

## 呼吸道合胞病毒感染对肺组织 GRK2 的影响及其与哮喘的关系

吴 铭<sup>1</sup>, 张 华<sup>1</sup>, 武 怡<sup>1\*</sup>, 屈昌雪<sup>1</sup>, 李 刚<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>徐州医学院附属医院儿科, <sup>2</sup>口腔科, 江苏 徐州 221002)

**[摘要]** 目的: 探讨呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)感染鼠肺组织后, G 蛋白偶联受体激酶 2(G protein coupled receptor kinase 2, GRK2)的变化规律及其与哮喘的关系。方法: Balb/c 雌性小鼠 100 只, 随机分为 5 组, 每组 20 只。正常对照组, 于第 1、14 天予生理盐水 0.2 ml 腹腔注射, 第 21~25 天用 37℃ 生理盐水 20 ml 雾化吸入 30 min; RSV 感染组, 于第 19、20、21 天, 以 RSV 按浓度  $1 \times 10^6$  PFU、100  $\mu$ l/次鼻腔滴入; 哮喘组, 第 1、14 天予以鸡卵白蛋白(ovalbumin, OVA)100  $\mu$ g、AL(OH)<sub>3</sub> 2 mg 腹腔注射, 第 21 天开始激发, 以 2% OVA 生理盐水 20 ml 雾化吸入 30 min, 持续激发 5 d; 双重感染组, 模型制备同哮喘组, 第 19、20、21 天, 以 RSV 按浓度  $1 \times 10^6$  PFU、100  $\mu$ l/次鼻腔滴入; 地塞米松干预组, RSV 感染同 RSV 组, 第 21~25 天予腹腔注入地塞米松 0.2 mg/(kg·d)。末次激发后 24 h, 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉(0.3 ml/kg), 处死小鼠, 取左肺上叶和右肺中叶, 4% 甲醛固定, 分别用于免疫荧光检测 GRK2 的表达和组织病理改变检测; 取右肺下叶用于 Western blot 检测各组 GRK2 的表达; 无菌条件下取左肺下叶, 用于肺组织病毒分离及免疫荧光鉴定。结果: RSV 组 GRK2 表达较正常组显著增加, 与哮喘组相比差异有统计学意义; 双重感染组 GRK2 表达较 RSV 组显著增加; 地塞米松干预组 GRK2 表达较 RSV 组显著减少。结论: RSV 感染小鼠肺组织后 GRK2 表达增加, 合并哮喘时表达显著增加, 地塞米松干预对 GRK2 的表达有一定的抑制作用。

**[关键词]** 呼吸道合胞病毒; G 蛋白偶联受体激酶 2; 哮喘

**[中图分类号]** R392.8

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)11-1463-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20141102

## The influence of respiratory syncytial virus infection on GRK2 expression of lung tissue and its relationship with asthma

Wu Ming<sup>1</sup>, Zhang Hua<sup>1</sup>, Wu Yi<sup>1\*</sup>, Qu Changxue<sup>1</sup>, Li Gang<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Paediatrics, <sup>2</sup>Department of Stomatology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the G protein coupled receptor kinase 2 (GRK2) changes and its relationship with asthma after respiratory syncytial virus (RSV) infection in lung tissue of mice. **Methods:** A total of 100 female Balb/c mice were randomly divided into 5 groups with 20 each group. In the normal control group, intraperitoneal injection of 0.2 ml saline were performed at day 1 and 14, and inhalation of 20 ml atomized saline at 37℃ were taken for 30 min at day 21~25. In the RSV group, RSV of  $1 \times 10^6$  pfu in consistency and 100  $\mu$ l/time in volume were dropped into the nasal cavity at day 19, 20 and 21. In the asthma group, intraperitoneal injection of OVA/AL (OH)<sub>3</sub> (OVA 100  $\mu$ g, AL (OH)<sub>3</sub> 2 mg) were performed at day 1 and 14, and inhalation of 2% OVA saline of 20 ml were taken for 30 min at day 21 and the excitation was lasted for 5 days. In the double infection group, model preparation was the same with the asthma group, but RSV of  $1 \times 10^6$  pfu in consistency and 100  $\mu$ l/time in volume were dropped into the nasal cavity at day 19, 20 and 21. In the dexamethasone intervention group, RSV infection was the same to the RSV group, but intraperitoneal injection of dexamethasone 0.2 mg/(kg·d) were performed at day 21 to 25. Twenty-four hours after the last excitation, by anesthesia with 10% chloral hydrate intraperitoneal injection (0.3 ml/kg), the mice were sacrificed. The left upper lobe and right middle lobe of the lung, 4% formaldehyde fixed, were used for expression and pathological immunofluorescence detection of GRK2 change detection. The lower lobe of the right lung was performed to detected GRK2 expression of each group by Western blot. Under the sterile conditions, the lower lobe of the left lung was taken for virus isolation and immunofluorescence identification.

**[基金项目]** 徐州医学院附属医院课题资助

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: dearberyl@163.com

**Results:** In the RSV group, GRK2 expression was significantly increased compared with the normal group, and showed significant differences compared with the asthma group. In the double infection group, GRK2 expression was significantly increased compared with the RSV group. In the dexamethasone intervention group, GRK2 expression was significantly reduced compared with the RSV group.

**Conclusion:** The expression of GRK2 was increased after the RSV infection in lung tissue of the mice, and significantly increased in terms to asthma. The dexamethasone intervention inhibits the expression of GRK2.

[Key words] respiratory syncytial virus; G protein coupled receptor kinase 2; asthma

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(11): 1463-1468]

呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV) 是婴幼儿期呼吸道感染最为常见的病原之一,也是每年儿童呼吸道疾病住院的首要原因<sup>[1]</sup>。大量研究证实 RSV 感染豚鼠后气道反应性明显升高,可引起毛细支气管炎或病毒性肺炎,导致患儿向哮喘转化或加重病情<sup>[2]</sup>。在发病过程中,病毒感染引起的神经-受体失衡机制在产生气道高反应性的作用日趋受到重视,已有研究证实哮喘时肺组织  $\beta$ -肾上腺素能受体 (beta-adrenergic receptor,  $\beta$ -AR) 功能下调,下调机制推测与受体表达减少、受体蛋白降解、受体内化等有关<sup>[3]</sup>。目前认为与  $\beta$ -AR 内化密切相关的主要有两类分子: G 蛋白偶联受体激酶 (G protein-coupled receptor-kinase, GRKs) 和  $\beta$ -arrestins。GRKs 分为 GRK1~GRK7 7 种亚型,其中与  $\beta$ -AR 内化有关的是 GRK2 和 GRK3, 所以 GRK2 和 GRK3 又分别称为  $\beta$ -受体激酶 1 和  $\beta$ -受体激酶 2; 二者中起主要作用的是 GRK2<sup>[4]</sup>。另外,糖皮质激素对  $\beta$ -AR 减敏有保护作用已得到实验证实,但在 RSV 感染哮喘后 GRK2 表达改变及其与  $\beta$ -AR 下调的关系、激素的治疗效果尚未见报道。本研究主要探讨 Balb/c 小鼠感染 RSV 后肺组织 GRK2 的变化规律以及与哮喘的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

Balb/c 雌性小鼠,由徐州医学院实验动物中心提供;RSV A2 标准株及 293-T 人胚肾细胞株(由山东医学科学院微生物教研室惠赠);HyClone 改良型 RPMI-1640 培养基、HyClone 胎牛血清(北京赛默飞世尔生物化学制品有限公司);RSV 免疫荧光试剂盒 (Chemicon 公司,美国);鸡卵白蛋白 (ovalbumin, OVA) (Sigma 公司,美国);AL(OH)<sub>3</sub> 粉剂(上海生物工程技术有限公司);4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI 染色剂) (北京冬哥生物科技有限公司);GRK2 一抗 (1:150 稀释) (Epitomics 公司,美国);荧光二抗 (北京中衫公司);水电分离型超声波雾化机 (鞍山医

疗器械厂)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组

Balb/c 雌性小鼠 100 只,月龄 6~8 周,体重 22~24 g,随机分为 5 组:正常对照组、RSV 感染组、哮喘组、双重感染组、地塞米松干预组,每组 20 只。

#### 1.2.2 动物模型复制

①正常对照组: Balb/c 小鼠于第 1、14 天予生理盐水 0.2 ml 腹腔注射,第 21~25 天用 37℃ 生理盐水 20 ml 雾化吸入 30 min; ②哮喘组: 采用改良后的哮喘模型制备方法,第 1、14 天予以 OVA/AL(OH)<sub>3</sub> (含 OVA 100  $\mu$ g, AL(OH)<sub>3</sub> 2 mg) 腹腔注射,第 21 天开始激发,以 2% OVA 生理盐水 20 ml 雾化 30 min,持续激发 5 d; ③ RSV 感染组: 首先制备病毒悬液,将 RSV 毒株接于 293-T 细胞上,培养 5~6 d,在病变最明显时用力振荡细胞管,使细胞从管壁脱落,反复冻融,离心,去除细胞散片,收集上清液,保存于 -80℃ 的冰冻态中,取出部分病毒,滴定其毒力,用于 Balb/c 小鼠接种。第 19、20、21 天, Balb/c 小鼠先用乙醚麻醉,待麻醉完全后,将动物头部仰起,以 RSV 按浓度  $1 \times 10^6$  PFU、100  $\mu$ l/次,用移液枪吸取后缓慢滴入鼻腔<sup>[5-6]</sup>; ④双重感染组: 模型制备同哮喘组,第 19、20、21 天,以 RSV 按浓度  $1 \times 10^6$  PFU、100  $\mu$ l/次鼻腔滴入; ⑤地塞米松干预组: RSV 感染同呼吸道合胞病毒组,于 21~25 d 腹腔注入地塞米松 0.2 mg/(kg·d)。末次激发后 24 h, 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉 (0.3 ml/kg), 处死小鼠,取右肺中叶和左肺上叶, 4% 甲醛固定,制成石蜡切片,分别用于组织病理 HE 染色和免疫荧光检测 GRK2 的表达; 取右肺下叶用于 Western blot 检测各组 GRK2 的变化; 无菌条件下取左肺下叶,用于肺组织病毒分离及免疫荧光鉴定。

#### 1.2.3 肺组织病毒分离及免疫荧光法鉴定 RSV

在无菌条件下,剪碎肺组织,研磨后加适量维持液,接种到 293-T 细胞管内, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内观察细胞病变,待细胞胞质内颗粒增多,胞质透明度

降低,细胞融合病变超过 50%时收取标本。将上述标本制成抗原片,冷丙酮固定 20 min,取出晾干。每孔加入 1 滴结合了异硫氰酸荧光素 (FITC) 的 RSV 抗体,37℃孵育 30 min,晾干后用基质液封片,移至荧光显微镜下观察。细胞质内出现荧光则为阳性<sup>[7]</sup>。

#### 1.2.4 HE 染色观察肺病理改变

取肺组织,4%甲醛固定,石蜡切片,苏木素-伊红染色,光镜下观察肺组织学改变。

#### 1.2.5 免疫荧光检测 GRK2 的表达

取肺组织,4%甲醛固定,石蜡切片,置 60℃恒温烘片箱中烘烤 180 min 脱蜡水化,3% $H_2O_2$  室温孵育 10 min,蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min,微波炉热修复高火 2 min,低火 8 min,5%~10%正常山羊血清封闭,室温孵育 10 min,倾去血清,加 GRK2 一抗(1:150),4℃孵育过夜,PBS 冲洗 5 min × 3 次,加适量稀释的免疫荧光标记的二抗(1:100),37℃避光孵育 60 min,回收荧光标记的二抗,PBS 冲洗 5 min × 3 次,使用 DAPI 复染细胞核,PBS 冲洗 5 min × 3 次,加抗荧光淬灭封片液,盖上盖玻片,荧光显微镜下用波长 550~570 nm 的滤光片进行荧光强度观察。荧光强弱分+、++、+++、++++ 4 级,做相互观察比较。

#### 1.2.6 Western blot 检测 GRK2 的表达

①蛋白提取和定量:各取 100 mg 肺组织,加 2 ml 细胞裂解液(50 mmol/L pH8.0 Tris·HCl,150 mmol/L NaCl,0.02% 叠氮钠,100 g/ml PMSF,1 g/ml Aprotinin,1% Triton X-100)冰浴,用电动玻璃匀浆机匀浆,12 000 r/min,4℃离心 10 min,取上清用 DAB 蛋白试剂盒进行蛋白定量,调整至 2 mg/ml;②SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE):根据目的蛋白分子量大小选择 8%的分离胶和 3%的浓缩胶进行 SDS-PAGE。每个泳道点样 20  $\mu$ l 蛋白样品和上样缓冲液,Marker 点样 10  $\mu$ l。电泳完成后用 R250 考马斯亮蓝染色,脱色液脱色,观察是否有目的条带;③转膜和封闭:根据凝胶大小剪取 NC 膜,甲醇浸泡,漂洗,转移缓冲液平衡 5 min;用半干电转仪按说明书将蛋白转移至 NC 膜,并在 0.02%的氨基黑中快速染色,直至分子量标准显现时取出,记录下标准位置。洗涤 NC 膜,脱色缓冲液漂洗 10 min。将膜封入塑料袋中,加封闭液(5%脱脂奶粉、0.05%Tween-20、TBS 溶解)封闭 90 min;④抗原抗体反应:加封闭液 1:1 000 稀释的一抗(GRK2 单抗)4℃过夜。含 0.05% Tween-20 的 TBS 洗膜 5 min × 3 次。室温下与结合有 HRP 的二抗孵育 90 min。二抗用封闭液稀释至 1:1 000。含 0.05% Tween-20 的 TBS 洗膜 5 min × 3 次,

再用 TBS 洗膜 5 min。将膜置 DAB 中显色,直至显出清晰条带。结果用 SK-100 Image System 凝胶成像系统扫描存盘,并比较各条带积分吸光度。

#### 1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计软件进行统计学分析,数据用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,所有数据均进行正态性检验,多组样本均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),方差齐时采用 LSD 法,方差不齐时采用 Dunnett T3 法, $P \leq 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 各组动物的症状观察

致敏阶段,第 1 次致敏后,各组小鼠表现无明显差异,但在第 2 次致敏及以后,哮喘组和双重感染组小鼠出现明显毛发竖起和俯伏不动现象。正常对照组未见上述症状。雾化激发阶段,哮喘组和双重感染组出现烦躁不安、头面部抓挠、呼吸急促、偶尔咳嗽、前肢缩抬、反应迟钝、步态不稳、蛙跳等表现,取出动物可见遗留较多排泄物,提示哮喘模型诱发成功;RSV 感染组小鼠滴鼻后第 3 天出现烦躁不安,第 6 天表现明显,出现呼吸急促、易激惹、食欲不佳,取出动物可见遗留较多排泄物。地塞米松干预组小鼠症状表现较轻,24 h 内精神、食欲均可,获得不同程度上的恢复;正常对照组小鼠一般情况良好,无明显上述表现。

### 2.2 肺组织的病理变化

正常对照组:Balb/c 小鼠肺组织肉眼及电镜观察下其细支气管和肺泡等组织均未发现异常变化(图 1A)。RSV 感染组:肺泡间隔宽,肺泡上皮肿胀,间质水肿;电镜下见肺泡 I 型上皮细胞肿胀,线粒体基质变淡,内质网轻度扩张。肺泡 II 型上皮细胞增生,板层小体结构松散、空泡化(图 1B)。哮喘组:肉眼可见肺脏体积增大,有形状不规则的暗红色充血区;镜下可见支气管及伴行血管周围,大量炎症细胞浸润,肺间质及肺泡腔内可见嗜酸性粒细胞,支气管腔内可见黏液栓,黏膜皱襞减少,杯状细胞增生,血管平滑肌明显增生,部分肺泡间隔融合形成肺气肿(图 1C)。双重感染组:兼具 RSV 感染组及哮喘组的表现,肉眼观不规则暗红色充血区范围扩大,镜下炎症细胞浸润明显,明显肺间质炎症改变(图 1D)。地塞米松干预组:肉眼可见体积与正常对照组无明显变化,可及少量点状暗红色充血区;镜下未见明显炎症细胞浸润,无明显间质性改变(图 1E)。

2.3 肺组织 RSV 病毒分离及免疫荧光鉴定

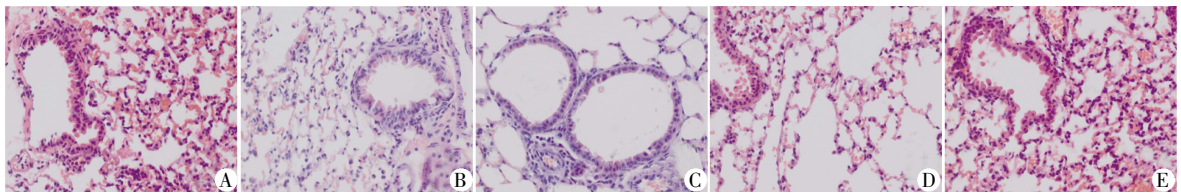
对 RSV 感染组、双重感染组及地塞米松干预组的 RSV 病毒分离阳性的标本进行免疫荧光检查, 荧光显微镜下可观察到细胞质内出现绿色荧光, 呈颗粒状或弥散状分布。病毒分离阴性的标本中未见荧光。正常对照组未分离到 RSV 病毒。

2.4 免疫荧光检测 GRK2 的表达

背景为黑色, 阳性细胞主要在胞浆内, 被染为亮

红色; 细胞膜被染为暗红色; 细胞核被染成蓝色(图 2)。正常对照组荧光强度大多为(+), RSV 感染组大多为(++), 哮喘组大多为(+++), 双重感染组大多为(+++), 地塞米松干预组大多为(+)(图 3)。RSV 感染组 GRK2 表达较正常组增加, 与哮喘组相比无差异; 双重感染组 GRK2 表达较 RSV 感染组增加; 地塞米松干预组 GRK2 表达较 RSV 感染组减少。

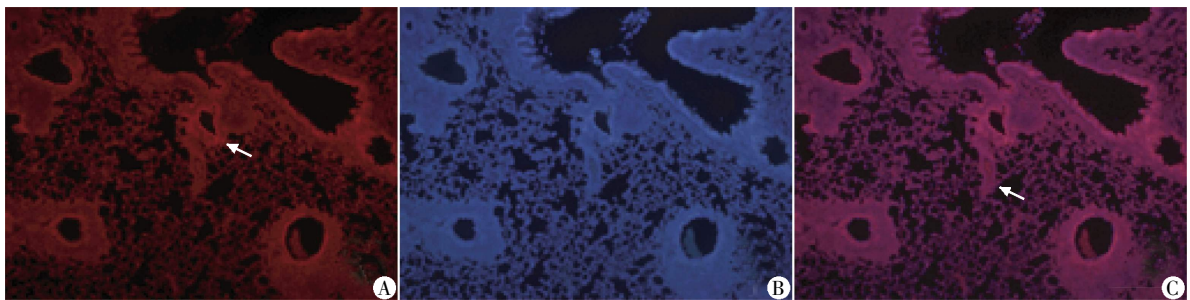
2.5 Western blot 检测 GRK2 的表达



A: 正常对照组; B: RSV 感染组; C: 哮喘组; D: 双重感染组; E: 地塞米松干预组。

图 1 各组肺组织病理变化(HE, ×400)

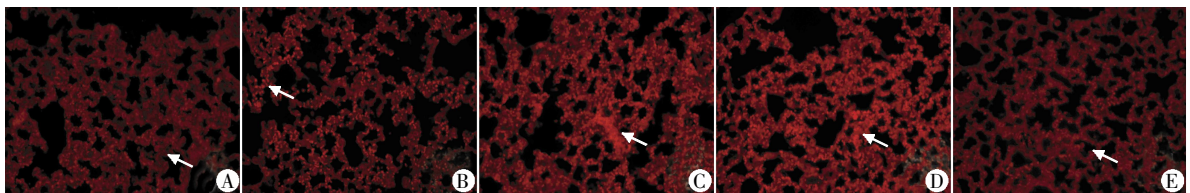
Figure 1 Pathological changes of lung tissue(HE, ×400)



A: GRK2 在胞浆中的表达; B: 细胞核 DAPI 染色; C: 图 A、图 B 融合。箭头所指为 GRK2 阳性细胞。

图 2 GRK2 在细胞中的表达(免疫荧光染色, ×200)

Figure 2 GRK2 expression in lung cells(immunofluorescence staining, ×200)



A: 正常对照组(+); B: RSV 感染组(++); C: 哮喘组(+++); D: 双重感染组(+++); E: 地塞米松干预组(+)。箭头所指为阳性细胞。

图 3 各组肺组织 GRK2 的表达(免疫荧光染色, ×400)

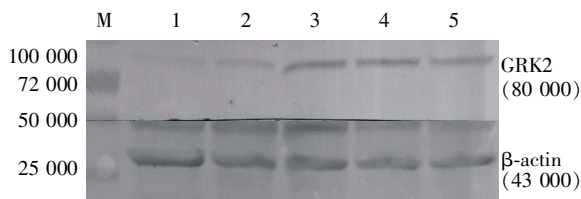
Figure 3 GRK2 expression of lung tissue in each group (immunofluorescence staining, ×400)

蛋白电泳结果示 GRK2 分子量为 80 000, 故此处的蛋白条带为目的条带。Western blot 检测 GRK2 的表达结果(图 4): RSV 感染组与正常组相比较差异有统计学意义(1.331 5 ± 0.003 7 vs 1.151 1 ± 0.050 0, P < 0.01); RSV 感染组与哮喘组比较差异有统计学意义(1.331 5 ± 0.003 7 vs 1.564 5 ± 0.028 0, P < 0.01); 而双重感染组与哮喘组相比差异有统计学意义(1.722 1 ± 0.008 8 vs 1.564 5 ± 0.028 0, P < 0.01);

地塞米松干预组与 RSV 组相比差异有统计学意义(1.189 5 ± 0.017 0 vs 1.331 5 ± 0.003 7, P < 0.01)。结果与免疫荧光检测法一致(表 1)。

3 讨论

观察 RSV 感染后 Balb/c 小鼠肺组织 GRK2 变化的关键是成功建立感染动物模型。本研究采取腹腔致敏结合雾化激发制备哮喘模型, 经多种实验研



M:Marker; 1:正常对照组;2:RSV 感染组;3:哮喘组;4:双重感染组;5:地塞米松干预组。

图 4 Western blot 检测各组肺组织 GRK2 的表达

Figure 4 GRK2 expression of lung tissue in each group by Western blot

表 1 比较各组 GRK2 灰度值

Table 1 Comparison of GRK2 gray value in each group

组别	灰度值
正常对照组(n=20)	1.151 1 ± 0.050 0
RSV 感染组(n=20)	1.331 5 ± 0.003 7*
哮喘组(n=20)	1.564 5 ± 0.028 0#
双重感染组(n=20)	1.722 1 ± 0.008 8# <sup>Δ</sup>
地塞米松干预组(n=20)	1.189 5 ± 0.017 0#

F = 1.544E3, P < 0.01。与正常对照组比较, \*P < 0.05; 与 RSV 感染组比较, #P < 0.05; 与哮喘组比较, <sup>Δ</sup>P < 0.05。

究证实<sup>[8-9]</sup>,是一种简单有效,能够获得典型变应性炎症的有效方法。而 RSV 毒力相对较弱,感染的动物模型不易建立,本研究选用毒性较强的 RSV-A 型病毒毒株,培养时严格无菌操作,滴定其毒力,稀释所需的病毒浓度,同时选用对 RSV 感染敏感的 6~8 周龄的幼龄 Balb/c 小鼠,取一定剂量的病毒悬液对处于轻度麻醉状态下的 Balb/c 小鼠进行鼻内感染。本实验组在 RSV 感染后肺炎炎症达到高峰的第 6 天,取肺组织制成 HE 切片,电镜下即显示有明显炎症变化,实验组肺组织分离到 RSV,病毒分离阳性的标本免疫荧光检查亦为阳性。说明 Balb/c 小鼠 RSV 肺部感染动物模型的建立是成功的。

RSV 是引起 6 个月以下婴儿毛细支气管炎和肺炎的最常见病因,1 岁以下感染率为 68.8%, 25%~40%与日后发生反复喘息和哮喘密切相关。已有实验证实 RSV 感染致气道高反应性的重要机理之一是神经-受体失衡机制<sup>[10]</sup>,一方面维持气道正常功能的  $\beta$  受体亲和力下降<sup>[11]</sup>,另一方面介导气道平滑肌收缩和促进过敏介质释放的 M 受体密度和亲和力改变<sup>[12]</sup>,表现出明显的受体系统之间的失衡。

$\beta$ -AR 是一种 G 蛋白偶联受体,分为  $\beta$ 1-AR、 $\beta$ 2-AR、 $\beta$ 3-AR,肺组织主要表达  $\beta$ 2-AR<sup>[13]</sup>。既往发

现,RSV 感染后小鼠肺组织的  $\beta$ -AR 受体功能下调,推测下调机制可能与受体内化有关<sup>[3]</sup>。

GRK2 是 GRKs 的家族成员之一,它能使多种处于激动剂结合状态的 G 蛋白偶联受体(G protein coupled receptors, GPCRs)磷酸化,主要作用于  $\beta$ -AR 羧基末端的第 355 至 364 位氨基酸序列,磷酸化的  $\beta$ -AR 对抑制蛋白  $\beta$ -arrestins 具有募集作用,并与之形成转导复合体(receptor-signaling complex),导致受体与异三聚体的 G 蛋白失偶联和受体反应性的丧失。目前认为<sup>[14]</sup>,通过 G 蛋白进行信号转导的 GPCRs (包括  $\beta$ -AR)在持续的激动剂刺激下通常以信号的快速衰减机制进行调控,这种同类 GPCRs 的失敏部分是由 GRKs 介导的。

GRKs 使激活态或配基结合态的受体底物磷酸化,促进了受体与调节蛋白  $\beta$ -arrestins 的结合,阻止了受体进一步与 G 蛋白偶联;GRK2 还是 Gq 蛋白介导的信号转导途径中重要的反馈抑制分子,它通过与 6 种信号转导分子,包括受体蛋白、4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP2)、游离的 G 蛋白  $\beta$ 、 $\gamma$  亚基、活化 Gq 蛋白的  $\alpha$  亚基、PKC 和钙调蛋白间相互作用,对该信号转导途径进行负反馈调节<sup>[15]</sup>。本研究中 RSV 组 GRK2 表达显著高于正常对照组和地塞米松干预组,引起肺组织 GRK2 蛋白表达增加,推测其可促进  $\beta$ -AR 与 G 蛋白解偶联及  $\beta$ -AR 与  $\beta$ -arrestins 结合,从而促进  $\beta$ -AR 内化并减弱或阻断  $\beta$ -AR 的信号内传,这可能是 RSV 感染导致肺组织  $\beta$ -AR 下调和  $\beta$ -AR 激动剂失敏的重要机制。双重感染组 GRK2 表达显著高于 RSV 感染组及哮喘组,推测 RSV 感染后 GRK2 表达进一步增加,抑制受体进行 G 蛋白偶联,使得  $\beta$ -AR 下调,造成临床表现较重, $\beta$  受体激动剂应用效果不佳。

同时有研究表明,糖皮质激素的使用可以刺激  $\beta$ 2-AR 基因的转录,上调  $\beta$ -AR 的表达,使临床个体对  $\beta$ -AR 的激动剂反应敏感<sup>[16]</sup>,本研究中地塞米松干预组 GRK2 表达显著低于 RSV 感染组,推测应用地塞米松治疗可以降低 GRK2 表达,增加偶联的有效性,防治炎症诱导的下调和脱偶联,对降低  $\beta$ -AR 受体减敏有一定的作用。

综上所述,RSV 感染引起气道高反应或肺间质炎症时,Balb/c 小鼠肺组织有丰富的 GRK2 表达,这可能是  $\beta$ -AR 下调的重要机制;地塞米松可以明显降低 GRK2 表达,在治疗 RSV 感染或合并哮喘时有一定疗效,从而为  $\beta$  受体激动剂耐药的哮喘治疗提供一定依据。

[参考文献]

[1] 陈小琴,冯车举,姚堃. 340例儿童急性呼吸道感染常见病毒病原的检测[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2010,30(12):1756-1759

[2] 李晓波,呼永和,甘庆,等. 浅论高湿环境对哮喘发病的影响[J]. 西南国防医药, 2011,21(1):21-25

[3] Umeda N, Yoshikawa T, Kanazawa H, et al. Association of beta 2-adrenoreceptor genotypes with bronchodilatory effect of tiotropium in COPD[J]. *Respirology*, 2008, 13(3): 346-352

[4] Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling[J]. *Pharmacol Bey*, 2001, 53(1): 1-24

[5] 许先科,郑冬雅,邵征洋,等. 清肺饮对呼吸道合胞病毒感染大鼠血清白细胞介素-4、干扰素- $\gamma$ 及肺组织的影响[J]. 中华中医药学刊, 2012,30(7): 1590-1592

[6] 蒋雄斌,殷凯生,黄茂,等. 呼吸道合胞病毒感染对卵白蛋白诱导哮喘小鼠气道高反应性的影响[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2011,10(1): 11-15

[7] Okubo E, Lehman JM, Friedrich TD. Negative regulation of mitotic promoting factor by the checkpoint kinase chk1 in simian virus 40 lytic infection[J]. *J Virol*, 2003, 77(2), 1257-1267

[8] 蒋莉,金蕊,李悦,等. 哮喘易感基因 ORMDL3 在哮喘小鼠中的表达及地塞米松的干预作用[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2013,33(6): 744-748

[9] 王文璐,李红岩,苗伟伟,等. 布地奈德抑制支气管哮喘小鼠 TSLP 及 TH2 免疫作用的研究[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2012,32(9): 1207-1210

[10] 田蔓,葛传生,麦根荣. 病毒感染引起气道高反应性的神经受体机制 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(1): 45-46

[11] 田蔓,赵德育,葛传生,等. 呼吸道合胞病毒感染对豚鼠肺组织  $\beta$ 、M 受体变化的影响[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2006, 20(4): 367-369

[12] 赵德育,葛传生,田蔓,等. 呼吸道合胞病毒感染对豚鼠肺组织 M 受体变化的影响[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2002, 22(5): 379-400

[13] 肖贞良,孙耕耘,钱桂生,等. 脂多糖诱导急性肺损伤大鼠肺组织 GRK2 变化的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(10): 1176-1178

[14] Krupnick JG, Benovic JL. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1998, 38(2): 289-319

[15] Banday AA, Fazili FR, Lokhandwala MF. Insulin causes renal dopamine D1 receptor desensitization via GRK2-mediated receptor phosphorylation involving phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 293(3): F877-F844

[16] 刘华,殷凯生.  $\beta_2$  肾上腺素能受体减敏及其激素保护的研究进展 [J]. 国际呼吸杂志, 2007, 27(11): 830-833

[收稿日期] 2014-03-13

《南京医科大学学报(自然科学版)》荣获首届  
江苏省新闻出版政府奖

由中共江苏省委宣传部、江苏省新闻出版(版权)局、江苏省财政厅、江苏省人力资源和社会保障厅共同主办的首届江苏省新闻出版政府奖评选表彰结果公布,经评审委员会评审和评选工作领导小组审定,并经过严格的指标评定,《南京医科大学学报(自然科学版)》荣获江苏省新闻出版政府奖报刊提名奖。该奖项中报刊奖期刊类 20 种,报刊提名奖期刊类 14 种。江苏省共有 441 种期刊出版,此次仅有 34 种期刊获此殊荣。