

## 特发性肺纤维化中mTORC1/4E-BP1轴的作用探讨及柴胡对其干预的研究进展

沈泉<sup>1</sup>, 何凌林<sup>1</sup>, 范伏元<sup>2</sup>, 柳玉佳<sup>2</sup>, 欧慧萍<sup>1,3</sup>, 肖雪飞<sup>2</sup>, 李妲<sup>2\*</sup>

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007;

3. 湖南中医药高等专科学校, 湖南 株洲 412012)

**[摘要]** 特发性肺纤维化(IPF)是一种常见的,以气道重塑、炎症、肺泡破坏和纤维化为特征的致死性间质性肺病。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物1/4E结合蛋白1(mTORC1/4E-BP1)轴与成纤维细胞表达胶原关系密切,其在肺纤维化中的作用尚待进一步阐明。中医药在改善IPF患者肺功能、运动能力和生活质量等方面都有着良好的疗效。中医“异病同治”为柴胡治疗肺纤维化提供了中医理论依据,而西医研究已初步表明柴胡复方、单药及有效成分均对肺纤维化有良好的治疗效果。因此,本文将阐述mTORC1/4E-BP1轴在IPF病理机制中的作用,以及柴胡有效成分对于磷酸肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/mTOR通路的研究结果,为IPF的治疗及药物研发提供参考依据。

**[关键词]** 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物1(mTORC1); 4E结合蛋白1(4E-BP1); 特发性肺纤维化; 柴胡

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R284;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)10-0239-12

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20210803

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210318.1140.001.html>

**[网络出版日期]** 2021-3-18 15:02

### Analysis on Role of mTORC1/4E-BP1 Axis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Research Progress of Bupleuri Radix on Its Intervention

SHEN Xiao<sup>1</sup>, HE Ling-lin<sup>1</sup>, FAN Fu-yuan<sup>2</sup>, LIU Yu-jia<sup>2</sup>, OU Hui-ping<sup>1,3</sup>, XIAO Xue-fei<sup>2</sup>, LI Da<sup>2\*</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;

3. Hunan Traditional Chinese Medical College, Zhuzhou 412012, China)

**[Abstract]** Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a common, lethal interstitial lung disease characterized by airway remodeling, inflammation, alveolar destruction, and fibrosis. The mammalian target of rapamycin complex 1/4E binding protein 1 (mTORC1/4E-BP1) axis is closely related to the expression of collagen by fibroblasts, and its role in pulmonary fibrosis remains to be further elucidated. Traditional Chinese medicine (TCM) has shown promising efficacy in improving the lung function, exercise capacity, and quality of life in patients with IPF. The theory of "same treatment for different diseases" provides a TCM theoretical basis for the treatment of pulmonary fibrosis with Bupleuri Radix, while the research in western medicine has preliminarily shown that both the formulation and single herb as well as the active ingredients of Bupleuri Radix have good therapeutic effects on pulmonary fibrosis. Therefore, this review will elaborate on the role of the mTORC1/4E-BP1 axis in the pathomechanism of IPF, as well as the research results of the active components of

**[收稿日期]** 20210114(016)

**[基金项目]** 湖南省自然科学基金项目(2020JJ5434);湖南省教育厅科学研究项目(19C1446);湖南省教育厅科学研究项目(20B442);湖南省中医药科研计划项目(2021165)

**[第一作者]** 沈泉,在读硕士,从事中西医结合呼吸系统疾病防治研究,E-mail:shenx@stu.hnucm.edu.cn

**[通信作者]** \*李妲,硕士,主治医师,从事中西医结合呼吸系统疾病防治研究,E-mail:498472988@qq.com

Bupleuri Radix on the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin protein (PI3K/AKT/mTOR) pathway, so as to provide a reference for the treatment and drug development of IPF.

**[Key words]** mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1); 4E binding protein 1 (4E-BP1); idiopathic pulmonary fibrosis; Bupleuri Radix

特发性肺纤维化(IPF)是一种常见的,以气道重塑、炎症、肺泡破坏和纤维化为特征的致死性间质性肺病<sup>[1]</sup>。IPF也是进展最快的纤维化疾病之一,其诊断后中位生存期为3.5年,5年生存率仅为20%~30%,比许多癌症预后更差<sup>[2-3]</sup>。在过去的10年中,IPF相关临床试验呈指数级增长,其中吡非尼酮和尼达尼布这两种药物被批准用于治疗IPF<sup>[4-5]</sup>。然而,这些药物只能减缓患者疾病进展的速度,进行性的肺纤维化最终仍会导致患者死亡。

磷酸肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)通路是细胞增殖、代谢和存活等重要生物学活动的调节中枢<sup>[6]</sup>,大量研究已证实PI3K/Akt/mTOR通路在肺纤维化中具有举足轻重的作用,目前该通路已成为IPF治疗的新靶点。但是最新的研究却得出了截然不同的结论,研究发现肺成纤维细胞胶原表达与上游PI3K/Akt的激活无关,而是与其下游mTOR复合物1/4E结合蛋白1(mTORC1/4E-BP1)轴活化密切相关<sup>[7]</sup>。mTORC1/4E-BP1轴的激活促进了I型胶原的表达,而抑制上游诸如PI3K, Akt, 细胞外信号调节激酶(ERK)等关键蛋白对此过程均无显著影响。目前,诸多不良反应限制了非选择性mTOR抑制剂雷帕霉素在IPF治疗中的应用,因此研究人员正在开发选择性靶向mTORC1的新药<sup>[8]</sup>。

临床研究及荟萃分析结果表明,中药治疗在改善IPF患者的肺功能、运动能力和生活质量等方面都有着良好的疗效<sup>[9-10]</sup>。“异病同治”是中医学诊治的精髓思维之一,体现了中医辨证论治特色和病证结合的重要思想<sup>[11]</sup>。中医学认为肝、肺纤维化虽然病位不同,但病因病机具有相似性;现代医学研究也认为两者均存在信号通路异常导致细胞外基质堆积的病理机制<sup>[12]</sup>。因此,从中西医角度均可发现肝、肺纤维化存在共性<sup>[13]</sup>。柴胡是中医治疗肝纤维化的常用药物,柴胡复方、柴胡单药及柴胡有效成分抗纤维化的作用在多层次的研究中已得到充分证实,且对PI3K/Akt/mTOR通路介导的细胞增殖、凋亡、自噬、侵袭转移、化疗耐药具有调控作用<sup>[14-24]</sup>。目前研究者已证实部分柴胡所含有效成分对于肺纤维化也有着良好疗效,本文在此总结PI3K/Akt/

mTOR通路与mTORC1/4E-BP1轴在肺纤维化中的作用及柴胡有效成分对PI3K/Akt/mTOR通路的调控作用,为日后研究柴胡及其有效成分治疗肺纤维化的机制研究提供新的思路。

### 1 PI3K/Akt/mTOR通路概述

在正常细胞中,PI3K/Akt通路是细胞代谢、增殖、分化和存活的调节中枢<sup>[6]</sup>。PI3K是一个独特而保守的细胞内脂质激酶,由3个亚基组成,p85调节亚基,p55调节亚基和p110催化亚基。根据其不同的结构和底物,PI3K家族可分为I, II和III 3类<sup>[6]</sup>。I类PI3K是一个尤为重要的信号转导节点,能够整合来自于受体酪氨酸激酶,G蛋白偶联受体和Ras等来源的信号,以介导包括细胞周期、生长、增殖、代谢和蛋白合成在内的多种细胞过程<sup>[25-26]</sup>。PI3K被诸如表皮生长因子、转化生长因子、白细胞介素等生长因子或细胞因子激活后,能够催化磷脂酰肌醇4,5-二磷酸(PIP2)转化为磷脂酰肌醇3,4,5-三磷酸(PIP3)以激活Akt<sup>[27]</sup>。

丝氨酸/苏氨酸激酶Akt,也被称为蛋白激酶B(PKB)是高等真核生物细胞中的一个重要的信号转导节点,是人类生理学和疾病中最重要的蛋白激酶之一<sup>[27]</sup>。自从研究者发现Akt是小鼠白血病病毒Akt8的致癌基因,也是蛋白激酶C的同源物以来<sup>[28-30]</sup>,目前为止已经鉴定出3种Akt的亚型——Akt1, Akt2和Akt3,它们在氨基酸水平上都具有高度的同源性<sup>[31-32]</sup>。PI3K被激活后,其磷酸化的PIP2, PIP3与Akt的PH结构域结合,导致Akt转移并定位于质膜上<sup>[33-34]</sup>。随后, Akt上两个高度保守且关键的残基发生磷酸化,不同亚型具体位点有所不同(Akt1为T308和S473, Akt2为T309和S474, Akt3为T305和S472)<sup>[35]</sup>。以Akt1为例, Akt1上T308残基的磷酸化需要磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1(PDK1)的参与, Akt和PDK1在质膜上与PIP3结合,从而引起T308位点的磷酸化<sup>[33-34, 36-37]</sup>。值得注意的是, Akt完全激活需要S473残基的磷酸化,该残基是mTORC2的靶点<sup>[38]</sup>。S473位点磷酸化能够稳定T308位点磷酸化并维持Akt的活化状态,当Akt缺乏S473位点磷酸化时,其活性将会大大降低<sup>[39-40]</sup>。Akt激活后,会将信号传递给下游效应器,

其中就包括了mTOR<sup>[35]</sup>。

mTOR是PI3K/Akt下游的一种重要的丝氨酸/苏氨酸激酶,是调控蛋白质合成以及细胞、增殖、存活和衰老的重要调节因子<sup>[41]</sup>。其有mTORC1和mTORC2两复合物形式,两者生理功能差异巨大且存在不同的调节机制。mTORC1和mTORC2结构有所不同,但都包含如下几个成分,充当中心催化组件的mTOR激酶,支架蛋白mLST8,mTOR调节亚基DEPTOR和Tti1/Te12复合物,这些成分对于mTOR复合物的形成和稳定来说相当重要。除此之外,2种复合物还包含各自不同的亚基,mTORC1特有的亚基是Raptor和PRAS40,mTORC2特有的亚基是Rictor和mSin1。Raptor和Rictor分别是对mTORC1和mTORC2组装、稳定性和底物特异性非常重要的支架蛋白,此外Raptor还能促进4E-BP1和p70S6激酶(p70S6K)与mTORC1结合并发生磷酸化<sup>[42]</sup>。PRAS40和mSin1分别是mTORC1和mTORC2激酶活性的抑制蛋白,直到PI3K产生的生长因子受体信号将两种复合物募集到质膜上,PRAS40和mSin1对mTOR的抑制作用才得以解除<sup>[43-47]</sup>。mTORC1和mTORC2存在着一个特征性的调控差异—雷帕霉素敏感性。雷帕霉素与细胞质基质中的胞浆蛋白FK506结合蛋白12(FKBP12)结合,形成雷帕霉素-FKBP12复合物。该复合物再与mTORC1结合,阻碍mTORC1募集下游效应蛋白,从而起到抑制mTORC1功能的作用。而mTORC2并不与雷帕霉素-FKBP12复合物结合,因此mTORC2对雷帕霉素相对不敏感<sup>[46]</sup>。

mTORC1一旦激活后,就会使诸如4E-BP1和p70S6K等下游底物磷酸化,这两种蛋白是帽依赖性翻译的关键调节因子。4EBP1和p70S6K分别与延伸起始因子(eIF)-4E和eIF-3结合,从而抑制翻译起始复合物的形成。mTORC1磷酸化4E-BP1后,可诱导其与eIF-4E分离,从而减少对蛋白质合成的抑制作用<sup>[48]</sup>。mTORC1激活引起的帽依赖性翻译增加会导致细胞大小增加<sup>[49]</sup>,促进细胞增殖<sup>[50]</sup>。但细胞增殖和大小的调节是相互独立的,p70S6K在控制细胞大小方面起着关键作用,而4E-BP1通过调节细胞周期来调节细胞增殖<sup>[50]</sup>。值得注意的是,虽然mTORC1对雷帕霉素敏感,但是mTORC1底物p70S6K和4EBP1对于mTORC1亲和力并不相同,以至两者对雷帕霉素具有不同的敏感性。雷帕霉素是一种变构抑制剂,仅与mTORC1的FKBP12/雷帕霉素结合域(FRB)结合,以限制底物接近催化位

点。p70S6K Thr389位点和4E-BP1 Ser65位点被mTORC1弱磷酸化,对雷帕霉素很敏感,而4E-BP1 Thr37/46位点和Thr70位点可被mTORC1强烈磷酸化,因此对雷帕霉素不敏感<sup>[51]</sup>。

不同于mTORC1处于Akt的下游,目前研究认为mTORC2在整个通路中介于PI3K与Akt之间。已有大量研究证实生长因子(GF)能够激活mTORC2,此过程通常被认为依赖于PI3K,但将PI3K与mTORC2连接在一起的中间产物仍然是未知的<sup>[52-53]</sup>。mTORC2通过mSin1亚基定位在细胞膜上,使mTORC2靠近Akt,PKC等底物,促使Akt发生磷酸化<sup>[45]</sup>。由于mTORC2能够磷酸化Akt S473位点,有部分学者认为mTORC2位于mTORC1的上游<sup>[54]</sup>。值得注意的是,这种关系也许在某些特定的细胞环境下成立,但在相当多的细胞类型中,基因敲除或敲减mTORC2核心组分(如Rictor,mSin1)对结节性硬化症2蛋白(TSC2)磷酸化和mTORC1信号传导并没有影响<sup>[55-56]</sup>。因此可知,mTORC1通路的激活并不完全依赖于mTORC2。其原因就在于mTORC2的确是能够促使Akt Ser473位点磷酸化,但是Akt Ser473磷酸化异常仅仅影响Akt一小部分下游靶点,而其他诸如TSC2,糖原合酶激酶-3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )以及mTORC1下游效应器p70S6K和4E-BP1是不受Akt Ser473位点磷酸化影响的<sup>[56]</sup>。

## 2 PI3K/Akt/mTOR通路与肺纤维化

随着研究的不断进展,PI3K/Akt/mTOR通路在IPF中的作用逐渐引起了研究者的重视。首先,多位研究者通过测序技术、生信分析技术发现IPF患者肺组织中存在PI3K/Akt/mTOR通路的过度激活。XU等<sup>[57]</sup>利用单细胞RNA测序鉴定了IPF患者上皮细胞类型与IPF发病相关的生物学过程,通路分析发现IPF患者上皮细胞存在PI3K/Akt信号通路的异常激活。GOKEY等<sup>[58]</sup>对IPF患者上皮细胞进行转录组测序,也证实了存在PI3K/Akt/mTOR通路的激活,且免疫荧光成像显示mTOR下游p70S6K磷酸化水平上升。研究者在组织学和细胞学水平进一步证实了IPF患者存在PI3K/Akt/mTOR通路标志物的激活。CONTE等<sup>[59]</sup>发现IPF患者肺组织中PI3K p110 $\gamma$ 表达量显著上升。患者肺组织分离出的成纤维细胞系中PI3K p110 $\alpha$ , $\beta$ 和 $\delta$ 亚型的表达无显著差异,而PI3K p110 $\gamma$ 的表达明显上调。MERCER等<sup>[60]</sup>通过免疫组化法发现肺组织中磷酸化的Akt定位于纺锤形的 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)表达阳性的肌

成纤维细胞和上皮纤维化灶中。与此相反的是,同样表达 $\alpha$ -SMA的气道平滑肌细胞却几乎没有Akt磷酸化。随后研究者通过共聚焦双重免疫荧光对pAkt和 $\alpha$ -SMA的细胞共定位进行了更详细的评估,进一步证实了pAkt S473和pAkt T308都定位于 $\alpha$ -SMA表达阳性的肌成纤维细胞亚群,即IPF患者肌成纤维细胞存在Akt的异常激活。迄今为止最大的IPF全基因组关联研究发现了3个与IPF易感性相关的基因(KIF15, MAD1L1和DEPTOR)。DEPTOR是mTOR的调节亚基,能够抑制mTOR的激酶活性。研究发现,DEPTOR表达降低与IPF易感性增加相关,这也支持了mTOR信号在肺纤维化中重要作用<sup>[61]</sup>。

在人体病理学研究的基础上,细胞及动物实验也证实了PI3K/Akt/mTOR通路对肺纤维化的重要性。在细胞实验层面,HOROWITZ等<sup>[62]</sup>发现,转化生长因子 $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )处理肺成纤维细胞能够在几分钟内迅速激活Smad和p38通路,随后出现PI3K/Akt通路的延迟激活。抑制剂或p38突变均能抑制TGF- $\beta_1$ 诱导的PI3K/Akt磷酸化,并阻断由此导致的细胞凋亡抵抗。CONTE等<sup>[63]</sup>发现人肺成纤维细胞中,PI3K广谱抑制剂LY294002能够通过抑制Akt磷酸化,从而抑制TGF- $\beta_1$ 诱导的细胞增殖、血管 $\alpha$ -SMA和胶原的表达。在对PI3K亚型的研究中,选择性PI3K 110 $\gamma$ 抑制剂和siRNA敲减均能显著抑制成纤维细胞的增殖和 $\alpha$ -SMA的表达<sup>[59]</sup>。从而证明PI3K/Akt通路在肺成纤维细胞增殖和分化中的中心作用。在动物实验层面,博来霉素气管内注射是目前最常用的肺纤维化模型,目前已有大量研究验证了PI3K/Akt/mTOR通路所介导的细胞增殖<sup>[64]</sup>、内质网应激<sup>[65]</sup>、上皮-间充质转化(EMT)<sup>[66-69]</sup>、血管新生<sup>[70]</sup>、自噬<sup>[67]</sup>在博来霉素诱导的肺纤维化中起到了重要的作用。

目前PI3K/Akt/mTOR通路逐渐成为IPF治疗的新热点。Ompalisib(GSK2126458)作为PI3K,mTOR双效抑制剂,能够抑制IPF来源的肺成纤维细胞中的PI3K信号传导,抑制IPF患者肺泡灌洗液内细胞的Akt磷酸化<sup>[60]</sup>。Ompalisib能够有效抑制TGF- $\beta_1$ 刺激所致的胶原蛋白、纤维连接蛋白和 $\alpha$ -SMA的合成<sup>[71]</sup>。目前Ompalisib已完成I期临床实验,研究证实口服Ompalisib对IPF患者的全身循环和肺部PI3K/mTOR通路具有可测量的剂量依赖性的抑制作用。通过FDG-PET测定,Ompalisib还可以降低IPF肺纤维化区域的异常葡萄糖信号。这

些数据支持进一步评估PI3K/mTOR通路作为IPF新疗法的靶点。高选择性的抑制剂可以减少或避免广泛的PI3K/mTOR抑制的潜在副作用,同时提供类似的潜在治疗益处<sup>[58]</sup>。

### 3 IPF与mTORC1/4E-BP1轴密切相关

随着对于PI3K/Akt/mTOR通路研究进一步深入和细化,目前研究者发现位于通路下游的mTORC1/4E-BP1轴与胶原合成关系最为密切。WALKER等<sup>[72]</sup>发现雷帕霉素能够完全抑制mTORC1介导的p70S6K1磷酸化,但这对I型胶原表达的影响很小。Raptor基因沉默和显性抑制4E-BP1过表达的实验中发现,mTORC1/4E-BP1轴才是I型胶原表达的重要驱动因素,这为后续研究提供了一个崭新的思路。除此之外,通过siRNA敲除与mTORC2结合的Rictor蛋白,能够降低mTORC1底物的磷酸化水平,减少I型胶原的表达,这似乎说明了mTORC1活化对mTORC2的依赖性。然而,目前多数实验均发现mTORC1活化并不需要mTORC2介导的Akt磷酸化<sup>[55-56]</sup>。

近期,WOODCOCK等<sup>[7]</sup>得出了与WALKER完全不同的研究结果,研究者通过CRISPR-Cas9技术分别敲除原代人肺成纤维细胞的Raptor和Rictor,敲除Raptor显著减少了TGF- $\beta_1$ 诱导的I型胶原表达,而敲除Rictor对此影响很小。由此可知,mTORC1/4E-BP1轴对I型胶原表达至关重要,且不依赖于mTORC2。除此之外,实验还发现mTOR上游经典的PI3K/Akt信号转导对TGF- $\beta_1$ 诱导的I型胶原表达是可有可无的。PI3K,Akt,PDK1抑制剂均不能减少TGF- $\beta_1$ 诱导的I型胶原表达,这一结果与先前研究报道PI3K在TGF- $\beta_1$ 诱导的胶原合成中所起重要作用形成对比<sup>[63,73-74]</sup>,但值得注意的是,这些早期的研究使用了第一代PI3K抑制剂LY294002和wortmannin,他们选择性较低,会广泛地抑制PI3K相关蛋白,其中就包括了mTOR<sup>[75]</sup>。WOODCOCK的研究还提出了Smad3/mTORC1/4E-BP1信号转导机制。siRNA敲减Smad3后,p70S6K和4E-BP1的磷酸化水平显著下降,I型胶原表达量显著降低,表明mTORC1/4E-BP1轴介导的胶原表达是依赖于Smad3的。进一步研究mTORC1/4E-BP1轴下游作用机制发现,mTORC1/4E-BP1轴可以增加调控氨基酸代谢的转录因子—活化转录因子4(ATF4)的产生,ATF4能够通过促进丝氨酸-甘氨酸途径,为成肌纤维细胞合成胶原蛋白提供甘氨酸<sup>[76]</sup>。该研究巧妙地将mTORC1激活与成纤维细

胞代谢机制联系在一起,为研究TGF- $\beta_1$ 影响胶原沉积的信号传导机制提供了新的思路。

#### 4 柴胡治疗肺纤维化的中医理论基础

“证”是对疾病所处特定阶段的病因、病机和病位的高度概括。在一种“病”发生发展过程中,可以有不同的“证”,而同一种“证”亦可见于多种“病”中。因此,中医不同疾病可被辨为相同的证型,即“异病同证”。在“异病同证”的基础上,用相同的理法方药进行干预即“异病同治”。

一方面,中医认为肝、肺的纤维化发生发展均是由于外邪侵袭,正气亏虚,而至气机失疏,痰瘀痹阻所致<sup>[13,77]</sup>,虽然病位不同,但其病因病机却具有着相似性。另一方面,在中医理论中,肝和肺两者的功能不论是在生理还是病理上均是密不可分的。肺气主肃降,肝气主升发,肺与肝一降一升,为全身气机升降宣发之枢纽,是维持气机平衡之关键。不论是肺失肃降还是肝气不升,气机平衡一旦被打破,另一方则势必受损。因此,在肝、肺纤维化的治疗上即可采用“异病同治”的治法。

柴胡是中医临床上治疗肝纤维化的要药,中医认为柴胡具有和解表里、舒肝利胆、退热升阳的功效,《神农本草经》云:“(柴胡)主心腹,去肠胃中结气,饮食积聚,寒热邪气,推陈致新。久服,轻身明目益精。”认为柴胡有通过调畅气机,疏肝利胆达到化积聚,推陈致新的作用。因此在中医临床上,柴胡类方剂已被广泛用于肝纤维化乃至各类肝脏疾病的治疗。在“异病同治”的基础上,有学者充分阐明了“从肝论治”肺纤维化的中医理论依据<sup>[78]</sup>。此外,张华东教授也提出治疗肺纤维化应该从“五体痹-五脏痹”理论出发,而非单从肺论治肺纤维化<sup>[79]</sup>。因此,柴胡治疗肺纤维化有着中医理论和临床经验作为支持。

#### 5 柴胡有效成分对于肺纤维化的干预作用

目前已从柴胡中分离出多种化合物,包括挥发油、三萜皂苷、黄酮类化合物、木脂素、脂肪酸和甾醇等。其中的主要活性成分是三萜皂苷、黄酮类化合物和挥发油,这些成分具有抗炎、抗癌、解热、抗菌、抗病毒、保肝、免疫调节的作用<sup>[80]</sup>。

从柴胡中提取的黄酮类主要包括山柰酚、槲皮素、黄芩苷及芦丁等<sup>[81]</sup>。山柰酚能够缓解皮肤<sup>[82-83]</sup>、肝脏<sup>[84]</sup>、肾脏<sup>[85-87]</sup>、心肌<sup>[88-90]</sup>的纤维化,有研究证实其可通过抑制自噬和EMT起到抗肺纤维化的作用<sup>[91-92]</sup>。GONG等<sup>[91]</sup>发现山柰酚在体外可以显著抑制脂多糖(LPS)或TGF- $\beta_1$ 诱导的EMT,并且山柰酚

灌胃能够抑制卵清蛋白所致小鼠肺组织胶原蛋白和基质金属蛋白酶(MMP)的表达,减轻气道重塑。在矽肺病所致的肺纤维化中山柰酚也具有显著的疗效。在小鼠矽肺造模7d时,山柰酚能显著抑制大鼠肺部炎症,28d时能显著抑制肺纤维化。而使用氯喹阻断自噬可拮抗山柰酚对炎症的抑制作用,提示山柰酚治疗矽肺可能依赖于自噬作用<sup>[92]</sup>。除了抗肺纤维化的作用外,山柰酚对于脂多糖、缺血、脓毒症及病毒感染所致的急性肺损伤也有着良好的效果<sup>[93-96]</sup>。除了山柰酚,黄酮类其他成分亦有抗肺纤维化的作用。例如芦丁就能够减少博来霉素诱导肺纤维化大鼠TGF- $\beta_1$ 、 $\alpha$ -SMA和胶原的表达,缓解氧化应激<sup>[97]</sup>。

研究者已从柴胡中分离出100多种不同的三萜皂苷,是柴胡的主要活性成分,具有广泛的生物学和药理作用。其中柴胡皂苷a(SSa),柴胡皂苷d(SSd),柴胡皂苷c(SSc)和柴胡皂苷b2(SSb2)被认为是柴胡最具药理活性的物质<sup>[98]</sup>。柴胡皂苷也有良好的抗纤维化作用,能够缓解心肌<sup>[99]</sup>、肾脏<sup>[100]</sup>、胰腺<sup>[101-102]</sup>、肝脏<sup>[103]</sup>等器官的纤维化。在抗肺纤维化研究方面,郑金旭等<sup>[104]</sup>发现SSd能够显著缓解博来霉素所致的小鼠肺纤维化,作用机制可能与抗脂质过氧化作用有关。孙金玲等<sup>[105]</sup>发现SSd可能通过调控TGF- $\beta_1$ /Smads信号通路从而抑制肺成纤维细胞增殖和胶原表达。此外,柴胡皂苷对于脂多糖诱导的急性肺损伤和香烟烟雾引起的肺部炎症均有一定的治疗作用<sup>[106-107]</sup>。

柴胡中的酚酸类化合物主要为绿原酸类成分<sup>[108]</sup>,其所含的绿原酸、异绿原酸均具有良好的纤维化作用。在抗肝纤维化的研究方面,LIU等<sup>[109]</sup>证实异绿原酸可以通过抑制高迁移率族蛋白1(HMGB1)/Toll样受体4(TLR4)/核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路介导炎症反应和胶原沉积来预防四氯化碳所致的肝纤维化。绿原酸抗肝纤维化的研究更为丰富,其可通过调控TGF- $\beta_1$ /Smad通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族等所介导的细胞增殖,炎症,胶原沉积,EMT,氧化应激起到减轻肝损伤,缓解肝纤维化的作用<sup>[110-114]</sup>。除了治疗肝纤维化外,绿原酸在肺纤维化中的作用也得到了证实。绿原酸能够缓解博来霉素诱导的小鼠肺纤维化,减少胶原表达以及内质网应激介导的细胞凋亡<sup>[115]</sup>。

本文就柴胡有效成分抗肺纤维化的药理学研究进行了相关汇总,见表1。

表 1 柴胡有效成分抗肺纤维化的药理作用

Table 1 Pharmacological effect of active ingredients from Bupleuri Radix on pulmonary fibrosis

有效成分	英文名称	模型	作用机制	参考文献
山柰酚	kaempferol	LPS 或 TGF- $\beta_1$ 刺激 BEAS-2B 细胞	抑制胶原蛋白和 MMP 的表达, 抑制 EMT	[91]
		卵清蛋白致敏诱导小鼠气道纤维化	抑制胶原蛋白和 MMP 的表达以及杯状细胞增生	[91]
		二氧化硅诱导小鼠肺纤维化	抑制肺部炎症、自噬以及 MMP 的表达	[92]
芦丁	rutin	博来霉素诱导大鼠肺纤维化	抑制氧化应激, 抑制 TGF- $\beta$ , 胶原蛋白和 MMP 的表达	[97]
槲皮素	quercetin	衰老的 IPF 患者肺成纤维细胞	促进 Fas 配体 (FasL) 和 TNF 相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 诱导的凋亡, 抑制 Akt 磷酸化	[116]
		博来霉素刺激 RLE-6TN 细胞	抑制 EMT, 抑制 Smad2 磷酸化	[117]
		博来霉素诱导老年大鼠肺纤维化	抑制胶原表达和细胞衰老	[116]
黄芩苷	baicalin	大鼠成纤维细胞	抑制成纤维细胞增殖, 调控细胞周期, 抑制 Akt 磷酸化	[118]
		博来霉素诱导大鼠肺纤维化	抑制炎症反应、细胞凋亡和胶原蛋白的表达, 减轻氧化应激损伤	[118]
柴胡皂苷 d	saikosaponin d	TGF- $\beta_1$ 刺激 HELF 细胞	抑制细胞增殖、胶原蛋白表达以及 TGF- $\beta_1$ /Smads 通路	[105]
		博来霉素诱导小鼠肺纤维化	抑制胶原蛋白表达和氧化应激	[104]
绿原酸	chlorogenic acid	TGF- $\beta_1$ 刺激 RLE-6TN 细胞	抑制胶原蛋白表达和内质网应激介导的细胞凋亡	[115]
		博来霉素诱导小鼠肺纤维化	抑制胶原蛋白表达和内质网应激介导的细胞凋亡	[115]

## 6 柴胡有效成分对 PI3K/Akt/mTOR 通路的干预作用

目前山柰酚对于 PI3K/Akt/mTOR 通路调控作用主要以肿瘤相关研究为主。在子宫内腺癌<sup>[14]</sup>、结肠癌<sup>[15]</sup>、宫颈癌<sup>[16]</sup>、肝癌<sup>[17]</sup>、肺癌<sup>[18]</sup>、黑色素瘤<sup>[19]</sup>等细胞系中山柰酚对 PI3K/Akt/mTOR 通路介导的细胞增殖、细胞凋亡、细胞周期、自噬、侵袭转移、化疗耐药具有调控作用。HOHMANN 等<sup>[116]</sup>发现槲皮素通过促进 FasL, TRAIL 和 caveolin-1 的表达和抑制 Akt 的激活来促进 IPF 患者肺成纤维细胞发生凋亡。ZHAO 等<sup>[118]</sup>发现黄芩苷可以通过 PI3K/Akt 信号通路减轻博来霉素诱导的大鼠肺纤维化和成纤维细胞增殖。

SSa, SSd 等均能调控 PI3K/Akt/mTOR 通路。CUI 等<sup>[102]</sup>发现, SSd 能够抑制胰腺星型细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路介导的自噬, 减少细胞外基质的形成和胰腺纤维化。YE 等<sup>[119]</sup>发现 SSa 通过抑制 mTOR 信号通路对抗戊四唑诱导的癫痫发作和海马神经元凋亡。柴胡皂苷在体内外实验中也体现出良好的抗肿瘤活性, 其也与调控 PI3K/Akt/mTOR 通路密切相关。GAO 等<sup>[120]</sup>发现 SSd 对骨肉瘤细胞增殖、侵袭和转移有明显的抑制作用, 还能够通过线粒体和死亡受体途径诱导肿瘤细胞发生凋亡。与此同时也观察到 SSd 可以抑制 Akt 和 ERK 的磷酸化。HU 等<sup>[121]</sup>SSd 的环糊精制剂可以诱导激活 MAPK 通路和抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路来介导人皮肤鳞癌细胞凋亡。

异绿原酸对于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的干预作用目前尚无文献报道, 而绿原酸对于该通路的调控作用已在阿尔兹海默病、肿瘤、糖尿病、骨质疏松等疾病的体内外实验中均得到了证实<sup>[20-24]</sup>。

柴胡多种有效成分都对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路有调控作用, 但是目前尚无其对 mTORC1/4E-BP1 轴干预作用的报道。并且柴胡有效成分对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调控的相关研究以肿瘤、内分泌、神经内科相关疾病为主, 与肺纤维化相关的研究极少。柴胡有效成分对于有着良好的抗肺纤维化作用, 同时也在其他疾病模型中也能够调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 由此可见将两者结合的中药药理学研究具有一定的可行性和创新性, 有待研究者进一步阐明。

## 7 结语

时至今日, IPF 的病理机制研究越来越丰富, 研究者的目光已逐渐从吡非尼酮以及尼达尼布的靶通路转移到诸如 mTOR, Notch 等通路中。而且随着研究技术不断进步, 现在也出现了不少与原先结果矛盾的新研究结果。例如, 原先有大量证据证实 PI3K/Akt 通路和肺成纤维细胞表达胶原密切相关, 然而随着研究一步步深入却发现, 上游 PI3K/Akt 通路活化与否并不是成纤维细胞表达胶原的关键因素。目前研究人员已将目光聚焦到 mTORC1/4E-BP1 轴上, 必然将会更为深入的去研究其信号转导过程及其与纤维化的关系, 从而研发出更为精准的靶向药物服务于临床。

柴胡有效成分对肝、肺、心、肾等脏器都具有良好的抗纤维化作用。其中柴胡有效成分抗肺纤维化主要是通过减轻炎症,抑制成纤维细胞EMT,促进成纤维细胞自噬、凋亡,抑制氧化应激等生物学过程起效的,所影响的信号通路主要为TGF- $\beta_1$ /Smad,PI3K/Akt等。虽然研究者们已初步阐明了柴胡有效成分抗肺纤维化的中药药理学机制,但目前的研究结果仍存在以下几个问题有待进一步完善:①柴胡有效成分抗肺纤维化机制研究较为浅显,以表型研究为主。涉及到信号通路等机制的研究,大多未联合抑制剂、过表达或RNAi技术,机制研究因果逻辑相对比较薄弱;②柴胡在中医临床常用于治疗肝纤维化,因此柴胡有效成分抗肝纤维化药理学研究较多,而抗肺纤维化研究较少。此现象以柴胡皂苷最为突出,截至目前PubMed上尚无柴胡皂苷抗肺纤维化的相关研究报道;③动物实验有效成分给药剂量须考虑有效成分存在的不良反应。例如柴胡皂苷强大的促凋亡作用也导致了其具有一定的肝毒性。SSd以300 mg·kg<sup>-1</sup>灌胃1周可引起小鼠肝脏组织学损伤,诱导肝细胞发生凋亡<sup>[122]</sup>。

“中医学是打开中华文明宝库的钥匙”,异病同治是中医诊治疾病的特色理论,同时也能为中药现代药理学研究指明全新的方向。柴胡治疗肺纤维化,在中医理论上具有合理性,在临床应用中具有有效性,研究柴胡及其有效成分抗肺纤维化的机制,是中医临床思路指导中药药理学研究的一个尝试。两者巧妙结合,既能为中医临床提供指导和依据,也能进一步阐明中药药理机制,为日后新药研发打下基础。

#### [参考文献]

[1] GOODWIN A T, JENKINS G. Molecular endotyping of pulmonary fibrosis [J]. *Chest*, 2016, 149 (1): 228-237.

[2] LEY B, COLLARD H R, KING T E J R. Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(4):431-440.

[3] WIN T, SCREATON N J, PORTER J C, et al. Pulmonary 18F-FDG uptake helps refine current risk stratification in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2018, 45 (5): 806-815.

[4] KING T E J R, BRADFORD W Z, CASTRO-BERNARDINI S, et al. A phase 3 trial of pirfenidone

in patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(22):2083-2092.

[5] RICHELDI L, DU BOIS R M, RAGHU G, et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(22): 2071-2082.

[6] ENGELMAN J A, LUO J, CANTLEY L C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*, 2006, 7(8):606-619.

[7] WOODCOCK H V, ELEY J D, GUILLOTIN D, et al. The mTORC1/4E-BP1 axis represents a critical signaling node during fibrogenesis [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):6.

[8] SCHREIBER K H, ARRIOLA APELO S I, YU D, et al. A novel rapamycin analog is highly selective for mTORC1 *in vivo* [J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 3194.

[9] JI K, MA J, WANG L, et al. Efficacy and safety of traditional chinese medicine in idiopathic pulmonary fibrosis: a meta-analysis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, doi: 10. 1155/2020/1752387.

[10] CHEN M J, YANG G L, DING Y X, et al. Efficacy of TCM therapy of tonifying lung-kidney's Qi-deficiency in a case of idiopathic pulmonary fibrosis: a case report [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(18):e15140.

[11] 牛建昭,姜术霞,李彧. 多脏器纤维化的络病机制探讨 [J]. *北京中医药大学学报*, 2004, 27(6):4-6.

[12] 常虹,孟洪宇,王宇,等. 基于代谢组学的肝、肺纤维化“异病同治”科学内涵研究 [J]. *中草药*, 2018, 49 (21):5116-5124.

[13] 常虹,郭凯,孟洪宇,等. 中医异病同治理论治疗多器官纤维化的科学基础评述 [J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(4):849-851.

[14] LEI X, GUO J, WANG Y, et al. Inhibition of endometrial carcinoma by Kaempferol is interceded through apoptosis induction, G<sub>2</sub>/M phase cell cycle arrest, suppression of cell invasion and upregulation of m-TOR/PI3K signalling pathway [J]. *J BUON*, 2019, 24(4):1555-1561.

[15] LI Q, WEI L, LIN S, et al. Synergistic effect of kaempferol and 5-fluorouracil on the growth of colorectal cancer cells by regulating the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20 (1): 728-734.

[16] KASHAFI E, MORADZADEH M, MOHAMADKHANI A, et al. Kaempferol increases apoptosis in human cervical cancer HeLa cells via

- PI3K/Akt and telomerase pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 573-577.
- [17] ZHU G, LIU X, LI H, et al. Kaempferol inhibits proliferation, migration, and invasion of liver cancer HepG2 cells by down-regulation of microRNA-21 [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2018, doi: 10.1177/2058738418814341.
- [18] HAN X, LIU C F, GAO N, et al. Kaempferol suppresses proliferation but increases apoptosis and autophagy by up-regulating microRNA-340 in human lung cancer cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108: 809-816.
- [19] YANG J, XIAO P, SUN J, et al. Anticancer effects of kaempferol in A375 human malignant melanoma cells are mediated via induction of apoptosis, cell cycle arrest, inhibition of cell migration and downregulation of m-TOR/PI3K/Akt pathway [J]. *J BUON*, 2018, 23(1): 218-223.
- [20] ZHOU R P, LIN S J, WAN W B, et al. Chlorogenic acid prevents osteoporosis by Shp2/PI3K/Akt pathway in ovariectomized rats [J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0166751.
- [21] CHEN L, TENG H, CAO H. Chlorogenic acid and caffeic acid from *Sonchus oleraceus* Linn synergistically attenuate insulin resistance and modulate glucose uptake in HepG2 cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 127: 182-187.
- [22] WANG X, LIU J, XIE Z, et al. Chlorogenic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in A498 human kidney cancer cells via inactivating PI3K/Akt/mTOR signalling pathway [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2019, 71(7): 1100-1109.
- [23] REFOLO M G, LIPPOLIS C, CARELLA N, et al. Chlorogenic acid improves the regorafenib effects in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1518.
- [24] GAO L, LI X, MENG S, et al. Chlorogenic acid alleviates  $A\beta_{25-35}$ -induced autophagy and cognitive impairment via the mTOR/TFEB signaling pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 1705-1716.
- [25] VANHAESEBROECK B, GUILLERMET-GUIBERT J, GRAUPERA M, et al. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(5): 329-41.
- [26] HENNESSY B T, SMITH D L, RAM P T, et al. Exploiting the PI3K/Akt pathway for cancer drug discovery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(12): 988-1004.
- [27] MANNING B D, CANTLEY L C. Akt/PKB signaling: navigating downstream [J]. *Cell*, 2007, 129(7): 1261-1274.
- [28] BELLACOSA A, TESTA J R, STAAL S P, et al. A retroviral oncogene, Akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region [J]. *Science*, 1991, 254(5029): 274-277.
- [29] JONES P F, JAKUBOWICZ T, PITOSI F J, et al. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(10): 4171-4175.
- [30] STAAL S P. Molecular cloning of the Akt oncogene and its human homologues Akt1 and Akt2: amplification of Akt1 in a primary human gastric adenocarcinoma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(14): 5034-5037.
- [31] DATTA S R, BRUNET A, GREENBERG M E. Cellular survival: a play in three Akts [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(22): 2905-2927.
- [32] KANDEL E S, HAY N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 253(1): 210-229.
- [33] CALLEJA V, ALCOR D, LAGUERRE M, et al. Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation *in vivo* [J]. *PLoS Biol*, 2007, 5(4): e95.
- [34] CALLEJA V, LAGUERRE M, PARKER P J, et al. Role of a novel PH-kinase domain interface in PKB/Akt regulation: structural mechanism for allosteric inhibition [J]. *PLoS Biol*, 2009, 7(1): e17.
- [35] MANNING B D, TOKER A. Akt/PKB signaling: navigating the network [J]. *Cell*, 2017, 169(3): 381-405.
- [36] STOKOE D, STEPHENS L R, COPELAND T, et al. Dual role of phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate in the activation of protein kinase B [J]. *Science*, 1997, 277(5325): 567-570.
- [37] ALESSI D R, JAMES S R, DOWNES C P, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B $\alpha$  [J]. *Curr Biol*, 1997, 7(4): 261-269.
- [38] SARBASSOV D D, GUERTIN D A, ALI S M, et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex [J]. *Science*, 2005, 307(5712): 1098-1101.
- [39] ALESSI D R, ANDJELKOVIC M, CAUDWELL B, et

- al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1 [J]. *EMBO J*, 1996, 15(23): 6541-6551.
- [40] YANG J, CRON P, GOOD V M, et al. Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP [J]. *Nat Struct Biol*, 2002, 9(12): 940-944.
- [41] RA SAXTON D M S. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease [J]. *Cell*, 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.03.035
- [42] MAIESE K, CHONG Z Z, SHANG Y C, et al. mTOR: on target for novel therapeutic strategies in the nervous system [J]. *Trends Mol Med*, 2013, 19(1): 51-60.
- [43] YANG H, RUDGE D G, KOOS J D, et al. mTOR kinase structure, mechanism and regulation [J]. *Nature*, 2013, 497(7448): 217-223.
- [44] AYLETT C H, SAUER E, IMSENG S, et al. Architecture of human mTOR complex 1 [J]. *Science*, 2016, 351(6268): 48-52.
- [45] LIU P, GAN W, CHIN Y R, et al. PtdIns(3, 4, 5)P3-dependent activation of the mTORC2 kinase complex [J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(11): 1194-1209.
- [46] SARBASSOV D D, ALI S M, KIM D H, et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton [J]. *Curr Biol*, 2004, 14(14): 1296-1302.
- [47] KENNEDY B K, LAMMING D W. The mechanistic target of rapamycin: the grand conductor of metabolism and aging [J]. *Cell Metab*, 2016, 23(6): 990-1003.
- [48] WANG L, RHODES C J, LAWRENCE J J. Activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) by insulin is associated with stimulation of 4EBP1 binding to dimeric mTOR complex 1 [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(34): 24293-24303.
- [49] FINGAR D C, SALAMA S, TSOU C, et al. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E [J]. *Genes Dev*, 2002, 16(12): 1472-1487.
- [50] DOWLING R J, TOPISIROVIC I, ALAIN T, et al. mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs [J]. *Science*, 2010, 328(5982): 1172-1176.
- [51] KANG S A, PACOLD M E, CERVANTES C L, et al. mTORC1 phosphorylation sites encode their sensitivity to starvation and rapamycin [J]. *Science*, 2013, 341(6144): 1236566.
- [52] KNUDSEN J R, FRITZEN A M, JAMES D E, et al. Growth factor-dependent and -independent activation of mTORC2 [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2020, 31(1): 13-24.
- [53] ZINZALLA V, STRACKA D, OPPLIGER W, et al. Activation of mTORC2 by association with the ribosome [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 757-768.
- [54] HUANG K, FINGAR D C. Growing knowledge of the mTOR signaling network [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 36: 79-90.
- [55] GUERTIN D A, STEVENS D M, THOREEN C C, et al. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC $\alpha$ , but not S6K1 [J]. *Dev Cell*, 2006, 11(6): 859-871.
- [56] JACINTO E, FACCHINETTI V, LIU D, et al. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity [J]. *Cell*, 2006, 127(1): 125-137.
- [57] XU Y, MIZUNO T, SRIDHARAN A, et al. Single-cell RNA sequencing identifies diverse roles of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *JCI Insight*, 2016, 1(20): e90558.
- [58] GOKEY J J, SRIDHARAN A, XU Y, et al. Active epithelial Hippo signaling in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *JCI Insight*, 2018, 3(6): e98738.
- [59] CONTE E, GILI E, FRUCIANO M, et al. PI3K p110 $\gamma$  overexpression in idiopathic pulmonary fibrosis lung tissue and fibroblast cells: *in vitro* effects of its inhibition [J]. *Lab Invest*, 2013, 93(5): 566-576.
- [60] MERCER P F, WOODCOCK H V, ELEY J D, et al. Exploration of a potent PI3 kinase/mTOR inhibitor as a novel anti-fibrotic agent in IPF [J]. *Thorax*, 2016, 71(8): 701-711.
- [61] ALLEN R J, GUILLEN-GUIO B, OLDHAM J M, et al. Genome-wide association study of susceptibility to idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020, 201(5): 564-574.
- [62] HOROWITZ J C, LEE D Y, WAGHRAY M, et al. Activation of the pro-survival phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by transforming growth factor-beta1 in mesenchymal cells is mediated by p38 MAPK-dependent induction of an autocrine growth factor [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(2): 1359-1367.
- [63] CONTE E, FRUCIANO M, FAGONE E, et al. Inhibition of PI3K prevents the proliferation and differentiation of human lung fibroblasts into myofibroblasts: the role of class I P110 isoforms [J].

- PLoS One, 2011, 6(10):e24663.
- [64] YIN W, HAN J, ZHANG Z, et al. Aloperine protects mice against bleomycin-induced pulmonary fibrosis by attenuating fibroblast proliferation and differentiation [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):6265.
- [65] HSU H S, LIU C C, LIN J H, et al. Involvement of ER stress, PI3K/Akt activation, and lung fibroblast proliferation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):14272.
- [66] SAITO M, MITANI A, ISHIMORI T, et al. Active mTOR in lung epithelium promotes epithelial-mesenchymal transition and enhances lung fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2020, 62(6):699-708.
- [67] 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.
- [68] JIANG Y, HU F, LI Q, et al. Tanshinone IIA ameliorates the bleomycin-induced endothelial-to-mesenchymal transition via the Akt/mTOR/p70S6K pathway in a murine model of systemic sclerosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, doi: 10.1016/j.intimp.2019.105968.
- [69] QI Q, MAO Y, TIAN Y, et al. Geniposide inhibited endothelial-mesenchymal transition via the mTOR signaling pathway in a bleomycin-induced scleroderma mouse model [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(3):1025-1036.
- [70] IYER A K, RAMESH V, CASTRO C A, et al. Nitric oxide mediates bleomycin-induced angiogenesis and pulmonary fibrosis via regulation of VEGF [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(11):2484-2493.
- [71] RØNNOW S R, DABBAGH R Q, GENOVESE F, et al. Prolonged Scar-in-a-Jar: an *in vitro* screening tool for anti-fibrotic therapies using biomarkers of extracellular matrix synthesis [J]. *Respir Res*, 2020, 21(1):108.
- [72] WALKER N M, BELLOLI E A, STUCKEY L, et al. Mechanistic target of rapamycin Complex 1 (mTORC1) and mTORC2 as key signaling intermediates in mesenchymal cell activation [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(12):6262-6271.
- [73] RUNYAN C E, SCHNAPER H W, PONCELET A C. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway enhances Smad3-stimulated mesangial cell collagen I expression in response to transforming growth factor- $\beta_1$  [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(4):2632-2639.
- [74] RICUPERO D A, POLIKS C F, RISHIKOF D C, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stabilization of  $\alpha_1(I)$  collagen mRNA in human lung fibroblasts [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 281(1):C99-C105.
- [75] CLEARY J M, SHAPIRO G I. Development of phosphoinositide-3 kinase pathway inhibitors for advanced cancer [J]. *Curr Oncol Rep*, 2010, 12(2):87-94.
- [76] SELVARAJAH B, AZUELOS I, PLATÉ M, et al. mTORC1 amplifies the ATF4-dependent de novo serine-glycine pathway to supply glycine during TGF- $\beta(1)$ -induced collagen biosynthesis [J]. *Sci Signal*, 2019, doi:10.1126/scisignal.aav3048.
- [77] 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(1):32-34.
- [78] 刘森, 廖尖兵, 王文譞, 等. 从肝论治特发性肺纤维化 [J]. *中医学报*, 2019, 34(5):920-923.
- [79] 于志谋, 李响, 崔冉, 等. 张华东教授从肝肺论治类风湿肺间质纤维化 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2019, 14(8):1088-1091.
- [80] YANG F, DONG X, YIN X, et al. Radix Bupleuri: a review of traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology, and toxicology [J]. *Biomed Res Int*, 2017, doi:10.1155/2017/7597596.
- [81] 李仁国. 柴胡有效成分及药理作用分析 [J]. *陕西中医*, 2013, 34(6):750-751.
- [82] SEKIGUCHI A, MOTEGI S I, FUJIWARA C, et al. Inhibitory effect of kaempferol on skin fibrosis in systemic sclerosis by the suppression of oxidative stress [J]. *J Dermatol Sci*, 2019, 96(1):8-17.
- [83] LI H, YANG L, ZHANG Y, et al. Kaempferol inhibits fibroblast collagen synthesis, proliferation and activation in hypertrophic scar via targeting TGF- $\beta$  receptor type I [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83:967-974.
- [84] XU T, HUANG S, HUANG Q, et al. Kaempferol attenuates liver fibrosis by inhibiting activin receptor-like kinase 5 [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(9):6403-6410.
- [85] JI X, CAO J, ZHANG L, et al. Kaempferol protects renal fibrosis through activating the BMP-7-Smad1/5 signaling pathway [J]. *Biol Pharm Bull*, 2020, 43(3):533-539.
- [86] SHARMA D, KUMAR TEKADE R, KALIA K. Kaempferol in ameliorating diabetes-induced fibrosis and renal damage: an *in vitro* and *in vivo* study in diabetic nephropathy mice model [J]. *Phytomedicine*, 2020, doi:10.1016/j.phymed.2020.153235.

- [87] SHARMA D, GONDALIYA P, TIWARI V, et al. Kaempferol attenuates diabetic nephropathy by inhibiting RhoA/Rho-kinase mediated inflammatory signalling[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 1610-1619.
- [88] LIU Y, GAO L, GUO S, et al. Kaempferol alleviates angiotensin II -induced cardiac dysfunction and interstitial fibrosis in mice[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(6): 2253-2263.
- [89] FENG H, CAO J, ZHANG G, et al. Kaempferol attenuates cardiac hypertrophy via regulation of ASK1/MAPK signaling pathway and oxidative stress [J]. *Planta Med*, 2017, 83(10): 837-845.
- [90] DU Y, HAN J, ZHANG H, et al. Kaempferol prevents against Ang II -induced cardiac remodeling through attenuating Ang II -induced inflammation and oxidative stress[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2019, 74(4): 326-335.
- [91] GONG J H, CHO I H, SHIN D, et al. Inhibition of airway epithelial-to-mesenchymal transition and fibrosis by kaempferol in endotoxin-induced epithelial cells and ovalbumin-sensitized mice [J]. *Lab Invest*, 2014, 94(3): 297-308.
- [92] LIU H, YU H, CAO Z, et al. Kaempferol modulates autophagy and alleviates silica-induced pulmonary fibrosis[J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38(12): 1418-1426.
- [93] QIAN J, CHEN X, CHEN X, et al. Kaempferol reduces K63-linked polyubiquitination to inhibit nuclear factor- $\kappa$ B and inflammatory responses in acute lung injury in mice[J]. *Toxicol Lett*, 2019, 306: 53-60.
- [94] YANG C, YANG W, HE Z, et al. Kaempferol improves lung ischemia-reperfusion injury via antiinflammation and antioxidative stress regulated by SIRT1/HMGB1/NF- $\kappa$ B axis [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1635.
- [95] RABHA D J, SINGH T U, RUNGSUNG S, et al. Kaempferol attenuates acute lung injury in caecal ligation and puncture model of sepsis in mice[J]. *Exp Lung Res*, 2018, 44(2): 63-78.
- [96] ZHANG R, AI X, DUAN Y, et al. Kaempferol ameliorates H9N2 swine influenza virus-induced acute lung injury by inactivation of TLR4/MyD88-mediated NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 660-672.
- [97] BAI L, LI A, GONG C, et al. Protective effect of rutin against bleomycin induced lung fibrosis: Involvement of TGF- $\beta_1/\alpha$ -SMA/Col I and III pathway [J]. *Biofactors*, 2020, 46(4): 637-644.
- [98] YUAN B, YANG R, MA Y, et al. A systematic review of the active saikosaponins and extracts isolated from *Radix Bupleuri* and their applications[J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 620-635.
- [99] LIU Y, GAO L, ZHAO X, et al. Saikosaponin A protects from pressure overload-induced cardiac fibrosis via inhibiting fibroblast activation or endothelial cell EndMT [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(13): 1923-1934.
- [100] REN D, LUO J, LI Y, et al. Saikosaponin B<sub>2</sub> attenuates kidney fibrosis via inhibiting the hedgehog pathway [J]. *Phytomedicine*, 2020, doi: 10.1016/j.phymed.2019.153163.
- [101] CUI L, LI C, ZHUO Y, et al. Saikosaponin a inhibits the activation of pancreatic stellate cells by suppressing autophagy and the NLRP3 inflammasome via the AMPK/mTOR pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, doi:10.1016/j.biopha.2020.110216.
- [102] CUI L H, LI C X, ZHUO Y Z, et al. Saikosaponin d ameliorates pancreatic fibrosis by inhibiting autophagy of pancreatic stellate cells via PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 300: 18-26.
- [103] SHIU L Y, HUANG H H, CHEN C Y, et al. Reparative and toxicity-reducing effects of liposome-encapsulated saikosaponin in mice with liver fibrosis [J]. *Biosci Rep*, 2020, doi:10.1042/BSR20201219.
- [104] 郑金旭, 卢坤琴, 夏德刚, 等. 柴胡皂甙d对博来霉素诱导肺纤维化小鼠的治疗作用及机制研究[J]. *中华医学杂志*, 2010, 90(12): 808-812.
- [105] 孙金玲, 郑金旭, 史小东, 等. 柴胡皂甙D通过调控TGF- $\beta_1$ /Smads信号通路抑制人胚肺成纤维细胞增殖和胶原蛋白产生[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2019, 35(3): 256-261.
- [106] CHEN R J, GUO X Y, CHENG B H, et al. Saikosaponin a inhibits cigarette smoke-induced oxidant stress and inflammatory responses by activation of Nrf2 [J]. *Inflammation*, 2018, 41(4): 1297-1303.
- [107] DU Z A, SUN M N, HU Z S. Saikosaponin a ameliorates LPS-induced acute lung injury in mice[J]. *Inflammation*, 2018, 41(1): 193-198.
- [108] 郭敏娜, 刘素香, 赵艳敏, 等. 基于HPLC-Q-TOF-MS技术的柴胡化学成分分析[J]. *中草药*, 2016, 47(12): 2044-2052.
- [109] LIU X, HUANG K, ZHANG R J, et al. Isochlorogenic acid a attenuates the progression of liver fibrosis through regulating HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 582.

- [110] SHI A, SHI H, WANG Y, et al. Activation of Nrf2 pathway and inhibition of NLRP3 inflammasome activation contribute to the protective effect of chlorogenic acid on acute liver injury [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 54: 125-130.
- [111] YANG F, LUO L, ZHU Z D, et al. Chlorogenic acid inhibits liver fibrosis by blocking the miR-21-regulated TGF- $\beta$ /Smad7 signaling pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 929.
- [112] SHI H, SHI A, DONG L, et al. Chlorogenic acid protects against liver fibrosis *in vivo* and *in vitro* through inhibition of oxidative stress [J]. *Clin Nutr*, 2016, 35(6): 1366-1373.
- [113] WANG Y, YANG F, XUE J, et al. Antischistosomiasis liver fibrosis effects of chlorogenic acid through IL-13/miR-21/Smad7 signaling interactions *in vivo* and *in vitro* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(2)
- [114] KIM H, PAN J H, KIM S H, et al. Chlorogenic acid ameliorates alcohol-induced liver injuries through scavenging reactive oxygen species [J]. *Biochimie*, 2018, 150: 131-138.
- [115] WANG Y C, DONG J, NIE J, et al. Amelioration of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by chlorogenic acid through endoplasmic reticulum stress inhibition [J]. *Apoptosis*, 2017, 22(9): 1147-1156.
- [116] HOHMANN M S, HABIEL D M, COELHO A L, et al. Quercetin enhances ligand-induced apoptosis in senescent idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts and reduces lung fibrosis *in vivo* [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 60(1): 28-40.
- [117] TAKANO M, DEGUCHI J, SENOO S, et al. Suppressive effect of quercetin against bleomycin-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2020, 35(6): 522-526.
- [118] ZHAO H, LI C, LI L, et al. Baicalin alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and fibroblast proliferation in rats via the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(6): 2321-2334.
- [119] YE M, BI Y F, DING L, et al. Saikosaponin a functions as anti-epileptic effect in pentylenetetrazol induced rats through inhibiting mTOR signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 81: 281-287.
- [120] GAO T, ZHAO P, YU X, et al. Use of Saikosaponin D and JNK inhibitor SP600125, alone or in combination, inhibits malignant properties of human osteosarcoma U2 cells [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(4): 2070-2080.
- [121] HU S C, LAI Y C, LIN C L, et al. Inclusion complex of saikosaponin-d with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: Improved physicochemical properties and anti-skin cancer activity [J]. *Phytomedicine*, 2019, 57: 174-182.
- [122] ZHANG F, CHEN L, JIN H, et al. Activation of Fas death receptor pathway and Bid in hepatocytes is involved in saikosaponin D induction of hepatotoxicity [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 41: 8-13.

[责任编辑 周冰冰]