

虎杖苷对慢性阻塞性肺疾病大鼠 PI3K/AKT/mTOR 通路以及气道炎症的影响

史方海, 陈忠仁

海口市人民医院 呼吸内科, 海南 海口 570208

摘要:目的 构建慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠模型,探讨虎杖苷对COPD大鼠PI3K/AKT/mTOR通路以及气道炎症的影响。方法 100只Wistar大鼠随机分为对照组、模型组、地塞米松(0.2 mg/kg,阳性药)组和虎杖苷低、高剂量(30、60 mg/kg)组,每组20只。除对照组外,其他组熏香烟加气管注射内毒素法制备COPD模型,COPD造模前1 d开始ig给药,每天1次,持续30 d。ELISA法检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中肿瘤坏死因子(TNF)- α 和白细胞介素(IL)-6水平;RSE3020肺功能检测仪测定用力肺活量(FVC)、第1秒用力呼气容积(FEV₁)、呼气峰流速(PEF);取肺组织4%甲醛固定后制作切片,HE染色,并进行肺组织损伤病理评分;Western blotting检测肺组织PI3K、AKT、mTOR蛋白表达。结果 虎杖苷高、低剂量组大鼠BALF中TNF- α 和IL-6表达水平、肺组织损伤病理评分以及PI3K、AKT和mTOR蛋白表达均显著低于模型组($P < 0.01$);虎杖苷高、低剂量组大鼠FVC、FEV₁、PEF肺功能指标显著高于模型组($P < 0.01$)。结论 虎杖苷可以抑制COPD大鼠PI3K/AKT/mTOR通路,抑制气道炎症,发挥肺损伤保护作用。

关键词:虎杖苷;慢性阻塞性肺疾病(COPD);PI3K/AKT/mTOR信号通路;气道炎症;大鼠

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2020)10-1983-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.10.010

Effects of polydatin on PI3K/AKT/mTOR pathway and airway inflammation in rats with chronic obstructive pulmonary disease

SHI Fanghai, CHEN Zhongren

Department of respiratory medicine, Haikou People's Hospital, Haikou 570208, China

Abstract: **Objective** To observe the effects of polydatin on PI3K/AKT/mTOR pathway and airway inflammation in rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** Totally 100 Wistar rats were divided into control group, model group, dexamethasone (0.2 mg/kg, positive drug) group and low and high dose of polydatin (30, 60 mg/kg) groups, with 20 rats in each group. Except for control group, the COPD models were prepared by passive cigarette smoking and intratracheal Ig administration was started one day before COPD modeling, once a day, lasting for 30 days. The expression of TNF- α and IL-6 in BALF was detected by ELISA analysis. The FVC, FEV₁, and PEF was used to determine lung function. HE staining was used to determine pathological score of lung tissue injury (LDPS scores). Western blot was used to detect protein expression of PI3K, AKT and mTOR in lung tissue. **Results** The expression of TNF- α and IL-6 in BALF, LDPS scores, expression of PI3K, AKT, mTOR in low and high dose of polydatin group was significantly lower than that in COPD model group ($P < 0.01$) and the FVC, FEV₁, and PEF was significantly higher than that in COPD model group ($P < 0.01$). **Conclusion** Polydatin can inhibit PI3K/AKT/mTOR pathway to block airway inflammation in rats and protect lung destroy in COPD rats.

Key words: polydatin; chronic obstructive pulmonary disease (COPD); PI3K/AKT/mTOR pathway; airway inflammation; rat

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)表现为气道慢性炎症,因为环境污染和人口老龄化进程的加剧,COPD的人群发病率

逐年升高,1990—2015年增加了44.2%,开发COPD的预防和治疗药物有着广阔的临床应用前景^[1]。虎杖苷是从虎杖根中提取的一种天然化合物,具有抗

收稿日期: 2019-12-04

基金项目:海南省自然科学基金面上项目(818MS136)

第一作者:史方海(1987—),男,主治医师,研究方向为呼吸内科。E-mail: hnhk2010@126.com

炎、抗氧化和抗肿瘤作用^[2-3]。磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(AKT)/雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路是机体内一条重要的炎性通路,参与 COPD 的气道高炎症反应中^[4]。本研究构建 COPD 大鼠模型,探讨虎杖苷对 PI3K/AKT/mTOR 通路以及气道炎症的影响。

1 材料

1.1 实验动物

100 只健康清洁级 Wistar 雄性大鼠,12 周龄,体质量 210~240 g,购自海南医学院动物实验中心,实验动物生产许可证号 SCXK(琼)2018-0011,自由摄食饮水,清洁级适应性喂养 1 周后进行实验。所有实验方案均经本院动物研究委员会批准。

1.2 试剂与仪器

虎杖苷购自美国 Sigma 公司(批号 20181226,粉剂,质量分数≥98%);肿瘤坏死因子(TNF)- α 和白细胞介素(IL)-6 检测试剂盒,购自北京中杉金桥公司;PI3K、AKT、mTOR、 β -actin 抗体购自美国 Abcam 公司。

MK3 酶标仪,美国 Thermo 公司;BH2 显微镜,日本 Olympus 公司;RSE3020 肺功能检测仪,贝兰博科技有限公司产品;CW-SAR-830/AP 小动物呼吸机,美国 WPI 公司产品;垂直电泳仪,美国 Bio-rad 公司。

2 方法

2.1 大鼠 COPD 动物模型的建立

实验大鼠使用数字表法随机分为对照组、模型组、地塞米松(0.2 mg/kg,阳性药)组和虎杖苷低、高剂量(30、60 mg/kg)组,每组 20 只。对照组不作造模处理,仅用生理盐水滴注气管;其他组参照李红梅等^[5]的方法造模,第 1 天大鼠 ip 0.45% 戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉后,经气管注射脂多糖(LPS, 200 mg、200 μ L),第 2 天置于烟室,连续吸入 30 min/d 烟雾,持续 14 d,第 15 天再次麻醉后气管给予 LPS,第 16 天开始继续吸入烟雾持续 14 d。参考周勇等^[2]的方法,地塞米松和虎杖苷低、高剂量组在 COPD 造模前 1 d 开始 ig 给药,每天 1 次,持续 30 d,期间进行 COPD 造模处理,造模期间无大鼠死亡。

2.2 支气管肺泡灌洗液(BALF)中 TNF- α 和 IL-6 水平测定

各组大鼠经戊巴比妥钠麻醉后,对肺支气管进行肺泡灌洗,收集 BALF,1 500 r/min 离心 10 min,取上清使用 ELISA 法检测 TNF- α 和 IL-6 表达水平,严

格按照试剂盒说明书操作。

2.3 肺功能测定

大鼠经戊巴比妥钠麻醉后,暴露气管,连接小动物呼吸机,RSE3020 肺功能检测仪测定用力肺活量(FVC)、第 1 秒用力呼气容积(FEV₁)、呼气峰流速(PEF)。

2.4 肺组织病理学观察

大鼠麻醉后处死,取肺组织 4% 甲醛固定后制作 HE 染色切片。显微镜下根据周勇等^[2]的方法进行肺组织损伤病理评分:无病变为 0 分;轻度肺泡内水肿、炎性细胞浸润为 1 分;中度肺泡内水肿、炎性细胞浸润为 2 分;重度肺泡内水肿、炎性细胞浸润、伴有管腔破坏为 3 分。

2.5 组织蛋白表达的 Western blotting 检测

大鼠麻醉后处死,取肺组织 50 mg,超声研磨成组织匀浆,加入蛋白裂解液,提取细胞总蛋白,10% SDS-PAGE 凝胶电泳后转印至聚偏氟乙烯膜(PVDF)膜,室温下用 5% 脱脂乳封闭 1 h 后,加入 PI3K、AKT、mTOR 或 β -actin 一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,加入辣根过氧化物酶结合的二抗孵育 2 h,化学发光后扫描条带,Bandscan5.0 软件分析各条带灰度值,以 β -actin 为对照计算目的蛋白的相对灰度值。

2.6 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件分析,多组均数间比较使用方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 对 COPD 大鼠 BALF 中 TNF- α 和 IL-6 表达的影响

与对照组比较,模型组 TNF- α 和 IL-6 水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,地塞米松和虎杖苷低、高剂量组 TNF- α 和 IL-6 水平显著下降($P < 0.01$),且虎杖苷作用呈剂量相关性。见表 1。

表 1 各组大鼠 BALF 中 TNF- α 和 IL-6 表达的比较($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	TNF- α / (μ mol·L ⁻¹)	IL-6/ (μ mol·L ⁻¹)
对照	—	4.33 $\pm$ 0.52	2.25 $\pm$ 0.32
模型	—	44.36 $\pm$ 5.82**	32.14 $\pm$ 4.35**
地塞米松	0.2	20.43 $\pm$ 3.16 ^{##}	14.31 $\pm$ 1.73 ^{##}
虎杖苷	30	33.25 $\pm$ 4.72 ^{##}	23.62 $\pm$ 3.36 ^{##}
	60	26.24 $\pm$ 3.27 ^{##}	18.62 $\pm$ 2.05 ^{##}

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

** $P < 0.01$ vs control group; ^{##} $P < 0.01$ vs model group

3.2 对COPD大鼠肺功能的影响

与对照组比较,模型组大鼠FVC、FEV₁、PEF均显著下降($P<0.01$);与模型组比较,地塞米松和虎杖苷低、高剂量组大鼠FVC、FEV₁、PEF均显著升高($P<0.01$),且虎杖苷作用呈剂量相关性。见表2。

3.3 对COPD大鼠肺组织损伤病理的影响

镜下见模型组大鼠肺泡内水肿、间质炎症细胞浸润,各给药组均明显好转。见图1。与对照组比较,模型组肺组织损伤病理评分均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,地塞米松和虎杖苷低、高剂量组肺组织损伤病理评分均显著降低($P<0.01$),且虎杖苷作用呈剂量相关性。见表3。

3.4 对COPD大鼠PI3K/AKT/mTOR通路的影响

与对照组比较,模型组PI3K、AKT、mTOR蛋白表达均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,地塞米松和虎杖苷低、高剂量组PI3K、AKT、mTOR蛋白表达均显著下降($P<0.01$),且虎杖苷作用呈剂量相关性。见图2和表4。

4 讨论

COPD的基本病理改变表现为气道的慢性炎症,抑制气道炎症激活是目前防治COPD疾病的主要方向。虎杖苷是植物虎杖的提取物,具有镇咳、去痰、平喘、抗菌、消炎、清除自由基的功效,现代药理研究显示,虎杖苷可以抑制细胞溶酶体酶释放,阻止白细胞附壁过程,赵雨喆等^[6]研究显示,虎杖苷

表2 各组大鼠FVC、FEV₁、PEF指标的比较($\bar{x}\pm s, n=20$)
Table 2 Comparison of FVC, FEV₁, and PEF of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=20$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	FVC/mL	FEV ₁ /mL	PEF/(L·min ⁻¹)
对照	—	8.02±0.75	4.64±0.38	3.86±0.34
模型	—	2.92±0.30**	1.07±0.14**	0.82±0.11**
地塞米松	0.2	6.62±0.52 [#]	3.73±0.32 [#]	3.04±0.28 [#]
虎杖苷	30	4.47±0.42 [#]	2.54±0.27 [#]	1.63±0.21 [#]
	60	5.53±0.56 [#]	3.13±0.31 [#]	2.28±0.25 [#]

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

** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.01$ vs model group

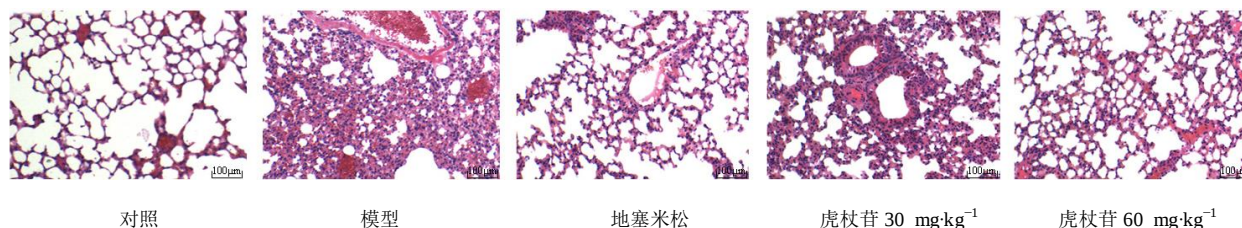


图1 肺组织的HE染色(400×)
Fig. 1 HE staining of lung tissue (400 ×)

表3 各组大鼠肺组织病理损伤评分($\bar{x}\pm s, n=20$)
Table 3 Pathological injury score of lung tissue of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=20$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肺组织病理损伤评分
对照	—	0.07±0.01
模型	—	2.62±0.27**
地塞米松	0.2	1.26±0.14 [#]
虎杖苷	30	2.13±0.22 [#]
	60	1.67±0.16 [#]

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

** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.01$ vs model group

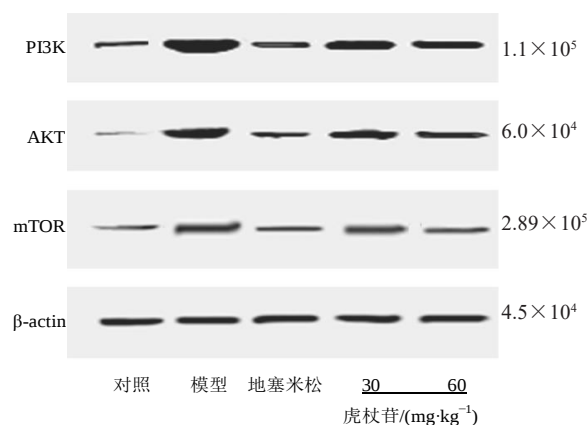


图2 PI3K、AKT、mTOR蛋白的Western blotting检测
Fig. 2 Western blotting of PI3K, Akt and mTOR proteins

表4 各组大鼠肺组织PI3K、AKT、mTOR蛋白表达相对灰度值的比较($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 4 Comparison of relative gray value of PI3K, Akt and mTOR protein expression in lung tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

分组	剂量/(mg·kg ⁻¹)	PI3K/ β -actin	AKT/ β -actin	mTOR/ β -actin
对照	—	0.18±0.03	0.07±0.01	0.12±0.02
模型	—	2.34±0.37**	2.04±0.31**	1.87±0.24**
地塞米松	0.2	0.24±0.05 [#]	0.17±0.03 [#]	0.18±0.04 [#]
虎杖苷	30	1.62±0.28 [#]	1.05±0.12 [#]	0.92±0.17 [#]
	60	1.05±0.22 [#]	0.72±0.13 [#]	0.56±0.11 [#]

与对照组比较:** $P < 0.01$;与模型组比较:[#] $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.01$ vs model group

可以显著减轻哮喘模型小鼠的气道炎症。本研究显示,虎杖苷组 COPD 大鼠 BALF 中 TNF- α 和 IL-6 表达水平显著低于模型组,且作用呈剂量相关性,说明了虎杖苷可以降低 COPD 大鼠的气道炎症。肺组织损伤病理评分结果也显示了虎杖苷可以剂量相关性地抑制 COPD 大鼠的肺损伤,同时肺功能检测也发现虎杖苷可以剂量相关性地改善 COPD 大鼠的肺功能。上述结果提示,虎杖苷可以抑制 COPD 大鼠的气道炎症,发挥 COPD 肺损伤的保护作用,地塞米松组作为一个阳性对照也获得了类似的结果,说明了本研究动物研究模型的可靠性。

PI3K/AKT/mTOR 通路是体内主要的炎症调控通路^[7],PI3K 激活后可以和 AKT 的 N 端 PH 结构域结合^[8],PI3K 的脂类激酶活性,能催化 AKT 磷酸化,磷酸化的 AKT 可以从细胞质转移到细胞膜上,通过直接和间接两种途径激活底物 mTOR 蛋白,调节下游细胞生长、增殖和炎症靶基因的表达^[9]。Wang 等^[10]的研究显示,上调 PI3K/AKT/mTOR 通路可以激活呼吸道平滑肌细胞增殖、迁移和黏附功能,以及细胞外基质(ECM)成分的积累,促使气道壁增厚,发挥致 COPD 病变作用;李敏静等^[11]的研究显示,抑制 COPD 大鼠 PI3K/AKT/mTOR 信号通路可以阻止气道平滑肌细胞增殖和炎症反应,发挥治疗作用;钟华林等^[12]在鼻咽癌的研究发现,虎杖苷可以抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路。本研究检测了虎杖苷对 COPD 大鼠 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响,发现虎杖苷组大鼠 PI3K、AKT、mTOR 蛋白表达显著低于 COPD 模型组,且作用呈剂量相关性,说明了虎杖苷可以抑制 COPD 大鼠 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,地塞米松作为一个阳性对照也获得了类似的结果,说明了本研究动物模型的可靠性。虎杖苷对 COPD 大鼠气道炎症的抑制作用可能是通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路实现的。

本研究显示,虎杖苷可以抑制 COPD 大鼠 PI3K/AKT/mTOR 通路,抑制气道炎症,发挥肺损伤保护作用。

参考文献

- [1] Vyas P, Vohora D. Phosphoinositide-3-kinases as the novel therapeutic targets for the inflammatory diseases: Current and Future Perspectives [J]. Curr Drug Targets, 2017, 18(14): 1622-1640.
- [2] 周勇,余洋,程文涛,等.虎杖苷对慢性阻塞性肺疾病大鼠气道炎症及TLR4/NF- κ B 信号通路的影响[J].中药药理与临床,2019, 35(2): 35-40.
- [3] 潘纪红,王海滨,杜晓飞,等.虎杖苷通过PI3K/AKT/mTOR 信号通路诱导人宫颈癌细胞凋亡的初步研究[J].中国中药杂志,2017, 42(12): 2345-2349.
- [4] 张明华,税明明,姚俊,等.血清硒水平对老年慢性阻塞性肺疾病患者临床诊断价值及其与PI3K/AKT/mTOR 通路蛋白水平的关系分析[J].临床和实验医学杂志,2017, 16(18):1841-1844.
- [5] 李红梅,崔德健,佟欣,等.熏香烟加气管注内毒素和单纯熏香烟建立大鼠 COPD 模型[J].中国病理生理杂志,2002, 18(7): 808-812.
- [6] 赵雨喆,姜京植,叶晶,等.虎杖苷通过p38 MAPK/Nrf2/HO-1 通路减轻小鼠哮喘模型气道炎症[J].中国药理学通报,2018, 34(6): 851-856.
- [7] Wu Z, Luan Z, Zhang X, et al. Chondro-protective effects of polydatin in osteoarthritis through its effect on restoring dysregulated autophagy via modulating MAPK, and PI3K/Akt signaling pathways [J]. Sci Rep, 2019, 9 (1): 13906-13913.
- [8] Cui J, Zhang F, Wang Y, et al. Macrophage migration inhibitory factor promotes cardiac stem cell proliferation and endothelial differentiation through the activation of the PI3K/Akt/mTOR and AMPK pathways [J]. Int J Mol Med, 2016, 37(5): 1299-1309.
- [9] 吴中华,闫玲玲,杨爱东,等.鱼腥草素钠对慢性阻塞性

- 肺疾病模型大鼠肺组织PI3K、AKT1及mTOR mRNA表达的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(1): 8-12.
- [10] Wang Z, Li R, Zhong R. Extracellular matrix promotes proliferation, migration and adhesion of airway smooth muscle cells in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease via upregulation of the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *MolMedRep*, 2018, 18(3): 3143-3152.
- [11] 李敏静, 陈 晔, 蔡宛如, 等. 温肾益气颗粒对慢性阻塞性肺疾病大鼠气道平滑肌细胞增殖及PI3K/AKT/mTOR信号通路表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(4): 1711-1714.
- [12] 钟华林, 李玲波, 覃焕桦, 等. 基于PI3K/AKT/mTOR信号通路探讨虎杖苷诱导鼻咽癌细胞凋亡的初步研究 [J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2019, 26(10): 536-540.