

# 复方精油对 PM<sub>2.5</sub> 诱导小鼠肺微血管内皮细胞内皮间质转化的影响

马柯欣<sup>1,2</sup>, 徐靖斌<sup>1</sup>, 任 飞<sup>1</sup>, 许 新<sup>1</sup>, 刘超生<sup>1</sup>, 李发胜<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 大连医科大学检验医学院, 大连 116044; <sup>2</sup> 沈阳市第四人民医院检验科, 沈阳 110031

**摘要:** 探讨复方精油对 PM<sub>2.5</sub> 诱导小鼠肺微血管内皮细胞 (MHC) 内皮间质转化 (EndMT) 的干预作用, 并从 TGF- $\beta$ 1/SMAD3/p-SMAD3 通路分析其可能的调节机制。建立 PM<sub>2.5</sub> 诱导小鼠 MHC 和复方精油干预模型, 测定细胞活力和迁移能力的变化; 采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测 CDH5、CD31、Col1、Acta2、S100A4 和 TGF- $\beta$  信号通路相关因子的水平变化。结果表明复方精油可减弱 PM<sub>2.5</sub> 对细胞迁移能力的影响; EndMT 相关因子的表达随 PM<sub>2.5</sub> 作用时间的延长呈现正向发展趋势, 复方精油对 PM<sub>2.5</sub> 诱导产生的 EndMT 有良好的干预作用; TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ R1 和 p-SMAD3 的表达均呈现下降趋势, EndMT 相关因子的表达水平也有所逆转。复方精油可缓解 PM<sub>2.5</sub> 诱导的 EndMT 进程, 其作用与 TGF- $\beta$ 1/SMAD3/p-SMAD3 信号通路相关。

**关键词:** PM<sub>2.5</sub>; 复方精油; 内皮间质转化 (EndMT); TGF- $\beta$ 1/SMAD3/p-SMAD3 通路

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)6-1006-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.6.015

## Effect of compound essential oils on endothelial-mesenchymal transition of mouse pulmonary vascular endothelial cells induced by PM<sub>2.5</sub>

MA Ke-xin<sup>1,2</sup>, XU Jing-bin<sup>1</sup>, REN Fei<sup>1</sup>, XU Xin<sup>1</sup>, LIU Chao-sheng<sup>1</sup>, LI Fa-sheng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> College of Medical Laboratory, Dalian Medical University, Dalian 116044, China;

<sup>2</sup> Department of Clinical Laboratory, the Fourth People's Hospital of Shenyang, Shenyang 110031, China

**Abstract:** To investigate the effect of compound essential oils (CEOs) on EndMT of mouse pulmonary vascular endothelial cells (MHC) induced by PM<sub>2.5</sub>, and discuss the regulatory mechanism of CEOs by the TGF- $\beta$ 1/SMAD3/p-SMAD3 pathway. MHC cells were cultured in vitro. Design the PM<sub>2.5</sub> group (500  $\mu$ g/mL), the CEOs group (PM<sub>2.5</sub> 500  $\mu$ g/mL + CEOs 10<sup>-5</sup>%), the inhibitor of TGF- $\beta$  pathway SB431542 group (10  $\mu$ mol/L) and the PM<sub>2.5</sub> + SB431542 group (500  $\mu$ g/mL + 10  $\mu$ mol/L). The changes of cell viability and migration ability were analyzed by cell proliferation experiment and cell scratch experiment. RT-qPCR and Western blot were used to detect the levels of CDH5, CD31, Col1, Acta2, S100A4 and TGF- $\beta$  signal pathway related factors. The cell viability of MHC began to increase after 36 h in the PM<sub>2.5</sub> group ( $P < 0.0001$ ), and there is no significant difference in the CEOs group. The cell migration increased significantly in the PM<sub>2.5</sub> group, and CEOs can attenuate the effect of PM<sub>2.5</sub> on cell migration (36 h,  $P < 0.05$ ). The result of RT-qPCR and Western blot showed that the expression of EndMT related factors showed a positive trend with the prolongation of PM<sub>2.5</sub>. CEOs had a beneficial intervention effect on EndMT induced by PM<sub>2.5</sub> exposure. Compared with the PM<sub>2.5</sub> group, Western blot showed that the expression of TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ R1 and p-SMAD3 decreased in the CEOs group, and the expression of EndMT related factors was reversed after 48 h. CEOs ameliorates EndMT induced by PM<sub>2.5</sub>, which is related to TGF- $\beta$ 1/SMAD3/p-SMAD3 pathway.

**Key words:** PM<sub>2.5</sub>; compound essential oils; endothelial-mesenchymal transition (EndMT); TGF- $\beta$ 1/SMAD3/p-SMAD3 pathway

PM<sub>2.5</sub>(空气动力学直径≤2.5  $\mu$ m 的细微颗粒

收稿日期: 2020-07-16 接受日期: 2020-12-10

基金项目: 国家自然科学基金(5137029); 大连医科大学省级大学 生创新创业训练计划(201910161093)

\* 通信作者 Tel: 86-411-86110391; E-mail: lifasheng@dmu.edu.cn

物)是造成空气污染的主要污染物之一。PM<sub>2.5</sub>比表面积大, 因而很容易附带有毒有害物质, 通过呼吸系统进入到肺泡深部, 引发肺部炎症和损伤并很可能进展为肺纤维化。成纤维细胞的大量增多是肺纤维

化的主要表征,胶原蛋白在肺血管外周和肺泡间隔中大量累积,纤维结缔组织也随之增加,最终导致基质硬度增加,气体交换难度加大。内皮间质转化(endothelial-mesenchymal transition, EndMT)是成纤维细胞的来源之一,其特征是内皮细胞逐渐失去表型标志物如血管内皮细胞钙粘连蛋白(vascular endothelial cell cadherin, VE-cadherin/CDH5)和血小板-内皮细胞粘附分子(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31/PECAM-1),间充质细胞表型标志物表达增强如I型胶原蛋白(type I collagen, Col1)、波形蛋白(vimentin)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin, Acta2/ $\alpha$ -SMA)和成纤维细胞特异性蛋白1(fibroblast-specific protein 1, Fsp1/S100A4)等。在这个过程中,细胞的增殖能力和迁移能力逐渐增强,最终导致细胞形态发生改变<sup>[1,2]</sup>。近年来,炎症诱导EndMT的分子机制已被了解<sup>[3]</sup>。TGF- $\beta$ 途径是炎症诱导EndMT的经典途径<sup>[4]</sup>,TGF- $\beta$ 三种异构体均可在多种细胞系中介导EndMT的发生<sup>[5]</sup>,其中TGF- $\beta$ 1的作用最为明显。已有研究表明,PM<sub>2.5</sub>可通过激活TGF- $\beta$ 信号途径增强肺部炎症<sup>[6]</sup>,但其中的具体作用机制以及对肺纤维化的影响尚不清楚。

精油(essential oils,EOs)可通过蒸馏、挤压或溶剂萃取等方式从芳香植物的花、果实、种子、叶、茎或根中提取,具有抗菌、消炎、抗氧化、抗衰老等多种活性,现已广泛应用于临床、药妆、保健养生等领域<sup>[7]</sup>。把从芳香植物中提取的精油用作治疗医疗目的的“自然疗法”称之为芳香疗法,可通过香薰、吸入、外涂或水疗等外用药法给药。尤加利、薄荷、乳香和云杉精油是治疗呼吸系统疾病的常见精油,可以起到溶解黏液、祛痰、杀菌、止咳和镇痉等作用,进而保护肺部免受炎症侵害并缓解肺部炎症<sup>[8-10]</sup>。我们根据芳香疗法将上述四种单方精油复配成复方精油用于本实验中,探讨了复方精油通过TGF- $\beta$ 1/SMAD3/p-SMAD3信号通路对PM<sub>2.5</sub>诱导的EndMT的干预作用。

## 1 材料及方法

### 1.1 复方精油

复方精油由大连医美芳香疗法工作室提供,批号:20170325,由尤加利、云杉、薄荷和乳香单方精油(英国Absolute Aromas公司惠赠、纯度近100%)复配而成。复方精油的化学成分分析主要有25种成分,其中桉叶素(16.7%)、 $\alpha$ -蒎烯(16.54%)、薄荷醇(12.86%)等<sup>[11]</sup>。

### 1.2 试剂

小鼠肺微血管内皮细胞完全培养基和M199培养基(中国普诺赛生命科技有限公司,批号分别为CM-M001、PM150610);MTT试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、ECL检测试剂盒(中国凯基生物技术有限公司,批号分别为KGA312、KGP903、KGP1123);CDH5、TGF- $\beta$ R1、p-SMAD2和p-SMAD3抗体(中国博奥森生物技术有限公司,批号分别为bs-0878R、bs-0638R、bs-3419R、bs-5616R);CD31、Col1、Acta2、SMAD2、SMAD3、TGF- $\beta$ 1和S100A4抗体(美国Proteintech公司,批号分别为11265-1-AP、14695-1-AP、14395-1-AP、12570-1-AP、25494-1-AP、21898-1-AP、66489-1-Ig);PVDF膜(美国Millipore公司,批号为FFP39);SB431542(美国APExBIO公司,批号为A8249);RIPA裂解液(中国碧云天公司,批号为P0013B)。

### 1.3 仪器

酶标仪和PCR仪(美国Bio-Rad公司);一体化成像仪ImageQuant LAS 500(美国GE医疗公司);超微量紫外可见分光光度计(美国Thermo公司,型号为SMA4000);垂直电泳仪和转膜仪(北京六一生物科技有限公司,型号分别为DYCZ-24DN、DYCZ-40D)。

### 1.4 PM<sub>2.5</sub>的提取和悬液制备

PM<sub>2.5</sub>样本采集于2015年10月至2016年3月河北省廊坊市。采用70%乙醇溶液浸泡PM<sub>2.5</sub>石英滤膜,超声处理,蒸发浓缩、冷冻干燥得到PM<sub>2.5</sub>样品,放入-20℃冰箱中备用。PM<sub>2.5</sub>的主要成分包括元素碳、有机碳、17种金属(如锌、铅、铜、铁、铝、钙等)、8种水溶性离子(如NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>等)<sup>[12]</sup>。

### 1.5 细胞分离培养和分组

小鼠肺微血管内皮细胞(mouse pulmonary vascular endothelial cells,MHC)购自中国普诺赛生命科技有限公司,批号分别为CP-M001,属于原代细胞。

分离步骤:小鼠经断颈处死后,75%酒精浸泡5 min,移至超净工作台内,仰卧固定小鼠;沿胸部正中线剪开皮肤,打开胸腔,取出肺组织,分离肺叶,放入含双抗的PBS中;剪下肺叶边缘1~2 mm处组织,将边缘组织剪成1 mm<sup>3</sup>碎块;PBS清洗组织碎块1次,用血清润洗组织碎块1次,用显微镊将组织块种植于6 cm培养皿中,于37℃,5%CO<sub>2</sub>恒温培养箱中干贴1 h。

培养步骤:向培养皿中加入2 mL小鼠肺微血管内皮细胞完全培养基,于培养箱内静置培养,60 h后挑出培养皿内组织块丢弃,培养皿内更换新鲜培

养基,每3天换液1次,细胞长满后待用。采用小鼠肺微血管内皮细胞完全培养基进行培养,使用第五代到第七代的细胞进行后续实验。

分组情况:PM<sub>2.5</sub>组(500 μg/mL),复方精油组(PM<sub>2.5</sub>500 μg/mL + CEOs 10<sup>-5</sup>%),TGF-β通路抑制剂SB431542组(10 μmol/L)和PM<sub>2.5</sub>+SB431542组(500 μg/mL + 10 μmol/L)。

## 1.6 MTT法

采用MTT法测定药物浓度和细胞活力,酶标仪上检测各组550 nm的吸光度值,并进行统计学分析。

## 1.7 细胞划痕实验

将1×10<sup>5</sup>个MHC细胞加入6孔组织培养板中;待细胞长满后,使用无菌的200 μL枪头尖端在

每孔中形成细胞间隙,并用无菌PBS冲洗掉细胞碎片;每孔中按照分组需要加入含不同的受试药物的新鲜无血清培养基,在规定时间拍照记录;Image J软件分析间隙宽度,每组重复3次。

## 1.8 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)

利用Trizol法提取核酸,按照PrimeScript RT reagent Kit with gDNA eraser操作说明进行反转录;按照SYBR Premix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus)的要求在冰水浴的条件下进行加样,离心;使用TP800 PCR扩增仪扩增。采用RT-qPCR方法检测CDH5、CD31、COL1α1和Acta2的mRNA水平变化(见表1)。

Table 1 Primer sequence

名称 Target name	上游序列(5'→3') Forward primer(5'→3')	下游序列(5'→3') Reverse primer(5'→3')
Mus-Gapdh	AAATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC	CAACAATCTCCACTTTGCCACTG
Mus-Col1α1	GACATGTTCACTTGTGGACCTC	GGGACCCTTAGGCCATTGTGTA
Mus-Acta2	GACAATGGCTCTGGCTCTGTA	TTTGGCCCATTCCAACCATTA
Mus-CD31	TAAGCCCACCAAGAGACATGGAA	TTACTCGACAGGATGGAATCACAA
Mus-CDH5	TGTGCAAGTGCAACCGAGCAG	CTCCGCAGGATGATCAGCAA

## 1.9 蛋白免疫印迹(Western blot)

各组细胞加入含有PMSF的裂解缓冲液,BCA蛋白检测试剂盒检测总蛋白浓度;蛋白质40 μg转移到0.45 μm的PVDF膜上;5%脱脂牛奶封闭2 h;分别加入CDH5(1:500)、CD31(1:1 000)、Col1(1:2 000)、Acta2(1:2 000)、S100A4(1:500)、TGF-β1(1:1 000)、TGF-βR1(1:1 000)、SMAD2(1:1 000)、SMAD3(1:1 000)、p-SMAD2(1:1 000)和p-SMAD3(1:1 000),4 °C孵育过夜;二抗(1:2 000)室温孵育2 h;ECL超敏发光液发光;Image J软件分析条带的灰度值。目的蛋白相对表达量=目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值。

## 1.10 统计分析

GraphPad Prism 8.0分析实验中的数据,并使用平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。各组均数比较采用单因素方差分析及非参数t检验, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 复方精油可干预PM<sub>2.5</sub>对MHC细胞相关功能的改变

本实验室前期研究证明浓度为500 μg/mL的PM<sub>2.5</sub>可诱导MHC细胞发生EndMT<sup>[13]</sup>。通过MTT

法检测10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>[(V1/V)%]复方精油单独作用MHC细胞48 h后细胞活性的改变,选择10<sup>-5</sup>[(V1/V)%]作为复方精油干预细胞时的药物浓度( $P < 0.01$ ,图1)。

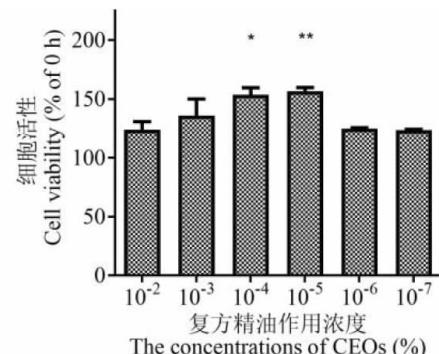


图1 药物浓度实验

Fig. 1 The experiments of drug concentration

注:与CEO单独作用MHC细胞0 h后细胞活性的改变,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。Note: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs the 0 h group.

PM<sub>2.5</sub>作用细胞24 h后明显提高了MHC细胞的活性( $P < 0.01$ );在36 h和48 h时MHC细胞的活性最高( $P < 0.0001$ ),但复方精油组的细胞活性并没有显著改变(见图2C)。迁移实验中,PM<sub>2.5</sub>组和复方精油组分别作用细胞36 h后,两组细胞迁移

能力差异明显( $P < 0.05$ ,图 2A 和 2B),复方精油可减弱 PM<sub>2.5</sub>对细胞迁移能力的影响。

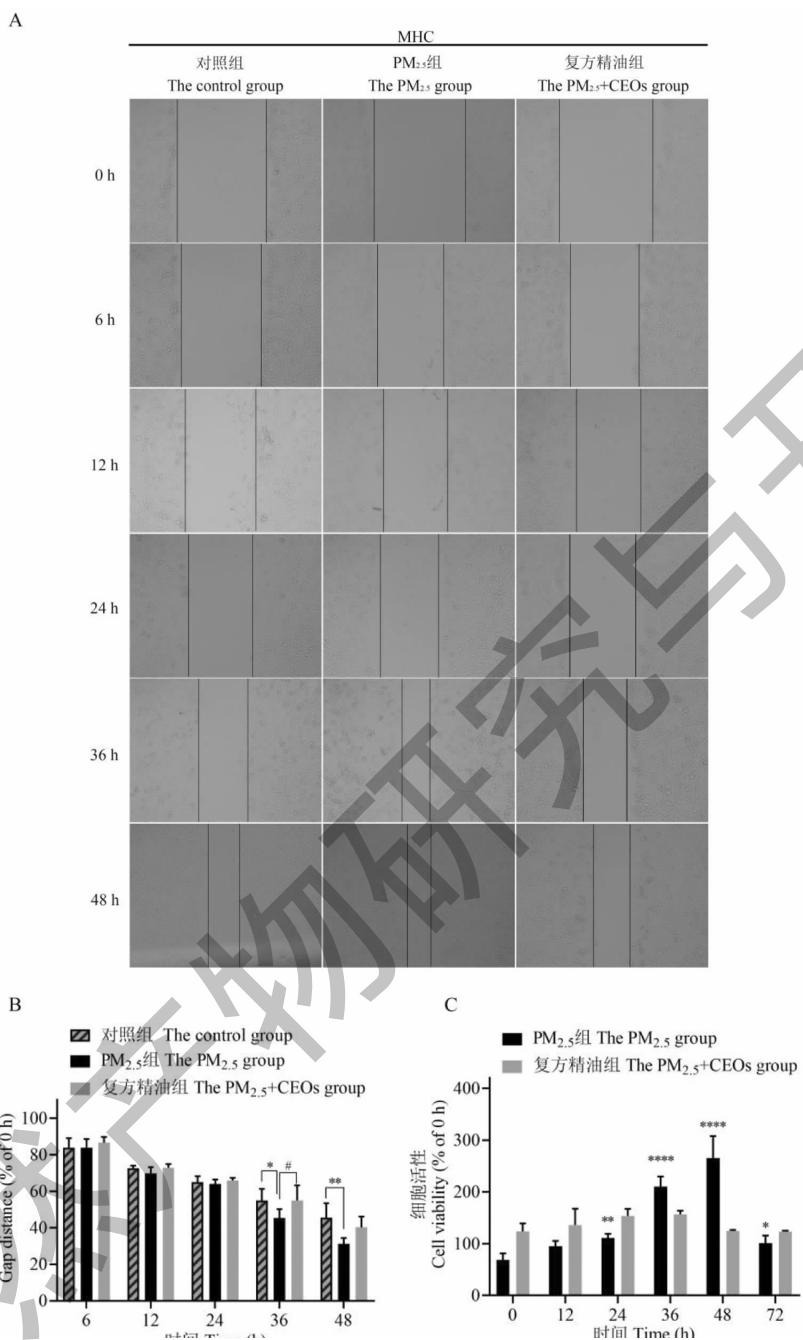


图 2 细胞功能实验结果

Fig. 2 The result of cell function experiments

注:B. PM<sub>2.5</sub>组与对照组相比,<sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ ,复方精油组与 PM<sub>2.5</sub>组相比,<sup>#</sup>  $P < 0.05$ ;C. PM<sub>2.5</sub>组和复方精油组 MHC 细胞不同时间下的细胞活性变化,与 0 h 相比,<sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*\*</sup>  $P < 0.0001$ 。Note: B. The control group vs the PM<sub>2.5</sub> group, <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ ; The PM<sub>2.5</sub> group vs the PM<sub>2.5</sub> + CEOs group, <sup>#</sup>  $P < 0.05$ . C. <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*\*</sup>  $P < 0.0001$  vs the 0 h group.

## 2.2 复方精油可缓解 PM<sub>2.5</sub>诱导 MHC 细胞 EndMT 的进程

PM<sub>2.5</sub>分别作用 MHC 细胞 0、6、12、24、36、48 h。结果表明,S100A4、Col1 和 Acta2 的表达量明显提

升,CDH5 和 CD31 的表达量明显下降,提示 PM<sub>2.5</sub>诱导 MHC 细胞发生 EndMT<sup>[13]</sup>。复方精油分别干预 MHC 细胞 6、12、24、36、48 h,其对 PM<sub>2.5</sub>诱导产生的 EndMT 有良好的缓解作用,尤其是在蛋白表达水平

上。复方精油干预 24 h 后, Acta2 和 S100A4 的蛋白表达量下降趋势尤为明显 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ), 而

复方精油对 Col1 的缓解作用主要体现在复方精油干预 36 h 后 (36 h,  $P < 0.05$ ; 48 h,  $P < 0.05$ , 见图 3)。

表 2 复方精油组中 MHC 细胞的 COL1 $\alpha$ 1、CD31、CDH5 和 Acta2 mRNA 变化情况 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 2 The expression of COL1 $\alpha$ 1, CD31, CDH5 and Acta2 mRNA in the CEOs group in MHC cells ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

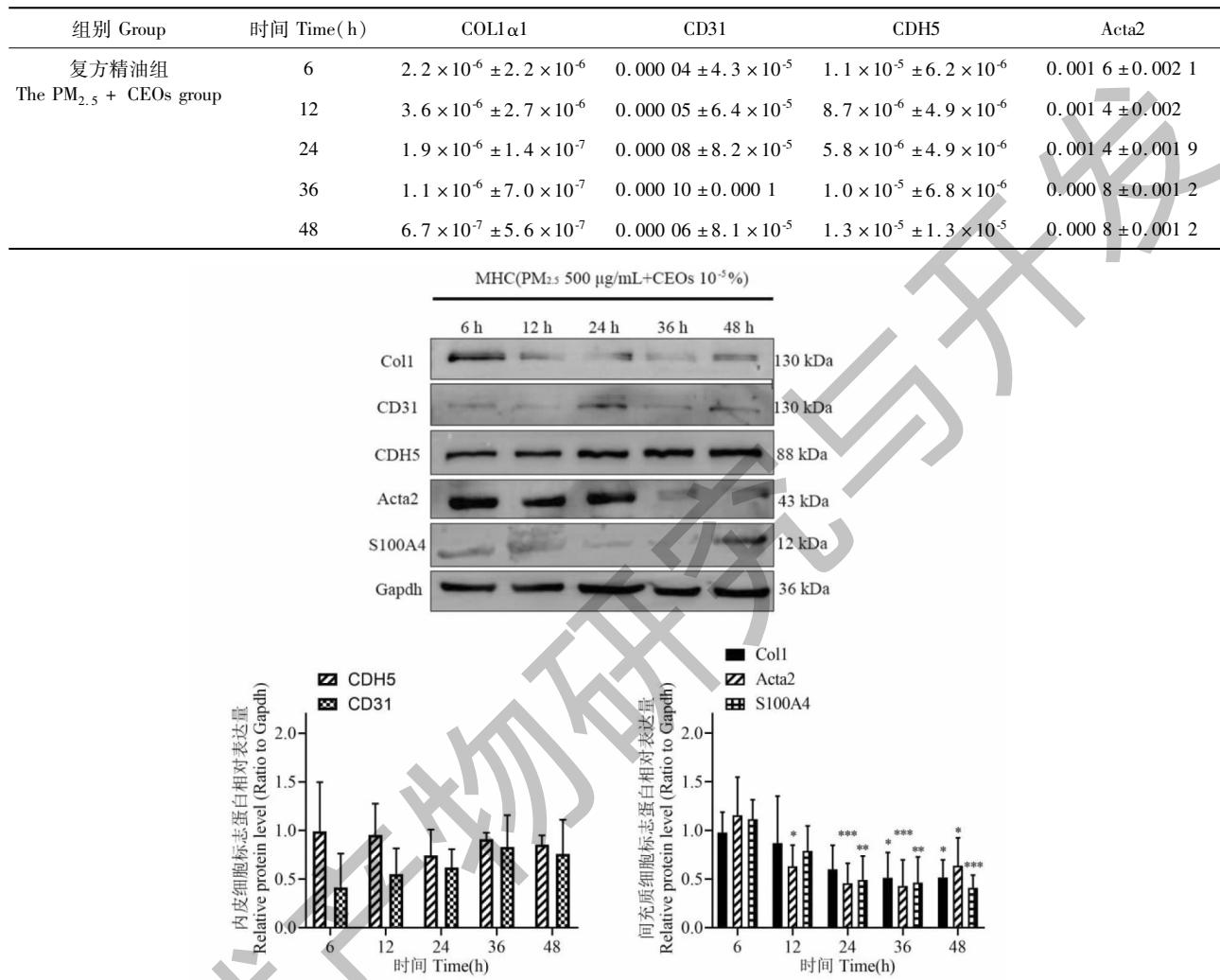


图 3 复方精油可缓解 PM<sub>2.5</sub> 诱导 MHC 细胞 EndMT 的进程

Fig. 3 CEOs can alleviate EndMT in MHC cells exposed to PM<sub>2.5</sub>

注: 与 6 h 组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。Note: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs the PM<sub>2.5</sub> + CEOs group at the 6 h point.

## 2.3 复方精油通过调节 TGF- $\beta$ 1/SMAD3/p-SMAD3 通路抑制 PM<sub>2.5</sub> 诱导的 EndMT

本实验室前期研究证明 PM<sub>2.5</sub> 通过激活 TGF- $\beta$ 1/SMAD3/p-SMAD3 通路诱导 MHC 细胞发生 EndMT<sup>[13]</sup>。Western blot 结果显示, 与 PM<sub>2.5</sub> 组相比, 在复方精油组中, TGF- $\beta$ R1 和 p-SMAD2/3 均有下降趋势, 其中 TGF- $\beta$ R1 ( $P < 0.05$ ) 和 p-SMAD3 ( $P < 0.01$ ) 下降显著(见图 4)。

与此同时, 在复方精油组中, CD31 的蛋白表达

量增加明显 ( $P < 0.05$ ), Col1、Acta2 和 S100A4 的表达均具有下降趋势(见图 5)。综上所述, 复方精油可通过下调 TGF- $\beta$ R1 的表达, 降低下游靶分子 p-SMAD3 的表达从而抑制 EndMT 的发生。

## 3 讨论

PM<sub>2.5</sub> 是最受关注的空气污染物之一。因其颗粒小, 较易到达人体的肺泡和血液中, 从而加快已患肺部疾病人群的疾病进程。血管内壁的内皮细胞与血液直接接触, 对血液中的异物刺激具有明显的异

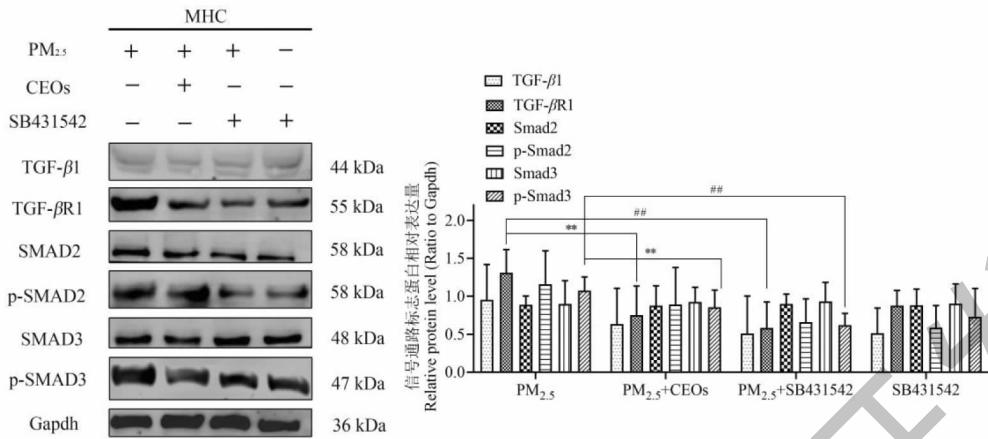


图4 复方精油可降低PM<sub>2.5</sub>诱导下TGF-β1/SMAD3/p-SMAD3信号通路的表达

Fig. 4 CEOs can reduce the expression of TGF-β1/SMAD3/p-SMAD3 pathway induced by PM<sub>2.5</sub>

注:复方精油组与PM<sub>2.5</sub>组比较, \*P<0.05, \*\*P<0.01; PM<sub>2.5</sub>+SB431542组与PM<sub>2.5</sub>组比较, #P<0.05, ##P<0.01。Note: The PM<sub>2.5</sub> group vs the PM<sub>2.5</sub> + CEOs group, \*P<0.05 and \*\*P<0.01; The PM<sub>2.5</sub> group vs the PM<sub>2.5</sub> + SB431542 group, #P<0.05, ##P<0.01.

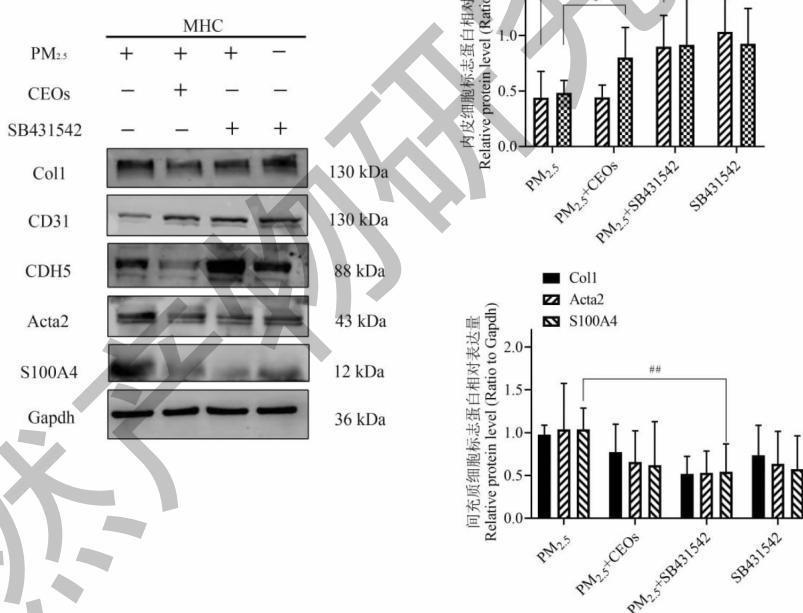


图5 复方精油通过调节TGF-β1/SMAD3/p-SMAD3信号通路抑制PM<sub>2.5</sub>诱导的EndMT

Fig. 5 CEOs can alleviate EndMT by regulating the TGF-β1/SMAD3/p-SMAD3 pathway

注:复方精油组与PM<sub>2.5</sub>组比较, \*P<0.05; PM<sub>2.5</sub>+SB431542组与PM<sub>2.5</sub>组比较, #P<0.05, ##P<0.01。Note: The PM<sub>2.5</sub> group vs the PM<sub>2.5</sub> + CEOs group, \*P<0.05; The PM<sub>2.5</sub> group vs the PM<sub>2.5</sub> + SB431542 group, #P<0.05, ##P<0.01.

质性。处于EndMT进程的内皮细胞是成纤维细胞的来源之一,不仅导致成纤维细胞大量增加,同时会使毛细血管床密度减少,加重组织缺氧、缺血,从而加速肺纤维化进程。实验室前期试验已证明PM<sub>2.5</sub>可诱导MHC细胞发生EndMT, Acta2、Col1和S100A4的蛋白表达量上升,CD31和CDH5的表达

下降,说明PM<sub>2.5</sub>可使小鼠肺微血管内皮细胞发生EndMT,S100A4的蛋白表达量的增加也证实了EndMT在肺纤维化中具有重要的作用<sup>[13]</sup>。

本实验采用的复方精油主要成分为α-蒎烯(16.54%)、桉叶素(16.7%)和薄荷醇(12.86%)等<sup>[12]</sup>。桉叶素是肿瘤坏死因子-α的阻遏剂,可有效

抑制哮喘和慢性肺阻塞疾病的恶化过程,具有潜在的类固醇抗炎药物的作用<sup>[14]</sup>。 $\alpha$ -蒎烯具有抗氧化和抗菌作用,对肿瘤细胞A549显示一定的抑制活性<sup>[15]</sup>。薄荷醇能够阻断血管平滑肌的L型钙通道,对心血管疾病起到一定的治疗作用<sup>[16]</sup>。本实验发现,PM<sub>2.5</sub>可诱导处理MHC细胞48 h时,MHC细胞的增殖能力和迁移能力达到顶峰,但在复方精油组中,MHC细胞的整体功能并没有因PM<sub>2.5</sub>的诱导而发生显著变化。复方精油干预36 h后,Acta2和Col1的蛋白表达量明显减少,提示复方精油对EndMT的发生具有良好的缓解作用。

研究发现,TGF- $\beta$ 在肝脏的发育、损伤和修复的过程中扮演重要的角色,其可通过激活TGF- $\beta$ 1受体促进细胞外基质的合成,并对肺纤维化的发病机制起到调控作用。前期实验已经发现,PM<sub>2.5</sub>处理MHC细胞48 h后,TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ R1和p-SMAD3的蛋白表达量增加,但在PM<sub>2.5</sub>组中加入SB431542 48 h后,TGF- $\beta$ R1和p-SMAD3的表达减少,因SMAD蛋白磷酸化是TGF- $\beta$ 1信号通路的典型指标,由此可见,PM<sub>2.5</sub>可通过调节TGF- $\beta$ 信号通路,刺激TGF- $\beta$ 1转化为活性形式去激活TGF- $\beta$ R1,TGF- $\beta$ R1被激活后与SMAD3结合,p-SMAD3的过度表达可促进间充质细胞标志物表达的增加和胶原的积累<sup>[13]</sup>。而在复方精油组中,TGF- $\beta$ R1和p-SMAD3的蛋白表达量明显下降,复方精油通过抑制TGF- $\beta$ R1的激活降低p-SMAD3的表达,从而抑制PM<sub>2.5</sub>诱导的EndMT发生。

由此推断,复方精油可通过抑制TGF- $\beta$ 1/SMAD3/p-SMAD3信号通路的表达减缓PM<sub>2.5</sub>诱导肺血管内皮细胞EndMT的发生。这些发现为PM<sub>2.5</sub>暴露后肺部EndMT的损伤修复和复方精油的干预方案提供了理论基础。

## 参考文献

- Jimenez S, Piera-Velazquez S. Endothelial to mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of systemic sclerosis-associated pulmonary fibrosis and pulmonary arterial hypertension. Myth or reality? [J]. Matrix Biol, 2016, 51:26-36.
- Lin F, Wang N, Zhang TC. The role of endothelial-mesenchymal transition in development and pathological process [J]. Iubmb Life, 2012, 64:717-723.
- Pérez L, Muñoz-Durango N, Riedel C, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition: cytokine-mediated pathways that determine endothelial fibrosis under inflammatory conditions [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2017, 33:41-54.
- Cho J, Lee A, Chang W, et al. Endothelial to mesenchymal transition represents a key link in the interaction between inflammation and endothelial dysfunction [J]. Front Immunol, 2018, 9:294.
- Arciniegas E, Sutton A, Allen T, et al. Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells *in vitro* [J]. J Cell Sci, 1992, 103:521-529.
- Yang D, Ma M, Zhou W, et al. Inhibition of miR-32 activity promoted EMT induced by PM<sub>2.5</sub> exposure through the modulation of the Smad-1-mediated signaling pathways in lung cancer cells [J]. Chemosphere, 2017, 184:289-298.
- Wang Y, Tao FY, Cui DH, et al. Study on the anti-depressant effect of compound essential oil [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2020, 32:278-287.
- Poaty B, Lahlah J, Porqueres F, et al. Composition, antimicrobial and antioxidant activities of seven essential oils from the North American boreal forest [J]. World J Microb Biot, 2015, 31:907-919.
- Forouzanfar F, Hosseinzadeh H, Ebrahimzadeh Bideskan A, et al. Aqueous and ethanolic extracts of *Boswellia serrata* protect against focal cerebral ischemia and reperfusion injury in rats [J]. Phytother Res, 2016, 30:1954-1967.
- Kozlovich S, Chen G, Watson C, et al. Role of L- and D-menthol in the glucuronidation and detoxification of the major lung carcinogen, NNAL [J]. Drug Metab Dispos, 2019, 47: 1388-1396.
- Wang H, Song L, Ju W, et al. The acute airway inflammation induced by PM exposure and the treatment of essential oils in Balb/c mice [J]. Sci Rep, 2017, 7:44256.
- Ma YM, The alleviative effect of compound essential oils regulating autophagy in lung injury induced by PM<sub>2.5</sub> exposure [D]. Dalian: Dalian Medical University (大连医科大学), 2018.
- Ma KX, Li CL, Xu JB, et al. LncRNA Gm16410 regulates PM-induced lung endothelial-mesenchymal transition via the TGF- $\beta$ 1/Smad3/p-Smad3 pathway [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2020, 205:111327.
- Juergens U, Engelen T, Racké K, et al. Inhibitory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2004, 17:281-287.
- Zhang HQ, Yang Y, Yu JY, et al. Composition and antitumor activities of essential oils from two *Anaphalis* DC. species [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31: 2087-2092.
- Silva H. Current knowledge on the vascular effects of menthol [J]. Front Physiol, 2020, 11:298.