

基于基因芯片技术探究柴朴汤对哮喘大鼠 差异表达基因的调控

张 丹¹, 刘 鑫^{2*}, 肖琳琳¹, 张韶泽¹, 刘 巍¹, 杨苏琴¹
(南华大学附属第一医院, 1. 呼吸内科, 2. 中医科, 湖南 衡阳 421000)

摘 要: 柴朴汤治疗哮喘的作用已经得到充分验证,但其作用机理尚不明确。既往研究表明,柴朴汤主要通过改善哮喘的气道炎症发挥其药理作用。本实验通过对哮喘模型大鼠及柴朴汤干预后的哮喘模型大鼠进行基因芯片分析,探测柴朴汤对炎症基因表达的影响。结果提示,T-淋巴细胞相关蛋白(MAL)及肿瘤蛋白D52L(TPD52L)基因与哮喘的发病呈显著相关性,柴朴汤则可以通过调节这两种差异性基因的表达参与哮喘的气道炎症及气道重塑。

关键词: 哮喘; 柴朴汤; T-淋巴细胞相关蛋白; 肿瘤蛋白D52L; 基因芯片

中图分类号:R562.25 文献标识码:A

To study the effect of Chaipu decoction on differentially expressed genes in asthmatic rats by gene chip

ZHANG Dan¹, LIU Xin^{2*}, XIAO Linlin¹, ZHANG Shaoze¹, LIU Wei¹, YANG Suqing¹
(1. Department of Respiratory Medicine, 2. Department of Chinese Medicine, the First Affiliated
Hospital of University of South China, Hengyang 421000, Hunan, China)

Abstract: Chaipu decoction can be used to treat asthma, but its mechanism of action is still unclear. Previous studies have shown that Chaipu decoction can improve airway inflammation in asthma, and this paper researches how it participates in inflammatory changes. In this study, the effects of Chaipu decoction on asthmatic rats were investigated by gene chip analysis of asthma model rats and asthmatic model rats after intervention with Chaipu decoction. The results showed that the expression of T-lymphocyte-associated protein (MAL) and tumor protein D52L (TPD52L) was significantly changed after Chaipu decoction ($P < 0.05$). Chaipu decoction may be involved in airway inflammation and airway remodeling in asthma by regulating the expression of these two differential genes.

Key words: asthma; chaipu decoction; MAL; TPD52L; gene chip

支气管哮喘(Bronchial Asthma)是由多种原因共同作用引起的常见病,主要受到遗传因素和环境因素的共同影响,一直是呼吸道疾病研究的热点,但其发生发展的生物学机制及调节机制仍未明确^[1]。传统中药治疗哮喘有多种方法,其作用温和且副作用少,不仅可控制哮喘的急性发作,对于患者的远期愈后也具有十分重大的意义。柴朴汤作为治疗哮喘的常用方剂,其疗效已经得到临床验

证,但其控制哮喘发作的机制尚不明确。基于此,本研究以哮喘大鼠为实验对象,采用基因芯片技术,在基因水平探究柴朴汤控制哮喘大鼠急性发作及后期修复的作用机制,为柴朴汤的临床用药,提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康 SPF 级 SD 大鼠 18 只,雄性,体重(200±20)g,南华大学动物实验部提供。

1.1.2 药物和试剂 卵蛋白(OVA)购自美国 Sigma 公司(Ⅱ级);中药配方颗粒购自广东一方制

收稿日期:2018-10-11;修回日期:2018-12-11

基金项目:国家自然科学基金资助项目(NO.81873282);湖南省中医药管理局资助项目(NO.2015106)。

* 通信作者, E-mail: 765779560@qq.com.

药有限公司;Trizol、琼脂糖、EB、TBE 购自 Invitrogen 公司;dNTP、RNase Inhibitor、M-MLV 购自 Takara 公司;RNA 提取试剂盒购自东盛生物技术股份有限公司;PCR 引物购自江苏联川生物技术有限公司;Phalanx Rat OneArray 基因芯片购自台湾华联生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及造模 18 只健康 SD 大鼠适应性喂养 2 周后,按随机数字表法分 3 组,即正常组、哮喘组及柴朴汤干预哮喘组,每组 6 只。哮喘造模于第 1 天与第 8 天,腹腔注射 1 mg 卵蛋白加 100 mg 氢氧化铝配成 1 mL 生理盐水混悬液,第 15 天开始,以 1% 卵蛋白雾化吸入,隔天 1 次,连续 7 次,每次持续 30 分钟。柴朴汤干预哮喘组每次雾化前半小时予以柴朴汤 2 mL 灌胃;哮喘组予以生理盐水 2 mL 灌胃;正常组给予生理盐水 1 mL 致敏、雾化,2 mL 生理盐水灌胃作为对照。

1.2.2 肺泡灌洗液炎症相关细胞计数 取左侧肺组织行嗜酸性粒细胞 (Eosinophils, EOS) 和白细胞 (White blood cell, WBC) 计数,以生理盐水行肺泡灌洗,收集灌洗液离心 (2000 r/min 离心 20min),回收细胞,油镜下计数瑞氏染色后细胞的数量。

1.2.3 HE 染色 造模成功后,采用腹主动脉放血法处死大鼠,取大鼠肺组织,以 10% 的甲醛溶液固定,行 HE 染色,光镜下分析肺组织的病理变化。

1.2.4 基因芯片试验及分析 肺组织 RNA 提取后,基因表达分析使用 Phalanx Rat One Array 基因芯片,用激光共聚焦扫描仪对杂交后的芯片进行扫描,同时扣除背景杂交信号值,每组样品均需行重复实验。

1.2.5 荧光定量 PCR 检测 使用 Real-Time PCR 检测肺组织 MAL 及 TPD52 的表达,待反应结束后

收集所有反应体系中目的基因的初始表达量。将每组目的基因的 CT 值,与标准曲线对应的 CT 值对照,得到 MAL 基因及 TPD52L 基因的相对表达量。

1.2.6 统计学分析 用 SPSS 13.0 软件进行统计学数据分析,实验分析后的数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,各组间两两比较使用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 柴朴汤对肺泡灌洗液中 EOS 及 WBC 数量的影响

与正常组对照,哮喘组中 EOS 及 WBC 的数目增多;与哮喘组对比,柴朴汤干预组中上述炎性细胞数目均显著降低 (见表 1)。

表 1 各组 BALF 中嗜酸性粒细胞及白细胞数量

组别	EOS	WBC
正常组	1.52±0.31	1.69±0.34
哮喘组	248.38±13.77 ^a	8.09±0.70 ^a
柴朴汤干预组	76.01±8.40 ^{ab}	6.01±0.68 ^{ab}

与正常组比较,^a $P < 0.05$;与哮喘组比较,^b $P < 0.05$ ($n = 6$)

2.2 柴朴汤对哮喘大鼠肺组织病理改变的影响

肺组织 HE 染色后可见:正常组肺泡壁结构完整,管壁无增厚,管腔未见狭窄,周围仅少量炎性细胞浸润;哮喘组可见管壁增厚明显,管腔狭窄,可见大量炎性细胞浸润;柴朴汤干预后,管壁增厚不如哮喘组明显,炎性细胞的浸润也明显下降 (见图 1)。

2.3 基因芯片杂交结果

芯片扫描后显示显示信号强度均匀,基因点清晰。一个基因的表达由一个荧光亮点表示,亮度越高、数量越多,代表表达量越高 (见图 2)。

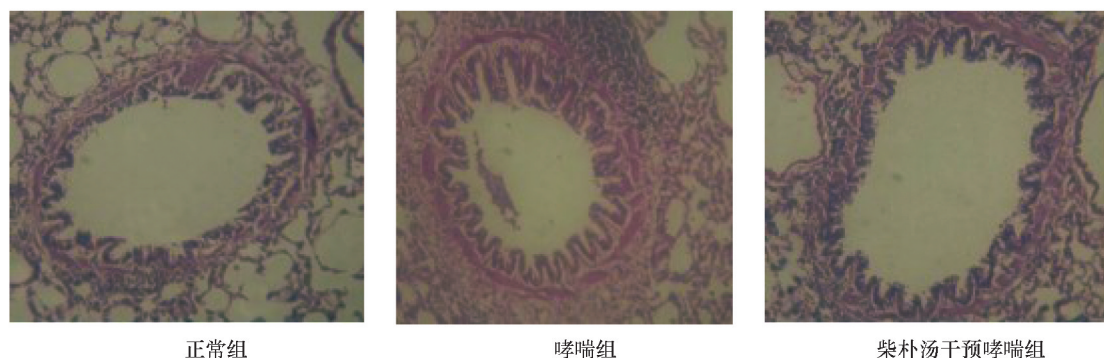


图 1 柴朴汤对哮喘大鼠肺组织的影响

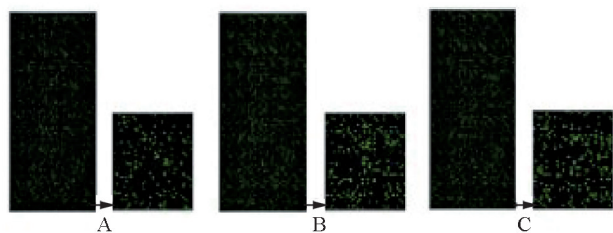


图2 基因芯片扫描图

注:A 正常组;B 哮喘组;C 柴朴汤干预哮喘组

2.4 荧光定量 PCR 分析结果

哮喘组 MAL 基因的表达显著低于正常组,在柴朴汤干预后,可见其出现上调;在哮喘组中 TPD52L1 基因表达较正常组显著升高,柴朴汤干预后,其表达发生下调(见表2)。

表2 各组差异表达基因的荧光定量 PCR 结果
与基因芯片结果对比

基因	组别	$\Delta\Delta CT$	荧光定量 RT-PCR 倍数变化 (Fold Change)	基因芯片结 果倍数 log2 (Ratio)
MAL	B vs A	-3.14	8.08	-2.084693
	C vs B	1.44	2.71	2.011575
TPD52L1	B vs A	1.08	2.51	1.887544
	C vs B	-1.42	2.68	-2.545991

A: 正常组;B: 哮喘组;C: 柴朴汤干预哮喘组(n=6)

3 讨 论

本课题组前期通过基因芯片技术,筛选出与哮喘致病密切相关的 MAL 及 TPD52L1 基因,从整体分子学水平研究哮喘发病的病因及可能的病理生理机制^[2]。

MAL 为 T-淋巴细胞相关蛋白,是一种主要表达于细胞表面的顶端膜蛋白,可参与上皮细胞的分泌与吸收^[3]。同时,也有研究发现 Mal 可作为囊泡形成与运输相关蛋白,调节顶端膜物质的转运和分泌,通过维持上皮细胞极性,调节多种疾病的发病过程,其分布状态的改变及表达量的下调,可影响正常细胞极性,介导细胞的炎症反应^[4-5]。本课题组在前期哮喘大鼠模型中也发现,随着哮喘炎症反应的进展, MAL 基因呈明显的下调趋势。TPD52L1 是癌蛋白 52 (D52) 家族成员之一。TPD52L1 的基因扩增与病毒转染的细胞增殖及肿瘤细胞的增生都密切相关^[6]。Proux V 证实逆转录病毒转导的 TPD52L1 能够促使鸡的神经胶质上皮细胞增生,又证实了 D52 家族基因表达介导细胞的增生^[7-8],结合前期基因芯片技术发现 TPD52L1 在肺组织中的表达随着哮喘病程的进展逐渐上调,据

此推测 TPD52L1 通过参与上皮细胞的增生,影响哮喘疾病的进展。

气道炎症及气道重塑是组成哮喘病理变化的两大基石,但目前其治疗仍是以抑制炎症的糖皮质激素为主,这对改善患者的气道重塑效果差且副作用多,所以急需寻找一种既无明显副作用又可以长期应用,同时拥有良好平喘作用的药物。柴朴汤是针对哮喘病理机制而设的方剂,该方可显著的抑制疾病变态反应并有镇咳、镇静、解痉、抗炎、祛痰、和增强非特异性抗感染免疫功能的作用^[9-10]。作为治疗哮喘的常用方剂,柴朴汤治疗哮喘的临床疗效已经得到充分证实^[11]。本研究通过基因芯片及实时定量 PCR 结果分析,发现柴朴汤可上调 MAL 基因及抑制 TPD52L1 基因在肺组织中的表达,减轻哮喘气道炎症及重塑的程度,结合本实验结果及相关文献,笔者推测柴朴汤可能通过影响 MAL 及 TPD52L1 在肺组织气道上皮细胞中的表达,维持气道上皮组织功能,阻断上皮组织细胞增殖,进而抑制哮喘气道炎症及重塑的进程。

参考文献:

- [1] 傅相均,唐寅,许洁. 黔北 300 例哮喘患者的室内危险因素影响研究[J]. 重庆医学,2018,47(26):3340-4.
- [2] 刘鑫,熊花,刘斌,等. 基因芯片技术筛选哮喘大鼠差异表达基因的研究[J]. 中国现代医学杂志,2013,23(10):10-5.
- [3] KAMSTEEG EJ, DUFFIELD AS, KONINGS IB, et al. MAL decreases the internalization of the aquaporin-2 water channel [J]. PNAS, 2007,104(42):16696-701.
- [4] HORNE HN, LEE PS, MURPHY SK, et al. Inactivation of the MAL gene in breast cancer is a common event that predicts benefit from adjuvant chemotherapy[J]. Mol Cancer Res, 2009, 7(2):199-209.
- [5] KURASHIGE J, SAWADA G, TAKAHASHI Y, et al. Suppression of MAL gene expression in gastric cancer correlates with metastasis and mortality[J]. Fukuoka Igaku Zasshi 2013,104:344-9.
- [6] ZHU VW, UPADHYAY D, SCHROCK AB, et al. TPD52L1-ROS1, a new ROS1 fusion variant in lung adenosquamous cell carcinoma identified by comprehensive genomic profiling [J]. Lung Cancer, 2016,97:48-50.
- [7] PROUX V, PROVOT S, MARX M, et al. Characterization of a leucine zipper-containing protein identified by retroviral insertion in avian neuroretina cells[J]. J Biol Chem, 1996,271(48):30790-7.
- [8] PEKOW J, DOUGHERTY U, HUANG Y, et al. Gene signature distinguishes patients with chronic ulcerative colitis harboring remote neoplastic lesions[J]. Inflamm Bowel Dis 2013,19:461-70.
- [9] 张立山,周绍忠,张顺利,等. 柴朴汤治疗 191 例慢性咳嗽临床研究[J]. 中国中医药信息杂志,2017,24(4):29-31.
- [10] 张立山,陈英,张筱雯,等. 柴朴汤与其减味方治疗咳嗽的对比研究[J]. 中国中医药现代远程教育,2016,14(16):72-4.
- [11] 邹渭红,刘鑫. 柴朴平喘干糖浆的制备及疗效观察[J]. 中药材,2001,20(5):390.

(本文编辑:秦旭平)