture 5 μL , 正反向引物各 1 μL , 模板 cDNA 1 μL , RNase Free water 2 μL , 95 $^\circ\text{C}$ 热失活变性 1 min, 95 $^\circ\text{C}$ 变性 20 s, 60 $^\circ\text{C}$ 退火延伸 1 min, 共 40 个循环, 得到每个样品的 C_t 值, 以 β -actin 作为内参基因, 计算各目的基因 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值, 以假手术组为基线计算各组目的基因的相对表达水平。引物序列见表 1, CREB, β -actin 的 PCR 引物均由美国 Invitrogen 公司设计合成。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
CREB	上游 GACAACCAGCAGAGTGGAG	103
	下游 GCATGGATACCTGGGCTAAT	
β -actin	上游 CCCATCTATGAGGGTTACGC	150
	下游 TTTAATGTCACGCACGATTTC	

2.9 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测大鼠肺组织中 CREB 的蛋白表达量 剪取组织, 称质量, 每个样品质量在 100 mg 左右, 加入 RIPA 细胞裂解液 1 mL (内含 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PMSF) 进行裂解。12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4 $^\circ\text{C}$ 离心 15 min。收集上清液, 即含有组织总蛋白。在收集的蛋白样品中按照 1:4 加入的 5 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液。沸水浴加热 10 min, 以充分变性蛋白。待样品冷却到室温后, 把蛋白样品直接上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内即可。每孔加 5~15 μL 。浓缩胶所用电压为 80 V, 时间为 30 min; 分离胶所用电压为 120 V, 时间为 1 h。将预先裁好与胶条同样大小的 PVDF 膜 (预先在甲醇中浸泡 3~5 min), 浸入转膜缓冲液中 5 min。接通电源, 300 mA 恒流转膜。转膜完毕后, 立即把蛋白膜放置到预先准备好的 Western 洗涤液中, 漂洗 5 min, 以洗去膜上的转膜液。加入 Western 封闭液 (5% 脱脂奶粉), 在摇床上缓慢摇动, 室温封闭 2 h。参考一抗的说明书, 按照合适的比例用一抗稀释液进行稀释 (CREB 抗体按 1:500 稀释; β -actin 抗体按 1:1 000 稀释; 10% 的分离胶), 4 $^\circ\text{C}$ 缓慢摇动孵育过夜。加入洗涤液 (PBST), 每次洗涤 10 min, 共洗涤 3 次。参考二抗的说明书, 按照 1:1 万比例用二抗稀释液稀释辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗。室温孵育 2 h。加入洗涤液 (PBST), 每次洗涤 10 min, 共洗涤 3 次。化学发光法进行曝光显色, 使用 ECL 发光试

剂盒来检测蛋白, 成像后使用 Image J 软件对结果进行灰度分析。

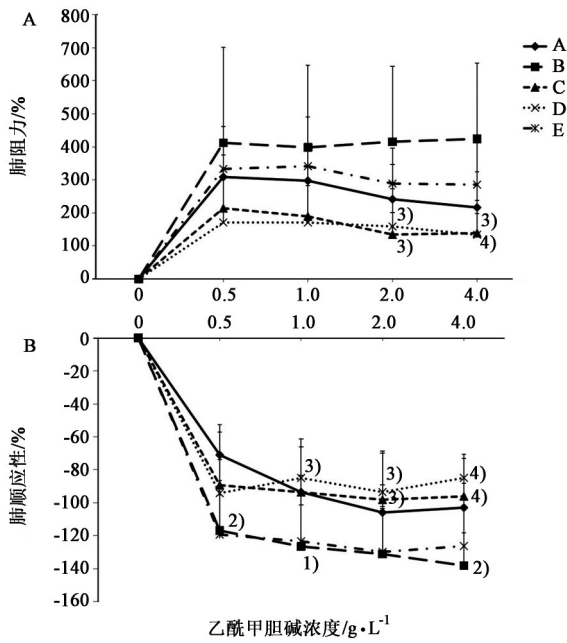
2.10 统计学分析 采用 IBM SPSS 13.0 统计软件进行重复测量的多因素方差分析, 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 每个时间点上多个分组之间的比较用多变量方差分析, $P<0.05$ 差异有统计学意义, 对 CREB 数据做 Shapiro-Wilk 检验, 各指标数据符合正态分布, 做单因素方差分析, 方差齐, 组间比较用最小显著性差异法 (LSD) 法, 方差不齐, 组间比较用 Games-Howell (A) 法。

3 结果

3.1 对幼龄哮喘大鼠肺功能及 AHR 性的影响 根据实验所得数据, 分别绘制 RL 变化趋势图和 Cdyn 变化趋势图, 模型组大鼠 RL 较正常组明显升高, 且随着 Mch 刺激质量浓度的增加, 模型组大鼠 RL 上升更为明显, 上升趋势大于其余各组, 说明模型组大鼠对 Mch 的敏感性高于其余各组; 健脾补肺方和氨茶碱组在 2.0, 4.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MCh 刺激浓度下能够明显降低大鼠的 RL, 和模型组大鼠比较差异显著 ($P<0.05$)。模型组大鼠 Cdyn 较正常组显著降低 ($P<0.05$), 且随着 Mch 刺激质量浓度的增加降低越明显, 其趋势大于其余各组; 健脾补肺方和氨茶碱组在 2.0, 4.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MCh 刺激浓度下能够明显减轻模型组大鼠 Cdyn 的降低, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 1。

3.2 对幼龄哮喘大鼠 BALF 中炎症细胞数量的影响 与正常组比较, OVA 致敏并攻击后的模型组大鼠 BALF 中的白细胞总数显著增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, 健脾补肺方、氨茶碱和地塞米松能够不同程度地减少 BALF 中的白细胞数量 ($P<0.05$), 但是健脾补肺方对 BALF 中的白细胞数量的影响较地塞米松和氨茶碱组小。与正常组比较, OVA 致敏并攻击后的模型组大鼠 BALF 中嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、中性粒细胞和单核细胞的数量显著高于正常组 ($P<0.01$); 与模型组比较, 健脾补肺方、氨茶碱和地塞米松能够明显减少嗜酸性粒细胞和中性粒细胞的数量, 健脾补肺方和地塞米松能够明显减少嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和中性粒细胞的数量 ($P<0.01$)。见表 2。

3.3 对幼龄哮喘大鼠肺组织形态学的影响 正常组气道壁及肺泡结构正常, 气管黏膜上皮完整, 未见炎症细胞浸润, OVA 致敏模型组可见气道周围及肺间质有大量炎症细胞浸润 (以嗜酸性粒细胞、淋巴细胞为主), 支气管管壁增厚、管腔狭窄, 支气管



与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;
A. 正常组; B. 模型组; C. 健脾补肺方组; D. 氨茶碱组; E. 地塞米松组

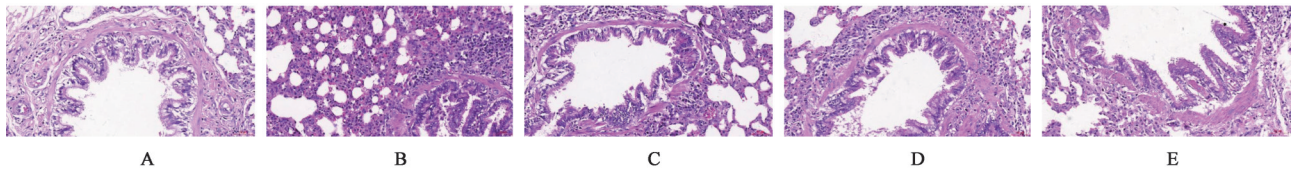
图1 健脾补肺方对哮喘大鼠RL和Cdyn的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)
Fig. 1 Effect of Jianpi Bufei prescription on RL and Cdyn of asthmatic rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

管壁及平滑肌较正常组增厚。健脾补肺方组、氨茶碱组、地塞米松组和模型组比较炎症细胞浸润明显减少,支气管管壁及平滑肌较模型组变薄,其中健

表2 健脾补肺方对哮喘大鼠BALF中白细胞总数及分类计数的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	白细胞总数	嗜酸性粒细胞	淋巴细胞	中性粒细胞	单核细胞
正常		50.00±11.88	0.27±0.09	34.51±10.61	1.86±0.42	1.72±0.40
模型		152.67±33.42 ¹⁾	23.17±5.79 ¹⁾	70.84±9.90 ¹⁾	29.83±6.03 ¹⁾	16.59±2.69 ¹⁾
健脾补肺方	8.37	114.33±11.20 ²⁾	18.94±4.77 ³⁾	57.58±9.76	19.81±5.76 ³⁾	11.50±4.11
氨茶碱	0.04	95.33±13.56 ³⁾	14.72±5.32 ³⁾	106.00±13.46	11.62±4.75 ³⁾	10.09±2.05
地塞米松	0.000 1	57.00±12.39 ³⁾	8.06±3.30 ³⁾	37.28±10.86 ³⁾	5.44±1.68 ³⁾	5.56±2.46 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。



A. 正常组; B. 模型组; C. 健脾补肺方组; D. 氨茶碱组; E. 地塞米松组(图3,4同)

图2 健脾补肺方对哮喘大鼠肺组织病理学的影响(HE, ×200)

Fig. 2 Effect of Jianpi Bufei prescription on lung tissue of asthmatic rats (HE, ×200)

3.5 对幼龄哮喘大鼠血浆中cAMP的影响 与正常组比较,哮喘模型组大鼠血浆中cAMP水平显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,健脾补肺方和氨茶碱均能够显著升高哮喘大鼠血浆中cAMP水平($P <$

健脾补肺方组和氨茶碱组作用相当,地塞米松能够明显抑制炎症细胞的数量,但对肺组织及支气管的形态学改善作用不如健脾补肺方和氨茶碱组。见图2。正常组气道黏液分泌较少,未见明显的杯状细胞增生,OVA致敏模型组可见气道内壁大量杯状细胞增生,黏液分泌和正常正常组相比明显增加。健脾补肺方组、氨茶碱组、地塞米松组和模型组相比杯状细胞增生和黏液分泌明显减少,其中健脾补肺方组和氨茶碱组和地塞米松组作用相当。见图3。正常组肺组织和气道周围纤维组织较少,未见纤维增生情况,OVA致敏模型组可见肺组织及气道周围大量炎症细胞募集,并形成大量纤维组织,和正常正常组相比纤维增生明显。健脾补肺方组、氨茶碱组、地塞米松组和模型组相比纤维增生明显减少,其中地塞米松组和氨茶碱组作用相当,健脾补肺方组作用稍弱于前两者。见图4。

3.4 对幼龄哮喘大鼠外周血中炎症因子的影响

与正常组比较,哮喘模型组大鼠血清及肺组织中IL-4, IL-5, IL-13及TNF- α 水平显著升高,而IFN- γ 显著降低($P < 0.01$),差异有显著统计学意义;与模型组比较,健脾补肺方和氨茶碱均能够显著降低哮喘大鼠血清及肺组织中IL-4, IL-5, IL-13及TNF- α 水平,升高IFN- γ 水平($P < 0.01$),差异有显著统计学意义。见表3。

0.01)。见表4。

3.6 对幼龄哮喘大鼠肺组织中PKA蛋白表达影响 本研究通过免疫组化(IHC)染色研究发现,哮喘模型组大鼠肺组织中PKA的表达量和正常组相

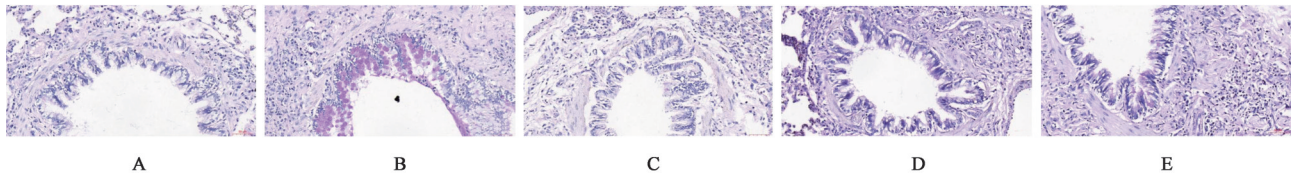


图3 健脾补肺方对哮喘大鼠肺组织杯状细胞增生和黏液分泌的影响(PAS,×200)

Fig. 3 Effect of Jianpi Bufe prescription on goblet cell hyperplasia and mucus secretion of asthmatic rats (PAS,×200)

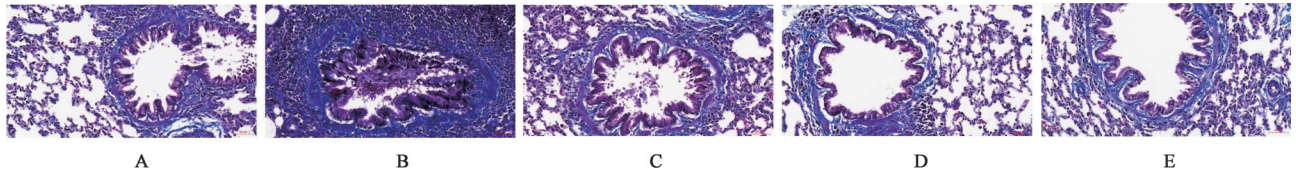


图4 健脾补肺方对哮喘大鼠肺组织纤维增生的影响(Masson,×200)

Fig. 4 Effect of Jianpi Bufe prescription on fibroplasia of of asthmatic rats (Masson,×200)

表3 健脾补肺方对哮喘大鼠外周血IL-4,IL-5,IL-13,IFN-γ,TNF-α水平的影响(̄x±s,n=6)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-4	IL-5	IL-13	IFN-γ	TNF-α
正常		42.38±5.16	35.94±7.11	22.94±3.57	45.99±12.18	124.86±12.16
模型		97.69±9.73 ¹⁾	109.91±13.75 ¹⁾	57.23±14.03 ¹⁾	114.22±17.11 ¹⁾	306.84±36.53 ¹⁾
健脾补肺方	8.37	57.04±5.79 ²⁾	50.30±4.16 ²⁾	28.56±4.49 ²⁾	71.39±3.04 ²⁾	163.74±20.25 ²⁾
氨茶碱	0.04	63.25±4.71 ²⁾	51.99±7.51 ²⁾	28.25±4.47 ²⁾	63.60±10.51 ²⁾	174.74±13.14 ²⁾
地塞米松	0.000 1	48.90±5.99 ²⁾	51.19±5.33 ²⁾	28.58±3.96 ²⁾	58.18±10.97 ²⁾	151.13±19.12 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.01(表4,5同)。

表4 健脾补肺方对哮喘大鼠外周血cAMP水平的影响(̄x±s,n=6)

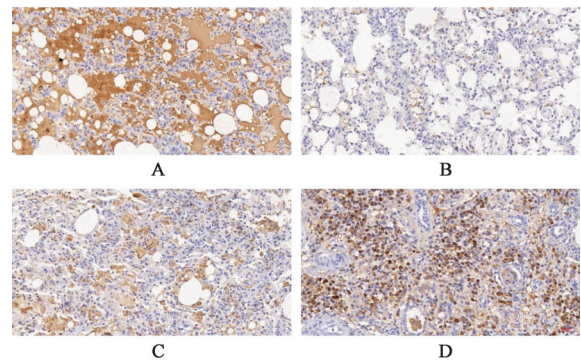
Table 4 Effect of Jianpi Bufe prescription on cAMP level in plasma of asthmatic rats (̄x±s,n=6)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	cAMP/ng·L ⁻¹
正常		45.73±4.30
模型		21.30±3.21 ¹⁾
健脾补肺方	8.37	30.53±3.53 ²⁾
氨茶碱	0.04	34.13±4.81 ²⁾

比有明显减少(P<0.01),而健脾补肺方和氨茶碱均能不同程度的升高大鼠肺组织PKA的表达量(P<0.01),增加cAMP信号通路的活性。见图5,表5。

3.7 对幼龄哮喘大鼠肺组织中CREB mRNA表达影响 与正常组比较,哮喘模型组大鼠肺组织中CREB mRNA表达水平显著降低(P<0.01);与模型组比较,健脾补肺方和氨茶碱均能够明显升高哮喘模型组CREB mRNA表达(P<0.05,P<0.01),且健脾补肺的改善效果优于氨茶碱组。见表6。

3.8 对幼龄哮喘大鼠肺组织中CREB蛋白表达影响 与正常组比较,哮喘模型组大鼠肺组织中CREB表达水平显著降低(P<0.01);与模型组比较,健脾补肺方和氨茶碱均能够明显增加模型大鼠



A. 正常组;B. 模型组;C. 健脾补肺方组;D. 氨茶碱组(图5,6同)

图5 健脾补肺方对哮喘大鼠肺组织PKA表达的影响(IHC,×200)

Fig. 5 Effect of Jianpi Bufe prescription on PKA expression of asthmatic rats (IHC,×200)

表5 健脾补肺方对哮喘大鼠肺组织PKA表达的影响(̄x±s,n=6)

Table 5 Effect of Jianpi Bufe prescription on PKA expression in lung tissue of asthmatic rats (̄x±s,n=6)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PKA
正常		0.69±0.01
模型		0.22±0.02 ¹⁾
健脾补肺方	8.37	0.38±0.03 ²⁾
氨茶碱	0.04	0.46±0.04 ²⁾

表6 健脾补肺方对哮喘大鼠肺组织 CREB mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Jianpi Bufei prescription on CREB mRNA expression in lung tissue of asthmatic rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CREB
正常		1.00±0.05
模型		0.10±0.01 ¹⁾
健脾补肺方	8.37	0.66±0.04 ³⁾
氨茶碱	0.04	0.24±0.02 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01(表7同)。

CREB 的表达(P<0.05, P<0.01),而且健脾补肺的改善效果优于氨茶碱组。见图6,表7。

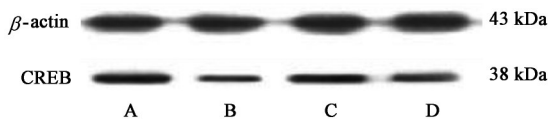


图6 各组大鼠肺组织 CREB 基因表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of CREB mRNA expression of asthmatic rats

表7 健脾补肺方对大鼠肺组织 CREB 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Jianpi Bufei prescription on relative expression of CREB protein in lung tissue of asthmatic rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CREB/ β -actin
正常		1.24±0.05
模型		0.53±0.09 ¹⁾
健脾补肺方	8.37	1.00±0.04 ³⁾
氨茶碱	0.04	0.69±0.08 ²⁾

4 讨论

cAMP是细胞内重要的第二信使,其上下游与多条信号通路相联系,调控着细胞的炎症、免疫等多种生理和病理效应^[16]。哮喘的诱发因素包括免疫球蛋白(Ig)E,病毒和环境污染等,这些刺激因素通过抗原识别受体(PAR)和钟状受体(TLR)激活气道上皮细胞,刺激2型T辅助细胞(Th2)和2型固有淋巴细胞(ILC2),启动和介导2型免疫应答,从而产生更多以IL-4, IL-5, IL-9和IL-13为代表的Th2细胞因子,促进嗜酸性粒细胞和肥大细胞的激活和募集、杯状细胞增生和黏液分泌,最终引起气道重塑和AHR^[11,17],哮喘的一线治疗药物包括 β_2 肾上腺素受体激动剂和糖皮质激素,其作用的发挥均与影响cAMP信号通路的活性密切相关^[18]。cAMP主要通过PKA和Epac 2条通路引起信号级联反应,其中关

于PKA的研究较多,cAMP/PKA通路不仅和炎症免疫相关,与组织增生和气道重塑也有密切的关系^[4]。近年来,也有研究将用于具有血管舒张作用的钙通道拮抗剂治疗哮喘,亦见到较好疗效,并认为阻断钙通道后引起支气管平滑肌松弛的作用是由cAMP介导的^[19-20]。在cAMP/PKA这一途径中,膜受体与其相应的第一信使分子结合后,激活CREB转录因子,继而激活膜上的Gq蛋白(一种G蛋白),然后由Gq蛋白激活磷酸酯酶C β (PLC),将膜上的脂酰肌醇4,5-二磷酸(PIP₂)分解为细胞内的第二信使:三磷酸肌醇(IP₃),通过IP₃受体激活蛋白激酶C(PKC),引起肌球蛋白轻链激酶(MLCK)激活,最后通过激动 β_2 受体引起气道平滑肌(ASM)松弛^[21-22]。CREB是cAMP/PKA通路下游重要的信号蛋白,也是多种影响气道炎症和气道重塑的信号通路的重要下游信号,在哮喘的病理过程中发挥中重要的作用。cAMP/PKA通路活性的下降会使CREB下调,这可能是哮喘中气道炎症和气道重塑发生的重要基础,也进一步介导了气道炎症和气道重塑^[23-24]。因此,cAMP/PKA/CREB信号通路的下调是介导哮喘中的气道慢性炎症和AHR的关键因素。

哮喘为儿科常见的顽固性病证,是病因繁多、发病机制复杂的慢性呼吸道疾病,近年来由于环境污染和饮食生活习惯的改变,哮喘在儿童及未成人人群中逐年上升的趋势^[25-26]。哮喘患儿大多自幼起病,常反复发作,严重危害小儿生长发育和健康,尤其哮喘持续状态若得不到及时处理常可危及生命,因此如何有效地控制和防止哮喘发生已成为中西医研究的重要课题。健脾补肺方在前期的临床研究中显示出对于小儿哮喘的较好疗效^[11,11,13]。本实验结果显示健脾补肺方对幼龄哮喘大鼠具有较好的干预作用,可以减轻大鼠的AHR,在高浓度的乙酰甲胆碱刺激下,可以明显降低RL并增加Cdyn;肺组织病理染色显示健脾补肺方能够改善哮喘大鼠肺组织的病理状态,抑制炎症细胞浸润,减少杯状细胞增生和黏液分泌,并降低纤维增生,对BALF中的白细胞计数和分类计数也验证了健脾补肺方对肺组织炎症的抑制作用。研究显示,健脾补肺方能够改善哮喘大鼠炎症细胞数量,增加IFN- γ 水平并抑制IL-4, IL-5和IL-13水平,并降低TNF- α 水平,提示健脾补肺方能够改善哮喘大鼠的免疫失衡和炎症反应。进一步的机制研究中,考虑到地塞米松虽然是临床一线治疗药物,但其作用机制并不与cAMP激活直接相关,因此选用作用机制与cAMP

信号通路激活密切相关的氨茶碱作为阳性药物, 结果发现, 健脾补肺方能够明显上调下游信号蛋白PKA和CREB的表达, 增加cAMP/PKA/CREB信号通路的活性, 这可能是其治疗哮喘的重要机制。cAMP信号通路是多种哮喘治疗药物的共同作用靶点, 本研究为阐明健脾补肺方治疗哮喘的作用和机制提供了理论依据, 对其关键作用环节还需要进一步探讨。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 姚雪红, 尚莉丽. 尚莉丽治疗儿童难治性哮喘经验撷萃[J]. 中医药临床杂志, 2018, 30(10): 1799-1801.

[2] 徐彬彬, 姜之炎. 活血化瘀法治疗小儿哮喘的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(36): 4722-4724.

[3] 吴迪, 杨勤军, 李泽庚, 等. 基于数据挖掘的中医药治疗儿童哮喘缓解期的临床用药规律分析[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(1): 234-238.

[4] WÓJCIK-PSZCZOŁA K, CHŁOŃ -RZEPA G, JANKOWSKA A, et al. A novel, Pan-PDE inhibitor exerts anti-fibrotic effects in human lung fibroblasts via inhibition of TGF- β signaling and activation of cAMP/PKA signaling[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 4008.

[5] ZHANG H, KONG Q, WANG J, et al. Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2020, 9(1): 32.

[6] WANG L, HAN L, XUE P, et al. Dopamine suppresses osteoclast differentiation via cAMP/PKA/CREB pathway[J]. *Cell Signal*, 2021, 78: 109847.

[7] KIM D, CHO S, WOO J A, et al. A CREB-mediated increase in miRNA let-7f during prolonged β -agonist exposure: a novel mechanism of β_2 -adrenergic receptor down-regulation in airway smooth muscle[J]. *FASEB J*, 2018, 32(7): 3680-3688.

[8] CHEN Y, GAO Y, LU W, et al. Influence of acupuncture on the expression of VIP, SP, NKA and NKB, cAMP/cGMP and HE content and treatment of bronchial asthma in rats[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2020, 66(5): 29-35.

[9] WANG S, XIE Y, HUO Y W, et al. Airway relaxation mechanisms and structural basis of osthole for improving lung function in asthma [J]. *Sci Signal*, 2020, 13(659): e0273.

[10] 杨小静. 哮喘缓解期肺脾气虚证应用补肺健脾汤治疗效果研究[J]. 首都食品与医药, 2020, 27(6): 191-192.

[11] 张莉莉, 尚莉丽. 健脾补肺化痰方干预幼龄哮喘大鼠气道重塑模型中PDGF、ERK1/2/c-jun信号通路的研

究[J]. 中医药临床杂志, 2018, 30(5): 880-884.

[12] 宋鹏飞, 尚莉丽, 田净忆. 健脾补肺化痰方对哮喘大鼠肺组织中TGF- β_1 、c-fos表达影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(4): 23-26.

[13] 顾婷婷, 余燕玲, 尚莉丽. 健脾补肺化痰方对哮喘大鼠血清VCAM-1、ICAM-1、VEGF水平的影响[J]. 江西中医药大学学报, 2017, 29(5): 62-64, 108.

[14] 陈艳, 李子刚, 汤慧芳, 等. 咯利普兰对大鼠哮喘模型肺组织磷酸二酯酶及IL-4的影响[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(4): 447-451.

[15] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.

[16] MUSHESHE N, SCHMIDT M, ZACCOLO M. cAMP: from long-range second messenger to nanodomain signalling [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2018, 39(2): 209-222.

[17] KATO A. Group 2 innate lymphoid cells in airway diseases[J]. *Chest*, 2019, 156(1): 141-149.

[18] CAMINATI M, PHAM D L, BAGNASCO D, et al. Type 2 immunity in asthma[J]. *World Allergy Organ J*, 2018, 11(1): 13.

[19] BERGANTIN L B. The interplay between asthma and other diseases: role of Ca²⁺/cAMP signalling [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2020, 20(3): 321-327.

[20] BERGANTIN L B. A link among schizophrenia, diabetes, and asthma: role of Ca²⁺/cAMP signaling[J]. *Brain Circ*, 2020, 6(3): 145-151.

[21] CHARLOTTE K B, IAN P H. Novel cAMP signaling paradigms: therapeutic implications for airway disease [J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 166: 401-410.

[22] DOINA M, RACILA, JOEL N. Kline. Perspectives in asthma: molecular use of microbial products in asthma prevention and treatment[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116: 1202-1205.

[23] WU Y, LU Y, ZOU F, et al. PTEN participates in airway remodeling of asthma by regulating CD38/Ca²⁺/CREB signaling [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(16): 16326-16340.

[24] WANG H, CHENG Y, LIU Y, et al. Montelukast promotes mitochondrial biogenesis via CREB/PGC-1 α in human bronchial epithelial cells [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 4234-4239.

[25] PAPI A, BRIGHTLING C, PEDERSEN S E, et al. Asthma[J]. *Lancet*, 2018, 391(10122): 783-800.

[26] 赵桓艺, 潘俊辉, 陈珠侨. 大青龙汤对外寒内热证型小儿哮喘疗效及免疫功能的影响[J]. 世界中医药, 2020, 15(17): 2608-2612.

[责任编辑 周冰冰]