

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

吴中华¹, 闫玲玲¹, 杨爱东^{1*}, 张海英¹, 符胜光¹, 杨云翔²

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 上海市位育中学, 上海 200231)

【摘要】 目的 观察鱼腥草素钠对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠肺组织中 PI3K、AKT1 及 mTOR mRNA 表达的影响,并探讨其作用机制。方法 选取 Wistar 雄性大鼠 24 只,体重(220 ± 20)g,随机分为正常组、模型组、地塞米松组和鱼腥草素钠组(每组 6 只)。采用烟熏和脂多糖气管滴注联合方法建立慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)大鼠模型,采用实时荧光定量聚合酶链反应检测 PI3K、AKT1 及 mTOR mRNA 表达,并观察大鼠肺组织病理变化。结果 与正常组相比,模型组大鼠肺组织 PI3K、AKT1 mRNA 表达显著增高($P < 0.01$, $P < 0.05$),mTOR mRNA 表达显著降低($P < 0.01$);与模型组相比,鱼腥草素钠组和地塞米松组肺组织 PI3K、AKT1 mRNA 表达显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$),mTOR mRNA 表达显著增高($P < 0.01$);与地塞米松组相比,鱼腥草素钠组肺组织 mTOR mRNA 表达显著增高($P < 0.05$)。病理观察结果显示,与正常组比较,模型组局部肺实变,肺泡腔内大量中性粒细胞浸润,胶原染色显示肺间质纤维组织大量增生;鱼腥草素钠组和地塞米松组肺组织病理改变明显轻于模型组,鱼腥草素钠组和地塞米松组肺组织呈轻度间质性肺炎,仅见少量的纤维组织增生。结论 鱼腥草素钠能够减轻慢性阻塞性肺疾病模型大鼠肺组织损伤,其机制可能与其能够下调 PI3K、AKT1 mRNA 的表达、上调 mTORmRNA 表达有关。

【关键词】 鱼腥草素钠;慢性阻塞性肺疾病;磷脂酰肌醇 3 激酶;丝氨酸苏氨酸蛋白激酶;雷帕霉素靶蛋白;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 01-0008-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.01.002

Effect of sodium houttuynonate on the expression of PI3K, AKT1 and mTOR mRNA in the lung of rat models of chronic obstructive pulmonary disease

WU Zhonghua¹, YAN Lingling¹, YANG Aidong^{1*}, ZHANG Haiying¹, FU Shengguang¹, YANG Yunxiang²

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China. 2. Shanghai WeiYu High School, Shanghai 200231)

Corresponding author: YANG Aidong. E-mail: aidongy@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of sodium houttuynonate on the expression of PI3K and AKT1 and mTOR mRNA in the lung of rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and reveal the possible mechanism of the COPD treated with sodium houttuynonate. **Methods** Twenty-four male Wistar rats were randomly divided into normal control group, model control group, dexamethasone group and sodium houttuynonate group ($n = 6$ for each). The rat models of COPD were established by intratracheal instillation of lipopolysaccharide and smudging. The expressions of PI3K and AKT1 and mTOR mRNA were determined by real-time PCR. The morphological changes of the lung tissue was examined by

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(No. 81673855);上海中医药大学学科能力提升项目。

Funded by National Natural Science Foundation of China (No. 81673855); Subject Ability Promotion Project of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine.

【作者简介】吴中华(1977-),男,医学硕士,高级实验师,主要从事中医药防治呼吸系统疾病和肿瘤的机制研究。E-mail: 13764521057@126.com

【通信作者】杨爱东(1968-),男,医学博士,教授,硕士研究生导师,主要从事中医药防治呼吸系统疾病研究。E-mail: aidongy@126.com

histopathology. **Results** Compared with the normal control group, the expressions of PI3K and AKT1 were significantly increased and mTOR mRNA was significantly decreased in the model group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with the model group, the expressions of PI3K and AKT1 were significantly decreased and mTOR mRNA was significantly increased in the sodium houthuyfonate group and dexamethasone group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with the dexamethasone group, the expression of mTOR mRNA was significantly increased in the sodium houthuyfonate group ($P < 0.05$). The pathological observation indicated that there were local pulmonary consolidation and a extensive neutrophil infiltration in the alveolar cavity. Prominent pulmonary interstitial fibrous hyperplasia was observed in the model group. The pathological manifestations were much ameliorated than those of the model group, and only mild interstitial pneumonia and a slight fibrous hyperplasia were seen in the sodium houthuyfonate and the dexamethasone groups. **Conclusions** Sodium houthuyfonate reduces the injury of lung tissue and has protective effect on COPD rats. The mechanism is probably related to the down-regulation of expression of PI3K and AKT1 mRNA and up-regulation of expression of mTOR mRNA in COPD rats.

【Key words】 sodium houthuyfonate; chronic obstructive pulmonary disease; PI3K; AKT1; mTOR; rats

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是以肺部和气道慢性炎症反应为特征的疾病。近年来 COPD 发病率呈持续增长趋势,据世界卫生组织预测,到 2020 年 COPD 将成为第三位死亡原因^[1]。研究发现,在气道慢性炎症性疾病中磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) / 丝氨酸 - 苏氨酸蛋白激酶 (AKT) 信号通路可通过调控炎症细胞活化、炎性介质释放等途径发挥作用^[2],因此干预 PI3K/AKT 信号通路中信号分子对防治 COPD 发生发展有重要意义。我们既往研究表明加味小青龙汤 (由小青龙汤加鱼腥草等中药组成) 对 COPD 大鼠肺组织有保护作用,其机理与该方下调 TLR4 蛋白和 MyD88 mRNA 表达、下调 TNF- α 和白介素-1 β 含量、下调 NF- κ B 蛋白表达有关^[3-4]。在此基础上本项目观察鱼腥草素钠对 COPD 大鼠肺组织 PI3K、AKT1 和 mTOR (mammalian target of rapamycin, mTOR) mRNA 表达的影响,探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

清洁级 Wistar 雄性大鼠 24 只,鼠龄 12 周,体重 (220 \pm 20)g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。专用标准颗粒饲料、水喂养。实验在上海中医药大学实验动物中心设施内进行【SYXK (沪) 2014-0008】。所有的操作均按照上海中医药大学动物实验伦理委员会要求进行,本实验研究实验伦理委员会批准编号:2012015。

1.1.2 主要设备与仪器

低温冷冻离心机 3K15, Sigma (美国);生物安

全柜 TYPE B2, Sigma (美国);BH2 显微镜 (Olympus (日本));Real-time 检测仪 (7300 Sequence Detection System), ABI-7300 ABI (美国);自制烟熏箱:宽 30 cm,高 40 cm,长 60 cm 有机透明储物箱。

1.1.3 试剂和药物

LPS 冻干粉剂 (O111:B4) 购自美国 Sigma 公司,批号 L1430;香烟:白沙烟 (白盒,软包),产商为湖南中烟工业有限责任公司,烟气烟碱量:1.0 mg,焦油:12 mg,一氧化碳:14 mg;引物和探针序列。PI3K:上游:5'-CGTGGGAGTACGTGAAACCT-3',下游:5'-CTGCTTTTGGGAGAGTCTGG-3';AKT1:上游:5'-ATGAACGACGTAGCCATTGTG-3',下游:5'-TTGTAGCCAATAAAGGTGCCAT-3';mTOR:上游:5'-AGGAAGGACGTTTGCTCAGA-3',下游:5'-TC-CCTCACTGAACACAGCAG-3';Actin:上游物:5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3',下游引物:5'-AC-CCTCATAGATGGGCACAG-3',5'端 FAM 修饰;3'端 Tamra 修饰;Trizol 总 RNA 提取试剂、反转录和 PCR 扩增所需的酶及其他试剂均购自美国 Invitrogen 公司。

鱼腥草素钠购自上海青平药业有限公司,分子式: $C_{12}H_{23}NaO_5S$,分子量: 302.36;地塞米松购自上海信谊药厂有限公司,批号 01120302。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型建立的方法以及分组、给药

按随机分组原则将大鼠分为正常组、模型组、地塞米松组和鱼腥草素钠组,每组 6 只。参照文献方法并加以改良建立 COPD 大鼠模型^[5]。于实验开始第 1、14 天给予气管内滴注脂多糖,剂量为 2 mg/kg。分别于第 2~13 天及第 15~28 天,每日同一时间将大鼠置于 72 L (宽 30 cm,高 40 cm,长 60 cm) 自制

有机透明储物箱内,进行香烟烟雾暴露 1 次,每次 10 支,每次 0.5 h。暴露方法为:将点燃的白沙牌香烟通过悬挂方法,将烟雾注入自制箱内。正常组用生理盐水进行气管滴注并在自制箱内吸入正常空气。在第 2~13 天、第 15~28 天,鱼腥草素钠组给予大鼠灌服鱼腥草素钠溶液(24.3 mg/kg),地塞米松组通过胃灌服剂量为 0.2 mg/kg,正常组、模型组在相应时点灌服等体积蒸馏水。各组动物用药量按人与动物的体表面积换算^[6]。在实验建模期间观察大鼠活动、进食、饮水等基本生命活动情况。

1.2.2 观察标本以及采集

所有动物于造模后第 29 天,用 20% 乌拉坦 5.0 mL/kg 腹腔麻醉。肺样本:剖去肺部周围组织,取右肺上叶,生理盐水冲洗后,放在 4% 甲醛溶液中保存;取右肺下叶置于液氮罐中作肺组织 PI3K、AKT1、mTOR mRNA 表达检测。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测肺组织 PI3K、AKT1、mTOR mRNA 表达

按美国 Invitrogen 公司 Trizol 试剂提取总 RNA 后,逆转录合成 cDNA。12 μ L 反应体系中,10 mmol/L dNTP 1 μ L,随机引物 1 μ L,标本 RNA 2 g,混匀后于 65 $^{\circ}$ C 5 min,快速插入冰水中,离心,冰上加入:5 \times buffer 4 μ L, DTT (100 mmol/L) 2 μ L, RNasin (40 U/ μ L) 1 μ L, M-MLVRT 反转录酶 (200 U/ μ L) 1 μ L, 37 $^{\circ}$ C 50 min, 70 $^{\circ}$ C 15 min, -20 $^{\circ}$ C 保存。

PCR 扩增:SYBR green 10 μ L,上游引物 (5 mol/L) 2 μ L,下游引物 (5 mol/L) 2 μ L,反转录产物 2 μ L,扩增条件① 95 $^{\circ}$ C 10 s;② 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 40 Cycles。数据采用仪器自带软件 ABI Prism 7300 SDS Software 分析。PI3K、AKT1、mTOR 表达水平以它们与 actin 的相对表达量来计算。

1.2.4 病理观察

右上肺组织常规 4% 甲醛固定,取材进行脱水和浸蜡后用石蜡包埋,用切片机切取一片,漂片,常规 HE 和胶原染色,光镜下观察肺组织病理形态学的变化。

1.3 统计学分析

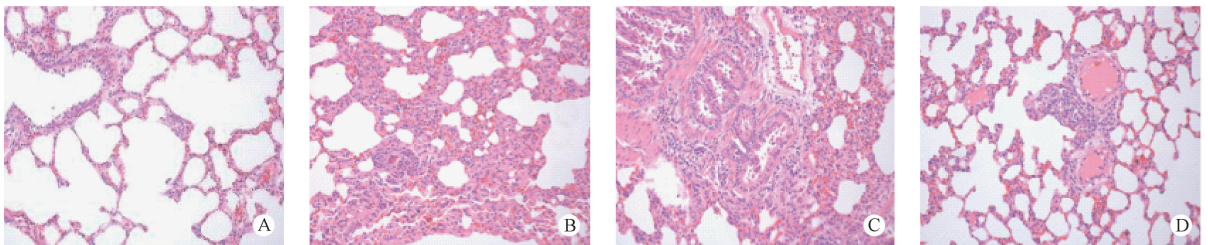
采用 SPSS 18.0 软件包分析统计,所有数据均采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组均数采用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD 检验; $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

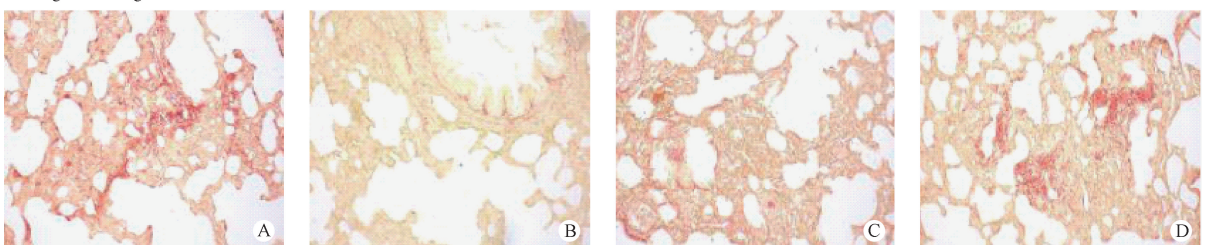
2.1 各组大鼠肺组织病理形态学观察

光镜观察:正常组肺泡结构清晰,胶原染色未见明显纤维组织增生;模型组局部肺实变,肺泡腔内大量中性粒细胞浸润,胶原染色显示肺间质纤维组织大量增生;地塞米松组和鱼腥草素钠组肺间质极少量炎症细胞浸润,胶原染色显示肺间质少量纤维组织增生。(见图 1)

HE染色
HE staining



胶原染色
Collagen staining



注:A. 正常组; B. 模型组; C. 地塞米松组; D. 鱼腥草素钠组。

图 1 各大鼠肺组织病理变化比较 ($\times 200$)

Note. A. Normal control group; B. Model control group; C. Dexamethasone group; D. Sodium houttuiffonate group.

Fig. 1 Pathological changes of lung tissue in the rats ($\times 200$)

2.2 鱼腥草素钠对大鼠肺组织 PI3K、AKT1 和 mTOR 基因表达的影响

与正常组比较,模型组肺组织中 PI3K 和 AKT1 基因表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)、mTOR 基因表达明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,鱼腥草

素钠组和地塞米松组肺组织 PI3K 和 AKT1 基因表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)、mTOR 基因表达明显升高($P < 0.01$);与地塞米松组比较,鱼腥草素钠组肺组织 mTOR 基因表达明显升高($P < 0.05$)。(见表 1)

表 1 各组大鼠肺组织 PI3K、AKT1 和 mTOR 基因表达的比较($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Tab. 1 Expression of PI3K and AKT and mTOR genes in the lung tissues of rats in each group($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别 Groups	PI3K mRNA($\times 10^{-2}$)	AKT1 mRNA($\times 10^{-2}$)	mTOR mRNA($\times 10^{-2}$)
正常组 Normal control group	0.71 \pm 0.18	0.69 \pm 0.12	1.90 \pm 0.10
模型组 Model control group	1.20 \pm 0.48 Δ	0.94 \pm 0.17 $\Delta\Delta$	0.89 \pm 0.27 $\Delta\Delta$
地塞米松组 Dexamethasone group	0.79 \pm 0.25 Δ	0.73 \pm 0.11 $\Delta\Delta$	1.26 \pm 0.22 $\Delta\Delta\Delta\Delta$
鱼腥草素钠组 Sodium houttuynonate group	0.86 \pm 0.32 Δ	0.70 \pm 0.13 $\Delta\Delta$	1.46 \pm 0.28 $\Delta\Delta\Delta\Delta\#$

注:与正常组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta P < 0.05$;与地塞米松组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta P < 0.05$ 。

Note. Compared with the normal group, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta P < 0.05$. Compared with the model group, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta P < 0.05$. Compared with the dexamethasone group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta P < 0.05$.

3 讨论

PI3K/AKT/mTOR 是细胞内的经典信号通路,参与细胞炎症、细胞凋亡和自噬等环节,在 COPD 发展和转归中有重要作用。研究表明,胰岛素通过激活 PI3K/AKT 通路,抑制 TLR3(Toll-like receptor 3, TLR3)诱导的人支气管上皮细胞凋亡,减轻 COPD 炎症损伤,提示 PI3K/AKT 信号通路可抗细胞凋亡而减轻 COPD 气道炎症^[7]。香烟烟雾提取物通过诱导 PI3K/AKT 磷酸化增加,促进人气道上皮细胞间质转化,导致 COPD 患者小气道纤维化^[8]。而抑制 PI3K/AKT 则减少香烟烟雾诱导的上皮细胞间质转化,减轻 COPD 肺部纤维化^[9]。

PI3K 是细胞质中能催化磷脂酰肌醇 D3 位磷酸化的一种脂类激酶。I 型 PI3K 由调节亚基 P85 和催化亚基 P110 组成。AKT 是进化上高度保守的一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,约由 480 个氨基酸残基组成,是 PI3K 下游的关键蛋白^[10]。mTOR 属于磷脂酰肌醇 3-激酶(PIKK)相关激酶家族,是一种存在于胞质中的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。mTOR 主要通过响应外界环境中能量、营养和生长因子等刺激,参与调控细胞生长、增殖和存活等病理生理过程,包括:炎症过程和细胞自噬的调控。在体内,可与机体其他蛋白形成不同复合物 mTORC1 和 mTORC2,各自发挥不同的功能^[11]。生长因子等刺激细胞后,激活 PI3K 后使 3,4-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP2)转化为 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3),募集 AKT 和

PDK1 丝氨酸/苏氨酸激酶,活化 AKT 并激活 mTOR,诱导 P70S6K 磷酸化 S6 核糖体,导致内皮细胞分化和细胞增殖,促进上皮细胞间质转化^[12]。

研究表明,鱼腥草蒸馏提取物通过抑制 TGF- β 1/Smad2/3 信号通路,从而修复模型大鼠的肺纤维化^[13]。鱼腥草素钠剂量依赖性地降低阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)诱导的膜性肾小球肾炎 BALB/c 小鼠 NF- κ B 和 MCP-1 的水平,其抗炎作用可能与抑制 NF- κ B 诱导的细胞因子通路有关^[14]。

本实验研究结果表明,与正常组比较,模型组局部肺实变,肺泡腔内大量中性粒细胞浸润,胶原染色显示肺间质纤维组织大量增生,表明 COPD 模型复制成功。且模型组肺组织 PI3K、AKT1 基因表达升高,mTOR 基因表达降低,表明 COPD 发病机制与 PI3K、AKT1 基因表达升高及 mTOR 基因表达降低有关。与模型组比较,鱼腥草素钠组肺组织病理改变减轻,且鱼腥草素钠组肺组织 PI3K 和 AKT1 基因表达降低、mTOR 基因表达升高。表明鱼腥草素钠能够减轻慢性阻塞性肺疾病模型大鼠肺组织损伤,其机制可能与其能够下调 PI3K、AKT1 mRNA 基因表达、上调 mTOR 基因表达有关。

参 考 文 献(References)

- [1] 范春红,李时悦. IL-32、INF- γ 、IL-1 β 与慢性阻塞性肺疾病的研究[J]. 中国医药导报, 2011, 8(3): 17-19.
Fan CH, Li SY. Study on IL-32, INF- γ , IL-1 β and chronic obstructive pulmonary disease[J]. Chin Med Herald, 2011, 8(3): 17-19.

- [2] Jiang H, Abel PW, Toews ML, et al. Phosphoinositide 3-kinase gamma regulates airway smooth muscle contraction by modulating calcium oscillations [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 334(3): 703 - 709.
- [3] 闫玲玲, 张海英, 杨爱东, 等. 加味小青龙汤对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠肺组织 TLR4、MyD88 和 SOCS1mRNA 表达的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(8): 1879 - 1881.
Yan LL, Zhang HY, Yang AD, et al. Effects of additional Xiao Qing Long Decoction on lung expression of TLR4 and MyD88 and SOCS1mRNA in rats with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2015, 26(8): 1879 - 1881.
- [4] 张海英, 闫玲玲, 杨爱东, 等. 加味小青龙汤对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺组织核转录因子- κ B、锌指蛋白 A20 表达的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2015, 20(2): 149 - 152.
Zhang HY, Yan LL, Yang AD, et al. Effects of additional Xiao Qing Long Decoction on lung expression of NF- κ Bp65 and A20 protein and its mRNA in rats with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med*, 2015, 20(2): 149 - 152.
- [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.
Li HM, Cui DJ, Tong X, et al. Establishment of chronic obstructive pulmonary disease rat models by passive cigarette smoking and intratracheal instillation of lipopolysaccharide [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2002, 18(7): 808 - 812.
- [6] 陈奇. *中药药理研究方法学* [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1103.
Cheng Q. *Research methods in pharmacology of Chinese materia medica* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996: 1103.
- [7] Numata T, Araya J, Fujii S, et al. Insulin-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK signaling pathways inhibit TLR3-mediated human bronchial epithelial cell apoptosis [J]. *J Immunol*, 2011, 187(1): 510 - 519.
- [8] Shen HJ, Sun YH, Zhang SJ, et al. Cigarette smoke-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition is mediated by Rac1 activation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(6): 1838 - 1849.
- [9] Wang Q, Wang Y, Zhang Y, et al. The role of uPAR in epithelial-mesenchymal transition in small airway epithelium of patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Respir Res*, 2013, 14: 67.
- [10] Coffey PJ, Jin J, Woodgett JR. Protein kinase B (C-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation [J]. *Biochem J*, 1998, 335(Pt1): 1 - 13.
- [11] 李晓菲, 陶玉芬, 刘建生, 等. LPS/D-gal 诱导小鼠急性肝炎模型及 mTOR 信号的变化 [J]. *中国实验动物学学报*, 2015, 23(3): 307 - 311.
Li XF, Tao YF, Liu JS, et al. A murine model of LPS/D-gal-induced acute hepatitis and alterations in mTOR signaling [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2015, 23(3): 307 - 311.
- [12] 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.
- [13] Du SH, Li H, Cui YH, et al. *Houttuynia cordata* inhibits lipopolysaccharide-induced rapid pulmonary fibrosis by up-regulating IFN- γ and inhibiting the TGF- β 1/Smad pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 13(3): 331 - 340.
- [14] Pan P, Wang YJ, Han L, et al. Effects of sodium houttuyniate on expression of NF- κ B and MCP-1 in membranous glomerulonephritis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131: 203 - 209.

[收稿日期] 2017 - 06 - 01