

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.22.017

寒喘舒对哮喘相关基因的影响

张丽玲¹, 张丽萍², 刘志勇^{3*}

(1. 中国人民解放军第四五四医院, 江苏省南京市马路街 1 号, 210002; 2. 江西省职业病防治研究院; 3. 江西中医药大学)

摘要 目的 观察寒喘舒治疗前后哮喘患者相关基因的变化, 探讨其治疗哮喘的作用机制。方法 从用寒喘舒治疗的寒哮证 200 例患者中随机选择 3 例, 治疗前后抽取静脉血分离提取 RNA 进行 RT² Profiler PCR Array 实验, 寻找差异基因, 并对其治疗前后的变化进行比较。结果 治疗后共检测到 4 个基因上调, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。下调的 1 个基因变化达到显著差异 ($P < 0.01$), 但未达到 3 倍; 下调基因变化达到 3 倍以上并达到显著差异的有 ADAM33、IL4、LTB4 和 RNASE3 4 个基因。结论 寒喘舒能改变部分哮喘相关基因, 可能是通过影响基因的变化来治疗哮喘。

关键词 哮喘; 寒喘舒; 基因

哮喘是常见的呼吸道疾病之一, 严重威胁患者的健康和生命。中医学将哮喘分为寒哮和热哮。寒哮发作期病因病机多为寒痰伏肺, 遇感引发, 肺气郁闭, 壅塞气道, 而发寒哮。我们根据多年的临床经验, 以温肺祛痰、平喘止咳法, 研制了寒喘舒, 经临床近 20 年的观察, 疗效确切^[1-4]。有文献曾报道超过 180 个与小儿哮喘相关的基因^[5]。我们利用 RT² Profiler PCR Array 方法研究经寒喘舒治疗前后哮喘相关 84 个基因的变化, 报告如下。

1 材料与方法

1.1 临床资料

从 200 例在中国人民解放军第四五四医院用寒喘舒治疗的寒哮患者中用抽签法随机选择 3 例作为本项目的研究对象。3 例患者中男 1 例, 女 2 例; 年龄 21~36 岁, 年龄 (28.1 ± 7.9) 岁; 病程 3~20 年, 平均 (12.3 ± 8.7) 年。给予寒喘舒冲剂 (中国人民解放军第四五四医院中药制剂室生产, 非标准制剂批准文号: FP54022, 主要组成药物: 炙麻黄 3 g, 干姜 3 g, 紫苑 10 g, 细辛 3 g, 法半夏 10 g, 旋覆花 10 g, 赭石 10 g 等), 每次 10 g, 每日 2 次, 治疗 3 周。治疗后 3 个病例气喘、咯痰、胸闷、怕冷症状消失。

1.2 试剂、材料与仪器

PAXgene[®] Blood RNA Kit (德国 Qiagen 公司, 批号 20131121), RNeasy Mini Kit (德国 Qiagen 公司, 批号 20131029), RT² First Strand Kit (德国 Qiagen 公司, 批号 20131123), RT² SYBR Green ROX[™] qPCR Mastermix (德国 Qiagen 公司, 批号 20131220), 96-孔盘 (含冻干粉状态的引物, 德国 Qiagen 公司), 透光粘合膜 (德国 Qiagen 公司), 实时定量 PCR 仪 (7000S, 美国 ABI 公司), 紫外分光光度计 (UV-2401PC, 日本岛津公司)。

1.3 哮喘相关基因检测

治疗前后抽取患者静脉血 5 ml, -80°C 冷冻保存。本研究中选择 7 个功能基因组的 76 个基因和 8 个哮喘密切相关基因共 84 个基因进行检测。7 个功能基因组为 Th2 细胞因子相关基因 33 个: AR-EG, CCL11 (Eotaxin), CCL17 (TARC), CCL2 (MCP-1), CCL22 (MDC), CCL24 (Eotaxin-2), CCL26 (Eotaxin-3), CCL5 (RANTES), CCL8 (MCP-2), CLC, CSF2 (GM-CSF), GPR44 (CRTH2), ICOS, IFNG, IL10, IL12A, IL12B, IL13, IL17A, IL18, IL21, IL25 (IL17E), IL3, IL31, IL33, IL4, IL5, IL9, PDCD1, PMCH, TGFB1, TNFSF4 (OX40L), TSLP。细胞因子和趋化因子受体相关基因 16 个: CCR3, CCR4, CCR8, CD40LG (TNFSF5), CRLF2 (TSLPR), CSF3R (GM-CSFR), IFNGR2, IL13RA1, IL13RA2,

基金项目: 军区医药卫生科研基金 (11MB014), 江西省卫生厅中医重大项目 (2014Z007)

* 通讯作者: liuzhiyong0791@163.com

IL17RB, IL1RL1 (ST2), IL2RA (CD25), IL3RA, IL4R (CD124), IL5RA (CD125), TNFRSF4 (OX40)。转录因子 10 个: BCL6, FOXP3, GATA3, MAF, PPARC, RORC, SATB1, STAT5A, STAT6, TBX21。肥大细胞和 IgE 相关基因 7 个: CMA1, CPA3, FCER1A, KIT (CD117), KITLG, MS4A2, TPSAB1。噬酸性粒细胞相关基因 5 个: EPX, PRG2, RNASE2, RNASE3, SIGLEC8。自然杀伤细胞相关因子 7 个: IFNG, IL12A, IL12B, IL13, IL18, IL21, IL33。替代性活化的巨噬细胞 5 个: ARG1, CHI3L1, CHIA, MRC1, RETNLB, 共计 76 个基因; 剩余 8 个为哮喘密切相关的基因: ADAM33, ADRB2, ALOX5, CLCA1, CYSLTR1, LTB4R, MMP9 (Gelatinase B), POSTN。

用 PAXgene® Blood RNA Kit 从全血样品中提取总 RNA, 进一步用 RNeasy Mini Kit 进行纯化, 按试剂盒说明操作。用紫外分光光度计通过吸光度来测定 RNA 的浓度和纯度比, 用于测吸光度的 RNA 稀释在 10mM Tris-HCl, pH8.0 溶液中。

解冻 RT² First Strand Kit。用瞬时离心 (10 ~ 15 s) 使管中的试剂沉至管底, 按 25 ng ~ 5 μg RNA 加入 2 μl 反应液 GE, 最后加入无 RNA 酶纯净水至 10 μl, 用加样枪进行上下轻微混匀, 瞬时离心, 按下面方法进行每个 RNA 样品的基因组 DNA 去除反应。

基因组 DNA 去除反应在 42℃ 保温 5 min, 接着放在冰上至少 1 min, 按要求准备逆转录反应混合物。在每管 10 μl 基因组 DNA 去除反应物中加 10 μl 逆转录反应混合物。用加样枪进行上下轻微混匀。保持在 42℃ 15 min, 立即放在 95℃ 保持 5 min 中断反应。每个反应中加 91 μl RNase-free 水并用加样枪进行上下混匀数次。

将 cDNA 与 RT² SYBR Green ROX™ qPCR MasterMix 混合, 再将混合物准确加入 96-孔盘中, 包括 84 个通路/疾病/功能相关基因和 5 个稳定表达的基因的 PCR 检测引物、1 个基因组 DNA 污染质控、3 个逆转录质控及 3 个 PCR 反应质控。

进行实时定量 PCR 检测, 结果采用相对定量法 ($2^{-\Delta\Delta CT}$ 法) 表示。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 16.1 统计软件进行分析, 数据分析采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 差异基因表达

本研究患者基因变化见散点图 (图 1) 和火山图 (图 2), 该可视化图用于评估两个样本的基因表达的变异, 两组散点分布图和火山图提示, 大部分基因位于回归线内, 表明哮喘患者与正常人 (回归线内为正常人基因表达) 大部分基因表达接近, 少部分基因表达存在差异。

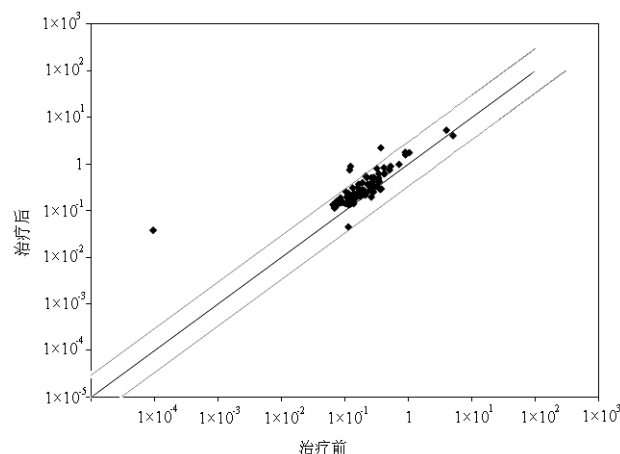


图 1 哮喘舒治疗前后哮喘患者基因变化散点图

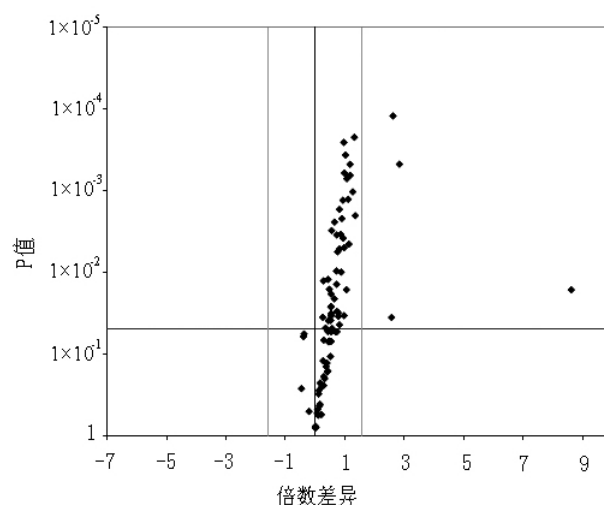


图 2 哮喘舒治疗前后哮喘患者基因变化火山图

2.2 哮喘患者治疗前后下调基因表达比较

本实验检测的哮喘相关基因表达多数在 1 的水平, 即多数基因是正常水平, 本次条件下共检测到大多数基因下调, 但下调达到 3 倍以上的有 ADAM33、IL4、LTB4R 和 RNASE3 4 个基因 (见表 1)。其中哮喘密切相关的基因 2 个 ADAM33 和 LTB4R, 1 个与 Th2 细胞因子相关基因 IL4, 1 个基因属于噬酸性粒细胞相关基因 (RNASE3)。另有 1

个基因为 Th2 细胞因子相关基因 CCL26 (Eotaxin-3), 虽然下调达到显著差异 ($P < 0.01$), 但未达到 3 倍的变化, 生物学意义有限。治疗前后仅 4 个基因有上调, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 寒喘舒治疗前后哮喘患者下调基因表达比较 (变化 > 3 倍) ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

时间	ADAM33	IL4	LTB4R	RNASE3
治疗前	1.2×10^{-1}	9.6×10^{-5}	1.2×10^{-1}	3.7×10^{-1}
治疗后	8.8×10^{-1}	3.8×10^{-2}	7.4×10^{-1}	2.20
治疗后/ 治疗前	7.17	389.31	6.17	5.99
P 值	0.000479	0.016593	0.000123	0.036155

3 讨论

寒哮多为寒痰伏肺, 遇寒引发, 痰升气阻, 肺气郁闭而致呼吸急促, 痰鸣有声, 咳嗽咯痰。病因于寒, 阴盛于内, 阳气不能宣达, 故形寒肢冷, 舌质淡、舌苔白, 脉弦紧, 均为寒盛之象。治疗法则为温肺散寒, 祛痰平喘。寒喘舒以麻黄宣肺平喘为主药, 配干姜、细辛温肺化痰, 法半夏、紫菀祛痰止咳, 旋覆花配赭石降气化痰平喘。诸药合用, 共奏温肺散寒祛痰、降气平喘止咳之功。

寒哮涉及多种炎性细胞及炎症介质相互作用, 受遗传和环境因素的双重影响, 基因的作用越来越受到重视。本研究结果显示, 哮喘相关 84 个基因中 4 个表达差异大于 3 倍的基因分别为哮喘密切相关基因 2 个 (ADAM33 和 LTB4R), Th2 细胞因子相关基因 1 个 (IL4), 嗜酸性粒细胞相关基因 1 个 (RNASE3)。

哮喘治疗中最大的问题是气道重构, 某些特殊类型的哮喘, 现有治疗手段不能奏效, 可能与气道重构有关^[6-7], 目前还没有针对重构的有效治疗手段。多个研究表明, ADAM33 很可能介导了气道重构, 针对 ADAM33 的治疗有可能是重要靶点, ADAM33 基因有助于进一步深入理解哮喘的发生和发展过程^[8-11]。本研究结果显示, 寒喘舒能使哮喘患者 ADAM33 表达下降, 可能是通过影响该基因的表达从而改变了哮喘患者气道的建构。

LTB4R 基因表达产物为白三烯受体蛋白之一的 LTB4R 蛋白。白三烯包括白三烯 B₄ (LTB₄) 与半胱氨酰白三烯 (CYsLTs) 两组介质, LTB₄ 是体内产生的最强的白细胞趋化因子之一, 参与了体内多种免疫和炎症的发生发展过程^[12]。王凌云等^[13]研究发现, 支气管哮喘及咳嗽变异型哮喘组患者的

血清 LTB₄ 较健康对照组水平显著升高, 显示出 LTB₄ 与哮喘有显著关联。本研究结果显示, 寒喘舒能使哮喘患者 LTB4R 基因表达下降, 则 LTB4R 蛋白减少, 白三烯缺少与之结合的受体, 因而作用减弱, 使哮喘减轻。

IL4 基因编码产生白细胞介素 4 (IL-4), IL4 基因与哮喘患者体内 IL-4 水平呈相关性^[14]。IL-4 也是肥大细胞生长因子, 能增强 B 细胞对 T 细胞的抗原递呈作用, 促进体液免疫应答, 特别是促进 IgE 介导的免疫反应^[15]。本研究结果显示, 寒喘舒能使哮喘患者 IL4 基因表达显著下降, 从而使 IL-4 产生减少, IgE 下降, 减轻免疫反应, 使哮喘好转。

RNASE3 (核糖核酸酶、核糖核酸酶家族 3) 是一个蛋白编码基因, 编码嗜酸性粒细胞阳离子蛋白 (ECP), 嗜酸性粒细胞脱颗粒时释放, 在机体感染和哮喘时 ECP 有所增高^[16-17]。目前认为与 RNASE3 相关疾病以支气管炎和食物过敏为多见, 是过敏性疾病的候选基因^[18]。本研究结果显示, 寒喘舒能使哮喘患者 RNASE3 基因表达显著下降, 使 ECP 减少, 缓解哮喘。

本研究结果显示, 寒喘舒可抑制哮喘患者 ADAM33、IL-4、LTB4R、RNASE3 水平, 使与这些基因相关的白细胞趋化因子也下降, 提示寒喘舒可能是通过影响基因的变化起到平喘止咳作用, 使寒痰消除, 气道畅通, 从而控制哮喘症状。由于经费所限, 本研究仅进行了 3 例患者的基因分析, 结果还需要扩大样本量进行深入研究。

参考文献

- [1] 张丽玲, 许楠, 郭超, 等. 寒喘舒片对免疫功能的实验研究 [J]. 南昌大学学报(医学版), 2011, 51(6): 21-22, 27.
- [2] 张丽玲, 孙剑秋, 李银珍, 等. 寒喘舒片治疗“慢支”200 例 [J]. 江苏中医, 1991(6): 15-16.
- [3] 张丽玲, 方泰惠, 梁秉文, 等. 寒喘舒片治疗寒喘证的研究 [J]. 中国医药学报, 1996, 11(4): 42.
- [4] 张丽玲, 梁卫, 方泰惠, 等. 寒喘舒治疗寒哮证的研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(7): 547-548.
- [5] Gu ML, Dong XQ, Zhao J. New insight into the genes susceptible to asthma [J]. J Asthma, 2010, 47(2): 113-116.
- [6] Liang S, Wei X, Gong C, et al. A disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) gene polymorphisms and the risk of asthma: a meta-analysis [J]. Hum Immunol, 2013, 74(5): 648-657.
- [7] Xue W, Han W, Zhou ZS. ADAM33 polymorphisms are associated with asthma and a distinctive palm dermatoglyphic pattern [J]. Mol Med Rep, 2013, 8(6): 1795-

1800.

- [8] 桑珂,胡昕,王琼,等. ADAM33 基因 S2 位点多态性与新疆维吾尔族人群哮喘的相关性研究 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2013, 12(5) : 442-445.
- [9] 李宏彬,赵兵,席景砖. ADAM33 基因 S2 位点多态性与支气管哮喘易感性关系的 Meta 分析 [J]. 现代预防医学, 2014, 41(5) : 773-776.
- [10] 凌昊,赵霞. ADAM33 与哮喘关系的研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(12) : 2610-2611.
- [11] Tripathi P, Awasthi S, Husain N, et al. Increased expression of ADAM33 protein in asthmatic patients as compared to non-asthmatic controls [J]. Indian J Med Res, 2013, 137(3) : 507-514.
- [12] Gabrijelcic J, Acua A, Profita M, et al. Neutrophil airway influx by platelet-activating factor in asthma: role of adhesion molecules and LTB4 expression [J]. Eur Respir J, 2003, 22(2) : 290-297.
- [13] 王凌云,周影娜,闻心培. 血清 LTB4 及支气管激发试验在咳嗽变异性哮喘中的临床研究 [J]. 贵州医药, 2008, 32(3) : 213-215.
- [14] Gervaziev YV, Kaznacheev VA, Gervazieva VB, et al. Al-

lelic polymorphisms in the interleukin-4 promoter region—sand their association with bronchial asthma among the Russian population [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2006, 141(3) : 257-264.

- [15] Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma [J]. Thorax, 1999, 54(9) : 825-875.
- [16] Boix E, Carreras E, Nikolovski Z, et al. Identification and characterization of human eosinophil cationic protein by an epitope-specific antibody [J]. J Leukoc Biol, 2001, 69(6) : 1027-1035.
- [17] Mastrianni DM, Eddy RL, Rosenberg HF, et al. Localization of the human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase) gene (CLC) to chromosome 19 and the human ribonuclease 2 (eosinophil-derived neurotoxin) and ribonuclease 3 (eosinophil cationic protein) genes (RNS2 and RNS3) to chromosome 14 [J]. Genomics, 1992, 13(1) : 240-242.
- [18] Kang I, An XH, Oh YK, et al. Identification of polymorphisms in the RNase3 gene and the association with allergic rhinitis [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2010, 267(3) : 391-395.

Impact of *Hanchuan Shu* (寒喘舒) on Asthma-Related Genes

ZHANG Liling¹, ZHANG Liping², LIU Zhiyong³

(1. The 454th Hospital of People's Liberation Army, Nanjing, Jiangsu Province 210002; 2. Institute of Occupational Medicine of Jiangxi; 3. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the changes of asthma related genes in patients before and after treatment with *Hanchuan Shu*. **Methods** Three cases were randomly selected from 200 cases of cold asthma syndrome patients cured by *Hanchuan Shu*. Venous blood samples were collected, RNA was isolated and extracted to do RT2 Profiler PCR Array test before and after treatment. Different genes were looked for and changes before and after treatment were compared. **Results** Four up-regulated genes were found after treatment, but there was not significant difference in changes between before and after treatment ($P > 0.05$). There was significant difference in the change of a down-regulated gene between before and after treatment ($P < 0.01$), but the change was less than 3 times. The changes of 4 down-regulated genes were more than 3 times and the difference was significant. These four genes were ADAM33, IL4, LTB4 and RNASE3. **Conclusion** *Hanchuan Shu* could change part of genes related to asthma. It might treat asthma by regulating genes changes.

Keywords asthma; *Hanchuan Shu*; gene

(收稿日期: 2015-05-11; 修回日期: 2015-07-13)

编辑: 王利芬

欢迎邮购《中医杂志》

2000 年合订本 85 元, 2001 年合订本 95 元, 2002 年合订本 105 元, 2003 年合订本 105 元, 2004 年合订本 115 元, 2005 年合订本 125 元, 2007-2010 年合订本每年 140 元。2011 (缺 5、6 期) -2013 年每册 9.80 元, 2011-2013 年合订本 (每年 4 本), 每年 280 元, 2014 年合订本 (共 4 本) 400 元。《中医杂志》2006-2008 年增刊每册 40 元。以上免费邮寄, 如需挂号每件另加 3 元。

欲购者请汇款至北京东直门内南小街 16 号中医杂志社读者服务部, 邮编: 100700, 电话: (010) 64089195

欢迎邮购《中医杂志》光盘合订本

1951-1986 年 (4 张光盘) 480 元; 1987-1994 年 (1 张光盘) 260 元; 1995-2004 年 (1 张光盘) 280 元; 2005-2013 年 (1 张光盘) 300 元。

光盘合订本为计算机用数据光盘, 收入了同期出版的全部《中医杂志》的内容, 可对所有文章进行任意字检索, 方便实用。

汇款地址: 北京东直门内南小街 16 号中医杂志社北京医海林音像书店, 邮政编码: 100700

电话: (010) 64035632; 网址: <http://www.jtcm.net.cn>