

0.05)。观察组 TNF-α 水平为治疗后 7 d<治疗后 5 d<治疗后 1 d<治疗前,且任意两时间点比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );对照组 TNF-α 水平为治疗后 7 d<治疗后 5 d<治疗后 1 d<治疗前,且任意两时间点比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。观察组 IL-6 水平为治疗后 7 d<治疗后 5 d<治疗后 1 d<治疗前,且任意两时间点比较,差异均有统计学

意义( $P<0.05$ );对照组 IL-6 水平为治疗后 7 d<治疗后 5 d<治疗后 1 d<治疗前,且任意两时间点比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。多变量方差分析结果显示,观察组治疗后 1、5、7 d CRP、TNF-α、IL-6 水平均低于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 5、6。

| 表 4 两组治疗前后不同时间血气指标比较( $\bar{x}\pm s$ ) |          |                         |                         |                          |                           |          |          |
|----------------------------------------|----------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|----------|----------|
| 组别                                     | <i>n</i> | PaO <sub>2</sub> (mmHg) |                         |                          |                           | <i>F</i> | <i>P</i> |
|                                        |          | 治疗前                     | 治疗后 1 d                 | 治疗后 5 d                  | 治疗后 7 d                   |          |          |
| 观察组                                    | 60       | 55.07±6.56              | 63.85±6.70 <sup>a</sup> | 83.40±7.14 <sup>ab</sup> | 89.45±7.27 <sup>abc</sup> | 171.064  | <0.001   |
| 对照组                                    | 60       | 54.91±6.63              | 58.43±6.75 <sup>a</sup> | 70.39±7.21 <sup>ab</sup> | 83.14±7.33 <sup>abc</sup> | 279.179  | <0.001   |
| <i>F</i>                               |          | 0.016                   | 53.942                  | 98.766                   | 22.456                    |          |          |
| <i>P</i>                               |          | 0.900                   | 0.001                   | <0.001                   | <0.001                    |          |          |

| 组别       | <i>n</i> | PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> |                           |                            |                             | <i>F</i> | <i>P</i> |
|----------|----------|------------------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------|----------|
|          |          | 治疗前                                | 治疗后 1 d                   | 治疗后 5 d                    | 治疗后 7 d                     |          |          |
| 观察组      | 60       | 220.41±14.06                       | 231.42±14.36 <sup>a</sup> | 287.47±15.52 <sup>ab</sup> | 306.95±16.87 <sup>abc</sup> | 472.441  | <0.001   |
| 对照组      | 60       | 219.55±13.45                       | 225.43±14.21 <sup>a</sup> | 268.96±15.76 <sup>ab</sup> | 289.64±16.03 <sup>abc</sup> | 784.589  | <0.001   |
| <i>F</i> |          | 0.117                              | 5.271                     | 41.974                     | 33.160                      |          |          |
| <i>P</i> |          | 0.733                              | 0.023                     | <0.001                     | <0.001                      |          |          |

注:与同组治疗前比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与同组治疗后 1 d 比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与同组治疗后 5 d 比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

| 表 5 两组治疗期间血气指标的重复测量方差分析( $\bar{x}\pm s$ )       |          |                  |              |            |            |                |            |            |            |
|-------------------------------------------------|----------|------------------|--------------|------------|------------|----------------|------------|------------|------------|
| 组别                                              | <i>n</i> | CRP(mg/L)        |              |            |            | TNF-α(pg/mL)   |            |            |            |
|                                                 |          | 治疗前              | 治疗后 1 d      | 治疗后 5 d    | 治疗后 7 d    | 治疗前            | 治疗后 1 d    | 治疗后 5 d    | 治疗后 7 d    |
| 观察组                                             | 60       | 183.46±12.43     | 144.93±11.58 | 75.64±8.96 | 45.96±5.39 | 30.17±3.45     | 26.74±3.28 | 18.63±2.44 | 10.71±1.51 |
| 对照组                                             | 60       | 185.63±12.77     | 150.88±12.04 | 81.66±9.12 | 49.77±5.41 | 30.22±3.56     | 28.71±3.19 | 22.63±2.51 | 13.92±1.77 |
| <i>F</i> <sub>组间</sub> / <i>P</i> <sub>组间</sub> |          | 21.948/<0.001    |              |            |            | 84.621/<0.001  |            |            |            |
| <i>F</i> <sub>时间</sub> / <i>P</i> <sub>时间</sub> |          | 4 717.185/<0.001 |              |            |            | 963.030/<0.001 |            |            |            |
| <i>F</i> <sub>交互</sub> / <i>P</i> <sub>交互</sub> |          | 1.038/0.370      |              |            |            | 11.118/<0.001  |            |            |            |

| 组别                                              | <i>n</i> | IL-6(pg/mL)      |            |            |            |
|-------------------------------------------------|----------|------------------|------------|------------|------------|
|                                                 |          | 治疗前              | 治疗后 1 d    | 治疗后 5 d    | 治疗后 7 d    |
| 观察组                                             | 60       | 60.41±5.63       | 53.18±4.97 | 37.96±4.25 | 25.18±2.59 |
| 对照组                                             | 60       | 60.83±5.55       | 56.64±5.29 | 44.93±4.38 | 30.28±2.44 |
| <i>F</i> <sub>组间</sub> / <i>P</i> <sub>组间</sub> |          | 1 242.525/<0.001 |            |            |            |
| <i>F</i> <sub>时间</sub> / <i>P</i> <sub>时间</sub> |          | 95.563/<0.001    |            |            |            |
| <i>F</i> <sub>交互</sub> / <i>P</i> <sub>交互</sub> |          | 11.085/<0.001    |            |            |            |

| 表 6 两组治疗前后不同点血气指标比较( $\bar{x}\pm s$ ) |          |              |                         |                          |                           |          |
|---------------------------------------|----------|--------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|----------|
| 组别                                    | <i>n</i> | TNF-α(pg/mL) |                         |                          |                           | <i>P</i> |
|                                       |          | 治疗前          | 治疗后 1 d                 | 治疗后 5 d                  | 治疗后 7 d                   |          |
| 观察组                                   | 60       | 30.17±3.45   | 26.74±3.28 <sup>a</sup> | 18.63±2.44 <sup>ab</sup> | 10.71±1.51 <sup>abc</sup> | <0.001   |
| 对照组                                   | 60       | 30.22±3.56   | 28.71±3.19 <sup>a</sup> | 22.63±2.51 <sup>ab</sup> | 13.92±1.77 <sup>abc</sup> | <0.001   |
| <i>F</i>                              |          | -0.006       | -11.010                 | -78.421                  | -114.230                  |          |
| <i>P</i>                              |          | 0.938        | 0.001                   | <0.001                   | <0.001                    |          |

| 续表 6 两组治疗前后不同时点血气指标比较( $\bar{x}\pm s$ ) |          |             |                         |                          |                           |           |
|-----------------------------------------|----------|-------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------|
| 组别                                      | <i>n</i> | IL-6(pg/mL) |                         |                          |                           | <i>F</i>  |
|                                         |          | 治疗前         | 治疗后 1 d                 | 治疗后 5 d                  | 治疗后 7 d                   |           |
| 观察组                                     | 60       | 60.41±5.63  | 53.18±4.97 <sup>a</sup> | 37.96±4.25 <sup>ab</sup> | 25.18±2.59 <sup>abc</sup> | 990.573   |
| 对照组                                     | 60       | 60.83±5.55  | 56.64±5.29 <sup>a</sup> | 44.93±4.38 <sup>ab</sup> | 30.28±2.44 <sup>abc</sup> | 1 205.116 |
| <i>F</i>                                |          | −0.169      | −13.633                 | −78.212                  | −124.202                  |           |
| <i>P</i>                                |          | 0.681       | <0.001                  | <0.001                   | <0.001                    |           |

注:与同组治疗前比较,<sup>a</sup>*P*<0.05;与同组治疗后 1 d 比较,<sup>b</sup>*P*<0.05;与同组治疗后 5 d 比较,<sup>c</sup>*P*<0.05。

**2.5 两组治疗前后 WVLWI 及 PVPI 比较** 重复测量方差分析结果显示,两组治疗期间 EVLWI 存在时间、组间、交互效应(*P*<0.05)。单因素重复测量方差分析结果显示,观察组 EVLWI 为治疗后 7 d<治疗后 5 d<治疗后 1 d<治疗前,且任意两时间点比较,差异均有统计学意义(*P*<0.05);对照组 EVLWI 为

治疗后 7 d<治疗后 5 d<治疗后 1 d<治疗前,且任意两时间点比较,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。多变量方差分析结果显示,观察组治疗后 1、5、7 d EVLWI 均低于对照组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。见表 7、8。

| 表 7 两组治疗期间 WVLWI 及 PVPI 值的重复测量方差分析( $\bar{x}\pm s$ ) |          |              |                |            |           |           |                |           |           |
|------------------------------------------------------|----------|--------------|----------------|------------|-----------|-----------|----------------|-----------|-----------|
| 组别                                                   | <i>n</i> | EVLWI(mL/kg) |                |            |           | PVPI      |                |           |           |
|                                                      |          | 治疗前          | 治疗后 1 d        | 治疗后 5 d    | 治疗后 7 d   | 治疗前       | 治疗后 1 d        | 治疗后 5 d   | 治疗后 7 d   |
| 观察组                                                  | 60       | 15.77±2.25   | 12.13±2.04     | 8.18±1.57  | 6.43±1.21 | 3.48±0.61 | 2.55±0.47      | 1.77±0.35 | 0.94±0.17 |
| 对照组                                                  | 60       | 15.83±2.24   | 14.61±1.88     | 10.61±1.63 | 7.29±1.18 | 3.51±0.59 | 2.61±0.41      | 1.96±0.43 | 1.24±0.22 |
| <i>F</i> <sub>组间</sub> / <i>P</i> <sub>组间</sub>      |          |              | 68.383/<0.001  |            |           |           | 11.238/0.001   |           |           |
| <i>F</i> <sub>时间</sub> / <i>P</i> <sub>时间</sub>      |          |              | 627.859/<0.001 |            |           |           | 738.747/<0.001 |           |           |
| <i>F</i> <sub>交互</sub> / <i>P</i> <sub>交互</sub>      |          |              | 14.245/<0.001  |            |           |           | 2.858/0.055    |           |           |

| 表 8 两组治疗前后不同时点 WVLWI 比较( $\bar{x}\pm s$ , mL/kg) |          |            |                         |                          |                          |          |
|--------------------------------------------------|----------|------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|----------|
| 组别                                               | <i>n</i> | 治疗前        | 治疗后 1 d                 | 治疗后 5 d                  | 治疗后 7 d                  | <i>F</i> |
| 观察组                                              | 60       | 15.77±2.25 | 12.13±2.04 <sup>a</sup> | 8.18±1.57 <sup>ab</sup>  | 6.43±1.21 <sup>abc</sup> | 316.180  |
| 对照组                                              | 60       | 15.83±2.24 | 14.61±1.88 <sup>a</sup> | 10.61±1.63 <sup>ab</sup> | 7.29±1.18 <sup>abc</sup> | 331.137  |
| <i>F</i>                                         |          | −0.015     | −48.320                 | −69.172                  | −15.660                  |          |
| <i>P</i>                                         |          | 0.903      | <0.001                  | <0.001                   | <0.001                   |          |

注:与同组治疗前比较,<sup>a</sup>*P*<0.05;与同组治疗后 1 d 比较,<sup>b</sup>*P*<0.05;与同组治疗后 5 d 比较,<sup>c</sup>*P*<0.05。

3 讨 论

肺损伤是导致 SAP 患者呼吸衰竭的重要原因之一,西医在治疗 SAP 合并肺损伤时多以改善患者血气指标、降低炎症反应等为主,但治疗效果较理想预期仍存在一定差距。西医认为,SAP 可过度激活炎症介质,并释放大量的内毒素,炎症介质及内毒素进肠道-淋巴-肺轴引发肺内炎症介质级联放大,进而诱发肺损伤,这与中医的“肺与大肠相表里”理论一致<sup>[8]</sup>。中医认为,SAP 病理机制为明腑实证,阳明燥实内结,腑气不通,以致肺失肃降,肺气上逆<sup>[9]</sup>。因此应以“攻下实热、荡涤燥结”为治疗原则。承气汤方中大黄苦寒,攻下消积,泻热去实,推陈致新,荡涤胃肠;芒硝性寒味咸苦,泻下清火,软坚润燥;枳实辛苦酸寒,破气消积;厚朴味苦性温,下气除满。上述诸药共奏攻下热结、荡涤肠胃之效。本研究中基于“肺与大肠相表里”理

论对 SAP 合并肺损伤患者应用承气汤联合胃肠减压治疗取得良好效果。

本研究结果显示,观察组的治疗效果好于对照组,且观察组机械通气时间、入住 ICU 时间及 AMS 恢复时间均短于对照组,提示承气汤可有效提高 SAP 合并肺损伤患者的治疗效果,促进患者临床症状改善。常规的胃肠减压已被研究证实,可缓解胃肠腔内压力,促进胃肠道血液循环,对机体内有毒介质具有一定的清除及抑制效果,但单一应用效果较为局限<sup>[10]</sup>。动物实验研究表明,承气汤的大黄对肺保护作用是通过抑制丝裂原活化蛋白激酶信号通路,该通路可调节炎症及氧化应激损伤的作用<sup>[11]</sup>。黄福霞等<sup>[12]</sup>研究指出承气汤可有效抑制 SAP 患者的炎症反应,提高治疗效果。承气汤可刺激肠道蠕动并促进肠液分泌,可有效抑制菌群移位,促进有害菌排除,抑制

AMS 活化,进而减轻炎症反应,抑制炎症级联反应对肺组织的损伤,进而提高治疗效果<sup>[13]</sup>。

本研究结果显示,治疗后各时间点两组 PaO<sub>2</sub> 及 PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> 均较治疗前显著升高,且观察组在治疗后各时间点的 PaO<sub>2</sub> 及 PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> 均高于对照组,提示承气汤可有效改善 SAP 合并肺损伤患者的血气指标。研究证实,常规的胃肠减压可改善机体血液循环,促进肠道屏障功能恢复,抑制肠腔内炎症介质及内毒素透过肠道屏障入血,进而避免其对肺泡毛细血管造成进一步损伤,改善肺功能,但单一应用胃肠减压会产生恶心呕吐等不良反应,患者耐受性较差,影响治疗效果<sup>[14]</sup>。一项针对急性肺损伤大鼠的研究表明,承气汤可通过调控 Nrf2/TGF-β1/ERK 通路来减轻脂多糖诱导的急性肺损伤<sup>[15]</sup>。承气汤可抑制脂多糖对肺部炎症细胞募集与激活,抑制机体炎症因子对肺损伤程度,而且承气汤可通过 Nrf2 阻断经典的 TGF-β-Smad 信号传导进而减轻非纤维化反应,阻止上皮-间质转化,进而控制疾病发展,改善血气指标<sup>[16]</sup>。炎症因子浸润、活化所致的细胞因子的异常分泌与 SAP 合并肺损伤的病理、生理过程具有密切的相关性<sup>[17]</sup>。而本研究结果显示,相较治疗前,两组治疗后各时间点 CRP、TNF-α、IL-6 均显著降低;且相较于对照组,观察组改善效果作为显著,提示承气汤联合胃肠减压可有效降低 SAP 合并肺损伤患者的炎症反应,这与多项研究结果较为一致<sup>[18-19]</sup>。

SAP 合并肺损伤患者在早期常以通透性肺水肿为临床特征,其表现为肺毛细血管内皮细胞与肺泡上皮细胞屏障的通透性增高,肺泡、肺间质内积聚大量积液<sup>[20]</sup>。EVLWI 是临床量化肺水肿的理想指标,可反映肺水肿程度,PVPI 可反映肺毛细血管对小分子物质的通透性,两者已被多项研究证实与肺损伤程度关系密切<sup>[21]</sup>。本研究发现承气汤治疗 SAP 合并肺损伤患者的肺水肿程度改善效果明显。这是因为承气汤可加强肠黏膜屏障保护作用,减轻肠道炎症反应及内毒素透过肠道屏障进入血液,进而抑制炎症级联反应对肺组织的损伤程度。

综上所述,承气汤可有效改善 SAP 合并肺损伤患者的血气指标,降低炎症反应及肺水肿程度,促进病情好转。

参考文献

[1] 李霞,庄伟,马冲,等.丙氨酰谷氨酰胺辅助乌司他丁治疗重症急性胰腺炎肺损伤的效果及对肺功能、炎症反应、免疫功能的影响[J].中国医药导报,2022,19(7):92-95.

[2] GARG P K, SINGH V P. Organ failure due to systemic injury in acute pancreatitis[J]. Gastroenterology, 2019, 156(7):2008-2023.

[3] 文娟,周思举.中药保留灌肠联合胃管内灌注并持续胃肠减压对胰腺炎患者的临床疗效[J].中国现代医学杂志, 2021,31(11):81-85.

[4] 宋媛,解基良.“肺与大肠相表里”机制的现代研究进展[J].中国中西医结合外科杂志,2013,19(5):605-608.

[5] 成向进,林朝亮,朱红林,等.大承气汤加味干预急性胰腺炎合并腹腔高压患者的临床研究[J].中国中医急症, 2020,29(2):253-255.

[6] 葛均波,徐永健,王辰.内科学[M].9版.北京:人民卫生出版社,2018:130-134.

[7] 中华中医药学会脾胃病分会.急性胰腺炎中医诊疗专家共识意见(2017)[J].临床肝胆病杂志,2017,33(11):2052-2057.

[8] SHAH J, RANA S S. Acute respiratory distress syndrome in acute pancreatitis[J]. Indian J Gastroenterol, 2020, 39(2):123-132.

[9] 姚红梅,付新新,路璐,等.清胰汤灌肠联合盐酸氨溴索治疗重症急性胰腺炎相关性肺损伤的临床观察[J].中国中医急症,2021,30(7):1257-1260.

[10] 张梦霞,冯丽,汪娇,等.非手术治疗的急性胰腺炎患者胃肠减压的最佳证据总结[J].护士进修杂志,2022,37(13):1219-1224.

[11] 万强,田静,韩晓红,等.大黄素对重症急性胰腺炎大鼠肺损伤的保护作用及对 MAPK 通路的影响[J].浙江中医药大学学报,2021,45(4):331-338.

[12] 黄福霞,韩晓玲,蔡晖.大承气汤高位灌肠改善急性胰腺炎肠黏膜屏障和炎症反应的临床研究[J].护理研究, 2019,33(6):1072-1074.

[13] 洪美琳,张翠柳.清胰汤合大承气汤加减治疗对重症急性胰腺炎患者炎性应激、肠黏膜功能及免疫功能的影响[J].四川中医,2021,39(8):86-89.

[14] 刘喜凤.中度重症急性胰腺炎合并麻痹性肠梗阻患者的改良胃肠减压及保留灌肠护理[J].山西医药杂志,2017,46(18):2268-2270.

[15] 尚罗锐,刘宇寒,李金骁,等.大承气汤调控 Nrf2/TGF-β1/ERK 通路来减轻脂多糖诱导的急性肺损伤[J].中国医院药学杂志,2021,41(19):1935-1939.

[16] WAZA A A, HAMID Z, ALI S, et al. A review on heme oxygenase-1 induction: is it a necessary evil[J]. Inflamm Res, 2018, 67(7):579-588.

[17] 景光旭,梁鸿寅,黄竹,等.重症急性胰腺炎相关肺损伤机制与治疗的研究进展[J].中国普通外科杂志,2022,31(3):405-409.

[18] 王桂春,孔晔宏,张雪乔,等.大承气汤保留灌肠联合足三里穴按摩在促进重症急性胰腺炎胃肠动力中的应用[J].中国中西医结合急救杂志,2022,29(2):183-186.

[19] 李劼,程卓安,马骄阳,等.大承气汤通过抑制 HMGB1 及 NLRP3 炎症小体治疗重症急性胰腺炎的研究[J].上海中医药杂志,2022,56(9):70-75.

[20] 陆鹰,郭小芙,徐蓉.热休克蛋白 27、白细胞介素-37 与重症胰腺炎肺损伤的相关性研究[J].标记免疫分析与临床,2020,27(8):1333-1336.

[21] 高嵩,吴丁烨,高飞,等.多配体聚糖-1 检测联合肺部超声评估 ARDS 患者血管外肺水的程度[J].中华危重病急救医学,2021,33(8):990-993.

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.20.018

基于 MAPK/ERK 信号通路探讨孟鲁司特通过自噬改善哮喘模型小鼠肺损伤的机制<sup>\*</sup>林妍妍<sup>1</sup>,裴 剑<sup>2</sup>,夏彦东<sup>3</sup>

1. 河北省唐山市第三医院药剂科,河北唐山 063000;2. 河北省唐山市工人医院神经外科,河北唐山 063000;3. 开滦总医院检验科,河北唐山 063000

**摘要:**目的 探究孟鲁司特是否可改善哮喘小鼠肺损伤,并基于丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)信号通路介导的自噬探究其改善肺损伤的机制。方法 选取 60 只无特定病原体(SPF)级 BALB/c 小鼠;对照组、哮喘组、孟鲁司特组及司美替尼(Selumetinib)组,每组 15 只。肺功能仪检测小鼠第 0.15 秒用力呼气容积(FEV<sub>0.15</sub>)、最高呼气流速(PEF)。苏木素-伊红(HE)染色检测小鼠肺组织病理学形态。Masson 染色检测肺组织平滑肌增生与胶原沉积水平。Western blotting 检测肺组织中 MAPK、ERK、Beclin1 及微管相关蛋白轻链 3(LC3 II)蛋白水平。免疫组织化学检测肺组织中 MAPK、ERK 蛋白水平。结果 与对照组比较,哮喘组小鼠 FEV<sub>0.15</sub>、PEF 均降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );与哮喘组比较,孟鲁司特组 FEV<sub>0.15</sub>、PEF 均增加,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。HE 染色结果显示,哮喘组小鼠可见支气管壁增厚、炎性浸润显著等病理学形态损伤;孟鲁司特组可见肺组织病理学形态损伤改善。Masson 染色结果显示,哮喘组小鼠支气管平滑肌增厚,且其周围可见胶原大量沉积;孟鲁司特组小鼠支气管平滑肌增生减轻,周围胶原沉积减少。Western blotting 检测结果显示,与对照组比较,哮喘组小鼠肺组织中 MAPK、ERK、Beclin1、LC3 II 表达水平增加,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );与哮喘组比较,孟鲁司特组小鼠肺组织中 MAPK、ERK、Beclin1、LC3 II 表达水平降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。与对照组比较,哮喘组小鼠 FEV<sub>0.15</sub>、PEF 降低,MAPK、ERK、Beclin1、LC3 II 蛋白表达水平均增加,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。与哮喘组比较,Selumetinib 组 FEV<sub>0.15</sub>、PEF 均增加,MAPK、ERK、Beclin1、LC3 II 蛋白表达水平均降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 孟鲁司特可改善哮喘小鼠肺损伤,其机制可能与 MAPK/ERK 信号通路介导的自噬相关。

关键词:哮喘; 肺损伤; 孟鲁司特; MAPK/ERK 信号通路; 自噬

中图法分类号:R392.8;R563

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2024)20-3033-06

Mechanism of montelukast in improving lung injury in asthmatic mice through autophagy based on MAPK/ERK signaling pathway<sup>\*</sup>LIN Yanyan<sup>1</sup>, PEI Jian<sup>2</sup>, XIA Yandong<sup>3</sup>

1. Department of Pharmacy, the Third Hospital of Tangshan, Tangshan, Hebei 063000, China;

2. Department of Neurosurgery, Tangshan Gongren Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China;

3. Clinical Laboratory Department, Kailuan General Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China

**Abstract: Objective** To investigate whether montelukast can improve lung injury in asthmatic mice, and to explore its possible protective mechanism based on autophagy mediated by mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) signaling pathway. **Methods** Sixty specific pathogen free (SPF) BALB/c mice were randomly divided into control group, asthma group, montelukast group and Selumetinib group, with 15 mice in each group. Forced expiratory volume in 0.15 second (FEV<sub>0.15</sub>) and peak expiratory flow (PEF) were measured by pulmonary function analyzer. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect the pathological morphology of lung tissue. Masson staining was used to detect the proliferation of smooth muscle and collagen deposition in lung tissue. The protein levels of MAPK, ERK, Beclin1 and microtubule-associated protein light chain 3III (LC3III) in lung tissue were detected by Western blotting. The protein levels of MAPK and ERK in lung tissue were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the control group, FEV<sub>0.15</sub> and PEF in the asthma group were decreased, and the differences were statistically sig-

<sup>\*</sup> 基金项目:河北省中医药管理局中医药科研计划项目(2020420)。

作者简介:林妍妍,女,主管药师,主要从事哮喘方面的研究。

nificant ( $P < 0.05$ ). Compared with the asthma group,  $FEV_{0.15}$  and PEF in the montelukast group increased, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The results of HE staining showed that the mice in the asthma group had pathological morphological damage such as bronchial wall thickening and inflammatory infiltration. The pathological changes of lung tissue were improved in the montelukast group. Masson staining showed that the bronchial smooth muscle of the asthma group was thickened, and a large amount of collagen was deposited around it. In montelukast group, bronchial smooth muscle hyperplasia and collagen deposition were reduced. Western blotting showed that compared with the control group, the asthma group had significant increases in the protein expressions of MAPK, ERK, Beclin1 and LC3 II in lung tissue ( $P < 0.05$ ). Compared with the asthma group, the montelukast group had significant reductions in the expression of MAPK, ERK, Beclin1 and LC3 II in the lung tissue ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group,  $FEV_{0.15}$  and PEF in the asthma group were decreased, and the protein expression levels of MAPK, ERK, Beclin1 and LC3 II were increased, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). Compared with the asthma group,  $FEV_{0.15}$  and PEF in the Selumetinib group were increased, and the protein expression levels of MAPK, ERK, Beclin1 and LC3 II were decreased, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Montelukast can improve lung injury in asthmatic mice, and its mechanism may be related to autophagy mediated by MAPK/ERK signaling pathway.

**Key words:** asthma; lung injury; montelukast; MAPK/ERK signaling pathway; autophagy

哮喘是一种慢性气道炎症性疾病,其发病率和病死率仍在不断增加<sup>[1]</sup>。哮喘源于遗传因素和环境因素之间的相互作用,是一种复杂的综合征<sup>[2-3]</sup>,以间歇性发作的呼吸困难、胸闷和喘息为特征<sup>[4]</sup>。全球有超过 3 亿人患有哮喘,每年死亡人数约为 250 000 人<sup>[5]</sup>。目前,支气管扩张剂、白三烯受体拮抗剂等被用于治疗哮喘<sup>[4]</sup>,然而,预后效果不理想。因此,有必要深入探究治疗哮喘的有效分子机制,为临床治疗哮喘挖掘新思路。孟鲁司特是白三烯受体拮抗剂,在临床中被广泛用于治疗哮喘<sup>[6]</sup>。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)可通过调控炎症反应、细胞应激等生物学过程参与支气管哮喘的发生与发展过程<sup>[7]</sup>。细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)在支气管平滑肌上大量分布,且参与气道炎症反应过程<sup>[8-9]</sup>。此外,MAPK/ERK 信号通路可诱导细胞自噬<sup>[10]</sup>,但其自噬是否参与孟鲁司特治疗哮喘过程目前相关报道较少见。因此,本研究通过建立哮喘小鼠模型,基于 MAPK/ERK 信号通路探究孟鲁司特治疗哮喘小鼠肺损伤过程中是否存在细胞自噬,以期为临床治疗哮喘提供新依据与思路。

## 1 材料与方法

**1.1 动物来源** 选取 60 只 SPF 级 BALB/c 小鼠(上海斯兰生物科技有限公司)随机将其分为对照组、哮喘组、孟鲁司特组、司美替尼组(Selumetinib 组),每组 15 只。

**1.2 试剂与仪器** MAPK 抗体、ERK 抗体均购自上海艾博抗贸易有限公司, GAPDH 抗体、Beclin1 抗体、LC3 II 抗体均购自美国 Affinity 公司、Selumetinib 购自美国 MCE 公司, Masson 染色试剂盒购自赛默飞世尔科技公司, Finepointe-RC 型肺功能仪购自美国 BUXCO 公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 哮喘小鼠模型的建立** 哮喘组、孟鲁司特组与 Selumetinib 组小鼠分别在第 0、7、14 d 腹腔注射 0.2 mL 卵清蛋白致敏液,第 21 天开始每隔一天用 5% 卵清蛋白雾化液处理 1 次,每次 30 min,持续至第 40 天<sup>[7]</sup>。孟鲁司特组在灌胃雾化的同时每天按每只小鼠 0.6 mg/mL 灌胃孟鲁司特。Selumetinib 组小鼠腹腔注射 MAPK 抑制剂 Selumetinib (10 mg/kg),处理时间同孟鲁司特组。对照组小鼠在相同的时间给予等量生理盐水。

**1.3.2 小鼠肺功能检测** 各组小鼠干预结束后,将小鼠麻醉,剪开其颈部皮毛,将气管分离并在第 3 和第 4 环骨间切开一小口,放入小鼠气管插管,并结扎气管外,检测各组小鼠第 0.15 秒用力呼气容积( $FEV_{0.15}$ )、最高呼气流速(PEF)。

**1.3.3 苏木素-伊红(HE)染色检测小鼠肺组织病理学改变情况** 将制作结束的各组小鼠肺组织切片 64 °C 烘烤 10 min,依次在二甲苯和上行梯度乙醇溶液中进行透明、脱水。将肺组织切片水化后先滴加苏木素染液 3 min,放入水中反蓝,然后在细小流水下持续冲洗 15 min,滴加适量伊红染液 3 min,依次浸入下行梯度乙醇溶液和二甲苯中进行脱水透明,滴加中性树脂盖上盖玻片,此过程避免产生气泡影响观察,最后镜下观察拍照。

**1.3.4 Masson 染色检测小鼠肺组织中平滑肌增生与胶原沉积情况** 将各组小鼠肺组织切片脱蜡,铬处理后自来水洗涤,Regaud 苏木精滴染 5 min,使用蒸馏水洗涤后将组织切片浸入 Masson 丽春红酸性复红液中 5 min,再浸入 2% 冰醋酸溶液中 3 min,1% 钼酸水 3 min,滴加苯胺蓝染色 5 min,浸入 0.2% 冰醋酸

溶液中 3 min,再依次浸入梯度乙醇溶液与二甲苯溶液中脱水透明,使用中性树胶封片后镜下观察拍照。

**1.3.5 Western blotting 检测小鼠肺组织中 MAPK、ERK、Beclin1、LC3 II 蛋白水平** 将各组小鼠肺组织切碎后,根据其重量加入合适的裂解液提取总蛋白,检测各组蛋白浓度后配置相同浓度的样品,将配置成一定体系的样品在金属浴中高温变性。向凝胶孔道中加入相同体积的样品进行电泳,将电泳结束的凝胶与 PVDF 膜按照一定顺序置于转膜夹中进行转膜。将转膜结束的 PVDF 膜浸入快速封闭液中封闭 15 min,磷酸盐吐温缓冲液(PBST)清洗后,在 4 ℃ 冰箱中孵育对应的抗体孵育,次日清洗后,室温孵育 1 h 对应的二抗,使用 PBST 清洗后滴加发光液曝光,最后将结果保存后进行分析统计。

**1.3.6 免疫组织化学染色检测小鼠肺组织中 MAPK、ERK 蛋白水平** 将制作结束的各组小鼠肺组织切片 64 ℃ 烘烤 10 min,依次浸入二甲苯溶液与梯度乙醇溶液脱水进行脱蜡,高温高压抗原修复 5min,待组织切片自然冷却后用蒸馏水清洗,滴加过氧化物酶阻断剂孵育 10 min,清洗后滴加一抗孵育 60 min,清洗后滴加二抗孵育 20 min,滴加 DAB 孵育 1 min,浸入蒸馏水中终止显色,滴加苏木素 3min 染细胞核,盐酸乙醇溶液分化 3 s 立即流水冲洗,最后脱水、透明、中性树胶封片、镜下观察。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS23.0 统计软件进行数据处理与统计分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用独立样本  $t$  检验,多组间比较采用单因素方差分析,多组间的两两比较采用 LSD- $t$  检验。计数资料以例数或百分率表示,组间比

较采用  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

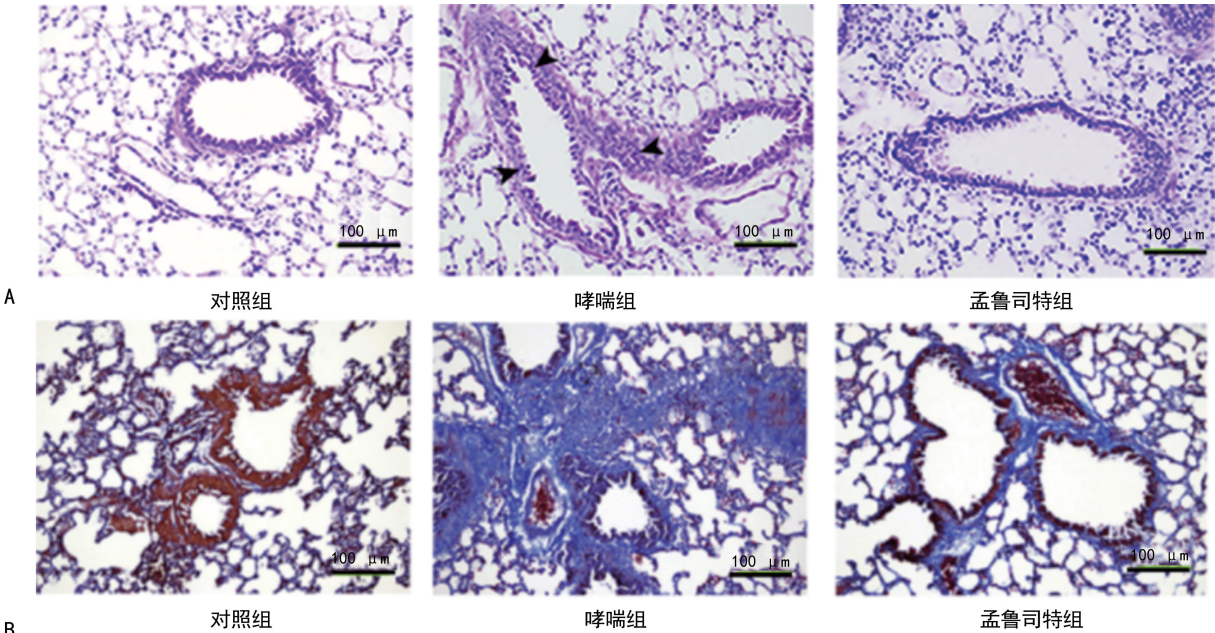
2 结 果

**2.1 对照组、哮喘组、孟鲁司特组 FEV<sub>0.15</sub>、PEF 比较** 与对照组比较,哮喘组小鼠 FEV<sub>0.15</sub>、PEF 均降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );与哮喘组比较,孟鲁司特组 FEV<sub>0.15</sub>、PEF 均增加,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。HE 染色结果显示,哮喘组小鼠可见支气管壁增厚、炎性浸润显著等病理学形态损伤;孟鲁司特组可见肺组织病理学形态损伤显著改善(图 1A)。Masson 染色结果显示,哮喘组小鼠支气管平滑肌增厚,且其周围可见胶原大量沉积;孟鲁司特组小鼠支气管平滑肌增生减轻,周围胶原沉积减少(图 1B)。

**2.2 对照组、哮喘组、孟鲁司特组 MAPK、ERK、Beclin1、LC3 II 表达水平比较** Western blotting 检测结果显示,与对照组比较,哮喘组小鼠肺组织中 MAPK、ERK、Beclin1、LC3 II 蛋白表达水平增加,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );与哮喘组比较,孟鲁司特组小鼠肺组织中 MAPK、ERK、Beclin1、LC3 II 蛋白表达水平降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2。

| 表 1 各组小鼠肺功能比较( $\bar{x} \pm s$ ) |          |                          |                        |
|----------------------------------|----------|--------------------------|------------------------|
| 组别                               | <i>n</i> | FEV <sub>0.15</sub> (mL) | PEF(mL/s)              |
| 对照组                              | 15       | 1.18±0.25                | 10.75±1.30             |
| 哮喘组                              | 15       | 0.50±0.10 <sup>a</sup>   | 4.94±1.25 <sup>a</sup> |
| 孟鲁司特组                            | 15       | 0.79±0.08 <sup>b</sup>   | 8.26±0.83 <sup>b</sup> |
| <i>F</i>                         |          | 12.87                    | 19.46                  |
| <i>P</i>                         |          | <0.001                   | <0.001                 |

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与哮喘组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。



注:A为H-E染色检测小鼠肺组织病理学改变;B为Masson染色检测小鼠平滑肌增生与胶原沉积水平。

图1 各组小鼠肺组织病理学形态(200×,标尺100 μm)