

贝母素乙对肺炎链球菌诱导肺泡上皮细胞损伤的影响及机制^Δ

张睿^{1*}, 李翠红¹, 王有琴¹, 关君艳^{2#} [1. 湖北医药学院附属随州医院(随州市中心医院)儿科, 湖北随州 441300; 2. 湖北文理学院附属襄阳市中心医院儿科, 湖北襄阳 441021]

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)07-0820-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.07.09



摘要 **目的** 探究贝母素乙(PEI)调节伏隔核Ras相关的C3肉毒素底物1(Rac1)/蛋白激酶B(Akt)/核因子κB(NF-κB)信号通路对肺炎链球菌(SP)诱导肺泡上皮细胞损伤的影响。**方法** 取人肺泡上皮细胞HPAEPiC, 随机分为对照组(Control组), SP组(1×10^8 cfu/mL的SP菌液), PEI低、中、高浓度组(1×10^8 cfu/mL的SP菌液+0.05、0.10、0.20 mmol/L的PEI)和PEI高浓度+Akt通路激活剂组(1×10^8 cfu/mL的SP菌液+0.20 mmol/L的PEI+10 μmol/L的SC79)。除Control组外, 其余各组细胞均以SP菌液和(或)相应药液处理。24 h后, 检测各组细胞上清液中炎症因子(白细胞介素6、18、1β)水平、细胞氧化应激指标[乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、活性氧(ROS)]含量、凋亡率和增殖/凋亡相关蛋白[周期蛋白依赖性激酶1(CDK1)、B细胞淋巴瘤2相关X蛋白(Bax)]、通路相关蛋白(Rac1、Akt及磷酸化Akt、NF-κB及磷酸化NF-κB)的表达情况。**结果** 与Control组比较, SP组细胞上清液中炎症因子水平, LDH、ROS含量, 凋亡率, Bax、Rac1蛋白的表达和Akt、NF-κB蛋白的磷酸化水平均显著升高或上调, SOD含量、CDK1蛋白的表达均显著降低或下调($P < 0.05$)。与SP组比较, PEI各浓度组上述指标均显著改善, 且呈浓度依赖性($P < 0.05$); 而SC79可显著逆转高浓度PEI的改善作用($P < 0.05$)。**结论** PEI可以减轻SP诱导的肺泡上皮细胞炎症和氧化应激损伤, 抑制细胞凋亡, 上述作用可能是通过抑制Rac1/Akt/NF-κB信号通路而实现的。

关键词 贝母素乙; 肺炎链球菌; 肺泡上皮细胞; Rac1/Akt/NF-κB信号通路

Effects of peiminine B on *Streptococcus pneumoniae*-induced alveolar epithelial cell injury and its mechanism

ZHANG Rui¹, LI Cuihong¹, WANG Youqin¹, GUAN Junyan² [1. Dept. of Pediatrics, Suizhou Hospital Affiliated to Hubei Medical College (Suizhou Central Hospital), Hubei Suizhou 441300, China; 2. Dept. of Pediatrics, Xiangyang Central Hospital Affiliated to Hubei University of Arts and Sciences, Hubei Xiangyang 441021, China]

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effects of peiminine B (PEI) on *Streptococcus pneumoniae* (SP)-induced alveolar epithelial cell injury by regulating the Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 in nucleus accumbens (Rac1)/protein kinase B (Akt)/nuclear factor κB (NF-κB) signaling pathway. **METHODS** Human alveolar epithelial cells (HPAEPiC) were taken and randomly divided into the Control group, SP group (1×10^8 cfu/mL SP bacterial solution), low-, medium-, and high-concentration PEI groups (1×10^8 cfu/mL SP bacterial solution+0.05, 0.10, 0.20 mmol/L PEI), and high-concentration PEI+Akt activator group (P-H+SC79 group, 1×10^8 cfu/mL SP bacterial solution+0.20 mmol/L PEI+10 μmol/L SC79). Except for the Control group, the other groups of cells were treated with SP bacterial solution and/or corresponding drug solution. After 24 h of treatment, the levels of inflammatory factors (interleukin-6, -18, -1β) in the supernatant solution, the contents of oxidative stress indexes [lactate dehydrogenase (LDH), reactive oxygen species (ROS) and superoxide dismutase (SOD)], apoptosis rate, as well as the expressions of proliferation/apoptosis-related proteins [cyclin-dependent kinase 1 (CDK1), B cell lymphoma-2 related X protein (Bax)] and pathway-related proteins (Rac1, Akt, phosphorylated Akt, NF-κB and phosphorylated NF-κB) were detected in each group. **RESULTS** Compared with the Control group, the levels of inflammatory factors in supernatant solution, LDH and ROS contents, apoptosis rate, the protein expressions of Bax and Rac1 and the phosphorylation levels of Akt and NF-κB in the SP group were significantly increased or up-regulated, while SOD content and the protein expression of CDK1 were significantly decreased or down-regulated ($P < 0.05$). Compared with the SP group, the above indexes in PEI groups

Δ 基金项目 湖北省卫生健康委科研立项项目(No. WJ2019-AB008)

* 第一作者 主治医师, 硕士。研究方向: 儿科呼吸疾病的基础与临床。E-mail: ziguyun@163.com

通信作者 副主任医师, 硕士。研究方向: 儿科呼吸疾病的基础与临床。E-mail: xwqdc83@163.com

were significantly improved in a concentration-dependent manner ($P<0.05$). SC79 could significantly reverse the improvement effect of the high concentration of PEI ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** PEI can alleviate SP-induced inflammation and oxidative stress damage of alveolar epithelial cells and inhibit apoptosis, which may be achieved by inhibiting Rac1/Akt/NF- κ B signaling pathway.

KEYWORDS peiminine B; *Streptococcus pneumoniae*; alveolar epithelial cells; Rac1/Akt/NF- κ B signaling pathway

肺部上皮细胞由肺泡上皮细胞(alveolar epithelial cells, AEC)组成,可为交换气体、隔离吸入的异物以及调节水和离子的传输提供场所,是肺稳态环境的关键组成部分;此外,AEC作为保护性机械屏障,可防止病原体吸入,降低由促炎因子、病原体等所致细菌性肺炎和急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的发生风险^[1]。肺炎球菌性肺炎是最常见的细菌性肺炎类型,通常会引发剧烈的炎症反应,从而危及患者生命^[2]。肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, SP)是一种革兰氏阳性菌,侵入机体后,其可从鼻咽扩散到肺部,从而诱发细菌性肺炎。SP感染患者主要表现为肠寒、发热、咳嗽、呼吸困难,并可进展为急性呼吸衰竭、脓毒性休克、多器官衰竭,甚至死亡^[3]。临床实践显示,细菌性肺炎的治疗常受到抗菌药物耐药性的影响,因此探索有效缓解SP致肺炎的新型药物十分重要。

贝母素乙(peiminine B, PEI)是贝母属药用植物的主要有效成分。研究指出,除具有抗炎活性外,PEI还可直接保护炎症性疾病中的AEC、骨细胞等,这种保护作用可能与增加细胞对肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等炎症因子的耐受性,从而抑制细胞凋亡有关^[4];此外,PEI可减轻脂多糖诱导的小鼠ALI和炎症反应,并减弱磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)和蛋白激酶B(protein kinase B, 又称Akt)的磷酸化水平,抑制核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)的活性^[5],但PEI对AEC损伤影响的具体分子机制尚不明确。激活的伏隔核Ras相关的C3肉毒素底物1(Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 in nucleus accumbens, Rac1)在启动炎症相关通路Akt/NF- κ B的信号转导过程中发挥了重要作用,可通过激活上述信号通路来促进下游促炎介质的表达,而抑制该信号通路则可显著减轻机体的炎症反应^[6]。由此推测,Rac1/Akt/NF- κ B信号通路可能是PEI的作用靶点。本课题组前期预实验结果显示,PEI可能通过调控上述信号通路来影响肺炎等疾病的进展。基于此,本研究以人AEC(HPAEpiC细胞)作为对象,基于Rac1/Akt/NF- κ B信号通路,初步探索PEI对SP致AEC损伤的影响及潜在机制,以期对细菌性肺炎的临床治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Ox-101C型细胞培养箱(上海塔望智能科技有限公司)、CLARIOstar PLUS型酶标仪(德国BMG LABTECH公司)、K-IMC-900TFL型荧光显微镜(德国KOSTER公司)、DxFLEX型流式细胞仪[贝克曼库尔特国际贸易(上海)有限公司]、1645052型电泳仪(美国Bio-Rad公司)等。

1.2 主要药品与试剂

PEI对照品(批号SH8310,纯度 $\geq 98\%$)购自北京索莱宝科技有限公司;Akt通路激活剂SC79的对照品(批号LM2730-10mM,纯度 $\geq 98\%$)购自上海联迈生物工程有限公司;兔抗周期蛋白依赖性激酶1(cyclin-dependent kinase 1, CDK1)、B细胞淋巴瘤2相关X蛋白(B cell lymphoma-2 related X protein, Bax)、Rac1、磷酸化Akt(p-Akt)、Akt、磷酸化NF- κ B(p-NF- κ B)、NF- κ B、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(批号分别为CSB-PA005061LA01-HU、CSB-PA002573GA01HU、CSB-PA019242GA01HU、CSB-RA001553A450phHU、CSB-PA15905A0Rb、CSB-PA000579、CSB-PA10354A0Rb、CSB-PA01629A0Rb)均购自华美生物工程有限公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗(批号33501ES60)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、IL-18、IL-1 β 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为EH0201、AQ-H0205-B、EH0185)均购自武汉菲恩生物科技有限公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒(批号E1020-1)购自北京普利莱基因技术有限公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(批号50104ES60)购自翌圣生物(上海)股份有限公司;活性氧(reactive oxygen species, ROS)试剂盒(批号JGK217)购自上海经科化学科技有限公司;Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(批号YX-101409)购自上海亿修生物科技有限公司;DMEM培养基(批号A-CSH795-500mL)购自武汉佰瑞得生物技术有限公司。

1.3 细胞与菌株

人HPAEpiC细胞(批号HT-X2419)购自深圳市豪地

华拓生物科技公司;SP(批号BKJ4126)购自上海帛科生物技术有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养、分组与给药

将HPAEpiC细胞接种于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μg/mL的DMEM培养基中,于37℃、5%CO₂条件下培养(每2 d更换1次培养基),至对数生长期后进行后续实验。

取对数生长期的HPAEpiC细胞,随机分为对照组(Control组),SP组,PEI低、中、高浓度组(P-L、P-M、P-H组),PEI高浓度+Akt通路激活剂组(P-H+SC79组),每组设置6个复孔。除Control组(正常培养,不经任何处理)外,SP组细胞用1×10⁸ cfu/mL的SP菌液处理24 h^[7],PEI各浓度组细胞分别用0.05、0.10、0.20 mmol/L的PEI(浓度根据前期MTT实验确定)+1×10⁸ cfu/mL的SP菌液共同处理24 h,P-H+SC79组细胞用0.20 mmol/L的PEI+10 μmol/L的SC79^[8]+1×10⁸ cfu/mL的SP菌液共同处理24 h。

2.2 细胞上清液中炎症因子检测

采用ELISA法检测。取对数生长期的HPAEpiC细胞,按“2.1”项下方法分组、处理。24 h后,收集各组细胞培养液,离心,取上清液,按照相应试剂盒说明书方法操作,使用酶标仪检测细胞上清液中IL-6、IL-8、IL-1β水平。

2.3 细胞氧化应激指标检测

采用比色法检测细胞上清液中SOD、LDH含量。取对数生长期的HPAEpiC细胞,按“2.1”项下方法分组、处理。24 h后,收集各组细胞培养液,离心,取上清液,按照相应试剂盒说明书方法操作,使用酶标仪检测细胞上清液中SOD、LDH含量。

采用2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(2',7'-dichloro-fluorescein diacetate,DCFH-DA)荧光探针法检测细胞中ROS含量。取对数生长期的HPAEpiC细胞,按“2.1”方法分组、处理。24 h后,收集各组细胞,用胰酶消化,加入DMEM培养基终止消化并制备细胞悬液(细胞密度1×10⁶个/mL);取上述细胞悬液,离心;收集细胞,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,加入DCFH-DA探针,于室温下避光孵育30 min,离心;收集细胞,用PBS清洗2次后重悬,使用显微镜观察各组细胞的荧光变化情况并使用Image J软件分析其荧光强度,用以表示细胞中ROS含量。

2.4 细胞凋亡检测

采用双染法检测。取对数生长期的HPAEpiC细胞,按“2.1”项下方法分组、处理。24 h后,收集各组细胞,用

PBS清洗,再以binding buffer重悬、离心,调整细胞密度至1×10⁶个/mL。向细胞悬液中依次加入Annexin V-FITC溶液、PI溶液,混匀,避光孵育15 min。使用流式细胞仪检测,并采用FlowJo软件分析凋亡数据(流式图中,左上象限为坏死细胞,右上/下象限为凋亡细胞,左下象限为正常活细胞,凋亡率为右上/下象限凋亡细胞数占细胞总数的比例)。

2.5 细胞中增殖/凋亡、通路相关蛋白表达检测

用Western blot法检测。取对数生长期的HPAEpiC细胞,按“2.1”项下方法分组、处理。24 h后,以裂解液提取各组细胞的总蛋白,再以BCA法测定蛋白含量。将蛋白与缓冲液混合,于水浴中加热5 min变性。取变性蛋白适量,进行电泳分离并转膜,以脱脂奶粉封闭1 h;洗膜后,加入增殖/凋亡相关蛋白(CDK1、Bax)、通路相关蛋白(Rac1、p-Akt、Akt、p-NF-κB、NF-κB)、内参蛋白(β-actin)一抗(稀释比例分别为1:1 000、1:1 000、1:2 000、1:2 000、1:2 000、1:2 000、1:2 000、1:2 000),于4℃下孵育过夜;洗膜后,加入相应二抗(稀释比例为1:2 000),室温下孵育2 h;洗膜后,以ECL显色、成像。使用Image J软件,以β-actin为内参蛋白,分析各目的蛋白的表达水平,以p-Akt与Akt、p-NF-κB与NF-κB蛋白的表达水平比值表示Akt、NF-κB蛋白的磷酸化水平。

2.6 统计学方法

采用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用SNK-*q*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 PEI对SP诱导的HPAEpiC细胞上清液中炎症因子的影响

与Control组比较,SP组细胞上清液中IL-6、IL-8、IL-1β水平均显著升高($P<0.05$);与SP组比较,P-L、P-M、P-H组细胞上清液中IL-6、IL-8、IL-1β水平均显著降低,且呈浓度依赖性($P<0.05$);与P-H组比较,P-H+SC79组细胞上清液中IL-6、IL-8、IL-1β水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表1。

表1 各组细胞上清液中炎症因子比较($\bar{x} \pm s, n=6, \text{pg/mL}$)

组别	IL-6	IL-8	IL-1β
Control组	4.95±0.51	0.96±0.09	4.14±0.45
SP组	53.68±5.59 ^a	38.16±3.95 ^a	76.98±7.75 ^a
P-L组	43.72±4.76 ^b	30.52±3.13 ^b	65.34±6.61 ^b
P-M组	29.38±3.05 ^c	20.46±2.31 ^c	45.94±4.78 ^c
P-H组	18.73±1.91 ^{cd}	14.23±1.57 ^{cd}	33.62±3.47 ^{cd}
P-H+SC79组	35.42±3.37 ^e	25.08±2.63 ^e	52.95±5.38 ^e

a:与Control组比较, $P<0.05$;b:与SP组比较, $P<0.05$;c:与P-L组比较, $P<0.05$;d:与P-M组比较, $P<0.05$;e:与P-H组比较, $P<0.05$ 。

3.2 PEI对SP诱导的HPAEpiC细胞氧化应激指标的影响

与Control组比较,SP组细胞SOD含量显著降低,LDH、ROS含量均显著升高($P<0.05$);与SP组比较,P-L、P-M、P-H组细胞SOD含量均显著升高,LDH、ROS含量均显著降低,且呈浓度依赖性($P<0.05$);与P-H组比较,P-H+SC79组细胞SOD含量显著降低,LDH、ROS含量均显著升高($P<0.05$)。结果见表2、图1。

表2 各组细胞氧化应激指标比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	SOD/(ng/mL)	LDH/(U/L)	ROS/%
Control组	45.24±4.61	44.52±4.59	22.64±2.58
SP组	8.75±0.92 ^a	503.52±55.32 ^a	65.47±6.68 ^a
P-L组	15.43±1.67 ^b	437.21±46.75 ^b	54.28±5.52 ^b
P-M组	29.24±3.13 ^{bc}	324.59±36.98 ^{bc}	35.76±3.69 ^{bc}
P-H组	38.15±3.97 ^{bcd}	258.74±23.41 ^{bcd}	21.85±2.29 ^{bcd}
P-H+SC79组	24.08±2.56 ^c	385.06±41.26 ^c	43.14±4.55 ^c

a:与Control组比较, $P<0.05$;b:与SP组比较, $P<0.05$;c:与P-L组比较, $P<0.05$;d:与P-M组比较, $P<0.05$;e:与P-H组比较, $P<0.05$ 。

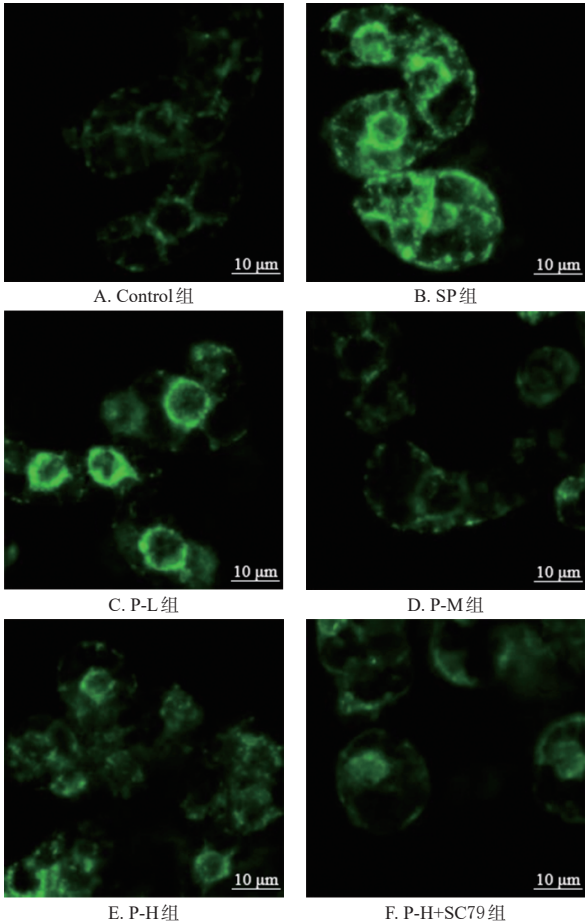


图1 PEI对SP诱导的HPAEpiC细胞中ROS含量影响的显微图

3.3 PEI对SP诱导的HPAEpiC细胞凋亡率及增殖/凋亡相关蛋白表达的影响

与Control组比较,SP组细胞的凋亡率显著升高

($P<0.05$);与SP组比较,P-L、P-M、P-H组细胞的凋亡率均显著降低,且呈浓度依赖性($P<0.05$);与P-H组比较,P-H+SC79组细胞凋亡率显著升高($P<0.05$)。结果见表3、图2。

表3 各组细胞凋亡率和增殖/凋亡相关蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	凋亡率/%	CDK1	Bax
Control组	2.36±0.25	1.13±0.11	0.23±0.02
SP组	38.64±3.96 ^a	0.26±0.02 ^a	1.04±0.10 ^a
P-L组	32.47±3.53 ^b	0.41±0.04 ^b	0.81±0.08 ^b
P-M组	24.25±2.64 ^{bc}	0.69±0.06 ^{bc}	0.62±0.06 ^{bc}
P-H组	18.72±1.96 ^{bcd}	0.87±0.08 ^{bcd}	0.35±0.03 ^{bcd}
P-H+SC79组	28.13±2.85 ^c	0.54±0.05 ^c	0.74±0.07 ^c

a:与Control组比较, $P<0.05$;b:与SP组比较, $P<0.05$;c:与P-L组比较, $P<0.05$;d:与P-M组比较, $P<0.05$;e:与P-H组比较, $P<0.05$ 。

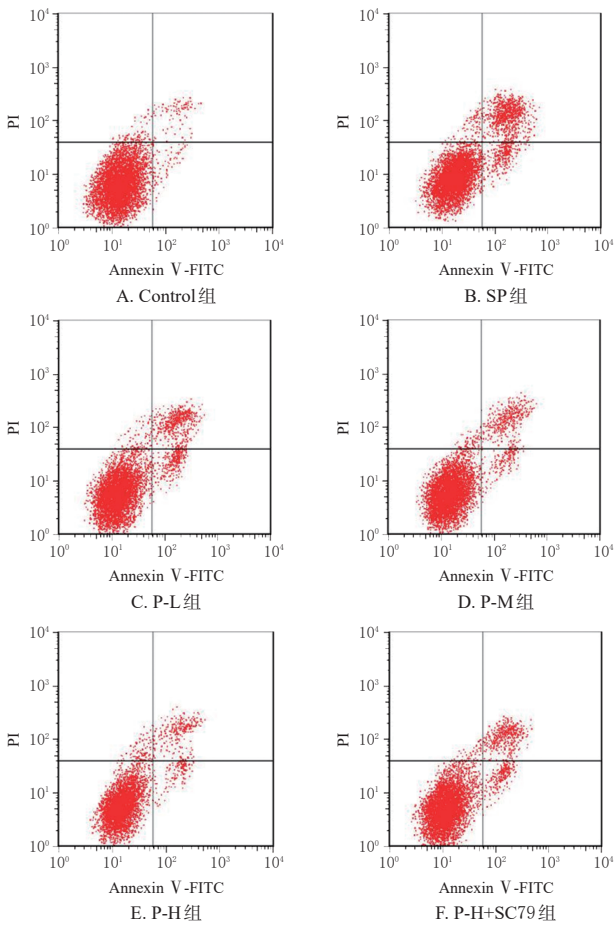
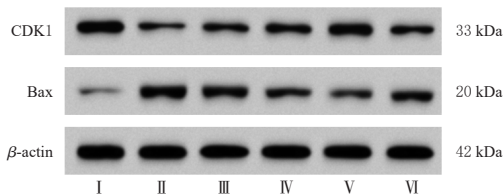


图2 PEI对SP诱导的HPAEpiC细胞凋亡影响的流式图

与Control组比较,SP组细胞中CDK1蛋白的表达显著下调,Bax蛋白的表达显著上调($P<0.05$);与SP组比较,P-L、P-M、P-H组细胞中CDK1蛋白的表达均显著上调,Bax蛋白的表达均显著下调,且呈浓度依赖性($P<0.05$);与P-H组比较,P-H+SC79组细胞中CDK1蛋白的表达显著下调,Bax蛋白的表达显著上调($P<0.05$)。结果见表3、图3。



I :Control组; II :SP组; III :P-L组; IV :P-M组; V :P-H组; VI :P-H+SC79组。

图3 PEI对SP诱导的HPAEpiC细胞增殖/凋亡相关蛋白表达影响的电泳图

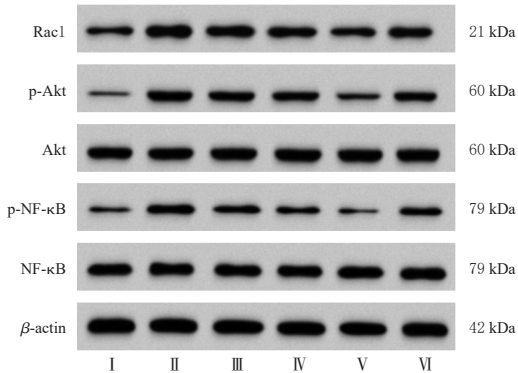
3.4 PEI对SP诱导的HPAEpiC细胞通路相关蛋白表达的影响

与Control组比较,SP组细胞中Rac1蛋白的表达和Akt、NF-κB蛋白的磷酸化水平均显著上调或升高($P<0.05$);与SP组比较,P-L、P-M、P-H组细胞中Rac1蛋白的表达和Akt、NF-κB蛋白的磷酸化水平均显著下调或降低,且呈浓度依赖性($P<0.05$);与P-H组比较,P-H+SC79组细胞中Rac1蛋白的表达和Akt、NF-κB蛋白的磷酸化水平均显著上调或升高($P<0.05$)。结果见表4、图4。

表4 各组细胞中通路相关蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	Rac1	p-Akt/Akt	p-NF-κB/NF-κB
Control组	0.33 ± 0.03	0.28 ± 0.02	0.21 ± 0.02
SP组	1.06 ± 0.10^a	0.90 ± 0.09^a	0.85 ± 0.08^a
P-L组	0.86 ± 0.08^b	0.72 ± 0.07^b	0.65 ± 0.06^b
P-M组	0.65 ± 0.06^{bc}	0.54 ± 0.05^{bc}	0.44 ± 0.04^{bc}
P-H组	0.42 ± 0.04^{bcd}	0.38 ± 0.03^{bcd}	0.27 ± 0.02^{bcd}
P-H+SC79组	0.71 ± 0.07^c	0.63 ± 0.06^c	0.54 ± 0.05^c

a:与Control组比较, $P<0.05$;b:与SP组比较, $P<0.05$;c:与P-L组比较, $P<0.05$;d:与P-M组比较, $P<0.05$;e:与P-H组比较, $P<0.05$ 。



I :Control组; II :SP组; III :P-L组; IV :P-M组; V :P-H组; VI :P-H+SC79组。

图4 PEI对SP诱导的HPAEpiC细胞通路相关蛋白表达影响的电泳图

4 讨论

SP是一种革兰氏阳性致病菌,常在动物或人鼻咽部定植,可导致细菌性肺炎。SP在世界范围内迅速传播,老年人、儿童或免疫功能低下人群是该菌的易感人群^[9]。

该菌具有侵入肺组织并激活上皮细胞炎症反应的能力,可破坏肺泡毛细血管屏障,但其致肺损伤的具体机制十分复杂,尚未被完全阐明^[9]。细菌性肺炎的治疗往往受到抗菌药物耐药性的影响,因此寻找有效药物减轻SP诱导的肺损伤、降低患者死亡率至关重要。

研究指出,炎症因子包括TNF-α、IL-1β、IL-6等,其中TNF-α、IL-1β可诱导肺中性粒细胞蓄积并促进包括IL-6在内的其他炎症因子的释放^[10]。大量的促炎介质可进一步引发强烈的免疫反应,使巨噬细胞过度激活,从而产生以IL-1β为代表的炎症因子,最终加重机体炎症反应^[11]。研究显示,细菌感染发生时,机体内的主要效应分子是ROS,过度的ROS积累会诱发氧化应激,从而进一步参与介导炎症细胞募集和炎症级联反应,最终导致组织损伤^[10]。本研究结果显示,经SP诱导后,细胞上清液中IL-6、IL-8、IL-1β、LDH水平/含量和细胞中ROS含量均较Control组显著升高,上清液中SOD含量较Control组显著降低,说明SP可导致AEC出现ROS过度积累,使炎症因子分泌增加,从而引发炎症反应和氧化应激损伤。

现代药理学研究表明,PEI具有镇痛、抗炎和抗肿瘤等生物活性,还可松弛平滑肌^[12]。PEI能够显著抑制促炎因子(如TNF-α、IL-6和IL-1β)的分泌,增加抗炎因子(如IL-10)的表达,并抑制脂多糖诱导的炎症介质的产生;同时,PEI还可抑制A549细胞中IL-8的产生,并可抑制NF-κB信号通路的激活、减少脂多糖诱导的Akt蛋白的磷酸化^[5,13]。本研究结果显示,用低、中、高浓度的PEI处理SP诱导的HPAEpiC细胞后,细胞的凋亡率均显著降低,增殖相关蛋白CDK1的表达显著上调,凋亡相关蛋白Bax的表达显著下调,SOD含量显著升高,ROS和LDH含量均显著降低,IL-6、IL-8、IL-1β分泌均显著减少,且上述作用呈浓度依赖性,说明PEI可抑制AEC凋亡,降低其炎症水平,减轻氧化应激损伤,初步证实了PEI的抗炎及抗氧化应激作用。

有学者发现,抑制Rac1/Akt/NF-κB信号通路可减轻炎症反应和氧化应激损伤,进而改善脓毒症大鼠的肠损伤^[14]。NF-κB是位于Akt蛋白下游的重要炎症信号通路,其被激活后可加重机体炎症反应,与多种炎症性疾病(如肺炎、炎症性肠病、乳腺炎等)的发生发展密切相关;此外,NF-κB的激活可促进炎症介质的表达,包括炎症因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)和促炎蛋白酶,抑制NF-κB蛋白的磷酸化是有效缓解肺部疾病相关症状的潜在靶点^[11]。当炎症发作时,Akt蛋白的磷酸化水平明显升高,进而诱导炎症因子及促炎蛋白酶表达的增加^[11]。据报

道,Rac1/Akt/NF- κ B 信号通路可能是药物改善急性肺炎模型大鼠炎症反应的潜在靶点^[15]。本研究结果显示,经 SP 诱导后,HPAEpiC 细胞中 Rac1 蛋白的表达显著上调,Akt、NF- κ B 蛋白的磷酸化水平均显著升高;经低、中、高浓度 PEI 处理后,细胞中 Rac1 蛋白的表达呈浓度依赖性下调,Akt、NF- κ B 蛋白的磷酸化水平呈浓度依赖性降低,提示 PEI 减轻 SP 诱导的肺组织炎症和氧化应激损伤的作用可能与抑制 Rac1/Akt/NF- κ B 信号通路有关。为验证上述假设,本研究以高浓度 PEI 联合 Akt 通路激活剂 SC79 对 HPAEpiC 细胞进行了干预,结果显示,PEI 对细胞的保护作用被 SC79 显著逆转,提示 PEI 可能通过抑制 Rac1/Akt/NF- κ B 信号通路来改善 SP 诱导的 AEC 损伤。

综上所述,PEI 可减轻 SP 诱导的 AEC 炎症和氧化应激损伤,抑制细胞凋亡,上述作用可能是通过抑制 Rac1/Akt/NF- κ B 信号通路而实现的。然而,本研究仅通过细胞实验对 PEI 的保护作用及机制进行了初步探究,尚需体内实验进一步探究。

参考文献

- [1] SUL C, LEWIS C, DEE N, et al. Release of extracellular superoxide dismutase into alveolar fluid protects against acute lung injury and inflammation in *Staphylococcus aureus* pneumonia[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2023, 324(4): L445-L455.
- [2] GOU X M, XU W C, LIU Y S, et al. IL-6 prevents lung macrophage death and lung inflammation injury by inhibiting GSDME- and GSDMD-mediated pyroptosis during pneumococcal pneumosepsis[J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(2): e0204921.
- [3] MA D B, ZHANG H, WANG X L, et al. METTL3 aggravates cell damage induced by *Streptococcus pneumoniae* via the NEAT1/CTCF/MUC19 axis[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2024, 40(8): 722-731.
- [4] QIU Q W, GENG Z J, WANG L, et al. Peiminine ameliorates Crohn's disease-like colitis by enhancing the function of the intestinal epithelial barrier through Nrf2/HO1 signal[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 136: 112380.
- [5] DU B X, CAO L, WANG K, et al. Peiminine attenuates acute lung injury induced by LPS through inhibiting lipid rafts formation[J]. Inflammation, 2020, 43(3): 1110-1119.
- [6] ZHANG Q, LI J Y, ZHONG H X, et al. The mechanism of nicotinamide on reducing acute lung injury by inhibiting MAPK and NF- κ B signal pathway[J]. Mol Med, 2021, 27(1): 115.
- [7] 范彩霞, 张宗林, 伏瑶, 等. 金合欢素通过调节 Sirt1 介导的 AMPK/Nrf2 信号通路改善肺炎链球菌感染引起的肺泡上皮细胞损伤[J]. 中国免疫学杂志, 2024, 40(3): 513-518.
- [8] 高智波, 刘娟, 刘毓岫, 等. 乙酰半胱氨酸通过激活 PI3K/AKT 信号通路抑制脂多糖诱导的肺泡上皮细胞活力降低和炎症反应[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2023, 32(3): 229-235.
- [9] CHEN Z Q, ZHENG B J, ZHANG Z W, et al. Protective role of FBXL19 in *Streptococcus pneumoniae*-induced lung injury in pneumonia immature mice[J]. J Cardiothorac Surg, 2023, 18(1): 92.
- [10] KONG L M, DENG J, ZHOU X, et al. Sitagliptin activates the p62-Keap1-Nrf2 signaling pathway to alleviate oxidative stress and excessive autophagy in severe acute pancreatitis-related acute lung injury[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(10): 928.
- [11] KAN X C, CHEN Y S, HUANG B X, et al. Effect of Palrnatine on lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting activation of the Akt/NF- κ B pathway[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2021, 22(11): 929-940.
- [12] CHA S J, KIM S S, SHIN J H, et al. Peiminine exerts its anti-acne effects by regulating the NF- κ B pathway[J]. Antioxidants (Basel), 2024, 13(1): 131.
- [13] CHEN Z K, ZHAO D, FENG S X, et al. Pharmacodynamics and cellular uptake of peimine and peiminine in inflammatory model non-small-cell lung cancer epithelial cells (A549)[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 2946201.
- [14] 张树柳, 刘瑞瑞, 陈玉刚, 等. 隐丹参酮调节 Rac1/AKT/NF- κ B 信号通路对脓毒症大鼠肠损伤的影响[J]. 河北医学, 2024, 30(10): 1597-1603.
- [15] LIU H L, WANG W P, SHEN W Y, et al. ARHGAP24 ameliorates inflammatory response through inactivating Rac1/Akt/NF- κ B pathway in acute pneumonia model of rat[J]. Ann Transl Med, 2020, 8(20): 1289.

(收稿日期: 2024-09-13 修回日期: 2025-02-06)

(编辑: 张元媛)