

引用本文:赵娜,殷莉,秦晓楠.基于白细胞介素13/信号传导和转录激活因子6信号通路研究甘草酸二铵对慢性阻塞性肺疾病大鼠气管黏液高分泌的影响[J].安徽医药,2022,26(7):1406-1410.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.07.031.



◇临床医学◇

基于白细胞介素13/信号传导和转录激活因子6信号通路研究甘草酸二铵对慢性阻塞性肺疾病大鼠气管黏液高分泌的影响

赵娜,殷莉,秦晓楠

作者单位:河南省直第三人民医院呼吸内科,河南 郑州 450000

摘要: 目的 基于白细胞介素13(IL-13)/信号传导和转录激活因子6(STAT6)信号通路观察甘草酸二铵盐对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠气管黏液高分泌的影响。方法 2019年6月至2020年2月,从珠海百试通生物科技有限公司购买健康雄性SD大鼠。将SD雄性大鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、盐酸氨溴索组和甘草酸二铵低、中、高剂量组,每组15只。采用香烟烟熏联合脂多糖(LPS)建立COPD大鼠模型,除正常组和模型组注射生理盐水外,其余各组均于尾部静脉注射相应剂量的药物,每天1次,持续14d。通过检测各组大鼠的肺阻力(RI)、肺顺应性(Cdyn)以及酚红排痰实验反映大鼠肺功能变化情况;ELISA检测肺泡灌洗液中IL-13的水平变化;HE染色反映肺组织的病理学变化;实时定量荧光PCR(qRT-PCR)和Western blotting检测各组肺组织中IL-13、STAT6和黏蛋白5AC(MUC5AC)mRNA及蛋白表达水平。结果 与正常组相比,模型组大鼠Cdyn降低,RI[(2.39±0.30)cmH₂O·mL⁻¹·s⁻¹比(0.85±0.11)cmH₂O·mL⁻¹·s⁻¹]、排痰量[(1.09±0.14)mg/L比(0.55±0.07)mg/L]、肺泡灌洗液中IL-13[(34.28±5.88)ng/L比(10.36±1.67)ng/L]水平显著升高(P<0.05),肺组织出现病理学损伤,p-STAT6/STAT6[(1.33±0.23)比(0.72±0.14)]水平以及IL-13蛋白[(0.47±0.07)比(0.17±0.03)]和MUC5AC mRNA及蛋白[(0.78±0.15)比(0.15±0.04)]水平均有升高(P<0.05);与模型组相比,甘草酸二铵低、中、高剂量组和盐酸氨溴索组Cdyn增加,RI、排痰量、肺泡灌洗液中IL-13水平显著下降(P<0.05),肺组织损伤程度降低,p-STAT6/STAT6以及IL-13蛋白和MUC5AC mRNA及蛋白水平均有降低(P<0.05);其中甘草酸二铵组作用效果最为明显。结论 甘草酸二铵能抑制COPD模型大鼠IL-13/STAT6信号通路,并可能藉此减轻气管黏液高分泌,改善气管阻塞。

关键词: 肺疾病,慢性阻塞性; 甘草酸二铵; 白细胞介素13; 信号转导与转录激活因子6; 气管黏液; 大鼠,Sprague-dawley

Effects of diammonium glycyrrhizinate on tracheal mucus hypersecretion in rats with COPD based on the IL-13/STAT6 signaling pathway

ZHAO Na, YIN Li, QIN Xiaonan

Author Affiliation: Department of Respiratory Medicine, The Third People's Hospital of Henan Province, Zhengzhou, Henan, 450000, China

Abstract: Objective To observe the effects of diammonium glycyrrhizinate on tracheal mucus hypersecretion in rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) based on the interleukin-13 (IL-13)/signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) signaling pathway. **Methods** From June 2019 to February 2020, healthy male Sprague-Dawley (SD) rats were purchased from Zhuhai BesTest Bio-Tech Co., Ltd. The rats were divided into the normal group, model group, ambroxol hydrochloride group and diammonium glycyrrhizinate low-dose, medium-dose and high-dose groups according to the random number table method, with 15 rats in each group. The COPD rat model was established by cigarette smoking combined with lipopolysaccharide (LPS). Except for the normal group and the model group, which were injected with normal saline, the other groups were injected with the corresponding dose of drugs through the tail vein once a day for 14 days. The pulmonary resistance (RI), lung compliance (Cdyn) and phenol red sputum excretion test of rats in each group were detected to reflect the changes in pulmonary function. The level of IL-13 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The pathological changes in the lung tissue were reflected by HE staining. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expression levels of IL-13, STAT6 and mucin 5ac (MUC5AC). **Results** Compared with the normal group, the rats in the model group had lower Cdyn, RI [(2.39±0.30) cmH₂O·mL⁻¹·s⁻¹ vs. (0.85±0.11) cmH₂O·mL⁻¹·s⁻¹], sputum volume [(1.09±0.14) mg/L vs. (0.55±0.07) mg/L] and IL-13 [(34.28±5.88) ng/L vs. (10.36±1.67) ng/L] levels in BALF were significantly increased (P < 0.05); lung tissue showed pathological damage, p-STAT6/STAT6 [(1.33±0.23) vs. (0.72±0.14)] level and IL-13 protein [(0.47±0.07) vs. (0.17±0.03)] and MUC5AC mRNA and protein [(0.78±0.15) vs. (0.15±0.04)] levels were increased (P < 0.05). Compared with the model group, Cdyn increased, and RI, sputum vol-

ume, and IL-13 levels in bronchoalveolar lavage fluid decreased significantly in the low-, medium- and high-dose groups of diammonium glycyrrhizinate and ambroxol hydrochloride group ($P < 0.05$). The degree of lung tissue injury was reduced, and the levels of p-STAT6/STAT6, IL-13 protein and MUC5AC mRNA and protein were decreased ($P < 0.05$), and the effect of diammonium glycyrrhizinate group was the most obvious. **Conclusions** Diammonium glycyrrhizinate can inhibit the IL-13/STAT6 signaling pathway in COPD model rats, and may reduce tracheal mucus hypersecretion and improve tracheal obstruction.

Key words: Pulmonary disease, chronic obstructive; Diammonium glycyrrhizinate; Interleukin-13; Signal transducer and activator of transcription 6; Tracheal mucus; Rats, Sprague-Dawley

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 病因是气流受限不完全可逆并逐渐发展, 与肺部对外界有害环境的异常炎症反应有关, 其严重时会引起全身 (或肺外) 的不良效应^[1]。由炎性细胞浸润表层上皮、黏液分泌腺增大和杯状细胞增多而导致的气管黏液高分泌是 COPD 重要病理生理特征之一, 与 COPD 的发生、发展、临床结果密切相关^[2-3]。其中, 黏蛋白 5AC (Mucin5AC, MUC5AC) 是气管中最主要的分泌型黏蛋白, 其表达水平代表着气管黏液分泌的强度。此外, 有报道显示, 细胞因子白细胞介素-13 (IL-13) 及其介导的信号转导和转录激活因子 6 (STAT6) 信号转导通路哮喘病人气管的黏液高分泌密切相关, 可以显著诱导气管上皮杯状细胞的化生和 MUC5AC 的表达^[4]。甘草具有补脾益气、润肺止咳、缓急止痛的功效, 而甘草酸二铵是中药甘草中的有效成分, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤及免疫调节的作用。研究显示, 服用甘草酸二铵的 COPD 病人肺功能明显加强, 肺部炎症水平明显降低^[5]。但其作用机制研究较少, 因此, 2019年6月至2020年2月, 本研究主要通过观察甘草酸二铵对香烟烟熏联合脂多糖 (LPS) 诱导的 COPD 大鼠模型气管黏液高分泌的影响以及可能作用机制, 以期临床用药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 健康雄性 SD 大鼠 100 只, 清洁级, 8 周龄体质量为 (240 ± 20) g, 由珠海百试通生物科技有限公司提供, 许可证号: SCXK (粤) 2020-0051。本研究符合一般动物实验伦理学原则。所有动物均严格按照动物饲养规则喂养, 温度为 25°C , 湿度为 60%, 实验室适应性饲养 1 周后用于实验研究。甘草酸二铵注射液 (20190520), 来自江苏神龙药业有限公司; 注射用盐酸氨溴索 (20190312), 由山东罗欣药业集团股份有限公司生产。大鼠 IL-13 ELISA 试剂盒来自上海江莱生物; 实时定量荧光 PCR (qRT-PCR) 扩增引物由金唯智公司合成; TRIzol 试剂 (货号 15596026) 来自 Invitrogen 公司; 逆转录 (货号 R123-01) 及 qRT-PCR 试剂盒 (货号 Q121-02) 来自南京诺唯赞公司; Western blotting 所用抗体均来自 abcam 公司, 一抗为兔抗 IL-13 抗体 (ab52538)、兔抗

磷酸化的信号转导和转录激活因子 6 (p-STAT6) 抗体 (ab44718)、兔抗 STAT6 抗体 (ab217998) 和兔抗 MUC5AC 抗体 (ab3649), 二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG) (ab205718)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及建模 按随机数字表法将大鼠分为正常组, 模型组, 甘草酸二铵低、中、高剂量组和盐酸氨溴索组, 每组 15 只。COPD 大鼠模型制作参考王骏等^[6]。除正常组外, 其余各组在实验开始后的第 1 天和第 14 天将大鼠麻醉后气管内滴入 $200 \mu\text{g}$ LPS; 第 2~13 天和第 15~28 天在特制的 1 m^3 的特制烟室中, 给予大鼠每日 2 次香烟烟熏 (每次 10 根, 每次 30 min)。第 29~42 天, 对各组大鼠进行相应的药物处理, 均行大鼠尾部静脉注射。根据等效剂量折算表, 大鼠对于甘草酸二铵注射液的等效剂量为 15 mg/kg , 因此, 设置低、中、高剂量分别为 7.5 mg/kg , 15 mg/kg 和 30 mg/kg 。盐酸氨溴索组每日注射 6.5 mg/kg 。正常组和模型组大鼠注射等量无菌生理盐水。每天 1 次, 持续 14 d。

1.2.2 酚红排痰实验 参考文献^[7]研究, 每组取 5 只大鼠, 先将酚红用生理盐水配成不同浓度的溶液, 分别测量其在 558 nm 处的吸光度值, 以此制作标准曲线, 然后大鼠腹腔注射 7.05 mmol/L 酚红溶液 0.5 mL , 30 min 后处死分离气管, 用 1 mol/L 氢氧化钠溶液反复冲洗, 合并冲洗液注入比色管中, 测量其在 558 nm 处的吸光度值, 根据酚红的标准曲线计算出痰液排泄量。

1.2.3 大鼠肺功能检测 各组剩余 10 只大鼠戊巴比妥钠注射麻醉后分离暴露气管, 进行气管插管并固定, 用小动物肺功能检测仪测定肺阻力 (RI) 和动态肺顺应性 (C_{dyn})。

1.2.4 肺泡灌洗液中 IL-13 的含量测定 “1.2.3”中各组 10 只大鼠检测肺功能后, 行右支气管插管, 用 1 mL PBS 反复抽吸 3 遍, 回收肺泡灌洗液, 回收率在 80% 以上, 4°C 、 3000 r/min 条件下离心 10 min, 取上清液置于 -20°C 冰箱保留备检; 依照 ELISA 试剂盒说明书步骤检测肺泡灌洗液中 IL-13 的含量, 酶标仪 450 nm 检测待测样本, 然后将样本的吸光度值代入回归方程, 得到浓度值。

1.2.5 大鼠肺组织病理学观察 各组10只大鼠灌洗结束后,开胸,留取肺组织。肺组织固定于4%多聚甲醛中,常规操作制备石蜡切片并进行HE染色,观察其病理学改变。

1.2.6 实时荧光定量PCR检测IL-13、STAT6和MUC5AC mRNA表达量水平 取“1.2.5”所取左肺组织一小块,液氮速冻后采用TRIzol等试剂提取肺组织总RNA,500 ng定量逆转录合成cDNA,然后用SYBR Green I 荧光染料技术进行qRT-PCR扩增。所用引物如表1所示,反应条件为预变性95℃、5 min;循环反应95℃、10 s,60℃、30 s,主循环40个;融解曲线,95℃、15 s,60℃、60 s,95℃、15 s。采用2^{-ΔΔCt}法,通过Ct值计算目的基因相对表达水平。

表1 实时定量荧光PCR引物序列

| 名称 | | 引物序列 |
|---------|----|-------------------------|
| β-actin | 正向 | CGCGAGTACAACCTTCTTGC |
| | 反向 | CCTCATCCATGGCGAACTGG |
| IL-13 | 正向 | TCGCTTGCCTTGGTGGT |
| | 反向 | GGAGATGTTGGTCAGGGATT |
| STAT6 | 正向 | CCCCAGAAAACTGCAACGG |
| | 反向 | GGAAGTCCCAGGGCTGATTC |
| MUC5AC | 正向 | ACCCTTTGGGAACCATCAATCTA |
| | 反向 | GCTCCTTACCTCTGGACAC |

注:β-actin为β-肌动蛋白,IL-13为白细胞介素-13,STAT6为转录激活因子6,MUC5AC为黏蛋白5AC。

1.2.7 肺组织IL-13、p-STAT6、MUC5AC蛋白检测 取“1.2.5”中所保存各组肺组织,剪碎,置于玻璃匀浆器中;加入含有PMSF的裂解液,冰上反复匀浆。30 min后,4℃下12 000 r/min离心5 min,收集上清液,参照BCA试剂盒测定蛋白总浓度。配制10%分离胶、4%浓缩胶。取50 μg蛋白上样,沸水浴处理5 min使蛋白变性,冷却后可以上样。初始电压为80 V,待样品进入分离胶后,换成120 V。电泳结束后,将目的条带凝胶切除,转移到硝酸纤维素膜上,冰上进行转膜反应,电压为60 V,反应时间2 h。结束后用TBS清洗,用封闭液室温下摇床摇动封闭1 h,TBS清洗后,加入兔抗IL-13、兔抗p-STAT6、兔抗STAT6以及兔抗MUC5AC单克隆抗体(稀释倍数1:200),4℃过夜。TBS后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗(稀释倍数1:1 000),室温下孵育2 h,TBS清洗、ECL显色后置于BioRad成像系统中分析电泳条带。

1.3 统计学方法 采用SPSS 20.0统计软件分析处理数据,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 描述,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用SNK-*q*检验, $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甘草酸二铵对各组大鼠酚红分泌量和肺泡灌洗液中IL-13水平的影响 与正常组相比,模型组气管分泌量和肺泡灌洗液中IL-13水平显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,甘草酸二铵各剂量组和盐酸氨溴索组大鼠气管分泌量和肺泡灌洗液中IL-13水平均显著降低($P < 0.05$);其中甘草酸二铵高剂量组与盐酸氨溴索组气管分泌量差异无统计学意义($P > 0.05$),肺泡灌洗液中IL-13水平差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表2 甘草酸二铵对各组大鼠酚红分泌量的影响($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 鼠数 | 酚红分泌量/(mg/L) | IL-13/(ng/L) |
|-----------|----|--------------------------|-----------------------------|
| 正常组 | 5 | 0.55±0.07 | 10.36±1.67 |
| 模型组 | 5 | 1.09±0.14 ^① | 34.28±5.88 ^① |
| 甘草酸二铵组 | | | |
| 7.5 mg/kg | 5 | 0.91±0.11 ^{①②} | 28.37±3.79 ^{①②} |
| 15 mg/kg | 5 | 0.73±0.09 ^{①②③} | 22.52±3.44 ^{①②③} |
| 30 mg/kg | 5 | 0.54±0.07 ^{②③④} | 14.25±2.03 ^{①②③④} |
| 盐酸氨溴索组 | 5 | 0.56±0.10 ^{②③④} | 16.83±2.37 ^{①②③④⑤} |
| F值 | | 26.11 | 66.97 |
| P值 | | <0.001 | <0.001 |

注:IL-13为白细胞介素-13。

①与正常组相比, $P < 0.05$ 。②与模型组相比, $P < 0.05$ 。③与甘草酸二铵低剂量组相比, $P < 0.05$ 。④与甘草酸二铵中剂量组相比, $P < 0.05$ 。⑤与甘草酸二铵高剂量组相比, $P < 0.05$ 。

2.2 甘草酸二铵对各组大鼠肺功能的影响 与正常组相比,模型组大鼠RI显著增高,Cdyn显著降低($P < 0.05$);与模型组相比,甘草酸二铵低、中、高剂量组RI依次降低($P < 0.05$),Cdyn依次增加($P < 0.05$),且甘草酸二铵高剂量组RI、Cdyn水平与盐酸氨溴索组差异无统计学意义($P > 0.05$),见表3。

2.3 甘草酸二铵对大鼠肺组织病理学的影响 正常组大鼠气管壁可见少量炎性细胞,肺形态正常,而模型组的大鼠表现出明显的支气管上皮炎性细胞

表3 甘草酸二铵对各组大鼠肺功能的影响($\text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 鼠数 | RI | Cdyn |
|-----------|----|---------------------------|--------------------------|
| 正常组 | 10 | 0.85±0.11 | 0.61±0.20 |
| 模型组 | 10 | 2.39±0.30 ^① | 0.28±0.04 ^① |
| 甘草酸二铵组 | | | |
| 7.5 mg/kg | 10 | 1.91±0.24 ^{①②} | 0.36±0.05 ^{①②} |
| 15 mg/kg | 10 | 1.51±0.19 ^{①②③} | 0.47±0.06 ^{①②③} |
| 30 mg/kg | 10 | 0.98±0.12 ^{①②③④} | 0.59±0.07 ^{②③④} |
| 盐酸氨溴索组 | 10 | 1.06±0.12 ^{①②③④} | 0.56±0.07 ^{②③④} |
| F值 | | 97.87 | 18.76 |
| P值 | | <0.001 | <0.001 |

注:RI为肺阻力,Cdyn为动态肺顺应性。

①与正常组相比, $P < 0.05$ 。②与模型组相比, $P < 0.05$ 。③与甘草酸二铵低剂量组相比, $P < 0.05$ 。④与甘草酸二铵中剂量组相比, $P < 0.05$ 。

胞浸润,随后小支气管壁增厚,支气管周围肺组织中的淋巴聚集体增加,支气管腔分泌物增多。与模型组相比,甘草酸二铵低、中、高剂量组都表现出较少的病理变化,尤其是甘草酸二铵高剂量组的大鼠,支气管无明显炎性细胞浸润和淋巴聚集,与盐酸氨溴索组类似。见图1。

2.4 甘草酸二铵对各组大鼠肺组织 IL-13、STAT6 和 MUC5AC mRNA 表达量的影响 与正常组相比,模型组大鼠肺组织中 IL-13、STAT6 和 MUC5AC mRNA 表达水平显著增加($P<0.05$);与模型组比较,甘草酸二铵各剂量组大鼠肺组织中 IL-13、STAT6 和 MUC5AC mRNA 表达水平均显著减少($P<0.05$),且呈剂量依赖性;与盐酸氨溴索组相比,甘草酸二铵高剂量组在 IL-13、STAT6 表达量水平明显下降,而在 MUC5AC mRNA 水平无统计学意义,见表4。

表4 甘草酸二铵对各组大鼠肺组织 IL-13、STAT6 和 MUC5AC mRNA 表达量的影响/ $\bar{x} \pm s$

| 组别 | 鼠数 | IL-13/ β -actin | STAT6/ β -actin | MUC5AC/ β -actin |
|-----------|----|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 正常组 | 10 | 1.01±0.12 | 1.00±0.13 | 1.00±0.12 |
| 模型组 | 10 | 3.86±0.48 ^① | 2.36±0.30 ^① | 4.43±0.55 ^① |
| 甘草酸二铵组 | | | | |
| 7.5 mg/kg | 10 | 2.63±0.33 ^{①②} | 2.07±0.26 ^{①②} | 2.18±0.27 ^{①②} |
| 15 mg/kg | 10 | 1.95±0.24 ^{①②③} | 1.67±0.21 ^{①②③} | 1.83±0.23 ^{②③} |
| 30 mg/kg | 10 | 1.23±0.15 ^{①②③④} | 1.10±0.14 ^{②③④} | 1.10±0.12 ^{①②③④} |
| 盐酸氨溴索组 | 10 | 1.46±0.18 ^{①②③④⑤} | 1.32±0.16 ^{①②③④⑤} | 1.05±0.11 ^{②③④} |
| F值 | | 147.24 | 67.81 | 221.25 |
| P值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

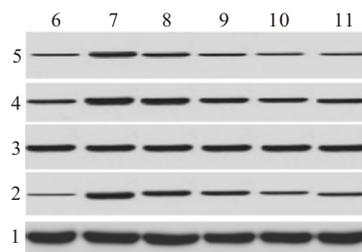
注:IL-13为白细胞介素-13,STAT6为信号转导和转录激活因子6,MUC5AC为黏蛋白5AC, β -actin为 β -肌动蛋白。

①与正常组相比, $P<0.05$ 。②与模型组相比, $P<0.05$ 。③与甘草酸二铵低剂量组相比, $P<0.05$ 。④与甘草酸二铵中剂量组相比, $P<0.05$ 。⑤与甘草酸二铵高剂量组相比, $P<0.05$ 。

2.5 甘草酸二铵对各组大鼠肺组织 IL-13/STAT6 通路相关蛋白表达量的影响 与正常组比较,模型组大鼠肺组织中 IL-13、p-STAT6/STAT6 和 MUC5AC 蛋白表达水平均显著上调,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,甘草酸二铵各剂量组大鼠肺组织中 IL-13、p-STAT6/STAT6 和 MUC5AC 水平均显著下调,差异有统计学意义($P<0.05$),且呈剂量依赖性,且甘草酸二铵高剂量组与盐酸氨溴索组 IL-13、p-STAT6/STAT6 和 MUC5AC 水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见图2,表5。

3 讨论

COPD是呼吸内科常见疾病,容易引起并发症。



注:1— β -肌动蛋白(β -actin);2—黏蛋白5AC(MUC5AC);3—信号转导和转录激活因子6(STAT6);4—磷酸化的信号转导和转录激活因子6(p-STAT6);5—白细胞介素-13(IL-13);6—正常组;7—模型组;8—甘草酸二铵7.5 mg/kg组;9—甘草酸二铵15 mg/kg组;10—甘草酸二铵30 mg/kg组;11—盐酸氨溴索组。

图2 甘草酸二铵对各组大鼠肺组织 IL-13/STAT6 通路相关蛋白表达量的影响

表5 甘草酸二铵对各组大鼠肺组织 IL-13、p-STAT6 和 MUC5AC 蛋白表达量的影响/ $\bar{x} \pm s$

| 组别 | 鼠数 | IL-13/ β -actin | p-STAT6/STAT6 | MUC5AC/ β -actin |
|-----------|----|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 正常组 | 10 | 0.17±0.03 | 0.72±0.14 | 0.15±0.04 |
| 模型组 | 10 | 0.47±0.07 ^① | 1.33±0.23 ^① | 0.78±0.15 ^① |
| 甘草酸二铵组 | | | | |
| 7.5 mg/kg | 10 | 0.41±0.04 ^{①②} | 0.95±0.17 ^{①②} | 0.64±0.13 ^{①②} |
| 15 mg/kg | 10 | 0.35±0.07 ^{①②③} | 0.64±0.13 ^{②③④} | 0.52±0.10 ^{①②③} |
| 30 mg/kg | 10 | 0.29±0.05 ^{①②③④} | 0.64±0.13 ^{②③④} | 0.43±0.09 ^{①②③④} |
| 盐酸氨溴索组 | 10 | 0.27±0.05 ^{①②③④} | 0.63±0.13 ^{②③④} | 0.42±0.08 ^{①②③④} |
| F值 | | 39.63 | 29.37 | 42.43 |
| P值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注:IL-13为白细胞介素-13,p-STAT6为磷酸化的信号转导和转录激活因子6,STAT6为信号转导和转录激活因子6,MUC5AC为黏蛋白5AC, β -actin为 β -肌动蛋白。

①与正常组相比, $P<0.05$ 。②与模型组相比, $P<0.05$ 。③与甘草酸二铵低剂量组相比, $P<0.05$ 。④与甘草酸二铵中剂量组相比, $P<0.05$ 。

最新调查显示,COPD死亡率在全球疾病中排名第6,在我国排名第4,严重威胁着人们健康^[8]。气管黏液分泌过多,一方面加重气管阻塞,引起通气功能障碍,加速肺功能下降;另一方面影响气管纤毛去除功能,从而影响 COPD 病人对吸入细菌和有毒颗粒的去除,引起反复感染,并进一步刺激黏液分泌^[9-10]。在本研究中,通过香烟烟熏联合 LPS 建立 COPD 大鼠模型,结果发现模型组大鼠相比正常组肺阻力增加,肺顺应性以及排痰能力均有下降,IL-13 水平升高,STAT6 磷酸化水平以及 MUC5AC mRNA 和蛋白水平均增加,肺组织出现病理性损伤,说明 COPD 大鼠模型建立成功。

现代药理学认为,甘草酸二铵具有许多生物学功能,例如抗氧化,免疫调节,抗炎,调节内源性类固醇激素水平和保护细胞膜结构等^[11]。研究表明,

甘草酸二铵可以迅速作用于肺,通过改善肺血液循环,减少气管痉挛,增加肺泡通气,缓解临床症状^[12]。另一方面,方妮等^[13]发现 COPD 稳定期病人应用甘草酸二铵后,较对照组血清 CRP、IL-6 和 TNF- α 水平明显降低,外周血 T 淋巴细胞水平明显升高,说明甘草酸二铵可减轻炎症反应,增强免疫功能。甘草酸二铵对 COPD 气管黏液高分泌的作用机制还不清楚,因此,本实验选用甘草酸二铵低、中、高三个剂量对 COPD 大鼠模型进行处理,探究其对气管黏液高分泌的影响,并分析可能存在的作用机制。甘草酸二铵各剂量组大鼠较模型组相比均表现出肺泡灌洗液 IL-13 降低,肺组织病理损伤减轻,提示甘草酸二铵改善 COPD 大鼠气管黏液高分泌,与盐酸氨溴索处理组效果一致。

研究表明,气管黏液的分泌受体体内多个信号通路调节^[14]。其中,IL-13 介导的信号通路在其中具有重要的调控作用。IL-13 对气管上皮杯状细胞的化生、黏蛋白的转录、翻译以及释放等黏液分泌的过程中都发挥着促进作用^[15]。当用含有 IL-13 的培养液培养人支气管上皮细胞时,可观察到上皮细胞转化为胞内富含黏液的杯状细胞^[16]。而激活型转录因子 STAT6 作为 IL-13 信号通路的下游分子,在 IL-13 信号转导途径中发挥着极重要的作用^[17],当通过转基因技术使小鼠过表达 IL-13 时,如果 STAT6 信号通路完整,可以在大鼠体内无气管炎症的情况下观察到气管黏液高分泌的现象,说明 IL-13 诱导小鼠气管上皮细胞黏液高分泌依赖于 STAT6 信号通路^[18]。MUC5AC 是构成 COPD 病人黏液的主要黏蛋白,其基因转录水平可受 STAT6 磷酸化水平调节。同时,有报道指出,IL-13 可增强 MUC5AC 启动子活性,驱动 MUC5AC 基因表达^[19]。本研究中发现,甘草酸二铵各剂量组大鼠肺组织中 IL-13、STAT6、MUC5AC mRNA 水平以及 IL-13、p-STAT6/STAT6、MUC5AC 蛋白表达水平都显著低于模型组,且呈剂量依赖性,进一步表明甘草酸二铵可能通过抑制 IL-13/STAT6 通路激活发挥降低慢性阻塞性肺疾病大鼠气管黏液高分泌的作用。

综上所述,甘草酸二铵抑制 IL13/STAT6 信号通路,进而抑制黏液高分泌,改善气管阻塞,为临床治疗 COPD 提供了新思路。然而未能说明甘草酸二铵与盐酸氨溴索各自的优缺点,还需进一步地研究。

(本文图 1 见封三)

参考文献

[1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组.慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2007年修订版)[J].中华内科杂志,

2007, 46(3):254-261.

- [2] FAHY JV, DICKEY BF. Airway mucus function and dysfunction [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(23):2233-2247.
- [3] RUBIN BK. Secretion properties, clearance, and therapy in airway disease[J]. *Transl Respir Med*, 2014, 2:6.
- [4] YU H, LI Q, KOLOSOV VP, et al. Interleukin-13 induces mucin 5AC production involving STAT6/SPDEF in human airway epithelial cells[J]. *Cell Commun Adhes*, 2010, 17(4/6):83-92.
- [5] 方妮,周鸿江,黎雨,等.甘草酸二铵对稳定期慢性阻塞性肺疾病患者肺功能及炎症指标的影响[J].*中国继续医学教育*, 2016, 8(8):133-134.
- [6] 王骏,李春盈,刘治坤,等.慢性阻塞性肺疾病气道黏液高分泌大鼠模型的建立[J].*心肺血管病杂志*, 2014, 33(4):592-595.
- [7] 邓秀娟,刘雨,谭光波,等.麻杏二三汤对 COPD 大鼠气道黏液高分泌 MUC5AC、MUC5B 表达的影响[J].*中国中医急症*, 2020, 29(4):592-595, 616.
- [8] 景璇,郭洁,赵小静,等.慢性阻塞性肺疾病急性加重期的中医治疗研究进展[J].*世界中医药*, 2016, 11(7):1384-1388.
- [9] 文富强,申永春.祛痰治疗在慢性阻塞性肺疾病中临床应用[J].*中华肺部疾病杂志(电子版)*, 2010, 3(4):236-238. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-6902.2010.04.003.
- [10] JARNICKI AG, SCHILTER H, LIU G, et al. The inhibitor of semicarbazide-sensitive amine oxidase, PXS-4728A, ameliorates key features of chronic obstructive pulmonary disease in a mouse model[J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(22):3161-3175.
- [11] 曾诚,方辰,张剑锋,等.百草枯诱导急性肺损伤大鼠和肝素水平变化及甘草酸二铵对其影响[J].*中国急救医学*, 2016, 36(12):1111-1115.
- [12] BLUMENTHAL JA, SMITH PJ, DURHEIM M, et al. Biobehavioral prognostic factors in chronic obstructive pulmonary disease: results from the INSPIRE- II trial[J]. *Psychosom Med*, 2016, 78(2):153-162.
- [13] 方妮,周鸿江,陈俊健.甘草酸二铵对稳定期慢性阻塞性肺疾病的临床疗效及对患者血清炎症因子和外周血 T 淋巴细胞水平的影响[J].*中国医药*, 2019, 14(9):1326-1330.
- [14] HA EV, ROGERS DF. Novel Therapies to inhibit mucus synthesis and secretion in airway hypersecretory diseases[J]. *Pharmacology*, 2016, 97(1/2):84-100.
- [15] GOUR N, WILLS-KARP M. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease[J]. *Cytokine*, 2015, 75(1):68.
- [16] ZHEN G, PARK SW, NGUYENVU LT, et al. IL-13 and epidermal growth factor receptor have critical but distinct roles in epithelial cell mucin production[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 36(2):244-253.
- [17] VALE K. Targeting the JAK-STAT pathway in the treatment of Th2-high severe asthma[J]. *Future Med Chem*, 2016, 8(4):405-419.
- [18] WILLIAMS OW, SHARAFKHANEH A, KIM V, et al. Airway mucus: from production to secretion[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 34(5):527-536.
- [19] EVANS CM, WILLIAMS OW, TUVIM MJ, et al. Mucin is produced by clara cells in the proximal airways of antigen-challenged mice[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 31(4):382-394.

(收稿日期:2020-10-26,修回日期:2020-12-31)