

引用本文:陈宝磊,高映春,吴磊.枇杷叶提取物通过激活磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B信号通路减轻脂多糖诱导的肺细胞损伤[J].安徽医药,2022,26(3):453-457.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.03.007.



◇ 药学研究 ◇

## 枇杷叶提取物通过激活磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B信号通路减轻脂多糖诱导的肺细胞损伤

陈宝磊,高映春,吴磊

作者单位:辽阳市中心医院重症医学科,辽宁 辽阳 111000

**摘要:** 目的 探讨枇杷叶提取物对脂多糖(LPS)诱导的人Ⅱ型肺泡上皮细胞A549增殖、凋亡及氧化应激的影响及其可能作用机制。方法 2019年6月至2020年7月,采用LPS诱导的A549细胞建立肺损伤模型(LPS组),同时将正常培养的细胞作为对照组。不同剂量(1 mg/L、2 mg/L、4 mg/L)的枇杷叶提取物处理细胞(LPS+枇杷叶-L组、LPS+枇杷叶-M组、LPS+枇杷叶-H组),添加磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路抑制剂LY294002与枇杷叶提取物处理细胞(LPS+枇杷叶-H+LY294002组);采用MTT法检测细胞增殖;采用流式细胞术检测细胞凋亡率;采用2,4-二硝基苯肼显色法检测乳酸脱氢酶(LDH)的含量;采用黄嘌呤氧化酶法检测超氧化物歧化酶(SOD)的含量;采用硫代巴比妥酸法检测丙二醛的含量;蛋白质印迹法(Western blotting)检测磷酸化磷脂酰肌醇-3-激酶(p-PI3K)、磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X(Bax)蛋白蛋白表达量。结果 与对照组比较,LPS组吸光度[(1.38±0.06)比(0.55±0.02)]及SOD的含量[(81.66±5.36)U/L比(14.65±1.06)U/L]降低,凋亡率[(6.41±0.25)%比(27.43±1.00)%]、Bax蛋白水平及LDH[(242.86±6.09)U/L比(875.92±15.01)U/L]、丙二醛[(121.55±3.17)μmol/g比(424.46±6.48)μmol/g]的含量升高,Bcl-2、p-PI3K[(0.60±0.04)比(0.13±0.01)]、p-Akt[(0.51±0.04)比(0.09±0.01)]蛋白水平降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与LPS组比较,LPS+枇杷叶-M组、LPS+枇杷叶-H组吸光度[(0.55±0.02)比(0.86±0.03)、(1.18±0.05)]及SOD[(14.65±1.06)U/L比(36.84±2.08)U/L、(70.97±3.03)U/L]的含量升高,凋亡率[(27.43±1.00)%比(22.24±0.81)%、(14.78±0.49)%]、Bax蛋白水平及LDH[(875.92±15.01)U/L比(641.95±9.81)U/L、(365.47±7.02)U/L]、丙二醛[(424.46±6.48)μmol/g比(277.94±6.90)μmol/g、(156.30±3.26)μmol/g]的含量降低,Bcl-2、p-PI3K[(0.13±0.01)比(0.32±0.01)、(0.54±0.03)]、p-Akt[(0.09±0.01)比(0.25±0.02)、(0.42±0.03)]蛋白水平升高,均差异有统计学意义( $P<0.05$ );添加LY294002可明显逆转枇杷叶提取物对LPS诱导的A549细胞增殖、凋亡及氧化应激的作用。结论 枇杷叶提取物可通过激活PI3K/Akt信号通路减轻LPS诱导的A549细胞增殖抑制、凋亡和氧化应激效应,为探究枇杷叶治疗细菌感染引起的急性肺损伤提供依据。

**关键词:** 急性肺损伤; 枇杷叶提取物; 磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B信号通路; 脂多糖; A549细胞; 增殖; 凋亡

### Extract of loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl] leaves reduces LPS-induced cell damage in a lung injury model by activating PI3K/Akt signaling pathway

CHEN Baolei,GAO Yingchun,WU Lei

Author Affiliation: Intensive Care Unit, Liaoyang Central Hospital, Liaoyang, Liaoning 111000, China

**Abstract:** **Objective** To explore the effect of extract of loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl] leaves on the proliferation, apoptosis and oxidative stress of human type II alveolar epithelial cells A549 induced by lipopolysaccharide (LPS) and its possible mechanism. **Methods** LPS-induced A549 cells were used to establish a lung injury model (LPS group) from June 2019 to July 2020, and conventionally cultured cells were used as controls. Different doses of extract of loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl] leaves (1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L) were used to treat cells (LPS+loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl] leaves-L group, LPS+loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl] leaves-M group, and LPS+loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl] leaves-H group). Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway inhibitor LY294002 was added with the extract of loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl] leaves to treat cells (LPS+loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl] leaves-H+LY294002 group). The MTT method was used to detect cell proliferation. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate. The 2,4-dinitrophenylhydrazine color method was used to detect the content of lactate dehydrogenase (LDH). Xanthine oxidase method was used to detect the content of superoxide dismutase (SOD). The thiobarbituric acid method was used to detect the content of malondialdehyde (MDA). Western blotting method was used to detect the protein expressions in phosphorylated phosphatidylinositol-3-kinase (p-PI3K), phosphorylated protein kinase B (p-Akt), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), and Bcl-2-related X protein (Bax). **Results** Compared with the control group, the optical density (OD) value [(1.38±0.06) vs. (0.55±0.02)] and the content of SOD [(81.66±5.36) U/L vs. (14.65±1.06) U/L] were decreased, the apoptosis rate [(6.41±

0.25)% vs. (27.43±1.00)%], the protein level of Bax, the contents of LDH [(242.86±6.09) U/L vs. (875.92±15.01) U/L] and MDA [(121.55±3.17) μmol/g vs. (424.46±6.48) μmol/g] were increased, and the protein levels of Bcl-2, p-PI3K [(0.60±0.04) vs. (0.13±0.01)], p-Akt [(0.51±0.04) vs. (0.09±0.01)] were decreased in the LPS group; the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). Compared with the LPS group, in the LPS+loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl] leaves-M group, LPS+loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl] leaves-H group OD values [(0.55±0.02) vs. (0.86±0.03)/(1.18±0.05)] and the contents of SOD [(14.65±1.06) U/L vs. (36.84±2.08) U/L/(70.97±3.03) U/L] were increased, the apoptosis rate [(27.43±1.00)% vs. (22.24±0.81)/(14.78±0.49)%], the protein level of Bax, the contents of LDH [(875.92±15.01) U/L vs. (641.95±9.81) U/L/(365.47±7.02) U/L] and MDA [(424.46±6.48) μmol/g vs. (277.94±6.90) μmol/g/(156.30±3.26) μmol/g] were decreased, and the protein levels of Bcl-2, p-PI3K [(0.13±0.01) vs. (0.32±0.01)/(0.54±0.03)], p-Akt [(0.09±0.01) vs. (0.25±0.02)/(0.42±0.03)] were increased; the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). Addition of LY294002 could significantly reverse the effects of extract of loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl] leaves on the proliferation, apoptosis and oxidative stress of A549 cells induced by LPS. **Conclusion** Extract of loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl] leaves could reduce the proliferation inhibition, apoptosis and oxidative stress of LPS-induced A549 by activating the PI3K/Akt signaling pathway, providing a basis for exploring the treatment of acute lung injury caused by bacterial infection with loquat leaves.

**Key words:** Acute lung injury; Extract of loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl] leaves; PI3K/Akt signaling pathway; Lipopolysaccharide; A549 cells; Proliferation; Apoptosis

急性肺损伤是一种感染、创伤等重症疾病诱发的肺部炎症及通透性增加综合征,其主要病理特征为肺泡毛细血管损伤、肺水肿、肺不张等。目前急性肺损伤发病机制尚未阐明,发病率逐年上升。脂多糖(LPS)引起的急性肺损伤是导致病人死亡的重要原因之一,LPS属于革兰阴性杆菌细胞外膜成分之一,因而如何抑制LPS诱导的肺损伤是提高治疗效果的重要环节<sup>[1]</sup>。许多天然植物提取物具有抗炎、抗氧化等作用,并可用于抗肺损伤,例如,桑白皮水提取物、百合固金汤、黄原腐酚可减轻LPS诱导的急性损伤<sup>[2-4]</sup>。枇杷属于蔷薇科植物,三萜酸类等是其活性成分,研究表明枇杷叶提取物具有抗炎、抗氧化等作用<sup>[5]</sup>。但关于其对急性肺损伤的治疗效果及可能作用机制尚未阐明。磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路在多种疾病发生过程中发挥调控作用,信号通路活化后可减轻LPS诱导的急性肺损伤<sup>[6]</sup>。因此,本研究于2019年6月至2020年7月采用LPS诱导的A549细胞建立肺损伤模型,探讨枇杷叶提取物对LPS诱导的A549细胞增殖、凋亡及氧化应激的影响,探究其对PI3K/Akt信号通路的调控作用。

## 1 材料与方法

**1.1 材料与试剂** 人II型肺泡上皮细胞A549购自美国ATCC细胞库;PI3K/Akt信号通路抑制剂LY294002购自美国Selleck Chemicals公司;枇杷叶购自亳州市绅枫堂药业有限公司;DMEM培养基购自美国Gibco公司;噻唑蓝(MTT)试剂购自上海信帆生物科技有限公司;膜联蛋白V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(FITC)/碘化丙啶(PI)双染法细胞凋亡检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛检测试

剂盒购自南京建成生物工程研究所;兔抗人磷酸化磷脂酰肌醇-3-激酶(p-PI3K)、磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)抗体购自美国Abcam公司;兔抗人B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体购自美国CST公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗购自武汉博士德生物工程有限公司。HM-SY96酶标仪购自山东食安生物科技有限公司;FACS Calibur流式细胞仪购自美国BD公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验分组** 枇杷叶提取物<sup>[7]</sup>:称取50 g枇杷叶,研磨成粉状,加入70%乙醇溶解,55 °C超声波提取1 h(料液比1:10),过滤后重复提取滤渣1次,合并两次滤液,应用旋转蒸发器抽取真空减压回收,精密称取提取物适量,加入二甲基亚砷溶液中溶解,制备浓度为10 g/L的母液,根据实验需求稀释浓度为1 mg/L、2 mg/L、4 mg/L的溶液。

A549细胞置于含10%胎牛血清的DMEM培养液中,于培养箱内继续培养24 h后分别加入含有浓度为10 g/L LPS的培养液干预24 h<sup>[8]</sup>,记为LPS组。同时将正常培养的细胞作为对照组。分别加入含有不同浓度(1 mg/L、2 mg/L、4 mg/L)的枇杷叶提取物与含有浓度为10 g/L LPS的培养液干预24 h,分别记为LPS+枇杷叶-L组、LPS+枇杷叶-M组、LPS+枇杷叶-H组。后续实验中添加PI3K/Akt信号通路抑制剂LY294002处理细胞,分别加入含浓度为40 μmol/L LY294002<sup>[9]</sup>、4 mg/L枇杷叶提取物与10 g/L LPS的培养液干预24 h,记为LPS+枇杷叶-H+LY294002组。

**1.2.2 MTT检测细胞增殖** 取对数生长期A549细胞接种于96孔板(5×10<sup>3</sup>个/孔),按照“1.2.1”分组处理后,于培养箱内继续培养24 h,加入MTT试剂(20

微升/孔),于37℃、体积分数5%二氧化碳培养箱继续培养4h后弃上清,加入二甲基亚砜(150微升/孔),充分混匀后室温振荡孵育5min,应用酶标仪检测各孔吸光度。

**1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡率** 取各组A549细胞加入预冷PBS洗涤后弃上清,随后在细胞沉淀中加入500μL Binding Buffer,分别加入5μL Annexin V-FITC与5μL PI,充分混匀后孵育10min,于1h内应用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

**1.2.4 检测SOD、LDH、丙二醛的含量** 取各组A549细胞培养上清液,采用2,4-二硝基苯肼显色法检测LDH的含量,严格按照试剂盒说明书进行操作。采用反复冻融法裂解细胞,用黄嘌呤氧化酶法检测SOD的含量,用硫代巴比妥酸法检测丙二醛的含量,严格按照试剂盒说明书进行操作。

**1.2.5 蛋白质印迹法(Western blotting)检测Bax、Bcl-2、p-PI3K、p-Akt蛋白表达** 取各组A549细胞加入400μL RIPA裂解液提取细胞总蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度后蛋白变性,SDS-PAGE电泳反应分离蛋白,转移至PVDF膜(分离的蛋白凝胶)后进行封闭2h(5%脱脂奶粉),孵育一抗稀释液(1:1000)24h(4℃)后洗涤,孵育二抗稀释液(1:5000)1h(室温)后使用等渗缓冲液洗涤,暗室内曝光显影后应用ImageJ软件分析各条带灰度值。

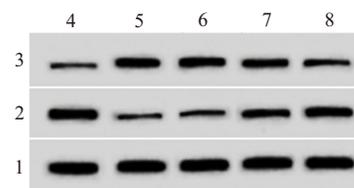
**1.3 统计学方法** 采用SPSS 21.0统计学软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示且均符合正态分布,两组间比较采用两独立样本 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 枇杷叶提取物对LPS诱导A549细胞活性的影响** 以下五组吸光度比较, $F=263.62, P < 0.001$ 。与对照组( $1.38 \pm 0.06$ )比较,LPS组( $0.55 \pm 0.02$ )吸光度降低( $P < 0.05$ );与LPS组比较,LPS+枇杷叶-L组( $0.56 \pm 0.02$ )吸光度差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),LPS+枇杷叶-M组( $0.86 \pm 0.03$ )、LPS+枇杷叶-H组( $1.18 \pm 0.05$ )吸光度升高( $P < 0.05$ ),且LPS+枇杷叶-H

组吸光度高于LPS+枇杷叶-M组( $P < 0.05$ )。

**2.2 枇杷叶提取物对LPS诱导A549凋亡的影响** 与对照组比较,LPS组凋亡率升高,Bax蛋白水平升高,Bcl-2蛋白水平降低(均 $P < 0.05$ );与LPS组比较,LPS+枇杷叶-M组、LPS+枇杷叶-H组凋亡率降低,Bax蛋白水平降低,Bcl-2蛋白水平升高,且LPS+枇杷叶-M组、LPS+枇杷叶-H组各指标间比较均差异有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。见图1、表1。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)蛋白;3—Bcl-2相关X(Bax)蛋白;4—对照组;5—LPS组;6—LPS+枇杷叶-L组;7—LPS+枇杷叶-M组;8—LPS+枇杷叶-H组。

图1 枇杷叶提取物对脂多糖(LPS)诱导的人II型肺泡上皮细胞A549凋亡蛋白表达的影响

表1 枇杷叶提取物对脂多糖(LPS)诱导的人II型肺泡上皮细胞A549凋亡的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	凋亡率/%	Bcl-2蛋白	Bax蛋白
对照	9	6.41±0.25	0.83±0.04	0.13±0.01
LPS	9	27.43±1.00 <sup>①</sup>	0.16±0.01 <sup>①</sup>	0.70±0.04 <sup>①</sup>
LPS+枇杷叶-L	9	27.33±0.90	0.17±0.01	0.70±0.04
LPS+枇杷叶-M	9	22.24±0.81 <sup>②③</sup>	0.36±0.02 <sup>②③</sup>	0.47±0.04 <sup>②③</sup>
LPS+枇杷叶-H	9	14.78±0.49 <sup>②③④</sup>	0.69±0.03 <sup>②③④</sup>	0.24±0.02 <sup>②③④</sup>
F值		440.50	450.34	192.37
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:Bcl-2为B细胞淋巴瘤-2,Bax为Bcl-2相关X。

①与对照组相比, $P < 0.05$ 。②与LPS组相比, $P < 0.05$ 。③与LPS+枇杷叶-L组相比, $P < 0.05$ 。④与LPS+枇杷叶-M组相比, $P < 0.05$ 。

**2.3 枇杷叶提取物对LPS诱导A549氧化应激的影响** 与对照组比较,LPS组SOD的含量降低,LDH、丙二醛的含量升高;与LPS组比较,LPS+枇杷叶-M组、LPS+枇杷叶-H组SOD的含量升高,LDH、丙二醛的含量降低(均 $P < 0.05$ ),见表2。

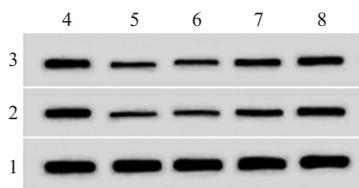
表2 枇杷叶提取物对脂多糖(LPS)诱导的人II型肺泡上皮细胞A549氧化应激的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	SOD/(U/L)	LDH/(U/L)	丙二醛/(μmol/g)
对照	9	81.66±5.36	242.86±6.09	121.55±3.17
LPS	9	14.65±1.06 <sup>①</sup>	875.92±15.01 <sup>①</sup>	424.46±6.48 <sup>①</sup>
LPS+枇杷叶-L	9	14.64±1.11	874.62±13.69	424.21±7.55
LPS+枇杷叶-M	9	36.84±2.08 <sup>②③</sup>	641.95±9.81 <sup>②③</sup>	277.94±6.90 <sup>②③</sup>
LPS+枇杷叶-H	9	70.97±3.03 <sup>②③④</sup>	365.47±7.02 <sup>②③④</sup>	156.30±3.26 <sup>②③④</sup>
F值		329.66	2115.63	1839.89
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:SOD为超氧化物歧化酶,LDH为乳酸脱氢酶。

①与对照组相比, $P < 0.05$ 。②与LPS组相比, $P < 0.05$ 。③与LPS+枇杷叶-L组相比, $P < 0.05$ 。④与LPS+枇杷叶-M组相比, $P < 0.05$ 。

**2.4 枇杷叶提取物对 LPS 诱导 A549 中 PI3K/Akt 信号通路的影响** 与对照组比较, LPS 组 p-PI3K、p-Akt 蛋白水平降低; 与 LPS 组比较, LPS+枇杷叶-M 组、LPS+枇杷叶-H 组 p-PI3K、p-Akt 蛋白水平升高 (均  $P < 0.05$ ), 见图 2、表 3。



注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH); 2—磷酸化蛋白激酶B(p-Akt); 3—磷酸化磷脂酰肌醇-3-激酶(p-PI3K); 4—对照组; 5—LPS 组; 6—LPS+枇杷叶-L 组; 7—LPS+枇杷叶-M 组; 8—LPS+枇杷叶-H 组。

**图 2** 枇杷叶提取物对脂多糖(LPS)诱导的人 II 型肺泡上皮细胞 A549 磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路的影响

**表 3** 枇杷叶提取物对脂多糖(LPS)诱导的人 II 型肺泡上皮细胞 A549 磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	p-PI3K	p-Akt
对照	9	0.60±0.04	0.51±0.04
LPS	9	0.13±0.01 <sup>①</sup>	0.09±0.01 <sup>①</sup>
LPS+枇杷叶-L	9	0.12±0.01	0.09±0.01
LPS+枇杷叶-M	9	0.32±0.01 <sup>②③</sup>	0.25±0.02 <sup>②③</sup>
LPS+枇杷叶-H	9	0.54±0.03 <sup>②③④</sup>	0.42±0.03 <sup>②③④</sup>
F 值		268.50	175.74
P 值		<0.001	<0.001

注: p-PI3K 为磷酸化磷脂酰肌醇-3-激酶, p-Akt 为磷酸化蛋白激酶 B。

①与对照组相比,  $P < 0.05$ 。②与 LPS 组相比,  $P < 0.05$ 。③与 LPS+枇杷叶-L 组相比,  $P < 0.05$ 。④与 LPS+枇杷叶-M 组相比,  $P < 0.05$ 。

**2.5 LY294002 对枇杷叶提取物处理的 LPS 诱导 A549 细胞活性和凋亡的作用** 与 LPS+枇杷叶-H 组

**表 4** 磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路抑制剂 LY294002 可逆转枇杷叶提取物对脂多糖(LPS)诱导的人 II 型肺泡上皮细胞 A549 活性和凋亡的作用/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	吸光度	凋亡率/%	Bcl-2	Bax
LPS+枇杷叶-H	9	1.18±0.05	14.87±0.50	0.39±0.03	0.24±0.02
LPS+枇杷叶-H+LY294002	9	0.65±0.03	24.50±0.87	0.25±0.02	0.63±0.04
t 值		15.74	16.62	6.72	15.10
P 值		<0.001	<0.001	0.003	<0.001

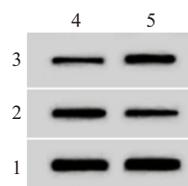
注: Bcl-2 为 B 细胞淋巴瘤-2, Bax 为 Bcl-2 相关 X。

**表 5** 磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路抑制剂 LY294002 可逆转枇杷叶提取物对脂多糖(LPS)诱导的人 II 型肺泡上皮细胞 A549 氧化应激的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	SOD/(U/L)	LDH/(U/L)	丙二醛/( $\mu\text{mol/g}$ )
LPS+枇杷叶-H	9	71.00±3.41	367.40±6.53	156.90±4.08
LPS+枇杷叶-H+LY294002	9	23.09±1.59	765.60±11.36	376.09±7.28
t 值		22.06	52.64	45.49
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: SOD 为超氧化物歧化酶, LDH 为乳酸脱氢酶。

比较, LPS+枇杷叶-H+LY294002 组吸光度降低, 凋亡率升高, Bax 蛋白水平升高, Bcl-2 蛋白水平降低 (均  $P < 0.05$ ), 见图 3、表 4。



注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH); 2—Bcl-2 相关 X(Bax) 蛋白; 3—Bcl-2 相关 X(Bax) 蛋白; 4—LPS+枇杷叶-H 组; 5—LPS+枇杷叶-H+LY294002 组。

**图 3** 磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路抑制剂 LY294002 可逆转枇杷叶提取物对脂多糖(LPS)诱导的人 II 型肺泡上皮细胞 A549 凋亡蛋白表达的影响

**2.6 LY294002 对枇杷叶提取物处理的 LPS 诱导 A549 细胞氧化应激的影响** 与 LPS+枇杷叶-H 组比较, LPS+枇杷叶-H+LY294002 组 SOD 的含量降低, LDH、丙二醛的含量升高 (均  $P < 0.05$ ), 见表 5。

### 3 讨论

急性肺损伤是临床常见的一种急危重症, 中药在治疗急性肺损伤方面具有一定作用, 黄酮类樱草素可改善 LPS 诱导的急性肺损伤<sup>[10]</sup>。黄芪素通过诱导血红素加氧酶-1 减轻脂多糖诱导的大鼠急性肺损伤<sup>[11]</sup>。但其对急性肺损伤的作用机制尚未阐明。

枇杷叶提取物具有抗炎、抗病毒等作用, 并可保护心脑血管, 但关于其作用机制尚未阐明<sup>[12]</sup>。本研究结果显示, A549 细胞经 LPS 诱导后细胞活力降低, 而枇杷叶提取物可明显提高细胞活力, 且显示剂量依赖关系, 随着枇杷叶提取物剂量增加细胞活力明显提高, 提示枇杷叶提取物可解除 LPS 诱导的

A549细胞增殖抑制。Bcl-2属于抗凋亡蛋白, Bax属于促凋亡蛋白, 其表达水平升高可激活线粒体途径从而诱导细胞凋亡<sup>[13]</sup>。本研究结果显示, LPS诱导的A549细胞凋亡率升高, 并可促进Bax表达及抑制Bcl-2表达, 枇杷叶提取物可明显降低细胞凋亡率, 并可抑制Bax表达及促进Bcl-2表达, 提示枇杷叶提取物可明显抑制LPS诱导的A549细胞凋亡, 且呈剂量依赖性。活性氧可诱导支气管上皮细胞释放炎症因子从而诱导肺组织炎症反应, 还可造成线粒体膜损伤而引起细胞凋亡, SOD可清除氧自由基从而减轻机体氧化损伤, 丙二醛是脂质过氧化的中间产物, 并可作为脂质过氧化的指标, LDH含量升高可引起氧化损伤<sup>[14]</sup>。本研究结果显示, LPS诱导的A549细胞中SOD的含量降低, LDH、丙二醛的含量升高, 而枇杷叶提取物可明显提高SOD的含量及降低LDH、丙二醛的含量, 且枇杷叶提取物不同剂量氧化应激指标间比较差异有统计学意义, 提示枇杷叶提取物可抑制LPS诱导的A549细胞氧化应激从而抑制细胞凋亡。

甘草酸通过活化PI3K/AKT/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)途径改善LPS诱导的急性肺损伤<sup>[15]</sup>。人参皂苷Rg3可通过激活PI3K/AKT/mTOR途径减轻LPS诱导的急性肺损伤<sup>[16]</sup>。PI3K/AKT信号通路活化可抑制急性肺损伤中细胞凋亡、内质网应激和炎症反应<sup>[17]</sup>。PI3K/AKT信号通路激活剂SC79可减轻d-Gal/LPS诱导的肝损伤<sup>[18]</sup>。本研究结果显示, LPS诱导的A549细胞中p-PI3K、p-Akt蛋白水平降低, 枇杷叶提取物可明显提高p-PI3K、p-Akt蛋白水平, 且呈剂量依赖性, 提示枇杷叶提取物可能通过激活PI3K/Akt信号通路从而减轻LPS诱导的急性肺损伤。同时本研究结果显示, 添加PI3K/Akt信号通路抑制剂LY294002后可明显降低LPS诱导A549细胞活力, 提高细胞凋亡率, 并可降低SOD的含量及提高LDH、丙二醛的含量, 提示抑制PI3K/Akt信号通路可明显逆转枇杷叶提取物对LPS诱导A549细胞增殖、凋亡及氧化应激的作用。

综上所述, 枇杷叶提取物可以对LPS诱导的A549细胞的增殖、凋亡及氧化应激产生影响, 而PI3K/Akt信号通路活化同样可抑制急性肺损伤中细胞凋亡、内质网应激等, 因此推测枇杷叶提取物可以通过PI3K/Akt信号通路对肺损伤中细胞凋亡等进程产生治疗作用。枇杷叶提取物可通过激活PI3K/Akt信号通路而解除LPS诱导的A549细胞增殖抑制及氧化应激引起的细胞凋亡, 减轻LPS诱导的细胞损伤, 为进一步揭示枇杷叶提取物治疗急性肺损伤的分子机制提供依据。

## 参考文献

- [1] 张慧, 于澎, 张楠, 等. 毛蕊花糖苷对内毒素诱导的急性肺损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(3): 41-43.
- [2] 张天柱, 姚金福, 赵雷, 等. 桑白皮水提液对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤的保护作用研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(3): 577-579.
- [3] 张敏, 许成辰, 徐婷贞, 等. 基于Nrf2/Keap1/p62信号通路探讨百合固金汤对LPS诱导的小鼠急性肺损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15): 77-82.
- [4] LV H, LIU Q, WEN Z, et al. Xanthohumol ameliorates lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury via induction of AMPK/GSK3 $\beta$ -Nrf2 signal axis[J]. Redox Biol, 2017, 12(1): 311-324.
- [5] 黄素华, 陈彤, 邱丰艳, 等. 枇杷叶不同成分抗氧化和止咳祛痰活性研究[J]. 湖北农业科学, 2019, 58(12): 138-140, 146.
- [6] 张娟娟, 胡仕祥, 李华, 等. 川芎嗪对内毒素诱导的急性肺损伤大鼠肺纤维化和炎症反应的调节作用[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(3): 259-264.
- [7] 朱敏芳, 张捷, 冯丽, 等. 枇杷叶提取物对中性粒细胞弹性蛋白酶抑制作用[J]. 中成药, 2017, 39(1): 177-180.
- [8] 胡小勇, 周发春. 川芎嗪抑制LPS诱导的人II型肺泡上皮细胞炎症反应[J]. 基础医学与临床, 2017, 37(6): 839-844.
- [9] 雷璐璐, 王珊, 刘苗, 等. PI3K/AKT信号通路在SK-N-SH细胞中对增殖和分化的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2015, 40(8): 1089-1094.
- [10] BITTENCOURT-MERNAK MI, PINHEIRO NM, SANTANA FP, et al. Prophylactic and therapeutic treatment with the flavonone sakuranetin ameliorates LPS-induced acute lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017, 312(2): L217-L230.
- [11] ZHENG D, LIU D, LIU N, et al. Astragaloside reduces lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats via induction of heme oxygenase-1[J]. Arch Pharm Res, 2019, 42(8): 704-711.
- [12] 廖圆圆, 王燕新, 郭晓农, 等. 枇杷叶总黄酮提取及体外抗氧化的研究[J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2020, 41(1): 60-64.
- [13] 池明, 高玲, 吴巍巍, 等. 黄连素对脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤和炎症的改善作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2018, 44(6): 1194-1199, 后插2.
- [14] 杨敏华, 姚友杰, 王娟. 姜油酮通过激活Nrf2通路减轻LPS诱导的小鼠急性肺损伤[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2020, 41(1): 150-156.
- [15] QU L, CHEN C, HE W, et al. Glycyrrhizic acid ameliorates LPS-induced acute lung injury by regulating autophagy through the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(4): 2042-2055.
- [16] YANG J, LI S, WANG L, et al. Ginsenoside Rg3 attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via MerTK-dependent activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 00850. DOI: 10.3389/fphar.2018.00850.
- [17] LUO X, LIN B, GAO Y, et al. Genipin attenuates mitochondrial-dependent apoptosis, endoplasmic reticulum stress, and inflammation via the PI3K/AKT pathway in acute lung injury[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 76: 105842. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105842.
- [18] JING ZT, LIU W, XUE CR, et al. AKT activator SC79 protects hepatocytes from TNF- $\alpha$ -mediated apoptosis and alleviates d-Gal/LPS-induced liver injury[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2019, 316(3): G387-G396.

(收稿日期: 2020-10-13, 修回日期: 2021-01-25)