

基于 cAMP/PKA/CREB 信号通路探讨固本止咳方治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期小鼠的作用机制

洪政¹ 方晗语¹ 刘明非¹ 邹浩¹ 刘颖² 张洪春²

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 中日友好医院中医肺病一部, 北京 100029)

【摘要】目的 基于环磷酸腺苷(cAMP)/蛋白激酶A(PKA)/cAMP反应元件结合蛋白(CREB)信号通路探讨固本止咳方(GBZK)治疗慢性阻塞性肺疾病(COPD)稳定期小鼠的作用机制。**方法** 60只BALB/c小鼠随机分为对照组、模型组、GBZK组、地塞米松组,除对照组外,其余组均使用烟草烟雾暴露联合脂多糖复制COPD稳定期小鼠模型。造模成功后,GBZK组予GBZK 0.2 mL/d灌胃,地塞米松组予1.0 mg/kg地塞米松注射液腹腔注射,2次/d,所有小鼠均给药28 d。观察各组小鼠一般情况,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测小鼠肺组织匀浆cAMP水平,利用Western blot检测小鼠肺组织匀浆中cAMP、p-PKA、CREB、p-CREB蛋白表达情况。**结果** 与模型组比较,GBZK组小鼠的喘息气促有所改善,肺组织匀浆中cAMP含量及cAMP、p-PKA、CREB、p-CREB蛋白表达均提高($P<0.05$)。**结论** 固本止咳方可能通过激活cAMP/PKA/CREB信号通路,进而发挥对COPD稳定期小鼠的保护作用。

【关键词】 固本止咳方; 慢性阻塞性肺疾病; cAMP/PKA/CREB; 小鼠

DOI: 10.16025/j.1674-1307.2024.04.002

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种慢性呼吸道炎症性疾病,以不完全可逆的气流受限为特点,且与吸烟史密切相关^[1-2],临床上常见呼吸困难、咳嗽、咳痰、胸闷等症状。流行病学调查表明,从1990—2010年,中国COPD发病总人数增加了66.73%,造成严重的社会经济负担^[3]。目前认为炎症反应和气道重塑是COPD的核心机制,且与信号通路及其之间的相互作用相关。研究表明,环磷酸腺苷(cAMP)/蛋白激酶A(PKA)/cAMP反应元件结合蛋白(CREB)信号通路改善炎症和通气功能等多种生物效应密切相关,是多种药物的共同作用靶点^[4-8]。

目前COPD稳定期常用糖皮质激素为主的抗炎药物治疗,然而部分患者存在糖皮质激素耐药性,且长期大剂量使用激素会导致许多不良反应,而中医药在治疗COPD中发挥重要作用^[9-10]。固本止咳方(GBZK)为国医大师晁恩祥教授所创经验方,具有补肺益肾、健脾化痰之功,对COPD稳定

期患者疗效显著。前期临床研究^[11]表明,服用GBZK能够更好地改善患者临床症状和肺功能。实验研究^[12]发现,GBZK有助于改善COPD小鼠的肺组织弹性及肺顺应性,改善肺功能状态、呼吸道黏膜功能,缓解全身炎症水平。然而,GBZK治疗COPD的作用通路尚不明确。故本研究使用烟草烟雾暴露(CSE)联合脂多糖(LPS)复制COPD稳定期小鼠模型,基于cAMP/PKA/CREB信号通路探讨GBZK治疗COPD稳定期小鼠的作用机制,以期GBZK治疗COPD提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

SPF级雌性BALB/c小鼠60只,5~6周龄,体重(200±10)g,购自北京迈德康纳生物技术有限公司,生产许可证号SYXK(京)2020-0050。5只/笼饲养于SPF级实验动物房中,予以标准饲料及饮用水,温度及湿度适宜,在12 h/12 h的光暗周期中饲养,适应性饲养1周后进行实验。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(82074367);国家重点研发计划项目(2019YFC1712003)

作者简介:洪政,男,27岁,硕士研究生,住院医师。研究方向:中医肺系病临床与基础研究。

通信作者:张洪春, E-mail: 13701226664@139.com

引用格式:洪政,方晗语,刘明非,等. 基于cAMP/PKA/CREB信号通路探讨固本止咳方治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期小鼠的作用机制[J]. 北京中医药, 2024, 43(4): 347-351.

1.2 伦理审查

本研究方案经中日友好医院动物实验伦理委员会审查批准(批号 zryhy21-20-12-2)。

1.3 药物

GBZK 组成包括黄芪、淫羊藿、炒白术、蜜百部、黄芩、赤芍、防风等,所有中药饮片均购自中日友好医院。将所有中药饮片用清水冲洗并浸泡 1 h 后,煎煮 40 min,过滤药液后再加入等量的清水煮沸 40 min。将 2 次煎煮所得药液混合并过滤后,浓缩至生药含量 0.41 g/mL 的药液。

1.4 主要仪器及试剂

大前门香烟(上海烟草公司,每支香烟含焦油 11 mg、烟气烟碱 0.8 mg);cAMP 抗体(货号 Ab76238)、p-PKA 抗体(货号 Ab32390)、CREB 抗体(货号 Ab32515)、p-CREB 抗体(货号 Ab32096),均购自英国 abcam 公司;GAPDH 抗体(美国 Proteintech,货号 60004-1-Ig);ELISA 检测试剂盒(货号 ZC-0544M2)。

自制染毒箱(大小约 120 cm×80 cm×80 cm,上方中央小口可开启,周围配有 12 个小透气孔);低温冷冻离心机(美国热电 ThermoFisher,型号 Fresco17);垂直电泳槽(美国伯乐 Bio-Rad,型号 Mini Protean Tetra);转印槽(美国伯乐 Bio-Rad,型号 Mini Trans Blot);电泳仪(美国伯乐 Bio-Rad,型号 PowerpacBasic);酶标仪(MOLECULAR DEVICES,型号 CMax Plus);低速离心机(DLAB,型号 D1008E)。

2 方法

2.1 分组及造模

小鼠适应性喂养 7 d 后,将 60 只 BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组、GBZK 组和地塞米松组,每组 15 只。对照组呼吸正常空气,其余各组烟雾暴露 2 次/d(9~10 支香烟/次,每次持续 3 h),每周 5 d,连续 12 周,并于实验第 1 天和第 14 天予气管滴注 7.5 μg LPS(对照组滴注等量生理盐水),以此构建 COPD 稳定期小鼠模型。

2.2 给药

在实验第 85 天(即造模 12 周后)进行干预,GBZK 组予 GBZK 0.2 mL/d 灌胃^[13],对照组和模型组予等量生理盐水灌胃,地塞米松组予 1.0 mg/kg 地塞米松注射液腹腔注射,2 次/d,所有小鼠均给药 28 d,给药期间继续予烟草烟雾暴露。

2.3 取材

给药 28 d 后,所有小鼠禁食不禁水 12 h 过夜,1% 戊巴比妥钠麻醉,取双肺中下叶样本做成 10% 匀浆液。每组取 3 只小鼠的肺组织匀浆存于冻存管,置于-80℃冰箱中保存,用于 Western blot 检测;同时再另取 3 只小鼠的肺组织匀浆,用于酶联免疫吸附测定法(ELISA)法检测 cAMP 含量。

2.4 观察指标

2.4.1 一般情况观察:每天观察各组小鼠的一般状态,包括精神状态、呼吸道症状、活动灵敏度、皮毛光泽度、进食饲料量及大小便情况等。

2.4.2 ELISA 法检测肺组织匀浆 cAMP 含量:取 2.3 项所得肺组织匀浆,采用 ELISA 法测定各组小鼠 cAMP 水平,严格按照试剂盒说明书进行检测,重复测量 3 次。

2.4.3 Western blot 检测肺组织匀浆 cAMP、p-PKA、CREB、p-CREB 蛋白表达:取 2.3 项所得肺组织匀浆,加入 95~110 μL 的 RIPA 细胞裂解液,在冰浴中放置 10 min,并以 15 000 r/min 离心 10 min 后转移上清,即得组织总蛋白产物。经浓度测定、制胶、制样、上样、电泳、转膜等步骤后,用 5% 的 BSA(磷酸化蛋白)以及 5% 脱脂奶粉(非磷酸化蛋白)进行封闭。依次加入一抗抗体,在 4℃ 过夜孵育,孵育完成后用 TBST 洗涤 3 次,加入二抗,室温孵育 1.2 h, PBST 洗膜,滴加 ECL 化学发光液进行自动曝光并拍摄照片。用 Image J 软件测定蛋白条带灰度值,计算小鼠肺组织匀浆中 cAMP、p-PKA、CREB、p-CREB 蛋白表达情况,通过内参均一化后表示蛋白的相对表达水平,所有目标蛋白均重复 3 次。

2.5 统计学方法

数据采用 GraphPad prism9.5 软件进行统计分析,通过 Shapiro-Wilk 检验进行正态分布评估,符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,模型组与对照组、GBZK 组和地塞米松组之间的组间两两比较用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠一般情况观察

造模期间:对照组小鼠精神状态良好,活泼好动,反应灵敏,皮毛雪白有光泽,饮食正常,强壮肥硕,呼吸频率稳定,未见呼吸道分泌物;模型组小鼠出现精神逐渐萎靡,倦怠少动,反应迟缓,皮

毛枯黄无光泽, 进食减少, 拱背蜷卧, 喘息明显且鼻道分泌物增加。给药后, GBZK 组和地塞米松组小鼠喘息气促缓解、反应变快、饮食增多。

3.2 各组小鼠肺组织匀浆 cAMP 含量比较

模型组小鼠肺组织匀浆 cAMP 含量低于对照组, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$); 给药后, GBZK 组及地塞米松组小鼠肺组织匀浆 cAMP 含量均较模型组升高 ($P<0.01$)。见图 1。

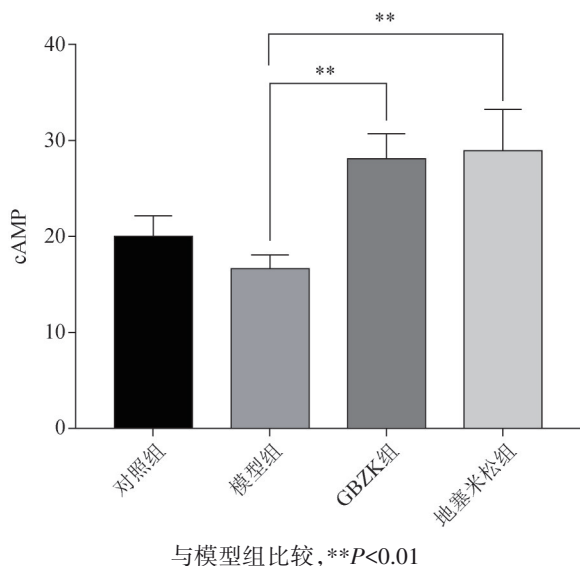


图1 各组肺组织匀浆中 cAMP 水平比较

3.3 各组小鼠肺组织匀浆 cAMP、p-PKA、CREB、p-CREB 蛋白表达水平比较

与对照组比较, 模型组小鼠肺组织匀浆 cAMP ($P<0.05$)、p-PKA ($P<0.01$)、CREB ($P>0.05$) 和 p-CREB ($P<0.05$) 蛋白表达水平降低; 与模型组比较, GBZK 组和地塞米松组小鼠肺组织匀浆 cAMP ($P<0.01$)、p-PKA ($P<0.01$)、CREB ($P<0.05$)、p-CREB ($P<0.01$) 蛋白水平升高。见图 2~5。

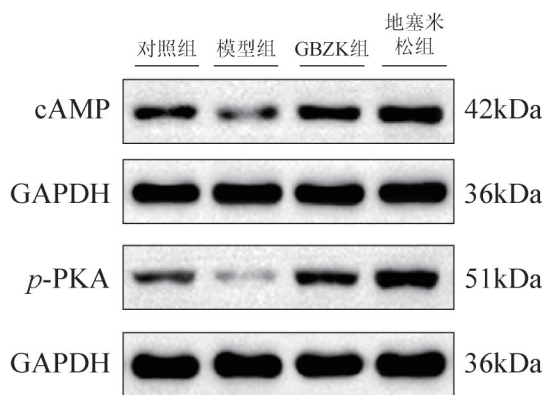


图2 各组 cAMP、p-PKA 蛋白表达条带 ($n=3$)

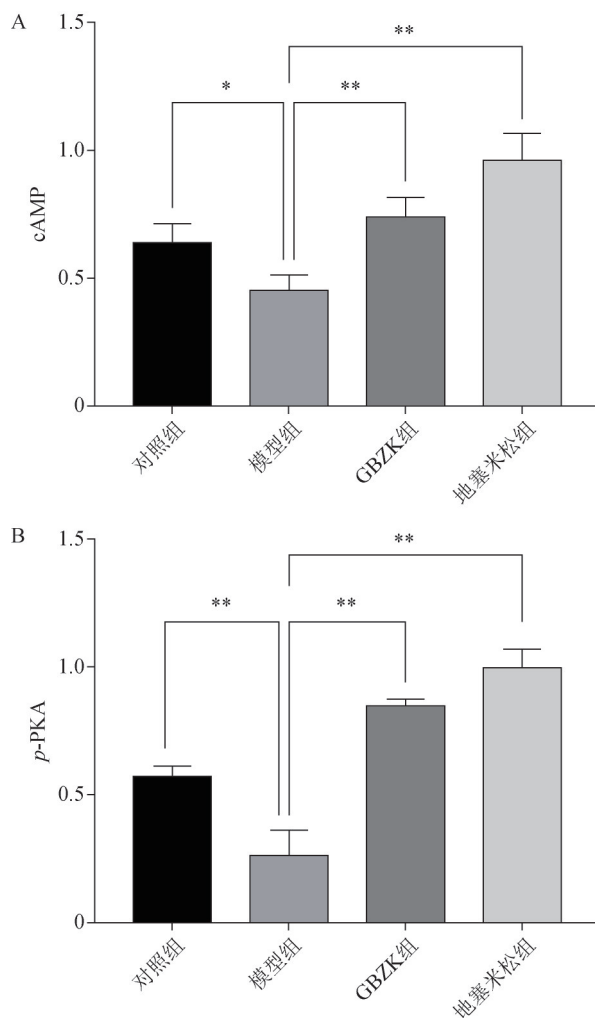


图3 各组肺组织匀浆中 cAMP、p-PKA 蛋白表达水平比较

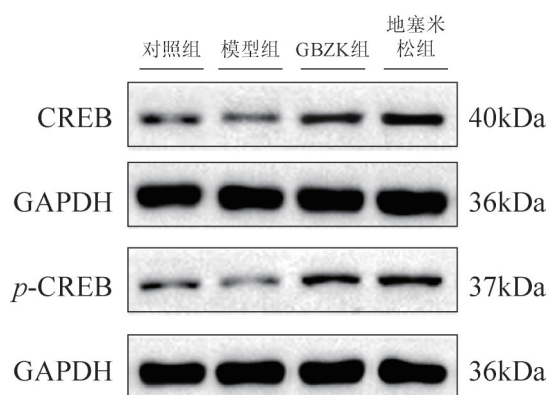
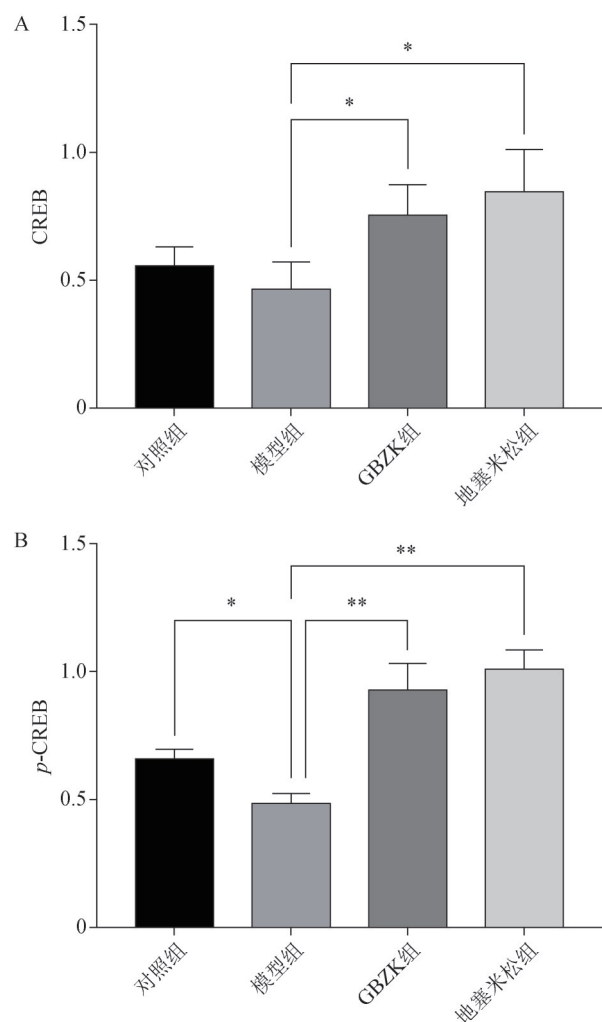


图4 各组 CREB、p-CREB 蛋白表达条带 ($n=3$)

4 讨论

COPD 在临床上常可见如咳嗽、咳痰、喘息、胸部膨满及胸闷、唇甲发绀、肢体浮肿等症状, 故现代学者多将其归属于中医学“肺胀”“内伤咳嗽”“喘证”的范畴。在临床实践中发现, 对于



与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图5 各组肺组织匀浆中CREB、p-CREB蛋白表达水平比较

COPD稳定期的管理有助于改善患者症状,减少急性加重的风险,中医学认为COPD稳定期多由于肺脾肾三脏俱损,痰浊血瘀是诱发疾病加重的重要因素,而GBZK以补肺益肾健脾为主,同时清热化痰活血,全方标本兼顾,扶正祛邪。方中黄芪补肺健脾、升阳益卫,淫羊藿温补肾阳、顾护先天共为君药,白术益气健脾、燥湿利水,百部温润肺气、下气止咳共为臣药,黄芩、赤芍、防风为佐药,共奏活血清热祛邪之功。现代药理研究^[11, 14-15]表明,GBZK在改善肺功能方面有良好的效果,可以降低吸气及呼气阻力,提高肺组织弹性和顺应性等;同时也可以通过增加支气管肺泡灌洗液的SIgA水平以改善黏膜免疫的作用,减少血清中SIgA的分泌以缓解全身炎性损伤程度;通过调节炎症因子IFN- γ 和IL-4的分泌,进而改善COPD模型小鼠Th1/Th2免疫失衡。

吸烟和肺部感染作为COPD最常见和最重要的危险因素,香烟中的有害成分引起支气管痉挛,增加气道阻力;气管滴注LPS引起气道上皮损伤,诱发气道及肺组织的炎症,最终导致气道重塑,形成COPD。相较于单纯烟雾或单纯肺部感染诱导模型,烟雾和细菌联合诱导模型在COPD稳定期的病理特征和气道阻塞等方面表现得更明显^[16]。故本实验选用CSE联合LPS复制COPD稳定期小鼠模型,造模后可见模型组相较于对照组喘息气促加重,伴有鼻分泌物增加,给药后,药物干预组呼吸症状较模型组改善明显,基本验证了COPD模型的可靠性,以及GBZK对COPD小鼠的治疗作用。

COPD患者由于长期反复的慢性炎症和组织损伤导致小支气管发生结构改变,同时还伴随着黏液分泌、气道狭窄阻塞、肺泡结构障碍和肺血管重塑等病理过程,因此通过调节炎症和抑制气道重塑已成为治疗COPD的研究热点。cAMP作为细胞内的第2信使,在激素、神经递质及其他信号分子结合于靶细胞后,其水平可在短时间内迅速增加以传递胞内信息;cAMP与PKA调节亚基结合可促进其基底部分的磷酸化,亦可调节包括CREB在内多种转录因子活性;CREB的转录活性的激活主要依赖于是否磷酸化其Ser133位点,p-CREB与多种转录因子形成复合物进而实现基因转录功能^[17-19]。多项实验证实了cAMP/PKA/CREB信号通路在呼吸疾病中发挥重要作用。麻黄生物碱组分^[4]、大蒜素^[5]和健脾补肺方^[6]能改善哮喘模型的气道高反应和气道炎症,其作用机制可能与cAMP/PKA/CREB信号通路相关;调控肺纤维化患者的cAMP/PKA/CREB信号通路可抑制炎症、减少细胞外基质表达,同时亦可改善肺功能,延缓疾病进展^[7];桂枝汤可通过调控变应性鼻炎大鼠鼻黏膜上皮细胞的cAMP/PKA/CREB信号通路的表达发挥疗效^[8]。

本研究发现,在给予GBZK后,COPD小鼠肺组织匀浆cAMP浓度及表达均升高,p-PKA、CREB及p-CREB表达升高,表明GBZK通过激活cAMP/PKA/CREB信号通路发挥治疗作用,为GBZK治疗COPD提供理论依据。

参考文献

- [1] 刘迪, 窦丹, 彭钰, 等. 基于网络药理及分子对接技术探讨固本平喘药物治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期的作

- 用机制[J]. 北京中医药, 2023, 42(8): 897-906.
- [2] 王萌超, 卢桐, 王辛秋, 等. 以国医大师晁恩祥养阴益气法治疗稳定期慢性阻塞性肺疾病 50 例临床观察[J]. 北京中医药, 2023, 42(5): 497-500.
- [3] CHAN KY, LI X, CHEN W, et al. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in China in 1990 and 2010[J]. J Glob Health, 2017, 7(2): 20704.
- [4] 郑亚娟, 袁培培, 傅阳, 等. 基于 cAMP/PKA/CREB 信号通路探讨麻黄生物碱组分对过敏性哮喘大鼠的抗炎机制[J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(11): 1453-1459.
- [5] 赵睿喧, 杨微, 陈妍, 等. 大蒜素对过敏性哮喘小鼠气道炎症及 cAMP/PKA/CREB 通路的影响[J]. 解剖科学进展, 2022, 28(5): 555-559.
- [6] 王雅娟, 高华武, 朱和平, 等. 健脾补肺方对幼龄哮喘大鼠 cAMP/PKA/CREB 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(19): 88-96.
- [7] 韦凌霞, 丁茂鹏, 王志旺, 等. cAMP/PKA/CREB 信号通路调控组织器官细胞纤维化及中医药干预作用的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(8): 1019-1024.
- [8] 张卫华, 刘舟, 王俊壹, 等. 桂枝汤对 AR 大鼠鼻黏膜上皮细胞 AQP5 表达及 cAMP/PKA-CREB 信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(1): 283-287.
- [9] 敬岳, 张洪春, 金津, 等. 补肺活血中药对慢性阻塞性肺疾病小鼠肺功能及炎症反应的影响[J]. 北京中医药, 2023, 42(3): 281-284.
- [10] 董珍宇, 曹锐, 李文泉, 等. 自拟中药方肺心安联合西药治疗气阴两虚型慢性阻塞性肺疾病稳定期 30 例疗效观察[J]. 北京中医药, 2022, 41(8): 907-911.
- [11] 尹英杰, 张洪春, 晁恩祥. 固本止咳胶囊治疗慢性支气管炎迁延期的临床研究[J]. 北京中医药大学学报, 2001, 24(2): 58-61.
- [12] 唐诗环, 王玥琦, 廖强, 等. 固本止咳中药对慢性阻塞性肺疾病模型小鼠肺功能及 SIgA 的影响[J]. 北京中医药, 2019, 38(9): 893-897, 封 3.
- [13] 刘颖, 敬岳, 郭丽丽, 等. 固本止咳中药对 COPD 小鼠肺组织 $\gamma\delta$ T 细胞及 IL-17 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(12): 3981-3984.
- [14] 来薛, 蔡哲, 敬岳, 等. 固本止咳中药对慢性阻塞性肺疾病模型小鼠肺组织中弹性蛋白酶表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(7): 2512-2514.
- [15] 刘颖, 敬岳, 郭丽丽, 等. 固本止咳中药对 COPD 模型小鼠脾、胸腺指数及 Th1/Th2 失衡的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(2): 504-506.
- [16] LI Y, LI SY, LI JS, et al. A rat model for stable chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke inhalation and repetitive bacterial infection[J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(10): 1752-1760.
- [17] 韩宇, 郭晏华, 于艳. 补骨脂甲素介导 cAMP/PKA/CREB 信号通路调控促进骨髓 MSC 成骨分化作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(7): 1597-1600.
- [18] 王晋平, 唐农, 胡跃强, 等. 益肺宣肺降浊方对血管性痴呆大鼠海马超微结构以及 cAMP/PKA-CREB 信号通路的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(2): 404-407.
- [19] 杨夏, 彭生, 刘功俭. cAMP/PKA/CREB 信号通路及相关调控蛋白 PDE-4 和 ERK 对学习记忆的影响[J]. 医学综述, 2011, 17(15): 2241-2243.

Mechanism of Guben ZhiKe Formula on COPD in stable mice based on cAMP/PKA/CREB signal pathway

HONG Zheng¹, FANG Hanyu¹, LIU Mingfei¹, ZOU Hao¹, LIU Ying², ZHANG Hongchun²

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Section 1 Lung Disease of TCM, China-Japanese Friendship Hospital, Beijing 100029)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Guben Zhike Formula (GBZK) on mice in stable stage of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and to explore the mechanism of action of GBZK on mice in stable stage of COPD based on cAMP/PKA/CREB signaling pathway. **Methods** 60 BALB/c mice were randomly and equally divided into 4 groups, that is control group, model group, GBZK group and dexamethasone group, except for the control group, the rest of the groups were replicated with cigarettes smoke exposure combined with lipopolysaccharide in COPD stable stage mouse model. After the mice were established with COPD model, corresponding drug interventions were given and GBZK was gavaged continuously of 0.2 mL/ (d·each), the dexamethasone group was given intraperitoneal injection of 1.0 mg/kg dexamethasone injection twice a day, all for 28 days. The general conditions of mice in each group were observed; cAMP levels in mouse lung tissue homogenates were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); protein expression of cAMP, p-PKA, CREB, and p-CREB were detected in mouse lung tissue homogenates using Western blotting. **Results** Compared with the model group, the wheezing shortness of breath was improved and the cAMP content in lung tissue homogenates increased in the GBZK Group ($P < 0.05$), and the protein expression of cAMP, p-PKA, CREB, and p-CREB ($P < 0.05$) were all increased ($P < 0.05$). **Conclusion** GBZK may play a protective role in stable COPD mice by activating the cAMP/PKA/CREB signaling pathway.

Keywords Guben Zhike Formula; COPD; cAMP/PKA/CREB; mice

(收稿日期: 2024-03-05)