

补肺活血胶囊对肺纤维化模型小鼠的治疗作用及对 PI3K/Akt 信号通路的影响

姜博涵¹, 张宁¹, 郭亚丽², 王玉光^{2*}

1. 北京中医药大学, 北京 100029

2. 首都医科大学附属北京中医医院, 北京 100010

摘要: **目的** 探索补肺活血胶囊治疗特发性肺纤维化的作用及其机制。**方法** 将 60 只 C57BL/6J 雄性小鼠分为对照组、模型组、吡非尼酮组及补肺活血胶囊高、低剂量组, 每组各 12 只。除对照组外, 其余各组小鼠气管滴注博来霉素建立肺纤维化模型。造模后第 1 天开始干预治疗, 补肺活血胶囊低、高剂量组分别 ig 315、630 mg/(kg·d) 的补肺活血胶囊溶液, 吡非尼酮组 ig 吡非尼酮 200 mg/(kg·d), 对照组、模型组 ig 等剂量生理盐水。连续给药 28 d 后取材, 收集小鼠的肺组织, 分别运用苏木精-伊红染色 (HE) 和马松 (Masson) 法观察小鼠的肺组织病理学变化, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测肺组织羟脯氨酸 (HYP) 含量, 实时荧光定量 (qRT-PCR) 法检测肺组织 I 型胶原蛋白 (COL-I)、纤连蛋白 1 (Fn1)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) mRNA 相对表达水平, 免疫组化法检测肺组织磷酸化的磷脂酰肌醇-3-激酶 (p-PI3K) 和磷酸化的蛋白激酶 B (p-Akt) 蛋白的表达水平。**结果** 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织结构明显被破坏、炎症细胞渗出及胶原纤维沉积增多, 肺组织中 HYP 含量明显升高, COL-I、Fn1、 α -SMA mRNA 相对表达量均明显升高, p-PI3K 和 p-Akt 蛋白的表达量显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 补肺活血胶囊高剂量组、吡非尼酮组小鼠肺组织结构改善明显、炎症细胞渗出以及胶原纤维沉积明显减少, 肺组织中 HYP 含量明显降低, COL-I、Fn1、 α -SMA mRNA 相对表达量均明显降低, p-PI3K 和 p-Akt 蛋白的表达量显著降低 ($P < 0.01$)。**结论** 补肺活血胶囊具有抗纤维化的作用, 可能与 PI3K/Akt 信号通路有关。

关键词: 补肺活血胶囊; 吡非尼酮; 特发性肺纤维化; 磷脂酰肌醇-3-激酶; 羟脯氨酸; 蛋白激酶 B

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2023)07-1590-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.07.006

Therapeutic effect of Bufe Huoxue Capsules on pulmonary fibrosis model mice and its effect on PI3K/Akt signal pathway

JIANG Bo-han¹, ZHANG Ning¹, GUO Ya-li², WANG Yu-guang²

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010, China

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of Bufe Huoxue Capsule in treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. **Methods** 60 C57BL/6J male mice were divided into control group ($n = 12$), model group ($n = 12$), pirfenidone group ($n = 12$), Bufe Huoxue Capsule high dose group ($n = 12$) and Bufe Huoxue Capsules low dose group ($n = 12$). Except the control group, the pulmonary fibrosis model was established by intratracheal instillation of bleomycin in other groups. Intervention treatment began on the first day after the establishment of the model. The low and high dose groups of Bufe Huoxue Capsules were given 315 and 630 mg/(kg·d) Bufe Huoxue Capsules solution, respectively. Pirfenidone group were ig pirfenidone 200 mg/(kg·d). The control group and model group were given the same dose of normal saline. After 28 d of continuous administration, the lung tissues of mice were collected, the pathological changes of lung tissues were observed by hematoxylin-eosin staining (HE) and Masson pine (Masson) method, and the content of hydroxyproline (HYP) in lung tissue was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The relative expression levels of collagen I (COL-I), fibronectin 1 (Fn1) and α -smooth muscle actin (α -SMA) mRNA in lung tissue were detected by real-time fluorescence quantification (qRT-PCR). The expression levels of phosphatidylinositol-3-kinase (p-PI3K) and

收稿日期: 2023-03-16

基金项目: 高层次公共卫生技术人才培养建设项目计划项目 (学科带头人-01-16)

作者简介: 姜博涵, 硕士研究生, 研究方向为中西医结合治疗呼吸系统疾病的临床和基础研究。E-mail: vnjiang@foxmail.com

*通信作者: 王玉光, 博士, 教授。E-mail: wygzhyaids@126.com

phosphorylated protein kinase B (p-Akt) in lung tissue were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the control group, the lung tissue structure of the model group was obviously destroyed, the exudation of inflammatory cells and the deposition of collagen fibers increased, the content of HYP in the lung tissue, the relative expression of COL- I, Fn1, α -SMA mRNA, and the expression of p-PI3K and p-Akt protein increased significantly in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the lung tissue structure of the mice in the high dose Bufei Huoxue Capsules group and the pifenidone group were significantly improved, the inflammatory cell exudation and collagen fiber deposition were significantly decreased, the content of HYP in the lung tissue was significantly decreased, the relative expressions of COL- I, Fn1, α -SMA mRNA, and the expression of p-PI3K and p-Akt protein were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Bufei Huoxue Capsules has the effect of anti-fibrosis, which may be related to PI3K/Akt signal pathway.

Key words: Bufei Huoxue Capsules; pifenidone; idiopathic pulmonary fibrosis; PI3K; HYP; p-Akt

特发性肺纤维化 (IPF) 是慢性、渐进性、纤维化性肺疾病, 临床表现为进行性呼吸困难、活动耐力下降、低氧血症以及呼吸衰竭^[1]。IPF 的病理特征为普通型间质性肺炎 (UIP), 表现为远端肺实质中出现片状纤维化重构区域及成纤维母细胞灶。近年来, IPF 发病率逐年上升, 中位生存期仅 2~3 年^[2]。现代医学以吡非尼酮和尼达尼布等抗纤维化治疗为主, 虽能一定程度上延缓肺功能下降, 延缓疾病进展, 但存在较多不良反应^[3]。

中医学将 IPF 归为“肺痹”“肺痿”范畴, 认为其病机为本虚标实, 以肺、脾、肾亏虚, 尤以肺气亏虚为主, 痰、瘀、热互结致病^[4-5]。本病源于气虚血瘀, 肺肾亏虚, 痰瘀互结, 故临床中常以益气活血、补肺固肾疗法为主^[6-7]。补肺活血胶囊由黄芪、赤芍、补骨脂组成, 具有益气活血、补肺固肾的功效^[8]。临床研究表明, 补肺活血胶囊治疗 IPF 疗效明显, 可以一定程度上延缓肺功能下降, 提高活动耐力, 改善临床症状及生活质量^[9], 但其抗纤维化作用机制尚不明确。磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路主要参与细胞生长、分化、凋亡和血管生成等过程, 是调控肺纤维化的重要通路^[3, 10]。本研究通过观察羟脯氨酸 (HYP)、I 型胶原蛋白 (COL-I)、纤连蛋白 1 (Fn1)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、磷酸化磷脂酰肌醇-3-激酶 (p-PI3K) 和磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt) 的表达情况, 分析补肺活血胶囊对于 PI3K/Akt 通路的调控作用, 探究其对 IPF 的作用及机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 60 只, 年龄 7~8 周, 体质量 20~24 g, 购自北京维通利华实验动物技术公司, 许可证编号 (京) 2021-0007, 饲养于北京市中医研究所, 饲养条件为 SPF 级, 每日动物处于 12 h 光

照/12 h 黑暗交替环境 (温度 22~25 °C, 湿度 60%~70%), 通风良好, 常规颗粒饲料喂养, 摄食饮水自由, 适应性饲养 1 周。动物实验经北京中医医院研究所伦理委员会批准 (批准号 BJTCM-M-2021-05-02)。

1.2 药物与试剂

补肺活血胶囊由广东雷允上药业有限公司生产, 规格 0.35 g/粒, 产品批号 20220309。吡非尼酮由北京康蒂尼药业有限公司生产, 产品批号 150816; 注射用盐酸博来霉素由浙江翰辉制药有限公司生产, 产品批号 15374。4%多聚甲醛 (北京兰杰柯科技有限公司, 批号 BL.539A); 无水乙醇 (中国医药集团有限公司, 批号 10009218); 二甲苯 (中国医药集团有限公司, 批号 10023418)。伊红 (MDL)、苏木素染液 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号 ZLI-9609), Masson 三色染色试剂盒 (索莱宝, 批号 G1340), Van Gieson 染色液 (LEAGENE, 批号 DC0047), Mouse HYP ELISA Kit (MDL, 批号 MD120463), TRIZOL 试剂 (Invitrogen, 批号 10296028), 异丙醇 (中国医药集团有限公司, 批号 40064360), 核酸酶抑制剂 (MDL, 批号 MD911875), UltraPure Agarose (ABI-Invitrogen, 批号 6500100), SuperScript III RT 逆转录 kit (ABI-Invitrogen, 批号 11752050), Sybr qPCR mix (ABI-Invitrogen, 批号 4472920), Citrate 柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) (北京中杉金桥生物技术有限公司, ZLI-9064), 磷酸盐缓冲液 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号 ZLI-9061), DAB kit (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号 ZLI-9017), 磷酸化磷脂酰肌醇-3-激酶 (p-PI3K) 抗体 (Affinity, 批号 AF3241), 磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt) 抗体 (Affinity, 批号 AF0016), 通用型 SPkit (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号 SP-9000), 封闭液 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号 AR0150), 抗体稀释液 (武汉博士德生物工程有

限公司, 批号 AR1016)。

1.3 实验仪器

ASP200S 型全自动脱水机 (德国 Leica 公司), RM2235 型石蜡切片机 (德国 Leica 公司), HI1220 型烤片台 (德国 Leica 公司), HI1220 型水浴缸 (德国 Leica 公司), G1150 H 型加热石蜡包埋系统 (德国 Leica 公司), DM3000 型显微镜 (德国 Leica 公司), DM3000 型正置荧光显微镜 (德国 Leica 公司), 550 型酶标仪 (美国 BIO-RAD 公司), GL-88B 型漩涡混匀器 (海门市其林贝尔公司), AXTGL16M 型离心机 (湖南恒诺仪器设备公司), LEGEND MICRO 21R 型台式高速冷冻离心机 (美国 THERMO 公司), Nanodrop lite 型分光光度计 (美国 THERMO 公司), StepOne Software 型荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied biosystems 公司), EPS 300 型电泳仪 (美国 BIO-RAD 公司), 2500 型凝胶成像仪 (美国 BIO-RAD 公司), 移液器 (德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将 60 只 C57BL/6J 小鼠分为 5 组, 每组 12 只, 分别为对照组、模型组、吡非尼酮组及补肺活血胶囊高、低剂量组。除对照组外, 其余各组小鼠建立肺纤维化模型, 即单次气管内滴注博来霉素, 剂量为 5 mg/kg。

参考相关文献方法^[11], 于造模后第 1 天开始干预治疗, 对照组、模型组按实际体质量 ig 等量生理盐水 10 mg/(kg·d), 1 次/d。吡非尼酮组按实际体质量 ig 吡非尼酮 200 mg/kg。按补肺活血胶囊说明书, 以成人 (60 kg) 4 200 mg/d 的标准剂量换算, 则小鼠等效剂量为 4 200 mg/d ÷ 60 kg × 70 kg × 0.002 6/20 g ≈ 630 mg/(kg·d), 补肺活血胶囊高、低剂量 (临床标准剂量) 组分别 ig 配制好的补肺活血胶囊 630、315 mg/(kg·d), 1 次/d。连续给药 28 d 后取材。

2.2 小鼠一般情况观察

实验过程中观察小鼠一般情况, 包括精神状态、活动程度、呼吸频率、进食量和皮毛色泽等。记录各组小鼠体质量变化和死亡数量等。

2.3 肺组织病理切片观察

取小鼠肺组织右下叶, 用 4%多聚甲醛溶液固定 24 h 后, 常规脱水、石蜡包埋、切片, 脱蜡后, 再分别用苏木精-伊红 (HE) 和马松 (Masson) 的试剂盒染色。然后将切片浸入 95%乙醇 I、95%乙醇 II 各 1 min, 无水乙醇 I、无水乙醇 II 中各 3 min

脱水, 脱水后将切片浸入二甲苯 I 溶液和二甲苯 II 溶液中各 3 min, 最后将切片晾干, 封片。在光学显微镜下对小鼠肺组织病理切片进行观察并摄片。

2.4 肺组织 HYP 含量测定

采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测各组小鼠肺组织 HYP 水平。分别设标准孔、空白孔与待测样品孔。标准孔依次加入 100 μL 不同浓度 (0、2.5、5、10、20、40 ng/mL) 的标准品溶液; 空白孔加入 100 μL 标准品稀释液, 待测样品孔加待测样品 100 μL, 在酶标板上盖上覆膜, 37 °C 温育 1 h。洗板 5 次, 洗涤后用吸水纸彻底拍干。各孔中加入显色剂 A 100 μL, 酶标板覆盖, 37 °C 温育 30 min, 弃去孔中液体, 洗板 5 次, 拍干; 再向各孔中加入显色剂 B 100 μL, 37 °C 温育 30 min, 弃去孔中液体, 洗板 5 次, 拍干。在 20-25 °C 下避光反应 10 min 后, 各孔加入 50 μL 终止液终止反应。立即将反应板置于已设好波长的 450 nm 的酶标仪, 在 30 min 内读出 OD 值。按照样品读数及稀释浓度计算出小鼠肺组织 HYP 水平。

2.5 RT-qPCR 法检测肺组织 COL- I、Fn1 和 α-SMA 的 mRNA 相对表达水平

采用 Trizol 法提取样本总 RNA, 使用核酸浓度测定仪测定 RNA 浓度和纯度。逆转录合成 cDNA, 以 β-actin 为内参, 进行 PCR 的扩增。反应总体积为 20 μL, 反应程序: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 10 s, 58 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 重复 40 个循环, 熔解曲线分析, 95 °C、15 s, 60 °C、60 s, 95 °C、15 s, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 COL- I、Fn1、α-SMA mRNA 相对表达量, 引物序列见表 1。

2.6 肺组织 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达水平

将肺组织依次进行 4%多聚甲醛固定、包埋、切片、脱蜡、抗原修复。3%过氧化氢溶液孵育 10 min 30 min。滴加适宜浓度的一抗置湿盒中 4 °C 孵育过

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-qPCR

基因	引物序列 (3'-5')
β-Actin	正向 CTCCTGAGCGCAAGTACTCT
	反向 TACTCCTGCTTGCTGATCCAC
Col- I	正向 GAGAACATCCGCAGCCCCGAAG
	反向 TCGATCCAGTACTCTCCGCTCT
FN1	正向 TTCTGAGTTTCATCCTACCCC
	反向 ATTGACTTCATTGGTACACCG
α-SMA	正向 ATTCCCGAGAACACTAACTTCCC
	反向 TTCATCTGGTGGTCACTGGTT

以消除内源性过氧化物酶活性，在湿盒中室温封闭过夜。滴加生物素化二抗工作液，室温置湿盒中孵育 20 min，加入 DAB 显色液，显微镜下控制显色时间，阳性为棕黄色，自来水冲洗切片终止显色，苏木素染色液复染 3 min，自来水冲洗；1%的盐酸酒精分化数秒、冲洗返蓝，乙醇梯度脱水、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。

2.7 统计学方法

分别采用 IBM SPSS Statistics 25.0、GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行统计分析、做图。计量资料符合正态分布用 $\bar{x} \pm s$ 表示，不符合正态分布用中位数和四分位间距表示。两组间比较符合正态分布采用独立样本 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析；组间比较不符合正态分布采用非参数检验。

3 结果

3.1 小鼠体质量与生活状态观察

造模及给药后，对照组小鼠一般状态较好，精神状态佳，反应敏捷，活泼好动，进食、饮水量正常，皮毛光亮，尾部无缺损。模型组小鼠精神状态较差，反应缓慢，活动量明显减少，进食量减少，饮水量减少，体型瘦弱，皮毛晦暗无光、凌乱，较多小鼠尾部出现缺损。补肺活血胶囊高剂量组与吡非尼酮组小鼠一般状态表现接近，反应较缓慢，活

动量稍减，进食、饮水量减少，皮毛尚有光泽，部分尾部出现缺损，均优于补肺活血胶囊低剂量组与模型组。对照组无小鼠死亡，模型组小鼠死亡 3 只，吡非尼酮组死亡 2 只，补肺活血胶囊高剂量组死亡 2 只，补肺活血胶囊低剂量组死亡 3 只。

由表 2 可知，给药 7 d 后，吡非尼酮组与模型组小鼠体质量最低，吡非尼酮组小鼠体质量较低可能与前期小鼠 ig 给药时不配合相关，给药 14、28 d，小鼠体质量由高到低排序为对照组、补肺活血胶囊高剂量组、吡非尼酮组、补肺活血胶囊低剂量组、模型组。

3.2 HE 染色结果

如图 1 所示，对照组小鼠肺组织结构清晰正常，轮廓完整，肺泡间隔未见明显增厚，未见明显渗出及炎性细胞浸润。模型组小鼠肺组织见肺泡结构明显破坏，肺泡间隔增厚或（和）断裂，纤维组织增生明显，可见胶原沉积，肺泡腔内可见明显炎性细胞浸润。与模型组比较，补肺活血胶囊低、高剂量组及吡非尼酮组小鼠肺组织上述病理变化均有不同程度的好转，肺泡融合塌陷较少，肺组织结构较完整，病变范围局限，炎性渗出物减少。

3.3 Masson 染色结果

如图 2 所示，对照组小鼠肺组织结构清晰正常，轮廓完整，肺泡间隔未见明显增厚，未见明显渗出及炎性细胞浸润。模型组小鼠肺组织见肺泡结构明

表 2 造模后各组小鼠体质量变化 ($n=12$)

Table 2 Changes of body weight of mice in each group after modeling ($n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量/g			
		给药前	给药 7 d	给药 14 d	给药 28 d
对照	—	21.68	23.78	24.20	25.02
模型	—	21.80	17.14	17.04	18.40
补肺活血胶囊	315	21.49	18.11	17.66	18.88
	630	21.85	19.06	19.60	21.39
吡非尼酮	200	21.80	17.30	19.25	20.62

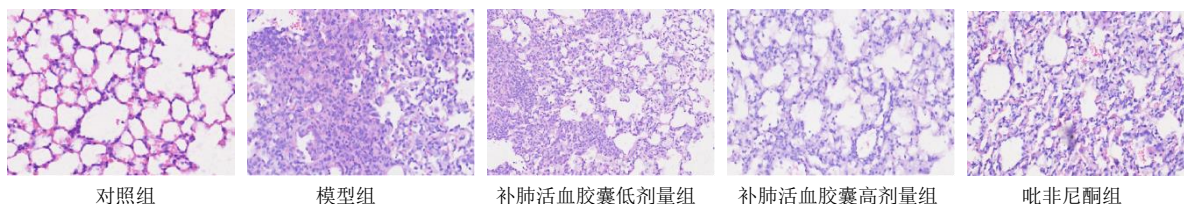


图 1 各组小鼠肺组织病理变化 (HE 染色, $\times 20$)

Fig. 1 Pathological changes of lung tissue of mice in each group (HE staining, $\times 20$)

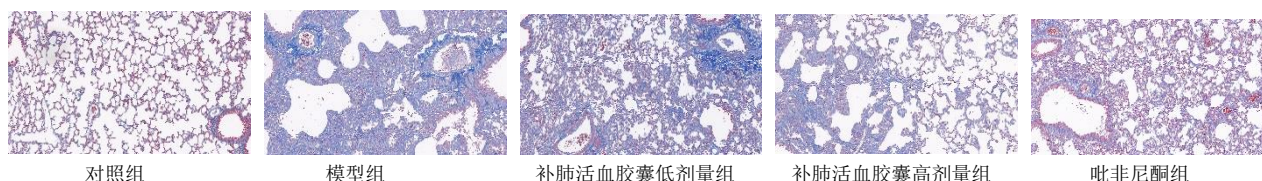


图 2 各组小鼠肺组织病理变化 (Masson 染色, $\times 20$)

Fig. 2 Pathological changes in lung tissue of mice in each group (Masson staining, $\times 20$)

显破坏, 肺泡间隔增厚或 (和) 断裂, 纤维组织增生明显, 可见胶原沉积, 肺泡腔内可见明显炎性细胞浸润。与模型组比较, 补肺活血胶囊高剂量组、补肺活血胶囊低剂量组、吡非尼酮组小鼠肺组织蓝色胶原纤维的沉积不同程度地减少。

3.4 各组小鼠肺组织中 HYP 含量比较

如表 3 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠肺组织中 HYP 含量显著增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 补肺活血胶囊低、高剂量组及吡非尼酮组小鼠肺组织中 HYP 含量均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与补肺活血胶囊低剂量组相比, 补肺活血胶囊高剂量组、吡非尼酮组小鼠肺组织中 HYP 含量显著降低 ($P < 0.01$); 补肺活血胶囊高剂量组与吡非尼酮组小鼠肺组织中 HYP 含量接近, 差异无统计学意义。

表 3 各组小鼠肺组织 HYP 含量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 3 Comparison on HYP content in lung tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	HYP/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	101.00 ± 4.82
模型	—	452.65 ± 25.70**
补肺活血胶囊	315	391.42 ± 10.23 [#]
	630	230.69 ± 57.78 ^{###△△}
吡非尼酮	200	222.84 ± 53.66 ^{###△△}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.01$;

与补肺活血胶囊低剂量组比较: ^{△△} $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.01$ vs model group; ^{△△} $P < 0.01$ vs Bufei Huoxue Capsules low dose group

表 4 各组肺组织中 COL-I、Fn1 和 α -SMA 的 mRNA 相对表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 4 Relative mRNA expression levels of COL- I, Fn1 and α -SMA in lung tissues of each group ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	COL- I mRNA 相对表达水平	Fn1 mRNA 相对表达水平	α -SMA mRNA 相对表达水平
对照	—	0.88 ± 0.18	0.83 ± 0.18	0.79 ± 0.18
模型	—	5.63 ± 0.56**	2.53 ± 0.35**	2.73 ± 0.30**
补肺活血胶囊	315	4.68 ± 0.62 [#]	2.10 ± 0.26	2.19 ± 0.46
	630	2.38 ± 0.42 ^{###△△}	1.75 ± 0.18 ^{###}	1.59 ± 0.18 ^{###△}
吡非尼酮	200	2.54 ± 0.41 ^{###△△}	1.75 ± 0.19 ^{###}	1.58 ± 0.29 ^{###△}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.01$; 与补肺活血胶囊低剂量组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$

3.5 各组小鼠肺组织中 COL- I、Fn1 和 α -SMA mRNA 相对表达水平比较

如表 4 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠肺组织中 COL- I、Fn1、 α -SMA 的 mRNA 相对表达量均显著上调 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 补肺活血胶囊高剂量组、吡非尼酮组小鼠肺组织中 COL- I、Fn1、 α -SMA mRNA 相对表达量均显著下调 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 补肺活血胶囊低剂量组小鼠肺组织中 COL- I mRNA 相对表达量下调 ($P < 0.05$), Fn1、 α -SMA 的 mRNA 相对表达量的差异无统计学意义; 与补肺活血胶囊低剂量组相比, 补肺活血胶囊高剂量组、吡非尼酮组小鼠肺组织中 COL- I 的 mRNA 相对表达量显著下调 ($P < 0.01$), α -SMA 的 mRNA 相对表达量下调 ($P < 0.05$), Fn1 的 mRNA 相对表达量差异无统计学意义。

3.6 各组小鼠肺组织中 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达水平比较

如图 3、表 5 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠肺组织中 p-PI3K、p-Akt 蛋白含量均显著上调 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 补肺活血胶囊低、高剂量及吡非尼酮组小鼠肺组织中 p-PI3K、p-Akt 蛋白含量均显著下调 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与补肺活血胶囊低剂量组相比, 补肺活血胶囊高剂量组和吡非尼酮组小鼠肺组织中 p-PI3K 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.01$), p-Akt 蛋白表达量降低 ($P < 0.05$); 补肺活血胶囊高剂量组与吡非尼酮组小鼠肺组织中 p-PI3K、p-Akt 蛋白含量接近, 差异无统计学意义。

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Bufe Huoxue Capsules low dose group

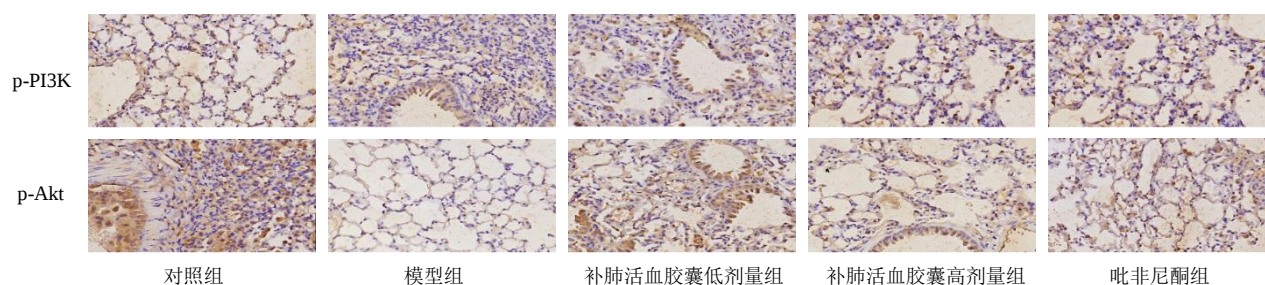


图 3 p-PI3K 和 p-Akt 免疫组化 (Masson 染色, $\times 40$)

Fig. 3 Immunohistochemistry of p-PI3K and p-Akt (Masson staining, $\times 40$)

表 5 各组小鼠肺组织 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达水平
($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 5 Expression levels of p-PI3K and p-Akt proteins in lung tissues of each group ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂 量 / ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	蛋白表达水平	
		p-PI3K	p-Akt
对照	—	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.02
模型	—	$0.29 \pm 0.07^{**}$	$0.37 \pm 0.03^{**}$
补肺活血胶囊	315	$0.25 \pm 0.03^{\#}$	$0.23 \pm 0.06^{##}$
	630	$0.19 \pm 0.04^{###\Delta\Delta}$	$0.22 \pm 0.04^{###\Delta\Delta}$
吡非尼酮	200	$0.19 \pm 0.02^{###\Delta\Delta}$	$0.22 \pm 0.04^{###\Delta\Delta}$

与对照组相比: ** $P < 0.01$; 与模型组相比: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$;

与补肺活血胶囊低剂量组相比: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group;

$\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Bufe Huoxue Capsules low dose group

4 讨论

在中医学中没有与 IPF 完全相对应的病名, 现代研究中将 IPF 归属为“肺痿”“肺痹”者居多。“肺痹”滥觞于《黄帝内经》。《素问·玉机真脏论》曰:“风寒客于人, 使人毫毛毕直, 皮肤闭而为热……弗治, 病入舍于肺, 名曰肺痹, 发咳上气”。《素问·痹论》曰:“风湿湿三气杂至, 合而为痹……皮痹不已, 复感于邪, 内舍于肺……凡痹之客五脏者, 肺痹者, 烦满喘而呕, ……淫气喘息, 痹聚在肺……其入脏者死”。其所论之肺痹, 多与皮痹相关, 主要由于肺气亏虚、少阴不足、风寒湿邪入舍于肺而成, 其证可见咳嗽, 虚喘, 胸中烦满, 喘而呕。“肺痿”一词, 源于《金匱要略·肺痿肺病咳嗽上气病脉证治第七》:“热在上焦者, 因咳为肺痿。肺痿治病, 何从得之? 师曰: 或从汗出, 或从呕吐, 或从消渴, 小便利数, 或从便难, 又被快药下利, 重亡津液, 故

得之”“肺痿吐涎沫而不咳者, 其人不渴, 必遗尿, 小便数, 所以然者, 以上虚不能制下故也。此为肺中冷, 必眩, 多涎唾……”。肺痿病因或为热在上焦, 邪热伤阴; 或因误治汗、吐、下伤阴; 或消渴津液耗伤等, 从而导致肺阴亏损和肺气虚冷、气不化津、津液不布、肺失濡养, 导致肺叶萎弱不用。

本病总由肺气虚损, 气不行血, 以致瘀血内停, 或肺气不足, 气不布津, 聚而成痰, 日久肺肾亏虚, 痰瘀互结。当属虚实夹杂、本虚标实之证。周平安教授认为, 本病大致可分为早期, 缓解期, 急性加重期, 晚期。气虚血瘀贯穿疾病的始终, 久病后肺肾亏虚, 故当以益气活血, 补肺固肾法治疗为主^[12]。补肺活血胶囊由黄芪、赤芍、补骨脂组成, 其功效为补益肺肾, 益气活血。临床研究表明^[9], 补肺活血胶囊治疗 IPF 疗效明显, 可以在一定程度上改善肺功能, 提高活动耐力, 改善临床症状及生活质量。

大量研究证明, 肺泡上皮细胞 (AEC) 在 IPF 发病机制中的关键作用^[13], AEC 的持续损伤与异常修复促成了肺纤维化的形成。上皮细胞-间充质转化 (EMT) 亦是肺纤维化发展的关键过程^[14]。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 COL-1、 α -SMA 的表达上调^[15], 促进了肺纤维化的发展。Fn1 属于纤连蛋白, 通过与胶原特异性结合, 为胶原的沉积构成基质支架^[16], 与纤维化进程息息相关。本次研究结果表明, 与模型组相比, 补肺活血胶囊高剂量组小鼠的 COL-1、Fn1、 α -SMA mRNA 表达量均显著降低 ($P < 0.01$), 证明其抗纤维化的作用。

PI3K/Akt 信号通路为参与调控肺纤维化过程的重要通路, 该通路通常由其受体酪氨酸激酶的激活触发, 导致 PI3K 从细胞质转位到质膜。这种易位激活了其催化亚基 (p110a), 进而诱导磷酸肌醇的

磷酸化, 导致第二信使 (PI3,4-二磷酸和 PI3,4,5-三磷酸) 的形成, 第二信使结合 Akt 导致其结构的改变, 暴露出 2 个氨基酸残基, 丝氨酸 473 和苏氨酸 308 分别被 PDK1 和 PDK2 磷酸化^[17]。从而导致 Akt 的激活, 诱导下游信号分子, 最终导致肌成纤维细胞增殖活化, 细胞质基质沉积, 胶原堆积, 纤维化形成。本次研究结果表明, 与模型组小鼠相比, 补肺活血胶囊高剂量组小鼠的 p-PI3K, p-Akt 表达量均显著降低 ($P < 0.01$), 表示其作用机制与 PI3K/Akt 信号通路相关。

综上所述, 补肺活血胶囊可能通过 PI3K/Akt 信号通路发挥抗纤维化的作用, 从而治疗 IPF。本研究为补肺活血胶囊治疗 IPF 提供了实验理论支持, 但是尚且需要进行更加完备的临床试验和基础实验进一步验证和阐明其具体的作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Richeldi L, Collard H R, Jones M G. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10082): 1941-1952.
- [2] Rosado de Christenson M L. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: Idiopathic pulmonary fibrosis: Evidence-based guidelines for diagnosis and management [J]. *Yearb Diagn Radiol*, 2012, 2012: 29-30.
- [3] Wang J C, Hu K L, Cai X Y, et al. Targeting PI3K/AKT signaling for treatment of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(1): 18-32.
- [4] 杨晓明. 肺痹理论探讨 [J]. 山东中医药大学学报, 2016, 40(3): 240-242.
- [5] 姜德友, 姜培培. 肺痿源流考 [J]. 浙江中医药大学学报, 2015, 39(1): 15-18.
- [6] 付小芳, 刘锡瞳, 焦扬. 周平安诊治肺间质纤维化的经验 [J]. 北京中医药, 2010, 29(2): 99-100.
- [7] 尹建坤, 刘世刚, 李光熙. 李光熙教授扶正化痰祛瘀法治疗特发性肺间质纤维化经验总结 [J]. 吉林中医药, 2022, 42(3): 277-280.
- [8] 《中成药治疗优势病种临床应用指南》标准化项目组. 中成药治疗慢性阻塞性肺疾病临床应用指南(2021 年) [J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(8): 901-914.
- [9] 孟泳, 贺启萌, 任璐瑶. 补肺活血胶囊治疗特发性肺纤维化的临床研究 [J]. 中国临床医生杂志, 2020, 48(8): 995-997.
- [10] Hu X T, Xu Q Y, Wan H X, 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.
- [11] Kolb P, Upagupta C, Vierhout M, et al. The importance of interventional timing in the bleomycin model of pulmonary fibrosis [J]. *Eur Respir J*, 2020, 55(6): 1901105.
- [12] 谢昭. 周平安教授治疗特发性肺纤维化经验总结 [D]. 北京: 北京中医药大学.
- [13] Pan L H, Yamauchi K, Uzuki M, et al. Type II alveolar epithelial cells and interstitial fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF [J]. *Eur Respir J*, 2001, 17(6): 1220-1227.
- [14] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178-196.
- [15] Hill C, Jones M G, Davies D E, et al. Epithelial-mesenchymal transition contributes to pulmonary fibrosis via aberrant epithelial/fibroblastic cross-talk [J]. *J Lung Health Dis*, 2019, 3(2): 31-35.
- [16] Dalton C J, Lemmon C A. Fibronectin: Molecular structure, fibrillar structure and mechanochemical signaling [J]. *Cells*, 2021, 10(9): 2443.
- [17] Moss B J, Ryter S W, Rosas I O. Pathogenic mechanisms underlying idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2022, 17: 515-546.

【责任编辑 金玉洁】