

雷公藤红素对肥胖型哮喘气道高反应的影响

曾泽宇 孔璐丹 张维溪 崇 蕾 李昌崇

摘要 目的 探讨雷公藤红素(celastrol)对肥胖型哮喘小鼠气道高反应的影响。**方法** 雄性C57BL/6小鼠30只,随机分为正常对照组、哮喘组、肥胖组、肥胖型哮喘组和雷公藤红素干预的肥胖型哮喘组(简称干预组)共5组。肥胖型哮喘组和干预组予以高脂饲料(HFD)喂养16周,于第13周起第1天和第13天腹腔注射卵清蛋白/氢氧化铝[OVA/AL(OH)₃]致敏,第25~31天连续7天雾化吸入OVA激发,干预组在每次雾化吸入前30min口服celastrol(10mg/kg)。哮喘组进行普通饲料喂养+OVA致敏激发。肥胖组进行高脂饲料喂养+生理盐水致敏激发。正常组进行普通饲料喂养+生理盐水致敏激发。运用小鼠肺功能仪检测小鼠气道高反应性(AHR)的指标呼吸气道阻力(Rn),进行相关分析。**结果** 哮喘组和肥胖组Rn值显著高于正常对照组,肥胖型哮喘组Rn值高于其余各组,干预组Rn显著低于哮喘组和肥胖型哮喘组(P 均<0.01),而干预组Rn与正常组比较,差异无统计学意义(P >0.05)。经乙酰胆碱激发后,哮喘组和肥胖组小鼠Rn值上升幅度显著高于正常对照组(P <0.01),肥胖型哮喘组Rn值上升幅度高于其余各组,干预组小鼠较哮喘组、肥胖组和肥胖型哮喘组小鼠比较,Rn值上升幅度显著降低(P 均<0.01);而干预组小鼠Rn值的上升幅度与正常对照组比较,差异无统计学意义(P >0.05)。**结论** 雷公藤红素显著减轻肥胖型哮喘小鼠呼吸气道阻力,改善了其AHR。

关键词 雷公藤红素 肥胖型哮喘 小鼠 气道高反应性

中图分类号 R72

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.04.008

Effect of Celastrol on Airway Hyperresponsiveness in Obese Asthma Mice. Zeng Zeyu, Kong Ludan, Zhang Weixi, et al. Department of Pediatric Pulmonology, The Second Affiliated Hospital & Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To study the effect of celastrol use on the airway hyperresponsiveness of obese asthma mice. **Methods** Thirty male C57BL/6 mice were randomly allocated to 5 groups. Mice in obese asthma group and celastrol group were fed with a high fat diet (HFD) for 16 weeks. On days 1 and 13 from the week 13, mice in the two groups were intraperitoneal injected with ovalbumin for a mouse asthma model, then the mice were nebulized with ovalbumin for 7 consecutive days from day 25 to 31. Mice in celastrol group were gavaged celastrol 10mg/kg 30min before being exposed to aerosolized ovalbumin. Mice in asthma group were fed with a normal diet, sensitized and challenged by OVA. Mice in obesity group were fed with HFD, sensitized and challenged by NS. Mice in normal weight group, as a control, were fed with a normal diet, sensitized and challenged by NS. Mouse spirometer was used to detect airway responsiveness. **Results** The resistance of airway (Rn) in obese group and asthma group were significantly higher than normal weight group. Obese asthma group was the highest, and celastrol group was significantly lower than asthma group and obese asthma group (all P <0.01). There were no differences between celastrol group and normal weight group (P >0.05). With the challenge of methacholine, Rn was growing rapidly in asthma group, obese group and obese asthma group, significantly faster than normal weight group and celastrol group (all P <0.01). There were no differences between celastrol group and normal weight group (P >0.05). **Conclusion** These results suggest that oral administration of celastrol alleviated airway hyperresponsiveness, may be used as a therapeutic agent for obese asthma.

Key words Celastrol; Obese asthma; Mouse; Airway hyperresponsiveness

气道高反应性(airway hyperresponsiveness,AHR)是支气管哮喘(简称哮喘)的重要特征之一,而肥胖

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81100015);浙江省自然科学基金资助项目(LY15H010006);浙江省科技厅基金资助项目(2016C33182)

作者单位:325027 温州医科大学附属第二医院、育英儿童医院儿童呼吸科

通讯作者:张维溪,电子信箱:zhangweixi112@163.com

型哮喘与单纯肥胖及哮喘相比,表现出更严重的AHR^[1]。肥胖型哮喘作为一种激素抵抗型哮喘,其对于典型哮喘的激素治疗反应较差,故其在治疗方面还存在许多问题和挑战^[2]。有研究表明雷公藤红素(celastrol)对哮喘过敏性气道炎症具有改善作用,但其对于肥胖型哮喘的作用尚未阐明^[3,4]。为初步探讨雷公藤红素对肥胖型哮喘AHR的影响,本研究应用小鼠肺功能仪,检测经雷公藤红素干预的小鼠

AHR 指标呼吸气道阻力 (Rn), 分析小鼠呼吸气道反应性, 探讨雷公藤红素对肥胖型哮喘小鼠 AHR 的影响, 现报道如下。

材料与方法

1. 动物: C57BL/6 小鼠来自上海斯莱克公司, 选购标准: 3~4 周龄、体重 15~20g、雄性, 飼养在温州医科大学实验动物中心, SPF 级, 共 30 只。实验动物许可证号: SYXK(浙)2015-0009。

2. 主要试剂及仪器: 雷公藤红素(上海博蕴生物科技有限公司), 卵清蛋白(ovalbumin, OVA, 美国 Sigma 公司), DMSO(上海博蕴生物科技有限公司), 45% 高脂饲料(江苏美迪森生物医药有限公司), 喷射式雾化器(NO38 型 PARI BOY, 德国百瑞公司), 小鼠肺功能仪(美国 FlexiVent 公司)。

3. 主要方法:(1) 实验动物分组: 将小鼠随机分成 5 组: 正常对照组(A 组)、哮喘组(B 组)、肥胖组(C 组)、肥胖型哮喘组(D 组)、雷公藤红素干预的肥胖哮喘组(E 组), 每组 6 只。适应性喂养 1 周后, A 组予以普通饲料喂养。C 组、D 组和 E 组小鼠予以 45% 高脂饲料喂养 16 周。从第 13 周起的第 1 天和第 13 天, B 组、D 组和 E 组小鼠通过腹腔注射 0.01% OVA/AI(OH)₃, 混合液 [OVA 0.01mg, AI(OH)₃ 20mg] 0.1ml 致敏, A 组和 C 组以生理盐水替代。第 25 天起连续 7 天, B 组、D 组和 E 组小鼠每天以 1% OVA 生理盐水溶进行雾化吸入激发 30min, 雾化期间将小鼠放置在密闭透明的容器内。A 组和 C 组同样以生理盐水雾化吸入替代 1% OVA 生理盐水溶液。E 组小鼠在雾化吸入前 30min, 予以雷公藤红素 10mg/kg 灌胃口服。(2) 体重监测: 小鼠适应性喂养 1 周后称体重, 以后每 2 周称 1 次体重, 雾化激发期间每天称 1 次体重, 肥胖标准: 体重超过正常组体重的 20%。(3) 肺功能检测: 最后一次雾化激发后 48h 内, 1% 戊巴比妥麻醉小鼠, 至小鼠完全没有自主呼

吸, 小鼠取仰卧位, 充分暴露颈部区域, 蚊式钳和眼科剪小心游离气管。将一根手术缝线从气管下穿过, 用眼科剪小心横向剪开气管, 用 12G 气管插管针做气管插管, 固定针头, 并连接小鼠肺功能仪间歇正压通气, 设定潮气量 0.2ml, 呼吸频率 150 次/分, PEEP 2ml H₂O。待呼吸稳定后, 记录呼吸气道阻力(Rn), 即基线值。换成药物雾化激发装置, 乙酰甲胆碱给药浓度依次为 3.125、6.25、12.5、25、50mg/ml, 每次给药后, 间隔固定时间 3min, 记录呼吸气道阻力(Rn), 计算各个浓度与基线值的百分比。

4. 统计学方法: 运用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析, 所有计量数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。先进行正态检验和方差齐性检验, 同一指标各组间比较采用单因素方差分析, 两两比较方差齐者采用 LSD 检验, 方差不齐者采用 Dunnett' T3 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组小鼠体重比较: 各组小鼠在实验开始前体重差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在肥胖建模完成时, C 组、D 组和 E 组体重分别增长至 $41.125 \pm 1.417\text{g}$ 、 $41.330 \pm 2.834\text{g}$ 和 $41.300 \pm 1.958\text{g}$, 均超过正常组体重 ($27.900 \pm 1.027\text{g}$) 的 20%, 达到肥胖标准, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.01), 而 C 组、D 组和 E 组小鼠之间体重差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。E 组予雷公藤红素 10mg/kg 连续灌口服 7 天后, 体重降至 $31.260 \pm 1.620\text{g}$, 此时 A 组、C 组和 D 组分别为 $27.560 \pm 0.915\text{g}$ 、 $40.973 \pm 1.632\text{g}$ 和 $40.090 \pm 3.051\text{g}$, E 组与 D 组、C 组小鼠体重差异有统计学意义 (P 均 < 0.01 , 图 1、图 2)。

2. 各组小鼠气道高反应性 (AHR): 哮喘组和肥胖组气道总阻力 Rn(分别为 0.546 ± 0.079 和 0.448 ± 0.007) 较正常对照组 (0.350 ± 0.004) 比较均显著增高, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.05); 肥胖型哮喘组

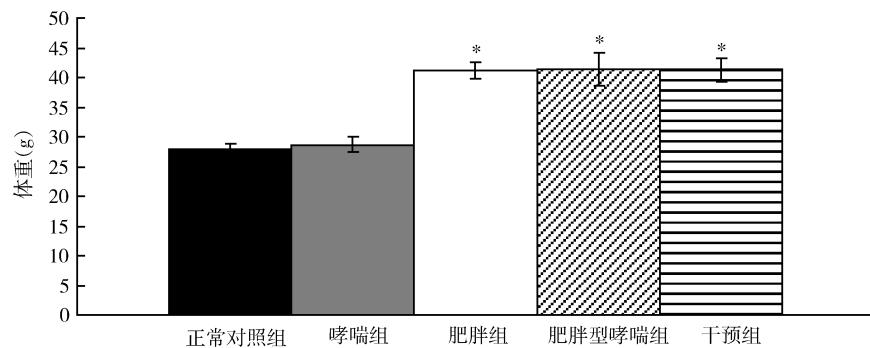


图 1 给药前各组小鼠体重的比较

与正常对照组比较, * $P < 0.01$

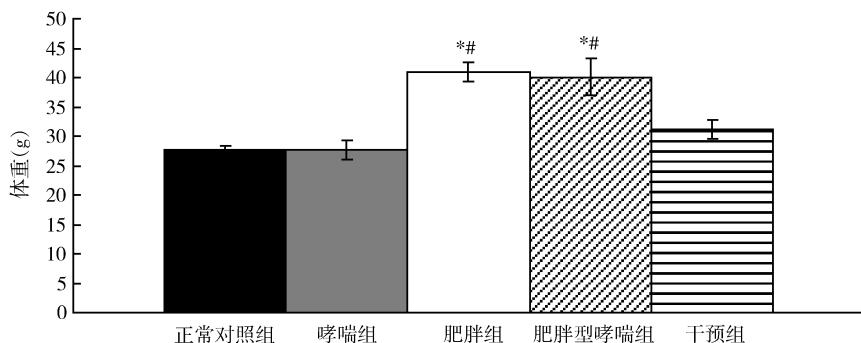


图 2 给药 7 天后各组小鼠体重的比较

与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与干预组比较, # $P < 0.01$

Rn 值 (0.655 ± 0.100) 最高, 与其他各组比较, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05); 干预组 (0.413 ± 0.045) 较哮喘组和肥胖型哮喘组比较, Rn 均显著下降, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.01)。而干预组较正常对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1)。

表 1 各组小鼠总气道阻力 (Rn) 基线值的比较 ($\bar{x} \pm s$)

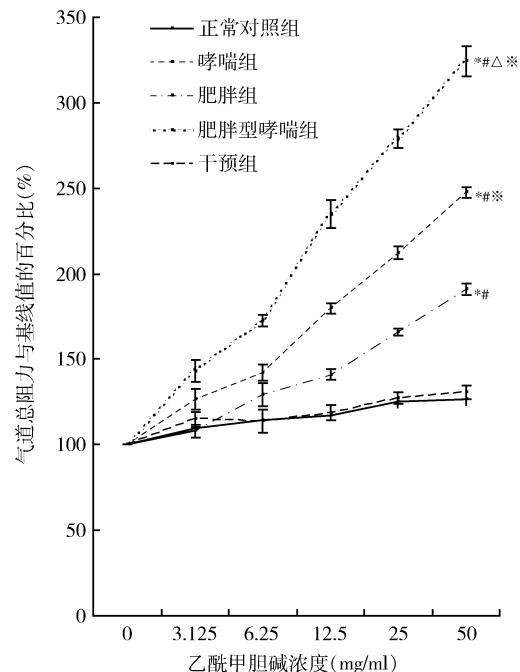
组别	鼠数	Rn
正常对照组	6	0.350 ± 0.003
哮喘组	6	$0.546 \pm 0.123^{*\#}$
肥胖组	6	$0.448 \pm 0.001^*$
肥胖型哮喘组	6	$0.655 \pm 0.097^{*\#}$
干预组	6	0.413 ± 0.044
F		16.272
P		< 0.01

与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与干预组比较, # $P < 0.01$

处于激发阶段的各组小鼠的 Rn 值与其基线值的比值 (%) 随乙酰甲胆碱浓度的不断增加均逐渐增高。正常对照组和干预组小鼠 Rn 值上升平缓, 哮喘组和肥胖组小鼠 Rn 值上升幅度较正常对照组比较显著增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。肥胖型哮喘组上升幅度最大, 与其他各组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。干预组小鼠较哮喘组、肥胖组和肥胖型哮喘组小鼠比较, Rn 值上升幅度显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。而干预组小鼠 Rn 值的上升幅度与正常对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 3)。

讨 论

儿童哮喘国际共识 (ICON) (2012 版) 将肥胖型哮喘列为哮喘的一种特殊表型^[5]。近期开展的研究表明, 单纯性肥胖可导致 AHR^[6,7]。而肥胖型哮喘与单纯肥胖组及哮喘组相比, 表现出更严重的 AHR^[1]。表明 AHR 可能为肥胖和哮喘的共同发病机制。本实验通过复习相关文献及参考课题组前期

图 3 各组小鼠乙酰甲胆碱激发后 Rn 值上升百分比的比较

与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与干预组比较, # $P < 0.01$;
与哮喘组比较, △ $P < 0.01$; 与肥胖组比较, * $P < 0.01$

研究, 建立肥胖型哮喘小鼠模型, 运用小鼠肺功能仪检测小鼠呼吸气道阻力, 分析小鼠 AHR, 研究结果表明, 肥胖型哮喘组小鼠气道总阻力 Rn 不仅显著高于正常对照组, 且与肥胖组和哮喘组相比也显著增高。

目前发现雷公藤红素除了在抗炎、肿瘤、自身免疫性疾病等方面有一定作用外, 其对于肥胖的治疗作用也备受关注^[8]。Umut Ozcan 等近期发表在《Cell》上的一项研究显示, 通过大规模药物筛选的方法, 利用瘦素和内质网应激共同反应基因发现雷公藤红素, 并对 C57BL/6 小鼠予雷公藤红素连续灌胃 3 周, 证

证实了雷公藤红素可以通过增加瘦素 (leptin) 的敏感度,令肥胖小鼠食欲降低,使其体重下降至正常水平^[9]。这点与本实验结果相符。本实验通过观察雷公藤红素干预后的肥胖型哮喘小鼠的体重变化,发现该组小鼠给药 7 天后体重下降 24% (从 41.300 ± 1.958 g 降至 31.260 ± 1.620 g),较肥胖组 (40.973 ± 1.632 g) 和肥胖型哮喘组 (40.090 ± 3.051 g) 显著降低,但仍较正常对照组小鼠 (27.560 ± 0.915 g) 高 ($P > 0.05$),这可能与给药天数有关,若适当延长给药天数,干预组小鼠体重可能降至正常水平。

肥胖是加重哮喘患病的重要因素,严重的 AHR 是症状之一^[10]。全世界肥胖儿童的比例不断增加,儿童哮喘的发生率也呈上升趋势,雷公藤红素能有效改善肥胖,那么,其是否能有效缓解肥胖型哮喘 AHR,正是本实验的目的所在。

此外,雷公藤红素在治疗哮喘方面也有一定作用。已有研究表明雷公藤红素对哮喘过敏性气道炎症具有改善作用^[3,4]。但是尚未有雷公藤红素应用于肥胖型哮喘的研究。肥胖型哮喘作为一种激素抵抗型哮喘,其对于典型哮喘的激素治疗反应较差,故其在治疗方面还面临许多问题和挑战^[2]。本实验将雷公藤红素应用于肥胖型哮喘小鼠,初步探讨其对肥胖型哮喘小鼠气道反应性的影响。结果显示,雷公藤红素干预 7 天后,干预组小鼠呼吸气道阻力 Rn 较肥胖型哮喘组和哮喘组相比显著降低。而干预组 Rn 与正常对照组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),表明经雷公藤红素干预后,肥胖型哮喘小鼠气道阻力恢复至正常水平,证实雷公藤红素可以降低肥胖型哮喘气道阻力。经过乙酰甲胆碱激发后,哮喘组和肥胖组小鼠 Rn 值上升幅度较正常对照组相比显著增加,肥胖型哮喘组小鼠 Rn 值上升幅度最大,与其余各组相比

差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),而干预组小鼠 Rn 值上升平缓,较哮喘组和肥胖型哮喘小鼠相比显著降低,其上升趋势接近正常组水平。表明经雷公藤红素干预后,肥胖型哮喘小鼠的气道反应性恢复至正常水平。

综上所述,雷公藤红素对于肥胖型哮喘的气道高反应具有改善作用,这一研究结果为肥胖型哮喘这一激素抵抗型哮喘的治疗提供了重要的指导意义,但其具体作用机制有待于进一步阐明。

参考文献

- 1 Kim JY, Sohn JH, Lee JH, et al. Obesity increases airway hyperresponsiveness via the TNF - alpha pathway and treating obesity induces recovery [J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0116540
- 2 Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches [J]. Nat Med, 2012, 18(5): 716 – 725
- 3 Kim DY, Park JW, Jeoung D, et al. Celastrol suppresses allergen - induced airway inflammation in a mouse allergic asthma model [J]. Eur J Pharmacol, 2009, 612(1 – 3): 98 – 105
- 4 Kim Y, Kim K, Lee H, et al. Celastrol binds to ERK and inhibits FcepsilonRI signaling to exert an anti - allergic effect [J]. Eur J Pharmacol, 2009, 612(1 – 3): 131 – 142
- 5 Papadopoulos NG, Arakawa H, Carlsen KH, et al. International consensus on (ICON) pediatric asthma [J]. Allergy, 2012, 67(8): 976 – 997
- 6 Arteaga - Solis E, Zee T, Emala CW, et al. Inhibition of leptin regulation of parasympathetic signaling as a cause of extreme body weight - associated asthma [J]. Cell Metab, 2013, 17(1): 35 – 48
- 7 Kim HY, Lee HJ, Chang YJ, et al. Interleukin - 17 - producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity - associated airway hyperreactivity [J]. Nat Med, 2014, 20(1): 54 – 61
- 8 Kannaiyan R, Shanmugam MK, Sethi G. Molecular targets of celastrol derived from Thunder of God Vine: potential role in the treatment of inflammatory disorders and cancer [J]. Cancer letters, 2011, 303(1): 9 – 20
- 9 Liu J, Lee J, Salazar Hernandez MA, et al. Treatment of obesity with celastrol [J]. Cell, 2015, 161(5): 999 – 1011
- 10 Permaul P, Kanchongkittiphon W, Phipatanakul W. Childhood asthma and obesity - what is the true link [J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2014, 113(3): 244 – 246

(收稿日期:2016-08-04)

(修回日期:2016-09-08)

(上接第 21 页)

- 5 Phielix E, Szendroedi J, Roden M. The role of metformin and thiazolidinediones in the regulation of hepatic glucose metabolism and its clinical impact [J]. Trends Pharmacol Sci, 2011, 32(10): 607 – 616
- 6 Turner N, Li JY, Cosby A, et al. Berberine and its more biologically available derivative, dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I: A mechanism for the action of berberine to activate AMP - activated protein kinase and improve insulin action [J]. Diabetes, 2008, 57(5): 1414 – 1418
- 7 Xu M, Xiao Y, Yin J, et al. Berberine promotes glucose consumption independently of AMP - activated protein kinase activation [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e103702
- 8 Zhang Y, Ye J. Mitochondrial inhibitor as a new class of insulin sensitizer [J]. Acta Pharm Sin B, 2012, 2(4): 341 – 349
- 9 Scheffler I E. Mitochondria [M]. New Jersey: John Wiley & Sons, 2011

- 10 Birsoy K, Wang T, Chen WW, et al. An essential role of the mitochondrial electron transport chain in cell proliferation is to enable aspartate synthesis [J]. Cell, 2015, 162(3): 540 – 551
- 11 Sádaba MC, Martín - Estal I, Puche JE, et al. Insulin - like growth factor 1 (IGF - 1) therapy: mitochondrial dysfunction and diseases [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1862(7): 1267 – 1278
- 12 Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. Lehninger principles of biochemistry [M]. New York: Macmillan, 2008
- 13 Sazanov LA. A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015, 16(6): 375 – 388
- 14 Huang S, Taylor NL, Ströher E, et al. Succinate dehydrogenase assembly factor 2 is needed for assembly and activity of mitochondrial complex II and for normal root elongation in Arabidopsis [J]. Plant J, 2013, 73(3): 429 – 441

(收稿日期:2016-10-26)

(修回日期:2016-10-27)