

麻芍平喘汤通过PI3K/Akt/mTOR信号通路 抑制气道上皮细胞自噬

任燕群^{1,2}, 王小乐^{1,2}, 刘桐^{1,2}, 张璐^{1,2}, 王心恒^{1,2}, 吴迪^{1,2}, 丁焕章^{1,2}, 李泽庚^{2,3,4,5*}

(1. 安徽中医药大学, 合肥 230031; 2. 新安医学教育部重点实验室, 合肥 230031;

3. 安徽省教育厅重点实验室中医药防治肺系重大疾病重点实验室, 合肥 230031;

4. 安徽省中医药科学院中医呼吸病防治研究所, 合肥 230031;

5. 安徽中医药大学第一附属医院, 合肥 230031)

[摘要] 目的:探讨麻芍平喘汤(MSPC)通过磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路对脂多糖(LPS)诱导的人支气管气道上皮样细胞(16HBE)自噬的影响。方法:选用人支气管上皮细胞16HBE作为研究对象,采用细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测LPS诱导的16HBE活性影响和麻芍平喘汤含药血清对16HBE细胞活性影响;以CCK-8法筛选出的适宜条件的LPS诱导16HBE细胞,并测定肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量鉴定模型成立,制备麻芍平喘汤含药血清作用于LPS诱导的16HBE,将细胞分为正常组、LPS组、LPS+MSPC组、LY294002+LPS组、LY294002+LPS+MSPC组。透射电镜观察细胞的自噬囊泡和超微结构的变化;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞PI3K、磷酸化PI3K(p-PI3K)、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR及微管相关蛋白1轻链3B(LC3B)的蛋白表达水平;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测5组炎症因子白细胞介素(IL)-5、IL-6、TNF- α 、IL-10的表达水平。结果:LPS对16HBE细胞的抑制率呈剂量依赖性;与正常组比较,模型组作用24 h能显著升高促炎因子TNF- α 表达($P<0.05$);麻芍平喘汤含药血清对16HBE的促进作用呈浓度依赖性;与正常组比较,模型组自噬体形成增多,麻芍平喘汤可以一定程度抑制自噬,改善细胞状态;Western blot结果显示,与正常组比较,LPS组p-PI3K、p-Akt、p-mTOR蛋白的表达明显降低($P<0.05$),LC3B蛋白的表达显著升高($P<0.01$);与LPS组比较,含药血清组p-PI3K、p-Akt、p-mTOR蛋白表达水平明显升高($P<0.05$),LC3B表达水平明显降低($P<0.05$),与LPS+LY294002组比较,LY294002+LPS+MSPC组p-PI3K、p-Akt、p-mTOR蛋白表达水平明显升高($P<0.05$),LC3B明显降低($P<0.05$)。ELISA结果显示,与正常组比较,LPS组细胞炎症IL-5、IL-6、TNF- α 、IL-10水平显著升高($P<0.01$),用药处理后,与LPS组比较,TNF- α 、IL-6、IL-8含量均显著下降($P<0.01$),IL-10升高($P<0.01$)。结论:麻芍平喘汤可能通过激活PI3K/Akt/mTOR信号通路减轻LPS诱导的人气道上皮细胞16HBE自噬的发生,改善炎症反应。

[关键词] 哮喘; 自噬; 磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR); 麻芍平喘汤; 气道炎症

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)03-0088-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221802

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220919.1531.004.html>

[网络出版日期] 2022-09-22 12:40:20

Mashao Pingchuan Decoction Inhibites Autophagy in Airway Epithelial Cells Through PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway

REN Yanqun^{1,2}, WANG Xiaole^{1,2}, LIU Tong^{1,2}, ZHANG Lu^{1,2}, WANG Xinheng^{1,2},

WU Di^{1,2}, DING Huanzhang^{1,2}, LI Zegeng^{2,3,4,5*}

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China;

[收稿日期] 2022-06-17

[基金项目] 国家自然科学基金区域创新重点项目(U20A20398);安徽省自然科学基金项目(2108085QH369);安徽省教育厅重点项目(KJ2019A0469)

[第一作者] 任燕群,在读硕士,从事中医药防治呼吸系统疾病,E-mail:18755173861@163.com

[通信作者] *李泽庚,二级教授,博士生导师,从事中医药防治呼吸系统疾病,Tel:0551-6285017,E-mail:Li6609@126.com

2. Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Hefei 230031, China;
3. Key Laboratory of Chinese Medicine for Prevention and Treatment of Major Diseases in Pulmonary System, Key Laboratory of Anhui Provincial Education Department, Hefei 230031, China;
4. Institute of Chinese Medicine for Prevention and Treatment of Respiratory Diseases, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230031, China;
5. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Mashao Pingchuan decoction (MSPC) on lipopolysaccharides (LPS)-induced autophagy in human bronchial airway epithelial cells (16HBE) via the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. **Method:** 16HBE cells were selected for the study, and cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect the activity of LPS-induced 16HBE cells and the effect of MSPC-containing serum on the cells. Suitable LPS-induced 16HBE cells were screened by the CCK-8 method, and the content of tumor necrosis factor- α (TNF- α) was measured to identify the established model. And MSPC-containing serum was prepared. The cells were divided into normal group, LPS group, LPS+MSPC group, LY294002+LPS group and LY294002+LPS+MSPC group. Transmission electron microscopy was performed to observe the changes in autophagic vesicles and ultrastructure of the cells. Western blot was performed to detect the protein expressions of PI3K, phosphorylated PI3K (p-PI3K), Akt, phosphorylated Akt (p-Akt), mTOR, phosphorylated mTOR (p-mTOR) and microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expressions of inflammatory factors interleukin-5 (IL-5), IL-6, TNF- α and IL-10 in the five groups. **Result:** LPS inhibited the 16HBE cells in a dose-dependent manner. Compared with the normal group, the LPS group (150 mg·L⁻¹ of LPS) increased the expression of pro-inflammatory factor TNF- α after 24 h of treatment ($P<0.05$) and facilitated the autophagosome formation, and MSPC-containing serum exerted a concentration-dependent promotion effect on the 16HBE cells, inhibited the autophagy to a certain degree and enhanced the cell status. Western blot revealed that the protein expressions of p-PI3K, p-Akt and p-mTOR in the model group were lower ($P<0.05$) and the protein expression of LC3B was higher ($P<0.01$) than those in the normal group. Compared with the conditions in the LPS group, the protein expressions of p-PI3K, p-Akt and p-mTOR in the LPS+MSPC group were elevated ($P<0.05$) and that of LC3B was reduced ($P<0.05$). Compared with the LPS+LY294002 group, the LY294002+LPS+MSPC group had up-regulated protein expressions of p-PI3K, p-Akt and p-mTOR ($P<0.05$) and down-regulated protein expression of LC3B ($P<0.05$). ELISA showed that the LPS group had higher levels of IL-5, IL-6, TNF- α and IL-10 than the normal group, while the levels of TNF- α , IL-6 and IL-8 were decreased ($P<0.01$) and the level of IL-10 was increased ($P<0.01$) after treatment with MSPC. **Conclusion:** MSPC may lower the LPS-induced autophagy in 16HBE cells and improve the inflammatory response through activating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

[Keywords] asthma; autophagy; phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR); Mashao Pingchuan decoction; airway inflammation

支气管哮喘(BA)是一种异质性疾病,一般以慢性气道炎症和气道高反应性为特征,尤以气道炎症是哮喘发生和进展的重要机制,表现为白细胞介素(IL)-4、IL-5等细胞因子分泌增加,引发的气道重塑、高反应、黏液高分泌和组织损伤^[1]。研究发现自噬可能是哮喘气道炎症持续存在的重要原因^[2-3],细颗粒物(PM_{2.5})、脂多糖(LPS)等作为哮喘相关的危

险因素,可诱发气道上皮细胞产生自噬小体,进而诱导IL-6、IL-8等炎性细胞因子的产生并损伤气道上皮细胞^[6]。因此,干预自噬可能是改善哮喘气道炎症,发挥治疗哮喘的有效途径之一。

长时间、高剂量吸入 β_2 受体激动剂、糖皮质激素等是哮喘的常用治疗手段,但可能会导致骨质疏松、支气管痉挛、窒息等严重的不良反应或治疗抵

抗^[7-8]。相比之下,中药防治哮喘优势显著^[9],多项研究发现,中草药可通过调节自噬治疗哮喘等炎症相关疾病^[10]。麻芍平喘汤是国医大师韩明向教授以临床经验结合中医经典理论为基础,创制的治疗哮喘的效验方,治疗哮喘临床疗效显著,可改善炎症反应。前期研究证实,该方能有效地缓解哮喘患者临床中医证候,改善患者的肺功能和降低血清相关炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ 干扰素(IFN- γ)等的水平^[11]。但其对哮喘自噬机制的调控作用有待探讨。

为此,本研究通过体外细胞实验,探究其对自噬经典通路磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的调控作用和对炎症的影响,研究麻黄平喘汤对哮喘自噬的影响及潜在机制。

1 材料

1.1 动物与细胞 清洁级健康雄性SD大鼠40只,体质量(200±20)g,购于安徽医科大学动物实验中心,动物生产合格证号SCXK(皖)2017-001。饲养于安徽中医药大学新安楼动物实验中心,饲养室干净、整洁、通风,室温在(22±2)℃,湿度(50±2)%,自由饮食,适应性饲养1周。实验方案经安徽中医药大学动物实验伦理审查委员会认证(伦理编号AHUCM-rats-2021021)。16HBE细胞株购自上海子实生物科技有限公司。

1.2 药物与试剂 麻芍平喘汤由麻黄10g、细辛3g、芍药7g、钩藤12g、五味子9g共5味药物组成,购于安徽中医药大学第一附属医院中药房,中药饮片由该院韩燕全教授鉴定均为正品。LPS(美国Sigma公司,批号0455310556);胎牛血清、0.25%胰酶(美国Gibco公司,批号分别为10270-106、25200-072);DMEM(高糖)培养基(美国Hyclone公司,批号AG29637393);磷酸盐缓冲液(PBS,北京塞维尔生物科技有限公司,批号GP2107007);青-链霉素溶液(双抗,上海碧云天生物技术有限公司,批号C0222);PI3K抑制剂(LY294002,美国Selleck公司,批号S110504);细胞增殖与活性检测-8(CCK-8,美国AbMole公司,批号M4839);内参抗体 β -肌动蛋白(β -actin)、山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G、山羊抗兔IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为19C10509、140193、202700514);PI3K/Akt/mTOR信号通路相关蛋白PI3K、磷酸化(p)-PI3K、Akt、p-Akt抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为AI04289453、BJC7207167、BJ09015054、

BJ08186890);mTOR、p-mTOR抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为10018370、10020406);微管相关蛋白1轻链3B(LC3B,美国Cell Signaling Technology公司,批号43566S);人TNF- α 、IL-5、IL-6、IL-10酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒(武汉基因美科技有限公司,批号分别为20210910、20210910、20210910、20210910)。

1.3 仪器 CHL2FM3型倒置显微镜(日本Olympus公司);Epoch 2型酶标仪(美国BioTek公司);Series 8000 WJ型三气培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);JEM1400型透射电子显微镜(日本Jeol公司);EPS300型电泳仪、VE-180型电泳槽、VE-186型转膜仪(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 麻芍平喘汤 麻芍平喘汤中药材,常规水提,水浴浓缩至生药质量浓度0.427 g·mL⁻¹,4℃冰箱保存备用。

2.2 含药血清的制备 40只雄性SD大鼠随机分成麻芍平喘汤组和空白组各20只。麻芍平喘汤血清组按照按照临床等效剂量进行换算^[12],相当于60kg成年人41 g·d⁻¹等效量,即灌胃剂量为4.27 g·kg⁻¹。两组大鼠每只每天灌胃2次,其中空白组每天以等量的生理盐水灌胃,连续给药7d,末次给药1h后,用2%戊巴比妥钠溶液麻醉后(10 mL·kg⁻¹)腹主动脉取血。随后将采血管在室温条件下静置30 min,转速3 000 r·min⁻¹(离心半径10 cm,下同),离心15 min,弃沉淀保留上层血清。将同组大鼠的血清合并并混匀,56℃水浴灭活30 min,用0.22 μ m微孔针头过滤器滤过,密封,-80℃冰箱保存备用。

2.3 CCK-8法进行细胞增殖抑制率检测

2.3.1 筛选LPS细胞造模最佳浓度和时间 细胞汇合度约70%~80%时,制备单细胞悬液,96孔板按每孔接种8 000个细胞,将孔板置于37℃、5% CO₂的细胞培养箱中继续培养12 h。后弃去孔板中原培养基,加入不同质量浓度(50、100、150、200、250、300 mg·L⁻¹)的LPS 100 μ L,同时设置正常细胞组、DMEM空白组,分别继续培养6、12、24、48 h后,按CCK-8说明书每个待测孔加入CCK-8试剂10 μ L,孵育1 h后,酶标仪检测各孔吸光度A,依据说明书公式计算抑制率。

2.3.2 筛选麻芍平喘汤含药血清最佳浓度 细胞培养和种板同前,培养12 h后,弃去原培养液,加入不同血药体积分数(5%、10%、15%、20%、25%)含药血清、不同体积分数(5%、10%、15%、20%、25%)空

白血清 100 μL 。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中继续培养 6、12、24、48 h。CCK-8 检测操作方法及计数同 2.3.1 项。

2.4 ELISA 检测 LPS 刺激 16HBE 后 TNF- α 含量变化 制备半数抑制浓度 (IC_{50}) 之前的适宜 LPS 浓度溶液, 将细胞培养至汇合度达到 70%~80%, 分为正常组和对照组, 正常组更换基础 DMEM 培养基, 对照组加入该浓度 LPS 溶液, 继续培养最佳造模时间后采用 ELISA 检测这两组 TNF- α 值, 以验证细胞炎症模型是否成功。

2.5 细胞分组及给药 将细胞分为正常组、LPS 组、LPS+ 麻芍平喘汤组、LY294002+LPS 组、LY294002+LPS+麻芍平喘汤组。除正常组外, 其余组每孔内加入已配好的 LPS 工作液(筛选好的最佳造模质量浓度), 正常组加入等剂量不完全 DMEM 培养基。将 5 组细胞放入细胞培养箱中继续培养。最佳造模时间后弃去原培养液, PBS 洗涤 2 次, 中药组加入筛选好的最佳浓度麻芍平喘汤含药血清, 正常组和 LPS 组加入同等浓度的空白血清, LY294002+LPS 组加入已配好的 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ [13], LY294002+最佳浓度麻芍平喘汤含药血清、再次将培养皿放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养 24 h。

2.6 透射电镜观察细胞超微结构 将培养好的细胞用刮具刮下后经过固定、脱水、浸透、包埋、切片、染色等过程后置透射电镜下观察并用相机记录不同倍镜下的图像。

2.7 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测信号通路蛋白的表达 将按照适宜条件分组处理好的细胞取出培养箱后弃去原培养液后及时 PBS 清洗、刮取细胞、离心 (12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min)、弃上清, 然后每管加入 RAPA 裂解液 300 μL , 混匀后于冰上裂解

10~15 min, 再次离心 (4 $^{\circ}\text{C}$, 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 15 min), 取上清, 按照说明书进行 BCA 蛋白定量。最后加入 5 \times 蛋白上样缓冲液于 100 $^{\circ}\text{C}$, 10 min 条件下使蛋白变性。于 10% SDS-PAGE 电泳上样后, 转膜至 PVDF 膜、5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h、一抗孵育, PI3K、p-PI3K、p-Akt、LC3B、 β -actin 内参抗体 (1: 1 000), Akt、p-mTOR (1: 1 000)、mTOR (1: 5 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 二抗 (1: 2 万) 孵育 1 h, ECL 发光定影, 用 Image J 软件分析灰度值。

2.8 ELISA 检测细胞各组细胞炎症水平 收集 16HBE 细胞上清液, 采用 ELISA 检测技术测定, 使用前将所有试剂充分混匀, 孔内加入不同浓度的标准品和待测样品, 每组做 3 个平行实验。依照说明书检测抗体、孵育、洗涤、加酶孵育、洗涤、底物显色、终止反应后用酶标仪在 450 nm 和 630 nm 波长下测得 A [14]。

2.9 统计学方法 采用 SPSS 26.0 统计软件分析数据, 所有结果均重复 3 次, 计量资料均用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间比较, 使用独立样本 t 检验; 多组间比较, 先判定是否为正态分布, 符合用单因素方差分析, 并进行 Tukey 事后检验; 不满足正态分布, 用 Kruskal-Wallis 秩和检验, Fisher 最小显著性差异法 (LSD) 进行多重比较, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CCK-8 法筛选 LPS 和麻芍平喘汤含药血清最佳浓度

3.1.1 筛选 LPS 诱导自噬模型适宜条件 筛选 LPS 诱导炎症损伤模型质量浓度, 结果发现, 12 h 和 24 h 时, LPS 处理对细胞增殖的抑制率呈明显的剂量依赖性, LPS 浓度越高, 对细胞增殖的抑制率越高, 见表 1; LPS 诱导 12 h 和 24 h 的 IC_{50} 见表 2。

表 1 不同处理时间和浓度 LPS 对 16HBE 细胞抑制率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Effect of different treatment times and concentrations of LPS on inhibition rate of 16HBE cells ($\bar{x}\pm s, n=3$) %

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	6 h	12 h	24 h	48 h
LPS	50	2.478 \pm 2.241	12.073 \pm 3.082	5.022 \pm 4.282	19.532 \pm 2.248
	100	13.576 \pm 2.994	25.212 \pm 2.415	9.805 \pm 3.739	26.377 \pm 1.655
	150	17.074 \pm 2.940	35.858 \pm 2.464	33.571 \pm 3.560	29.361 \pm 1.852
	200	7.618 \pm 4.697	52.606 \pm 1.730	51.855 \pm 4.571	22.838 \pm 2.560
	250	11.839 \pm 1.309	60.128 \pm 0.282	73.625 \pm 1.269	27.476 \pm 2.375
	300	10.711 \pm 1.775	80.057 \pm 1.079	87.116 \pm 0.796	32.345 \pm 2.107

3.1.2 LPS 诱导 12 h、24 h 对炎症因子 TNF- α 表达水平影响 用 150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 处理细胞 12 h 和 24 h, 分别设立相应正常组。ELISA 检测 TNF- α 的表达

水平, 见表 3。结果显示与正常组比较, 12 h 和 24 h LPS 组 TNF- α 表达明显升高 ($P<0.05$)。最终选取 LPS 质量浓度 150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、时间 24 h 进行后续造模

表2 LPS诱导12 h和24 h的IC₅₀的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of LPS induction on IC₅₀ at 12 h and 24 h ($\bar{x}\pm s, n=3$)

时间/h	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹
12	184.3±8.051
24	187.0±9.153

条件。

3.1.3 CCK-8筛选含药血清适宜条件 筛选含药血清时间结果发现,对比不同时间,只有24 h的时候,含药血清相对空白血清,皆有促进16HBE细胞增殖作用,且不同体积分数的血清各组,细胞的存

表3 LPS诱导12 h、24 h对炎症因子TNF-α表达水平影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of LPS induction at 12 h and 24 h on expression level of inflammatory factor TNF-α ($\bar{x}\pm s, n=3$) ng·L⁻¹

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	TNF-α	
		12 h	24 h
正常组		499.888±10.217	500.069±18.346
LPS组	150	566.296±10.248 ¹⁾	562.937±8.161 ¹⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.05

活率会随着血清体积分数(5%、10%、15%、20%、25%)增加而增加,呈现出促进作用,故选取24 h作为最佳含药血清处理时间。见表4。

表4 麻芍平喘汤含药血清对16HBE细胞存活率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 4 Effect of Mashao Pingchuan decoction (MSPC) containing serum on survival rate of 16HBE cells ($\bar{x}\pm s, n=4$) %

组别	体积分数/%	12 h	24 h	36 h	48 h
空白血清组	5	100.00±6.07	100.00±8.71	100.00±4.14	100.00±1.57
	10	100.00±4.38	100.00±6.51	100.00±3.81	100.00±2.90
	15	100.00±3.92	100.00±4.27	100.00±4.06	100.00±3.04
	20	100.00±3.62	100.00±11.90	100.00±4.36	100.00±1.78
	25	100.00±6.94	100.00±5.66	100.00±3.26	100.00±2.54
麻芍平喘汤含药血清组	5	111.14±4.24	113.32±4.89	93.77±4.61	104.49±1.32
	10	98.85±4.70	109.38±3.26	106.67±1.03	100.90±3.04
	15	107.17±7.18	117.60±7.53	102.25±3.36	102.15±2.38
	20	114.44±6.11	119.62±8.66	101.53±2.37	101.29±2.41
	25	103.13±3.36	126.14±5.51	94.31±1.47	96.45±1.52

观察24 h不同体积分数组含药大鼠血清和空白大鼠血清对细胞的增殖能力发现,含药血清和空白血清对16HBE细胞皆有促进作用,且逐渐呈体积

分数依赖性;但是20%的血清对细胞的增殖作用达到顶值,25%体积分数时开始呈下降趋势,故选取20%的含药血清进行后续实验。见表5。

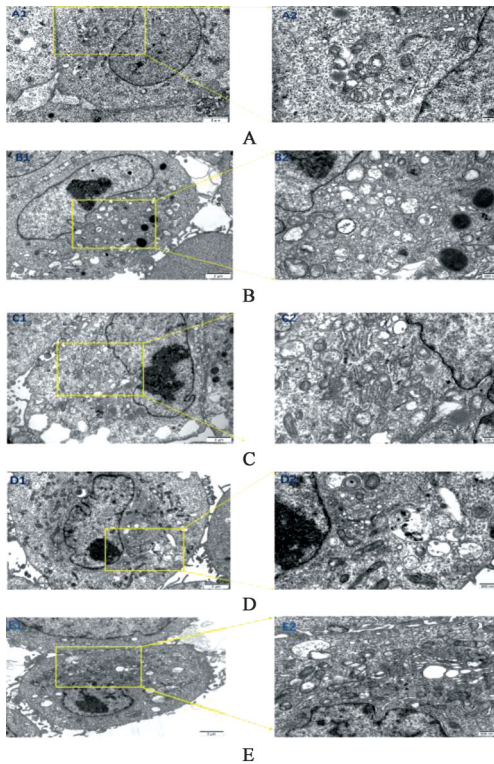
表5 不同浓度含药血清培养24 h后吸光度的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of absorbance after 24 h incubation with different concentrations of drug-containing serum ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	5%	10%	15%	20%	25%
空白血清组	1.488±0.081	1.574±0.066	1.521±0.041	1.512±0.114	1.445±0.05
麻芍平喘汤含药血清组	1.612±0.046	1.670±0.033	1.691±0.073	1.700±0.083	1.678±0.046

3.2 对16HBE细胞超微结构的影响 正常组的细胞基本结构和形态完好,细胞核染色质丰富、分布均匀;内可见内质网及线粒体,嵴较完整;经过LPS造模的细胞内可见自噬的标志性结构-双囊自噬小体,线粒体髓样变性;抑制剂(LY294002)组自噬小体增多,少量线粒体出现嵴溶解断裂;经过麻芍平喘汤干预后,其形态和超微结构有所改善,细胞基本形态较好,仍然可见自噬小体和线粒体,其中线粒体较完整,部分髓样变性。见图1。

3.3 对PI3K/Akt/mTOR信号通路相关蛋白及LC3B表达水平的影响 5组的PI3K、Akt、mTOR蛋白表达水平差异无统计学意义;与正常组比较,LPS组p-PI3K、p-Akt、p-mTOR蛋白表达水平明显降低(P<0.05),LC3B显著升高(P<0.01);与LPS组比较,麻芍平喘汤组p-PI3K、p-Akt、p-mTOR蛋白表达水平明显升高(P<0.05),LC3B明显降低(P<0.05);与LPS+LY294002组比较,LY294002+LPS+麻芍平喘汤组p-PI3K、p-Akt、p-mTOR蛋白表达水平明显升



注：A. 正常组；B. LPS组；C. LPS+MSP含药血清组；D. LY294002+LPS组；E. LY294002+LPS+麻芍平喘汤含药血清组（图2同）

图1 麻芍平喘汤含药血清对16HBE细胞超微结构的影响[电镜, (左)×10 000, (右)×25 000]

Fig. 1 Effect of MSPC on ultrastructure of 16HBE cells [TEM, (left) × 10 000, (right) × 25 000]

高 ($P < 0.05$), LC3B 明显降低 ($P < 0.05$)。见图2、表6。

表6 麻芍平喘汤含药血清对PI3K/Akt/mTOR信号通路相关蛋白及LC3B表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of MSPC-containing serum on expression levels of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway-related proteins and LC3B ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	体积分数 /%	PI3K / β -actin	p-PI3K / β -actin	Akt / β -actin	p-Akt / β -actin	mTOR / β -actin	p-mTOR / β -actin	LC3B / β -actin
正常组		0.569±0.053	0.874±0.104	0.626±0.087	0.799±0.131	0.687±0.073	0.870±0.032	1.548±0.093
LPS组		0.566±0.084	0.294±0.006 ¹⁾	0.602±0.068	0.225±0.035 ¹⁾	0.688±0.060	0.424±0.040 ¹⁾	2.193±0.126 ²⁾
LPS+麻芍平喘汤组	20	0.571±0.081	0.626±0.065 ³⁾	0.647±0.068	0.576±0.04 ³⁾	0.713±0.053	0.708±0.054 ³⁾	1.724±0.069 ³⁾
LY294002+LPS组		0.575±0.064	0.142±0.031 ⁴⁾	0.629±0.098	0.113±0.021 ⁴⁾	0.703±0.093	0.266±0.056 ³⁾	2.560±0.181
LY294002+LPS+麻芍平喘汤组	20	0.589±0.082	0.462±0.033 ⁵⁾	0.646±0.089	0.433±0.028 ⁵⁾	0.705±0.058	0.557±0.061 ⁵⁾	2.139±0.072 ⁵⁾

注：与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与LPS组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与LPS+LY294002组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表7同)

4 讨论

麻芍平喘汤由中药麻黄、细辛、五味子、钩藤、赤芍5味中药组成,方中麻黄味辛性温,解表散寒,防止风寒之邪深入,且宣通肺气以平喘,为君药;细辛辛散温通,祛风散寒,温肺化饮,可助麻黄宣肺散寒,祛除水气以防水聚为痰,加重病情;五味子酸涩

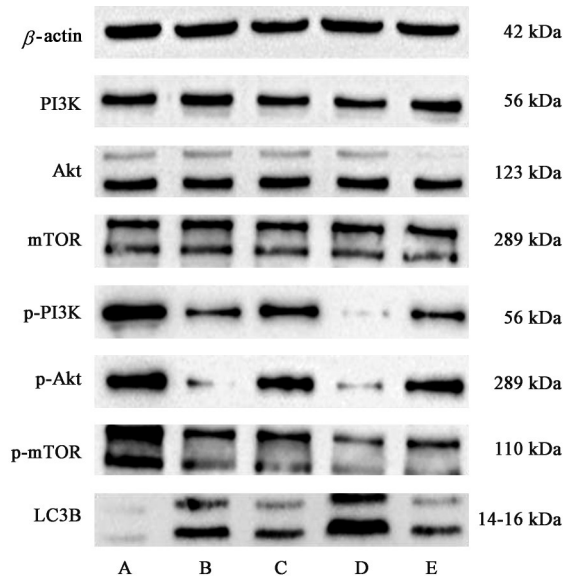


图2 麻芍平喘汤含药血清对PI3K/Akt/mTOR信号通路相关蛋白及LC3B表达水平的影响

Fig. 2 Effect of MSPC-containing serum on expression levels of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway-related proteins and LC3B

3.4 对16HBE细胞TNF- α 、IL-6、IL-5、IL-10的表达水平影响 与正常组比较, LPS组的促炎因子TNF- α 、IL-5、IL-6表达水平显著升高 ($P < 0.01$), 抗炎因子IL-10显著降低 ($P < 0.01$); 与LPS模型组比较, 麻芍平喘汤组的TNF- α 、IL-5、IL-6表达水平显著下调 ($P < 0.01$), 抗炎因子IL-10显著上调 ($P < 0.01$); 与LY295002+LPS组比较, LY295002+LPS+麻芍平喘汤组的TNF- α 、IL-5、IL-6显著降低 ($P < 0.01$), IL-10的表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。见表7。

收敛肺气,可防止麻黄、细辛辛散太过,使得肺气不收,加重喘嗽,二者收散结合,合乎肺性,共为臣药;钩藤轻清透邪,祛风化痰止痉,能缓解气管痉挛;宿痰为哮喘发病之夙根,痰瘀互结是哮喘反复发作,迁延不愈的重要病机,故加入苦,微寒之赤芍,凉血散瘀,防痰瘀互结,郁而化热,与钩藤互为佐药,诸

表7 麻芍平喘汤含药血清对16HBE炎症因子表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	TNF- α	IL-5	IL-10	IL-6
正常组		43.32 \pm 1.64	27.41 \pm 5.41	7.74 \pm 1.04	971.23 \pm 16.13
LPS组		74.15 \pm 2.30 ²⁾	38.50 \pm 3.61 ²⁾	9.42 \pm 0.68 ²⁾	1 137.63 \pm 5.61 ²⁾
LPS+麻芍平喘汤组	20	52.71 \pm 2.04 ⁴⁾	27.41 \pm 3.28 ⁴⁾	16.13 \pm 1.06 ⁴⁾	1 046.64 \pm 26.07 ⁴⁾
LY294002+LPS组		77.09 \pm 1.33	42.80 \pm 1.73	8.93 \pm 0.32	1 179.63 \pm 22.11
LY294002+LPS+麻芍平喘汤组	20	65.82 \pm 0.88 ⁶⁾	27.07 \pm 0.72 ⁶⁾	19.67 \pm 1.01 ⁶⁾	1 054.65 \pm 18.75 ⁶⁾

药合用散寒宣肺,化痰平喘。

课题组前期研究发现,麻芍平喘汤可能通过改善大鼠肺功能、下调肺组织中炎症因子含量以减轻气道炎症,延缓气道重塑的进程^[11,15-17]。但对该方如何调控自噬来影响疾病的进程尚不清楚。自噬通常被认为是一种细胞防御和生存机制,为缺乏营养的细胞维持必要的营养,但是过度的自噬可能会导致细胞死亡^[18]。肺气道中的上皮细胞是调节肺稳态的关键,对防止肺部炎症具有重要意义,且自噬对于维持肺气道上皮细胞计数至关重要。已有研究证明自噬在上皮细胞中被诱导,可破坏气道上皮细胞和触发气道上皮细胞炎症反应,增加黏液分泌从而加重哮喘的严重程度^[19-20]。本实验研究发现,麻芍平喘汤含药血清可以显著抑制LPS诱导的16HBE细胞自噬小体的产生,显著减轻促炎因子的表达及升高抑炎因子的表达,提示其可能通过自噬途径,改善LPS诱导的16HBE细胞炎症表达。为此,本研究进一步观察了麻芍平喘汤含药血清对LPS诱导的人气道上皮细胞16HBE自噬相关蛋白和PI3K/Akt/mTOR信号通路蛋白的影响。

PI3K/Akt/mTOR信号通路是调节自噬的关键通路之一,主要参与细胞内细胞增殖、分化、发育和凋亡过程,该通路在各种呼吸疾病中尤其是哮喘疾病过程中发挥了不容忽视的作用^[21-24],干预PI3K/Akt/mTOR信号通路调控自噬是药物治疗哮喘潜在作用机制^[23,25-26]。PI3Ks作为G蛋白偶联受体和受体酪氨酸激酶(RTK)的下游主要效应因子,通过磷脂的生成,将各种细胞因子和生长因子的信号转导为有用的细胞内信息,进而刺激Akt和其他下游效应通路。结果表明,LPS组16HBE中的p-Akt值低于正常组,说明LPS刺激诱导后,抑制了PI3K/Akt/mTOR信号通路。Akt可以通过触发雷帕霉素敏感的mTOR复合体1(mTORC1)信号通路来抑制自噬^[27];所以LPS组p-Akt值降低,进而引起p-mTOR值降低,自噬增多;加了麻芍平喘汤含药血清后较

LPS组p-Akt、p-mTOR表达水平升高,自噬减少;本研究使用了LY294002(PI3K的特异性抑制剂)来抑制PI3K的磷酸化,进而抑制下游信号Akt、mTOR的活化来观察自噬的变化;Atg5等自噬相关基因可以和LC3结合,以促进自噬体形成,可以通过监测LC3B蛋白表达反应自噬水平^[28]。结果发现LPS刺激条件下麻芍平喘汤含药血清+LY294002组p-Akt表达水平较单独使用抑制剂组升高,自噬相关蛋白LC3B表达水平明显下降。

IL-5、IL-6等促炎因子可以促进气道炎症的发展,IL-10的作用则能抑制炎症的发展;气道上皮细胞可以对吸入性变应原作出反应,增强树突状细胞的抗原递呈功能以启动辅助型T2细胞(Th2)免疫反应,同时分泌的细胞因子会导致气道IgE产生和黏液生成增加。本研究发现,LPS刺激气道上皮细胞后,促炎因子TNF- α 、IL-5、IL-6较正常组表达升高、抑炎因子IL-10表达降低,加入麻芍平喘汤含药血清后表达逆转;LPS刺激条件下麻芍平喘汤含药血清+LY294002组促炎因子TNF- α 、IL-5、IL-6表达水平较单独使用抑制剂组降低,抑炎因子IL-10表达升高。这表明麻芍平喘汤含药血清可能通过激活LPS刺激下PI3K/Akt/mTOR信号通路,部分逆转LPS刺激后16HBE细胞的自噬,改善细胞状态,减轻哮喘的炎症反应。

综上所述,麻芍平喘汤含药血清对LPS诱导人气道上皮细胞16HBE自噬有明显抑制作用,该作用由PI3K/Akt/mTOR信号通路介导。

[致谢] 感谢安徽中医药大学汪电雷教授赠送的16HBE细胞。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] LAMBRECHT B N, HAMMAD H, FAHY J V. The cytokines of asthma [J]. Immunity, 2019, 50 (4) : 975-991.
- [2] BAN G Y, PHAM D L, TRINH T H, et al. Autophagy

- mechanisms in sputum and peripheral blood cells of patients with severe asthma: A new therapeutic target [J]. *Clin Exp Allergy*, 2016, 46(1):48-59.
- [3] GUO F, HAO Y, ZHANG L, et al. Asthma susceptibility gene ORMDL3 promotes autophagy in human bronchial epithelium [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2022, 66(6):661-670.
- [4] DEBEUF N, LAMBRECHT B N. Eicosanoid control over antigen presenting cells in asthma [J]. *Front Immunol*, 2018, 9:2006.
- [5] LV X, LI K, HU Z. Asthma and autophagy [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1207:581-584.
- [6] 孙鹏,张倩. 细胞自噬和支气管哮喘[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2021, 41(5):779-784.
- [7] 郑璐璐,杨丹丹,包彩侠,等. 各类临床平喘药特点分析[J]. 首都食品与医药, 2017(9):68.
- [8] 师晓花. 氧化雾化吸入药物治疗支气管哮喘患者的副作用及护理[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017(20):19-20.
- [9] 李梦雯,范欣生,周丽萍,等. 麻杏石甘汤及拆方对RSV加重型哮喘气道炎症的保护作用及调控TRPV1的机制研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(21):5872-5881.
- [10] ZHANG Y, WANG X, ZHANG H, et al. Autophagy modulators from chinese herbal medicines: Mechanisms and therapeutic potentials for asthma [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:710679.
- [11] 杨勤军,童佳兵,杨程,等. 麻芍平喘汤治疗支气管哮喘冷哮证临床疗效观察及对血清炎症因子的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(4):573-578.
- [12] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9):1069-1072.
- [13] ALBANO G D, BONANNO A, MOSCATO M, et al. Crosstalk between mAChRM3 and β_2 AR, via acetylcholine PI3K/PKC/PBEP1/Raf-1 MEK1/2/ERK1/2 pathway activation, in human bronchial epithelial cells after long-term cigarette smoke exposure [J]. *Life Sci*, 2018, 192:99-109.
- [14] 李海峰,林一春,陈岸东,等. 银胶菊内酯调控JAK/STAT信号通路对LPS诱导的肺泡上皮细胞损伤的影响[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(8):1975-1978.
- [15] 徐增梅,丁伟伟,李泽庚. 麻芍平喘汤对哮喘大鼠气道重塑及TGF- β_1 、PDGF-BB的影响[J]. 天津中医药大学学报, 2017, 36(2):123-127.
- [16] 徐增梅,丁伟伟,尹婷婷,等. 麻芍平喘汤对支气管哮喘大鼠气道重塑及IL-5、IL-13影响研究[J]. 实用中医药杂志, 2014, 30(12):1074-1075.
- [17] 杨勤军,王心恒,杨程,等. 麻芍平喘汤对哮喘大鼠气道重塑和气道炎症及肺组织TGF- β_1 、Muc5AC蛋白表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(5):154-159, 64.
- [18] MIZUSHIMA N, LEVINE B. Autophagy in human diseases [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(16):1564-1576.
- [19] PHAM D L, BAN G Y, KIM S H, et al. Neutrophil autophagy and extracellular DNA traps contribute to airway inflammation in severe asthma [J]. *Clin Exp Allergy*, 2017, 47(1):57-70.
- [20] GASSEN N C, NIEMEYER D, MUTH D, et al. SKP2 attenuates autophagy through Beclin1-ubiquitination and its inhibition reduces MERS-Coronavirus infection [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):5770.
- [21] 唐艺玲,张培蓓,叶贤伟. PI3K-Akt-mTOR通路在慢阻肺发病机制中的研究进展[J]. 中国现代医生, 2021, 59(18):178-183.
- [22] 常兴,张恬,颜培正,等. NF- κ B与PI3K-Akt-mTOR信号通路在支气管哮喘病理机制中的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(34):3863-3866.
- [23] 裴彩霞. 黄芪甲苷通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路调控细胞自噬保护PM2.5诱导肺损伤的机制研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2021.
- [24] 赵革,张丹,杨小会,等. 丁香活性组分抑制PI3K/Akt/mTOR通路诱导人结肠癌HCT116细胞凋亡的研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(5):1197-1204.
- [25] WANG S, WUNIQIEMU T, TANG W, et al. Luteolin inhibits autophagy in allergic asthma by activating PI3K/Akt/mTOR signaling and inhibiting Beclin-1-PI3KC3 complex [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 94:107460.
- [26] 黄帅阳,候丹,黄贵锐,等. 基于网络药理学探讨哮喘宁颗粒治疗支气管哮喘的作用机制及PI3K/Akt信号通路验证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(9):150-157.
- [27] XU Z, HAN X, OU D, et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(2):575-587.
- [28] PAINTER J D, GALLE-TREGER L, AKBARI O. Role of autophagy in lung inflammation [J]. *Front Immunol*, 2020, 11:1337.

[责任编辑 周冰冰]