DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.08.020

雷公藤红素对PTEN介导PI3K/PKB信号通路改善特发性肺纤维化的实验研究

陈红红[1],吴珂[1],林龙[1],莫名月[1],朱裕林[1],李熠桓[1],陈依萍[1],
刘婉婷[1],张嘉妍[1],吴雅逸[1],付跃峰[2]
(1.广州南方学院云康医学与健康学院,广东 广州 510900;2.北京中医药大学东直门医院,北京 100700)

摘要:目的 观察雷公藤红素对磷酸酯酶与张力蛋白同源物(Phosphatase and tensin homolog,PTEN)介导磷脂酰肌醇3-激酶(Phosphatidyl inositol 3-kinase,PI3K)/蛋白激酶B(Protein kinase B,PKB)信号通路在特发性肺纤维化(Idiopathic pulmonary fibrosis,IPF)模型小鼠中的作用及机制。方法 C57BL/6小鼠随机区组平均分为4组,每组10只,包括正常组、模型组、雷公藤红素(1 mg·kg^{-1}·d^{-1})组、吡非尼酮组(50 mg·kg^{-1}·d^{-1})。以气管滴注博来霉素(Bleomycin,BLM)的方法制备IPF小鼠模型。造模成功后,各观察组灌胃给药,正常组灌胃等量生理盐水,连续给药28 d,末次给药后第2天取材。HE常规病理染色观察肺组织病理变化,Masson特殊染色观察小鼠肺间质及支气管周围胶原沉积。免疫组化(Immunohistochemistry,IHC)检测PTEN以及Ⅰ型胶原在肺组织中的原位表达,实时荧光定量PCR(Quantitative real-time PCR,qRT-PCR)检测肺组织中PTEN、PI3K、PKB及白细胞介素(interleukin,IL)-17βmRNA表达。结果 与正常组相比,模型组肺间质Ⅰ型胶原蛋白的表达显著增强($P<0.05$),PTEN蛋白的表达明显减弱($P<0.05$);肺组织匀浆PI3K、PKB及IL-17β mRNA表达均显著增强($P<0.05$),PTEN mRNA表达显著减弱($P<0.05$)。与模型组相比,雷公藤红素及吡非尼酮组肺间质Ⅰ型胶原蛋白的表达明显减弱($P<0.05$),PTEN蛋白的表达明显增强($P<0.05$);肺组织匀浆PI3K、PKB及IL-17β mRNA表达显著减弱($P<0.05$),PTEN mRNA表达显著增强($P<0.05$)。结论 雷公藤红素能有效抑制肺间质的结构破坏,减轻肺纤维化。其机制可能通过激活PTEN,并协调性抑制PI3K/PKB的表达,降低炎症反应,阻止肺间质胶原的沉积。

关键词:特发性肺纤维化;雷公藤红素;磷酸酯酶与张力蛋白同源物;磷脂酰肌醇3-激酶;蛋白激酶B;Ⅰ型胶原
中图分类号:R285.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)08-0091-10

Experimental Study of Celastrol Ameliorating Idiopathic Pulmonary Fibrosis by PTEN-mediated PI3K/PKB Signaling Pathway

CHEN Honghong[1],WU Ke[1],LIN Long[1],MO Mingyue[1],ZHU Yulin[1],LI Yihuan[1],CHEN Yiping[1],
LIU Wanting[1],ZHANG Jiayan[1],WU Yayi[1],FU Yuefeng[2]
(1. Yunkang School of Medicine and Health,Nanfang College Guangzhou,Guangzhou 510900,Guangzhou,China;
2. Dongzhimen Hospital,Beijing University of Chinese Medicine,Beijing 100700,China)

Abstract:*Objective* To observe the effect and mechanism of Celastrol extract on the phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)/protein kinase B(PKB) signaling pathway mediated by phosphatase and tensin homolog(PTEN) in idiopathic pulmonary fibrosis(IPF) model mice. *Methods* C57BL/6 mice were randomly divided into 4 groups with an average of 10 mice in each group,including normal group,model group,celastrol(1 mg·kg^{-1}·d^{-1}) group and pirfenidone(50 mg·kg^{-1}·d^{-1}) group. The IPF mouse model was established by intratracheal instillation of bleomycin(BLM). After successful modeling,each observation group was orally administered(ig),while the normal group was orally administered an equal amount of physiological saline for 28 con-

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(82000355);中央高水平中医医院临床科研业务费项目(CZ015);中华中医药学会青年求实项目(2021-QNQS-001);中华中医药学会雏鹰计划-第一批中医临床青年人才项目(CYJH2024008);广东省自然科学基金项目(2018A030310016);广东省普通高校特色创新类科研项目(2018KTSCX321);广州市科技计划项目(202102080037)
作者简介:陈红红(1989-),女,广东韶关人,讲师,硕士,研究方向:呼吸系统疾病机制。
通讯作者:付跃峰(1985-),男,河南登封人,副主任医师,硕士研究生导师,硕士,研究方向:中西医结合防治急危重症。E-mail:272167303@qq.com。

secutive days. The samples were taken out on the second day after the last administration. The pathological changes in lung tissue were observed through routine HE staining and collagen deposition in mouse lung interstitium and peribronchial tissue were observed through Masson special staining. Immunohistochemistry(IHC) method was used to detect the in situ expressions of PTEN and type I collagen in lung tissue, while quantitative real - time PCR(qRT - PCR)) was used to detect the mRNA expressions of PTEN, PI3K, PKB and interleukin(IL) -17β in lung tissue. *Results* Compared with that of the normal group, the expression of type I collagen in the lung interstitium was significantly increased in the model group($P<0.05$). The expressions of PI3K, PKB and IL -17β mRNA in lung tissue were significantly increased($P<0.05$), and the expression of PTEN mRNA was significantly decreased($P<0.05$). Compared with the model group, the celastrol and pirfenidone groups had a significant reduction in the expression of type I collagen in the lung tissue($P<0.05$) and the expression of PTEN protein was significantly enhanced($P<0.05$). The expressions of PI3K, PKB and IL -17β mRNA in lung tissue were significantly decreased($P<0.05$), and the expression of PTEN mRNA was significantly increased($P<0.05$). *Conclusion* Celastrol extract can effectively inhibit the structural damage of lung interstitium and alleviate pulmonary fibrosis. The mechanism may be achieved by activating PTEN and coordinating the inhibition of PI3K/PKB expression, reducing inflammatory response and preventing the deposition of pulmonary interstitial collagen.

Keywords: idiopathic pulmonary fibrosis; Celastrol; phosphatase and tensin homolog(PTEN); phosphatidylinositol 3 - kinase(PI3K); protein kinase B(PKB); type I collagen

特发性肺纤维化(Idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种病因不明,呈现慢性、进行性肺泡及肺间质结构破坏及紊乱加重的疾病,会影响支气管或肺泡周围的组织,使之变厚变僵硬,导致气体交换受阻[1]。最常见症状是呼吸急促和咳嗽,发病率呈逐年增加的趋势,确诊后年平均生存期为2~3年。现有药物吡非尼酮、尼达尼布只能轻度延缓疾病进程,无法治愈[2]。病理表现以纤维化进行性加重,弥漫性肺泡非特异性炎症为主要特征,这些症状会逐渐导致肺部形成永久性瘢痕,即纤维化,从而使呼吸变得更加困难。

炎症持续反应并呈级联放大是IPF气道结构破坏及紊乱的重要病理机制[3]。炎症信号通路磷酸酯酶与张力蛋白同源物(Phosphatase and tensin homolog, PTEN)/磷脂酰肌醇3-激酶(Phosphatidyl inositol 3 - kinase, PI3K)/蛋白激酶B(Protein kinase B, PKB)已被证实参与IPF的发生发展,可以调控细胞凋亡、代谢、增殖和生长等多种生物过程[4]。白细胞介素(Interleukin, IL) -17是PTEN/PI3K/PKB信号通路下游表达的主要炎症介质之一,参与炎症的级联反应,介导靶细胞中炎症介质如细胞因子、趋化因子和抗菌肽等的表达[5]。通过这种方式,IL-17家族细胞因子间接将炎症细胞募集到炎症部位,调节细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)合成和降解[6]。IL-17家族细胞因子驱动的炎症已被证明参与慢性肺部疾病的进展,如慢性阻塞性肺疾病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、肺癌、囊性肺疾病等[7]。Ⅰ型和Ⅲ型胶原参与IPF支气管壁及肺组织的结构重塑,影响肺的通气和换气功能[8]。PTEN是一种蛋白、脂质双重磷酸酶,如果蛋白功能变异可导致脂质磷酸酶失活,但仍具有蛋白磷酸酶活性[9],其主要的底物是磷脂酰肌醇3,4,5-三磷酸(PIP3),而PIP3是PI3K的产物。PIP3将PKB募集到细胞膜上并使其激活,PTEN使PIP3脱磷酸后阻断PI3K-AKT通路,降低AKT的活性。在IPF患者肺组织中,PTEN免疫组织化学染色较弱[10]。在转化生长因子β1(Transforming growth factor - β1, TGF - β1)诱导的肺成纤维细胞表型转化模型中,PTEN mRNA和蛋白水平也较低[11]。研究表明PI3K和PKB激活突变能够在几种细胞系统中赋予肿瘤致癌特性[12]。综上所述,PTEN/PI3K/PKB通路可以作为药物发现的重要靶点。

雷公藤红素又称南蛇藤素[13],是雷公藤(又名断肠草)最重要的活性成分之一,主要来源于卫矛科植物雷公藤的根皮,是一个具有多种生物活性的天然产物,具有抗炎、抗氧化、增强免疫活性、抗肿瘤新生血管生成等作用,它是治疗类风湿病雷公藤片、雷公藤多苷片等制剂的有效成分之一。研究发现,雷公藤红素还可以治疗肥胖[14]、慢性炎症[15]和免疫疾病[16]。高剂量的雷公藤红素具有一定的心脏毒性,但低剂量的雷公藤红素却被发现可以保护心血管,减少心肌纤维化并改善心脏功能[17]。雷公藤红素与肺纤维化关系的研究较少,其抗纤维化的疗效、内在的机制和作用靶点尚不完全清楚,因此雷公藤红素对肺纤维化作用的特异性靶点及分子作用机理具有研究价值。

本研究取中药雷公藤的有效组分雷公藤红素,用博来霉素诱导的方法制备肺纤维化IPF小鼠模型,发现雷公藤红素给药IPF小鼠后,PTEN表达水平呈相关性上调,并协调性抑制PI3K/PKB及下游信号通路的表达,降低炎症反应,阻止肺间质胶原的沉积,有效改善肺纤维化的病理表现。本文主要报道雷公藤红素对涉及IPF肺间质ECM重建的相关信号通路PTEN、PI3K、PKB及IL17β基因mRNA和PTEN、I型胶原蛋白表达,以及PTEN和I型胶原蛋白在细支气管管壁及肺间质中定位表达的影响。

1 材料

1.1 *动物* 40只C57BL/6小鼠,2月龄,SPF级,体质量20~23 g,由广东省广州锐格生物科技有限公司提供,实验动物质量合格证号:NO. 44827200004895,动物使用合格证号:SCXK(粤)2021-0059。本次实验已获得广州南方学院伦理委员会的批准(批号:NF2023061501)。室温20~25 ℃,相对湿度

60%～70%，正常昼夜光照，保证充足的清洁食物和水。

1.2 药物与试剂 硫酸博来霉素（规格：每瓶10 mg，批号：J12IS205946）由上海源叶生物科技有限公司提供。雷公藤红素（批号CFN99198）、吡非尼酮（批号MP179138）由广州晶欣生物科技有限公司提供。Anti－PKB1 Antibody（Lot No：BST17514390）、Anti－PI3CG Antibody（Lot No：BOS6896BP3538），Anti－COL1A1 Antibody（Lot No：23XB867J868E10）以上均为武汉博士德生物有限公司提供。PTEN Polyclonal Antibody（Lot：5814）为美国SAB（Signalway Antibody）公司提供。总RNA提取试剂盒（Total RNA Isolation Kit，LS1040），逆转录试剂盒（HiScript® Ⅱ 1st Strand cDNA Synthesis Kit，K1622），染料法qPCR试剂（批号#A25742），Oligo合成均为广州艾基生物技术有限公司。引物序列见表1。

表1 引物序列

基因	引物序列
PTEN－F	5’－TCCTGCAGAAAGACTTGAAGGTG－3’
PTEN－R	5’－AAGTTCTAGCTGTGGTGGGTT－3’
PI3K－F	5’－GGACTTAGAGTGTGCCAAGACA－3’
PI3K－R	5’－CCTCACAAACGGCAGCGTCA－3’
PKB－F	5’－ACTCATTCCAGACCCACGAC－3’
PKB－R	5’－ACTCATTCCAGACCCACGAC－3’
β－ACTIN－F	5’－GCTTCTTTGCAGCTCCTTCG－3’
β－ACTIN－R	5’－GGCCTCGTCACCCACATAG－3’

注：F表示正向引物（forward primer）；R表示反向引物（reverse primer）。

1.3 仪器 MAX Ⅱ型非束缚小动物肺功能测量仪（美国BUXCO），LX－100手掌型离心机、LEGACI－80 ℃超低温冰箱（美国电热），Fast－24匀浆机（Hartono Istanan Teknologi公司），酶标仪（Multiskan Mk3型）和BioMate 3S紫外可见分光光度计（赛默飞世尔科技有限公司），GL－3250A磁力搅拌器（江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司），YXQ－LS－30S Ⅱ型立式压力蒸汽灭菌器（上海博迅实业有限公司医疗设备厂），JS－680A自动凝胶图像分析仪（上海培清科技有限公司），Step One QPCR仪（Applied Biosystems），SKG－01电热恒温干燥箱（湖北省黄石市医疗器械厂），SW－CJ－2FD洁净工作台（苏净集团苏州安泰空气技术有限公司），TP1020－1自动组织脱水处理机、EG1150C冷台、ST5020全自动染色机（徕卡显微系统上海有限公司），BX51＋CCD＋照相装置病理图像分析系统（日本OLYMPUS），Image－Pro Plus 6.0（IPP）显微镜图像分析软件，Motic全自动数字切片扫描系统（Motic DSAssistant Lite，Http://192.168.106.169/dse）等均由北京中医药大学东直门医院和广州南方学院云康医学与健康学院科研实验中心及云康集团病理学实验室提供。

2 方法

2.1 分组、模型制备与给药 40只C57BL/6小鼠适应性饲养两周后，以体质量为区组随机分为4组：正常组、模型组、雷公藤红素组、吡非尼酮组。参照文献[18－19]制备肺纤维化小鼠模型：除正常组外，其余各组均于第1天和第14天麻醉，气管滴入博来霉素（5 mg·kg^{-1}），正常组注入等量生理盐水。造模成功后，雷公藤红素组以1 mg·kg^{-1}·d^{-1}灌胃，1次·d^{-1}。吡非尼酮组以50 mg·kg^{-1}·d^{-1}灌胃，1次·d^{-1}。正常组及模型组给予相同用量的生理盐水灌胃。疗程28 d，给药结束第2天取材。

2.2 实时荧光定量PCR法检测肺匀浆中PTEN、PI3K、PKB及IL－17β mRNA表达 制备肺匀浆液，12 000 g，4 ℃，离心10 min后取上层水相置于无菌EP管中，－80 ℃冰箱储存。将－80 ℃冰箱冻存的部分肺组织取出置于液氮瓶内，提取组织总RNA。按逆转录试剂盒说明配制逆转录反应液：在EP管中加入相同量的约0.5 μg的模板RNA，1 μL Oligo（dT）$_{18}$引物，DEPC水定容至12 μL，dNTP mix 2 μL，5×reaction Buffer 4 μL，Ribolock™ Ribonuclease Inhibitor 1 μL，ReverAid M－MuLV反转录酶1 μL，总反应体积20 μL，离心30 s，42 ℃水浴60 min进行反转录，70 ℃水浴5 min灭活逆转录酶，进行第一链cDNA合成反应，将全部cDNA置于－20 ℃冰箱保存。（荧光定量PCR：把样本从－20 ℃冰箱拿出，离心混匀，把染料和目的基因引物、内参（β－Actin）于4 ℃冰箱融化。按说明书计算配比量一次加入8联排中，放入实时荧光定量PCR仪进行反应。反应条件：预变性95 ℃ 10 min，变性95 ℃ 15 s，退火60 ℃ 1 min；40个循环。取得扩增曲线、扩增产物熔解曲线及Ct值。结果判断以扩增曲线中Ct值（20～28 cycles）大小为依据判定荧光定量实验的准确性，以扩增产物熔解曲线呈现单波峰来判断反应特异性良好，结果有效，计算得到目的基因相对于β－Actin基因的相对定量。

2.3 取材与病理标本制备 4%多聚甲醛固定肺组织48 h，常规包埋、切片厚4 μm，HE及Masson染色，光镜观察并拍照，评估Masson染色肺组织中的胶原沉积，蓝色为阳性表达，每张扫描切片随机计数6个视野，使用Fiji软件计算胶原容积分数（Collagenvolume fraction，CVF），并进行统计分析。

2.4 免疫组化法检测肺组织中PTEN及Ⅰ型胶原蛋白定位表达 常规脱蜡水化→pH值6.0柠檬酸钠缓冲液进行抗原修复→加一抗4 ℃过夜→加生物素化小鼠抗兔IgG→DAB染色→苏木素复染。以PBS代替一抗作阴性对照，以已知阳性片作阳性对照。阳性表达为棕黄色。在各组切片中随机选取5个高倍（400×）镜下视野，采用ImageJ图像处理软件，检测阳性显色平均光密度值，将所得数据整理并进行统计学分析。

2.5 统计学处理 定量资料的描述采用均数加减标准差法（$\bar{x}\pm s$），数据符合正态分布，且方差齐，组间比较采用单因素方差分析（ONE－WAY ANOVA）法，若数据不符合正态分布，用秩和检验，结果以$P<0.05$为差异有统计学意义。采用统计软件SPSS 26.0进行数据分析。作图采用GraphPad Prism 9软件。

3 结果

3.1 小鼠一般情况 正常组小鼠活动敏捷，毛色亮白，精神良好，大小便正常，无死亡。模型组小鼠毛色发黄暗淡无光泽，体质量减轻，呼吸音增粗、呼吸频率增快、偶有咳嗽、气喘。治疗组上述症状有不同程度地改善。模型组死亡3只、雷公藤红素组死亡2只，吡非尼酮组死亡1只。

3.2 雷公藤红素对肺纤维化小鼠肺组织病理形态的影响 正

常组肺泡结构完整,大小均一,无明显炎症反应,肺泡上皮细胞排列整齐,模型组小鼠明显出现肺组织结构破坏,肺间质炎细胞浸润,肺泡间隔增厚,细支气管壁及肺间质胶原增多,部分肺泡上皮细胞脱落进入肺泡腔,雷公藤红素及吡非尼酮给药组炎症反应减轻,肺泡间隔增厚减轻,细支气管壁及肺间质胶原减少。见插页XV图1。

3.3 雷公藤红素对肺纤维化小鼠肺组织胶原沉积的影响 Masson染色观察细支气管周围胶原纤维含量,与正常组比较,模型组胶原纤维沉积显著增加($P<0.05$);与模型组比较,雷公藤红素组及阳性对照组胶原纤维沉积明显减轻($P<0.05$)。与阳性对照组比较,雷公藤红素组胶原纤维沉积减轻($P<0.05$)。见插页XVI图2、表2。

表2 雷公藤红素对各组小鼠肺组织胶原沉积的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量/(mg·kg^{-1})	CVF/(%)
正常组	10	-	39.64±7.23[1)]
模型组	7	-	71.42±8.63[2)]
雷公藤红素组	8	1	57.78±7.60[3)]
吡非尼酮组	9	50	49.92±11.74[4)]

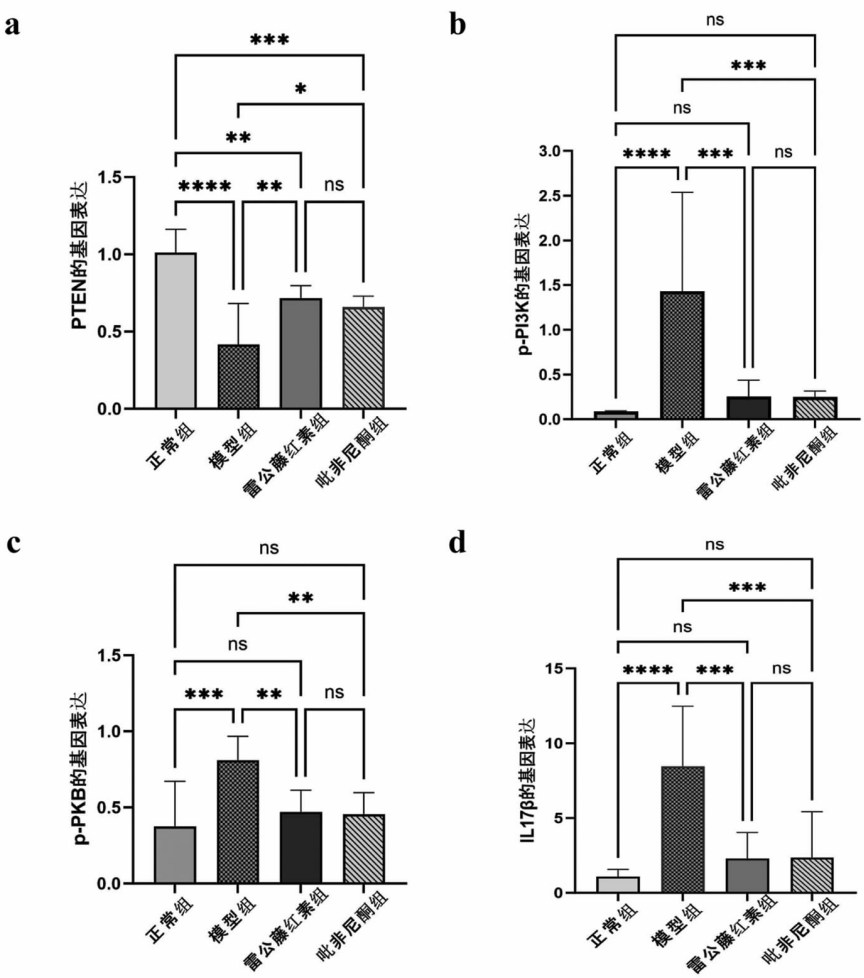
注:2)与正常组相比,$P<0.01$;3)与正常组相比,$P<0.01$;1)与模型组相比,$P<0.01$;3)与模型组相比,$P<0.05$;4)与模型组相比,$P<0.01$。

3.4 雷公藤红素对小鼠肺组织中PTEN、PI3K、PKB及IL-17βmRNA表达的影响 与正常组相比,模型组小鼠肺组织中PTEN表达明显降低,PI3K、PKB及IL-17βmRNA表达显著升高(均$P<0.05$)。与模型组相比,雷公藤红素组PTEN表达明显升高,PI3K、PKB及IL-17βmRNA表达有明显下降(均$P<0.05$)。雷公藤红素组与吡非尼酮组差异无统计学意义。见图3、表3。

3.5 雷公藤红素对小鼠肺泡及肺间质中PTEN及I型胶原蛋白表达的影响 PTEN阳性显色于肺泡上皮细胞胞浆和胞核(+)。与正常组相比,模型组小鼠肺组织中PTEN表达显著降低($P<0.05$);与模型组相比,雷公藤红素组PTEN表达显著升高($P<0.05$)。I型胶原的阳性显色区主要位于细支气管上皮胞浆(+),肺间质纤维细胞、成纤维细胞均(+)。与正常组相比,模型组小鼠肺组织中I型胶原蛋白的表达显著升高($P<0.05$);与模型组相比,雷公藤红素组和吡非尼酮组I型胶原蛋白的表达有明显下降($P<0.05$)。见表4、插页XVII图4和插页XVIII图5。

4 讨论

特发性肺纤维化(Idiopathic pulmonary fibrosis,IPF)是一种肺间质结构不断被破坏及纤维化加重的疾病,临床以呼吸困



注:****$P<0.0001$,***$P<0.001$,**$P<0.01$,*$P<0.05$,ns $P>0.05$。

图3 雷公藤红素对各组小鼠肺组织PTEN、PI3K、PKB及IL-17β mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s$)

表 3 雷公藤红素对各组小鼠肺组织 PTEN、PI3K、PKB 及 IL－17β mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(mg·kg^{-1})	PTEN mRNA	PI3K mRNA	PKB mRNA	IL－17β mRNA
正常组	10	－	1.03±0.15[2)]	0.09±0.01[2)]	0.38±0.29[2)]	1.09±0.47[2)]
模型组	7	－	0.42±0.27[1)]	1.43±1.11[1)]	0.81±0.15[1)]	8.42±4.04[1)]
雷公藤红素组	8	1	0.72±0.09[1)2)]	0.25±0.18[2)]	0.47±0.14[2)]	2.29±1.74[2)]
吡非尼酮组	9	50	0.75±0.07[1)3)]	0.24±0.07[2)]	0.46±0.14[2)]	2.35±3.07[2)]

注:1)与正常组相比,$P<0.01$;2)与模型组相比,$P<0.01$;3)与模型组相比,$P<0.05$。

表 4 雷公藤红素对各组小鼠肺组织中 PTEN 及 I 型胶原蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(mg·kg^{-1})	PTEN	I 型胶原
正常组	10	－	1.17±0.01[3)]	0.03±0.01[3)]
模型组	7	－	0.48±0.1[1)]	0.21±0.02[1)]
雷公藤红素组	8	1	0.84±0.05[2)4)]	0.07±0.01[4)]
吡非尼酮组	9	50	0.81±0.18[2)4)]	0.08±0.00[4)]

注:1)与正常组相比,$P<0.01$;2)与正常组相比,$P<0.05$;3)与模型组相比,$P<0.01$;4)与模型组相比$P<0.05$。

难、气体弥散功能降低、限制性通气功能障碍为主要表现,目前尚不能治愈,临床死亡率高,现有药物仅能延缓病情且不良反应较多,吡非尼酮治疗中报告了胃肠道和皮肤相关的不良事件[20],尼达尼布常导致腹泻和肝酶升高[21],因此新药物的开发具有重要意义。雷公藤红素是中药材雷公藤的有效成分之一,具有多种生物学功能,除了抗肿瘤、抗氧化、治疗肥胖等作用,已被用于肝脏纤维化、肾脏纤维化的研究,有一定疗效,目前在肺纤维化疾病中雷公藤红素的研究资料较少,作用靶点尚不明确。

研究发现[22],在 IPF 患者的肺成纤维细胞中,PI3K－PKB 信号被异常激活,PKB 的激活与疾病的预后不良关系密切,而 PTEN 的活性较低。PTEN 的脂质磷酸酶活性能够使 PIP3 转变为磷脂酰肌醇二磷酸而失活,继而抑制 PI3K/PKB 通路,预实验发现雷公藤红素能够激发 PTEN 的活性,减轻 IPF 肺纤维化症状。目前尚不清楚 PTEN 和 PI3K 轴的改变如何调节纤维化等慢性炎症性疾病。为了解雷公藤红素是否通过对 PTEN 介导 PI3K－PKB 信号通路进行调控而影响 IPF 患者肺纤维化进程,特设计此实验。

博来霉素诱导的肺纤维化动物模型与人类疾病发生发展病程相近[23],可用于研究肺纤维化疾病的进展机制。本研究中模型小鼠出现肺泡隔断裂、融合,细支气管管壁及肺泡间隔明显增厚,Masson 染色显示模型组小鼠细支气管管壁及肺泡间隔胶原纤维显著增加,雷公藤红素及吡非尼酮阳性药物对照组细支气管管壁及肺泡间隔胶原纤维明显减少。

炎症级联反应并持续扩大是 IPF 支气管和肺泡壁的结构不断破坏及肺间质纤维化的重要机制之一[24]。已知促进纤维化疾病的最突出因素是 TGF－β1。它主要由巨噬细胞释放,介导肌成纤维细胞的活化,IL－17β 和 TGF－β1 协同促进胶原蛋白合成并抑制细胞外基质降解[25]。IL－17β 主要由上皮细胞、中性粒细胞和 B 淋巴细胞分泌。它通过刺激来自巨噬细胞、中性粒细胞和 Th17 细胞的炎症介质 IL－6、IL－23、TNF－α、IL－1β 和趋化因子的表达,在介导肺部炎症中发挥重要作用[5]。IL－17β 通过与 TNF－α 配合刺激 Th17 细胞促进基因和中性粒细胞募集基因的分泌来诱导肺纤维化[6] PI3K/PKB 信号转导参与 IPF 的形成,一些有应用前景的 PI3K/PKB 抑制剂已经显示出 IPF 治疗益处[26],使靶向 PI3K/PKB 成为一种新的抗纤维化策略。PI3K/PKB 信号通路是调节细胞生长、增殖、运动、代谢和生存的核心信号通路之一[27]。PI3K 是一组与质膜相关的脂质激酶,可分为三类。Ⅰ类 PI3K 是由 p110 催化亚基和 P85 调节亚基组成的异源二聚体,以ⅠA 类(PI3Kα,PI3Kβ 和 PI3Kδ)和ⅠB 类(PI3Kγ)4 种亚型存在。在这四种亚型中,PI3Kα 可在人肺成纤维细胞中表达,PI3Kα 常在与肺相关的疾病中上调或突变,PI3Kγ 通常在 IPF 肺匀浆和成纤维细胞中过度表达,而 PI3KⅢ类参与自噬体膜的形成,可能影响肺纤维化[28]。PKB 有 3 种亚型:PKB1、PKB2 和 PKB3,其本质是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可响应上游 PI3K 而被激活。PKB1 和 PKB2 亚型与肺纤维化研究相关,PKB3 主要在脑组织中表达。PKB1 介导的线粒体自噬促进了肺泡巨噬细胞的凋亡抵抗,是肺纤维化发展的基础,而 PKB2 缺陷小鼠对博来霉素(BLM)诱导的肺纤维化和炎症具有保护作用,表明 PI3K/PKB 信号通路在 IPF 发展过程中发挥重要作用[29]。肺泡及细支气管壁上皮细胞、中性粒细胞及 B 淋巴细胞在 PI3K/PKB 信号通路被激活后释放 IL－17β,促进肺泡壁及细支气管壁炎症反应,进一步生成大量炎症介质如 TNF－α、TGF－β1 及 IL－1β 等,并刺激成纤维细胞增生及胶原纤维增多,促使 ECM 沉着。研究表明[30]在 IPF 患者肺组织中,PTEN 的活性较低,PTEN 可以通过对 PI3K/PKB 信号通路的负性调节减轻肺组织的炎症反应。如果药物能够激发 PTEN 的活性,就能抑制肺成纤维细胞活化,进而抑制 IPF 肺纤维化进程。正常情况下,PTEN 与 PI3K/PKB 信号通路处于平衡状态,PTEN 是 PI3K/PKB 信号转导的主要负调节因子[31],通过其磷酸肌醇磷酸酶活性将 PI(3,4,5)－P3 去磷酸化为 PI(4,5)P2 和 PI(3,4)P2 来直接拮抗 PI3K 活性。若 PTEN 表达量升高,细支气管管壁及肺泡壁炎症反应减轻,胶原生成减少,肺纤维化程度降低[32];若 PI3K/PKB 信号通路被激活,PTEN 表达量下降,炎症反应加重,肺纤维化程度升高[33]。

本研究结果显示,正常肺组织中 PTEN mRNA 及蛋白表达量较高,PI3K、PKB 及 IL－17β mRNA 表达量较少。与正常组相比,模型组肺组织中 PTEN mRNA 及蛋白表达量明显降低,PI3K、PKB 及 IL－17βmRNA 表达均增高。与模型组相比,雷公藤红素组及阳性药物吡非尼酮组 PTEN mRNA 及蛋白表达量升高,雷公藤红素组的表达量高于吡非尼酮组;PI3K、PKB 及 IL－17β mRNA 表达均明显下降($P<0.05$)。提示雷公藤红素可以减轻 IPF 小鼠肺纤维化相关症状及病理表现,降低肺间质纤维化程度,其机制可能通过上调 PTEN 抑制 PI3K/PKB 信号通路,从而降低炎症反应,减缓气道结构重塑,阻止气道狭窄等并发症发生发展。后期本课题组将使用 PTEN 抑制剂进一步观察雷公藤红素对 IPF 肺间质结构重塑的影响,探讨雷公

藤红素是否主要通过上调 PTEN 降低 PI3K/PKB 信号通路介导的炎症反应,详见后续报道。

参考文献

[1] 尹成胜, 徐作军. 间质性肺疾病研究进展[J]. 中国实用内科杂志, 2024, 44(6): 441 - 445, 456.

[2] GLASS D S, GROSSFELD D, RENNA H A, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: Current and future treatment[J]. Clinical Respiratory J, 2022, 16(2): 84 - 96.

[3] HEUKELS P, MOOR C C, VON DER THÜSEN J H, et al. Inflammation and immunity in IPF pathogenesis and treatment[J]. Respir Med, 2019, 147: 79 - 91.

[4] HE Y, SUN M M, ZHANG G G, et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy[J]. Sig Transduct Target Ther, 2021, 6: 425.

[5] YANG D P, CHEN X, WANG J J, et al. Dysregulated lung commensal bacteria drive interleukin - 17B production to promote pulmonary fibrosis through their outer membrane vesicles[J]. Immunity, 2019, 50(3): 692 - 706.

[6] SHE Y X, YU Q Y, TANG X X. Role of interleukins in the pathogenesis of pulmonary fibrosis[J]. Cell Death Discov, 2021, 7: 52.

[7] NIE Y J, WU S H, XUAN Y H, et al. Role of IL - 17 family cytokines in the progression of IPF from inflammation to fibrosis[J]. Military Med Res, 2022, 9: 21.

[8] RITZMANN F, LUNDING L P, BALS R, et al. IL - 17 cytokines and chronic lung diseases[J]. Cells, 2022, 11(14): 2132.

[9] LIU A, ZHU Y Y, CHEN W P, et al. PTEN dual lipid - and protein - phosphatase function in tumor progression[J]. Cancers, 2022, 14(15): 3666.

[10] TU M J, WEI T, JIA Y F, et al. Molecular mechanisms of alveolar epithelial cell senescence and idiopathic pulmonary fibrosis: a narrative review[J]. J Thorac Dis, 2023, 15(1): 186 - 203.

[11] CARNERO A, BLANCO - APARICIO C, RENNER O, et al. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2008, 8(3): 187 - 198.

[12] MARAT A L, HAUCKE V. Phosphatidylinositol 3 - phosphates—at the interface between cell signalling and membrane traffic[J]. EMBO J, 2016, 35(6): 561 - 579.

[13] 金泓宇, 王丹丹, 宋昕怡, 等. 雷公藤红素通过调控 Ezrin 的活化改善特应性皮炎[J]. 中国药理学通报, 2024, 40(10): 1921 - 1930.

[14] 池宏宇, 姚雪敏, 张国鑫, 等. 肥胖与抑郁共病小鼠模型建立及在雷公藤红素药效药理研究中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(14): 81 - 91.

[15] 荆紫琪, 王雪, 闫天月, 等. 靶向叶酸受体和线粒体的载雷公藤红素 PAMAM 纳米递药系统构建及体外抗炎作用[J]. 药学学报, 2023, 58(3): 550 - 559.

[16] HUANG E Y, PENG N, XIAO F, et al. The roles of immune cells in the pathogenesis of fibrosis[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(15): 5203.

[17] FAN J W, REN M, CHEN W W, et al. Celastrol relieves myocardial infarction - induced cardiac fibrosis by inhibiting NLRP3 inflammasomes in rats[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 121: 110511.

[18] MECOZZI L, MAMBRINI M, RUSCITTI F, et al. *In - vivo* lung fibrosis staging in a bleomycin - mouse model: a new micro - CT guided densitometric approach[J]. Sci Rep, 2020, 10: 18735.

[19] GUL A, YANG F Y, XIE C, et al. Pulmonary fibrosis model of mice induced by different administration methods of bleomycin[J]. BMC Pulm Med, 2023, 23(1): 91.

[20] RUWANPURA S M, THOMAS B J, BARDIN P G. Pirfenidone: molecular mechanisms and potential clinical applications in lung disease[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2020, 62(4): 413 - 422.

[21] TEPEDE A, YOGARATNAM D. Nintedanib for idiopathic pulmonary fibrosis[J]. J Pharm Pract, 2019, 32(2): 199 - 206.

[22] LI T H, GAO X J, JIA R, et al. Astragaloside IV inhibits idiopathic pulmonary fibrosis through activation ofautophagy by miR - 21 - mediated PTEN/PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. Cell Mol Biol (Noisy - le - grand), 2024, 70(2): 128 - 136.

[23] 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.

[24] KOUDSTAAL T, WIJSENBEEK M S. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. La Presse Médicale, 2023, 52(3): 104166.

[25] LIU G, PHILP A M, CORTE T, et al. Therapeutic targets in lung tissue remodelling and fibrosis[J]. Pharmacol Ther, 2021, 225: 107839.

[26] MERCER P F, WOODCOCK H V, ELEY J D, et al. Exploration of a potent PI_3 kinase/mTOR inhibitor as a novel anti - fibrotic agent in IPF[J]. Thorax, 2016, 71(8): 701 - 711.

[27] YANG J, NIE J, MA X L, et al. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 26.

[28] 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.

[29] HADDADI N, LIN Y G, TRAVIS G, et al. PTEN/PTENP1: 'Regulating the regulator of RTK - dependent PI3K/Akt signalling', new targets for cancer therapy[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 37.

[30] TIAN Y Q, LI H, QIU T, et al. Loss of PTEN induces lung fibrosis *via* alveolar epithelial cell senescence depending on NF - κB activation[J]. Aging Cell, 2019, 18: e12858.

[31] NADERALI E, KHAKI A A, RAD J S, et al. Regulation and modulation of PTEN activity[J]. Mol Biol Rep, 2018, 45(6): 2869 - 2881.

[32] CAI B R, YANG L, DO JUNG Y, et al. PTEN: an emerging potential target for therapeutic intervention in respiratory diseases[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 4512503.

[33] MARGARIA J P, MORETTA L, ALVES - FILHO J C, et al. PI3K signaling in mechanisms and treatments of pulmonary fibrosis following sepsis and acute lung injury[J]. Biomedicines, 2022, 10(4): 756.

雷公藤红素对 PTEN 介导 PI3K/PKB 信号通路改善特发性肺纤维化的实验研究

(正文见 91 – 96 页)

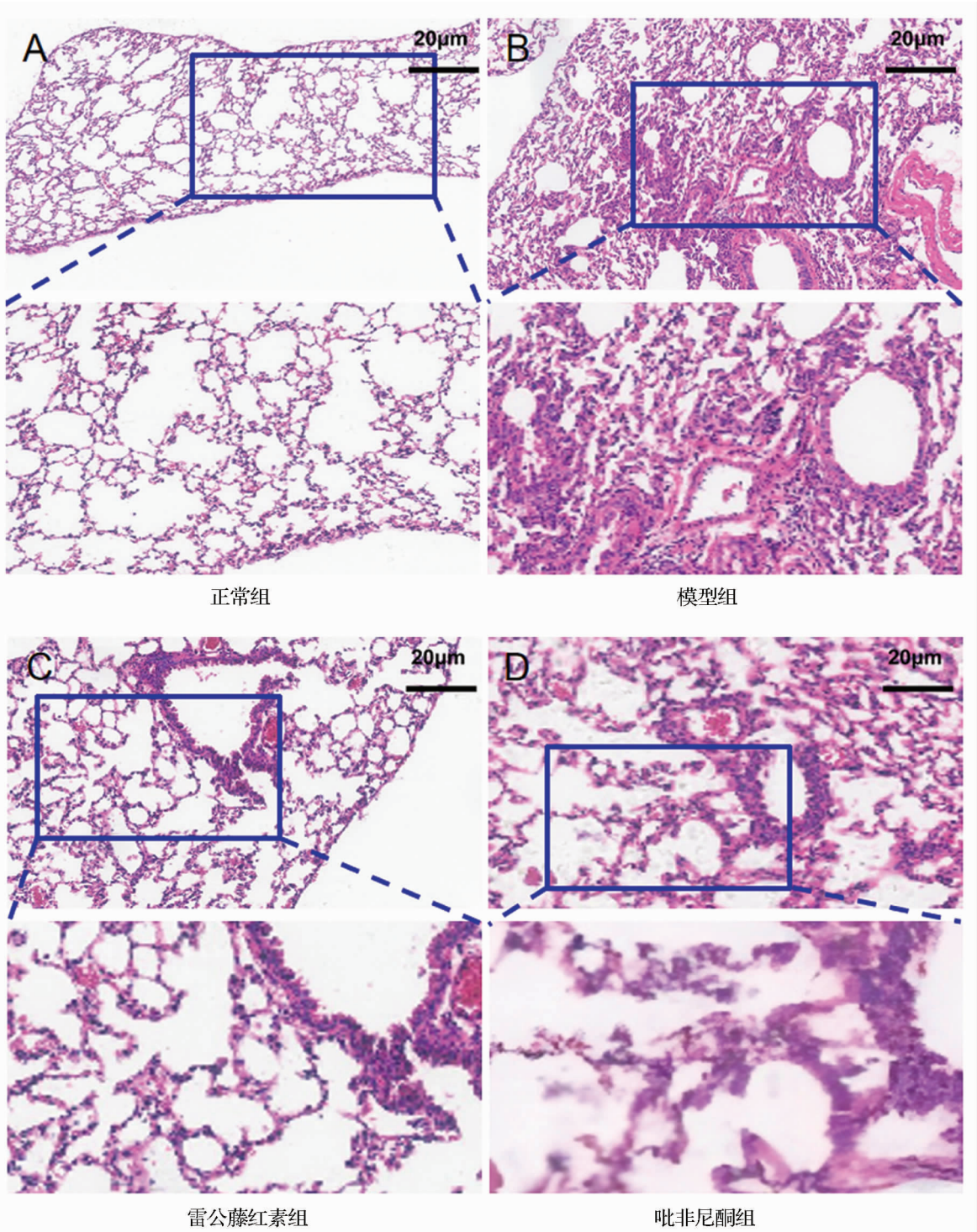


图 1 雷公藤红素对 IPF 小鼠肺组织病理形态的影响(HE 染色,40 ×)

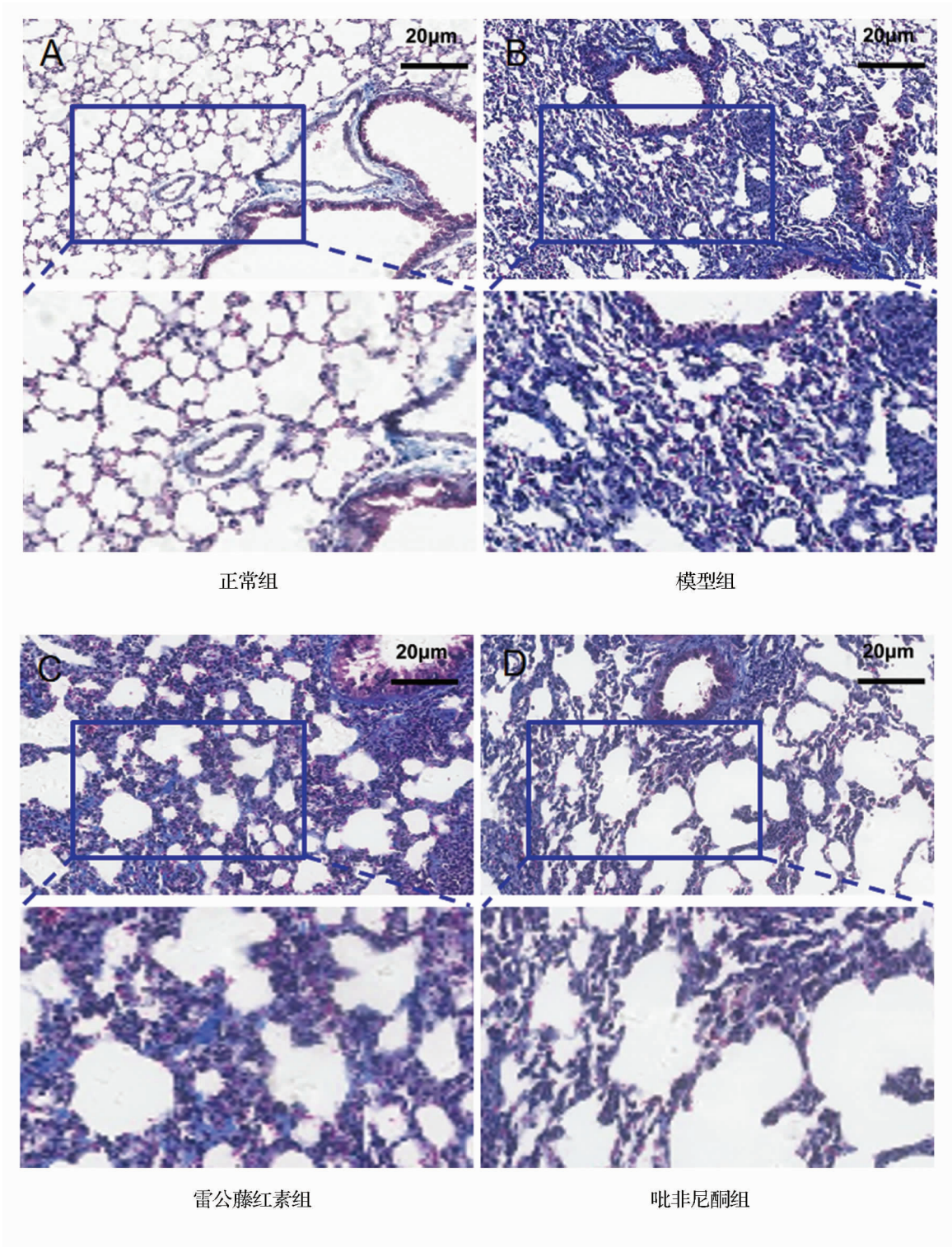


图 2　雷公藤红素对 IPF 小鼠肺组织胶原沉积的影响(Masson 染色,40 ×)

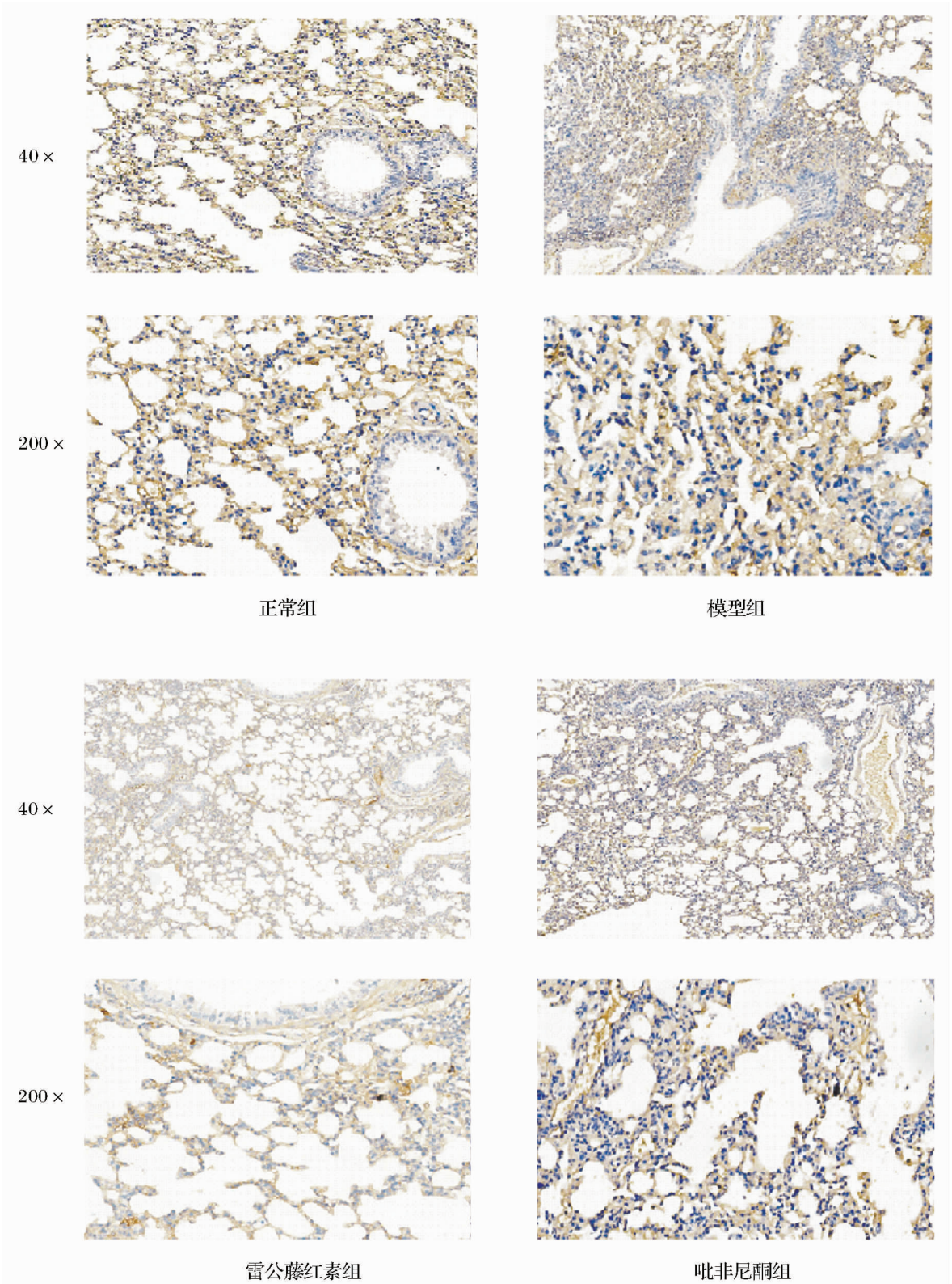


图 4 雷公藤红素对小鼠肺泡及肺间质中 I 型胶原蛋白表达的影响(IHC,40×,200×)

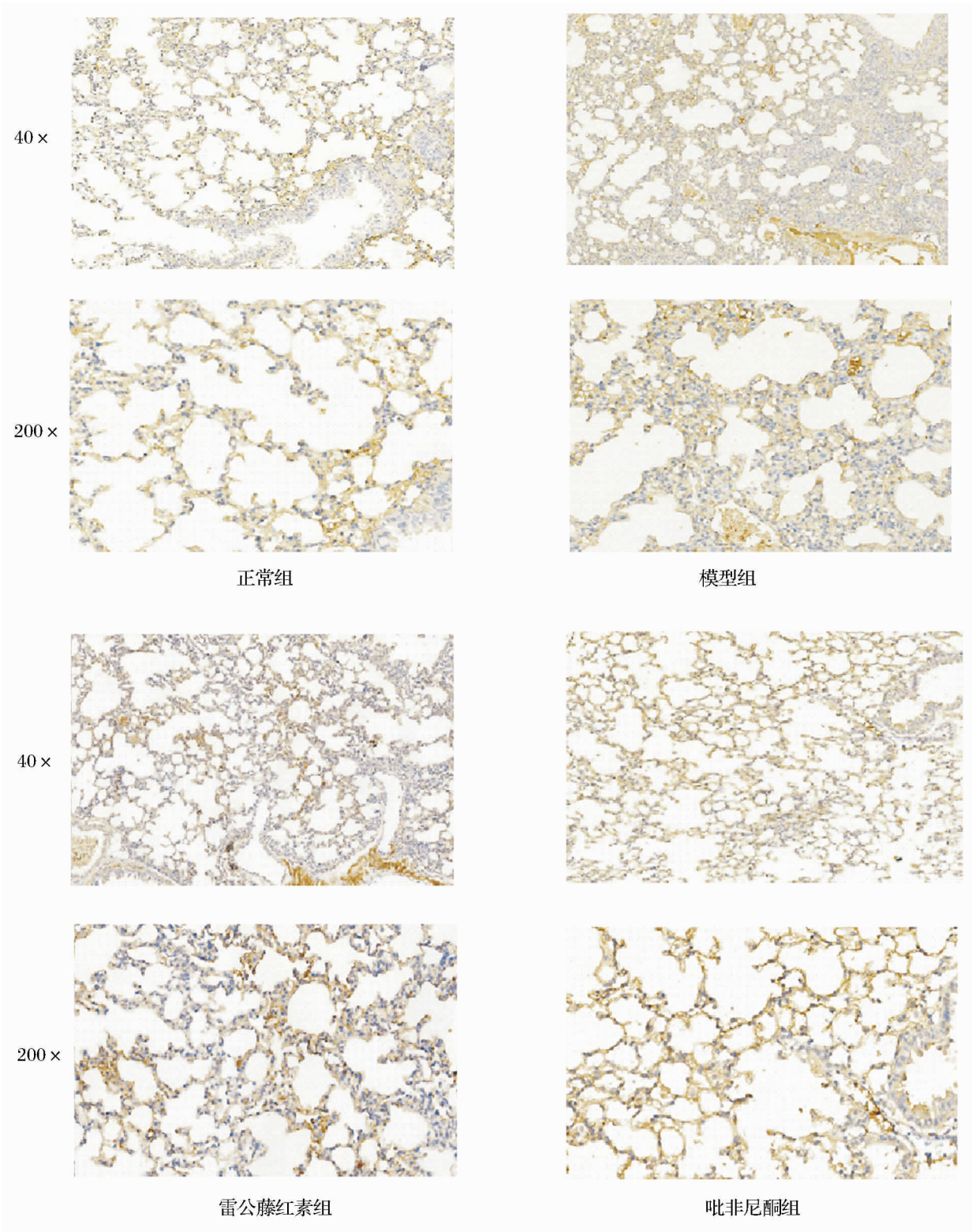


图 5 雷公藤红素对小鼠肺泡及肺间质中 PTEN 蛋白表达的影响(IHC,40×,200×)