

• 研究论文 •

利用基因芯片技术阐述甘草酸协同麻黄碱的分子作用机制

石倩, 刘曷, 李若洁, 程彬峰, 侯媛媛, 白钢*

南开大学 药学院, 天津 300071

摘要 目的: 利用基因表达谱芯片探索甘草酸协同麻黄碱对人支气管平滑肌细胞的协同作用机制。方法: 采用 TNF- α 诱导人支气管平滑肌细胞建立炎症模型, 再分别用麻黄碱、麻黄碱联合甘草酸进行干预。提取细胞的 mRNA, 反转录后与基因表达谱芯片进行杂交, 经扫描分析筛选表达差异的基因。结果: 共筛选出显著表达差异基因 53 种, 其中 33 种基因表达水平上调, 20 种基因表达下调, 经 Gene Go 软件分析这些基因在不同生物途径中存在协同作用。结论: 甘草酸在 G 蛋白偶联受体途径、细胞周期与凋亡以及离子通道等不同途径协同麻黄碱发挥作用。

关键词 麻黄碱; 甘草酸; 基因芯片; 人支气管平滑肌

中图分类号: R969.2 R974.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2010) 02-0085-06

Analysis of synergic effect of glycyrrhizic acid and ephedrine on the human bronchial smooth muscle cells with cDNA microarray

SHI Qian, LIU Ze, LI Ruo-jie, CHENG Bin-feng, HOU Yuan-yuan, BAI Gang*

College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract **Objective:** To investigate the synergic effect of glycyrrhizic acid and ephedrine on the human bronchial smooth muscle cells with cDNA microarray method. **Methods:** After establishment of inflammation model induced by TNF- α , the human bronchial smooth muscle cells were divided into three groups randomly: the model group, ephedrine group, and glycyrrhizic acid plus ephedrine group. Total RNA of the subcutaneous tumors was extracted using Trizol reagents, and cDNA-labeled fluorescence was synthesized by reverse transcription method. Total DNA preparations from the cells were hybridized to the gene chips. Then the array was scanned and the signals were analyzed after hybridization. **Results:** Compared with ephedrine group, 33 genes were up-regulated by more than two folds and 20 genes were down-regulated in the HBAMC cells treated with glycyrrhizic acid plus ephedrine. The Gene Go analysis revealed that these genes were associated with G-Protein coupled receptor signaling pathway, cell cycle, apoptosis, and so on. **Conclusion:** The results show that these pathways may be responsible for the synergic effect of glycyrrhizic acid and ephedrine.

Key words ephedrine; glycyrrhizic acid; cDNA microarray; human bronchial smooth muscle cells (HBSMC)

基因芯片技术已广泛应用于基因表达分析、基因型和多态性分析、疾病诊断与治疗 and 药物开发等研究^[1]。中药多成分多靶点的特点决定了基因芯片在其机制研究中的优势地位^[2]。将生物芯片技术和蛋白质组学技术应用于中药复方的研究, 可将中药作用的靶基因全部显示出来, 将药性、功能及主治与其对特定疾病相关通路与调控机制关联起来, 从分子水平上诠释传统的中药配伍理论及作用机制。

甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch 的干燥根及根茎^[3], 主要含有三萜类化合物甘

草酸、甘草次酸, 黄酮类化合物甘草黄苷和甘草素等, 具有解毒、调和药性及抗炎等多种药理活性^[4-9]。麻黄为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf 的干燥草质茎^[10], 主要化学成分为生物碱, 其中以麻黄碱为主, 占总生物碱的 40%~90%^[11,12]。具有松弛平滑肌、收缩血管、抗炎、发汗解热、抗菌、抗病毒和镇咳平喘等药理作用^[13-16]。麻黄碱具有松弛支气管平滑肌的平喘作用, 但过量摄入麻黄便会出现以中枢神经系统过度兴奋、气管平滑肌迟缓、心动过速和血压升高等副作用^[17,18]。在临床使用中麻黄

收稿日期: 2010-02-21

* 通讯作者 白钢 E-mail: gangbai@nankai.edu.cn

多与甘草配伍达到减毒增效的作用,在《伤寒论》中含麻黄的复方有 21 例,其中与甘草配伍的就有 18 例^[19]。其中治疗哮喘的代表方之一麻杏甘石汤由麻黄、甘草(蜜炙)、石膏和苦杏仁 4 味药组成,常用于治疗肺热咳喘而无大热之证,药理实验表明本方具有解热、抗炎、抗病毒、镇咳等作用^[20-22],临床应用较为广泛,但是麻黄甘草配伍后协同增效的分子机制尚未见报道。

本实验利用全基因组表达芯片的方法分析麻黄碱和甘草酸联合作用后,对人支气管平滑肌细胞(HBSMC)基因表达谱的变化,从功能基因组的角度对甘草酸协同麻黄碱平喘的分子机制进行探讨,为解释麻黄甘草配伍增效的机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及细胞培养

人支气管平滑肌细胞株 HBSMC 购于 ScienCell 公司,使用指定的 HBSMC Medium 培养(根据说明添加 SMCGs),并于 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中孵育生长。

1.1.2 试剂

肿瘤坏死因子- α (TNF- α) (100ug/mL)购于华美生物工程公司;甘草酸(质量分数 98%)购于陕西慧科科技股份有限公司;麻黄碱(质量分数 95%)购于天津一方科技公司。

1.1.3 主要仪器

本实验所采用的是 Affymetrix GeneChip 3000 TG System。具体包括: 1. Scanner 3000 7G 4C with Autoloader; 2. Scanner 3000 Workstation; 3. Fluidics Station 450; 4. Hybridization Oven 640。二氧化碳培养箱(Forma)。

1.2 方法

1.2.1 细胞模型的建立及处理

人支气管平滑肌细胞在 SMCM 培养基中培养,待细胞长至 80%~90%时加入终质量浓度 10 μ g/mL TNF α , (模型对照组);再分别添加终浓度 10⁻⁹ mol/L 麻黄碱(麻黄碱组);终浓度 10⁻⁹ mol/L 麻黄碱和 10⁻⁹ mol/L 甘草酸(麻黄碱甘草酸混合组)。给药 12 h 后消化细胞,用 Trizol 提取对照组和实验组细胞总 RNA, -80℃保存。

1.2.2 DNA 扩增和芯片扫描

RNA 反转录合成第一链 cDNA,合成第二链

cDNA。cDNA 纯化后进行杂交,洗涤,染色,对芯片进行扫描,具体过程遵守 Affymetrix 公司基因表达操作程序。应用 Scanner 3000 7G 4C 扫描仪对芯片进行扫描和信号值转换。

1.2.3 基因芯片数据的分析

使用 Gene Go 公司的 Meta Core 软件对生物途径进行整合分析。

2 结果

以麻黄碱组为基准,进行比较分析,挑出大于 2 倍差异的探针,判定为基因表达有显著性差异。在信号通路相关的基因中,表达有显著性差异的基因有 53 个,经甘草酸联合作用后基因表达上调有 33 项,结果见表 1;下调的有 20 项,结果见表 2。

利用生物信息学分析平台分别对上调和下调的各项基因进行分析,对这些基因功能进行分类,主要涉及 cAMP 生物合成过程(cAMP biosynthetic process)(图 1);受体调节和磷酸化(regulation of localization, phosphorylation)(图 2);细胞凋亡调节(regulation of apoptosis)(图 3,图 4);钠离子通道(sodium ion transport)(图 5)等 4 类生物调节途径,主要上调和下调变化基因见表 3。

3 讨论

药物与细胞相互作用引起的内部生理活动的变化可表现在基因表达的变化上,选择合适的药靶是研究药物作用的关键因素之一。而基因芯片技术可以用来阐述药效作用靶点,为从全基因组水平上了解药物作用机制提供线索。因此,首先用炎性介质 TNF- α 刺激人支气管平滑肌细胞(HBSMC)造成体外炎性模型,再用甘草酸和麻黄碱等进行干预,利用最新的 AFFY 人类表达谱芯片(U133plus2.0)考察药物干预前后胞内 35 800 个基因的表达变化。再用生物信息学分析平台分别对信号转导, G 蛋白偶联受体途径,感染和免疫,细胞周期与凋亡,以及离子通道等不同的功能基因进行分析,系统全面的了解麻黄碱和甘草酸的协同作用机制。

人支气管平滑肌细胞上表达大量的 β 2 受体,此功能性的受体是一种 G 蛋白偶联的受体,具有 G 蛋白偶联受体的共同特征。与它偶联的 G 蛋白为兴奋性 G 蛋白(Gs)。Gs 是由 α 、 β 、 γ 3 种亚基组成的异三聚体。当 β 2 受体激动剂与受体结合时,受体构象变化促使 Gs 蛋白的 α 亚基与 GDP 解离,形成短暂的游离型 α 亚基。由于细胞内 GTP 浓度高

表 1 甘草酸-麻黄碱联合作用后表达上调的基因

Table 1 Up-regulated genes in the HBSMC cells after treated with glycyrrhizic acid plus ephedrine compared with those with ephedrine

Number	Symbol	Description
1	ZNF236	zinc finger protein 236
2	FBXL17	F-box and leucine-rich repeat protein 17
3	C21orf59	chromosome 21 open reading frame 59
4	DLGAP1	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 1
5	ATP2C1	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, type 2C, member 1
6	ERBB3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)
7	ZNF148	zinc finger protein 148
8	HEG1	HEG homolog 1 (zebrafish)
9	HMGA2	high mobility group AT-hook 2
10	PRKD3	protein kinase D3
11	FYN	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES
12	RORA	RAR-related orphan receptor A
13	MSRA	methionine sulfoxide reductase A
14	FHL5	four and a half LIM domains 5
15	ZFAND6	zinc finger, AN1-type domain 6
16	SNCA	synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)
17	STX7	syntaxin 7
18	FNBP1L	formin binding protein 1-like
19	FBXL7	F-box and leucine-rich repeat protein 7
20	RIC8B	resistance to inhibitors of cholinesterase 8 homolog B (C. elegans)
21	MBNL1	muscleblind-like (Drosophila)
22	CUL3	cullin 3
23	TNFAIP8	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8
24	PDZRN3	PDZ domain containing RING finger 3
25	SBF2	SET binding factor 2
26	NPW	neuropeptide W
27	DGKH	diacylglycerol kinase, eta
28	ANKRD28	ankyrin repeat domain 28
29	CEP135	centrosomal protein 135kDa
30	PCM1	pericentriolar material 1
31	TRIO	triple functional domain (PTPRF interacting)
32	EPAG	early lymphoid activation protein
33	PAM	peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase

于 GDP, α 亚基即与 GTP 结合, α 亚基被激活而与 β 、 γ 亚基分离^[23]。激活的 α 亚基作用于腺苷酸环化酶 (AC), 导致由 AC 介导的各种效应。AC 活化后催化 ATP 生成 cAMP, cAMP 作为重要的第二信使参与呼吸系统靶细胞的信号传导功能调节^[24]。其中 cAMP 调控的蛋白激酶 A (PKA) 在气道平滑肌中活化后可影响多种蛋白的磷酸化。包括可以抑制肌球蛋白轻链激酶, 从而抑制肌动蛋白与肌球蛋白偶

联, 使气道平滑肌松弛。PKA 活化还可以促进钙激活钾通道, 钾离子外流导致气道平滑肌细胞膜超极化, 抵消跨壁张力引起的膜去极化及平滑肌收缩。PKA 活化也抑制磷脂酰肌醇水解, 从而降低胞内游离钙离子, 阻断依赖钙离子的气道平滑肌收缩反应^[25]。所以 cAMP 的升高有助于气道的舒张, ErbB3、ANKRD28、FZD3、ACT、UBAP2L 这 4 种基因在甘草酸干预后体现出上调的趋势, 推

测它们是甘草酸在干预 β_2 受体的 cAMP 生成网络中的相关影响因子。

临床治疗中长期使用一种激动药后，组织或细胞对激动药的敏感性下降，产生的激动药特异性脱敏的机制至今不很清楚，推测可能与受体的磷酸化有关。这些受体的调节涉及一些特异过程如受体的

脱敏、内化和下调。当兴奋剂与受体结合时，引发涉及受体磷酸化的级联反应。 β_2 受体的磷酸化涉及一个脱敏过程，特别是依赖激动药的 G 蛋白结合受体磷酸化是一个特异激动药介导的脱敏过程。在关闭受体介导的信号传导途径中，脱敏起着一个至关重要的作用。兴奋剂活化受体，可能刺激蛋白激酶

表 2 甘草酸-麻黄碱联合作用后表达下调的基因

Table 2 Down-regulated genes in the HBSMC cells after treated with glycyrrhizic acid plus ephedrine compared with those with ephedrine

Number	Symbol	Description
1	TADA1L	transcriptional adaptor 1 (HFI1 homolog, yeast)-like
2	MTRF1L	mitochondrial translational release factor 1-like
3	FCRLA	Fc receptor-like A
4	C18orf1	chromosome 18 open reading frame 1
5	STARD7	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 7
6	CYP3A5P2	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5 pseudogene 2
7	EIF3F	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F
8	CLCN4	chloride channel 4
9	CSNK2A1	casein kinase 2, alpha 1 polypeptide
10	CHGA	chromogranin A (parathyroid secretory protein 1)
11	C10orf11	chromosome 10 open reading frame 11
12	CD80	CD80 molecule
13	CITED1	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 1
14	DSPP	dentin sialophosphoprotein
15	THOC7	THO complex 7 homolog (Drosophila)
16	TMEFF2	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2
17	FOXO3	forkhead box O3
18	RCN1	reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding domain
19	NNMT	nicotinamide N-methyltransferase
20	SLC39A8	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8

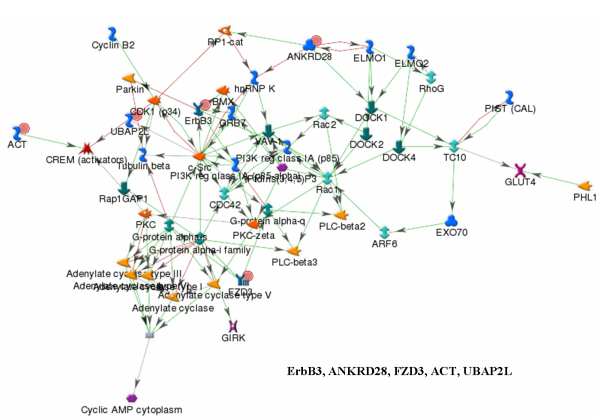


图 1 cAMP 生物合成途径中表达上调的基因网络示意图
Fig. 1 Diagram of up-regulated genes involved in the cAMP biosynthesis network.

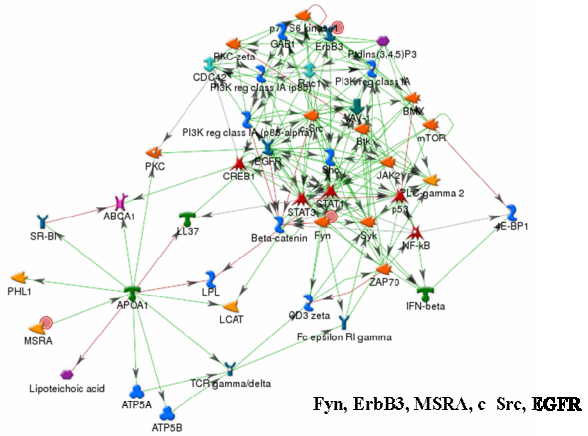


图 2 蛋白磷酸化生物途径中表达上调的基因网络示意图
Fig. 2 Diagram of up-regulated genes involved in the biological pathway of protein phosphorylation.

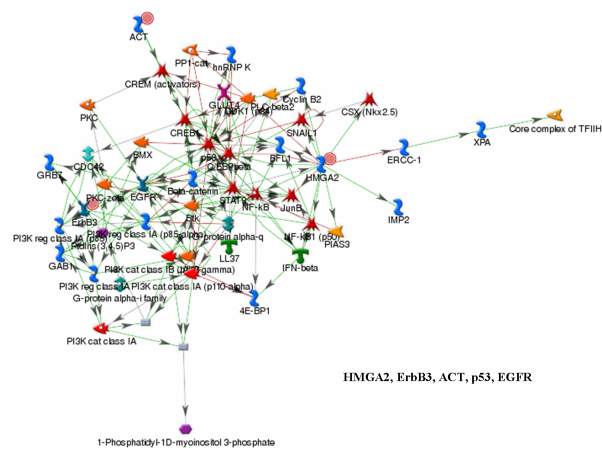


图3 细胞凋亡生物过程中表达上调的基因网络示意图
Fig. 3 Diagram of up-regulated genes involved in the biological pathway of cell apoptosis.

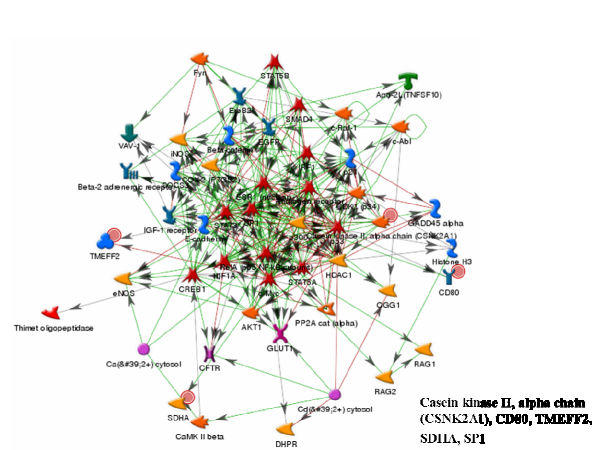


图4 细胞凋亡生物过程中表达下调的基因网络示意图
Fig. 4 Diagram of down-regulated genes involved in the biological pathway of cell apoptosis.

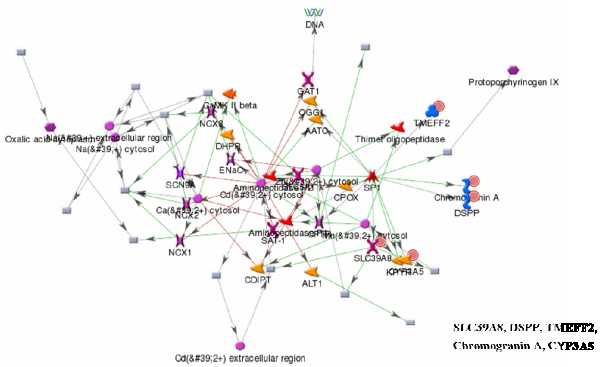


图5 钠离子通道调节过程中表达下调的基因网络示意图
Fig. 5 Diagram of down-regulated genes involved in the biological pathway of sodium channel.

催化受体磷酸化^[26]。改善 β_2 受体在接受激动药刺激后的磷酸化状态可以提高药物的敏感性及药效，故此我们推断甘草酸对 Fyn、ErbB3、MSRA、c-Src、EGFR 的调节功能可能是甘草协同麻黄增效

的关键。

此外，钠离子通道是保障钠离子在细胞膜两侧浓度相对恒定的条件，正常的跨膜钠离子梯度和电压依赖性钠离子是一切离子通道的基础，特别跨膜钠离子梯度是心肌细胞和血管平滑肌钠钙离子交换的基础，钠离子外流从而带动逆梯度外流，可引起平滑肌舒张^[27]。甘草酸的加入可能会更合理地调控平滑肌细胞的离子通道功能，达到增效的效果。研究表明 β_2 受体激动药激活受体可以引起心肌和骨骼肌细胞的凋亡^[28]，由此可以解释在一些接受 β_2 受体激动剂治疗的哮喘或COPD患者中出现的心脏副作用^[29]。根据芯片研究结果可以推测，甘草酸与 β_2 肾上腺素能受体激动药联合用药不仅可以发挥缓解气道紧张和抗炎的协同作用，甘草酸还可能起到抑制由 β_2 受体激动药诱导的细胞凋亡，保护心肌、肺上皮等细胞的作用，减轻激动药引起的副作用。

表3 甘草酸-麻黄碱联合组 VS 麻黄碱组表达变化基因的生物学过程分类
Table 3 Classification of biological process involved in glycyrrhizin combined ephedrine compared to ephedrine group

Function/Process	Symbol	up/down
cAMP biosynthetic process	ErbB3, ANKRD28, FZD3, ACT, UBAP2L.	up
regulation of localization , phosphorylation	Fyn, ErbB3, MSRA, c-Src, EGFR.	up
regulation of apoptosis	HMGA2, ErbB3, ACT, p53, EGFR.	up
	Casein kinase II, alpha chain (CSNK2A1), CD80, TMEFF2, SDHA, SP1.	down
sodium ion transport	SLC39A8, DSPP, TMEFF2, Chromogranin A, CYP3A5.	down

综上所述, 我们的检测结果虽然能在一定程度上提供较多的关于甘草酸影响经 TNF- α 刺激的各种信号通路中基因表达的信息, 探讨了联合使用甘草酸与麻黄碱协同增效作用的分子机制, 初步界定了一些重要的靶基因和相关的通路, 但这些基因的变化受到多种复杂因素的影响, 尚需在后续的翻译、蛋白、组织水平, 以及功能等方面进一步验证和探讨。

参考文献:

- [1] Nambiar S, Mirmohammadsadegh A, Bar A, *et al.* Applications of array technology: melanoma research and diagnosis [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2004, 4(4):549-557.
- [2] 李超英. 抗癌中药新型给药系统的研究及展望 [J]. 中医药学报, 2001, 29(6):312-331.
- [3] 中华人民共和国药典 [S]. 一部. 2005.
- [4] 管燕, 谢强敏. 甘草黄酮对肺部炎症小鼠细胞因子表达和氧化反应的调节作用[J]. 中草药, 2009, 40(8): 1254-1259.
- [5] Yuen M F, Tam S, Fung J, *et al.* Traditional Chinese medicine causing hepatotoxicity in patients with chronic hepatitis B infection: A 1-year prospective study [J]. *Aliment Pharm Therap*, 2006, 24(8):1179-1186.
- [6] Takahashi H, Onishi H, Machida Y. Glycyrrhetic acid-loaded microparticles: liver-specific delivery and therapeutic potential against carbon tetrachloride-induced hepatitis [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2004, 56(4):437-444.
- [7] 柯文娟, 刘新月, 陈燕, 等. 甘草次酸对 K562 细胞增殖抑制作用及其机制研究[J]. 中草药, 2008, 39(5): 714-718.
- [8] Parle M, Dhingra D, Kulkarni S K. Memory-strengthening activity of Glycyrrhiza glabra in exteroceptive and interoceptive behavioral models [J]. *J Medicinal Food*, 2004, 7(4):462-466.
- [9] Nagai T, Egashira T, Kudo Y, *et al.* Attenuation of dysfunction in the ischemia-reperfused liver by glycyrrhizin [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1992, 58(3):209-218.
- [10] 中华人民共和国药典 [S]. 一部. 2005.
- [11] 贾元印. 草麻黄和木贼麻黄挥发油成分的比较研究 [J]. 中国药学杂志, 1989, 24(7):402
- [12] 吉力. 草麻黄、中麻黄和木贼麻黄挥发油化学成分的 GC-MS 分析 [J]. 中国中药杂志, 1997, 22(8):489.
- [13] 吴桂荣. 为麻黄碱水杨酸盐的药理研究 [J]. 中国新药杂志, 2000, 9(6):386.
- [14] 刘 颀, 石 倩, 杨 洋, 等. 麻黄碱与伪麻黄碱平喘效果及机制比较研究[J]. 中草药, 2009, 40(5): 771-774.
- [15] 黄金伟. 蜜炙麻黄与蜜麻黄中麻黄碱含量测定及药理作用的研究 [J]. 中成药, 1990, 12(4):19.
- [16] 加濑义夫. 麻黄中所含麻黄碱在麻黄提取物药理效应中所起的作用 [J]. 国外医学 (中医中药分册), 1984, 1:51.
- [17] Akoba K, Anezake K, Tadano T, *et al.* Effects of sublingual administration of Ephedra herba aqueous extracts on respiratory resistance in dogs [J]. *Annu Rep Tohoku Coll Pharm*, 1978, (25):23-28.
- [18] 袁文学. 麻黄挥发油的药理研究 [J]. 药学通报, 1986, 21(4):235.
- [19] 吴天祥, 刘新鹏. 甘草甜素的用途 [J]. 现代化工, 1996, (7): 49.
- [20] 段富津, 李 飞, 郑守曾, 等. 方剂学 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1994.
- [21] 徐建民. 传统中药甘草的作用机理 [J]. 浙江中西医结合杂志, 1994, 8(53): 3.
- [22] 刘华东. 《伤寒论》麻黄杏仁甘草石膏汤方证探析 [J]. 国医论坛, 2006, 21(2): 5.
- [23] Audet M, Bouvier M. Insights into signaling from the beta2-adrenergic receptor structure[J]. *Nat Chem Biol*, 2008; 4(7): 397-403.
- [24] Hakonarson H, Grunstein M M. Regulation of second messengers associated with airway smooth muscle contraction and relaxation [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 158: S115-122.
- [25] Torphy T J. Beta-adrenoceptors, cAMP and airway smooth muscle relaxation: challenges to the dogma [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1994: 15(10): 370-374.
- [26] Freedman N J, Lefkowitz R J. Desensitization of G protein coupled receptors [J]. *Recent Prog Horm Res*, 1996, 51: 319-351.
- [27] Burniston J G, Tan L B, Goldspink D F. Beta2-Adrenergic receptor stimulation in vivo induces apoptosis in the rat heart and soleus muscle [J]. *J Appl Physiol*, 2005: 98(4): 1379-1386.
- [28] Salpeter S R, Ormiston T M, Salpeter E E. Cardiovascular effects of beta-agonists in patients with asthma and COPD: a meta-analysis [J]. *Chest*, 2004, 125(6): 2309-2321.
- [29] 张宗明, 裘法祖. 离子通道与疾病[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(5):585-587.