

布地奈德吸入给药对慢性支气管哮喘小鼠 HpARIh/STAT 信号通路的影响

武国宇

大连医科大学附属第一医院 药学部, 辽宁 大连 116000

摘要: **目的** 探讨布地奈德吸入给药对慢性支气管哮喘模型小鼠多形螺旋线虫预警素释放抑制剂/转录因子 (HpARIh/STAT) 信号通路的影响。**方法** 30 只小鼠随机分成 3 组, 对照组、模型组和布地奈德组, 每组 10 只。模型组小鼠于第 1 天和第 14 天用卵白蛋白 (OVA) 致敏, 第 24 天开始雾化吸入 1% OVA 并持续刺激至第 28 天, 建立哮喘气道重塑模型; 布地奈德组小鼠在吸入 OVA 2 h 前吸入布地奈德 30 min; 对照组使用生理盐水代替 OVA。第 28 天最后一次雾化结束后 24 h 处死小鼠, 采用病理图像分析系统测量小鼠的气道形态学参数, 分别取各组小鼠外周血和肺组织, 用 ELISA 试剂盒检测外周血上清液肿瘤坏死因子 (TNF- α)、白细胞介素 13 (IL-13) 和转化生长因子- β (TGF- β) 水平, HE 染色观察肺组织病理学变化, Western blotting 检测肺组织蛋白 HpARIh、IL-13、STAT3 和 STAT6 的表达。**结果** 病理组织学结果显示布地奈德组小鼠支气管壁的炎性细胞浸润明显减少, 支气管壁结构改变明显减轻。HE 染色结果显示布地奈德干预后有效地减少了炎性因子对肺组织的浸润。ELISA 结果显示布地奈德组与模型组相比, 外周血上清中 TNF- α 、TGF- β 和 IL-13 等炎症因子水平明显降低 ($P < 0.05$), 但仍高于对照组。Western blotting 结果表明布地奈德通过增加 HpARIh 蛋白表达来激活 STAT3, 同时抑制 STAT6, 从而抑制哮喘诱发因子 IL-13 的表达水平。**结论** 早期雾化吸入布地奈德可以有效抑制 TNF- α 、TGF- β 和 IL-13 等炎症因子的表达, 同时通过激活 HpARIh/STAT 信号通路抑制 IL-13 的表达, 明显减轻哮喘小鼠的气道重塑。

关键词: 哮喘; 布地奈德; 炎症因子; HpARIh/STAT 信号通路; 白细胞介素-13

中图分类号: R974 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2020)12-2307-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.12.003

Effect of budesonide inhalation on HpARIh/STAT signaling pathway in chronic bronchial mice

WU Guo-yu

Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of budesonide on HpARIh/STAT signaling pathway in chronic bronchial asthma model mice. **Methods** Thirty mice were randomly divided into three groups: normal control group, model group and budesonide group, with 10 rats in each group. Mice in model group were sensitized with ovalbumin (OVA) on day 1 and day 14, and aerosolized 1% OVA on day 24 and continued drug stimulation until day 28 to establish an asthmatic airway remodeling model; mice in budesonide group were inhaled budesonide 30 min before 2 h inhalation of OVA; mice in normal control group used physiological saline instead of OVA. On the 28th day, the mice were sacrificed 24 h after the last atomization. The pathological image analysis system was used to measure the airway morphological parameters of mice. Then the peripheral blood and lung tissues of mice in each group were taken, and the peripheral blood was detected by ELISA kit. The expression levels of tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-13 (IL-13) and transforming growth factor- β (TGF- β) were detected in the supernatant. HE staining was used to observe the pathological changes of lung tissue. Western blotting was used to detect protein expression of HpARIh, IL-13, STAT3 and STAT6 in lung tissue. **Results** Histopathological results showed that the inflammatory cell infiltration of the bronchial wall and the structural changes of the bronchial wall of mice in budesonide group were reduced significantly ($P < 0.05$). HE staining results showed that the infiltration of inflammatory factors in lung tissue of mice in budesonide group were reduced ($P < 0.05$). The results of ELISA showed that the levels of TNF- α , TGF- β and IL-13 in peripheral blood supernatant of mice in budesonide group were significantly lower than in model group ($P < 0.05$), but still higher than control group. Results of Western blotting indicated that budesonide inhibited the expression of

收稿日期: 2020-06-19

基金项目: 辽宁省教育厅计划项目 (201602223); 辽宁省科技厅攻关项目 (2019-ZD-0652)

作者简介: 武国宇 (1984—), 男, 硕士, 主要研究方向为呼吸系统用药。E-mail: 2487104738@qq.com

the asthma-inducible factor IL-13 by increasing the expression of HpARlh and inhibiting STAT6. **Conclusion** Early aerosolized inhalation budesonide can effectively inhibit the expression of inflammatory factors such as TNF- α , TGF- β and IL-13, and inhibit the expression of IL-13 by activating HpARlh/STAT signaling pathway, which can significantly reduce asthma.

Key words: asthma; budesonide; inflammatory factor; HpARlh/STAT; interleukin-13

支气管哮喘（简称哮喘）是由多种因素、多种细胞和细胞分泌因子参与的慢性炎症气道疾病，目前尚无完全根治的方法^[1]。已证实哮喘发病机制中，炎症因子起到至关重要的作用，有研究表明多种炎症因子，如肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）、白细胞介素 13（IL-13）和转化生长因子- β （TGF- β ）参与了哮喘的炎症反应^[2]。IL-13 是由白细胞产生的细胞信号分子，引发诸如哮喘等疾病的免疫反应，最近公布的一项研究表明在哮喘患者发病机制中 IL-13 参与了呼吸道超敏炎症反应^[3]，同时促进机体对类固醇的超敏反应，从而导致肺部大量的嗜酸性细胞的浸润。另一方面，IL-13 很可能是通过信号传导与转录激活因子（STAT3/STAT6）来发挥促炎作用^[4]。最新研究结果报道多形螺旋线虫预警素释放抑制剂（polymorphic spiral nematode warning element release inhibitor, HpARlh）可以抑制 IL-13^[5]。糖皮质激素布地奈德是最常见和最有效的治疗支气管哮喘的药物，其对哮喘的炎症反应具有一定的抑制作用^[6-7]。本研究旨在通过小鼠哮喘模型，观察研究早期雾化吸入布地奈德是否可以通过 HpARlh/STAT 信号通路抑制 IL-13 的促炎作用，从而发现布地奈德最新作用的信号通路及其分子机制，为哮喘治疗药物的开发提供新的思路和方向。

1 材料

1.1 实验动物

BALB/cCd 小鼠，雌性，6 周龄，30 只，体重 20~25 g，上海斯莱克实验动物有限责任公司提供，动物许可证号：2019X36524。

1.2 试剂与仪器

TNF- α 、TGF- β 和 IL-13 ELISA 试剂盒购自罗氏试剂公司，蛋白裂解液和蛋白定量试剂盒为 Thorne 公司产品，蛋白酶抑制剂购自 Roche 公司，鼠抗 HpARlh、STAT3、STAT6 和 IL-13 单克隆抗体均购自 Cell Signaling 公司。勃林格殷格翰超声雾化器，自制小鼠雾化吸入箱，计算机图像分析系统（德国 Leica Qwin 公司）。

1.3 药物

吸入用布地奈德混悬液（1 mg：2 mL，批号

H20140475），阿斯利康（AstraZeneca Pty Ltd.）。

2 方法

2.1 小鼠哮喘模型建立

小鼠随机分成 3 组，每组 10 只，模型组：小鼠于第 1 天和第 14 天 ip 0.2 mL 致敏液 [含卵白蛋白（OVA）100 μ g、氢氧化铝凝胶 400 μ g]，第 24 天以 1% OVA 溶液雾化激发，每天 30 min，持续至第 28 天，每次 OVA 雾化前 2 h 雾化吸入生理盐水 20 mL，每天 30 min，持续至最后 1 次 OVA 雾化。布地奈德组：致敏步骤同模型组，根据文献报道^[8]，每次 OVA 雾化前 2 h 雾化吸入 0.5 g/L 布地奈德雾化液 20 mL，每天 30 min，持续至最后 1 次 OVA 雾化。对照组：小鼠于第 1 天和第 14 天 ip 生理盐水 0.2 mL，第 24 天以生理盐水溶液雾化，每天 30 min，持续至第 28 天。

2.2 小鼠肺组织病理切片、染色和图像分析

各组小鼠末次致敏后 24 h 打开胸腔，取出左上叶肺组织，4%多聚甲醛固定 20 h，石蜡切片后行苏木精-伊红（HE）染色；应用 Leica Qwin 医学图像分析软件测定支气管腔的内周长（Pi）、管壁面积（WAt）、支气管平滑肌面积（WAm）、支气管平滑肌细胞核数（N），将 WAt、WAm、N 用 Pi 进行标准化^[9-10]。

2.3 ELISA 法检测外周血上清 TNF- α 、TGF- β 和 IL-13 水平

取血前小鼠禁食禁水，眼球取血至抗凝管，高速低温离心取上清，上清液采用 ELISA 法检测 TNF- α 、TGF- β 和 IL-13 的含量，严格按照试剂盒说明书操作。

2.4 Western blotting 检测 HpARlh、IL-13、STAT3 和 STAT6 蛋白表达水平

取肺组织，碾磨打碎提取组织上清，高速离心并抽取上清，即为所提蛋白。蛋白定量完成后加上样缓冲液，沸水煮 5 min，样品可冻于 -80 $^{\circ}$ C 保存。SDS-PAGE 电泳后进行转膜操作，转膜成功后用脱脂牛奶进行封闭，PBST 清洗，裁剪条带并分别加入 HpARlh、IL-13、STAT3、STAT6 和 β -actin 抗体，均为 1：1 000 稀释，室温孵育 1 h 后 4 $^{\circ}$ C

过夜。次日反复清洗条带,加二抗室温孵育 90 min, PBS 反复冲洗,然后加 ECL 发光液,化学发光仪检测并拍照。

2.5 统计学分析

实验数据使用 SPSS 15.0 软件进行统计分析,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 布地奈德改善小鼠支气管炎症和管壁结构

模型组支气管壁周围有大量炎性细胞浸润,气道壁明显增厚, WAt/Pi、WAm/Pi 和 N/Pi 与对照组比较显著增加 ($P < 0.05$);布地奈德组支气管壁的炎性细胞浸润程度明显减轻,支气管壁结构改变较少, WAt/Pi、WAm/Pi 和 N/Pi 与模型组比较,均显著降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组小鼠 WAt/Pi、WAm/Pi 和 N/Pi 比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Comparison of WAt/Pi, WAm/Pi and N/Pi of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·只 ⁻¹)	WAt/Pi/ μm	WAm/Pi/ μm	N/Pi/(个· μm^{-1})
对照	—	6.4 $\pm$ 2.0	2.6 $\pm$ 0.8	0.029 $\pm$ 0.026
模型	—	19.2 $\pm$ 5.1 [#]	8.1 $\pm$ 3.1 [#]	0.062 $\pm$ 0.020 [#]
布地奈德	0.01	13.4 $\pm$ 6.0 [*]	5.0 $\pm$ 2.0 [*]	0.022 $\pm$ 0.022 [*]

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

3.2 布地奈德改善小鼠肺组织结构

HE 染色结果显示,对照组小鼠肺组织清晰可见正常肺网状结构,肺组织结构完整,支气管管腔规则,周围未见炎症细胞浸润;模型组小鼠支气管、血管黏膜下和周围肺组织有明显的炎症细胞浸润,大量炎症细胞向支气管和血管迁移,上皮细胞部分有脱落,部分可见黏液栓;布地奈德组与模型组相比,肺组织炎症细胞明显减少,肺组织网状结构破

坏较轻,肺组织结构趋于完整,见图 1。

3.3 布地奈德抑制小鼠体内炎症因子表达

ELISA 结果显示,与对照组比较,模型组小鼠血浆中炎症因子 TNF- α 、TGF- β 和 IL-13 表达水平显著增加,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组相比,布地奈德给药组小鼠血浆炎症因子 TNF- α 、TGF- β 和 IL-13 表达水平显著降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

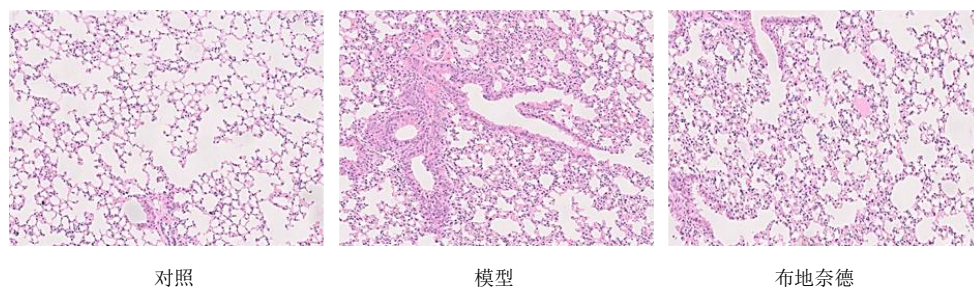


图 1 各组小鼠肺组织病理学观察结果

Fig.1 Results of phathological observation of lung tissue in mice in each group

表 2 各组小鼠血浆中 TNF- α 、TGF- β 和 IL-13 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Levels of TNF- α , TGF- β and IL-13 in plasma of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·只 ⁻¹)	TNF- α /(ng·mL ⁻¹)	TGF- β /(ng·mL ⁻¹)	IL-13/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	10.21 $\pm$ 0.85	11.61 $\pm$ 1.81	11.29 $\pm$ 1.24
模型	—	29.54 $\pm$ 2.64 [#]	28.10 $\pm$ 3.65 [#]	30.54 $\pm$ 3.08 [#]
布地奈德	0.01	19.62 $\pm$ 2.62 [*]	15.56 $\pm$ 2.87 [*]	18.52 $\pm$ 3.78 [*]

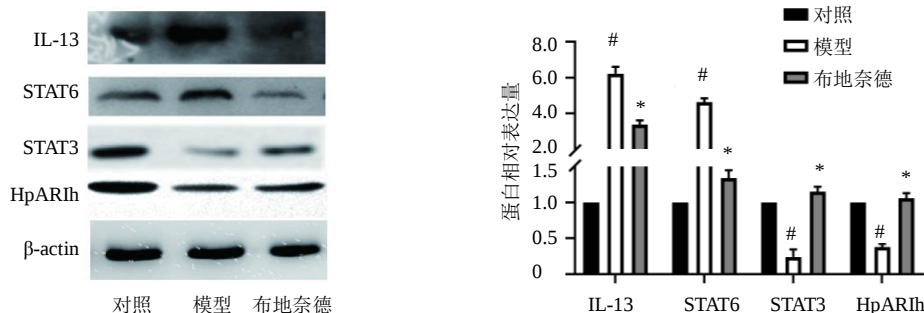
与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

3.4 布地奈德通过激活 HpAR1h/STAT 信号通路发挥抗炎作用

Western blotting 结果显示,与对照组相比,模型组小鼠 HpAR1h 和 STAT3 蛋白表达显著降低,STAT6 和 IL-13 的蛋白表达增高,而布地奈

德则显著抑制 STAT6 和 IL-13 的表达,而增加 HpAR1h 和 STAT3 蛋白表达,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明布地奈德通过激活 HpAR1h/STAT3,抑制 STAT6/IL-13 表达发挥抗炎作用。见图 2。



与对照组比较: # $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$

$P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs model group

图2 各组小鼠肺组织中 HpAR1h、STAT3、STAT6 和 IL-13 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Protein expression of HpAR1h, STAT3, STAT6, and IL-13 in lung tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

4 讨论

支气管哮喘是一种慢性疾病,其中肺部支气管气道发生炎症,并对某些过敏物质产生强烈过敏反应,结果导致气道周围肌肉收缩、变窄从而阻断氧气进入肺部。一些哮喘症状包括气短、胸闷、咳嗽和喘息^[11]。研究表明大部分的哮喘都伴随着过敏反应,哮喘的诱发因素包括过敏反应物质,如尘螨、花粉、烟草烟雾和空气污染等^[12],同时阿司匹林和其他药物也可以诱发哮喘,运动、冷气和极端情绪如愤怒和恐惧也可以诱发哮喘^[13]。而哮喘发病确切的原因尚未完全清楚,研究者认为可能是由多基因和环境的多种影响作用造成。

最新的研究表明,IL-13 是诱发哮喘的重要炎症因子,IL-13 是由白细胞产生的细胞信号分子,引发诸如哮喘等疾病的免疫反应,最近公布的一项研究表明在哮喘患者发病机制中 IL-13 参与了呼吸道超敏炎症反应,同时促进机体对类固醇的超敏反应,从而导致肺部大量的嗜酸性细胞的浸润^[14]。HpAR1h 蛋白是一种多形螺旋线虫预警素释放抑制剂,其可以干扰白细胞介素 33(IL-33)的作用,IL-33 是白细胞产生的细胞信号分子,在诸如哮喘等疾病的免疫反应过程中起到重要作用,研究发现 HpAR1h 作为一种抑制剂可以有效阻断 IL-33 的释放和“随之而来的过敏性致敏”^[15]。

有研究表明,IL-13 和 STAT 家族蛋白关系密切,其在哮喘发病中的具体作用尚无过多报道,而 HpAR1h 蛋白是否可通过 STAT 家族蛋白调控 IL-13 的表达,同样在哮喘的发病机制中尚无报道。本研究将 HpAR1h-STAT-IL-13 联系起来研究,探讨三者之间的分子相互作用关系,探讨早期雾化吸入布地奈德是否可以通过 HpAR1h/STAT 信号通路抑制 IL-13 的促炎作用。动物模型构建成功后,分别观察了各组小鼠支气管病理组织学变化和肺组织 HE 染色,结果发现模型组小鼠支气管和肺组织均发生不同程度的病变,而布地奈德可以缓解这些病变过程。此外用 ELISA 试剂盒检测了各组小鼠外周血中炎症相关因子 TNF- α 、TGF- β 和 IL-6 的表达,结果表明模型组小鼠外周血中炎症因子表达显著升高,布地奈德同样可以显著降低炎症因子表达水平。用免疫印迹法检测了各组小鼠肺组织 HpAR1h、STAT3、STAT6 和 IL-13 蛋白表达情况,最终发现通过激活 HpAR1h/STAT3,抑制 STAT6/IL-13 表达,最终阻断了哮喘炎症诱导因子 IL-13 的促炎作用,为研究哮喘发病因素发现了新的分子机制,研究结果表明 HpAR1h 可作为一种具有研究潜力的哮喘治疗靶分子,为临床治疗提供新的思路 and 方向,同时为布地奈德治疗哮喘提供新的临床依据。

参考文献

- [1] 蒋宝安, 屈斌, 郑辉, 等. 支气管哮喘的发病机制及药物治疗研究进展 [J]. 中国当代医药, 2015, 22(13): 35-37.
- [2] 陈辉龙, 熊维宁, 徐永健. 支气管哮喘治疗新药的开发及临床应用 [J]. 世界临床药物, 2014, 35(6): 396-399.
- [3] 石义兵, 郭小龙. 活血定喘汤对支气管哮喘患儿气道炎症及炎症因子水平的影响 [J]. 陕西中医, 2020, 41(11): 1602-1606.
- [4] 戴益凤. 基于 IL-4、IL-13 膜受体表达调控 STAT-6 信号通路探讨哮喘颗粒治疗支气管哮喘大鼠模型的作用机理研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [5] Junttila I S. Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 receptor complexes [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 888.
- [6] 刘丹, 李景钊, 吴文先. 哮喘宁颗粒联合布地奈德福莫特罗治疗支气管哮喘急性发作期的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(11): 2187-2190.
- [7] 何仁忠, 岑敏, 王冠, 等. 口服西替利嗪联合布地奈德雾化治疗中国儿童急性哮喘的 Meta-分析 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(7): 1399-1405.
- [8] 陈晶, 黄小琪, 梁丽英, 等. 生理盐水激发卵白蛋白诱发的哮喘大鼠模型与正常大鼠肺部病理检查的比较与研究 [J]. 现代预防医学, 2011, 38(20): 4223-4224.
- [9] 姚亮, 王振伟, 沈圆圆, 等. 哮喘方对支气管哮喘模型大鼠气道重塑的干预作用 [J]. 上海中医药大学学报, 2017, 31(2): 66-68.
- [10] 杨昆, 龚新月, 董滢, 等. 三子养亲汤通过抑制 miR-155-5p 调控 Th17/Treg 平衡失调对支气管哮喘的机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(4): 65-69.
- [11] 王金花. 扎鲁司特联合沙美特罗替卡松气雾剂对小儿咳嗽变异性哮喘症状改善及肺功能的影响 [J]. 中国现代药物应用, 2020, 14(20): 112-114.
- [12] 杨培君, 成秋, 朱富华. 115 例哮喘患儿的发病因素调查 [J]. 陕西中医药大学学报, 2019, 42(3): 88-91.
- [13] 李伟利, 叶成刚, 胡惠玲, 等. 哮喘与阿司匹林哮喘影响慢性鼻窦炎的临床研究 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2019, 33(7): 635-638.
- [14] Gao C, Yan Y, Chen G, et al. Autophagy activation represses pyroptosis through the IL-13 and JAK1/STAT1 pathways in a mouse model of moderate traumatic brain injury [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2020, 10(17): 1209-1216.
- [15] Osbourn M, Soares D C, Vacca F, et al. HpARI protein secreted by a helminth parasite suppresses interleukin-33 [J]. *Immunity*, 2017, 47(4): 739-751.