

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.17.003

麦门冬汤加减方对特发性肺纤维化小鼠 PI3K/AKT/mTOR 通路的调控*

刘珊珊¹ 盛春瑞¹ 杜庆红^{1,2} 仁青加² 陈以文¹宗晨钟¹ 王珊珊¹ 董瑞娟¹ 葛东宇¹ 王淑艳¹ 李丽娜^{1Δ}

(1 北京中医药大学中医学院 北京 100029; 2 西藏藏医药大学 西藏 拉萨 850000)

摘要 目的:探讨麦门冬汤加减方对特发性肺纤维化小鼠转化生长因子- $\beta 1$ (Transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)、平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、胶原 I (Collagen type I, COL1A) 表达的影响以及对 PI3K/AKT/mTOR 通路的调控作用。**方法:**将 120 只 SPF 级 ICR 小鼠随机分入空白组、模型组、吡菲尼酮组和麦门冬汤加减方组,用博来霉素(5 mg/kg)建立特发性肺纤维化模型,24 h 后分别给予相应的药物治疗。吡菲尼酮组和麦门冬汤加减方组小鼠分别灌胃吡菲尼酮和中药麦门冬汤加减方,空白组和模型组小鼠灌胃生理盐水,各组均连续给药 3 周(21d)后取材。观察指标:各组小鼠的肺系数;肺组织病理变化;肺组织 TGF- $\beta 1$ 、 α -SMA、COL1A 的表达量(免疫组化);肺组织中 α -SMA、COL1A、p-PI3K、p-AKT、mTOR 的蛋白表达量(Western blot);肺组织中 TGF- $\beta 1$ 、 α -SMA、COL1A 的 mRNA 表达量(qPCR)。**结果:**模型组小鼠的肺系数显著增加,麦门冬汤加减方组肺系数显著降低;模型组小鼠肺组织中有较多炎性细胞浸润,胶原沉积明显,肺泡结构破坏严重,麦门冬汤加减方组小鼠肺组织病理改变较模型组明显减轻,胶原沉积大量减少,肺泡结构逐渐修复;麦门冬汤加减方组较模型组 α -SMA、COL1A、TGF- $\beta 1$ 的蛋白表达量显著降低($P < 0.01$);麦门冬汤加减方组较模型组 α -SMA、COL1A、p-PI3K、p-AKT、mTOR 的蛋白表达量显著下调($P < 0.01$);麦门冬汤加减方组较模型组 α -SMA、COL1A、TGF- $\beta 1$ 的 mRNA 表达量显著降低($P < 0.01$)。**结论:**麦门冬汤加减方能有效改善博来霉素诱导的特发性肺纤维化,降低 α -SMA、COL1A、TGF- $\beta 1$ 的表达,可能是通过调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,抑制上皮间充质转化,减少细胞外基质沉积而发挥作用。

关键词:特发性肺纤维化;麦门冬汤;PI3K/AKT/mTOR 通路;平滑肌肌动蛋白;胶原 I;转化生长因子- $\beta 1$;上皮间充质转化(EMT)

中图分类号:R-33;R563;R243;R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)17-3214-06

Regulation of Maimendong Decoction on PI3K / Akt / mTOR Pathway in Mice with Idiopathic Pulmonary Fibrosis*

LIU Shan-shan¹, SHENG Chun-rui¹, DU Qing-hong^{1,2}, REN Qing-jia², CHEN Yi-wen¹,ZONG Chen-zhong¹, WANG Shan-shan¹, DONG Rui-juan¹, GE Dong-yu¹, WANG Shu-yan¹, LI Li-na^{1Δ}

(1 Beijing University of traditional Chinese Medicine, Beijing, 100029, China;

2 University of Tibetan Medicine, Lasa, Tibetan, 850000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of Maimendong Decoction on transforming growth factor in mice with idiopathic pulmonary fibrosis- $\beta 1$ (Transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$), α -smooth muscle actin(α -SMA), Collagen type I(COL1A) expression and regulation of PI3K/AKT/mTOR pathway. **Methods:** 120 SPF ICR mice were randomly divided into blank group, model group, pirfenidone group and traditional Chinese medicine group. The IPF model was replicated with bleomycin (5 mg / kg) and treated with corresponding drugs 24 hours later. The mice in the piffinone group and the Maimendong decoction plus and minus prescription group were intragastrically infused with pirfenidone and the traditional Chinese medicine Maimendong decoction, respectively, and the mice in the blank group and model group were intragastrically injected with normal saline, and the samples were taken after continuous administration for 3 weeks (21 days). Observation index: Lung coefficient and pathological changes of lung tissue in each group; Lung tissue TGF- $\beta 1$, α -SMA and COL1A; TGF- $\beta 1$, α -SMA and COL1A (qPCR), and α -SMA, COL1A, p-PI3K, p-Akt and mTOR (Western blot). **Results:** The lung coefficient of mice in the model group increased significantly, while that in the Maimendong decoction group decreased significantly, there were more inflammatory cell infiltration, obvious collagen deposition and serious destruction of alveolar structure in the model group. The pathological changes of lung tissue in the Maimendong decoction group were significantly less than those in the model group, the collagen deposition decreased greatly, and the alveolar structure was repaired gradually. The protein

* 基金项目:西藏自治区重点研发计划项目(XZ202001ZY0001G);西藏自治区藏医药管理局级科技专项(JJKT2020006);

西藏藏医药大学 2019 年中医学(藏医)博士点建设项目(XZ202001ZY0001G)

作者简介:刘珊珊(1992-),女,硕士研究生,研究方向:经方治疗疑难病的分子机制,E-mail: 1990568559@qq.com

Δ 通讯作者:李丽娜(1974-),女,硕士生导师,副教授,主要研究方向:经方治疗疑难病的分子机制,

E-mail: lilina1024@126.com, 电话: 18201012962

(收稿日期:2022-02-06 接受日期:2022-02-28)

expressions of α -SMA, COL1A, TGF- β 1, α -SMA, COL1A, p-PI3K, p-AKT, mTOR and mRNA expression of α -SMA, COL1A and TGF- β 1 in Maimendong decoction group were significantly lower than those in model group ($P<0.01$), and the protein expressions of α -SMA, COL1A, TGF- β 1 in Maimendong decoction modified prescription group were significantly lower than those in model group ($P<0.01$), and the protein expressions of α -SMA, COL1A, TGF- β 1 in Maimendong decoction modified prescription group were significantly lower than those in model group ($P<0.01$). **Conclusion:** Maimendong decoction can effectively improve bleomycin induced pulmonary fibrosis and reduce α -SMA, COL1A, TGF- β 1 may play a role by regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, inhibiting epithelial mesenchymal transformation and reducing extracellular matrix deposition.

Key words: Idiopathic pulmonary fibrosis; Modified Maimendong decoction; PI3K/AKT/mTOR pathway; α -SMA; COL1A; TGF- β 1; Epithelial mesenchymal transformation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R563; R243; R285.5 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2022)17-3214-06

前言

特发性肺纤维化(Idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种慢性、进行性、难以治愈的间质性肺疾病,以呼吸困难、干咳等为主要临床表现^[1-3]。本病好发于 50-70 岁的男性,且其发病率随年龄增长而增加^[4]。确诊后患者的中位生存期为 2-3 年^[5],目前尚无治疗 IPF 的临床特效药,因此,寻找有效的治疗药物一直是本领域的研究热点。近年来,中医药治疗肺纤维化优势愈加显著,不仅副作用小,还能有效缓解肺纤维化症状^[6],受到越来越多研究者的关注。麦门冬汤出自《金匱要略》,是治疗肺痿咳嗽的经典方剂,具有清养肺胃、降逆下气的功效。研究表明,麦门冬汤可治疗肺纤维化,可缓解炎症,降低氧化应激水平^[7],但其作用机制尚不明确。PI3K/AKT/mTOR 通路是参与肺纤维化的重要通路,通过调控上皮间充质转化(Epithelial mesenchymal transformation, EMT),使细胞质基质不断沉积,使肺纤维化进行性加重^[8]。本文通过观察 α -SMA、COL1A、TGF- β 1 的表达情况,分析麦门冬汤加减方对 PI3K/AKT/mTOR 通路的调控作用,以期探索该方治疗肺纤维化的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

雄性 ICR 小鼠,120 只,SPF 级,体质量(20 ± 2)g,6-8 周龄,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2019-0010。动物饲养于北京中医药大学屏障环境动物室,温度(22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度(65 ± 5) $^{\circ}\text{C}$,12 h 昼夜循环光环境,普通饲料喂食、自由进食饮水。

1.2 药物与试剂

麦门冬汤加减方(购于北京康仁堂药业),由麦冬、生黄芪、当归、桔梗、五味子、麻黄、丹参、党参、黄芩、炙甘草、清半夏、干姜组成;注射用盐酸博来霉素(浙江海正;H20055883);吡菲尼酮(源叶生物;S80784);Masson 三色染色试剂盒(索莱宝;G1340);BCA 蛋白定量试剂盒(普利莱;P1511);总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、PCR 扩增试剂盒(艾科瑞;AG21017、AG11705、AG11701);PCR 引物(鼎国昌盛);ECL Plus 超敏发光液(赛维儿;G2020); α -SMA 抗体、COL1A 抗体(CST;19245、72026);p-PI3K 抗体、p-AKT 抗体、mTOR 抗体(Abcam;ab140307、ab18785、ab32028);内参 β -Actin(四正柏生物;4ab000001)。

1.3 仪器

多功能台式离心机(德国 Eppendorf);曝光机(美国 Bio-rad);实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-rad);石蜡包埋机、全自动切片机(德国 Leica);全自动免疫组化染色仪(Thermo)。

2 方法

2.1 造模与治疗

根据随机数字表法,将 120 只 ICR 小鼠随机分入空白组、模型组、吡菲尼酮组、中药组,每组 30 只,除空白组外,其他 3 组小鼠用气管内注射博来霉素(5 mg/kg)方法建立 IPF 模型^[9]。即麻醉小鼠,剪开颈部皮肤,将气管暴露,用 1 mL 注射器针头插入气管并注射博来霉素。从造模第二天开始,吡菲尼酮组和中药组分别灌胃吡菲尼酮(78 mg/kg)和麦门冬汤加减方(药物剂量为:麦冬 25 g,黄芪 30 g,当归 30 g,五味子 15 g,麻黄 26 g,桔梗 21 g,丹参 9 g,党参 8 g,黄芩 3 g,清半夏 1 g,干姜 1 g,炙甘草 5 g),制作成颗粒剂,参照动物与人体表面积折算系数,小鼠每日用药量为: 20.8 g/kg ($160\text{ g}/70\text{ Kg}\times 9.1$),灌胃剂量为 $0.1\text{ mL}/10\text{ g}$,空白组和模型组灌胃生理盐水,1 次/d。在连续给药 3 周(21 d)后,进行取材。

2.2 小鼠肺脏系数测定

取材前称量并记录小鼠体重,用戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉小鼠,摘取全部肺组织,并用滤纸吸去残留血液,称量全肺湿重,计算肺脏系数,肺脏系数 = 全肺湿重 / 体重 $\times 100\%$ 。

2.3 肺组织病理切片观察

摘取右肺下叶组织,用 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,处以 HE 染色和 Masson 染色,其中 Masson 染色严格按照试剂盒说明操作,并用 20 倍显微镜观察小鼠肺组织纤维化情况。

2.4 免疫组化检测小鼠肺组织中 TGF- β 1、 α -SMA、COL1A 的蛋白表达

将肺组织依次进行 4%多聚甲醛固定、包埋、切片、脱蜡、PBS 冲洗、抗原修复,滴加内源性过氧化物酶,室温孵育 10 min, PBS 冲洗;滴加一抗 α -SMA(1:500 稀释)、COL1A(1:500 稀释)、TGF- β 1(1:250 稀释), 37°C 孵育 90 min, PBS 冲洗;滴加二抗,室温孵育 30 min, PBS 冲洗;加入 DAB 显色液,室温孵育 5 min,自来水冲洗,苏木素染色液孵育 1 min;分化、冲洗返蓝,梯度脱水、二甲苯透明、封片。用 40 倍显微镜分析切片,并用 Image J 软件进行评分。

2.5 Western-blot 检测小鼠肺组织中 α -SMA、COL1A、p-PI3K、

p-AKT、mTOR 的蛋白表达

每组随机选取 5 只小鼠,取小鼠右肺中叶组织,提取总蛋白,BCA 法检测蛋白浓度,加入蛋白上样缓冲液,煮沸使蛋白变性。10%SDS-PAGE 电泳分离,电压 80 v-30 min,110 v-60 min,转膜,300 mA-90 min,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗稀释液(α -SMA、COL1A、p-PI3K、p-AKT、mTOR,稀释比例分别为:1:1000、1:2000、1:3000、1:5000、1:2000,4℃ 孵育过夜,TBST 冲洗,10 min/次,洗 3 次,加入二抗(1:5000 稀释),室温摇床 1 h,TBST 冲洗,10 min/次,洗 3 次,用曝光机曝光、Image J 进行蛋

白条带灰度值分析。

2.6 q-PCR 检测小鼠肺组织中 α -SMA、COL1A、TGF- β 1 的 mRNA 表达

取小鼠肺组织(15 mg/只),按照试剂盒说明书操作,提取总 RNA,逆转录成 cDNA;以 β -Actin 为内参,进行 qPCR 的扩增。反应总体积为 20 μ L,反应程序为:95℃ 预变性 30 s,95℃ 变性 5 s,60℃ 退火及延伸 30 s,重复 40 个循环,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行数据的相对定量分析。其中引物序列见表 1。

表 1 引物序列表

Table 1 Primer sequence table

Gene	Primer sequence (5'-3')	Length
TGF- β 1	Forward Primer:CTCCCGTGGCTTCTAGTGC	19
	Reverse Primer:GCCTTAGTTTGACAGGATCTG	22
α -SMA	Forward Primer:GTCCCAGACATCAGGGAGTAA	21
	Reverse Primer:TCGGATACTTCAGCGTCAGGA	21
COL1A	Forward Primer:GCTCCTCTTAGGGGCCACT	19
	Reverse Primer:CCACGTCTCACCATTGGGG	19
β -Actin	Forward Primer:GGCTGTATTCCCCTCCATCG	20
	Reverse Primer:CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	22

2.7 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件分析,数据用均值加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对数据进行正态性检验和方差齐性检验,若方差齐,多组比较采用单因素方差分析,并在各组之间进行多重比较;若方差不齐,则用非参数检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义,用 Graphpad Prism 8.0 作图。

3 结果

3.1 小鼠的体质量和生活状态观察

造模及给药后,空白组小鼠,状态活跃,正常进食,皮毛光滑,体重增加;模型组小鼠,精神状态萎靡,进食减少,皮毛杂乱,体重明显减轻,死亡率较高;与模型组相比,中药组小鼠精神状态、进食量、皮毛光泽、体重及死亡率均改善,体重逐渐增加,死亡率降低。

3.2 对肺组织肺系数的影响

如表 2 所示,与空白组相比,模型组小鼠的肺系数显著增加 ($P < 0.01$);与模型组相比,中药组肺系数显著降低 ($P < 0.05$),差异具有统计学意义。

表 2 各组小鼠的肺系数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 2 Lung coefficient of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Groups	Lung coefficient
Contol Groups	0.59 $\pm$ 0.00
Model Groups	1.14 $\pm$ 0.10**
Pifinidong Groups	0.84 $\pm$ 0.10
Maimendong Decoction groups	0.64 $\pm$ 0.04 [#]

Note: compared with blank groups, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with model groups, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.

3.3 对肺组织病理变化的影响

3.3.1 HE 结果 如图 1 所示,空白组小鼠肺组织结构正常,肺泡膈清晰且均匀分布,无炎性细胞浸润或偶见炎性细胞;模型组小鼠肺组织结构破坏严重,肺泡内有大量炎性细胞浸润,肺泡壁增厚,部分肺泡膈断裂,肺间质纤维化明显;吡菲尼酮组和中药组肺组织结构趋于正常,炎性细胞数量显著减少,纤维化程度较模型组明显改善,且中药组纤维化改善情况比吡菲尼酮组更加显著。

3.3.2 Masson 结果 如图 2 所示,空白组无胶原蛋白沉积,模型组有大量蓝色胶原纤维,胶原沉积严重;吡菲尼酮组和中药

组蓝色胶原纤维沉积面积明显减少,且中药组蓝色胶原纤维沉积面积减少更加明显。

3.4 免疫组化法对肺组织 α -SMA、COL1A、TGF- β 1 蛋白的影响

如表 3 及图 3 所示,与空白组相比,模型组 α -SMA、COL1A、TGF- β 1 的蛋白含量均显著增加 ($P < 0.01$),差异具有统计学意义;与模型组比较,中药组 α -SMA、COL1A、TGF- β 1 蛋白含量均显著降低 ($P < 0.01$),差异具有统计学意义。

3.5 对肺组织 α -SMA、COL1A、p-PI3K、p-AKT、mTOR 蛋白表达的影响

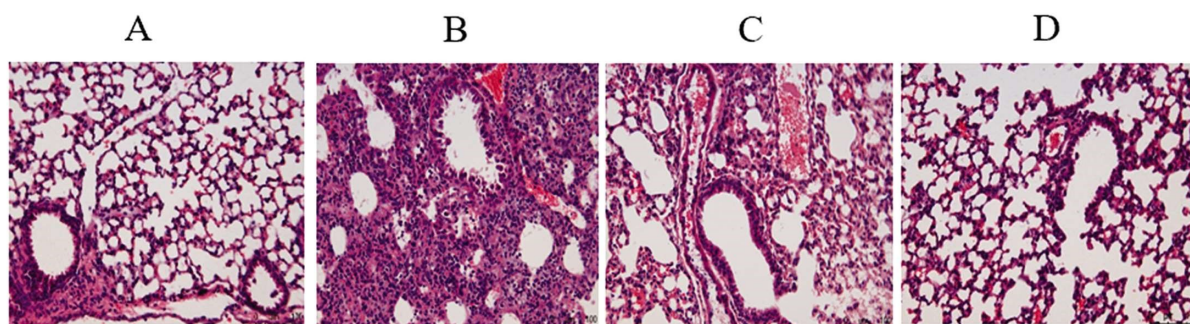


图 1 小鼠肺组织病理变化(HE 染色, ×20)

Fig. 1 Pathological changes of lung tissue in mice(HE dyeing, ×20)

Note: A control groups, B model groups, C Pifnidone groups and D Maimendong Decoction groups.

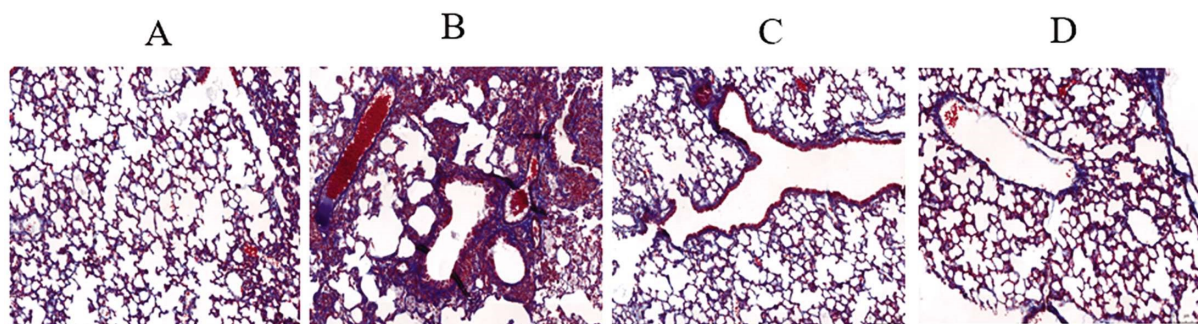


图 2 小鼠肺组织病理变化(Masson 染色, ×20)

Fig. 2 Pathological changes of lung tissue in mice(Masson dyeing, ×20)

Note: A control groups, B model groups, C Pifnidone groups and D Maimendong Decoction groups

表 3 α -SMA、COL1A、TGF- β 1 免疫组化评分表($\bar{x} \pm s$, n=3)

Table 3 α -SMA, COL1A, TGF- β 1 Immunohistochemical score table($\bar{x} \pm s$, n=3)

Groups	α -SMA	COL1A	TGF- β 1
Contol Groups	8.25±0.91	28.41±1.17	15.07±0.69
Model Groups	29.69±0.85**	53.42±0.31**	43.26±1.04**
Pifnidong Groups	25.00±1.00	30.74±1.32	33.79±0.75
Maimendong Decoction groups	17.41±0.38 [#]	27.36±0.81 [#]	29.75±0.94 [#]

Note: compared with blank groups, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with model groups, # $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$.

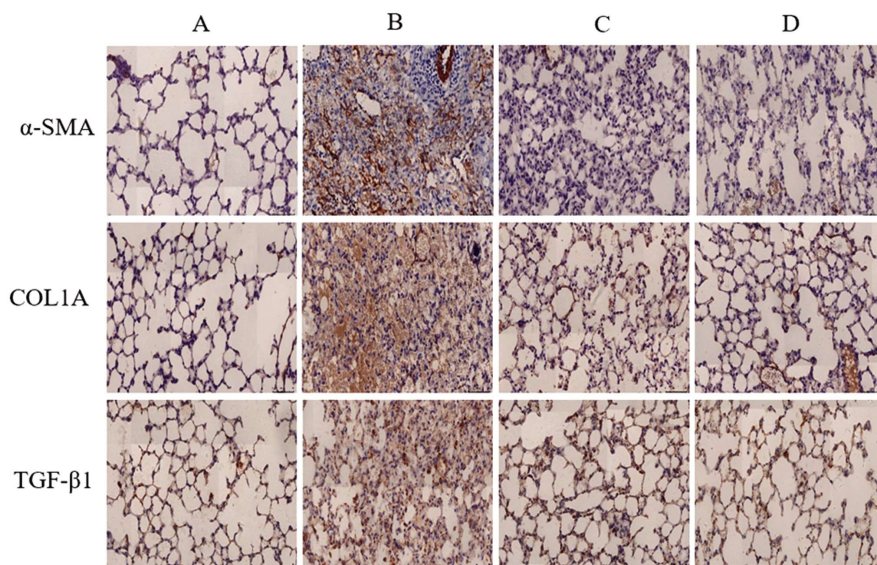


图 3 α -SMA、COL1A、TGF- β 1 免疫组化图(×40)

Fig. 3 α -SMA, COL1A, TGF- β 1 Immunohistochemical map(×40)

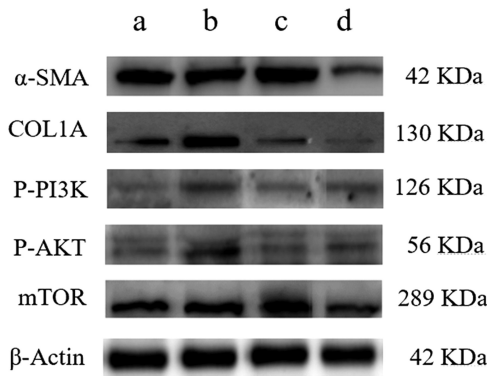


图 4 α-SMA、COL1A、p-PI3K、p-AKT、mTOR 蛋白表达量

Fig. 4 α-SMA, COL1A, p-PI3K, p-AKT, mTOR Protein expression

如图 4 及所示表 4,与空白组相比,模型组小鼠肺组织中 α-SMA、COL1A、p-PI3K、p-AKT、mTOR 蛋白表达量均显著上调($P<0.01$),差异具有统计学意义。与模型组相比,中药组小鼠肺组织中 α-SMA、COL1A、p-PI3K、p-AKT、mTOR 蛋白表达量均显著下调($P<0.01$),差异具有统计学意义。

3.6 对肺组织 α-SMA、COL1A、TGF-β1 mRNA 表达的影响

如表 5 所示,与空白组相比,模型组小鼠肺组织中 α-SMA、COL1A、TGF-β1 mRNA 表达量均显著升高($P<0.01$),差异具有统计学意义;与模型组相比,中药组小鼠肺组织中 α-SMA mRNA ($P<0.01$)、COL1A mRNA ($P<0.01$)、TGF-β1 mRNA ($P<0.05$)表达量均显著降低,差异具有统计学意义。

表 4 α-SMA、COL1A、p-PI3K、p-AKT、mTOR 蛋白表达量($\bar{x}\pm s$, n=5)

Table 4 α-SMA, COL1A, p-PI3K, p-AKT, mTOR Protein expression($\bar{x}\pm s$, n=5)

Groups	α-SMA/β-Actin	COL1A/β-Actin	p-PI3K/β-Actin	p-AKT/β-Actin	mTOR/β-Actin
Contol Groups	0.80±0.06	0.98±0.13	0.82±0.26	0.75±0.14	0.83±0.17
Model Groups	1.26±0.04**	1.55±0.18**	1.40±0.06**	1.42±0.08**	1.36±0.16**
PifinidongGroups	1.02±0.07	0.76±0.16	0.93±0.23	0.94±0.18	1.00±0.14
Maimendong Decoctiongroups	0.96±0.04 [#]	0.74±0.21 [#]	0.83±0.19 [#]	0.98±0.17 [#]	0.90±0.11 [#]

Note: A control groups, B model groups, C Pifinidone groups and D Maimendong Decoction groups. compared with blank groups, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with model groups, # $P<0.05$, [#] $P<0.01$.

表 5 α-SMA、COL1A、TGF-β1 mRNA 相对表达量($\bar{x}\pm s$, n=5)

Table 5 α-SMA, COL1A, TGF-β1 mRNA Relative expression quantity($\bar{x}\pm s$, n=5)

Groups	α-SMA mRNA	COL1A mRNA	TGF-β1 mRNA
Contol Groups	1.00±0.10	1.02±0.24	1.00±0.10
Model Groups	2.51±0.16**	3.31±0.27**	5.01±0.81**
Pifinidong Groups	1.46±0.24	2.56±0.24	4.43±0.36
Maimendong Decoction groups	0.71±0.04 [#]	2.19±0.30 [#]	2.81±0.16 [#]

Note: compared with blank groups, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with model groups, # $P<0.05$, [#] $P<0.01$.

4 讨论

IPF 在中医上没有与之精确对应的病名,医家根据症状和临床表现,多将其归属于"肺痹"和"肺痿"^[10]。肺痹之名最早记载于《黄帝内经》,如《素问·五脏生成论》"白脉之至也,喘而浮,上虚下实,惊,有积气在胸中,喘而虚,名曰肺痹",《素问·玉机真脏论》"风寒客于人,使人毫毛毕直,皮肤闭而热……病人入舍于肺,名曰肺痹",《素问·四时刺逆从论》"少阴有余病皮痹癢疹,不足病肺痹"^[11],由此可见肺痹以肺肾阴虚为本,风寒湿等外邪为标,外邪侵袭,气机不畅,经络痹阻,发为痹症。肺痿的较早记载则见于《金匱要略·肺痿肺癰咳嗽上气病脉证并治》:"热在上焦者,因咳为肺痿……", "息张口短气者,肺痿唾沫",《素问·痿论》指出"肺痿"的发病机制为"肺热叶焦"^[12],表明了肺痿的病位在上焦肺,形成原因为气阴两虚,津液不能濡养。

在治疗上,肺痹没有明确的用方,而《金匱要略》中则提出了治疗肺痿的主方麦门冬汤,后世医家将其作为治疗肺纤维化

的经典方剂^[13]。麦门冬汤原方由麦冬、半夏、粳米、甘草、大枣 5 味中药组成,本实验在麦门冬汤的基础上进行加减,组方为麦冬、五味子、炙甘草、清半夏、桔梗、生黄芪、党参、当归、丹参、麻黄、黄芩、干姜,其中党参、黄芪补气,丹参、当归活血,麦冬、五味子滋阴,半夏、桔梗化痰,全方共奏补气养阴,活血化瘀之效。实验结果证实,麦门冬汤加减方能减缓肺纤维化的进展。组织病理切片表明,模型组小鼠肺组织中出现大量炎性细胞浸润,肺组织结构被破坏,肺泡膈增宽甚至断裂,大量纤维组织出现,纤维灶形成;中药组小鼠炎性细胞数量减少,肺组织破坏程度减轻,纤维组织增生速度减慢。

IPF 的发生与 TGF-β1 的过表达有关。TGF-β 是一种生长因子,参与调节细胞的生长、增殖、分化和凋亡等许多重要的细胞过程。该生长因子有三种主要的亚型:TGF-β1、TGF-β2 和 TGF-β3,其中 TGF-β1 与 IPF 的发生发展关系最为密切^[14]。TGF-β1 存在于肺间质中,当上皮细胞或内皮损伤时,TGF-β1 从潜伏状态转变为活化状态^[15],促使成纤维细胞转化为肌成纤维细胞,细胞外基质(ECM)不断沉积和胶原堆积,破坏肺的结

构,发生肺纤维化^[16,17]。既往研究表明,麦门冬汤可抑制肺组织中 TGF- β 1 的表达^[18,19],通过改善气道周围纤维化区的间质增生,降低 IPF 小鼠模型的肺脏质量和肺脏系数^[20];肺系数是肺湿重与体重的比值,是反映肺纤维化程度的一个重要指标^[21],本实验中,模型组小鼠的体重不断减轻,但肺重反而增加,导致肺系数较正常组高,反映了肺纤维化过程中,胶原的沉积与细胞质基质的不断积累,因此,肺纤维化越严重,肺湿重越重,肺系数也越高;中药组小鼠的体重减轻缓慢,且肺重较轻,使肺系数低于模型组,反映了中药组肺纤维化程度较模型组明显减轻。

IPF 的发生与上皮向间充质转化(Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)有关。EMT 是指上皮细胞失去细胞极性和细胞间黏附力,获得迁移和侵袭特性,使细胞骨架重构,最终转化为间充质细胞的过程^[22,23]。在这一过程中,上皮细胞标志物 E-cadherin 的表达降低,间充质细胞标志物如 α -SMA、Vimentin、COL1A 的表达上调^[24]。本次研究结果表明,与空白组小鼠相比,模型组小鼠的 α -SMA、COL1A、TGF- β 1 mRNA 表达量和蛋白表达量均显著增加,提示上皮细胞损伤时,可通过激活 TGF- β 1 发生 EMT,使 α -SMA、COL1A 的表达量增加,促进 IPF 的形成。

同时,肺纤维化的发生和发展与 PI3K/Akt/mTOR 通路的激活密切相关^[25],它参与了肺纤维化的发病过程^[26]。当 PI3K 被激活时,PI3K 上的 p110 亚基可与 p85 亚基结合将底物 PIP2 转化为 PIP3^[27];PIP3 活化 AKT 的 Thr308 和 Ser473 位点,活化的 AKT 进一步磷酸化 mTOR 的 Ser2448 位点,激活 mTOR; mTOR 位于 PI3K/AKT 的下游,可影响转录与蛋白质的合成^[28,29],PI3K 活化对一些与纤维化形成相关的细胞过程是必不可少的,包括细胞生长、增殖、迁移、存活、自噬和胶原基因表达^[30];PI3K/AKT 通路被认为是 mTOR 活性的正调节因子,而 mTOR 可参与调节肺纤维化^[31]。研究发现,PI3K/AKT/mTOR 信号通路参与了 EMT 的过程,mTOR 复合物通过改变 PKC 磷酸化状态和激活 Akt 来调节细胞的肌动蛋白骨架,从而调节 EMT^[32]。因此,抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路可抑制 EMT,从而缓解 IPF。本研究实验结果显示,与空白组小鼠相比,模型组小鼠肺组织中 p-PI3K、p-AKT 和 mTOR 蛋白表达量较高,表明 PI3K/AKT/mTOR 信号通路被激活,经中药组治疗后, p-PI3K、p-AKT 和 mTOR 蛋白表达量降低,且间充质标志物 α -SMA、COL1A 的蛋白表达量也不同程度的降低,说明中药组能调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,进而调控 EMT 的发生,延缓 IPF 进程。

综上所述,中药麦门冬汤加减方可通过调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,使 EMT 转分化降低,降低 TGF- β 1、 α -SMA、COL1A 的表达,减少细胞质基质沉积,从而减缓 IPF 的发展进程。这一结果为 IPF 的临床药物研发提供了新方向。

参考文献(References)

- [1] Alfaro TM, Robalo Cordeiro C. Comorbidity in idiopathic pulmonary fibrosis-what can biomarkers tell us?[J]. Ther Adv Respir Dis, 2020, 14: 1753466620910092
- [2] Ammar R, Sivakumar P, Jarai G, et al. A robust data-driven genomic signature for idiopathic pulmonary fibrosis with applications for translational model selection[J]. PLoS One, 2019, 14(4): e0215565
- [3] Xu X, Dai H, Wang C. Epithelium-dependent profibrotic milieu in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis: current status and future directions[J]. Clin Respir J, 2016, 10(2): 133-141
- [4] Fang C, Huang H, Zhang Q. Relation between sex hormones and leucocyte telomere length in men with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Respirology, 2020, 25(12): 1265-1273
- [5] Kulkarni T, Willoughby J, Acosta Lara Mdel P. A bundled care approach to patients with idiopathic pulmonary fibrosis improves transplant-free survival[J]. Respir Med, 2016, 115: 33-38
- [6] 李文君,王玲. 中医治疗特发性肺纤维化研究现状 [J]. 新疆中医药, 2017, 35(03): 113-115
- [7] 陈以文. 基于“方证相应”思想对两个小鼠肺纤维化模型比较研究[D]. 北京中医药大学, 2020
- [8] 孙春斌,应艺,侯迎,等. 三七总皂苷抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路激活自噬缓解小鼠肺纤维化的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2020, 304(12): 2872-2876
- [9] Thannickal VJ, Zhou Y, Gaggari A, et al. Fibrosis: ultimate and proximate causes[J]. J Clin Invest, 2014, 124(11): 4673-4677
- [10] 魏媛,郭思佳,宋雅琳,等. 肺痿、肺痹与肺间质纤维化证候认识[J]. 吉林中医药, 2020, 40(01): 28-32
- [11] 郑洪亮. 从虚从痰论治特发性肺纤维化 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2020, 18(01): 32-34
- [12] 李想,常虹,石松利,等. 肺纤维化的中医病机及中医药治疗研究进展[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(01): 240-247
- [13] 王琦,赵亚茜,湛晓莉,等. 中医治疗肺纤维化的研究进展[J]. 河北医学, 2021, 27(10): 1751-1753
- [14] Upagupta C, Shimbori C, Alsilmi R, et al. Matrix abnormalities in pulmonary fibrosis[J]. Eur Respir Rev, 2018, 27(148): 180033
- [15] Weiss CH, Budinger GR, Mutlu GM, et al. Proteasomal regulation of pulmonary fibrosis[J]. Proc Am Thorac Soc, 2010, 7(1): 77-83
- [16] Fernandez IE, Eickelberg O. The impact of TGF- β on lung fibrosis: from targeting to biomarkers[J]. Proc Am Thorac Soc, 2012, 9(3): 111-116
- [17] Ask K, Martin GE, Kolb M, et al. Targeting genes for treatment in idiopathic pulmonary fibrosis: challenges and opportunities, promises and pitfalls[J]. Proc Am Thorac Soc, 2006, 3(4): 389-393
- [18] 刘锐,何嘉,梁梓扬,等. 麦门冬汤对肺纤维化模型大鼠肺组织转化生长因子 β 1 和基质金属蛋白酶 9 及基质金属蛋白酶组织抑制剂 1 表达的影响研究[J]. 中国全科医学, 2018, 21(29): 3590-3596
- [19] 臧明月,韩玉生,侯志涛,等. 麦门冬汤对肺纤维化大鼠 TGF- β 1、Smad3 和 Smad7 蛋白表达的影响[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2017, 38(24): 2856-2857
- [20] 张瑞,宋建平,李瑞琴,等. 麦门冬汤对肺纤维化大鼠形成阶段的影响[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(09): 2022-2024
- [21] 尹连红,许丽娜,彭金咏. 薯蓣皂苷对博来霉素诱导的大鼠肺纤维化的保护作用研究[J]. 临床肺科杂志, 2021, 26(12): 1804-1810
- [22] Wang D, Liu Z, Yan Z, et al. MiRNA-155-5p inhibits epithelium-to-mesenchymal transition (EMT) by targeting GSK-3 β during radiation-induced pulmonary fibrosis [J]. Arch Biochem Biophys, 2021, 697: 108699

- and depression, and health-related quality of life in moderate-to-severe atopic dermatitis: analysis of pooled data from the randomized trials SOLO1 and SOLO2[J]. *J Dermatolog Treat*, 2020, 31(6): 606-614
- [19] Brown SJ, Elias MS, Bradley M. Genetics in Atopic Dermatitis: Historical Perspective and Future Prospects. *Acta Derm Venereol*. 2020, 100(12): adv00163
- [20] Kumar R, Seibold MA, Burchard EG. Atopic dermatitis, race, and genetics[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2020, 145(1): 108-110
- [21] Zhang R, Zhang H, Shao S, et al. Compound traditional Chinese medicine dermatitis ointment ameliorates inflammatory responses and dysregulation of itch-related molecules in atopic dermatitis [J]. *Chin Med*, 2022, 17(1): 3
- [22] Zhang X, Shi YM, Li XM, et al. Analysis of animal model of atopic dermatitis based on characteristics of clinical symptoms traditional Chinese and Western medicine [J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2021, 46(4): 762-766
- [23] Sum CH, Ching J, Zhang H, et al. Integrated Chinese and western medicine interventions for atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 101
- [24] 郑娟. 丹参酮 II A 纳米结构脂质载体凝胶剂的制备及其抗银屑病药效的初步研究[D]. 成都中医药大学, 2017
- [25] Badloe FMS, De Vriese S, Coolens K, et al. IgE autoantibodies and autoreactive T cells and their role in children and adults with atopic dermatitis[J]. *Clin Transl Allergy*, 2020, 10: 34
- [26] Pellefigues C. IgE Autoreactivity in Atopic Dermatitis: Paving the Road for Autoimmune Diseases?[J]. *Antibodies*, 2020, 9(3): 47
- [27] Fan H, Zhang S, Li N, et al. Stable expression ratios of five pyroptosis-inducing cytokines in the spleen and thymus of mice showed potential immune regulation at the organ level [J]. *Lupus*, 2020, 29(3): 290-302
- [28] Song HY, Han JM, Byun EH, et al. Bombyx batryticatus Protein-Rich Extract Induces Maturation of Dendritic Cells and Th1 Polarization: A Potential Immunological Adjuvant for Cancer Vaccine [J]. *Molecules*, 2021, 26(2): 476
- [29] Furue M. Regulation of Filaggrin, Loricrin, and Involucrin by IL-4, IL-13, IL-17A, IL-22, AHR, and NRF2: Pathogenic Implications in Atopic Dermatitis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5382
- [30] Ren S, Gao Y, Wang L, et al. Sacran polysaccharide improves atopic dermatitis through inhibiting Th2 type immune response [J]. *Life Sci*, 2022, 288: 120205

(上接第 3219 页)

- [23] 杨召川. miR-448-5p 通过调控 Six1 抑制 TGF- β 1 诱导支气管上皮细胞 EMT 间充质转化的研究[D]. 山东大学, 2020
- [24] Kyung SY, Kim DY, Yoon JY, et al. Sulforaphane attenuates pulmonary fibrosis by inhibiting the epithelial-mesenchymal transition[J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2018, 19(1): 13
- [25] Chen D, Qiu YB, Gao ZQ, et al. Sodium Propionate Attenuates the Lipopolysaccharide-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition via the PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(24): 6554-6563
- [26] 董洪亮, 刘乃国, 苗双, 等. 1,25-(OH)₂D₃ 对肺纤维化大鼠中 PI3K、AKT、mTOR 表达的影响及其机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2018, 28(19): 1-6
- [27] 罗馨. MicroRNA-199a-3p 调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对 HELF 细胞表型转化的作用及机制[D]. 南昌大学, 2020
- [28] 赵跃恒, 常姍, 史瑞玲, 等. 麦门冬汤对间质性肺炎小鼠 II 型肺泡上皮细胞自噬及肺水清除的作用机制研究[J]. *浙江中医药大学学报*, 2021, 45(02): 116-123
- [29] 马梓茗. 丹贝益肺汤对肺纤维化大鼠 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的调控研究[D]. 黑龙江省中医药科学院, 2019
- [30] Han B, Chu C, Su X, et al. N6-methyladenosine-dependent primary microRNA-126 processing activated PI3K-AKT-mTOR pathway drove the development of pulmonary fibrosis induced by nanoscale carbon black particles in rats[J]. *Nanotoxicology*, 2020, 14(1): 1-20
- [31] He J, Peng H, Wang M, et al. Isoliquiritigenin inhibits TGF- β 1-induced fibrogenesis through activating autophagy via PI3K/AKT/mTOR pathway in MRC-5 cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2020, 52(8): 810-820
- [32] Hu X, Xu Q, Wan H, et al. PI3K-Akt-mTOR/PFKFB3 pathway mediated lung fibroblast aerobic glycolysis and collagen synthesis in lipopolysaccharide-induced pulmonary fibrosis [J]. *Lab Invest*, 2020, 100(6): 801-811