

平喘宁对哮喘大鼠 Bcl-2, Bax, EGF mRNA 及 PDGF mRNA 表达的影响

方向明*, 朱佳琪, 王智星
(安徽中医药大学, 合肥 230038)

[摘要] **目的:**观察平喘宁对寒性哮喘大鼠的肺功能、气道形态学、肺组织中 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax), 表皮生长因子 (EGF) mRNA 及血小板衍生生长因子 (PDGF) mRNA 表达的影响。**方法:**将 105 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、桂龙咳喘宁组、地塞米松组、平喘宁高、中、低剂量组, 每组 15 只。以卵蛋白致敏及寒冷刺激复制大鼠寒哮模型, 造模 21 d 后, 各给药组分别给予桂龙咳喘宁组 ($10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 地塞米松组 ($0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 平喘宁高、中、低剂量组 ($19.6, 9.8, 4.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), *ig* 给药, 正常组、模型组每天 *ig* 给予等量蒸馏水, 连续给药 4 周, 处死前测定肺功能, 处死后解剖大鼠并取出肺组织。采用免疫组化法测定肺组织中 Bcl-2 及 Bax 的表达。采用苏木素和伊红 (HE) 染色行病理形态学改变观察, 采用逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 半定量检测 EGF mRNA, PDGF mRNA 表达丰度。**结果:**与正常组比较, 模型组大鼠支气管炎症细胞浸润明显, 显著变窄, 平滑肌增厚; 肺功能下降 ($P < 0.01$)。Bcl-2 表达升高, Bax 表达降低 ($P < 0.01$); EGF mRNA, PDGF mRNA 表达升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组的肺组织病理改变减轻; 肺功能有不同程度的好转 ($P < 0.01, P < 0.05$)。各给药组肺组织中 Bcl-2 表达降低, Bax 表达增加 ($P < 0.01, P < 0.05$)。各给药组 EGF mRNA, PDGF mRNA 表达水平降低 ($P < 0.01, P < 0.05$)。**结论:**平喘宁可降低哮喘大鼠 Bcl-2 蛋白的表达, 升高 Bax 蛋白的表达; 抑制 EGF mRNA, PDGF mRNA 表达, 从而抑制细胞外信号调节蛋白激酶 (ERK) 通路活化, 减轻炎症反应, 改善肺功能, 抑制气道平滑肌增生, 延缓气道重塑而治疗哮喘。

[关键词] 哮喘; 平喘宁; 肺功能; 表皮生长因子; 血小板衍生生长因子; B 细胞淋巴瘤/白血病-2; Bcl-2 相关 X 蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)24-0088-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015240088

Effect of Pingchuanning on Expression of Bcl-2, Bax, EGF mRNA, PDGF mRNA in Lung Tissues of Asthma Rats FANG Xiang-ming*, ZHU Jia-qi, WANG Zhi-xing (Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Pingchuanning on B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), epidermal growth factor (EGF) mRNA, platelet-derived growth factor (PDGF) mRNA expressions, lung function and airway morphology in cold asthma model rats. **Method:** One hundred and five SD male rats were randomly divided into normal group, model group, Guilong Kechuanning group, dexamethasone group, Pingchuanning high-dose group, medium-dose group and low-dose group with 15 in each group. The ovalbumin sensitization and cold stimulation were adopted to establish the rat asthma model. At the 21st day after the modeling, normal and model groups were given the same amount of distilled water every day, the dexamethasone group ($0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), Guilong Kechuanning group ($10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and Pingchuanning high, medium and low dose groups ($19.6, 9.8, 4.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) were given corresponding drugs for four weeks. And the changes in lung function of asthma rats were observed, then Bcl-2 and Bax protein expressions of the lung tissues were detected by immunohistochemical assay. The lung histopathological changes were observed by hematoxylin and eosin (HE) staining. Expression of EGF mRNA and PDGF mRNA in the lungs were detected by RT-PCR. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed obvious inflammatory cells invasion,

[收稿日期] 20150319(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173187)

[通讯作者] *方向明, 博士, 教授, E-mail: fxm.bsh@163.com

stricture of bronchus, thickening of airway smooth muscle and declined lung function ($P < 0.01$); increases in Bcl-2 protein, EGF mRNA, PDGF mRNA ($P < 0.01$); and decrease in Bax expression ($P < 0.01$). Compared with the model group, all treatment groups showed improvements in the lung function and pathological changes to varying degrees ($P < 0.01$, $P < 0.05$); decreases in Bcl-2 protein, EGF mRNA, PDGF mRNA ($P < 0.01$, $P < 0.05$); and increase in Bax expression ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion:** Pingchuanning could reduce the expression of Bcl-2 protein and improve Bax protein in lung of asthmatic rats, inhibit the activation of ERK pathway, alleviate inflammatory reaction, improve the lung function, reduce airway smooth muscle hyperplasia, delay the airway remodeling and treat asthma, by the inhibition of EGF mRNA and PDGF mRNA.

[**Key words**] asthma; Pingchuanning; lung function; epidermal growth factor; platelet-derived growth factor; B-cell lymphoma/leukemia-2; Bcl-2 associated X protein

支气管哮喘是由多种细胞和细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病^[1]。中医药防治哮喘有着悠久的历史,其属中医“哮证”范畴。平喘宁是笔者长期治疗寒哮的验方,由射干麻黄汤与三子养亲汤化裁而成,主要由麻黄、苏子、杏仁、清半夏等中药组成,是治疗寒哮的有效方剂,具有温肺化痰、止咳平喘之功效。本实验通过建立大鼠寒哮模型,观察平喘宁对哮喘大鼠肺功能以及肺组织中 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax),表皮生长因子(EGF)mRNA 及血小板衍生生长因子(PDGF)mRNA 表达的影响,研究平喘宁治疗寒哮的作用机制,为该方治疗寒哮提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠 105 只,体重 180 ~ 220 g,清洁级,由安徽医科大学动物实验中心提供,合格证号 SCXK(皖)2011-002。

1.2 药物 平喘宁方药组成:麻黄、杏仁、苏子、清半夏等,饮片来源于安徽中医药大学国医堂制剂中心,分别煎制成 3 个浓度生药,质量浓度分别为 1.96,0.98,0.49 g·mL⁻¹。桂龙咳喘宁颗粒剂(山西桂龙医药有限公司产品,批号 Z20103119)。地塞米松片(上海信谊药业有限公司产品,批号 030402)。

1.3 试剂与仪器 Bcl-2, Bax 抗体(批号分别为 14H80415,14V70207),DAB 显色剂试剂盒(批号 K136821),通用型二抗试剂盒(批号 K136821F),均为北京中杉金桥生物技术有限公司,Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 14105),目的基因和 GAPDH 引物(上海捷瑞生物技术有限公司,批号 20140721),PCR 试剂和 Taq DNA 聚合酶(美国 Fermentas 公司,批号 00255866),DEPC(美国 Sigma 公司,批号 20130119215),琼脂糖凝胶(北京索莱宝科技有限公司,批号 111860),逆转录试剂盒(Fermentas 公司,批号 00145205),DNA Marker(宝

生物公司,批号 B7301A),卵蛋白(美国 Sigma 公司,批号 20140228),水合氯醛(上海化学试剂公司,批号 20140825)。RSE3020 型动物呼吸机,AniRes2003 软件分析(北京贝兰博科技有限公司),402A 型超声雾化器(江苏鱼跃医疗设备有限公司),CX31 型光学显微镜(日本奥林巴斯公司),FA3204B 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂),1900 型切片机(德国 Leica 公司),9700 型 PCR 仪(美国 ABI 公司),TGL-18R 冷冻离心机,801 病理图像分析系统(江苏捷达公司),GSG-2000 凝胶图像分析管理系统(珠海黑马医学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 大鼠寒哮模型制备及给药

2.1.1 动物分组与模型制备 大鼠常规饲养 7 d 后,随机分成正常组、模型组、平喘宁高、中、低剂量组、地塞米松组、桂龙咳喘宁组,共 7 组,每组 15 只。参照文献[2-3]复制寒哮模型,正常组不用寒冷刺激,以生理盐水代替卵白蛋白(OVA)致敏与激发。造模成功后,继续雾化激发与寒冷刺激 4 周。

2.1.2 给药 造模第 21 天后开始给药。正常组、模型组 ig 等容积的 9.0 g·L⁻¹氯化钠溶液,桂龙咳喘宁组将桂龙咳喘宁胶囊内的药粉倒出用生理盐水溶解后 ig(10 g·kg⁻¹·d⁻¹),地塞米松组将地塞米松药片研碎后用生理盐水溶解后 ig(0.4 mg·kg⁻¹·d⁻¹),平喘宁低、中、高剂量组给予平喘宁 ig(4.9, 9.8, 19.6 g·kg⁻¹·d⁻¹),每日 1 次,连续给药 4 周。末次激发后,用 10%的水合氯醛 3.5 mL·kg⁻¹ ip 麻醉,取右肺和左肺组织放入冻存管中,置 -80 °C 冰箱中保存备用;取左上肺置于 10% 甲醛液中固定。

2.2 检测指标

2.2.1 肺功能测定 全部动物于末次激发 24 h 用 10%的水合氯醛 3.5 mL·kg⁻¹ ip 麻醉,行气管插管,

于小动物呼吸机的密闭箱内仰卧,行肺功能测定。主要检测用力肺活量(FVC),0.2 s 用力呼气容积(FEV_{0.2}),最大呼出量(PEF),计算第 0.2 s 用力呼出容积占用力肺活量百分比(FEV_{0.2}/FVC)。

2.2.2 肺组织病理检测 取左上肺,修剪组织,最大限度的暴露较多的支气管切面,按照组别进行切片,经 HE 染色显微镜观察 HE 染色切片并摄片,光镜下观察肺组织形态学改变。

2.2.3 肺组织中 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达检测 常规病理切片,选取组织标本蜡块进行免疫组化检测。石蜡切片常规脱蜡至水;滴加 3% H₂O₂,室温静置 10~15 min;PBS 洗 3 次,每次各 3 min,滴加正常山羊血清封闭液,室温 30 min;滴加 I 抗,Bcl-2 和 Bax 按照一定浓度稀释室温孵育 10~15 min,4 ℃ 过夜;37 ℃ 复温 10~20 min;滴加生物素标记的 II 抗工作液,37 ℃ 30 min;PBS 洗 3 次,每次各 5 min。冲洗后苏木素复染,脱水,透明,中性树胶封片;烤片,拍照。计算平均吸光度 A 来表示阳性率。

2.2.4 EGF mRNA, PDGF mRNA 的测定 引物由上海捷瑞生物工程有限公司设计合成。EGF 扩增产物长度 143 bp, Forward primer 5'-AGCCGACAAACACACTGGGA-3', Reverse primer 5'-TGCATCGTTCGAGAGG-3'; PDGF 扩增产物长度 415 bp, Forward primer 5'-GCCGATACCTCGCCCATGCC-3', Reverse primer 5'-ACACTGCGGTGGTGGACCT-3'; 内参 Beta-actin 扩增产物长度 150 bp, Forward primer 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3', Reverse primer 5'-TTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'。RNA 的提取:取 100 g 肺组织放于匀浆管内,冰上操作,参照文献[4]进行 RNA 的提取,将提取的总 RNA 保存于 -80 ℃ 超低温冰箱中。RT 反应:在 0.2 mL P 管中,加入总 RNA 8 μL,10 mol·L⁻¹ Oligo(dt) 1 μL 和 DEPC 水 4 μL,轻轻混匀,点动离心。PCR 仪上 65 ℃ 加热 5 min,冰浴 3 min,在上述管中加入 MMLV 1.0 μL,10 mmol·L⁻¹ dNTPs 2.0 μL, Oligo(dt) primer 1.0 μL,5 × Reaction buffer 1.0 μL, RNasin 1 μL, RNA 2 μL, Water, nuclease-free 9 μL,混匀后点动离心;在 PCR 仪器上进行下述操作,42 ℃ 60 min,70 ℃ 5 min,取出上述反应液,即为 cDNA,-20 ℃ 保存。PCR 反应:吸取上述反应液 5 μL 作为模板,加入到 PCR 反应管中。反应条件:EGF 变性 30 s,95 ℃;退火 53 ℃,30 s;72 ℃ 延伸,1 min;共 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 5 min,扩增长度片段 143 bp。PDGF 变性 30 s,95 ℃;退火 57 ℃,30 s;72 ℃ 延伸,1 min;共 35

个循环,最后 72 ℃ 延伸 5 min,扩增长度片段 415 bp。内参 GAPDH 变性 30 s,94 ℃;退火 53 ℃,30 s;72 ℃ 延伸,1 min;共 30 个循环,最后 72 ℃ 延伸 5 min,扩增长度片段 150 bp。PCR 产物电泳分析:分别取 5 μL PCR 产物与 1 μL DNA 加样缓冲液混匀,以 1% 琼脂糖凝胶电泳,同时加 100 bp Marker 作对照标记,其结果用 Eagle Eye II 凝胶成像仪进行产物位置、吸光度 A 扫描(A 代表基因表达丰度)分析,同时以 Beta-actin 为内参照,对 EGF mRNA,PDGF mRNA 表达丰度进行半定量分析。

2.3 统计学处理 用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用 SNK 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠寒哮证候观察 大鼠经卵蛋白激发及寒冷刺激后,哮喘模型组大鼠在雾化激发过程中均可出现烦躁不安、呼吸增快、竖毛、腹式呼吸明显等症状,严重者可见呼吸急促,呼吸节律不整,轻度紫绀,毛发凌乱等,药物干预组上述情况得到不同程度的改善。

3.2 各组药物对大鼠肺功能的影响 模型组大鼠 FVC,FEV_{0.2},FEV_{0.2}/FVC 以及 PEF 均较正常组显著降低($P < 0.01$);平喘宁高、中、低剂量组及桂龙咳喘宁组和地塞米松组与模型组相比,上述指标均有改善($P < 0.05$)。见表 1。

3.3 病理形态学改变 光镜下,正常组大鼠各级支气管无明显炎症细胞浸润,结构正常。模型组见支气管黏膜充血,黏膜上皮中杯状细胞数目明显增加,大量炎症细胞浸润,皱襞增多;上皮细胞脱落,各级支气管管壁及平滑肌层和基底膜增厚,管道变窄,甚至趋近闭塞,尤以细支气管显著。地塞米松组、桂龙咳喘宁组、平喘宁组较模型组的病理改变明显改善。见图 1。

3.4 各组大鼠肺组织 Bcl-2 免疫组化染色比较 正常组大鼠肺组织以及周围气道壁的 Bcl-2 蛋白平均吸光度均值低,哮喘组显著高于正常组($P < 0.05$);与模型组相比,各治疗组显著降低,有统计学意义($P < 0.05$),平喘宁高剂量组大鼠肺组织以及周围气道壁的 Bcl-2 蛋白表达低于地塞米松组和桂龙咳喘宁组($P < 0.05$)。见表 2,图 2。

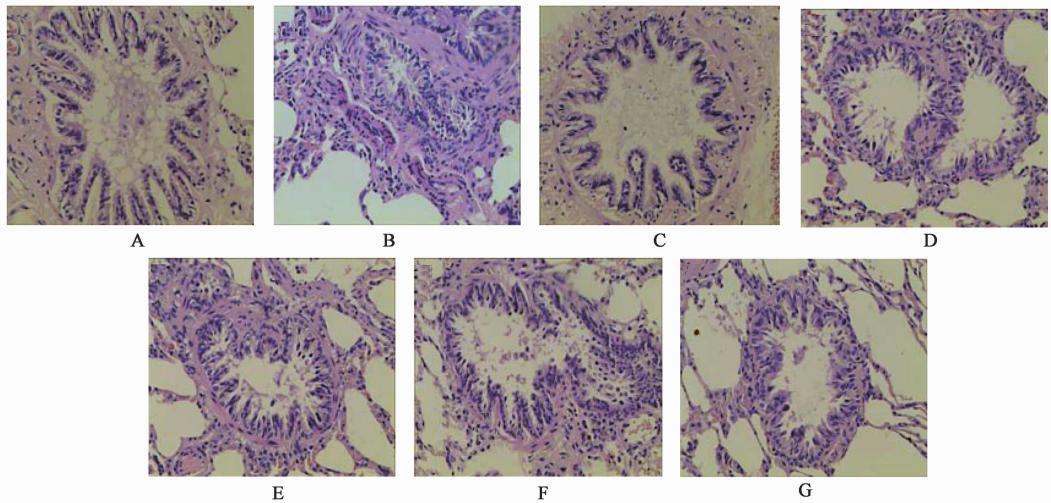
3.5 各组大鼠肺组织 Bax 在肺组织中的表达 正常组大鼠肺组织以及周围气道壁的 Bax 蛋白平均吸光度较高,哮喘组大鼠肺组织以及周围气道壁的

表 1 平喘宁对哮喘大鼠模型肺功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Pingchuanning on lung function of asthmatic rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	FVC /mL	FEV 0.2 /mL	FEV 0.2/FVC /%	PEF /mL·s ⁻¹
正常	-	14	2.94 ± 0.30	0.78 ± 0.34	23.38 ± 3.03	9.71 ± 0.38
模型	-	13	2.35 ± 0.47 ¹⁾	0.42 ± 0.56 ¹⁾	20.62 ± 3.68 ¹⁾	5.80 ± 0.56 ¹⁾
平喘宁	19.6	13	2.93 ± 0.83 ³⁾	0.67 ± 0.88 ³⁾	22.45 ± 3.60 ³⁾	9.52 ± 0.92 ³⁾
	9.86	12	2.92 ± 0.47 ³⁾	0.67 ± 0.57 ³⁾	22.63 ± 3.76 ³⁾	9.57 ± 0.62 ³⁾
	4.96	11	2.93 ± 0.65 ²⁾	0.65 ± 0.68 ²⁾	21.69 ± 3.26 ²⁾	9.63 ± 0.37 ²⁾
桂龙咳喘宁	10	12	2.81 ± 0.73 ²⁾	0.53 ± 0.67 ²⁾	21.34 ± 2.12 ²⁾	9.62 ± 0.75 ²⁾
地塞米松	4 × 10 ⁻⁴	12	2.83 ± 0.82 ²⁾	0.56 ± 0.24 ²⁾	22.28 ± 2.27 ²⁾	9.60 ± 0.17 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 2~3 同)。



A. 正常组;B. 模型组;C. 平喘宁 19.6 g·kg⁻¹·d⁻¹组;D. 平喘宁 9.8 g·kg⁻¹·d⁻¹组;E. 平喘宁 4.9 g·kg⁻¹·d⁻¹组;F. 桂龙咳喘宁 10 g·kg⁻¹·d⁻¹组;G. 地塞米松 0.4 mg·kg⁻¹·d⁻¹(图 2~3 同)

图 1 平喘宁对哮喘模型大鼠肺组织病理变化的影响(HE, ×400)

Fig.1 Effect of Pingchuanning on pathological changes in lung tissue of asthma rat (HE, ×400)

Bax 平均吸光度显著低于正常组;与模型组相比,各治疗组的大鼠肺组织以及周围气道壁的 Bax 蛋白表达升高(P < 0.05),平喘宁高剂量组大鼠肺组织以及周围气道壁的 Bax 蛋白高于桂龙咳喘宁组和地塞米松组(P < 0.05)。见表 2,图 3。

3.6 各组大鼠肺组织 EGF,PDGF mRNA 表达丰度半定量 以 β-actin 为内参,各组 PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳,用 GSM 凝胶图像分析管理系统进行 EGF,PDGF mRNA 表达丰度半定量测定。结果显示,与模型组相比,平喘宁各组 EGF,PDGF 表达率降低(P < 0.05,P < 0.01)。见表 3,图 4。

4 讨论

支气管哮喘,简称“哮喘”,是一种炎性细胞和炎性介质过度浸润的以气道高反应性为主要特征的

表 2 平喘宁对哮喘模型大鼠肺组织中 Bcl-2 及 Bax 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Pingchuanning on Bcl-2, Bax in lung tissue of asthma rat ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	蛋白表达(A)	
			Bcl-2	Bax
正常	-	14	0.312 ± 0.015	0.532 ± 0.031
模型	-	13	0.674 ± 0.041 ¹⁾	0.397 ± 0.014 ¹⁾
地塞米松	4 × 10 ⁻⁴	12	0.596 ± 0.022 ²⁾	0.416 ± 0.035 ²⁾
平喘宁	10	12	0.572 ± 0.034 ²⁾	0.432 ± 0.037 ²⁾
	4.96	11	0.413 ± 0.017 ²⁾	0.448 ± 0.024 ²⁾
	9.86	12	0.387 ± 0.013 ³⁾	0.495 ± 0.013 ³⁾
	19.6	13	0.369 ± 0.037 ³⁾	0.513 ± 0.025 ³⁾

慢性气道炎症。中医认为,哮喘属于祖国传统医学

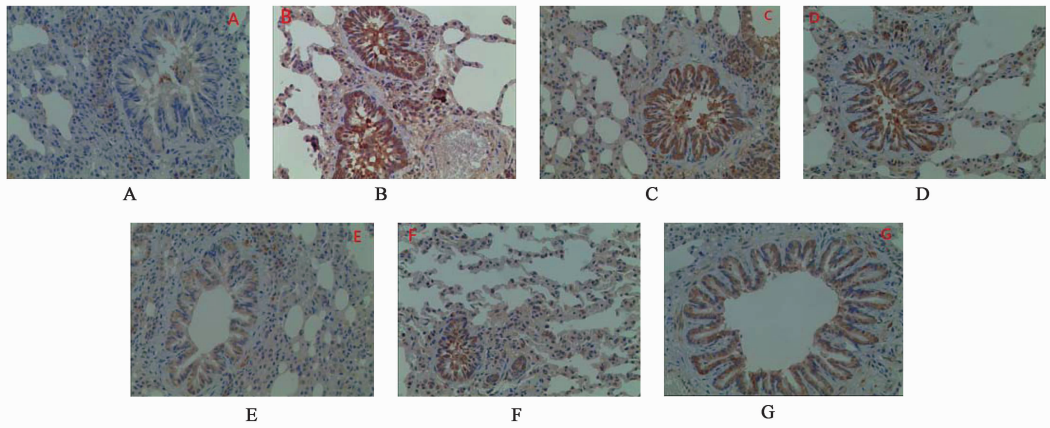


图 2 平喘宁对哮喘模型大鼠肺组织中 Bcl-2 蛋白表达的影响 (DAB 显色, ×400)

Fig. 2 Effect of pingchuanning on Bcl-2 Protein expression in lung tissue of asthma rat (DAB coloration, ×400)

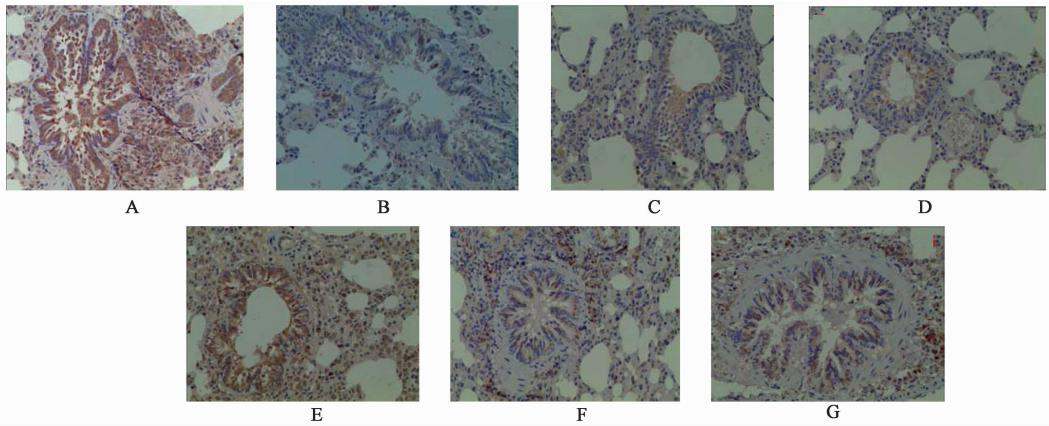


图 3 平喘宁对哮喘模型大鼠肺组织中 Bax 蛋白表达的影响 (DAB 显色, ×400)

Fig. 3 Effect of Pingchuanning on Bax protein expression in lung tissue of asthma rat (DAB coloration, ×400)

表 3 平喘宁对哮喘模型大鼠肺组织 EGF, PDGF mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Pingchuanning on EGF and PDGF mRNA in lung tissue of asthma rat ($\bar{x} \pm s$)

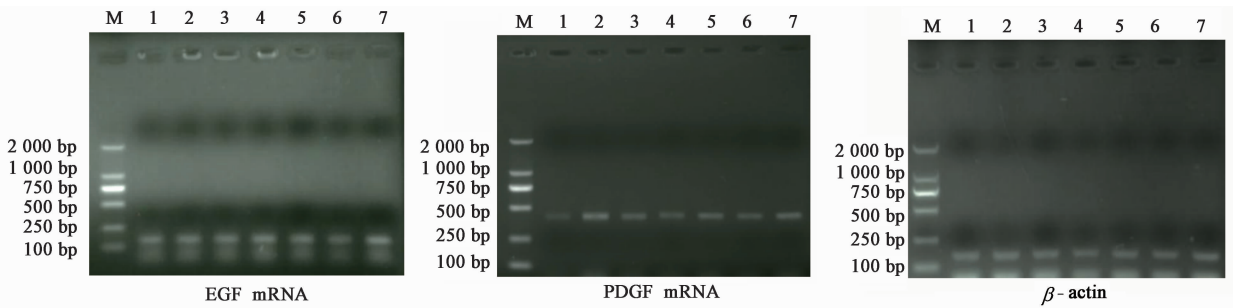
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	EGF mRNA /β-actin	PDGF mRNA /β-actin
正常	-	14	0.310 ± 0.028	0.401 ± 0.029
模型	-	13	0.643 ± 0.021 ¹⁾	0.713 ± 0.031 ¹⁾
桂龙咳喘宁	10	12	0.574 ± 0.038 ²⁾	0.691 ± 0.049 ²⁾
地塞米松	4 × 10 ⁻⁴	12	0.569 ± 0.037 ³⁾	0.619 ± 0.021 ³⁾
平喘宁	19.6	13	0.356 ± 0.026 ³⁾	0.457 ± 0.046 ³⁾
	9.86	12	0.489 ± 0.029 ³⁾	0.546 ± 0.037 ³⁾
	4.96	11	0.570 ± 0.036 ²⁾	0.672 ± 0.035 ²⁾

中的“哮证”范畴,病因病机不外乎情志、外邪、饮食、生活调摄等,以致伏痰遇感引触,痰气互结,壅塞气道,通畅失利,肺气上逆^[4]。嗜酸性粒细胞是参与支气管哮喘发病的重要标志物,它释放众多细胞因子,在过敏性哮喘中起着关键作用^[5]。支气管哮

喘容易受外界的理化等刺激而诱导。

Bcl-2 家族包括两种蛋白,一种是抑制凋亡基因 Bcl-2,一种是促凋亡基因 Bax。Bcl-2 是 20 世纪 80 年代后期 Tsujimoto 从淋巴瘤中提取出的可以减少诱导因子激活、在细胞凋亡进程中起着抑制凋亡作用的一类基因^[6]。Bax 是相对分子质量为 21 kD 的蛋白,起到拮抗 Bcl-2 抑制细胞凋亡的作用^[7]。Bcl-2 和 Bax 的比率直接关系到细胞凋亡的进程以及对机体的影响。Bcl-2 过高,使之形成异源二聚体,抑制机体内细胞的凋亡;反之,Bax 升高,其形成同源二聚体,促进细胞凋亡。Bcl-2/Bax 比率和细胞对外界刺激的易感性相关,Bcl-2/Bax 升高,细胞和易感性成反比,比率降低,则和易感性成正比^[8]。

细胞外信号调节蛋白激酶 (ERK) 是丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 家族中的一个亚族,参与细胞增殖、分化、凋亡等多种生理病理过程,特别是在调节细胞增殖过程中起着重要的作用^[9]。PDGF 和 EGF 为 ERK 信号通路的激动剂,外界刺激产生的



1. 正常组;2. 哮喘模型组;3. 桂龙咳喘宁 10 g·kg⁻¹·d⁻¹组;4. 地塞米松 0.4 mg·kg⁻¹·d⁻¹组;5. 平喘宁 19.6 g·kg⁻¹·d⁻¹组;6. 平喘宁 9.8 g·kg⁻¹·d⁻¹组;7. 平喘宁 4.9 g·kg⁻¹·d⁻¹组;M.β-actin

图 4 平喘宁对哮喘模型大鼠肺组织 EGF mRNA,PDGF mRNA 表达的影响

Fig. 4 Effect of Pingchuanning on EGF mRNA and PDGF mRNA in lung tissue of asthma rat

PDGF 和 EGF 诱导 ERK 的磷酸化,从而激活 ERK 信号通路。PDGF 是哮喘中的重要因子,PDGF-BB mRNA 在重症哮喘患者支气管中表达显著高于轻症哮喘患者,同时主要由嗜酸粒细胞表达^[10]。

平喘宁是我们长期治疗寒哮的验方,由经方射干麻黄汤与三子养亲汤化裁而成,功效温肺散寒,止咳平喘,治疗寒哮临床疗效确切。桂龙咳喘宁作为阳性对照组的干预药物,具有明确的治疗寒哮的作用,《中国药典》桂龙咳喘宁胶囊:“止咳化痰,降气平喘。用于外感风寒、痰湿阻肺引起的咳嗽、气喘、痰涎壅盛;急、慢性支气管炎上述证候者。”

本实验显示,平喘宁可以升高促凋亡基因蛋白 Bax 的表达,降低抑凋亡基因蛋白 Bcl-2 的表达,调整二者的比率,抑制哮喘炎性细胞的浸润。平喘宁可以通过抑制 EGF mRNA,PDGF mRNA 表达,从而抑制 ERK 通路的活化,减轻炎性反应,抑制哮喘大鼠气道平滑肌增生,从而延缓气道重塑而治疗哮喘。本研究对平喘宁治疗寒哮的作用机制进行了初步揭示,对于哮喘的中医药防治具有重要应用价值。

[参考文献]

[1] 巩雪芳,薄建萍. 生长因子与气道重塑—生长因子在支气管哮喘气道重塑过程中作用的新进展[J]. 国际呼吸杂志,2010,30(19):1202-1205.
[2] 白晶,刘先胜,徐永健,等. 细胞外信号调节蛋白激

酶对哮喘大鼠气道平滑肌细胞周期的影响[J]. 中国呼吸与危重监护杂志,2010,9(1):23-27.
[3] 王鹏,文小敏,赵鸿云,等. 肺阳虚证的实验研究[J]. 湖北中医杂志,1998,20(4):53-55.
[4] 方向明,王丽娜,袁亚美,等. 平喘宁对寒性哮喘大鼠肺组织 ERK2mRNA 及 c-fos mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2014,29(4):1221-1224.
[5] 陈卓,霍博雅. 止喘汤对哮喘大鼠血清 IL-13、IgE 及肺功能作用的研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2010,16(5):395-396.
[6] Youle R J, Strasser A. The Bcl-2 Protein family: opposing activities that mediate cell death[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2008,9(1):47-59.
[7] 张运克. 补阳还五汤及拆方对脑缺血再灌注 SD 大鼠模型细胞凋亡及 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2007,22(6):404-406.
[8] 解静芳,金国文,李瑞金,等. 在大鼠哮喘发生中 SO₂ 致凋亡相关基因蛋白质表达的改变[J]. 环境科学学报,2009,29(3):614-617.
[9] He H, Pannequin J, Tantiogeo J P, et al. Glycine-extended gastrin stimulates cell proliferation and migration through a Rho-and ROCK-dependent pathway, not a Rac/Cdc42-dependent pathway [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005, 289(3):G478-488.
[10] Kim H R, Hai C M. Mechanisms of mechanical strain memory in airway smooth muscle [J]. Can J Physiol Pharmacol,2005,83(10):811-815.

[责任编辑 聂淑琴]