

· 药理 ·

## 黄芪甲苷对特发性肺纤维化自噬活性作用及 PI3K/Akt/mTOR 信号调控的影响

徐昌君<sup>1</sup>, 王鹏飞<sup>1</sup>, 刘杨<sup>1</sup>, 黄紫薇<sup>2</sup>, 杨长福<sup>1\*</sup>, 赵宗江<sup>2\*</sup>

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

**[摘要]** 目的:研究黄芪甲苷对特发性肺纤维化自噬活性影响及其磷酸酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/mTOR 信号的调控作用,探讨黄芪的抗肺纤维化机制。方法:c57bl/6 小鼠分为假手术组、模型组、黄芪甲苷低、中、高剂量组、泼尼松组。博来霉素(BLM)10 mg·kg<sup>-1</sup>诱导建立肺纤维化动物模型,以黄芪甲苷低、中、高剂量(25,50,100 mg·kg<sup>-1</sup>)干预,分别于 3, 7,14,28 d 取材,进行苏木素-伊红(HE)染色观察肺组织形态变化,马松(Masson)三色染色、羟脯氨酸测定观察胶原表达水平,免疫组化及蛋白质免疫印迹(Western bolt)分析自噬标记蛋白和 PI3K/Akt/mTOR 信号蛋白表达水平。结果:与空白组比较,模型组肺组织炎症反应明显,胶原蛋白显著增加( $P < 0.01$ ),PI3K/Akt/mTOR 信号增强,自噬活性下降,与模型组比较,黄芪甲苷中、高剂量明显抑制肺组织炎症反应,下调转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )( $P < 0.01$ )和胶原蛋白( $P < 0.05$ )表达,提高 LC3 II/I 和(becn-1)表达( $P < 0.05$ ),减少 p62 积累( $P < 0.05$ ),同时抑制 PI3K,Akt,mTOR 磷酸化水平( $P < 0.05$ ),减少  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)而提高 E-钙黏素(E-cadherin)表达( $P < 0.01$ )。结论:黄芪甲苷通过抑制肺组织炎症反应、下调 TGF- $\beta_1$  表达,抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号增强肺组织细胞自噬活性,阻止上皮间质转分化(EMT)过程。

**[关键词]** 特发性肺纤维化;黄芪甲苷;自噬;上皮间质转分化;磷酸酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/mTOR 信号

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)18-0075-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017180075

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170628.1615.020.html>

**[网络出版时间]** 2017-06-28 16:15

### Regulatory Effect of PI3K/Akt/mTOR Signal on Autophagy in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Intervention Effect of Astragaloside

XU Chang-jun<sup>1</sup>, WANG Peng-fei<sup>1</sup>, LIU Yang<sup>1</sup>, HUANG Ya-wei<sup>2</sup>, YANG Chang-fu<sup>1\*</sup>, ZHAO Zong-jiang<sup>2\*</sup>

(1. Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang 550002, China; 2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the regulatory effect of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/mTOR signal on the autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis and the intervention effect of astragaloside. **Method:** The c57bl/6 Mice induced by bleomycin (BLM) were given astragaloside with low (25 mg·kg<sup>-1</sup>), medium (50 mg·kg<sup>-1</sup>) and high (100 mg·kg<sup>-1</sup>) dose by gavage. At 3, 7, 14, 28 days, lung tissues were collected for the analysis by hematoxylin-eosin (HE), Masson, immunohistochemical, and Western blot. **Result:** Astragaloside with medium dose and high dose significantly inhibited the inflammatory reaction of lung tissues,

**[收稿日期]** 20170426(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81660735,81260587);贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔科合 LH 字[2016]189)

**[第一作者]** 徐昌君,在读博士,讲师,从事中药药治疗肺纤维化研究工作,Tel:0851-5652048,E-mail:xcj1016@163.com

**[通讯作者]** \*杨长福,博士,副教授,从事中西医结合基础研究,Tel:0851-5652834,E-mail:yangchangfu@126.com;

\*赵宗江,博士,教授,从事中西医结合基础研究,Tel:010-64286926,E-mail:zongjiangz@sina.com

down-regulated expression of transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), increased LC3 II/I and beclin-1 expressions, decreased p62, inhibited phosphorylation levels of PI3K, Akt and mTOR, and strengthened cell autophagy activity. **Conclusion:** Astragaloside stopped the epithelial mesenchymal transdifferentiation (EMT) process by inhibiting the inflammatory reaction of lung tissues and the expression of TGF- $\beta_1$ , strengthening the autophagy activity and inhibiting PI3K/Akt/mTOR signal.

**[Key words]** idiopathic pulmonary fibrosis; astragaloside; autophagy; epithelial mesenchymal transdifferentiation; phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) /Akt/mTOR signaling

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是指由不明原因引起的慢性、渐进性的弥漫性间质性肺疾病 (interstitial lung disease, ILD), 发病率约占 ILD 的 20%, 5 年生存率临床不足 50%<sup>[1]</sup>。现普遍认为, 持续的肺泡上皮损伤导致的上皮间质转分化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 与 IPF 关系密切<sup>[2]</sup>, 高表达转化生长因子- $\beta_1$  (transforming growth factor  $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ ) 和自噬活性下降是导致 EMT 重要的分子机制<sup>[3]</sup>。TGF- $\beta_1$  通过激活膜 TGF- $\beta_1$  受体活化磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/mTOR 信号抑制自噬<sup>[4]</sup>。自噬缺陷可促进  $\alpha$ -平滑肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 的表达, 促进 EMT 发展<sup>[5]</sup>。

目前, 对于 IPF 无特效治疗药物, 虽然皮质激素仍在临床广泛使用, 但是其药效未得明确认可, 其副作用还可导致肝肾功能的损害及免疫功能的下调, 患者后期多数容易发生呼吸道感染<sup>[6]</sup>。新近吡非尼酮被证实通过多途径干预对 IPF 具有治疗作用<sup>[7]</sup>, 但是其价格昂贵, 购买困难目前未获得普及, 开发中医药治疗肺纤维化具有积极意义。IPF 属于中医“肺痿”、“肺痹”范畴, 病机属本虚标实, “益气”法贯穿于该病治疗的始终<sup>[8]</sup>, 黄芪作为益气药在 IPF 治疗中使用频率最高<sup>[9]</sup>, 疗效好。前期研究发现, 黄芪总皂苷可抑制博来霉素 (BLM) 诱导的肺组织炎症反应, 下调 TGF- $\beta_1$  表达<sup>[10]</sup>, 抑制肺纤维化发展, 其中黄芪甲苷能显著抑制 BLM 诱导的小鼠氧化应激状态, 延缓 IPF 进程<sup>[11-12]</sup>, 但对肺组织细胞自噬活性调控影响未见报道, 本研究基于 PI3K/Akt/mTOR 信号对自噬活性调控作用进一步研究黄芪甲苷抗肺纤维化机制, 为探索黄芪在 IPF 中的广泛应用提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康 SPF 级 c57bl/6 小鼠 360 只, 雄性, 6 周龄, 体重 18 ~ 20 g [北京维通利华实验动物有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2012-0001], 自由饮水、摄食, 适性喂养 1 周。动物实验获北京中医药

大学动物伦理委员会批准。

**1.2 药物及试剂** 黄芪甲苷 (贵州迪大生物科技有限公司, 批号 ZL150306582, 纯度 99.2%)。醋酸泼尼松片 (哈药集团制药四厂, 批号 20150702)。抗体 LC3A/B, E-cadherin, mTOR, Phospho-mTOR (美国 CST 公司, 批号分别为 70548, 70453, 605483, 60654); p62, beclin-1,  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin), phospho-PI3K p85, total-PI3K p85, Akt, TGF- $\beta_1$  (英国 Abcam 公司, 批号分别为 GR72113-5, GR70927-6, GR71854-3, GR70913-4, ab56416, GR70964-2, GR70926 1); p-Akt (北京博奥森生物技术有限公司, 批号 bsm-33281M); 羟脯氨酸测定试剂盒, Masson 染色试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号分别为 6452843, 6432656); BLM 粉剂 (日本化药株式会社, 批号 6575492); DAB 显色液 (中衫金桥, 批号 k1556158); 总蛋白提取试剂盒 (北京普利莱基因技术有限公司, 批号 P1255); BCA 蛋白定量试剂盒 (北京康为世纪生物技术有限公司, 批号 kw27543)。

**1.3 仪器** LD4-2 型低速离心机 (北京医用离心机厂), PLUS 新型 -86 °C 超低温冰箱 (美国 Thermo Scientific Revco 公司), DP73 + standard1.6 型显微镜摄像 CCD 照相系统 (日本 Olympus 公司), chemidoc™ XRS + with image lab™ software 型凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 造模与分组** c57bl/6 小鼠采用随机数字表法分为假手术组、模型组、黄芪甲苷低、中、高剂量组和泼尼松 (阳性) 组, 上述分组再分别设定为 3, 7, 14, 28 d 组, 共计 24 组, 每组 15 只。小鼠按体重给予 4% 水合氯醛 (10 mL · kg<sup>-1</sup>) 腹腔注射麻醉, 仰卧固定, 剪开皮肤, 逐层分离并暴露气管, 药物处理组和模型组经气管软骨环间隙用注射器朝向心端注入 BLM (10 mg · kg<sup>-1</sup>)<sup>[13]</sup>, 泼尼松组予等量生理盐水。造模成功后黄芪甲苷低 (25 mg · kg<sup>-1</sup>), 中 (50 mg · kg<sup>-1</sup>), 高 (100 mg · kg<sup>-1</sup>) 剂量组灌胃给药,

药物剂量根据文献[12,14]有效剂量进行换算,低剂量取有效剂量 0.5 倍,高剂量取有效剂量 2 倍。阳性组予 10 mg·kg<sup>-1</sup>,按照人和小鼠体表面积换算。分别于 3,7,14,28 d 取材。

**2.2 取材** 小鼠予 4% 水合氯醛麻醉(10 mL·kg<sup>-1</sup>),仰卧位固定,腹主动脉采血处死小鼠,取左叶肺置于 10% 中性甲醛固定做病理检查,右肺 -80℃ 冰箱冻存,进行相关检查分子检测。

**2.3 苏木素-伊红(HE)和马松(Masson)染色** 组织常规固定、脱水透明、石蜡包埋后切片,HE 常规染色:石蜡切片二甲苯脱蜡 2 次,12 min/次,乙醇梯度(100%,95%,80%,70%)入水,苏木精染色 6 min,自来水蓝化 10 min,视核染深浅进行盐酸乙醇分化,伊红染色 3 min,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。Masson 染色:石蜡切片脱蜡,入水同前,染色按照试剂盒依次操作,最后脱水、透明,封片同前。显微镜下按 Szapiel 等<sup>[15]</sup>进行积分统计。

**2.4 羟脯氨酸测定** 将肺组织 100 g 匀浆,按碱性水解法裂解组织,吸取上清 1 mL 进行测定,余按说明书操作。

**2.5 免疫组化** 组织切片常规脱蜡,梯度乙醇入水,抗原用柠檬酸缓冲液修复,3% 双氧水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)过氧化氢酶灭活,一抗肿瘤坏死因子-α(TNF-α)(1:500),TGF-β<sub>1</sub>(1:500)过夜,PBS 洗涤,二抗(1:1 000)37℃,20 min,洗涤,DAB 显色,苏木精复染,透明,封片。

**2.6 蛋白质免疫印迹(Western bolt)** 肺组织标本从 -80℃ 冰箱取出,称重,按 0.5 mg·L<sup>-1</sup>加入裂解

液匀浆,静置 10 min,1:2 加抽提试剂混匀,4℃ 静置 10 min,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,提取中间分离相,1% SDS 溶解,BCA 蛋白定量分析,4:1 加上样缓冲液 95℃ 变性。SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳:上样量 30 μg/孔,80~120 V,1.5 h,转膜(60 V,2 h),5% 脱脂牛奶封闭,一抗 LC3A/B, mTOR, phospho-mTOR, p62, beclin-1, phospho-PI3K p85, total-PI3K p85, Akt(稀释浓度均为 1:1 000),E-cadherin(稀释浓度 1:500),β-actin(稀释浓度 1:8 000)4℃ 孵育过夜,二抗(稀释浓度 1:8 000)常温下孵育 2 h(摇床轻摇),超敏发光液显色,Bio-Rad 蛋白凝胶电泳仪拍照。

**2.7 统计学处理** HE 和 Masson 染色按照 Szapiel 等<sup>[15]</sup>的方法统计,免疫组化分析软件 Image-Pro Plus 6.0,Western blot 分析软件 Image J。数据结果采用 SPSS 20.0 进行统计分析,所有数据资料用  $\bar{x} \pm s$  表示。当数据符合正态和方差齐时,各组间比较采用单因素方差分析(one-way-ANOVA),多组定量资料之间的比较采用 LSD-*t* 检验,*P* < 0.05 表示有统计学差异。

### 3 结果

**3.1 小鼠死亡情况** 与假手术组比较,BLM 诱导后,小鼠活动度减少,精神萎靡,体重减轻。模型组及药物处理组小鼠手术后均开始死亡,3 d 内模型组小鼠和泼尼松组小鼠死亡明显增加,这可能与术后创伤及 BLM 毒性作用的综合效应有关。小鼠死亡集中在 14 d 内,14 d 后小鼠死亡数量明显减少。而对于泼尼松组小鼠死亡比模型组更多,这可能与泼尼松的副作用有关。见表 1。

表 1 小鼠死亡数量比较

Table 1 Comparison of death rate in mice

只

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	死亡				剩余			
		3 d	7 d	14 d	28 d	3 d	7 d	14 d	28 d
假手术	-	0	0	0	0	15	15	15	15
模型	-	2	3	5	6	13	12	10	9
黄芪甲苷	25	1	2	4	4	14	13	11	11
	50	1	2	2	3	14	13	13	12
	100	1	2	3	4	14	13	12	11
泼尼松	10	3	4	7	8	12	11	8	7

**3.2 黄芪甲苷对 IPF 小鼠肺重指数的影响** 模型组小鼠 3 d 后肺重指数开始增加,随时间延长,肺重指数 14 d 达到最大值,而 28 d 后略有下降,但比假

手术组体重指数仍增加显著。黄芪甲苷中、高剂量组肺重指数比模型组显著下降(*P* < 0.01, *P* < 0.05),低剂量效果不明显。而对于泼尼松组,体重

指数呈上升趋势,14 d 达到最大值。28 d 后,除开假手术组小鼠,各组体重指数均下调,与模型组比

较,黄芪甲苷中、高剂量下降明显 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。见表 2。

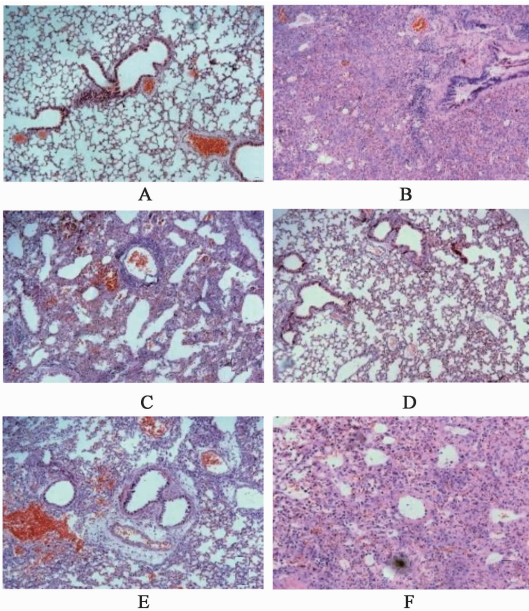
表 2 黄芪甲苷对 IPF 小鼠肺重指数的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	3 d	7 d	14 d	28 d
假手术	-	$0.58 \pm 0.12$	$0.66 \pm 0.09$	$0.59 \pm 0.19$	$0.57 \pm 0.09$
模型	-	$0.77 \pm 0.13^{1)}$	$0.96 \pm 0.13^{2,6)}$	$1.00 \pm 0.15^{2)}$	$0.80 \pm 0.08^{2,8)}$
黄芪甲苷	25	$0.63 \pm 0.08^{3)}$	$0.84 \pm 0.15^{5)}$	$0.90 \pm 0.12$	$0.76 \pm 0.11^{4)}$
	50	$0.61 \pm 0.13^{1)}$	$0.66 \pm 0.08^{3)}$	$0.73 \pm 0.14^{4)}$	$0.65 \pm 0.09^{4)}$
	100	$0.62 \pm 0.12^{1)}$	$0.70 \pm 0.12^{3)}$	$0.83 \pm 0.15^{3)}$	$0.70 \pm 0.14^{3,8)}$
泼尼松	10	$0.61 \pm 0.07$	$0.82 \pm 0.12^{1,5)}$	$0.98 \pm 0.09^{1)}$	$0.82 \pm 0.05^{1,7)}$

注:各组小鼠例数见表 1;与假手术组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ;与同剂量 3 d 组比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>6)</sup>  $P < 0.01$ ;与同剂量 7 d 组比较<sup>7)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>8)</sup>  $P < 0.01$ ;与同剂量 14 d 组比较<sup>9)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>10)</sup>  $P < 0.01$ (表 3~6 同)。

**3.3 黄芪甲苷对 IPF 小鼠肺组织炎症反应及胶原蛋白表达的影响** 正常组肺内结果清晰,肺泡间隔未见增厚,无水肿、炎症及纤维化表现,肺泡腔内无明显渗出;模型组肺泡腔内大量炎性细胞浸润,肺泡间隔增厚,肺泡塌陷,肺组织实化(图 1)。黄芪甲苷中、高剂量组能显著抑制肺组织炎性反应,尤其 7、14 d 最显著 ( $P < 0.01$ )。泼尼松抑制开始的炎症反应,但 7 d 后抑制作用减弱。见表 3。

术组比较具有显著差异 ( $P < 0.01$ )。黄芪甲苷中、高剂量显著抑制肺组织胶原蛋白表达 ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ),黄芪甲苷中高剂量处理后胶原纤维表达显著减少 ( $P < 0.01$ ),泼尼松组与模型组比较无显著性差异。见图 2,表 3。



A. 假手术组;B. 模型组;C~E. 黄芪甲苷低、中、高剂量组 ( $25, 50, 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ );F. 泼尼松组(图 2~6 同)

图 1 14 d 组黄芪甲苷对 IPF 小鼠肺组织形态的影响 (HE 染色,  $\times 200$ )

Fig. 1 Effect of astragaloside on morphology of lung tissue in day of 14 (HE,  $\times 200$ )

假手术组胶原蛋白表达少,模型组胶原蛋白表达显著提高 ( $P < 0.01$ ),7~28 d 持续增加,与假手

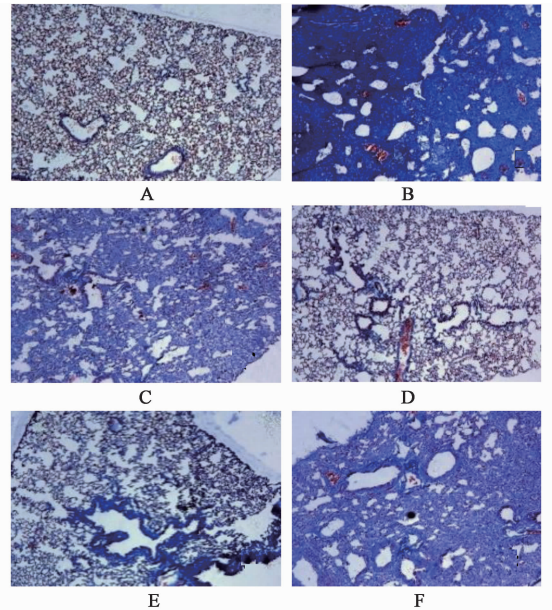


图 2 28 d 组黄芪甲苷对 IPF 小鼠肺组织胶原蛋白表达的影响 (Masson,  $\times 200$ )

Fig. 2 Effect of astragaloside on expression of collagen in lung tissue in day of 28 (Masson,  $\times 200$ )

**3.4 黄芪甲苷对 IPF 小鼠  $\alpha$ -SMA 和  $\text{TGF-}\beta_1$  表达影响** 假手术组  $\alpha$ -SMA 仅表达与气管上,模型组  $\alpha$ -SMA 在胸膜下肺组织表达显著增多,随时间逐渐增强(图 3),与假手术组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ ),黄芪甲苷中、高剂量能显著抑制  $\alpha$ -SMA 表达 ( $P < 0.01$ ),低剂量组和泼尼松组无效(表 4)。 $\text{TGF-}\beta_1$  表达在整个造模过程中均显著升高 ( $P <$

表 3 黄芪甲苷对 IPF 小鼠肺组织炎症及纤维化的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of pulmonary inflammation and fibrosis integral( $\bar{x} \pm s$ )

分

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	炎症积分				纤维化积分			
		3 d	7 d	14 d	28 d	3 d	7 d	14 d	28 d
假手术	-	1.13 ± 0.23	1.03 ± 0.22	1.25 ± 0.37	1.18 ± 0.43	1.26 ± 0.25	1.24 ± 0.53	1.32 ± 0.36	1.45 ± 0.36
模型	-	1.62 ± 0.3 <sup>2)</sup>	2.20 ± 0.57 <sup>2,5)</sup>	2.50 ± 0.30 <sup>2)</sup>	1.97 ± 0.42 <sup>2,7)</sup>	1.39 ± 0.32	2.30 ± 0.30 <sup>2,6)</sup>	2.52 ± 0.57 <sup>2)</sup>	3.03 ± 0.42 <sup>2,9)</sup>
黄芪甲苷	25	1.73 ± 0.45 <sup>3)</sup>	2.30 ± 0.44 <sup>5)</sup>	2.00 ± 0.31 <sup>3)</sup>	1.69 ± 0.28 <sup>3)</sup>	1.35 ± 0.55	2.00 ± 0.31 <sup>6)</sup>	2.34 ± 0.60 <sup>7)</sup>	2.75 ± 0.28 <sup>3)</sup>
	50	1.52 ± 0.57	1.80 ± 0.64 <sup>4)</sup>	1.60 ± 0.23 <sup>4)</sup>	1.52 ± 0.37 <sup>3)</sup>	1.33 ± 0.39	1.90 ± 0.23 <sup>3,6)</sup>	2.01 ± 0.62 <sup>3)</sup>	2.23 ± 0.37 <sup>4)</sup>
	100	1.56 ± 0.63	1.56 ± 0.38 <sup>3)</sup>	1.50 ± 0.20 <sup>4)</sup>	1.63 ± 0.36 <sup>3)</sup>	1.29 ± 0.62	2.01 ± 0.20 <sup>3,6)</sup>	2.13 ± 0.54 <sup>3)</sup>	2.32 ± 0.36 <sup>4)</sup>
泼尼松	10	1.26 ± 0.49	1.85 ± 0.62 <sup>1,5)</sup>	2.32 ± 0.39 <sup>1)</sup>	2.02 ± 0.21 <sup>1,7)</sup>	1.27 ± 0.38	2.30 ± 0.39 <sup>2,7)</sup>	2.59 ± 0.72 <sup>2,7)</sup>	2.83 ± 0.51 <sup>2,9)</sup>

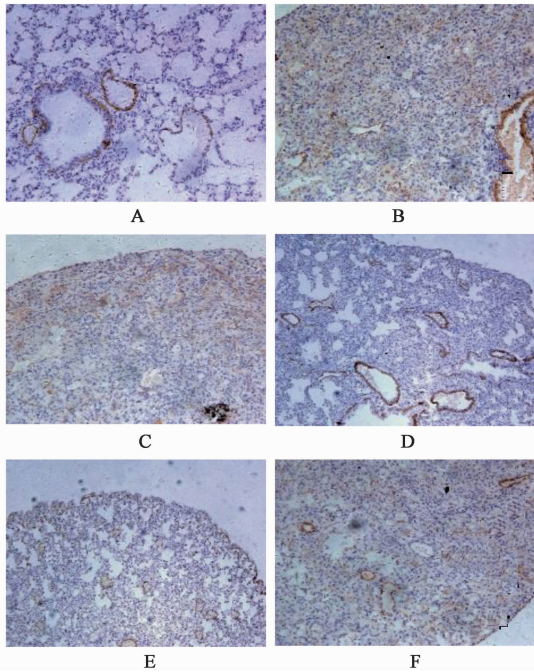


图 3 28 d 组黄芪甲苷对 IPF 小鼠  $\alpha$ -SMA 表达的影响(免疫组化,  $\times 200$ )

Fig. 3 Effect of astragaloside on expression of  $\alpha$ -SMA in day of 28 (IHC,  $\times 200$ )

0.01),虽然在 28 d 组略有下降,但仍比假手术组显著升高( $P < 0.01$ )。黄芪甲苷中、高剂量能显著抑制整个时间段内 TGF- $\beta_1$  表达( $P < 0.01$ ),黄芪甲苷低剂量、泼尼松组无显著性作用。见图 4,表 5。

**3.5 黄芪甲苷对 IPF 小鼠羟脯氨酸含量影响** 与假手术组比较,模型组除 3 d 组无显著改变,其他时间组均显著升高,说明 BLM 诱导的胶原蛋白表达从第 3 天后开始增加,28 d 达到最大值( $P < 0.01$ ),与模型组比较,黄芪甲苷中、高剂量显著抑制羟脯氨酸含量( $P < 0.01$ ),但黄芪甲苷低剂量和泼尼松组无明显改善作用。见表 6。

**3.6 黄芪甲苷对 IPF 小鼠 TGF- $\beta_1$ /PI3K/Akt/**

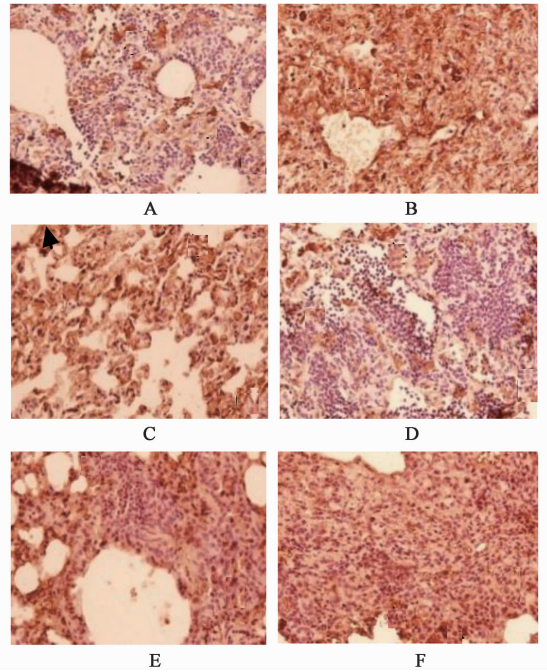


图 4 7 d 组黄芪甲苷对 IPF 小鼠 TGF- $\beta_1$  表达影响(免疫组化,  $\times 200$ )

Fig. 4 Effect of astragaloside on expression of TGF- $\beta_1$  in day of 7 (IHC,  $\times 200$ )

mTOR 信号蛋白的表达影响 14 d 组蛋白印迹结果提示,模型组 p-PI3K/PI3K, p-Akt /Akt, p-mTOR/mTOR 显著升高( $P < 0.05$ ),说明 PI3K/Akt/mTOR 信号在 TGF- $\beta_1$  高表达过程中被激活,同时 LC3II/LC3I, belcin-1 显著降低( $P < 0.05$ ), p62 增高( $P < 0.05$ ),自噬活性被抑制。随自噬活性下调, $\alpha$ -SMA 表达提高而 E-cadherin 表达减少,EMT 过程明显。黄芪甲苷中、高剂量处理后 p-PI3K/PI3K, p-Akt /Akt, p-mTOR/mTOR 被显著抑制,而 LC3 II/LC3 I, belcin-1 含量增高( $P < 0.01$ ), p62 显著下降( $P < 0.05$ ), $\alpha$ -SMA 表达减少而 E-cadherin 表达增加,说明黄芪甲苷通过调控 PI3K/Akt/mTOR 激活自噬

表 4 黄芪甲苷对 IPF 小鼠  $\alpha$ -SMA 表达水平影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Effect of astragaloside on expression of  $\alpha$ -SMA ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	3 d	7 d	14 d	28 d
假手术	-	0.086 1 $\pm$ 0.014 1	0.086 7 $\pm$ 0.010 5	0.085 2 $\pm$ 0.001 9	0.088 8 $\pm$ 0.007 0
模型	-	0.086 6 $\pm$ 0.007 1	0.152 7 $\pm$ 0.010 4 <sup>2,4)</sup>	0.165 0 $\pm$ 0.011 0 <sup>2)</sup>	0.173 3 $\pm$ 0.005 7 <sup>2,9)</sup>
黄芪甲苷	25	0.088 2 $\pm$ 0.007 2	0.134 3 $\pm$ 0.009 6 <sup>6)</sup>	0.148 3 $\pm$ 0.003 2	0.165 0 $\pm$ 0.007 9 <sup>9)</sup>
	50	0.085 5 $\pm$ 0.002 4	0.106 8 $\pm$ 0.014 2 <sup>2,5)</sup>	0.119 0 $\pm$ 0.007 0 <sup>4)</sup>	0.143 9 $\pm$ 0.010 0 <sup>4,5)</sup>
	100	0.084 4 $\pm$ 0.014 8	0.109 1 $\pm$ 0.019 6 <sup>2,4,5)</sup>	0.125 7 $\pm$ 0.005 5 <sup>2,4,5)</sup>	0.135 7 $\pm$ 0.006 4 <sup>2,4,5)</sup>
泼尼松	10	0.083 4 $\pm$ 0.016 7	0.150 3 $\pm$ 0.016 8 <sup>2,6)</sup>	0.155 0 $\pm$ 0.009 5 <sup>2,6)</sup>	0.174 7 $\pm$ 0.010 0 <sup>2,7)</sup>

表 5 黄芪甲苷对 IPF 小鼠 TGF- $\beta_1$  表达影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 Effect of astragaloside on expression of TGF- $\beta_1$  ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	3 d	7 d	14 d	28 d
假手术	-	0.141 $\pm$ 0.014	0.143 $\pm$ 0.018	0.152 $\pm$ 0.019	0.153 $\pm$ 0.015
模型	-	0.162 $\pm$ 0.015 <sup>2)</sup>	0.180 $\pm$ 0.0179 <sup>2,5)</sup>	0.207 $\pm$ 0.035 <sup>2,7)</sup>	0.243 $\pm$ 0.054 <sup>2,9)</sup>
黄芪甲苷	25	0.157 $\pm$ 0.012 <sup>3)</sup>	0.175 $\pm$ 0.013 <sup>3,5)</sup>	0.198 $\pm$ 0.019 <sup>3,7)</sup>	0.219 $\pm$ 0.023 <sup>3)</sup>
	50	0.151 $\pm$ 0.013 <sup>3)</sup>	0.162 $\pm$ 0.010 <sup>4)</sup>	0.170 $\pm$ 0.015 <sup>4)</sup>	0.184 $\pm$ 0.022 <sup>4)</sup>
	100	0.164 $\pm$ 0.014	0.170 $\pm$ 0.0121 <sup>3)</sup>	0.174 $\pm$ 0.024 <sup>4)</sup>	0.188 $\pm$ 0.022 <sup>3)</sup>
泼尼松	10	0.171 $\pm$ 0.079 <sup>1)</sup>	0.195 5 $\pm$ 0.025 <sup>2,5)</sup>	0.199 $\pm$ 0.019 <sup>2)</sup>	0.211 $\pm$ 0.012 <sup>2)</sup>

表 6 各组羟脯氨酸含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 6 Comparison of hydroxyproline conten ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	3 d	7 d	14 d	28 d
假手术	-	1.615 $\pm$ 0.115	1.661 $\pm$ 0.087	1.594 $\pm$ 0.188	1.488 $\pm$ 0.224
模型	-	1.717 $\pm$ 0.139	1.848 $\pm$ 0.200 <sup>2,5)</sup>	2.085 $\pm$ 0.277 <sup>2,7)</sup>	2.547 $\pm$ 0.400 <sup>2,10)</sup>
黄芪甲苷	25	1.633 $\pm$ 0.082	1.753 $\pm$ 0.139 <sup>1,5)</sup>	1.984 $\pm$ 0.185 <sup>2,7)</sup>	2.385 $\pm$ 0.362 <sup>2,9)</sup>
	50	1.606 $\pm$ 0.128 <sup>3)</sup>	1.657 $\pm$ 0.080 <sup>4)</sup>	1.727 $\pm$ 0.145 <sup>4)</sup>	1.936 $\pm$ 0.253 <sup>4,9)</sup>
	100	1.618 $\pm$ 0.119	1.703 $\pm$ 0.124 <sup>3)</sup>	1.756 $\pm$ 0.229 <sup>4,7)</sup>	1.975 $\pm$ 0.368 <sup>4,9)</sup>
泼尼松	10	1.713 $\pm$ 0.074 <sup>1)</sup>	1.821 $\pm$ 0.121 <sup>2,5)</sup>	1.979 $\pm$ 0.089 <sup>2,7)</sup>	2.681 $\pm$ 0.400 <sup>2,10)</sup>

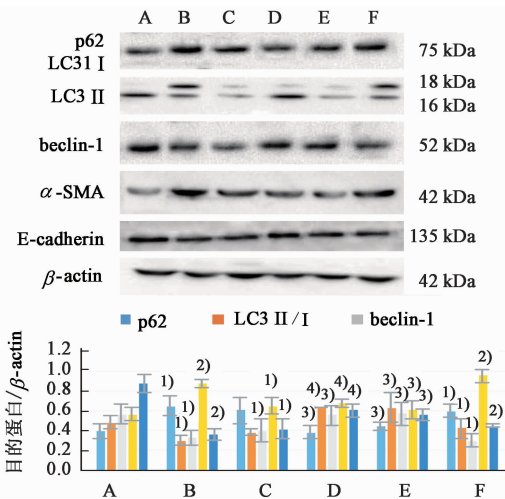
活性,抑制 EMT 发展,低剂量组和泼尼松组无上述作用。见图 5,6。

#### 4 讨论

IPF 是一种弥漫性肺间质性疾病。经检查,IPF 患者肺组织肺泡腔内有大量脱落 II 型肺泡上皮细胞和少量单核细胞、巨噬细胞,炎性细胞诱发肺泡壁血管扩张、渗出、细胞浸润呈弥漫性增厚<sup>[16]</sup>。同时,炎性细胞和细胞因子诱导胶原纤维大量生成,肺组织结构重塑,肺泡数量减少、变形、闭索或残留裂隙状不规则形态,正常肺功能丧失<sup>[17]</sup>。本实验,根据 HE 和 Masson 染色,模型肺组织胶原蛋白表达水平与炎症反应具有显著相关性,但两者时间上并不同步,BLM 诱导的肺组织炎性反应迅速产生,而肺纤维化胶原蛋白大量形成于造模后 7,14 d 胶原蛋白高表

达显著增高,这和  $\alpha$ -SMA 表达的趋势具有一致性,这种改变被羟脯氨酸含量分析证实。比较炎性反应和胶原蛋白表达强度发现,模型组炎性反应最强烈,胶原蛋白染色最明显,说明早期炎性反应仍然是介导 BLM 肺纤维化重要的原因。比较黄芪甲苷 25, 50,100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  干预效果,黄芪甲苷 50,100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  对炎性反应的抑制作用较好,但不呈剂量依赖性。

据研究,在大多数的组织纤维化疾病中,高表达 TGF- $\beta_1$  是组织纤维化最重要的病理基础<sup>[18-20]</sup>。TGF- $\beta_1$  主要是有薄壁细胞所产生,如浸润细胞淋巴细胞、单核细胞/巨噬细胞和血小板等,受损或者炎症组织都是潜在的 TGF- $\beta_1$  产生部位<sup>[17]</sup>。IPF 发生过程中,炎性刺激导致 TGF- $\beta_1$  过表达是促进 EMT



与假手术组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (图 6 同)

图 5 黄芪甲苷对小鼠自噬及 EMT 标记蛋白表达影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 5 Effect of astragaloside on expression of marker protein of autophagy and EMT ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

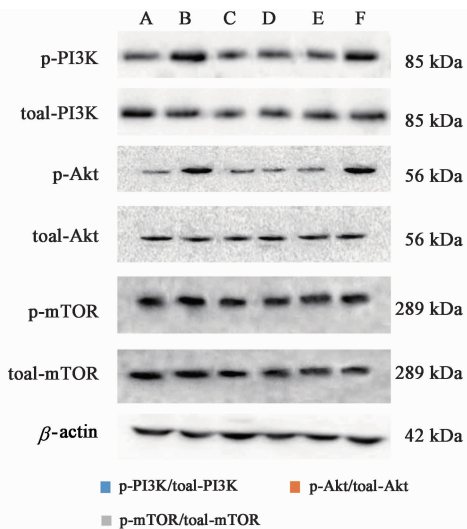


图 6 黄芪甲苷对小鼠 PI3K/Akt/mTOR 信号蛋白的表达影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 6 Effect of astragaloside on expression of protein of PI3K/Akt/mTOR signal ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

的根本原因<sup>[21]</sup>。本实验中, BLM 诱导肺组织肺泡及肺泡间隔区有大量中性粒细胞浸润, TGF- $\beta_1$  增强, 胶原纤维合成增加 (图 2), 羟脯氨酸含量增高 (表 6)。黄芪甲苷中、高剂量抑制 TGF- $\beta_1$  表达同时

抑胶原表达, 说明黄芪甲苷通过抑制 TGF- $\beta_1$  表达来缓解肺纤维化进程。

细胞自噬通常被认为是真核生物发生、发展过程中一种溶酶体依赖性的自我降解途径。在这个过程中, 受损的蛋白或细胞器被双层膜结构包裹后, 最后被转移到溶酶体降解并得以重新利用, 这对维持细胞自身稳态发挥重要作用。但在 IPF 患者肺组织中 LC3-II 蛋白表达下降, 而 p62, p-AMPK 在细胞内大量积累<sup>[22]</sup>, 自噬活性下降, BLM 可诱导肺组织内 LC3-II 蛋白表达水平显著降低<sup>[23]</sup>。研究认为, 自噬缺陷可促进  $\alpha$ -SMA 和 Fibronectin 蛋白的表达, ECM 沉积增多<sup>[24]</sup>, 自噬活性下降是促进特发性肺纤维化 EMT 发展的重要原因。本实验从病理和免疫组化分析发现, 14 d 模型组和黄芪甲苷治疗组在 HE 染色, Masson 染色,  $\alpha$ -SMA 和 TGF- $\beta_1$  免疫组化分析中均呈现了显著性差异, 所以实验用 Western blot 分析了 14 d 各组自噬活性和转分化标志蛋白表达变化, 结果提示: 模型肺组织 LC3 II/LC3I, beclin-1 显著下调, 而 p62 在细胞内聚集, 与上述实验结果一致。黄芪甲苷中、高剂量可显著提高 LC3 II/LC3I, beclin-1, E-cadherin 而抑制 p62,  $\alpha$ -SMA 表达, 说明黄芪甲苷通过增强自噬活性抑制 EMT。

mTOR 是磷脂酰肌醇激酶相关蛋白激酶中的成分, 是细胞营养的感受器, mTOR 磷酸化可抑制细胞自噬活性, 雷帕霉素抑制 mTOR 磷酸化可激活细胞自噬活性<sup>[25]</sup>。在该调节通路中, 生长因子和细胞因子通过激活 PI3K, 磷酸化 Akt 而激活 Tsc1/Tsc2, 进而活化 mTOR 而抑制自噬活性, 当营养匮乏时, 则反向激活自噬<sup>[23]</sup>, 维持营养平衡。也有研究认为高表达 TGF- $\beta_1$  可激活 PI3K/Akt/mTOR 信号而抑制细胞自噬活性<sup>[4]</sup>, 本实验中笔者检测到模型肺组织 TGF- $\beta_1$  高表达时, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR 增高, LC3 II 表达下调, 证实肺组织高表达 TGF- $\beta_1$  通过上述信号抑制细胞自噬活性。而黄芪甲苷中、高剂量干预后, 随着 TGF- $\beta_1$  下调, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR 降低, 自噬活性增强, 肺纤维化 EMT 的发展被抑制。

综上, 黄芪甲苷可通过抑制肺组织炎症反应、下调 TGF- $\beta_1$  表达, 并通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号增强肺组织细胞自噬活性而阻止 EMT 过程。

[参考文献]

[1] Gross T, Hyunninghake G. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. New Engl J Med, 2001, 345 (7): 517-525.  
[2] Willis B C, Liebler J M, Luby-Phelps K, et al.

- Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Am J Pathol*, 2005, 166(5):1321-1332.
- [3] Willis B C, Borok Z. TGF- $\beta$ -induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease [J]. *Am J Physiol-Lung C*, 2007, 293(3):L525-L534.
- [4] HUANG C, LIN M Z, CHENG D, et al. KCa3.1 mediates dysfunction of tubular autophagy in diabetic kidneys via PI3k/Akt/mTOR signaling pathways [J]. *Sci Rep-Uk*, 2016, 31(6):23884-23887.
- [5] Araya J, Kojima J, Takasaka N, et al. Insufficient autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Physiol-Lung C*, 2013, 304(1):L56-L69.
- [6] Olson A L, Swigris J J, Lezotte D C, et al. Mortality from pulmonary fibrosis increased in the United States from 1992 to 2003 [J]. *A J Resp Crit Care*, 2007, 176(3):277-284.
- [7] Margaritopoulos G A, Vasarmidi E, Antoniou K M. Pirfenidone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: an evidence-based review of its place in therapy [J]. *Core Evid*, 2016, 11(3):11-22.
- [8] 庞彩苓,徐志瑛.肺纤维化的中医药研究进展[J]. *浙江中医药大学学报*, 2005, 29(4):90-91.
- [9] 黄云鉴,婕宁.中医治疗肺纤维化方药规律的文献分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(15):206-210.
- [10] 徐昌君,方松文,李宏彬,等.黄芪提取物对肺纤维化小鼠肺泡炎症影响及抗纤维化作用研究[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2016, 18(4):646-652.
- [11] 刘建,刘燕梅,王玉光.黄芪甲苷对博莱霉素诱导小鼠肺纤维化的干预作用[J]. *北京中医药*, 2015, 34(6):484-488.
- [12] YU W N, SUN L F, YANG H. Inhibitory effects of astragaloside IV on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats *via* attenuation of oxidative stress and inflammation [J]. *Inflammation*, 2016, 39(5):1835-1841.
- [13] 徐昌君,万安霞,朱星,等.不同剂量博莱霉素诱导KM小鼠肺纤维化模型的比较[J]. *广东医学*, 2016, 37(1):15-18.
- [14] 唐斌,张金国,谭洪勇,等.黄芪甲苷对慢性心衰大鼠心肌纤维化及能量代谢的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(3):411-416.
- [15] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120(4):893-899.
- [16] WANG Q, WANG Y, Hyde D M. Reduction of bleomycin induced lung fibrosis by transforming growth factor beta soluble receptor in hamsters [J]. *Thorax*, 1999, 54(9):805-812.
- [17] Mapel D W, Hunt W C, Utton R. Idiopathic pulmonary fibrosis: survival in population based and hospital based cohorts [J]. *Thorax*, 1998, 53(6):469-476.
- [18] Gramley F, Lorenzen J, Koellensperger E, et al. Atrial fibrosis and atrial fibrillation: the role of the TGF- $\beta_1$  signaling pathway [J]. *Int J Cardiol*, 2010, 143(3):405-413.
- [19] Iekushi K, Taniyama Y, Azuma J, et al. Hepatocyte growth factor attenuates renal fibrosis through TGF- $\beta_1$  suppression by apoptosis of myofibroblasts [J]. *J Hypertens*, 2010, 28(12):2454-2461.
- [20] Nakerakanti S, Trojanowska M. The role of TGF- $\beta$  receptors in fibrosis [J]. *Open Rheumatol J*, 2012, 6(1):156-162.
- [21] Branton M H, Kopp J B. TGF- $\beta$  and fibrosis [J]. *Microbes Infect*, 1999, 1(15):1349-1365.
- [22] Kasai H, Allen J T, Mason R M, et al. TGF- $\beta_1$  induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT) [J]. *Respiratory Res*, 2005, 6(1):56-62.
- [23] Chitra P, Saiprasad G, Manikandan R, et al. Berberine inhibits smad and non-smad signaling cascades and enhances autophagy against pulmonary fibrosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 93(9):1015-1031.
- [24] Patel A S, LIN L, Geyer A, et al. Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7):e41394.
- [25] GUI Y S, WANG L, TIAN X, et al. mTOR overactivation and compromised autophagy in the pathogenesis of pulmonary fibrosis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9):e0138625.

[责任编辑 邹晓翠]