

本文引用:刘敏,张才圣,柏正平. 麻苧舒喘汤对哮喘小鼠气道黏液高分泌的影响及机制研究[J]. 湖南中医药大学学报,2020,40(12): 1449-1455.

麻苧舒喘汤对哮喘小鼠气道黏液高分泌的影响及机制研究

刘敏¹,张才圣²,柏正平^{1,3*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.湖南省中医药研究院附属医院,湖南长沙410006;
3.湖南省中医药研究院,湖南长沙410006)

〔摘要〕目的 观察麻苧舒喘汤对哮喘小鼠肺组织黏蛋白5AC(MUC5AC)及豆蔻酰化富丙氨酸激酶C底物(MARCKS)表达水平的影响,探讨麻苧舒喘汤治疗哮喘黏液高分泌的作用机制。**方法** 将60只雌性BALB/C小鼠随机分为6组:空白组,模型组,地塞米松组以及麻苧舒喘汤高、中、低剂量组,每组10只。采用腹腔注射10%鸡卵白蛋白(ovalbumin, OVA)致敏及雾化吸入5% OVA激发法建立BALB/C哮喘小鼠模型。观察各组小鼠的行为学并进行评分;采用气道酚红排泌实验检测麻苧舒喘汤的排痰功效,HE染色及PAS染色观察各组小鼠肺组织病理形态及杯状细胞增生情况;Western blot,qPCR分别检测肺组织MARCKS和MUC5AC蛋白表达及基因含量。**结果** 行为学评分结果显示,造模第14天,与空白组比较,模型组及药物干预组评分均升高($P<0.01$);造模第21天,与模型组比较,药物干预组评分均显著下降,喘息症状明显改善($P<0.01$)。气道酚红排泌实验结果表明,与空白组比较,模型组排泌量降低($P<0.01$),与模型组比较,药物干预组排泌量显著增加($P<0.01$)。与空白组比较,模型组小鼠病变部位见明显水肿,管腔狭窄,伴有大量炎性细胞浸润及杯状细胞增生($P<0.01$);肺组织内MARCKS、MUC5AC蛋白及mRNA表达显著增高($P<0.01$)。与模型组比较,药物干预组小鼠的气道管腔扩大,壁内炎性细胞及杯状细胞减少($P<0.05$);肺组织中的MARCKS、MUC5AC蛋白及mRNA表达明显降低($P<0.05$)。**结论** 麻苧舒喘汤具有较好的止咳、平喘、祛痰功效,并通过下调MARCKS,抑制MUC5AC的释放,减轻上皮杯状细胞异常增生,从而缓解哮喘气道黏液高分泌症状。

〔关键词〕哮喘;气道黏液高分泌;麻苧舒喘汤;黏蛋白5AC;豆蔻酰化富丙氨酸激酶C底物

〔中图分类号〕R256.12

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.12.003

Study of the Effect and the Mechanism of Mating Shuchuan Decoction on Airway Mucus Hypersecretion in Asthmatic Mice

LIU Min¹, ZHANG Caishen², BAI Zhengping^{1,3*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China; 3. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan, 410006, China)

〔Abstract〕 Objective To observe effects of Mating Shuchuan Decoction on expression levels of mucin 5AC (MUC5AC) and myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) in asthmatic mice's lung tissue, and to explore the mechanism of Mating Shuchuan Decoction in treatment for asthmatic mucus hypersecretion. **Methods** A total of 60 female BALB/C mice were randomly assigned into 6 groups: a blank group, a model group, a dexamethasone group, as well as high-, medium- and low-dose Mating Shuchuan Decoction groups, with 10 mice in each group. BALB/C mice models of asthma were established by

〔收稿日期〕2020-10-23

〔基金项目〕国家自然科学基金面上项目(81874459);湖南省技术创新引导计划(临床医疗技术创新引导项目)(2017SK50407);湖南省中医药研究院院级课题(201708);2020年湖南中医药大学研究生创新课题(编号2020CX08)。

〔作者简介〕刘敏,女,在读博士研究生,主治医师,研究方向:中医内科学。

〔通讯作者〕* 柏正平,男,主任医师,博士研究生导师,E-mail: Bzp121@163.com。

intraperitoneal injection of 10% chicken ovalbumin (OVA) for sensitization and aerosol inhalation of 5% OVA for stimulation. Behavior of the mice in each group was observed and scored. The airway phenol red excretion experiment was used to detect the sputum excretion effect. HE staining and PAS staining were used to observe pathological morphology of the lung tissue and goblet cell proliferation in each group. Western blot and qPCR were used to respectively detect expressions and gene contents of MARCKS and MUC5AC proteins in the lung tissue. **Results** The results of behavioral score showed, on the 14th day, the scores of the model group and the drug intervention groups were increased compared with the blank group ($P<0.01$), on the 21th day, the scores of the drug intervention groups were significantly decreased compared with the model group, and wheezing symptoms improved significantly ($P<0.01$). The results of phenol red excretion experiment showed the discharge quantity is reduced in the model group than the blank group ($P<0.01$). Compared with the model group, the secretion of the drug intervention groups were significantly higher ($P<0.01$). Compared with the blank group, edema, stenosis of lumen, infiltration of inflammatory cells and proliferation of goblet cells were observed in the lesion site of the model group ($P<0.01$), and significantly increased expression of MARCKS, MUC5AC protein and mRNA in lung tissue ($P<0.01$). Compared with the model group, the airway lumen was enlarged, and the inflammatory cells and goblet cells were decreased in the drug intervention groups ($P<0.05$), and the expression of MARCKS, MUC5AC protein and mRNA in lung tissue were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Mating Shuchuan Decoction has good effects of relieving cough, relieving asthma and eliminating phlegm. It can relieve the airway mucus hypersecretion in asthma by inhibiting MUC5AC and MARCKS, and alleviate the abnormal proliferation of epithelial goblet cells.

[**Keywords**] asthma; airway mucus hypersecretion; Mating Shuchuan Decoction; mucin 5AC; myristoylated alanine-rich C kinase substrate

哮喘是一种慢性炎症性呼吸道疾病,是目前全球发病率较高的呼吸道疾病之一,严重影响人们的健康生活^[1]。黏液高分泌是其最为关键的病理特征,也是导致哮喘患者死亡的最主要因素^[2]。Akaba等^[3]研究表明,哮喘中黏液过度分泌的原因在于气道杯状细胞增生,分泌过量的黏蛋白。其中,黏蛋白5AC (MUC5AC)是支气管哮喘患者体内含量最丰富的黏液蛋白^[4],豆蔻酰化富丙氨酸激酶C底物(MARCKS)为诱导气道黏液蛋白过度分泌的关键作用因子^[5]。

目前,常用于缓解哮喘的药物为糖皮质激素类及 β 受体激动剂等药物^[6-7]。但临床运用上发现,中药对于防治支气管哮喘也有较好的疗效^[8]。哮喘属于中医学“哮病”范畴,多见于中老年人,临床以风哮证多见,主要病机为风盛痰阻、气道挛急^[9]。麻苧舒喘汤是湖南中医药大学柏正平教授治疗支气管哮喘的临床经验方,具有止咳、平喘、祛痰的功效,对于哮喘-风哮证的临床疗效显著且安全性强,但其具体的作用机制尚不清楚。因此,本研究探讨麻苧舒喘汤对支气管哮喘模型小鼠气道黏液蛋白的干预作用,为麻苧舒喘汤进一步临床推广应用提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级雌性 BALB/C 小鼠 60 只,6~8 周龄,体质量范围 21~29 g,由湖南省中医药研究院动物实验中心提供,许可证号:SCXK(湘)2016-0002。实验

动物环境:小鼠分笼饲养,室温 18~20 °C,湿度 65%~70%,自由饮水进食。适应环境 7 d 后开始实验。

1.2 主要试剂

HE 染色试剂盒(GP1031,武汉赛维尔生物科技有限公司);PAS 染色试剂盒(GP1039,武汉赛维尔生物科技有限公司);Super ECL Plus 超敏发光液(32109,美国 Thermo pierce 科技有限公司);HiFi-Script cDNA 第一链合成试剂盒(CW2569,北京康为世纪生物科技有限公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(P0010S,上海碧云天生物技术有限公司);RIPA 裂解液(CW2333,北京康为世纪生物科技有限公司);Trizol™ Plus RNA 纯化试剂盒(12183555,美国 Invitrogen 生命技术有限公司);鼠抗 MUC5AC(MA1-21907,美国 Invitrogen 生命技术有限公司);兔抗 MARCKS(10004-2-Ig,美国 Proteintech 科技有限公司);鼠抗 β -actin(60008-1-Ig,美国 Proteintech 科技有限公司);山羊抗小鼠 IgG(CW0102,北京康为世纪生物科技有限公司);山羊抗兔 IgG(CW0103,北京康为世纪生物科技有限公司)。

1.3 主要仪器

医用压缩雾化器(MI-M680,深圳市摩力康医疗科技有限公司);荧光定量 PCR 仪(PIKO REAL 96,芬兰 Thermo 公司);-80 °C 超低温冰箱(DW-HL388,中科美菱低温科技有限责任公司);台式冷冻离心机(TGL-18R,深圳黑马电子科技有限公司);紫外分光计(UV-5200,上海元析仪器有限公司);荧光显微镜

(BX51,日本 Olympus 公司);电泳仪(1645050,美国 BIO-RAD 公司)。

1.4 实验药品

地塞米松片(浙江仙琚制药,0.75 mg/片);生理盐水(安徽丰原,250 mL/瓶),以上药物均购自湖南省中医药研究院附属医院。鸡卵白蛋白(ovalbumin, OVA)购自美国 Sigma 公司。酚红购自上海跃腾生物技术有限公司。中药材购自湖南省中医药研究院附属医院中药房,经湖南省中医药研究院附属医院药剂科田其学教授鉴定为地道药材。

2 方法

2.1 造模、分组及用药

2.1.1 麻苧舒喘汤的制备 麻苧舒喘汤组成:炙麻黄 10 g,地龙 10 g,蝉蜕 10 g,桑白皮 10 g,辛夷 10 g,法半夏 10 g,射干 10 g,白果 10 g,葶苈子 10 g,紫苏子 10 g,磁石 15 g,浙贝母 10 g,水蛭 3 g,甘草 6 g。一煎加水 500 mL,煎汁 150 mL;二煎加水 300 mL,煎汁 150 mL;两次煎煮液合并浓缩至含生药 2 g/mL 的膏状,置 4 ℃保存备用。

2.1.2 分组、造模 实验选择 60 只 BALB/C 雌性小鼠^[10],随机分为空白组、模型组、地塞米松组及麻苧舒喘汤高、中、低剂量组,10 只/组。根据刘贵颖改良法^[11]制作哮喘小鼠模型,于造模第 1、14 天腹腔注射新鲜配制的 OVA 致敏液(含 OVA 100 μg),注射量为 0.2 mL/只。造模第 14 天起,每组给予 5%OVA 雾化激发,1 次/d,30 min/次,连续刺激 7 d。空白组给予同体积生理盐水替代 OVA 致敏液,处理同上。造模成功的依据为:小鼠出现喷嚏、喘息、抓耳挠腮等症状^[12]。

2.1.3 给药 造模第 14 天起,各组小鼠开始给药,每次雾化激发前 30 min 进行灌胃给药,每天 1 次。空白组与模型组分别给予剂量为 0.1 g/mL 的生理盐水;地塞米松组给予剂量为 0.1 g/mL 的地塞米松混悬液;麻苧舒喘汤不同剂量组参考临床上 70 kg 人的等效剂量,根据“人与实验动物间体表面积比值表”换算出小鼠的等效剂量为人的 9.1 倍,并将此剂量设为低剂量组,中、高剂量组分别为低剂量组的 2 倍和 4 倍。最终,麻苧舒喘汤低、中、高剂量分别 0.19、0.38、0.76 g/mL^[13]。

2.2 小鼠行为学观察

于实验造模第 14、21 天后对哮喘小鼠进行

30 min 内的行为学观察。参考吴云涛等^[14]操作,将 30 min 内哮喘小鼠的喷嚏频率、抓鼻次数及喘息情况等作为半定量评价的主要指标,并将每项指标分为 4 个等级,以对哮喘小鼠的行为学进行客观化、标准化评定。其中无喷嚏、抓鼻、喘息为 0 分。1~4 次喷嚏、抓鼻为 1 分;5~8 次喷嚏、抓鼻为 2 分;8 次以上喷嚏、抓鼻为 3 分。轻度喘息(静伏或躁动)为 3 分,明显喘息(中度呼吸困难)为 6 分,严重喘息(重度呼吸困难或死亡)为 9 分。

2.3 气道酚红排泌实验

参考文献[15]方法,称取 10 mg 酚红,用 5%碳酸氢钠溶液定容至 100 mL,配成 100 μg/mL 的母液,依次稀释为 2.5、5、7.5、10、12.5、15、17.5、20 μg/mL,在 546 nm 下测定吸光度(absorbance, A)。以酚红浓度作为横坐标, A 为纵坐标,绘制酚红标准曲线。每组取 6 只小鼠,末次给药 30 min 后,腹腔注射 0.01 mL/g 酚红溶液。注射酚红 1 h 后,断髓处死小鼠,剪开颈前皮肤,剪下甲状软骨下缘至气管分叉处的一段气管,往气管内注射 5%碳酸氢钠溶液进行灌洗。随后放置于 1.5 mL 灌洗液中,旋涡振荡 1 min,用酶标仪在波长 546 nm 处测 A,并根据制定的标准曲线计算出气管冲洗液中酚红浓度,以此表示酚红排泌量。

2.4 取材

末次给药后 24 h 断髓处死小鼠,开胸取小鼠新鲜肺组织。用生理盐水反复冲洗肺组织表面淤血,重复 2 次。将左肺装入冻存管,于 -80 ℃保存待 Western blot 及 qPCR 实验备用。将右肺置于 4%多聚甲醛固定 24 h,石蜡包埋备用。

2.5 HE 染色观察肺组织病理形态变化

取制备好的小鼠右肺组织石蜡切片,常规 HE 染色后于 400 倍显微镜下观察气道炎性细胞浸润情况、肺泡/支气管结构、气道上皮损伤等病理形态改变。

2.6 气道黏膜杯状细胞 PAS 染色及杯状细胞计数

取制备好的小鼠右肺组织石蜡切片,常规 PSA 染色后于 100 倍显微镜下观察。PAS 技术可将中性黏液染成深红色或红紫色^[16],根据切片中紫红色或深红色判断杯状细胞增生情况。每张切片随机采 5 个直径约 70 μm 完整气道,测定杯状细胞占有上皮细胞的比例,并采用积分法进行半定量分析,杯状细胞占有上皮细胞的比例:<5%为 0 分;5%~25%为

1分;25%~50%为2分;50%~75%为3分; $\geq 75\%$ 为4分。

2.7 Western blot 检测相关蛋白的表达

使用 RIPA 提取肺组织蛋白并用 BCA 法对蛋白浓度进行测定。经 SDS-PAGE 和转膜后,用封闭液(含 5%脱脂奶粉的 TBST)封闭 90 min,分别加入稀释的一抗:MUC5AC(1:200)、MARCKS(1:2 000)及 β -actin(1:5 000),4 ℃过夜孵育。孵育后经 TBST 洗涤,并用稀释的 HRP 标记的二抗室温孵育 90 min:山羊抗小鼠 IgG(1:5 000)及山羊抗兔 IgG(1:6 000)。洗涤后用 ECL 化学发光法显示蛋白条带并用 quantity one 专业灰度分析软件分析各条带的灰度值,取目的蛋白与内参 β -actin 灰度值的比值进行统计学分析。

2.8 qPCR 进行肺组织 MUC5AC 及 MARCKS mRNA 定量分析

保持无酶清洁环境,称取 20 mg 肺组织于 1.5 mL 无 RNA 酶离心管中并加入 1 mL Trizol 提取总 RNA。使用紫外分光光度计在 260 nm 与 280 nm 处测定 RNA 浓度,表示 RNA 样本的纯度值 OD260/OD280 在 1.8~2.0 之间。RNA 逆转录按照 HiFi-Script cDNA 第一链合成试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司)要求操作。以 Real-time PCR 检测肺组织中 MUC5AC 及 MARCKS 的 mRNA 表达。反应体系见表 1。反应条件:95 ℃ 10 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 60 s(采集荧光),共 40 个循环。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司设计合成。序列见表 2。

2.9 统计学分析

数据采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,运用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。多组间比较采用单因素方差分析(One-

表 1 PCR 反应体系

| 试剂 | 体积/ μ L |
|---------------------------|-------------|
| Template | 2 |
| Primer F | 0.5 |
| Primer R | 0.5 |
| PCR H ₂ O | 12 |
| 2X SYBREEN PCR Master Mix | 15 |

way ANOVA),若方差齐,组间两两比较用 LSD 检验,若方差不齐,组间比较采用 Dunnett's T3 法。非正态分布的计量资料用中位数和四分位数[M(P25, P75)]表示,组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。统计结果以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠行为学表现

造模第 14 天,与空白组相比,模型组、地塞米松组、麻苧舒喘汤不同剂量组的哮喘小鼠行为学发生明显改变,表现为喷嚏频率增加,抓鼻次数增多,喘息症状明显,少数小鼠伴有呼吸困难、毛发杂乱无光泽等症状,哮喘小鼠的评分均显著高于空白组($P < 0.01$)。药物干预治疗 7 d 后(即造模第 21 天),地塞米松组和麻苧舒喘汤不同剂量组的哮喘小鼠评分较模型组均显著下降($P < 0.01$),抓鼻次数及喷嚏次数减少,喘息症状明显改善。见表 3。

3.2 各组小鼠气道酚红排放量

与空白组比较,模型组的酚红排放量明显降低($P < 0.01$)。模型组相比,加入地塞米松或麻苧舒喘汤进行干预治疗后,酚红排放量均明显增加($P < 0.01$)。见表 4。

表 2 RT-PCR 引物序列

| Gene | Forward | Reverse | Product length |
|--------|-------------------------|------------------------|----------------|
| MUC5AC | ATGCTACCTTCTCCGGCCTT | AGCCCAGGTTTCAGACGCACA | 118 bp |
| MARCKS | ACATTGCCAAGATAATATGCCAC | ACCTGCCTCACAAAATACATCG | 150 bp |
| Actin | ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC | TACTCTGCTTGCTGATCCAC | 223 bp |

表 3 各组小鼠行为学评分比较($\bar{x} \pm s, n=10$,分)

| 组别 | 第 14 天 | 第 21 天 |
|-----------|----------------------------------|------------------------------------|
| 空白组 | 1.250 \pm 0.936 | 1.500 \pm 0.866 |
| 模型组 | 9.500 \pm 1.937 ^{###} | 10.875 \pm 1.763 ^{###} |
| 地塞米松组 | 8.875 \pm 1.834 ^{##} | 7.750 \pm 0.968 ^{###**} |
| 麻苧舒喘汤低剂量组 | 8.125 \pm 1.452 ^{##} | 8.875 \pm 1.166 ^{###**} |
| 麻苧舒喘汤中剂量组 | 8.250 \pm 1.785 ^{##} | 8.125 \pm 1.452 ^{###**} |
| 麻苧舒喘汤高剂量组 | 8.375 \pm 1.495 ^{##} | 8.000 \pm 1.414 ^{###**} |

注:与空白组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{**} $P < 0.01$

表 4 各组小鼠气道酚红排放量($\bar{x} \pm s, n=6$)

| 组别 | 吸光度/A | 酚红浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ |
|-----------|------------------------------------|--|
| 空白组 | 0.460 \pm 0.005 | 3.335 \pm 0.034 |
| 模型组 | 0.387 \pm 0.010 ^{###} | 2.826 \pm 0.069 ^{##} |
| 地塞米松组 | 0.985 \pm 0.006 ^{###**} | 6.999 \pm 0.041 ^{###**} |
| 麻苧舒喘汤低剂量组 | 0.428 \pm 0.004 ^{###**} | 3.106 \pm 0.028 ^{###**} |
| 麻苧舒喘汤中剂量组 | 0.482 \pm 0.003 ^{###**} | 3.487 \pm 0.024 ^{###**} |
| 麻苧舒喘汤高剂量组 | 0.879 \pm 0.011 ^{###**} | 6.258 \pm 0.074 ^{###**} |

注:与空白组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{**} $P < 0.01$

3.3 各组小鼠肺组织 HE 染色结果比较

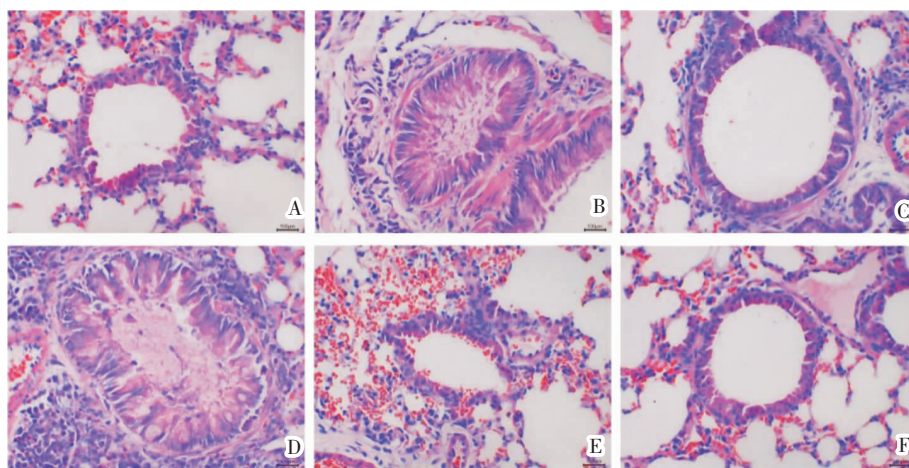
空白组肺组织结构正常,组织内未见水肿部位,管腔内光滑平整无黏液、无狭窄,管壁无炎性细胞浸润。模型组小鼠病变部位见明显水肿,管腔狭窄,内见黏液栓,管壁有大量炎性细胞浸润,基底膜厚度明显增加。地塞米松组的肺组织水肿明显减轻,病变处只见少量炎细胞浸润,管腔宽度较模型组明显扩大且无明显黏液栓形成,上皮结构也较完整。麻苧舒喘汤低剂量组的肺组织病理改善程度较地塞米松、麻苧舒喘汤中剂量及麻苧舒喘汤高剂量组低,但相对模型组,其管腔狭窄、管壁炎性细胞浸润等程度亦有所降低。麻苧舒喘汤中剂量组的管腔较地塞米松组和麻苧舒喘汤高剂量组缩小,壁内见少许炎性细胞。麻苧舒喘汤高剂量组的肺组织结构与地塞米松组类似,管腔扩大,壁内无明显炎性细胞浸润。见图 1。

3.4 各组小鼠肺组织支气管黏膜杯状细胞染色结果比较

空白组小鼠支气管周围仅有少量紫红色表达。与空白组相比,模型组在支气管周围的紫红色面积明显增加($P<0.01$)。给予地塞米松和中、高剂量的麻苧舒喘汤进行干预后,小鼠支气管周围的阳性面积呈现不同程度的减少($P<0.05$)。见表 5、图 2。

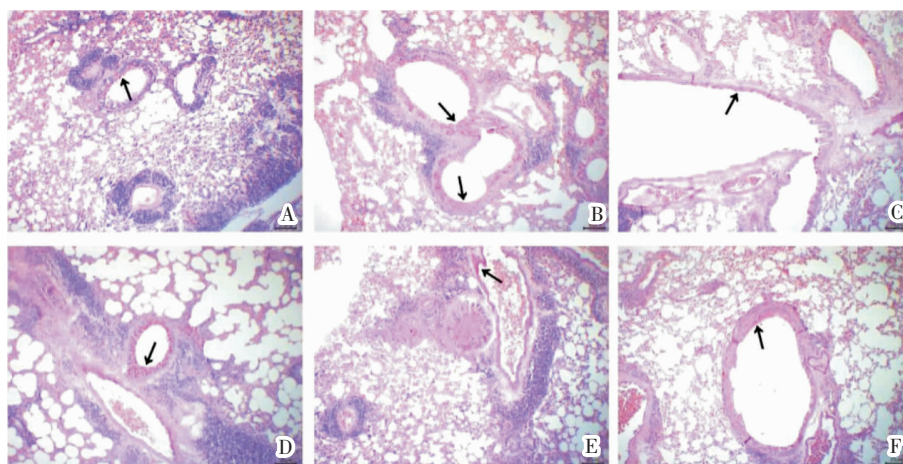
3.5 各组小鼠肺组织中 MUC5AC mRNA 及蛋白表达变化

与空白组相比,模型组的黏蛋白 MUC5AC 的 mRNA 及蛋白表达水平明显上升($P<0.01$)。加入地塞米松或麻苧舒喘汤进行干预治疗后,MUC5AC mRNA 及蛋白水平均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表 6、图 3。



注:A.空白组;B.模型组;C.地塞米松组;D.麻苧舒喘汤低剂量组;E.麻苧舒喘汤中剂量组;F.麻苧舒喘汤高剂量组

图 1 各组小鼠肺组织 HE 染色($\times 400$)



注:箭头所指为 PAS 染色阳性细胞;A.空白组;B.模型组;C.地塞米松组;D.麻苧舒喘汤低剂量组;E.麻苧舒喘汤中剂量组;F.麻苧舒喘汤高剂量组

图 2 各组小鼠肺组织 PAS 染色($\times 100$)

表5 各组小鼠支气管黏膜杯状细胞计数评分[M(P25,P75), n=10, 分]

| 组别 | 杯状细胞评分 |
|-----------|--------------------------------|
| 空白组 | 0.00(0.25, 0.00) |
| 模型组 | 4.00(4.00, 3.75) [#] |
| 地塞米松组 | 2.00(2.00, 1.00) ^{**} |
| 麻苧舒喘汤低剂量组 | 2.50(3.00, 2.00) [#] |
| 麻苧舒喘汤中剂量组 | 2.00(2.25, 2.00) ^{**} |
| 麻苧舒喘汤高剂量组 | 2.00(2.25, 1.00) ^{**} |

注:与空白组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$

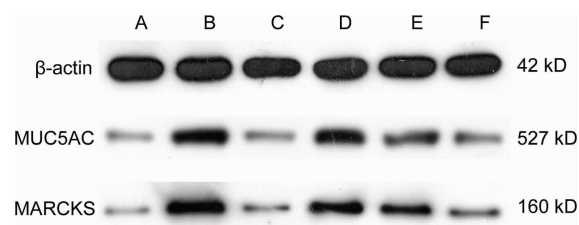
表6 各组小鼠肺组织中 MUC5AC mRNA 及蛋白含量($\bar{x}\pm s$, n=10)

| 组别 | MUC5AC mRNA | MUC5AC |
|-----------|---------------------------|----------------------------|
| 空白组 | 1.420±0.483 | 0.098±0.038 |
| 模型组 | 4.735±0.697 [#] | 0.504±0.037 [#] |
| 地塞米松组 | 1.814±0.475 ^{**} | 0.112±0.044 ^{**} |
| 麻苧舒喘汤低剂量组 | 4.122±0.296 [#] | 0.332±0.048 [#] |
| 麻苧舒喘汤中剂量组 | 3.963±0.608 [#] | 0.256±0.064 [#] |
| 麻苧舒喘汤高剂量组 | 2.065±0.446 ^{**} | 0.143±0.0180 ^{**} |

注:与空白组比较,[#] $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$

3.6 各组小鼠肺组织中 MARCKS mRNA 及蛋白表达变化

与空白组相比,模型组的黏蛋白 MARCKS 的 mRNA 及蛋白表达水平明显上升($P<0.01$)。使用地塞米松或麻苧舒喘汤进行干预治疗后, MARCKS mRNA 及蛋白水平均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表 7、图 3。



注:A.空白组;B.模型组;C.地塞米松组;D.麻苧舒喘汤低剂量组;E.麻苧舒喘汤中剂量组;F.麻苧舒喘汤高剂量组

图3 各组小鼠肺组织 MUC5AC 及 MARCKS 蛋白表达水平

表7 各组小鼠肺组织中 MARCKS mRNA 及蛋白含量($\bar{x}\pm s$, n=10)

| 组别 | MARCKS mRNA | MARCKS |
|-----------|---------------------------|---------------------------|
| 空白组 | 1.581±0.400 | 0.078±0.033 |
| 模型组 | 4.162±0.391 [#] | 0.454±0.051 [#] |
| 地塞米松组 | 2.067±0.287 ^{**} | 0.084±0.017 ^{**} |
| 麻苧舒喘汤低剂量组 | 3.523±0.310 [#] | 0.334±0.066 [#] |
| 麻苧舒喘汤中剂量组 | 3.052±1.289 [#] | 0.238±0.066 [#] |
| 麻苧舒喘汤高剂量组 | 2.266±0.278 ^{**} | 0.112±0.030 ^{**} |

注:与空白组比较,[#] $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$

4 讨论

哮喘是一种常见的慢性气道炎症性疾病,黏液高分泌是其最主要的病理特征。LOC 和 Takashi 等^[17-18]研究表明,杯状细胞显著增生,导致黏蛋白过度表达是黏液高分泌的首要原因。本次研究中,哮喘小鼠的杯状细胞增生远高于正常小鼠,而使用麻苧舒喘汤进行干预治疗后,哮喘小鼠的喷嚏、喘息、抓耳挠腮等哮喘体征及杯状细胞的增生情况得到了明显的改善,小鼠气道酚红排泄量显著增加,并且黏蛋白的分泌也有所降低,表明麻苧舒喘汤具有较好的止咳、祛痰作用。

MUC5AC 是最为常见的聚合黏蛋白,主要表达于气管和支气管上皮的杯状细胞中,其表达水平与黏液分泌量呈正相关^[19],而抑制黏蛋白的过度分泌可有效减轻哮喘患者的气道黏液高分泌^[20]。MARCKS 是黏蛋白分泌的主要调节因子。Li 等^[21]研究表明,抑制 MARCKS 蛋白可减弱这些细胞黏蛋白的高分泌。本研究发现,麻苧舒喘汤可有效降低哮喘小鼠的 MUC5AC 和 MARCKS 的 mRNA 及蛋白表达水平。因此,麻苧舒喘汤可能通过抑制 MARCKS 蛋白的表达减弱细胞黏蛋白的高分泌,直接或间接地减少 MUC5AC 蛋白的分泌,从而降低气道阻力,缓解气道阻塞、哮喘的症状。麻苧舒喘汤高剂量组抑制 MUC5AC 和 MARCKS 的表达,可使小鼠模型的相应指标降低至空白组水平。

中医学认为,气道黏液高分泌归属于中医“痰”的范畴^[22]。肺内宿痰内伏,外感侵袭,易导致痰结于气道,肺的宣肃功能失调,气道挛急,发为哮喘。风痰搏结是哮喘发作的关键,祛风化痰是哮喘发作期的治疗原则。麻苧舒喘汤是柏正平教授立足于“风盛痰阻,气道挛急”的病机而创建的,由炙麻黄、地龙、蝉蜕、桑白皮、辛夷、法半夏、浙贝母、射干、白果、葶苈子、水蛭、紫苏子、磁石、甘草组成。方中炙麻黄可宣散肺部壅塞之气;蝉蜕善除肺经之风邪;二者共用可开宣肺气,加入白果收敛肺气,防止宣散太过。地龙与蝉蜕能疏散风邪,透邪外出,舒缓气道^[23],配以水蛭可加强搜风通络,缓解气道痉挛。哮喘病发作期多由外感受凉而致,配以辛夷发散肺经风寒之邪。哮喘病根为痰,加入法半夏与射干合消肺部之痰。紫苏子、杏仁质润而主降,降利肺气,与炙麻黄相

配,宣降相宜,既制约炙麻黄宣散太过,又增强止咳平喘之功。浙贝母化痰止咳、降泄肺气。磁石质重沉降、纳气平喘。桑白皮泻肺平喘,葶苈子泄肺之水饮及痰水而下气定喘,二药合用增强泻肺平喘之功。甘草调和诸药,亦能解除痉挛。整方宣降通用,化痰祛风,并在宣散外邪的同时注重补肾纳气。

综上所述,麻苧舒喘汤可通过恢复 MARCKS/MUC5AC 的平衡,抑制小鼠气道黏液过度分泌,从而防治哮喘。同时,麻苧舒喘汤可使哮喘小鼠的杯状细胞、炎性细胞数量及组织水肿面积减少,改善气道重塑。

参考文献

- [1] MARTA M, KATARZYNA W, MILENA P, et al. Fibroblast-to-myofibroblast transition in bronchial asthma. [J]. Cellular and molecular life sciences: CMLS, 2018,75(21):3943-3961.
- [2] JIA Z R, BAO K F, WEI P, et al. EGFR activation-induced decreases in claudin1 promote MUC5AC expression and exacerbate asthma in mice[EB/OL].(2020-03-04)[2020-10-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32132671/>.
- [3] AKABA T, KOMIYA K, SUZAKI I, et al. Activating prostaglandin E2 receptor subtype EP4 increases secreted mucin from airway goblet cells [J]. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics, 2018, 48: 117-123.
- [4] KIM S H, PEI Q M, JIANG P, et al. Effects of dexamethasone on VEGF-induced MUC5AC expression in human primary bronchial epithelial cells: Implications for asthma[J]. Experimental Cell Research, 2020, 389(2): 111897.
- [5] 李敏超,尤列·皮尔曼,周向东.MARCKS 磷酸化对冷刺激诱导人气管上皮细胞 MUC5AC 分泌的影响[J].中南大学学报(医学版),2012, 37(5):447-452.
- [6] 李芳学,刘 娟.难治性支气管哮喘药物治疗的研究进展[J].医学综述,2020,26(8):1573-1577.
- [7] KRMISKY W, SOBIESZCZYK M J, SARKAR S. Thermal ablation for asthma: Current status and technique[J]. Journal of Thoracic Disease, 2017, 9(Suppl 2): S104-S109.
- [8] 王 强,杨 继,张 焱,等.支气管哮喘中医全病程治疗方案中西医对照研究[J].辽宁中医杂志,2020,47(10):7-11.
- [9] 李小娟,刘 健.哮喘风哮证的研究治疗进展[J].长春中医药大学学报,2011,27(4):675-676,686.
- [10] 高云娟,任 远,吴国泰.哮喘动物模型研究现状分析[J].中药药理与临床,2012,28(5):231-234.
- [11] 刘贵颖,张慧琪,朱振刚,等.卵清蛋白致敏大鼠支气管哮喘模型的制备[J].临床肺科杂志,2013,18(7):1167-1169.
- [12] 李海霞,张勇华,任晓丹,等.建立 RSV 联合 OVA 诱发幼年大鼠哮喘模型的方法[J].湖南中医药大学学报,2018,38(12):1371-1373.
- [13] 魏 伟.药理实验方法学[M].4 版.北京:人民卫生出版社, 2010.
- [14] 吴云涛,霍博雅.中药三子排痰汤联合氨溴索对哮喘大鼠气道黏液高分泌的影响[J].解放军医学杂志,2014,39(12):956-960.
- [15] 赵思俊,曲 萍,李 洋,等.小鼠酚红排泌实验影响因素的考察[J].山西中医学院学报,2017,18(4):5-7.
- [16] 朱惠源,张建立,张国俊,等.PAS 染色法在哮喘大鼠模型杯状细胞染色中的应用[J].临床与实验病理学杂志,2012,28(3):348-349.
- [17] ORDOÑEZ C, KHASHAYAR R, WONG H, et al. Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2001, 163 (2): 517-523.
- [18] AIKAWA T, SHIMURA S, SASAKI H, et al. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack[J]. Chest, 1992, 101(4):916-921.
- [19] LACHOWICZ-SCROGGINS M E, YUAN S P, KERR S C, et al. Abnormalities in MUC5AC and MUC5B protein in airway mucus in asthma [J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2016, 194(10): 1296-1299.
- [20] 柏正平,刘 雨,谭小宁,等.金水六君煎及其拆方含药血清对 A549 细胞中黏蛋白 MUC5AC 及水通道蛋白 AQP5 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(3):320-325.
- [21] LI Y, MARTIN L D, SPIZZ G, et al. MARCKS protein is a key molecule regulating mucin secretion by human airway epithelial cells in vitro[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(44): 40982-40990.
- [22] 高 旅,刘丽娜,史正刚.从中医角度看气道黏液高分泌[J].中国中西医结合儿科学,2019,11(2):133-135.
- [23] 罗社文.晁恩祥治疗咳嗽变异性哮喘经验[J].中医杂志,2002,43 (1):74.

(本文编辑 匡静之 周 旦)