

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.24.005

文章编号: 1005-8982 (2024) 24-0029-07

实验研究·论著

LY294002 干预对哮喘小鼠 M2 巨噬细胞极化及气道炎症的机制研究*

李丽蔚, 陈慧雯, 胡芳茴, 梁伯灯, 杨霞

(广西医科大学第一附属医院 全科医学科, 广西 南宁 530021)

摘要: **目的** 探讨LY294002干预对哮喘小鼠M2巨噬细胞极化及气道炎症的机制研究。**方法** 将24只雄性BALB/C小鼠随机分为空白对照组、哮喘模型组、LY294002组、地塞米松组,每组6只。采用腹腔注射卵清蛋白致敏及雾化吸入激发法复制小鼠哮喘模型,连续7d腹腔注射给药后,观察小鼠肺组织中气道炎症、杯状细胞增生情况,酶联免疫吸附试验检测血清免疫球蛋白E(IgE)、白细胞介素-4(IL-4)、IL-25及支气管肺泡灌洗液中炎症细胞分类计数,实时荧光聚合酶链反应检测肺组织炎症因子IL-4、IL-13、IL-25R及M2标志物ARG-1、Ym-1 mRNA表达,Western blotting检测肺组织PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt及M2标志物CD206蛋白表达。**结果** 哮喘模型组小鼠的支气管肺泡灌洗液中细胞总数、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞均较空白对照组高($P < 0.05$),巨噬细胞较空白对照组低($P < 0.05$);LY294002组、地塞米松组细胞总数、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞比例均较哮喘模型组低($P < 0.05$),巨噬细胞较哮喘模型组高($P < 0.05$)。哮喘模型组血清IgE、IL-4和IL-25水平均较空白对照组高($P < 0.05$),LY294002组、地塞米松组血清IgE、IL-4和IL-25水平均较哮喘模型组低($P < 0.05$)。哮喘模型组ARG-1、YM-1、IL-4、IL-13、IL-25R mRNA相对表达量均较空白对照组高($P < 0.05$),LY294002组、地塞米松组ARG-1、YM-1、IL-4、IL-13、IL-25R mRNA相对表达量均较哮喘模型组低($P < 0.05$)。哮喘模型组p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、CD206蛋白相对表达量均较空白对照组高($P < 0.05$),LY294002组、地塞米松组p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、CD206蛋白相对表达量均较哮喘模型组低($P < 0.05$)。**结论** LY294002可显著减低哮喘小鼠肺部组织的M2极化,减轻哮喘小鼠的气道炎症作用,其作用机制可能与PI3K/Akt信号通路有关。

关键词: 哮喘; LY294002; M2巨噬细胞; PI3K/Akt信号通路

中图分类号: R562.25

文献标识码: A

Mechanism of LY294002 intervention on M2 macrophage polarization and airway inflammation in asthmatic mice*

Li Li-wei, Chen Hui-wen, Hu Fang-hui, Liang Bo-deng, Yang Xia

(Department of General Medicine, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of LY294002 intervention on M2 macrophage polarization and airway inflammation in asthmatic mice. **Methods** The 24 male BALB/c mice were randomly divided into the blank control group, the asthma model group, the LY294002 group, and the dexamethasone group, with 6 mice in each group. The asthma mouse model was established by sensitization through intraperitoneal injection of ovalbumin and provocation via aerosol inhalation. After 7 days of continuous intraperitoneal drug administration, the airway

收稿日期: 2024-08-07

* 基金项目: 广西研究生教育创新计划项目(No: JGY2023080)

[通信作者] 杨霞, E-mail: 358080924@qq.com; Tel: 15977724347

inflammation and goblet cell hyperplasia in the lung tissues of mice were observed. Serum immunoglobulin E (IgE), interleukin-4 (IL-4), and IL-25 were detected by ELISA, and inflammatory cell counts in bronchoalveolar lavage fluid were determined. Quantitative real-time polymerase chain reaction was used to detect the mRNA expressions of inflammatory factors IL-4, IL-13, and IL-25R, as well as M2 markers ARG-1 and Ym-1 in lung tissues. Western blotting was performed to detect the protein expressions of PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, and M2 marker CD206 in lung tissues. **Results** Compared with the blank control group, the asthma model group had a higher total number of cells and greater percentages of eosinophils, neutrophils and lymphocytes ($P < 0.05$), but a lower percentage of macrophages in bronchoalveolar lavage fluid ($P < 0.05$). The total number of cells and the percentages of eosinophils, neutrophils and lymphocytes were lower ($P < 0.05$), but the percentage of macrophage was higher in the LY294002 group and the dexamethasone group compared with the asthma model group ($P < 0.05$). The serum levels of IgE, IL-4 and IL-25 in the asthma model group were higher than those in the blank control group ($P < 0.05$), while they were lower in the LY294002 group and the dexamethasone group than in the asthma model group ($P < 0.05$). The relative mRNA expressions of ARG-1, YM-1, IL-4, IL-13 and IL-25R in the asthma model group were higher than those in the blank control group ($P < 0.05$), while they were lower in the LY294002 group and the dexamethasone group than in the asthma model group ($P < 0.05$). The relative protein expressions of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt and CD206 in the asthma model group were higher than those in the blank control group ($P < 0.05$), while they were lower in the LY294002 group and the dexamethasone group than in the asthma model group ($P < 0.05$). **Conclusions** LY294002 can significantly reduce the M2 polarization of lung tissues and alleviate airway inflammation in asthmatic mice, and its mechanism may be related to the PI3K/Akt signaling pathway.

Keywords: asthma; LY294002; M2 macrophage; PI3K/Akt signaling pathway

支气管哮喘是最常见的慢性非传染性疾病之一,其病理变化主要表现为气道炎症、气道重塑^[1]。哮喘可以主要分为嗜酸性粒细胞哮喘(过敏性哮喘、高Th2型哮喘)、中性粒细胞哮喘(Th1型哮喘),而哮喘的最主要和明确描述的表型是嗜酸性粒细胞性哮喘,占成人哮喘的50%以上。巨噬细胞是肺中最丰富的免疫细胞,根据功能将巨噬细胞分为两种亚型,即经典激活表型(M1型)主要发挥促炎活性,替代激活表型(M2型)主要发挥抑制免疫应答^[2]。研究表明,哮喘中存在M1/M2的免疫失衡,M2是过敏性哮喘的主要效应巨噬细胞^[3],通过靶向调节巨噬细胞M2型极化,可能在过敏性哮喘的治疗中具有较好治疗前景。PI3K/Akt信号通路可能在调节哮喘患者的炎症发生和气道重塑中发挥重要作用,拮抗PI3K/Akt信号通路可能是哮喘治疗干预的一种潜在策略^[4-5]。LY294002是一种特异性PI3K抑制剂,有数据表明,LY294002能够调节炎症、癌症的进展^[6-7],也有研究表明LY294002能够调控M2巨噬细胞极化抑制糖尿病小鼠伤口的愈合^[8]。LY294002是否通过PI3K/Akt信号通路表达调控M2巨噬细胞极化,改善嗜酸性粒细胞哮喘的气道炎症,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Balb/c 雄性小鼠购于斯贝福(北京)生物技术有

限公司,SPF级6~8周龄,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2024-0001,实验动物使用许可证号:SYXK(桂)2020-0004。小鼠于广西医科大学实验动物中心饲养,SPF屏障系统,温度(22 ± 2)℃,相对湿度60%~70%,保证通风,自由进食及饮水,动物实验通过广西医科大学动物伦理审查委员会批准(No:202405682)。

1.2 药物、试剂与仪器

卵清蛋白(Ovalbumin, OVA)(II、V级)、氢氧化铝凝胶、地塞米松均购自美国Cell Signaling Technology公司,PI3K抑制剂LY294002试剂(货号:HY-10108)购自美国MCE公司,苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE staining)、爱先蓝-糖原染色(Ai Xianlan-glycogen staining, AB-PAS staining)、兔抗Beta Actin抗体(货号GB15001)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司,瑞氏染色液购自北京博奥森生物技术有限公司、免疫球蛋白G(Immunoglobulin G, IgG)、白细胞介素-4(Interleukin-4, IL-4)、IL-25酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(货号分别为MM-0056M1、MM-0165M1、MM-1063M1)均购自武汉酶免生物科技有限公司,实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction,

qRT-PCR)引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司,逆转录试剂盒、SYBR[®] GREEN PCR Master Mix 均购自南宁阳光生物工程,兔抗 PI3K、P-PI3K、Akt、P-Akt 抗体(货号分别是 R22768、34468、R23412、310021)均购自成都正能生物技术有限责任公司,兔抗 CD206 抗体(货号 WL06177)购自沈阳万类生物科技有限公司,多功能酶标仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,电泳仪、170-4150 型转膜仪均购自美国 Bio-Rad 公司,G:BOXChemi XR5 型凝胶成像系统购自英国 SYNGENE 公司,正置荧光显微镜购自日本 Olympus 株式会社,自制雾化吸入箱等。

1.3 分组及给药

随机将小鼠分为空白对照组、哮喘模型组、LY294002 组、地塞米松组,每组 6 只。按照本课题组既往研究^[9]方法采用 OVA 致敏、激发来复制哮喘动物模型,除空白对照组外,其余组致敏阶段:在实验第 1、8 及 15 天采用腹腔注射 25 μg 鸡 OVA 和 1 mg 氢氧化铝(两者充分混匀于 0.2 mL 的 PBS 液中)。激发阶段:在实验第 22 天开始连续激发 1 周。将小鼠通过自制雾化箱进行雾化治疗,给予 2% OVA 磷酸盐缓冲液 20 mL 雾化吸入刺激,20 min/次,1 次/d,连续 7 d。空白对照组和哮喘模型组注射生理盐水。LY294002 组、地塞米松组分别于激发前 30 min 腹腔注射 1.5 mg/kg 的 LY294002 溶液和地塞米松溶液^[10]。

1.4 观察小鼠哮喘行为

观察各组小鼠在末次激发时有无表现出哮喘,呼吸有无咳嗽、气急等,毛发是否光泽及有无脱落等情况,小鼠的活泼度、对外界刺激的反应及小鼠大小便等情况。

1.5 标本取材

各组小鼠在末次激发后腹腔注射 1% 戊巴比妥麻醉处死,眼球取血,收集标本,使用 500 μL 冰 PBS 灌洗并收集支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF),沉淀后涂片行细胞分类、计数。收集肺组织,左上叶肺组织用组织固定液固定,下一步做常规病理检查;左下叶肺浸泡于 RNA 保存液、右肺叶织用 EP 管收集,置入 -80 °C 冰箱冷冻保存。

1.6 支气管肺泡灌洗液中炎症细胞计数

将收集的 BALF 细胞以 1 200 r/min 离心 5 min, 100 μL PBS 重悬,吸取 10 μL 进行细胞计数,行瑞士

吉姆萨染色,对每张玻片至少观察 200 个炎症细胞,根据细胞形态学和染色性质在光学显微镜下进行细胞分类(分嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞)。

1.7 小鼠肺组织病理组织学检查

通用组织固定液固定 24 h 后行 HE 染色、AB-PAS 染色。切片于正置显微镜下观察肺组织病理形态并进行图片采集分析。

1.8 ELISA 检测血清 IgE、IL-4、IL-25 水平

将血液以 3 000 r/min 离心 30 min,取上清液,分离管收集各组小鼠血清,实验步骤严格参照 ELISA 试剂盒说明书进行,采用酶标仪检测 450 nm 波长处各孔吸光度值,绘制标准品线性回归曲线,按曲线方程计算各样本浓度值,检测出各组小鼠血清 IgE、IL-4、IL-25 水平。

1.9 qRT-PCR 检测 ARG-1、YM-1、IL-4、IL-13、IL-25R mRNA 相对表达量

使用 TRIzol 试剂提取肺组织总 RNA,按照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA,荧光定量 PCR 系统扩增分析产物。反应条件:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,循环 40 次。以 GAPDH 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列	长度/ bp
GAPDH	正向: 5'-CATCACTGCCACCCAGAAGACTG-3'	23
	反向: 5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCCTTCAG-3'	23
ARG-1	正向: 5'-GAAGACAGCAGAGGAGGTAAGAG-3'	24
	反向: 5'-CTTGAGTTCCGAAGCAAGCCAAG-3'	23
YM-1	正向: 5'-ACTGGAATTGGTGCCCTAC-3'	26
	反向: 5'-GAGCCACTGAGCCTTCAACT-3'	26
IL-4	正向: 5'-GGTCTCAACCCAGCTAGT-3'	20
	反向: 5'-GCCGATGATCTCTCTCAAGTGAT-3'	23
IL-13	正向: 5'-CTTGCTTGCCTTGCTGCTC-3'	22
	反向: 5'-GGGGAGTCTGCTTCTGTGTGATG-3'	23
IL-25R	正向: 5'-GGCTGCCTAAACCACGTAATG-3'	21
	反向: 5'-CCCCTGAATGAGAATCGTGT-3'	21

1.10 Western blotting 检测 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、CD206 蛋白相对表达量

取冷冻保存于 -80 °C 冰箱的肺组织,加入含磷

酸酶抑制剂的RIPA裂解30 min,充分研磨后超声,在4℃、12 000 r/min离心30 min,收集上清液,加入5×上样缓冲液,100℃煮沸10 min。取定量的蛋白进行电泳、转膜、封闭,加相对应的一抗4℃摇床孵育过夜,3次TBST洗膜10 min,于二抗(1:20 000)室温孵育1 h,显影、拍照、进行图像分析。内参为 β -actin,使用Image-pro plus 8.0软件测定各组蛋白阳性表达光密度值,以目的蛋白的光密度与内参蛋白的光密度比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.11 统计学方法

数据分析采用SPSS 27.0统计软件。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用单因素方差分析或*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般状态

哮喘模型组小鼠末次激发时表现出动物哮喘

发作症状:毛色暗黄、脱毛,精神萎靡,呼吸急促,咳嗽,活动减少,出现烦躁、抓耳挠腮,弓背直立、前肢缩抬于胸前,腹肌抽搐,大小便增多等症状;而LY294002组、地塞米松组小鼠毛色、精神状态、搔抓口鼻次数及呼吸急促症状较哮喘组明显好转;空白对照组小鼠毛色洁白光滑,精神状态正常,无明显症状。

2.2 各组小鼠支气管肺泡灌洗液细胞计数比较

各组小鼠支气管肺泡灌洗液中细胞总数、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞比较,经单因素方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。哮喘模型组小鼠的支气管肺泡灌洗液中细胞总数、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞均较空白对照组高($P < 0.05$),巨噬细胞较空白对照组低($P < 0.05$);LY294002组、地塞米松组细胞总数、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞比例均较哮喘模型组低($P < 0.05$),巨噬细胞较哮喘模型组高($P < 0.05$)。见表2。

表2 各组小鼠支气管肺泡灌洗液细胞计数比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞总数/($\times 10^5$ /mL)	细胞分类计数/%			
		嗜酸性粒细胞	中性粒细胞	巨噬细胞	淋巴细胞
空白对照组	6.1 ± 1.2	9.3 ± 1.6	10.4 ± 2.0	69.5 ± 4.9	10.8 ± 3.5
哮喘模型组	14.3 ± 1.8	48.3 ± 7.0	22.2 ± 5.5	10.9 ± 3.4	20.3 ± 5.6
LY294002组	7.8 ± 0.8	18.2 ± 4.4	13.1 ± 4.5	50.0 ± 5.4	14.2 ± 3.8
地塞米松组	8.0 ± 1.0	16.3 ± 2.4	15.9 ± 6.1	52.7 ± 9.6	13.8 ± 5.4
<i>F</i> 值	48.486	92.573	6.682	93.624	4.267
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.003	0.000	0.018

2.3 各组小鼠肺组织HE染色结果

HE染色结果示,空白对照组小鼠支气管、血管周围及肺泡结构的基本结构未见明显炎症细胞浸润现象;哮喘模型组小鼠支气管及血管周围大量炎症细胞浸润,黏膜水肿,肺泡壁增厚,相邻肺泡融合成大囊腔,可见肺泡内充血及炎症细胞填充;LY294002组、地塞米松组气道及血管周围炎症细胞浸润较哮喘模型组减少,黏膜水肿及肺泡融合程度

均比哮喘模型组减轻。见图1。

2.4 各组小鼠肺组织PAS染色结果

PAS染色结果示,空白对照组小鼠气道上皮细胞排列整齐,几乎未见黏液物质,气道内无杯状细胞增生;哮喘模型组小鼠气道内大量黏液分泌并堵塞气道,杯状细胞增生明显,环绕于气道内。LY294002组、地塞米松组小鼠气道内见少量黏液分泌,杯状细胞增生情况得到改善。见图2。

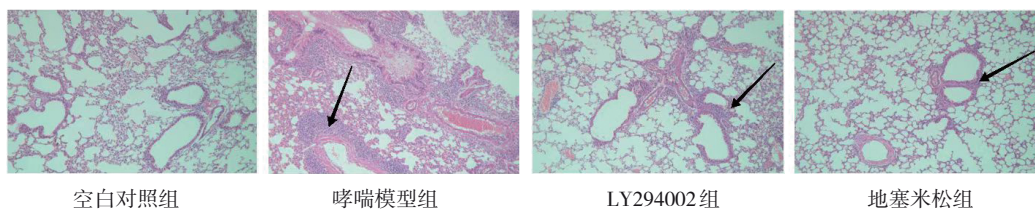


图1 各组小鼠肺组织HE染色 ($\times 100$)

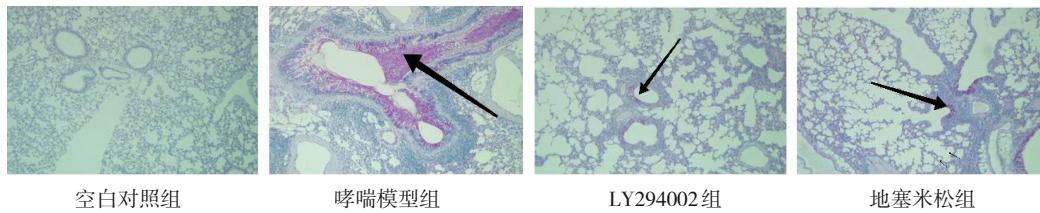


图 2 各组小鼠肺组织 AB-PAS 染色 (×100)

2.5 各组小鼠血清 IgE、IL-4 和 IL-25 水平比较

各组小鼠血清 IgE、IL-4 和 IL-25 水平比较, 经单因素方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 哮喘模型组较空白对照组高 ($P < 0.05$), LY294002 组、地塞米松组较哮喘模型组低 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组小鼠血清 IgE、IL-4 和 IL-25 水平比较 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	IgE/($\mu\text{g/mL}$)	IL-4/(pg/mL)	IL-25/(pg/mL)
空白对照组	2 423.1 ± 145.9	42.6 ± 6.8	49.3 ± 4.4
哮喘模型组	4 946.5 ± 146.5	84.3 ± 3.5	96.8 ± 5.0
LY294002 组	3 187.0 ± 247.7	46.0 ± 5.3	57.0 ± 5.0
地塞米松组	3 489.4 ± 981.2	49.56 ± 3.5	60.3 ± 3.6
F 值	52.335	45.354	63.130
P 值	0.000	0.000	0.000

2.6 各组小鼠 ARG-1、YM-1、IL-4、IL-13、IL-25R mRNA 相对表达量比较

各组小鼠 ARG-1、YM-1、IL-4、IL-13、IL-25R mRNA 相对表达量比较, 经单因素方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 哮喘模型组较空白对照组高 ($P < 0.05$), LY294002 组、地塞米松组较哮喘模型组低 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.7 各组小鼠肺组织 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、CD206 蛋白相对表达量比较

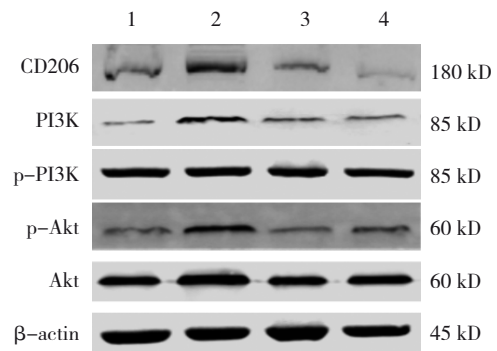
各组肺组织 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、CD206 蛋白相对表达量比较, 经单因素方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 哮喘模型组较空白对照组高 ($P < 0.05$), LY294002 组、地塞米松组较哮喘模型组低 ($P < 0.05$)。见表 5 和图 3。

表 4 各组小鼠 ARG-1、YM-1、IL-4、IL-13、IL-25R mRNA 相对表达量比较 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	ARG-1	YM-1	IL-4	IL-13	IL-25R
空白对照组	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
哮喘模型组	61.0 ± 7.1	39.1 ± 9.4	4.4 ± 0.3	39.8 ± 6.0	3.1 ± 0.6
LY294002 组	23.3 ± 2.3	21.3 ± 3.0	2.2 ± 0.4	12.2 ± 4.2	2.1 ± 0.5
地塞米松组	13.4 ± 3.9	16.4 ± 1.3	2.1 ± 0.4	12.3 ± 3.0	2.0 ± 0.2
F 值	112.618	30.188	58.745	52.358	23.583
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 5 各组小鼠肺组织 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、CD206 蛋白相对表达量比较 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	CD206
空白对照组	0.2 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0
哮喘模型组	0.8 ± 0.0	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.2
LY294002 组	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.0
地塞米松组	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.2
F 值	23.043	6.041	34.781
P 值	0.000	0.019	0.000



1: 空白对照组; 2: 哮喘模型组; 3: LY294002 组; 4: 地塞米松组。

图 3 各组小鼠肺组织蛋白条带图

3 讨论

目前,哮喘仍是呼吸系统最常见的疾病之一,其致病机制复杂,长期、慢性的气道炎症会导致气道上皮反复损伤和修复,气道炎症促进气道重塑^[11]。哮喘对患者的生活有重大影响,因此对哮喘的长期管理仍是临床治疗的重点和难点。本研究采用OVA诱导的哮喘小鼠模型中,哮喘小鼠临床表现毛色暗黄、脱毛,精神萎靡,呼吸急促,抓耳挠腮,弓背直立、前肢缩抬于胸前,大小便增多等哮喘反应症状,哮喘小鼠BALF中的细胞总数、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞比例升高,病理切片发现气道炎症细胞浸润明显增加,杯状细胞增生,提示哮喘模型复制成功。

PI3K/Akt信号通路具有调节细胞、增殖、分化和迁移等多种生物学功能,对嗜酸性粒哮喘具有调节作用^[12-13]。LY294002是PI3K的特异性抑制剂,能够抑制下游Akt的磷酸化,在预防气道炎症方面具有治疗应用。BI等^[14]指出LY294002能够改善严重哮喘患者的对糖皮质激素的不敏感性,缓解哮喘的气道炎症。据报道,LY294002减少支气管周围和血管周围炎症,改善气道重塑,靶向分子抑制PI3K/Akt信号传导减轻哮喘病理,在气道保护中发挥重要作用^[15-16]。本研究进一步探讨PI3K抑制剂LY294002改善哮喘气道炎症的分子机制是否与PI3K/Akt信号通路有关,结果发现LY294002组中小鼠肺组织IL-4、IL-13、IL-25R mRNA和血清IgE、IL-4、IL-25较哮喘模型组表达降低,小鼠肺组织中的P-PI3K/PI3K、P-Akt/Akt、CD206蛋白表达量较哮喘模型组小鼠下降,结果提示LY294002可能抑制了PI3K/Akt信号通路以减轻OVA诱导的哮喘小鼠气道炎症。

巨噬细胞稳态的紊乱是哮喘气道炎症的关键机制之一。据报道,M2巨噬细胞活化增加被认为在激活Th2细胞反应的过敏性哮喘中起关键作用^[17-19]。因此,阐明哮喘巨噬细胞M1/M2表型失调的内在因子及其分子机制十分重要。但是,目前未有研究报道哮喘中PI3K/Akt信号通路与M2巨噬细胞的关系。本研究使用PI3K抑制剂LY294002探讨哮喘的炎症因子PI3K/Akt信号传导是否能够调控M2巨噬细胞活化。M2巨噬细胞的标志物有ARG-1、FIZZ-1、YM-1、CD206等。相关研究发现,LY294002抑制PI3K介导的ARG-1表达诱导M1型巨噬细胞转

向M2型巨噬细胞^[20]。也有研究报道LY294002可以抑制二甲双胍对人脐带间充质干细胞成骨分化和M2巨噬细胞极化^[21]。XU等^[22]也指出了杨梅素通过PI3K/Akt信号通路诱导M2巨噬细胞极化减轻了糖尿病肾病肾小管间质纤维化。本研究结果发现LY294002能够减轻哮喘小鼠的哮喘反应,经LY294002治疗后的哮喘小鼠肺组织支气管周围炎症细胞及杯状细胞明显减轻,BALF中的细胞总数、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞比例明显减少,小鼠肺组织中的M2巨噬细胞标志物ARG-1、YM-1 mRNA及肺组织中的CD206蛋白表达量明显降低。以上结果提示,LY294002可以抑制哮喘小鼠气道炎症,其机制可能与LY294002能够抑制M2型巨噬细胞极化的相关因子有关。

糖皮质激素是临床治疗哮喘的主要药物之一,本研究采用了地塞米松作为单独干预组,地塞米松在治疗哮喘小鼠实验研究数据及对哮喘患者的疗效评价都表现出较好的治疗效果,但是在部分哮喘患者中存在对糖皮质激素抵抗。相关研究表明,PI3K抑制剂LY294002能够逆转哮喘模型对地塞米松的不敏感性,或者用LY294002作为地塞米松的附加药物,比单独使用地塞米松有更好的疗效^[14]。故研究LY294002对哮喘的疗效具有重要意义,但是目前缺乏相关不良反应的研究,后续希望能进一步深入探讨。

综上所述,本研究结果表明LY294002可通过调节PI3K/Akt信号通路的表达,抑制M2巨噬细胞的活化,减少炎症细胞因子的分泌,从而减轻哮喘小鼠气道炎症。这为临床治疗哮喘提供了新的思路和理论研究,但其作用机制有待后续实验深入研究,以及进行必要的临床试验以证实其治疗效果。

参 考 文 献 :

- [1] PAPI A, BRIGHTLING C, PEDERSEN S E, et al. Asthma[J]. Lancet, 2018, 391(10122): 783-800.
- [2] LOCATI M, CURTALE G, MANTOVANI A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity[J]. Annu Rev Pathol, 2020, 15: 123-147.
- [3] ABELAZIZ M H, ABDELWAHAB S F, WAN J, et al. Alternatively activated macrophages; a double-edged sword in allergic asthma[J]. J Transl Med, 2020, 18(1): 58.
- [4] ZHU Y J, SUN D, LIU H, et al. Bixin protects mice against bronchial asthma though modulating PI3K/Akt pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 101(Pt B): 108266.

- [5] PAN J, YANG Q Y, ZHOU Y, et al. MicroRNA-221 modulates airway remodeling via the PI3K/Akt pathway in OVA-induced chronic murine asthma[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 495.
- [6] ZAJĄC A, MACIEJCZYK A, SUMOREK-WIADRO J, et al. The role of Bcl-2 and Beclin-1 complex in "switching" between apoptosis and autophagy in human glioma cells upon LY294002 and sorafenib treatment[J]. *Cells*, 2023, 12(23): 2670.
- [7] 李丽, 许翀, 柴若楠. LY294002 对过敏性鼻炎-哮喘综合征大鼠氧自由基、TRPV1 神经元敏感性及 TSLP 表达的影响[J]. *西部医学*, 2023, 35(9): 1276-1281.
- [8] LI S Y, DING X F, ZHANG H, et al. IL-25 improves diabetic wound healing through stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 106: 108605.
- [9] 刘位位, 孙起翔, 张景鸿, 等. 雾化吸入灭活草分枝杆菌对哮喘模型小鼠 T-bet/GATA-3 表达的影响[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(8): 1099-1104.
- [10] DAI M N, ZHU X H, YU J, et al. CCR3 gene knockout in bone marrow cells ameliorates combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS) by reducing airway inflammatory cell infiltration and Th2 cytokines expression in mice model[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 104: 108509.
- [11] 刘健. 支气管哮喘气道重塑机制的研究进展[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(12): 51-54.
- [12] ATHARI S S. Targeting cell signaling in allergic asthma[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2019, 4: 45.
- [13] DIETSCHMANN A, SCHRUEFER S, WESTERMANN S, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) orchestrates *Aspergillus fumigatus*-induced eosinophil activation independently of canonical toll-like receptor (TLR)/C-type-lectin receptor (CLR) signaling[J]. *mBio*, 2022, 13(4): e0123922.
- [14] BI J, MIN Z H, YUAN H L, et al. PI3K inhibitor treatment ameliorates the glucocorticoid insensitivity of PBMCs in severe asthma[J]. *Clin Transl Med*, 2020, 9(1): 22.
- [15] MA B W, ATHARI S S, MEHRABI NASAB E, et al. PI3K/Akt/mTOR and TLR4/MyD88/NF- κ B signaling inhibitors attenuate pathological mechanisms of allergic asthma[J]. *Inflammation*, 2021, 44(5): 1895-1907.
- [16] WEI L N, GOU X L, SU B N, et al. Mahuang decoction attenuates airway inflammation and remodeling in asthma via suppression of the SP1/FGFR3/PI3K/Akt axis[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 2833-2850.
- [17] HAN X, LIU L J, HUANG S H, et al. RNA m6A methylation modulates airway inflammation in allergic asthma via PTX3-dependent macrophage homeostasis[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 7328.
- [18] BAI J Y, LI Y, XUE G H, et al. Requirement of Gai1 and Gai3 in interleukin-4-induced signaling, macrophage M2 polarization and allergic asthma response[J]. *Theranostics*, 2021, 11(10): 4894-4909.
- [19] DRAIJER C, BOORSMA C E, ROBBE P, et al. Human asthma is characterized by more IRF5⁺ M1 and CD206⁺ M2 macrophages and less IL-10⁺ M2-like macrophages around airways compared with healthy airways[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 140(1): 280-283.e3.
- [20] NISHIKOBA N, KUMAGAI K, KANMURA S, et al. HGF-MET signaling shifts M1 macrophages toward an M2-Like phenotype through PI3K-Mediated induction of arginase-1 expression[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 2135.
- [21] SHEN M, YU H H, JIN Y F, et al. Metformin facilitates osteoblastic differentiation and M2 macrophage polarization by PI3K/Akt/mTOR pathway in human umbilical cord mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells Int*, 2022, 2022: 9498876.
- [22] XU W L, ZHOU P P, YU X, et al. Myricetin induces M2 macrophage polarization to alleviate renal tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy via PI3K/Akt pathway[J]. *World J Diabetes*, 2024, 15(1): 105-125.

(李科 编辑)

本文引用格式: 李丽蔚, 陈慧雯, 胡芳茜, 等. LY294002 干预对哮喘小鼠 M2 巨噬细胞极化及气道炎症的机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(24): 29-35.

Cite this article as: LI L W, CHEN H W, HU F H, et al. Mechanism of LY294002 intervention on M2 macrophage polarization and airway inflammation in asthmatic mice[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(24): 29-35.