DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.06.007

基于JAK2/STAT3信号通路调控成纤维细胞自噬探讨玉屏风散干预特发性肺纤维化的机制研究

吴孝政[1],黄高[1],王力子[2],薛蕾[1],陈云志[1]
(1.贵州中医药大学基础医学院,贵州 贵阳 550025;2.贵州中医药大学药学院,贵州 贵阳 550025)

摘要:目的 观察玉屏风散对"Janus激酶2/信号转导及转录活化因子3(Janus kinase 2/ Signal transducer and activator of transcription 3,JAK2/STAT3)信号通路的活化抑制成纤维细胞自噬导致肺纤维化效应"的调控机制,探讨玉屏风散改善特发性肺纤维化(Idiopathic pulmonary fibrosis,IPF)的作用机制。方法 48只Sprague Dawley(SD)大鼠随机分为8组,每组6只:空白组,假手术组,模型组,阳性对照(强的松)组,STAT3抑制剂(索拉非尼)组,玉屏风散高、中、低剂量组,其中模型组及各给药组大鼠均采用一次性气管内注入博来霉素(Bleomycin,BLM)法建立肺纤维化模型。造模第14天后开始灌胃给药,阳性对照组予强的松6 mg/(kg·d),STAT3抑制剂组给予索拉非尼30 mg/(kg·d),玉屏风散高剂量组6 g/(kg·d)、中剂量组3 g/(kg·d)、低剂量组1.5 g/(kg·d)分别予玉屏风散汤液,空白组、模型组给予等体积0.9%氯化钠溶液,连续给药至第30天。观察治疗前后各组大鼠症状、体征、肺组织形态学的变化,肺组织中α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)蛋白表达,白细胞介素-6(Interleukin-6,IL-6)、转化生长因子-β1(Transforming growth factor-β1,TGF-β1)含量,JAK2/STAT3信号通路水平,各自噬指标水平及成纤维细胞中自噬小体的变化。结果 与空白组和假手术组比较,模型组大鼠症状、体征和肺组织损伤状态严重,肺组织中IL-6、TGF-β1含量、α-SMA、JAK2、磷酸化酪氨酸激酶2(Phosphorylated Janus Kinase 2,p-JAK2)、STAT3、磷酸化信号转导及转录活化因子3(Phosphorylation signal transducer and activator of transcription 3,p-STAT3)蛋白表达及髓样细胞白血病-1(Myeloid cell leukemia 1,Mcl-1)蛋白和mRNA表达均显著升高($P<0.01$),Beclin1、磷脂酰肌醇3-激酶催化亚基3型(Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3,PIK3C3)、自噬相关蛋白14(Atg14)蛋白和mRNA表达均显著降低($P<0.01$),Beclin1和Mcl-1之间的结合明显增强,成纤维细胞中自噬小体明显减少。药物治疗后,与模型组比较,玉屏风散高、中剂量组、强的松组和索拉非尼组大鼠的各项指标均有明显好转($P<0.01$或$P<0.05$),Beclin1和Mcl-1之间的结合明显减弱,成纤维细胞中自噬小体明显增加,而低剂量组的各项指标基本无明显变化。总体上玉屏风散高剂量组的疗效优于中剂量组和低剂量组,并且与强的松组接近,有优于索拉非尼组的趋势。结论 玉屏风散能够通过增加成纤维细胞自噬来减少胶原纤维沉积,从而达到抑制肺纤维化的目的,并且这个过程可能与通过降低IL-6、TGF-β1水平来抑制JAK2/STAT3通路的磷酸化和活化,从而阻断Mcl-1与Beclin1的结合,进一步增加Ⅲ型PI3K复合物的形成、增强Beclinl激活自噬的能力密切相关。

关键词:玉屏风散;特发性肺纤维化;STAT3;Beclin1;自噬
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)06-0036-12

Exploring Mechanism of Yupingfeng Powder(玉屏风散) Intervening in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Based on Fibroblast Autophagy Regulated by JAK2/STAT3 Signaling Pathway

WU Xiaozheng[1],HUANG Gao[1],WANG Lizi[2],XUE Lei[1],CHEN Yunzhi[1]
(1. School of Basic Medicine,Guizhou University of Traditional Chinese Medicine,Guiyang 550025,Guizhou,China;
2. School of Pharmacy,Guizhou University of Traditional Chinese Medicine,Guiyang 550025,Guizhou,China)

Abstract:*Objective* To observe the regulatory mechanism of Yupingfeng Powder(玉屏风散) on "activation of Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3(JAK2/STAT3) signaling pathway inhibiting fibroblast autophagy in pulmonary fibrosis", and to explore the mechanism of Yupingfeng Powder in improving idiopathic pulmonary fibrosis(IPF). *Methods* Forty-eight Sprague Dawley(SD) rats were randomly divided into 8 groups with 6 rats in each,including blank group,sham-

基金项目:国家自然科学基金项目(82160861);贵州省基础研究(自然科学)项目(黔科合基础-ZK〔2023〕一般411);贵州中医药大学学术新苗项目(贵科合学术新苗〔2023〕-22号)
作者简介:吴孝政(1985-),男(黎族),贵州安顺人,讲师,博士,研究方向:呼吸系统疾病证候物质基础研究。
通讯作者:陈云志(1968-),男(土家族),贵州印江人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中医证候物质基础研究。E-mail:chenyunzhi270@gzy.edu.cn。

operated group, model group, positive control (prednisone) group, STAT3 inhibitor (sorafenib) group and Yupingfeng Powder high, middle and low dose groups. The rats in the model group and in each administration group were injected with bleomycin (BLM) intratracheally to establish the lung fibrosis model. Gastric administration was started after the 14th day of modeling, and prednisone [6 mg/(kg · d)] was given to the positive control group, sorafenib [30 mg/(kg · d)] was given to the STAT3 inhibitor group, and Yupingfeng Powder solution was given to the high dose group [6 g/(kg · d)], the middle dose group [3 g/(kg · d)] and the low dose group [1.5 g/(kg · d)], respectively. The equal volume of saline was given to the blank group and the model group. The drug was continuously administered until the 30th day. The symptoms and signs, the changes in lung tissue morphology, the α-smooth muscle actin (α-SMA) protein expression, the levels of interleukin-6 (IL-6), transforming growth factor-β1 (TGF-β1), JAK2/STAT3 signaling pathway and respective phagocytosis index in lung tissues were observed before and after treatment. *Results* Compared with the blank and sham-operated groups, the model group showed severe symptoms, signs and lung tissue injury status, significantly higher levels of IL-6 andTGF-β1 ($P<0.01$), significantly higher expressions of α-SMA, JAK2, phosphorylated Janus kinase 2 (p-JAK2), STAT3, phosphorylation signal transducer and activator of transcription 3 (p-STAT3) proteins ($P<0.01$) and myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1) protein and mRNA ($P<0.01$). The protein and mRNA expressions of Beclin1, phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3 (PIK3C3) and Atg14 were significantly reduced ($P<0.01$), the binding between Beclin1 and Mcl-1 was significantly enhanced, and fibroblast autophagy was significantly reduced. After treatment, compared with those in the model group, all the indexes of the rats in the high and middle dose groups of Yupingfeng Powder, prednisone group and sorafenib group were significantly improved ($P<0.01$ or $P<0.05$), the binding between Beclin1 and Mcl-1 was significantly weakened, and the autophagy of fibroblasts was significantly increased, while the indicators of the low dose group basically showed no significant changes. Overall, the efficacy of the high dose group of Yupingfeng Powder was better than that of the middle and low dose groups, and equal to that of the prednisone group and close to that of the sorafenib group. *Conclusion* Yupingfeng Powder is able to reduce collagen fiber deposition by increasing fibroblast autophagy to inhibit pulmonary fibrosis, and this process may be related to the inhibition of the phosphorylation and activation of the JAK2/STAT3 pathway by decreasing the levels of IL-6 and TGF-β1, thus blocking the binding of Mcl-1 to Beclin1, further increasing the formation of type Ⅲ PI3K complex, and enhancing the ability of Beclinl to activate autophagy.

Keywords: Yupingfeng Powder (玉屏风散); idiopathic pulmonary fibrosis; STAT3; Beclin1; autophagy

特发性肺纤维化(Idiopathic Pulmonary Fibrosis, IPF)是一种慢性纤维化间质性肺炎,病因不明,临床病程可包括呼吸困难、运动能力下降、干咳和诊断后2.5~5年死亡[1-2]。主要病理特征为成纤维细胞失去分化并获得肌成纤维细胞的间充质表型,即成纤维细胞向间充质转化(FMT)[3],其特征在于以增殖性成纤维细胞和肌成纤维细胞、异常肺上皮细胞和肺间质中大量基质积累为病灶,并且存在着α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)和细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)成分的异常表达[4]。

IPF的发病机制复杂,其中之一认为这些大量的病灶和异常蛋白表达与肺成纤维细胞的自噬不足密切相关[5]:由于成纤维细胞中自噬降低能诱导其分化为肌成纤维细胞[6],导致IPF特异性表型标志物α-SMA的异常表达和ECM沉积增加,最终成纤维细胞向间充质转化(FMT)形成肺纤维化[7-8]。证据显示在沉默自噬相关蛋白微管相关蛋白轻链3B(Microtubule-associated protein 1 light chain 3-Ⅱ, LC3-Ⅱ)和Beclin-1基因后,α-SMA和ECM表达量明显增多[9]。另外在IPF患者的肺组织中,LC3-Ⅱ表达也比正常人低[10-11]。Janus激酶/信号转导及转录活化因子(Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)信号通路有多个不同的亚型,其中JAK2/STAT3在肺纤维化的形成中占主导地位[3]。研究表明激活JAK2/STAT3通路会导致博来霉素(Bleomycin, BLM)诱导的肺纤维化模型大鼠肺中成纤维细胞到肌成纤维细胞的转变(FMT),而抑制JAK2/STAT3可通过增加自噬以延缓肺纤维化的形成[5]。

IPF属于中医"肺痹""肺痿"范畴,如:"肺痹者,烦满喘而呕""咳,口中反有浊唾涎沫……为肺痿之病。"目前认为IPF为肺气亏虚、推动无力,导致气虚生痰、气虚生瘀、气虚气滞血瘀,从而痰瘀互结,经络痹阻不通而成病[12-13]。肺气亏虚是其始发和核心病机,可以认为它贯穿了IPF发生发展的整个病理过程[14-15],因此治疗IPF的最基本法则在于补益肺气[16]。肺气充足则气行,气行则血、水自行,痰瘀自消。玉屏风散方中黄芪补益肺气,为君;白术培土生金以助黄芪之功,为臣;防风合二药以益气祛邪,为佐。全方益肺气、固卫表,专治肺气虚证。现代研究发现玉屏风散具有较好抗肺纤维化作用,机制与降低转化生长因子-β1(Transforming growth factor-β1, TGF-β1)、α-SMA水平[17-18],减少肌成纤维细胞的活化,抑制胶原蛋白和ECM的沉积有密切关系[18-21]。但是玉屏风散是否通过阻断JAK2/STAT3通路的活化,增加肺成纤维细胞的自噬,达到抑制肌成纤维细胞的分化并减少ECM沉积的目的来延缓肺纤维化的进程,目前还不清楚。本次研究以BLM诱导的肺纤维化大鼠模型为载体,观察玉屏风散对"JAK2/STAT3信号通路的活化抑制成纤维细胞自噬致肺纤维化效应"的调控机制,为玉屏风散治疗IPF的研究提供更科学的途径。

1 材料

1.1 动物

健康Sprague Dawley(SD)大鼠48只,无特定病原体(Specific pathogen free, SPF)级,白色,10~12周龄,雄性,体质量210~240 g,购自湖北省实验动物研究中心[许可证号:SCXK(鄂)2020-0018],并且已通过贵州中医药大学实验动物伦理

审查委员会批准(编号:20220036)。

1.2 药物

黄芪、白术、防风:安徽桐花堂中药饮片科技有限公司,批号:20230603、20230701、20230701,均由贵州中医药大学中药制剂实验室鉴定均为合格药材;硫酸博来霉素(BLM):macklin公司,100 mg/瓶,货号:B802467;醋酸泼尼松(强的松)片:浙江仙琚制药股份有限公司,5 mg × 100 片/瓶,批号:H33021207;甲磺酸索拉非尼片(Bay 43 - 9006):MCE 公司,500 mg/片,货号:HY - 10201。

1.3 主要试剂与仪器

白细胞介素 - 6(Interleukin - 6, IL - 6)、TGF - β1 酶联免疫吸附(Enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒:菲恩生物公司,货号:ER0042、ER1378;JAK2 兔抗、磷酸化酪氨酸激酶2(Phosphorylated Janus Kinase 2, p - JAK2)(Tyr1007)兔抗、磷酸化信号转导及转录活化因子3(Phosphorylation signal transducer and activator of transcription 3,p - STAT3)(Tyr705)兔抗:Affinity 公司,货号:AF6022、AF3022、AF3293;STAT3 兔抗、α - SMA 兔抗、髓样细胞白血病 - 1(Myeloid cell leukemia 1, Mcl - 1)兔抗、Beclin1 兔抗、磷脂酰肌醇 3 - 激酶催化亚基 3 型(Phosphatidylinositol 3 - kinase catalytic subunit type 3, PIK3C3)兔抗、自噬相关蛋白 14(Atg14)兔抗:武汉三鹰公司,货号:10253 - 2 - AP、14395 - 1 - AP、16225 - 1 - AP、11306 - 1 - AP、13723 - 1 - AP、28021 - 1 - AP。

常温离心机:湖南可成,型号:H1 - 16K;冷冻高速离心机:湖南可成,型号:H1 - 16KR;FlexStation 3 多功能酶标仪:Molecular Devices,型号:Flexstation3;生物组织石蜡切片机:Leica,型号:RM 2016;垂直电泳槽:韦克斯,型号:WIX - easyPRO4;实时荧光定量 PCR 仪:ABI,型号:ViiA - 7;PCR 扩增仪:ABI,型号:proFlex;显微镜:奥林巴斯,型号:BX53;显微成像软件:奥林巴斯,型号:cellSens Entry;透射电镜:日本 HITACHI /美国 FEI 公司,型号:HT7700 - SS/FEI Tecnai G20 TWIN。

2 方法

2.1 玉屏风散药液制备

参考文献记载方法[22-23]和我们前期的实验方法[24]制备玉屏风散药液,最后生药浓度为 1 g/mL,4 ℃保存。由贵州中医药大学中药制剂实验室加工生产提供。

2.2 动物分组与模型制备

48 只 SD 大鼠随机分为 8 组,每组 6 只:空白组(NC)、假手术组(Sham)、模型对照组(Model)、阳性对照(强的松)组(Prednisone)、STAT3 抑制剂(索拉非尼)组(Sorafenib)、玉屏风散高(YPF - H)、中(YPF - M)、低剂量组(YPF - L),室温 22 ℃实验条件下全营养饲养。空白组不作任何处理。模型对照组、阳性对照(强的松)组、STAT3 抑制剂(索拉非尼)组、玉屏风散高、中、低剂量组参照《实验动物学教程》(胡建华,姚明,崔淑芳主编,2009 年 1 月第 1 版)"大鼠 IPF 模型"方法于实验第 1 天气管内注入 BLM(5 mg/kg,生理盐水配制 5 mg/mL)建立肺纤维化模型,假手术组大鼠则注入等量生理盐水。自由饮水进食。第 30 天造模结束后进行大鼠症状、体征和肺组织形态学变化分析。

2.3 给药方法

造模第 14 天开始灌胃:阳性对照组药物的使用剂量约等于成人临床常规用量乘以 10,强的松片用蒸馏水配制成混悬液灌胃 6 mg/(kg · d)[25-26];STAT3 抑制剂组给予索拉非尼悬浊液灌胃 30 mg/(kg · d)[27],索拉非尼悬浊液的制备[28]:甲磺酸索拉非尼片研磨细后溶于 1∶1 配制的聚氧乙烯蓖麻油/95% 乙醇中(5 mg/mL),4 ℃储存,药物每 3 d 重新配制;玉屏风散高、中、低组分别予汤液灌胃的浓度为 6、3、1.5 g/(kg · d)(参考徐叔云主编《药理实验方法学》:用体积面积换算,中剂量为成人常用剂量乘以成人与大鼠的换算系数 0.09 · kg^{-1},高剂量为中剂量 2 倍,低剂量为中剂量 1/2 倍);空白组、假手术组、模型组给予等体积 0.9% 生理盐水。连续给药至第 30 天。

2.4 标本采集及处理

造模第 30 天结束后,腹腔麻醉后将大鼠固定于手术台上,暴露胸腔,分离肺组织,剥离双肺后剔除多余的结缔组织,采集肺组织标本。4% 多聚甲醛缓冲液固定左下侧肺组织,备用;左上侧肺组织冲洗、剪碎、冰浴研磨,将匀浆液 3000 rpm 离心 10 min,取上清液,待测;右侧肺组织放入 1 mL EP 管中,置于 - 70 ℃冰箱和液氮中保存,备用。

2.5 检测指标

2.5.1 大鼠一般状态 观察各组大鼠每天的精神、体质量以及呼吸系统体征变化等情况。

2.5.2 肺组织病理形态学改变 各组大鼠左下肺固定 24 h 后,经过常规处理后连续 5 μm 厚切片,然后常规脱蜡、苏木精 - 伊红染色法(Hematoxylin - eosin staining, HE)染色或 Masson 染色、封片,每张切片 200 倍光镜下分别随机取 3 个视野观察并拍片。参照 Szapiel 量表[29]和 Ashcroft 量表[30]分别进行肺泡炎症和纤维化程度评分。

2.5.3 检测肺组织中 IL - 6、TGF - β1 含量 依照 ELISA 试剂盒步骤进行,采集各组大鼠左上侧肺组织上清液,测定 IL - 6、TGF - β1 含量。

2.5.4 检测肺组织中 JAK2、p - JAK2、STAT3、p - STAT3 蛋白含量 免疫组化检测(按说明书步骤):左侧肺组织脱水、透明、浸蜡,然后组织包埋、切片、脱蜡、抗原修复、血清封闭、滴加抗体,最后显色,苏木素复染、封片,显微镜下观察,阳性信号为棕黄色或棕褐色。随机选取每张切片的 3 个高倍镜视野(×400),对 JAK2、p - JAK2、STAT3、p - STAT3 的免疫反应阳性细胞的平均光密度(MOD, Density [mean])进行分析。

2.5.5 检测肺组织中 α - SMA、Mcl - 1、Beclin1、PIK3C3、Atg14 蛋白表达 蛋白质印迹(Western blotting)检测(按说明书步骤):制备各组大鼠右侧肺组织蛋白样品,取 40 μg 总蛋白上样电泳 1.5 h、转膜 40 min、封闭 2 h,α - SMA、Mcl - 1、Beclin1(1∶2000 稀释),PIK3C3、Atg14、GAPDH(1∶1000 稀释),4 ℃孵育过夜,二抗(1∶10 000 稀释)常温摇床孵育 2 h,最后进行显色,曝光,冲洗,扫描胶片,并分析胶片灰度值。相对灰度值 =(所测蛋白灰度值/内参 GAPDH 灰度值)×100%。

2.5.6 检测肺组织中 Mcl - 1、Beclin1、PIK3C3、Atg14 mRNA 表达 逆转录聚合酶链式反应(Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction, RT - PCR)检测(按说明书步骤):设计引物(表1),提取各组大鼠右侧肺组织总 RNA。采用两步法经过去除 RNA 中基因组 DNA 并逆转录成 cDNA,反应条件为 50 ℃(15 min)、85 ℃(5 s)、4 ℃(10 min)。最后进行实时荧光定

量检测，反应程序为：预变性95 ℃（10 min）；循环1次；变性95 ℃（10 sec）+退火延伸60 ℃（60 sec）；循环40次；熔解曲线采集95 ℃（15 sec）、60 ℃（60 sec）、95 ℃（15 sec）；共循环1次。QPCR算法（相对定量，2 - ΔΔCt法）计算各个样本的相对表达量。

表1 引物序列

Name	Primer	Sequence	Size/(bp)
Rat GAPDH	Forward	5′-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3′	253
	Reverse	5′-TTTGAGGGTGCAGCGAACTT-3′	
Rat Mcl-1	Forward	5′-GGAAGACGACGAGCTGTACC-3′	218
	Reverse	5′-CGTCCTCGTTTTTAATGTCCA-3′	
Rat Beclin1	Forward	5′-GAGGTACCGACTTGTTCCCT-3′	225
	Reverse	5′-CCTTTCTCCACGTCCATCCT-3′	
Rat PIK3C3	Forward	5′-TGGTTGAGTTTCGCTGTGTC-3′	226
	Reverse	5′-CTTGTGGTAGCGTTGGGTTT-3′	
Rat Atg14	Forward	5′-CGGAGGACGACATACCTCTC-3′	189
	Reverse	5′-GATGGTGTAGGCAGGGTTGT-3′	

2.5.7 检测肺组织细胞中Beclin1和Mcl-1蛋白间相互作用变化 蛋白质免疫共沉淀检测（按试剂盒说明操作）：收集各组大鼠右侧肺组织细胞，超声破碎后加入Co-IP抗体Beclin1和Protein A/G磁珠混合，孵育过夜后，离心3000 rpm 5 min，清洗，保留沉淀，变性，冷却，离心12 000 rpm 10 min，取30 μL上样。最后根据蛋白分子量配制PAGE胶电泳，Western blotting实验检测沉淀下来的Mcl-1蛋白。

2.5.8 观察肺组织成纤维细胞中自噬小体的变化 各组大鼠右肺组织样本固定24 h后，漂洗3次（15 min/次），然后室温（20 ℃）固定2 h后进行漂洗、脱水、渗透、包埋48 h，再进行切片，染色，过夜。透射电镜下观察各样本的成纤维细胞中自噬情况并拍照分析。

2.6 统计学分析

在SPSS 24.0软件中行组间比较和单因素方差分析（方差齐用LSD检验，不齐用Duunett's T3检验），以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）记录计量数据，$P<0.05$差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠症状和体征变化

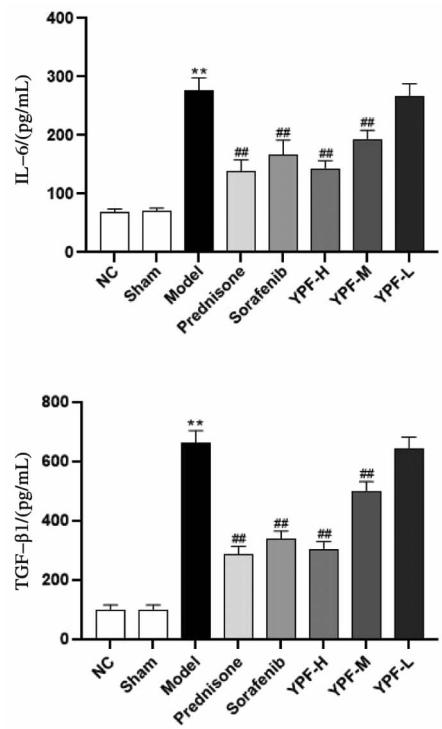
空白组及假手术组大鼠的症状、体征无明显异常，体质量逐渐增加；模型组大鼠逐渐出现精神萎靡，食量减少，体质量逐渐减轻，反应迟钝，毛发干枯，呼吸急促，口唇紫绀，且随着造模时间的延长而逐渐加重；玉屏风散高、中剂量组、STAT3抑制剂（索拉非尼）组和阳性对照（强的松）组大鼠的症状和体征相比于模型组均有不同程度改善，而低剂量组无明显改善。

3.2 肺组织形态学及纤维化标记物α-SMA水平的变化

病理结果（插页X图1，表2）显示：空白组及假手术组大鼠肺组织内无明显损伤，肺泡结构完整无渗出液，大小均一，气管血管完好，未见明显炎症及胶原纤维出现；模型组大鼠肺组织内损伤程度明显高于空白组和假手术组（$P<0.01$），肺泡结构消失，大量炎症细胞及纤维结缔组织浸润，同时可观察到上皮细胞空泡明显，管腔内有细胞碎片游离，局部腔内扩张，上皮消失，视野中可见局部血管管壁不均匀增厚及胶原纤维沉积；玉屏风散高、中剂量组、索拉非尼组和强的松组大鼠的上述病理情况均有明显改善（$P<0.01$）。模型组大鼠的肌成纤维细胞活化标志物α-SMA表达明显高于空白组和假手术组（$P<0.01$），而玉屏风散高、中剂量组、索拉非尼组和强的松组的α-SMA表达明显低于模型组（$P<0.01$）。各中药组之间的疗效呈剂量递增趋势。总体上说，玉屏风散高剂量组与索拉非尼组和强的松组的疗效大致持平。

3.3 肺组织中细胞因子IL-6、TGF-β1含量的变化

图2，表3显示：模型组IL-6、TGF-β1含量显著高于空白组和假手术组（$P<0.01$），而玉屏风散高、中剂量组、索拉非尼组和强的松组IL-6、TGF-β1含量显著低于模型组（$P<0.01$）。各中药组之间的疗效呈剂量递增趋势，玉屏风散高剂量组的疗效大致与强的松组接近。



注：##与模型组比较，$P<0.01$；**与空白组比较，$P<0.01$。

图2 各组大鼠肺组织中IL-6、TGF-β1含量的比较（$n=6$，$\bar{x} \pm s$）

3.4 大鼠肺组织中JAK2/STAT3蛋白表达水平变化

免疫组化结果显示（插页XI图3，表4）：模型组JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3蛋白的平均光密度值显著高于空白组和假手术组（$P<0.01$），而玉屏风散高、中剂量组、索拉非尼组和强的松组的平均光密度值显著低于模型组（$P<0.01$或$P<0.05$）；玉屏风散低剂量组的平均光密度值无明显变化。各中药组之间的疗效呈剂量递增趋势。总体上说，使用高、中剂量的玉屏风散后均能降低大鼠肺组织中JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3蛋白表达水平，并且玉屏风散高剂量组的疗效与索拉非尼组和强的松组大致持平。

3.5 大鼠肺组织中自噬水平的变化

Western Blotting和RT-PCR结果显示（图4、表5-表6）：与空白组和假手术组比较，模型组Mcl-1蛋白及mRNA表达显著升高（$P<0.01$），Beclin1、PIK3C3、Atg14蛋白及mRNA表达显著降低（$P<0.01$）；与模型组比较，玉屏风散高、中剂量组、索拉非尼组和强的松组Mcl-1蛋白及mRNA表达显著降低（$P<0.01$），Beclin1、PIK3C3、Atg14蛋白及mRNA表达显著

表2 各组IPF大鼠肺组织病理学评分及α-SMA水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Szapiel评分	Ashcroft评分	α-SMA/GAPDH
空白组	6	0.22±0.428	0.33±0.485	0.214±0.04
假手术组	6	0.28±0.461	0.39±0.502	0.224±0.038
模型组	6	2.89±0.323**●●	7.06±0.416**●●	0.836±0.028**●●
强的松组	6	1.33±0.485##	3.44±0.616##	0.467±0.058##
STAT3抑制剂组	6	1.56±0.511##	3.94±0.802##	0.501±0.035##
玉屏风散高剂量组	6	1.39±0.502##	3.56±0.511##	0.502±0.031##
玉屏风散中剂量组	6	2.11±0.471##▲▲△■■	4.89±0.583##▲▲△△■■	0.624±0.032##▲▲△△■■
玉屏风散低剂量组	6	2.72±0.461▲▲△△■■□	6.78±0.428▲▲△△■■□□	0.811±0.06▲▲△△■■□□

注：*与空白组比较，$P<0.05$；**与空白组比较，$P<0.01$；●与假手术组比较，$P<0.05$；●●与假手术组比较，$P<0.01$；#与模型组比较，$P<0.05$；##与模型组比较，$P<0.01$；▲与强的松组比较，$P<0.05$；▲▲与强的松组比较，$P<0.01$；△与STAT3抑制剂组比较，$P<0.05$；△△与STAT3抑制剂组比较，$P<0.01$；■与高剂量组比较，$P<0.05$；■■与高剂量组比较，$P<0.01$；□与中剂量组比较，$P<0.05$；□□与中剂量组比较，$P<0.01$。

表3 各组IPF大鼠肺组织中IL-6、TGF-β1含量的比较($\bar{x} \pm s$)

单位：pg/mL

组别	n	IL-6	TGF-β1
空白组	6	69.773±4.345	97.298±18.015
假手术组	6	70.858±4.688	98.77±16.063
模型组	6	277.041±21.045**●●	662.185±41.164**●●
强的松组	6	139.523±18.797##	285.807±26.936##
STAT3抑制剂组	6	167.103±24.713##▲▲	338.037±26.194##▲▲
玉屏风散高剂量组	6	143.939±12.901##△	301.541±28.437##△
玉屏风散中剂量组	6	192.088±16.750##▲▲△■■	499.724±31.185##▲▲△△■■
玉屏风散低剂量组	6	267.919±20.396▲▲△△■■□□	641.862±39.828▲▲△△■■□□

注：*与空白组比较，$P<0.05$；**与空白组比较，$P<0.01$；●与假手术组比较，$P<0.05$；●●与假手术组比较，$P<0.01$；#与模型组比较，$P<0.05$；##与模型组比较，$P<0.01$；▲与强的松组比较，$P<0.05$；▲▲与强的松组比较，$P<0.01$；△与STAT3抑制剂组比较，$P<0.05$；△△与STAT3抑制剂组比较，$P<0.01$；■与高剂量组比较，$P<0.05$；■■与高剂量组比较，$P<0.01$；□与中剂量组比较，$P<0.05$；□□与中剂量组比较，$P<0.01$。

升高($P<0.01$)；玉屏风散低剂量组无明显变化。各中药组之间的疗效呈剂量递增趋势。总体上说，使用高、中剂量的玉屏风散后均能降低大鼠肺组织中Mcl-1蛋白及mRNA表达，升高Beclin1、PIK3C3、Atg14蛋白及mRNA表达，并且玉屏风散高剂量组的疗效与强的松组接近，有优于索拉非尼组的趋势。

3.6 Beclin1和Mcl-1蛋白之间的相互作用变化

免疫共沉淀结果显示(图5)，空白组和假手术组大鼠肺组织细胞中Beclin1与Mcl-1存在相互关联。同时观察到在模型组中，使用博来霉素后明显增强了Beclin1和Mcl-1蛋白之间的结合作用(Beclin1表达明显降低，Mcl-1表达明显升高)。但此作用可以被玉屏风散高剂量组、索拉非尼组和强的组中使用的药物所逆转(Beclin1表达明显升高，Mcl-1表达明显降低)。玉屏风散中剂量组也具有一定的逆转的效果，而低剂量组基本上无明显效果。

3.7 肺组织中自噬小体变化

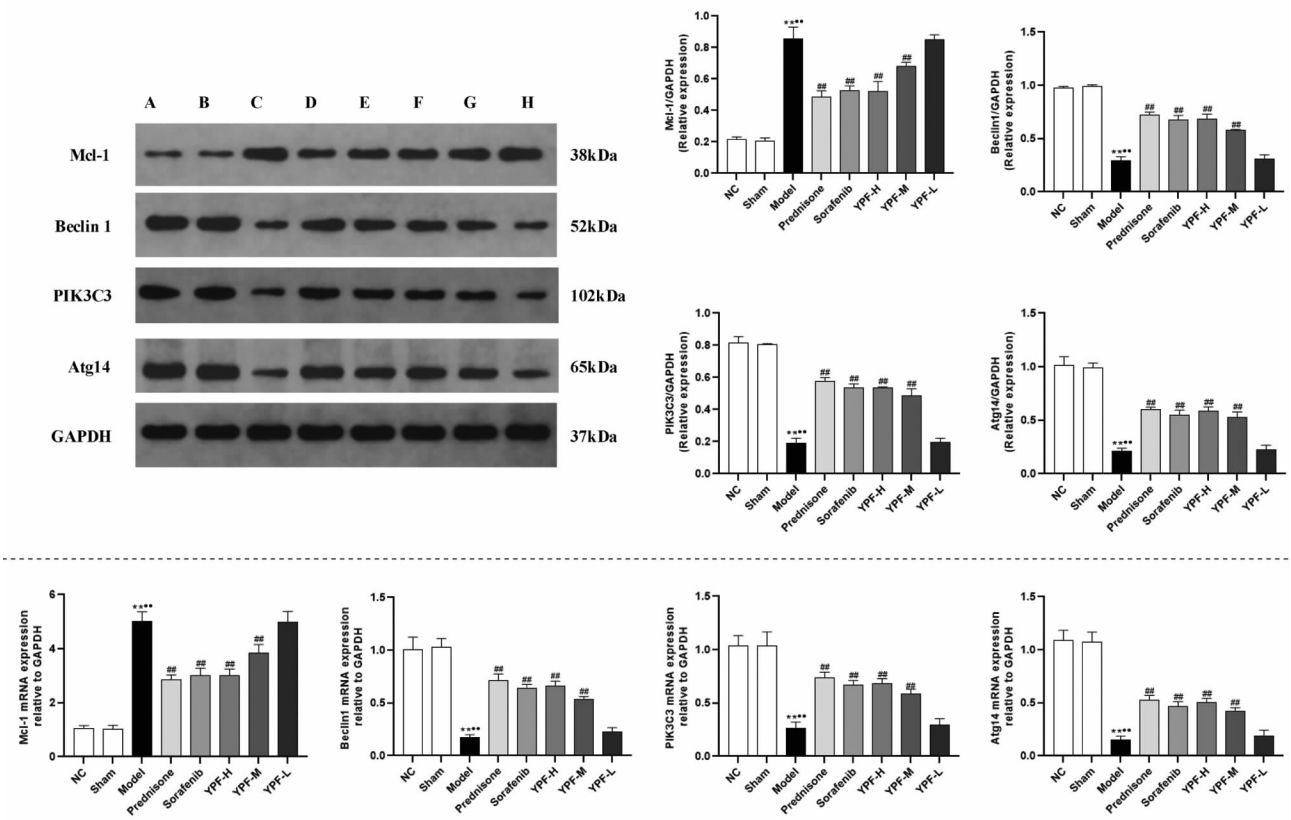
透射电镜显示(插页Ⅻ图6)：空白组、假手术组：成纤维细胞周围有少量的胶原纤维，细胞胞浆内充满自噬结构，整个细胞呈现高度自噬状态；模型组：成纤维细胞周围以及内部有明显的胶原纤维，细胞胞浆充盈，细胞器可见，胞浆内基本无明显自噬结构；强的松组：成纤维细胞周围以及内部有少量的胶原纤维，细胞胞浆出现部分自噬结构，胞浆内出现较多小自噬泡；索拉非尼组：成纤维细胞周围以及内部有少量的胶原纤维，细胞胞浆出现部分自噬结构，胞浆内出现较多小自噬泡；玉屏风散高剂量组：成纤维细胞周围以及内部有少量的胶原纤维，细胞胞浆出现部分自噬结构，胞浆内出现较多小自噬泡；玉屏风散中剂量组：成纤维细胞周围以及内部见到一定程度的胶原纤维，细胞胞浆充盈，细胞器可见，胞浆内见少数自噬结构；玉屏风散低剂量组：成纤维细胞周围以及内部见到明显的胶原纤维，细胞胞浆充盈，细胞器可见，胞浆内未见自噬结构。

总体而言，相比较于空白组以及假手术组，模型组成纤维细胞自噬明显减少，可见大量胶原纤维，而给予强的松及索拉非尼后，成纤维细胞自噬明显增加，胶原纤维相比较于模型组明显减少，但自噬水平低于空白组和假手术组；在模型组基础上给予不同浓度的玉屏风散后，成纤维细胞自噬情况较模型组有明显变化，尤其高剂量组自噬情况明显增多，趋近于激素对

表4 各组IPF大鼠肺组织中JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$，MOD)

组别	n	JAK2	p-JAK2	STAT3	P-STAT3
空白组	6	0.000 8±0.000 2	0.000 4±0.000 1	0.001 1±0.000 1	0.000 9±0.000 2
假手术组	6	0.000 8±0.000 5	0.000 4±0.000 5	0.001 2±0.000 7	0.000 9±0.000 2
模型组	6	0.003 7±0.000 7**●●	0.005 8±0.000 5**●●	0.006 5±0.000 5**●●	0.006 8±0.001 2**●●
强的松组	6	0.001 2±0.000 3##	0.002 2±0.000 3##	0.004 1±0.000 7##	0.002 9±0.000 4##
STAT3抑制剂组	6	0.001 3±0.000 4##	0.002 4±0.000 5##	0.003 9±0.000 4##	0.003 1±0.000 8##
玉屏风散高剂量组	6	0.001 3±0.000 2##	0.002 5±0.000 4##	0.004 0±0.000 3##	0.003 1±0.000 5##
玉屏风散中剂量组	6	0.002 3±0.000 3#▲▲△■■	0.003 5±0.000 7##▲▲△△■■	0.005 1±0.000 5##▲▲△△■■	0.004 3±0.000 6#▲
玉屏风散低剂量组	6	0.003 5±0.000 3▲▲△△■■□□	0.005 5±0.000 4▲▲△△■■□□	0.006 3±0.000 6▲▲△△■■□□	0.006 4±0.000 9▲▲△△■■□

注：*与空白组比较，$P<0.05$；**与空白组比较，$P<0.01$；●与假手术组比较，$P<0.05$；●●与假手术组比较，$P<0.01$；#与模型组比较，$P<0.05$；##与模型组比较，$P<0.01$；▲与强的松组比较，$P<0.05$；▲▲与强的松组比较，$P<0.01$；△与STAT3抑制剂组比较，$P<0.05$；△△与STAT3抑制剂组比较，$P<0.01$；■与高剂量组比较，$P<0.05$；■■与高剂量组比较，$P<0.01$；□与中剂量组比较，$P<0.05$；□□与中剂量组比较，$P<0.01$。



注：A：空白（NC）组；B：假手术组（Sham）组；C：模型（Model）组；D：强的松（Prednisone）组；E：STAT3 抑制剂索拉非尼（Sorafenib）组；F：玉屏风散高剂量（YPF－H）组；G：玉屏风散中剂量（YPF－M）组；H：玉屏风散高剂量（YPF－L）组。■与空白组比较，$P<0.05$；■■与空白组比较，$P<0.01$；●与假手术组比较，$P<0.05$；●●与假手术组比较，$P<0.01$；#与模型组比较，$P<0.05$；##与模型组比较，$P<0.01$；＊与治疗组比较，$P<0.05$；＊＊与空白组比较，$P<0.01$。

图4 各组大鼠肺组织中 Mcl－1、Beclin1、PIK3C3、Atg14 蛋白和 mRNA 相对表达的变化（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

表5 各组 IPF 大鼠肺组织中 Mcl－1、Beclin1、PIK3C3、Atg14 蛋白相对表达的变化（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	Mcl－1/GAPDH	Beclin1/GAPDH	PIK3C3/GAPDH	Atg14/GAPDH
空白组	6	0.214±0.018	0.979±0.012	0.813±0.041	1.010±0.084
假手术组	6	0.204±0.022	0.991±0.016	0.808±0.003	0.991±0.043
模型组	6	0.857±0.073＊＊●●	0.296±0.032＊＊●●	0.192±0.031＊＊●●	0.208±0.032＊＊●●
强的松组	6	0.484±0.042##	0.725±0.025##	0.577±0.022##	0.604±0.016##
STAT3 抑制剂组	6	0.526±0.032##	0.679±0.038##	0.536±0.023##	0.550±0.044##
玉屏风散高剂量组	6	0.523±0.061##	0.686±0.044##	0.537±0.021##	0.584±0.043##
玉屏风散中剂量组	6	0.681±0.025##▲▲△△■■	0.582±0.004##▲▲△■	0.484±0.046##▲	0.523±0.055##▲▲■
玉屏风散低剂量组	6	0.848±0.033▲▲△△■■□□	0.310±0.037▲▲△△■■□□	0.194±0.028▲▲△△■■□□	0.226±0.045▲▲△△■■□□

注：＊与空白组比较，$P<0.05$；＊＊与空白组比较，$P<0.01$；●与假手术组比较，$P<0.05$；●●与假手术组比较，$P<0.01$；#与模型组比较，$P<0.05$；##与模型组比较，$P<0.01$；▲与强的松组比较，$P<0.05$；▲▲与强的松组比较，$P<0.01$；△与 STAT3 抑制剂组比较，$P<0.05$；△△与 STAT3 抑制剂组比较，$P<0.01$；■与高剂量组比较，$P<0.05$；■■与高剂量组比较，$P<0.01$；□与中剂量组比较，$P<0.05$；□□与中剂量组比较，$P<0.01$。

照组以及索拉非尼组。中剂量组也存在一定程度的自噬，但低剂量的玉屏风散对于模型组的自噬情况影响不明显。

4 讨论

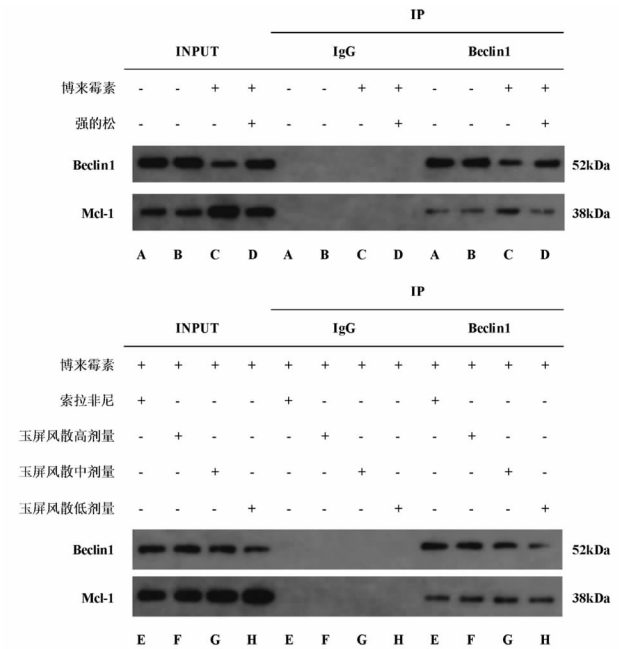
目前研究表明在 IPF 中，由于成纤维细胞中的自噬降低能诱导其自身不断地增殖，并分化成肌成纤维细胞[6]，导致其特异性表型标志物 α－SMA 的异常表达增加和 ECM 的沉积，最终成纤维细胞向间充质转化（FMT）形成肺纤维化[7－8]。JAK/STAT 信号通路有多个不同的亚型，其中 JAK2/STAT3 在 IPF 的形成中占主导地位[3]，激活 JAK2/STAT3 信号通路会导致 IPF 中成纤维细胞到肌成纤维细胞的转变（FMT）[5]，目前已发现其能通过对细胞自噬的调控来诱导 IPF 的形成。在 IPF 的微环境中，受 IL－6、TGF－β1 等细胞因子化学信号的持续作用下，JAK2 活化后磷酸化激活 STAT3，活化的 p－STAT3 不断形成二聚体进入细胞核，调控许多自噬相关基因如 Mcl－1（Bcl－2）、Beclin1 等的转录[31－32]，从而参与细胞自噬的调控。而 JAK2/STAT3 的药理学抑制可增加 BLM 诱导的肺纤维化模型大鼠肺中的细胞自噬[5]。

IPF 属于中医“肺痹”“肺痿”范畴[12－16]。目前认为肺气亏虚是 IPF 的始发和核心病机，可以认为它贯穿了 IPF 发生发展的整个病理过程[14－15]，因此治疗IPF的最基本法则在于补

表 6 各组 IPF 大鼠肺组织中 Mcl－1、Beclin1、PIK3C3、Atg14 mRNA 相对表达的变化($\bar{x} \pm s$) 单位：$2^{-\triangle\triangle CT}$

组别	n	Mcl－1	Beclin1	PIK3C3	Atg14
空白组	6	1.048 ±0.112	1.008 ±0.115	1.037 ±0.094	1.087 ±0.097
假手术组	6	1.032 ±0.137	1.028 ±0.082	1.033 ±0.134	1.077 ±0.090
模型组	6	5.010 ±0.357**●●	0.176 ±0.022**●●	0.263 ±0.058**●●	0.154 ±0.031**●●
强的松组	6	2.867 ±0.156##	0.711 ±0.063##	0.737 ±0.051##	0.528 ±0.043##
STAT3 抑制剂组	6	3.017 ±0.262##	0.638 ±0.037##	0.666 ±0.046##	0.468 ±0.043##
玉屏风散高剂量组	6	3.007 ±0.237##	0.659 ±0.047##	0.682 ±0.046##	0.505 ±0.037##
玉屏风散中剂量组	6	3.837 ±0.322##▲▲△■■	0.531 ±0.032##▲▲△△■■	0.589 ±0.039##▲▲	0.421 ±0.034##▲■
玉屏风散低剂量组	6	4.974 ±0.401▲▲△△■■□□	0.225 ±0.042▲▲△△■■□□	0.294 ±0.059▲▲△△■■□□	0.192 ±0.051▲▲△△■■□□

注：*与空白组比较，$P<0.05$；**与空白组比较，$P<0.01$；●与假手术组比较，$P<0.05$；●●与假手术组比较，$P<0.01$；#与模型组比较，$P<0.05$；##与模型组比较，$P<0.01$；▲与强的松组比较，$P<0.05$；▲▲与强的松组比较，$P<0.01$；△与 STAT3 抑制剂组比较，$P<0.05$；△△与 STAT3 抑制剂组比较，$P<0.01$；■与高剂量组比较，$P<0.05$；■■与高剂量组比较，$P<0.01$；□与中剂量组比较，$P<0.05$；□□与中剂量组比较，$P<0.01$。



注：A：空白（NC）组；B：假手术组（Sham）组；C：模型（Model）组；D：强的松（Prednisone）组；E：STAT3 抑制剂索拉非尼（Sorafenib）组；F：玉屏风散高剂量（YPF－H）组；G：玉屏风散中剂量（YPF－M）组；H：玉屏风散高剂量（YPF－L）组。

图 5 大鼠肺组织细胞中 Beclin1 和 Mcl－1 蛋白之间的相互作用变化

益肺气[16]，而玉屏风散益气固表，为治疗肺气虚证的专用方剂。现代研究发现玉屏风散具有较好抗肺纤维化作用，机制与降低 TGF－β1、α－SMA 水平[17－18,25－26]，减少肌成纤维细胞的活化，抑制胶原蛋白和 ECM 的沉积有密切关系[18－21,23]。关于玉屏风散与 JAK2/STAT3 信号通路的关系，最近的研究发现玉屏风散含药血清能降低肺癌 A549 细胞中 STAT3 磷酸化水平以及 Bcl－2 蛋白表达水平[33]，并且推测它可通过抑制 STAT3 信号通路的活化，降低 Bcl－2 来抑制 A549 细胞增殖。另外有学者发现玉屏风散可降低脾虚模型大鼠脑内 JAK1、STAT1、STAT1 mRNA 和 STAT4 的表达[34－36]。这些数据说明了玉屏风散能通过降低 TGF－β1、α－SMA 水平，减少肌成纤维细胞的活化，抑制胶原蛋白和 ECM 的沉积等作用来抑制肺纤维化。但是玉屏风散是否通过阻断 JAK2/STAT3 的活化，增加肺成纤维细胞的自噬，达到抑制肌成纤维细胞分化并减少 ECM 沉积的目的来延缓 IPF 的进程，目前还不清楚。本研究以 BLM 诱导的肺纤维化大鼠模型为载体，观察玉屏风散对“JAK2/STAT3 信号通路的活化抑制成纤维细胞自噬导致肺纤维化效应”的调控机制，为玉屏风散治疗 IPF 的研究提供更科学的途径。

本次研究的病理结果显示模型组大鼠出现肺组织内损伤明显，肺泡结构消失，大量炎症细胞及纤维结缔组织浸润，同时可观察到较多气管结构异常，上皮细胞空泡明显，管腔内有细胞碎片游离，局部腔内扩张，上皮消失，视野中可见局部血管管壁不均匀增厚及胶原纤维沉积等特征，表明成功地建立了肺纤维化大鼠模型。另外，模型组大鼠肺组织内的肌成纤维细胞活化标记物 α－SMA 表达显著升高，表明成功地诱导了成纤维细胞向肌成纤维细胞分化（FMT），并形成肺纤维化。使用药物干预后，发现高剂量的玉屏风散能明显改善肺纤维化大鼠的肺组织病理情况、减少胶原纤维沉积、降低大鼠肺组织中 α－SMA 表达，并且与强的松疗效比较无明显差异。这些结果表明玉屏风散能很好地干预 IPF 的发生和发展过程，并且这个过程与抑制成纤维细胞的分化、减少胶原纤维沉积密切相关。

另外，模型组大鼠 Mcl－1 的表达升高，而 Beclin1、PIK3C3、Atg14 的表达降低，并且 Beclin1 和 Mcl－1 蛋白之间结合明显增强（Beclin1 表达明显降低，Mcl－1 表达明显升高），这就表示大鼠肺纤维化的过程与其肺组织内 Beclin1 和 Mcl－1 之间的结合增强导致的自噬不足密切相关。据报道 Mcl－1 是 Bcl－2 家族中一个重要的抗自噬蛋白，它能与含 BH3 结构域的 Beclin1 蛋白结合，直接起到负性调控细胞自噬的作用[37－38]。Beclin1 是自噬通路中所必需的正性调节因子，它的基因在自噬体形成的早期起关键作用的自噬蛋白[39－40]。Beclin1 通过 PIK3C3（VPS34）等形成Ⅲ型 PI3K 复合物［Beclin1、Atg14 和 PIK3C3（VPS34）所构成］，直接诱导细胞自噬的发生[41]。而 Mcl－1 与 Beclin1 结合后，可抑制 Beclinl 激活自噬的能力，起到负调控细胞自噬的作用[42－44]，并因此导致自噬抑制［Beclin1、Atg14、PIK3C3（VPS34）、LC3－Ⅱ的表达和LC3－Ⅱ/LC3－Ⅰ比率下调，p62 表达上调］[31]。这些证据结合本研究的结果，可以认为大鼠 IPF 的过程与 Mcl－1 的升高、Mcl－1 与 Beclinl 的结合增多，从而导致Ⅲ型 PI3K 复合物的形成受到破坏，Beclinl 激活自噬的能力下降密切相关。当使用玉屏风散（高、中剂量）干预后的模型大鼠肺组织中 Mcl－1 的表达降低，Beclin1、Atg14、PIK3C3 的表达升高，Beclin1 和 Mcl－1 蛋白

之间的结合明显减弱,这就意味着玉屏风散可通过抑制Mcl-1水平减少Mcl-1与Beclinl结合,从而增加Ⅲ型PI3K复合物的形成、增强Beclinl激活自噬的能力来抑制IPF的病理过程。

进一步的结果显示,模型组大鼠肺组织内除了存在着自噬不足外,还存在着IL-6、TGF-β1含量及JAK2/STAT3信号通路的表达升高。当使用索拉非尼(STAT3抑制剂)[44]阻断STAT3的磷酸化后,JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3的表达明显下降,并且同时存在着Mcl-1的表达降低,Beclin1、PIK3C3(VPS34)、Atg14的表达升高,Mcl-1与Beclin1的结合减弱。这些结果提示了JAK2/STAT3信号通路直接调控着大鼠肺组织内的自噬水平。证据显示在肺纤维化的微环境中,受IL-6、TGF-β1等细胞因子化学信号的持续作用影响,JAK2活化后激活STAT3,活化的p-STAT3不断形成二聚体进入细胞核,调控许多自噬相关基因如Mcl-1(Bcl-2)、Beclin1、PIK3C3(VPS34)和LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ等的转录[31-32],从而参与细胞自噬的调控。研究证实细胞核和细胞质中的STAT3都有助于自噬信号传导[37,45],其中核STAT3(p-STAT3)调控这些自噬相关基因主要表现在:它可激活抗自噬蛋白基因Mcl-1(Bcl-2),导致自噬必不可少的复合物Beclin1/PIK3C3(VPS34)的形成受到破坏[46],从而抑制自噬。核STAT3(p-STAT3)是自噬的重要调节剂[37]。研究表明p-STAT3被激活后,p-STAT3能上调Mcl-1(Bcl-2)的表达[47-48]。数据显示在饥饿刺激自噬的微环境中,p-STAT3的水平降低并下调Bcl-2,导致Beclin1、Atg14和PIK3C3(VPS34)的表达水平大量增加,p62表达降低,而这种状态可被IL-6的刺激所逆转[31]。进一步提供了p-STAT3可上调Mcl-1(Bcl-2)并下调Beclin1抑制自噬的有力证据。这些数据结合我们的结果,可以认为在BLM的刺激下,由于大鼠肺组织内IL-6、TGF-β1的水平升高诱导JAK2/STAT3信号通路的活化,p-STAT3通过上调自噬的负调节因子Mcl-1,导致Mcl-1与Beclin1的结合增加,从而破坏Ⅲ型PI3K复合物的形成并抑制自噬,最终形成IPF。在电镜下观察,发现当使用索拉非尼进行干预后,成纤维细胞中的自噬水平明显升高、胶原纤维明显减少,并且疗效与强的松组接近,表明JAK2/STAT3信号通路的抑制能够增加成纤维细胞自噬,从而达到抑制IPF的目的,并且这个过程可能与抑制Mcl-1与Beclin1的结合密切相关。

当使用玉屏风散干预后,模型组中IL-6、TGF-β1含量降低,JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3表达降低,表明玉屏风散可通过降低IL-6、TGF-β1水平来抑制JAK2/STAT3通路的磷酸化和活化。再从进一步的结果来看,玉屏风散(高、中剂量)干预后的模型大鼠肺组织内也同样存在着Mcl-1的表达降低,Beclin1、PIK3C3、Atg14的表达升高,Mcl-1与Beclin1的结合减弱,表明玉屏风散可通过抑制JAK2/STAT3的活化阻断Mcl-1与Beclinl的结合,从而增加Ⅲ型PI3K复合物的形成、增强Beclinl激活自噬的能力来抑制IPF的病理过程。在电镜下观察,发现在模型组大鼠肺组织的成纤维细胞中存在着明显的自噬不足及大量的胶原纤维,当使用玉屏风散(高剂量)进行干预后,发现成纤维细胞中的自噬水平明显升高、胶原纤维明显减少,并且疗效与强的松组接近。这些结果进一步证实了玉屏风散能够通过增加成纤维细胞自噬来减少胶原纤维沉积,从而达到抑制IPF的目的,并且这个过程可能与抑制JAK2/STAT3的活化、阻断Mcl-1与Beclin1的结合密切相关。

综上所述,IL-6、TGF-β1激活JAK2/STAT3信号通路后,上调自噬的负调节因子Mcl-1,进而下调自噬必需的因子Beclin1,破坏Ⅲ型PI3K复合物的形成,导致自噬受损,从而诱导IPF的形成。玉屏风散能够通过增加成纤维细胞自噬来减少胶原纤维沉积,从而达到抑制IPF的目的,并且这个过程可能与通过降低IL-6、TGF-β1水平来抑制JAK2/STAT3通路的磷酸化和活化,从而阻断Mcl-1与Beclin1的结合,进一步增加Ⅲ型PI3K复合物的形成、增强Beclinl激活自噬的能力密切相关。

参考文献

[1] RAGHU G, ROCHWERG B, ZHANG Y, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline: treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. an update of the 2011 clinical practice guideline [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2015, 192(2): e3-e19.

[2] XIE B B, REN Y H, GENG J, et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis Registry China study (PORTRAY): protocol for a prospective, multicentre registry study[J]. BMJ Open, 2020, 10(11): e036809.

[3] MONTERO P, MILARA J, ROGER I, et al. Role of JAK/STAT in interstitial lung diseases; molecular and cellular mechanisms[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(12): 6211.

[4] WOLTERS P J, COLLARD H R, JONES K D. Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Annu Rev Pathol Mech Dis, 2014, 9: 157-179.

[5] MILARA J, HERNANDEZ G, BALLESTER B, et al. The JAK2 pathway is activated in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Respir Res, 2018, 19(1): 24.

[6] ARAYA J, KOJIMA J, TAKASAKA N, et al. Insufficient autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013, 304(1): L56-L69.

[7] PATEL A S, LIN L, GEYER A, et al. Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41394.

[8] NHO R S, HERGERT P. IPF fibroblasts are desensitized to type I collagen matrix-induced cell death by suppressing low autophagy *via* aberrant Akt/mTOR kinases[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e94616.

[9] AL-SHENAWY H A. Expression of Beclin-1, an autophagy-related marker, in chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma and its relation with apoptotic markers[J]. APMIS, 2016, 124(3): 229-237.

[10] CHITRA P, SAIPRASAD G, MANIKANDAN R, et al. Berberine inhibits Smad and non-Smad signaling cascades and enhances autophagy against pulmonary fibrosis[J]. J Mol Med, 2015, 93(9): 1015-1031.

[11] DEL PRINCIPE D, VONA R, GIORDANI L, et al. Defective autophagy in fibroblasts may contribute to fibrogenesis in autoimmune processes[J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(35): 3878-3887.

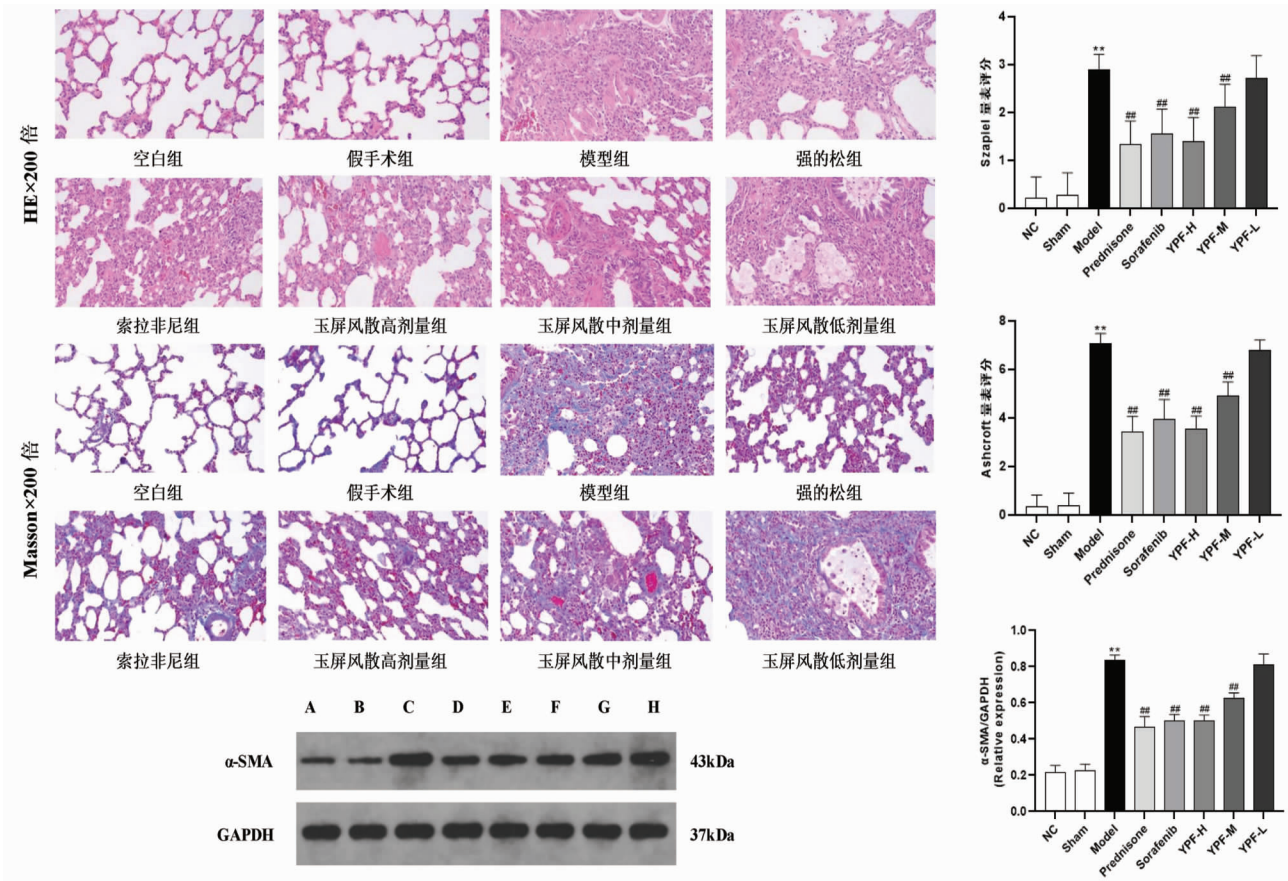
[12] 兰智慧, 张元兵, 朱伟, 等. 从阳虚论治肺间质纤维化探讨[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(7): 1940-1942.

[13] 考希良, 张伟. 从痰探讨肺间质纤维化的中医病因病机[J]. 世

界中西医结合杂志, 2012, 7(6): 523 - 525.
[14] 范锐, 张伟. 从气虚痰阻探讨肺纤维化氧化应激机制[J]. 中医杂志, 2019, 60(24): 2099 - 2102.
[15] 崔红生, 谢淑华, 靳锐锋. 肺间质纤维化临床分期与证候分布规律探讨[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(5): 1443 - 1445.
[16] 李建生. 特发性肺纤维化中医辨证治疗概要[J]. 中医学报, 2017, 32(6): 929 - 931.
[17] 高建. HMGB1 在肺纤维化进程中的作用及玉屏风散的调控机制[J]. 神经药理学报, 2018, 8(6): 36.
[18] CUI W H, LI L C, LI D L, et al. Total glycosides of Yupingfeng protects against bleomycin - induced pulmonary fibrosis in rats associated with reduced high mobility group box 1 activation and epithelial - mesenchymal transition[J]. Inflamm Res, 2015, 64(12): 953 - 961.
[19] 王胜霞, 李俊, 刘勇. 玉屏风多糖对大鼠肺纤维化的干预作用及部分机制研究[J]. 安徽医科大学学报, 2009, 44(5): 586 - 590.
[20] XU L, LI L C, ZHAO P, et al. Total polysaccharide of Yupingfeng protects against bleomycin - induced pulmonary fibrosis *via* inhibiting transforming growth factor - β1 - mediated type I collagen abnormal deposition in rats[J]. J Pharm Pharmacol, 2014, 66(12): 1786 - 1795.
[21] LI L C, LI D L, XU L, et al. Total extract of Yupingfeng attenuates bleomycin - induced pulmonary fibrosis in rats[J]. Phytomedicine, 2015, 22(1): 111 - 119.
[22] 杨胜, 张仲林, 袁明勇, 等. 玉屏风散对肺气虚证模型大鼠免疫功能的影响[J]. 中国药房, 2016, 27(22): 3041 - 3044.
[23] 李留成. 玉屏风总苷对肺纤维化大鼠的保护作用及部分机制研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2015.
[24] 吴孝政, 黄高, 刘杨, 等. 玉屏风散对肺气虚证大鼠 JAK1/STAT3 通路及炎性反应的影响及相关机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(3): 66 - 72, 后插 10 - 后插 11.
[25] 季树仙. 玉屏风散加减联合激素对放射性肺纤维化的有效性分析[J]. 内蒙古中医药, 2018, 37(8): 70 - 71.
[26] 杨莹, 李静, 康静波. 玉屏风散加减联合激素治疗放射性肺纤维化的疗效观察[J]. 中国医药导报, 2012, 9(7): 35 - 37.
[27] 李全林. 索拉非尼对雷帕霉素诱导的肝细胞癌 PI_3K/AKT 及 MAPK 信号通路异常活化的拮抗作用[D]. 上海: 复旦大学, 2010.
[28] WILHELM S M, CARTER C, TANG L Y, et al. BAY 43 - 9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis[J]. Cancer Res, 2004, 64(19): 7099 - 7109.
[29] SZAPIEL S V, ELSON N A, FULMER J D, et al. Bleomycin - induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse[J]. Am Rev Respir Dis, 1979, 120(4): 893 - 899.
[30] ASHCROFT T, SIMPSON J M, TIMBRELL V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale[J]. J Clin Pathol, 1988, 41(4): 467 - 470.
[31] QIN B B, ZHOU Z, HE J Q, et al. IL - 6 inhibits starvation - induced autophagy *via* the STAT3/bcl - 2 signaling pathway[J]. Sci Rep, 2015, 5: 15701.
[32] YOSHIKAWA T, MIYAMOTO M, AOYAMA T, et al. JAK2/STAT3 pathway as a therapeutic target in ovarian cancers[J]. Oncol Lett, 2018, 15(4): 5772 - 5780.
[33] 鲍建敏, 石玉丹, 段达荣, 等. 玉屏风散含药血清对肺癌 A549 细胞及 STAT3 信号通路的影响[J]. 中国卫生检验杂志, 2021, 31(19): 2367 - 2371.
[34] 熊斌, 钱会南. 益气健脾方药对脾虚大鼠脑内 JAK1、STAT1、SOCS1 水平变化的影响[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(7): 1543 - 1547.
[35] 熊斌, 钱会南. 四君子汤和玉屏风散对脾虚大鼠脑内信号转导和转录激活因子 1 mRNA 水平变化的影响[J]. 湖北中医药大学学报, 2013, 15(1): 3 - 5.
[36] XIONG B, QIAN H N. Effects of Sijunzi decoction and Yupingfeng powder on expression of Janus kinase - signal transducer and activator of transcription signal pathway in the brain of spleen - deficiency model rats[J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33(1): 78 - 84.
[37] YOU L K, WANG Z G, LI H S, et al. The role of STAT3 in autophagy[J]. Autophagy, 2015, 11(5): 729 - 739.
[38] YU H Y, YIN S S, ZHOU S Y, et al. Magnolin promotes autophagy and cell cycle arrest *via* blocking LIF/Stat3/Mcl - 1 axis in human colorectal cancers[J]. Cell Death Dis, 2018, 9: 702.
[39] HILL S M, WROBEL L, RUBINSZTEIN D C. Post - translational modifications of Beclin 1 provide multiple strategies for autophagy regulation[J]. Cell Death Differ, 2019, 26(4): 617 - 629.
[40] MENON M B, DHAMIJA S. Beclin 1 phosphorylation - at the center of autophagy regulation[J]. Front Cell Dev Biol, 2018, 6: 137.
[41] LEVY J M M, TOWERS C G, THORBURN A. Targeting autophagy in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2017, 17(9): 528 - 542.
[42] GERMAIN M, NGUYEN A P, LE GRAND J N, et al. MCL - 1 is a stress sensor that regulates autophagy in a developmentally regulated manner[J]. EMBO J, 2011, 30(2): 395 - 407.
[43] CHU J Q, JING K P, GAO X, et al. Toxoplasma gondii induces autophagy and apoptosis in human umbilical cord mesenchymal stem cells *via* downregulation of Mcl - 1[J]. Cell Cycle, 2017, 16(5): 477 - 486.
[44] TAI W T, SHIAU C W, CHEN H L, et al. Mcl - 1 - dependent activation of Beclin 1 mediates autophagic cell death induced by sorafenib and SC - 59 in hepatocellular carcinoma cells[J]. Cell Death Dis, 2013, 4(2): e485.
[45] BOWMAN T, GARCIA R, TURKSON J, et al. STATs in oncogenesis[J]. Oncogene, 2000, 19(21): 2474 - 2488.
[46] BHARADWAJ U, KASEMBELI M M, ROBINSON P, et al. Targeting Janus kinases and signal transducer and activator of transcription 3 to treat inflammation, fibrosis, and cancer: rationale, progress, and caution[J]. Pharmacol Rev, 2020, 72(2): 486 - 526.
[47] ZHOU M J, ZHAO J F, ZHANG Q, et al. Nicotine upregulates the level of mcl - 1 through STAT3 in H1299 cells[J]. J Cancer, 2020, 11(5): 1270 - 1276.
[48] RENJINI A P, TITUS S, NARAYAN P, et al. STAT3 and MCL - 1 associate to cause a mesenchymal epithelial transition[J]. J Cell Sci, 2014, 127(Pt 8): 1738 - 1750.

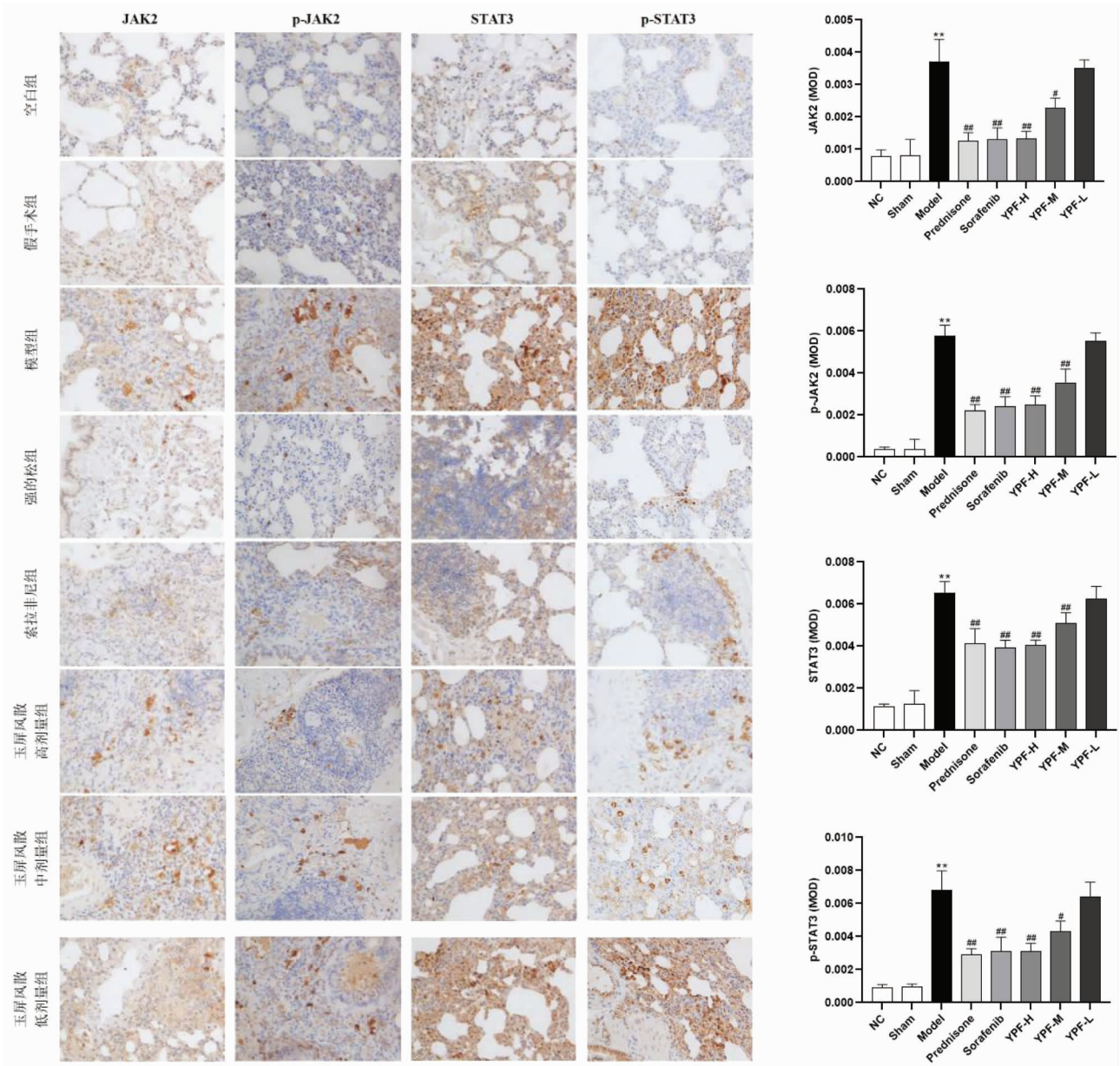
基于JAK2/STAT3信号通路调控成纤维细胞自噬探讨玉屏风散干预特发性肺纤维化的机制研究

(正文见36－44页)



注:HE:细胞核呈蓝色,肌纤维和胶原纤维呈不同程度的红色;Masson:胶原纤维、黏液呈蓝色,胞浆呈红色,细胞核呈蓝黑色。A:空白(NC)组;B:假手术组(Sham)组;C:模型(Model)组;D:强的松(Prednisone)组;E:STAT3抑制剂索拉非尼(Sorafenib)组;F:玉屏风散高剂量(YPF－H)组;G:玉屏风散中剂量(YPF－M)组;H:玉屏风散高剂量(YPF－L)组。＊＊与空白组比较,$P<0.01$;##与模型组比较,$P<0.01$。

图1 各组大鼠肺组织病理学评分及α－SMA水平的比较($n=6$,$\bar{x}\pm s$)



注:蓝色为细胞核,棕黄色或棕褐色为目标蛋白。#与模型组比较,$P<0.05$;##与模型组比较,$P<0.01$;＊＊与空白组比较,$P<0.01$。

图3 各组大鼠肺组织中JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3蛋白表达比较(×400倍,$n=6$,$\bar{x}\pm s$,MOD)

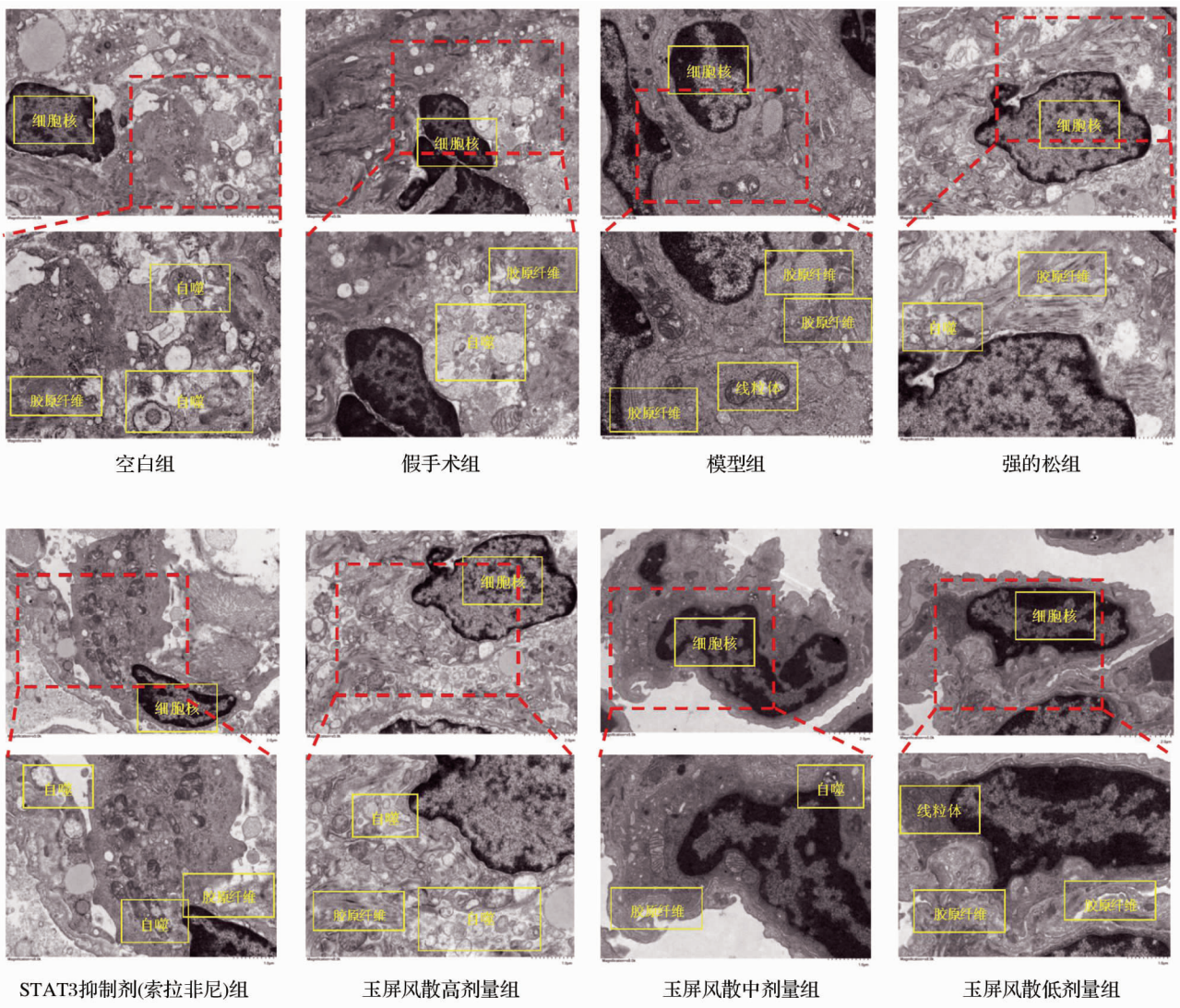


图 6 电镜下各组大鼠肺组织成纤维细胞中自噬小体的变化情况