

异钩藤碱调控 ERK/p27^{Kip1} 信号通路改善博莱霉素诱导的小鼠肺纤维化

陈晓¹, 李泽朋¹, 何晓伟², 李先伟^{1*}

¹皖南医学院药学院药理学教研室; ²安徽省皖南植物药活性物质筛选与再评价工程实验室, 芜湖 241002

摘要:基于细胞外调节蛋白激酶 1/2 (ERK1/2)、p27^{Kip1} 信号通路探究异钩藤碱 (isorhynchophylline, IRN) 对博莱霉素 (bleomycin, BLM) 诱导的小鼠肺纤维化 (pulmonary fibrosis, PF) 的作用及机制。C57BL/6J 小鼠 48 只, 随机正常组、BLM 组、BLM + IRN (10、20 mg/kg) 两个剂量组, 每组 12 只。气管注射 BLM (5 000 U/kg) 诱导 PF 小鼠模型, 造模后连续灌胃给药 21 天。HE 和 Masson 染色观察肺组织病理变化及胶原沉积情况。免疫组化检测肺组织 α -平滑肌肌动蛋白 (alpha-smooth muscle actin, α -SMA) 的表达。体外培养小鼠原代肺成纤维细胞, 实验设对照组、转化生长因子- β 1 (transforming growth factor-beta 1, TGF- β 1) (10 ng/mL) 组和 TGF- β 1 + IRN (5、10、20 μ mol/L) 三个剂量组。EdU 掺入法和流式细胞术检测细胞增殖, Transwell 观察细胞的迁移能力。RT-qPCR 检测肺组织或肺成纤维细胞 TGF- β 1、collagen I 和 α -SMA mRNA 的表达。Western blot 检测肺组织和 (或) 肺成纤维细胞 TGF- β 1、collagen I、 α -SMA、p-ERK1/2、p27^{Kip1}、CDK2 和 Cyclin E1 的蛋白水平。动物实验结果显示, 与 BLM 组相比, 不同剂量 IRN 均能明显减轻肺组织结构的损伤、降低炎症细胞的浸润和胶原的沉积; 此外, IRN 不同程度地降低肺组织 TGF- β 1、collagen I 和 α -SMA mRNA 和蛋白的表达; 同时, IRN 还抑制了肺组织 ERK1/2 的磷酸化、上调 p27^{Kip1} 和下调 CDK2 和 Cyclin E1 的蛋白表达。细胞实验结果显示, 与 TGF- β 1 组相比, 不同剂量 IRN 能够明显抑制 TGF- β 1 诱导的肺成纤维细胞增殖、显著降低细胞迁移能力; 明显降低 TGF- β 1 诱导的 collagen I 和 α -SMA mRNA 和蛋白的表达, 同时降低 ERK1/2 的磷酸化水平、上调 p27^{Kip1} 和下调 CDK2 和 Cyclin E1 的蛋白表达。以上结果表明 IRN 可能通过抑制 ERK1/2 信号通路、上调 p27^{Kip1} 的表达而抑制了肺成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化, 从而减轻了 BLM 诱导的 PF。

关键词:异钩藤碱; ERK1/2; p27^{Kip1}; 肺纤维化

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)5-0750-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.5.003

Isorhynchophylline alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by regulating ERK/p27^{Kip1} signaling pathway in mice

CHEN Xiao¹, LI Ze-peng¹, HE Xiao-wei², LI Xian-wei^{1*}

¹Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Wannan Medical College;

²Anhui Provincial Engineering Laboratory for Screening and Reevaluation of Active Compounds of Herbal Medicines in Southern Anhui, Wuhu 241002, China

Abstract: To explore the effect and mechanism of isorhynchophylline (IRN) on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice based on extracellular regulated protein kinases 1/2 (ERK1/2), p27^{Kip1} signaling pathway. Forty-eight C57BL/6 mice were randomly divided into normal group, bleomycin (BLM) group, IRN low and high (10 and 20 mg/kg) groups, twelve mice in each group. The pulmonary fibrosis (PF) model was induced by intratracheal injection of BLM (5 000 U/kg). IRN were administered by intragastric every day after BLM treatment for three weeks. HE and Masson staining were used to observe the pathological changes and collagen deposition in lung tissue. The expression of alpha-smooth muscle actin (α -SMA) in lung tissue was detected by immunohistochemistry. Primary mouse lung fibroblasts cultured *in vitro*, cells were divided into control group, transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) group, and IRN (5, 10 and 20 μ mol/L) groups. Cell proliferation

收稿日期: 2022-01-17

接受日期: 2022-03-25

基金项目: 安徽省卫生健康委科研重点项目 (AHWJ2021a033); 安徽省高校自然科学研究重点项目 (2018A0254)

* 通信作者 E-mail: wnmclxianwei69@163.com

was measured by EdU marking and flow cytometry. The ability of cell migration was applied by Transwell assays. The mRNA levels of TGF- β 1, collagen I and α -SMA were detected by RT-qPCR in lung tissue and cells. The proteins levels of TGF- β 1, collagen I, α -SMA, p-ERK1/2, p27^{Kip1}, CDK2 and Cyclin E1 were detected by Western blot in lung tissue and cells. *In vivo*, compared with BLM group, IRN (10 and 20 mg/kg) reduced damaged lung structures, infiltrated inflammatory cells and accumulated areas of collagen deposition. Moreover, IRN reduced the mRNA and proteins expression of TGF- β 1, collagen I and TGF- β 1 in the lung tissues. Meanwhile, IRN decreased the level of ERK1/2 phosphorylation, up-regulation expression of p27^{Kip1} and down-regulation expression of CDK2 and Cyclin E1 in the lung tissues. *In vitro*, compared with TGF- β 1 group, IRN (5, 10 and 20 μ mol/L) treatment significantly inhibited proliferation and migration of pulmonary fibroblasts, and obviously decreased the mRNA and proteins expression of collagen I and α -SMA induced by TGF- β 1. Similarly, IRN (5, 10 and 20 μ mol/L) treatment reduced the level of ERK1/2 phosphorylation, up-regulation expression of p27^{Kip1} and down-regulation expression of CDK2 and Cyclin E1 induced by TGF- β 1. These results demonstrated that IRN could suppress lung fibroblast proliferation, migration and differentiation to myofibroblasts and alleviate bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice, possibly through suppressing the ERK1/2 signaling pathway and up-regulating p27^{Kip1} expression.

Key words: isorhynchophylline; ERK1/2; p27^{Kip1}; pulmonary fibrosis

肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)是一种慢性间质性肺疾病,其特征是肺成纤维细胞异常增殖、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度积累、炎症损伤和组织结构破坏,最终导致肺瘢痕形成、肺功能不全和呼吸衰竭^[1]。氧化应激、炎症反应、成纤维细胞增殖活化和 ECM 异常沉积等多种因素都参与了 PF 的发病机制,更重要的是肺成纤维细胞向肌成纤维细胞(myofibroblast, MFb)增殖分化的过程可能是肺纤维化形成的关键^[2]。大量研究表明在转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)等细胞因子的刺激下,肺成纤维细胞可大量增殖并分化为 α -平滑肌肌动蛋白(alpha smooth muscle actin, α -SMA)阳性的 MFb^[3]。MFb 通过其合成大量的 ECM 和促纤维化因子导致病理性肺组织重塑被认为是 PF 进展性的关键致病机制^[4]。因此,探究肺成纤维细胞增殖和分化的机制并寻找其抑制靶点可能是减轻 PF 的潜在策略。

异钩藤碱(isorhynchophylline, IRN)是从中药钩藤中分离出来的四环羟吲哚生物碱,前期研究发现 IRN 具有抗氧化、抗炎、抗增殖和神经保护等多种作用^[5,6]。Guo 等^[7]研究发现 IRN 通过抑制肺动脉平滑肌细胞增殖并减轻肺血管重塑而缓解野百合碱诱导的肺动脉高压。进一步研究发现,IRN 通过抑制支气管平滑肌细胞增殖而对支气管哮喘具有一定的缓解作用^[8]。最新的研究发现异钩藤碱对二氧化硅诱导的小鼠肺损伤具有一定的保护作用^[9]。而我们前期研究发现含羞草碱通过抑制细胞外调节蛋白激酶 1/2(extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK1/2)的磷酸化、上调 p27^{Kip1} 的表达能够明显

抑制 TGF- β 1 诱导的肺成纤维化细胞的增殖分化^[10,11]。而 IRN 通过抑制 ERK1/2 的磷酸化而明显抑制血管紧张素 II(angiotensin II, AngII)诱导的新生大鼠心室肌细胞的增殖^[12]。基于以上的研究背景,本课题以 ERK1/2、p27^{Kip1} 信号通路靶点,探究 IRN 抗 PF 的作用及机制,从而为研究开发具有抗 PF 作用的中药提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

C57BL/6J 小鼠,体质量(18 \pm 2 g),购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,动物许可证号:SCXK(京)2019-0010。

1.1.2 药物与试剂

IRN(北京索莱宝科技有限公司,货号 II0310);注射用盐酸博莱霉素(Bleomycin, BLM)(浙江瀚晖制药有限公司,批号 H20055883);SABC-AP 免疫组化染色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司,批号 KIT-5004);Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG、DAPI 染色液、细胞周期检测试剂盒、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-deoxy uridine, EdU)掺入细胞增殖检测试剂盒、结晶紫染色液(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 A0428、C1005、C1052、C0085S、C0121);Transwell 小室(美国 Corning 公司);重组小鼠 TGF β 1(美国 R&D 公司,批号 7666-MB);PrimeScriptTM RT reagent Kit、TB Green[®] Premix Ex TaqTM II(北京宝日生物技术有限公司,批号分别为 RR037Q、RR820Q);改良 Masson 染色试剂盒、TGF- β 1 抗体、ERK1/2 抗体、磷酸化 ERK1/

2(p-ERK1/2)抗体、I型胶原蛋白(collagen I)抗体及GAPDH抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为S0076、bs-0086R、bsm-33337M、bs-3016R、bs-7158R、bsm-33033M);p27^{Kip1}抗体、周期素依赖性激酶2(cyclin dependent kinase 2, CDK2)抗体和周期素E1(cyclin E1)抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为#3686、#18048、#4129);波形蛋白(vimentin)抗体、 α -SMA抗体(美国Santa Cruz公司,批号分别为sc-6260、sc-8432);PVDF膜和ELC化学发光液(美国Merck Millipore公司,批号分别为IPVH00005、WBKIS0100)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组、模型制备与给药

C57BL/6J小鼠随机分为正常(control, CON)组、BLM组、BLM + IRN低剂量(10 mg/kg)组和BLM + IRN高剂量(20 mg/kg)组,每组各12只。BLM(5 000 U/kg)气管注射(药物总量分两次注射,每次间隔30 min),制备肺纤维化模型。IRN用0.5%羧甲基纤维素钠充分混匀,于造模后第三天连续灌胃给药21天,CON组与BLM组灌胃给予等体积的0.5%羧甲基纤维素钠。

1.2.2 肺组织病理检测与胶原沉积分析

肺组织用4%多聚甲醛灌流后,参照我们前期实验方法进行HE及Masson染色^[10],光镜下观察肺

组织病理学变化及胶原沉积情况。根据文献^[13]以Ashcroft评分体系评价纤维化程度。此外,根据我们前期研究方法^[14],Masson染色结果以Image Pro Plus 6.0软件测量并计算小鼠肺组织胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF):

$$\text{CVF} = (\text{蓝色胶原纤维面积} / \text{视野总面积}) \times 100\%$$

1.2.3 肺组织 α -SMA免疫组化染色

肺组织用4%多聚甲醛灌流后,根据SABC-AP(链霉亲和素-碱性磷酸酶)免疫组化法检测肺组织 α -SMA蛋白表达, α -SMA一抗浓度为1:500。相应二抗浓度为1:2 000。肺组织 α -SMA蛋白阳性表达呈黄至棕黄色颗粒。

1.2.4 小鼠原代肺成纤维细胞培养及实验分组

组织法分离C57BL/6J小鼠肺成纤维细胞,并用差时贴壁法进行纯化,因成纤维细胞特异表达波形蛋白(vimentin)而上皮细胞波形蛋白表达比较低,经vimentin(1:500)细胞免疫荧光染色鉴定后(鉴定结果见图1),取3~6代细胞用于后续实验,具体培养方法详见我们前期研究成果^[11]。细胞实验设对照(Control)组、TGF- β 1 10 ng/mL剂量组、TGF- β 1 + IRN(5、10、20 μ mol/L)剂量组。细胞先用TGF- β 1预处理1 h,再加入IRN共孵育48 h。每组设2个复孔,实验重复3次。

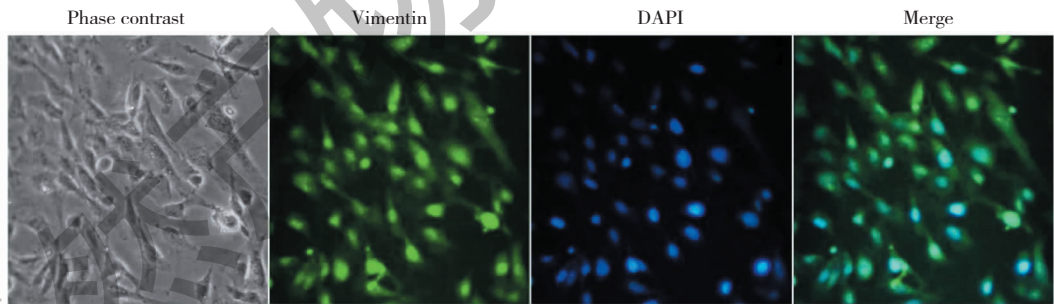


图1 细胞免疫荧光检测 Vimentin 的表达($\times 400$)

Fig. 1 The expression of vimentin was detected by cellular immunofluorescence ($\times 400$)

1.2.5 EdU 掺入法测定细胞增殖

细胞(4×10^4 /well)接种于96孔板,按照细胞实验方案处理细胞后,用BeyoClickTM EdU细胞增殖检测试剂盒检测细胞增殖情况。

1.2.6 流式细胞术测定细胞周期

细胞(1×10^6 /well)接种于6孔板处理后,按照细胞实验方案处理细胞后,收集肺成纤维细胞制成细胞悬液,细胞周期检测试剂盒染色后用流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.7 Transwell 细胞迁移实验

细胞(2×10^5 /well)接种于Transwell小室上室,按照细胞实验方案处理细胞后,用4%多聚甲醛固定细胞30 min,结晶紫染色液染色30 min,PBS洗涤后,显微镜下观察细胞迁移情况。

1.2.8 实时定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测相关基因表达

Trizol法提取肺组织和肺成纤维细胞总RNA,测定浓度后将其逆转录成cDNA。以2 μ L cDNA为

模板,20 μL 反应体系,用 StepOnePlus™ Real-Time PCR System 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件参照我们

前期的研究结果^[10]。以 GAPDH 为内参,用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各基因 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 实时定量聚合酶链式反应引物序列

Table 1 Primers sequence for RT-qPCR

基因名称 Gene name	基因序列代号 GenBank No.	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物长度 Product length (bp)
Collagen I	NM_007742.4	F:TGAACGTGACCAAAAACCAA R:GCAGAAAAGGCAGCATTAGG	176
α -SMA	NM_007392.3	F:CTGACAGAGGCACCCTGAA R:CATCTCCAGAGTCCAGCACA	160
TGF- β 1	NM_011577.2	F:TGAGTGGCTGTCTTTTGACG R:AGCCCTGTATTCCGTCTCT	71
GAPDH	NM_001289726.1	F:ACCCAGAAGACTGTGGATGG R:CACATTGGGGTAGGAACAC	54

1.2.9 Western blot 检测相关蛋白表达

收集 6 孔板细胞,加入 50 μL 0.1% PMSF 的 RIPA 裂解液;称取 200 mg 肺组织,液氮研磨后加入 300 μL 含 0.1% PMSF 的 RIPA 裂解液,吹打混匀,冰浴摇床裂解 40 min。4°C、12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清。BCA 法测定蛋白浓度。参照我们前期的研究方法进行 Western Blot 检测^[10]。相关蛋白一抗浓度分别为 TGF- β 1 (1:1 000)、collagen I (1:1 000)、 α -SMA (1:2 000)、p-ERK1/2 (1:2 000)、ERK1/2 (1:2 000)、p27^{Kip1} (1:1 000)、CDK2 (1:1 000)、Cyclin E1 (1:1 000) 及 GAPDH (1:2 000),相应二抗浓度 (1:2 000 ~ 1:5 000)。用 Image J 1.43 软件进行灰度值测量并统计分析蛋白相对表达量。

1.2.10 统计学方法

使用 SPSS 24 对数据进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IRN 对 PF 小鼠肺组织病理学变化的影响

HE 染色结果显示 CON 组肺泡结构正常,未见炎症反应,而 BLM 组肺泡结构出现萎缩和塌陷并发生融合,肺泡壁增宽增厚明显,且可见大量炎性细胞的浸润及分泌物,Ashcroft 评分纤维化程度明显升高 ($P < 0.01$)。而与 BLM 组相比,IRN 低、高两个剂量组给药 21 天后,上述肺组织病理损伤均有不同程度的减轻,纤维化评分明显降低 ($P < 0.05$) (见图 2、图 3)。

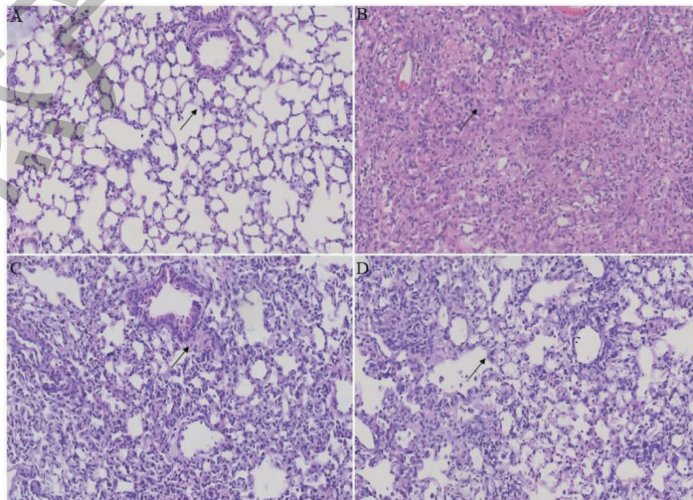


图 2 小鼠肺组织 HE 染色 ($\times 200$)

Fig. 2 HE staining of lung tissues in mice ($\times 200$)

注:A:对照组;B:博莱霉素组;C:异钩藤碱(10 mg/kg)剂量组;D:异钩藤碱(20 mg/kg)剂量组。下同。Note:A:Control group;B:Bleomycin group;C:IRN (10 mg/kg) group;D:IRN (20 mg/kg) group. The same below.

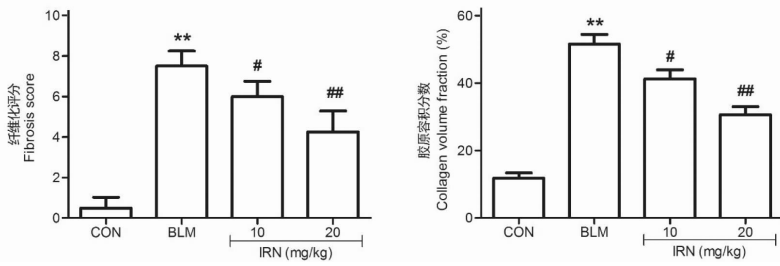


图3 肺组织纤维化评分及胶原容积分数 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 3 Fibrosis score and CVF in lung tissues ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$;与博莱霉素组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。下同。Note: Compared with control group, ** $P < 0.01$; Compared with bleomycin group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. The same below.

2.2 IRN对PF小鼠肺组织胶原及TGF β 1表达的影响

Masson染色结果显示, CON组肺组织可见少量蓝色胶原纤维,而BLM组肺组织可见大量蓝色胶原纤维的沉积, CVF明显升高($P < 0.05$)。而IRN低、高两个剂量组给药21天后,肺组织蓝色胶原纤维染色明显减少, CVF明显降低($P < 0.05$) (见图3、图4)。另外,与CON组相比, BLM组collagen I、TGF β 1 mRNA和蛋白表达明显升高($P < 0.01$)。与BLM组相比, IRN低、高剂量组TGF β 1、collagen I mRNA

和蛋白表达均明显降低($P < 0.05$) (见图5)。

2.3 IRN对PF小鼠肺组织 α -SMA表达的影响

免疫组化结果发现, CON组肺组织 α -SMA阳性表达水平较低, BLM组肺组织 α -SMA阳性表达明显增多,与BLM组相比, IRN低、高两个剂量组 α -SMA蛋白阳性表达均不同程度降低(见图6)。另外,与CON组相比, BLM组 α -SMA mRNA和蛋白表达明显升高($P < 0.01$)。与BLM组相比, IRN低、高两个剂量组 α -SMA mRNA和蛋白表达均明显降低($P < 0.05$) (见图7)。

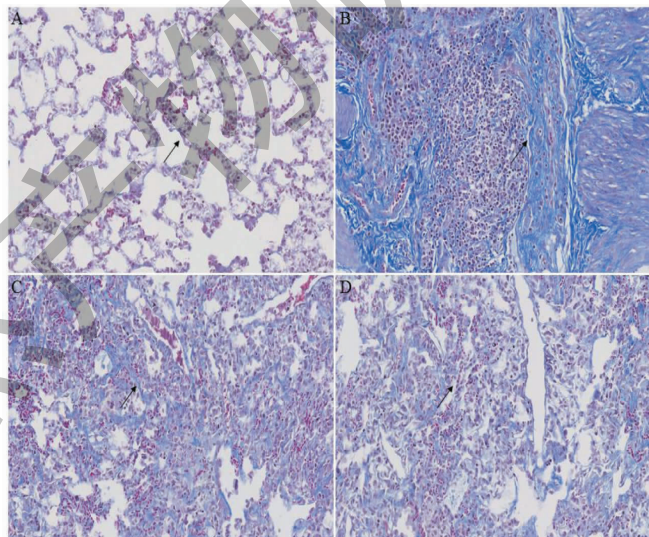


图4 小鼠肺组织 Masson 染色 ($\times 200$)

Fig. 4 Masson staining of lung tissues in mice ($\times 200$)

2.4 IRN对PF小鼠肺组织ERK1/2、p27^{Kip1}信号通路相关蛋白表达的影响

Western blot检测发现,与CON组相比, BLM组ERK1/2磷酸化水平明显升高、周期素依赖性激酶抑制蛋白p27^{Kip1}表达明显下调、CDK2和Cyclin E1

的表达明显上调($P < 0.01$)。与BLM组相比, IRN低、高两个剂量组ERK1/2磷酸化水平明显降低、p27^{Kip1}表达明显上调、CDK2和Cyclin E1的表达明显下调($P < 0.05$) (见图8)。

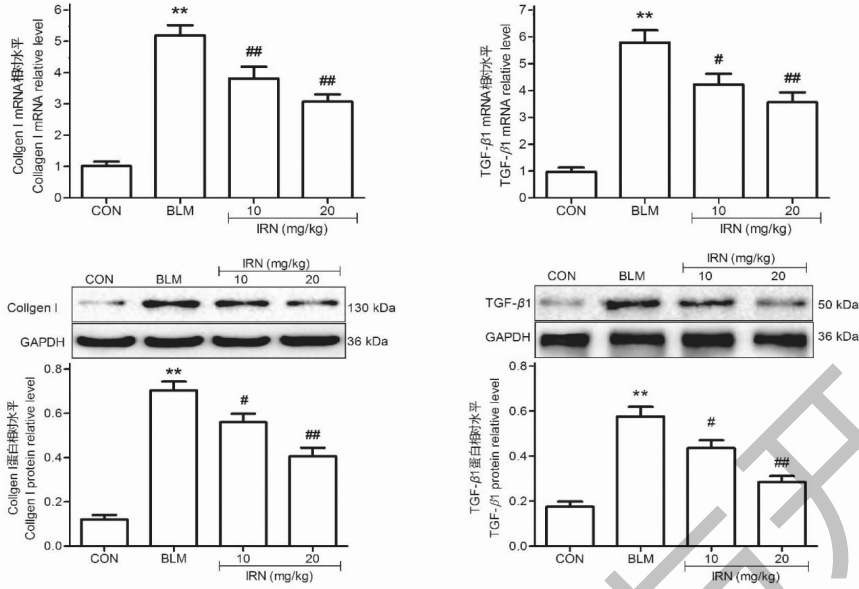


图 5 异钩藤碱对肺纤维化小鼠肺组织 TGFβ1、I 型胶原 mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
 Fig. 5 Effects of IRN on the expression of TGFβ1 and collagen I mRNA and protein in lung tissue of mice with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

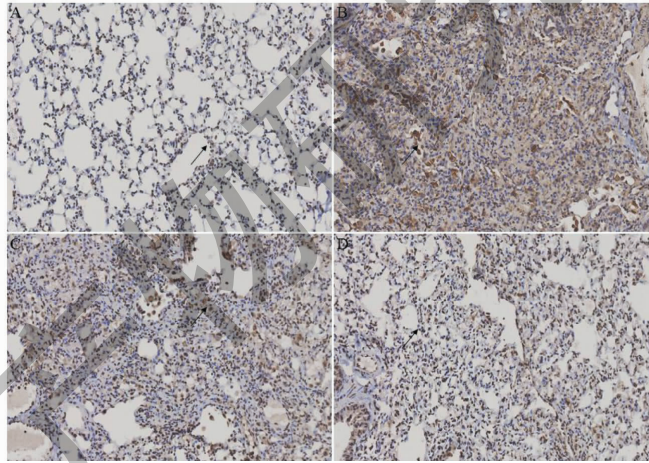


图 6 免疫组化检测肺组织 α-SMA 蛋白表达 (×200)
 Fig. 6 Immunohistochemical staining for analysis of α-SMA protein expression in lung tissues (×200)

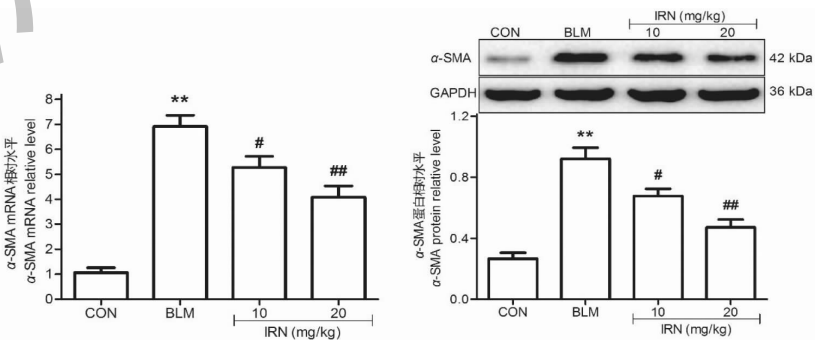


图 7 异钩藤碱对肺纤维化小鼠肺组织 α-SMA mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
 Fig. 7 Effect of IRN on mRNA and protein expression of α-SMA in lung tissue of mice with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

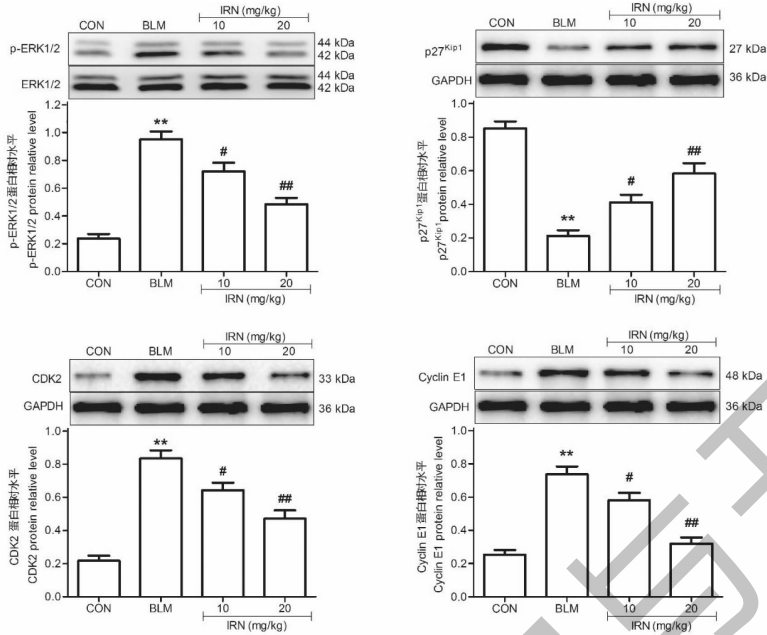


图 8 异钩藤碱对肺纤维化小鼠肺组织 p-ERK1/2、p27^{Kip1}、CDK2 和 Cyclin E1 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 8 Effect of IRN on proteins expression of p-ERK1/2, p27^{Kip1}, CDK2 and Cyclin E1 in lung tissue of mice with pulmonary fibrosis($\bar{x} \pm s, n=8$)

2.5 IRN 对原代肺成纤维细胞增殖和迁移的影响

与 CON 组相比, TGF- β 1 能显著诱导肺成纤维细胞增殖、明显增加(S 期 + G2 期)细胞周期比率($P < 0.01$), 而与 TGF- β 1 组相比, IRN 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组均不同程度地抑制肺成纤维细胞的增殖和降低细胞周期(S 期 + G2 期)比率($P < 0.05$)(见图 9 和图 10)。Transwell 实验检测结果显示, TGF- β 1 能显著提高小鼠肺成纤维细胞的迁移能力, 而与 TGF- β 1 组相比, IRN 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组均不同程度地降低肺成纤维细胞的迁移能力(见

图 11)。

2.6 IRN 对 TGF- β 1 诱导的小鼠肺成纤维细胞 α -SMA 和 collagen I 表达的影响

RT-qPCR 和 Western blot 检测发现, 与 Control 组相比, TGF- β 1 能显著上调肺成纤维细胞 α -SMA 和 collagen I mRNA 和蛋白表达($P < 0.01$)。而与 TGF- β 1 组相比, IRN 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组均不同程度地抑制 TGF- β 1 诱导的肺成纤维细胞 α -SMA 和 collagen I mRNA 和蛋白的表达($P < 0.05$)(见图 12)。

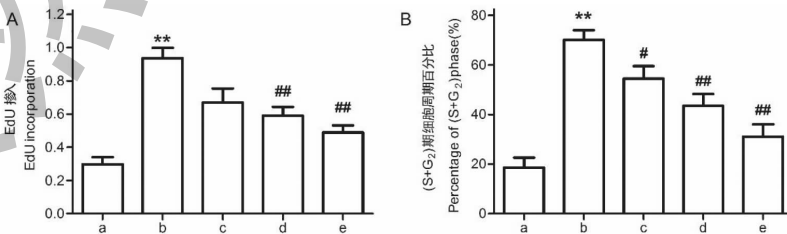


图 9 异钩藤碱对 TGF- β 1 诱导的小鼠肺成纤维细胞增殖和迁移的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 9 The effect of IRN on proliferation and migration ability induced by TGF- β 1 in lung fibroblasts of mice($\bar{x} \pm s, n=6$)

注: A: 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(Edu)掺入法检测细胞增殖; B: S 期和 G2 期细胞周期比率。a: 对照组; b: TGF- β 1 10 ng/mL 剂量组; c: TGF- β 1 + 异钩藤碱 5 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组; d: TGF- β 1 + 异钩藤碱 10 $\mu\text{mol/L}$; e: TGF- β 1 + 异钩藤碱 20 $\mu\text{mol/L}$ 。下同。Note: A: Cell proliferation was measured by Edu incorporation assay; B: The percentage of cells in S + G₂ phase. a: Control group; b: TGF- β 1 10 ng/mL group; c: TGF- β 1 + IRN 5 $\mu\text{mol/L}$ group; d: TGF- β 1 + IRN 10 $\mu\text{mol/L}$ group; e: TGF- β 1 + IRN 20 $\mu\text{mol/L}$ group. The same below.

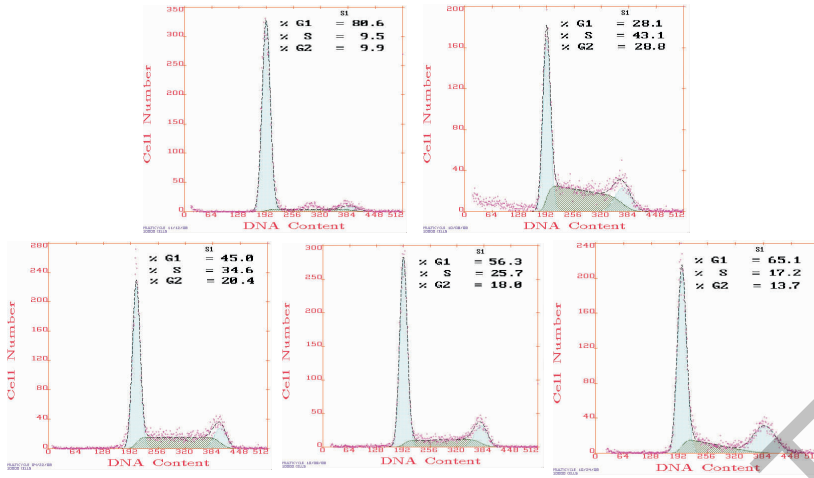


图 10 流式细胞术检测细胞周期

Fig. 10 Cell cycle distribution was monitored by flow cytometry

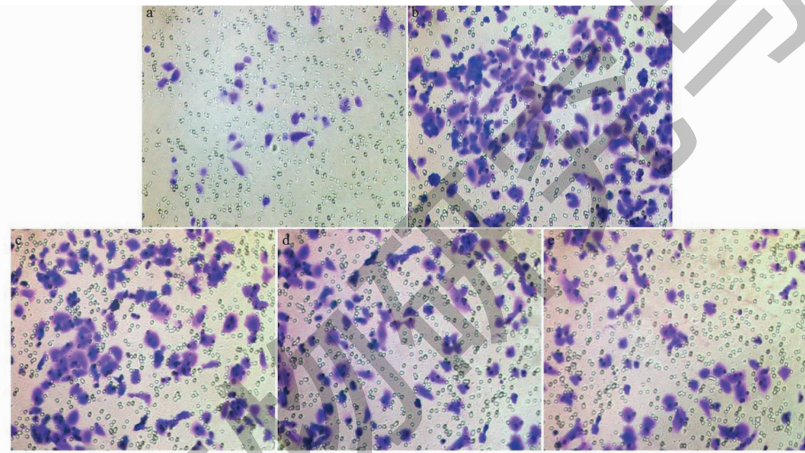


图 11 Transwell 实验观察肺成纤维细胞迁移能力

Fig. 11 The migration ability of lung fibroblasts was observed by transwell migration assay

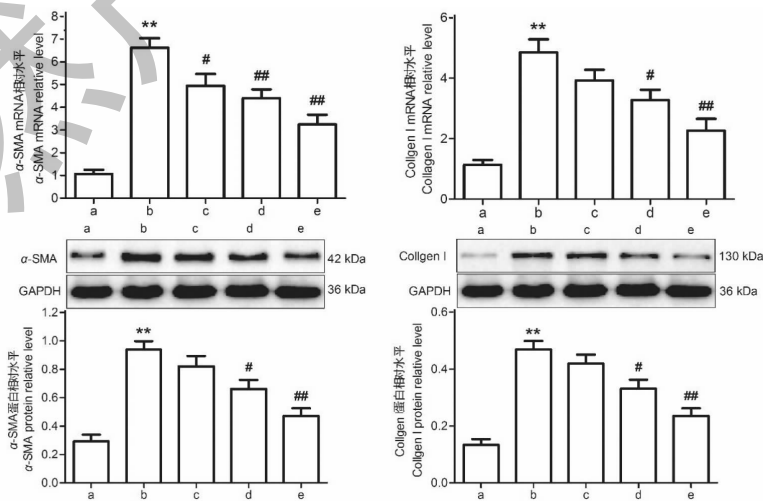


图 12 异钩藤碱对 TGF- β 1 诱导的小鼠肺成纤维细胞 α -SMA 和 collagen I mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 12 The effect of IRN on mRNA and proteins expression of α -SMA and collagen I induced by TGF- β 1 in lung fibroblasts of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.7 IRN 对 TGF- β 1 诱导的小鼠肺成纤维细胞 ERK1/2、p27^{Kip1} 信号通路相关蛋白表达影响

Western blot 检测发现,与 Control 组相比,TGF- β 1 能显著升高肺成纤维细胞 ERK1/2 磷酸化水平、明显下调 p27^{Kip1} 蛋白表达而显著上调 CDK2 和 cyclin E1 的表达。

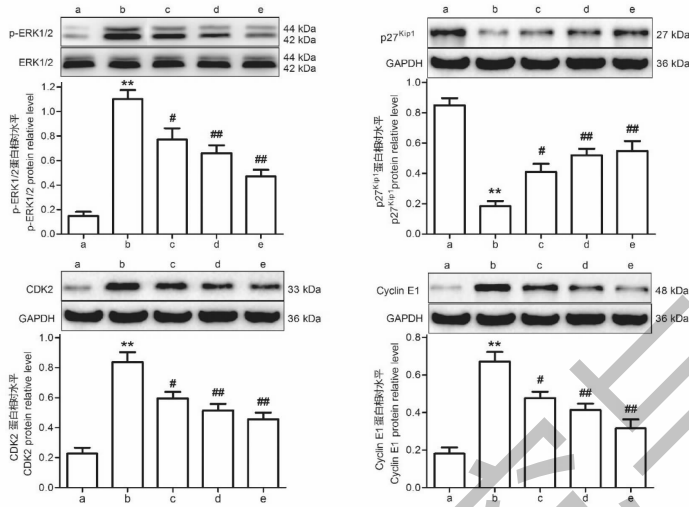


图 13 异钩藤碱对 TGF- β 1 诱导的小鼠肺成纤维细胞 p-ERK1/2、p27^{Kip1}、CDK2 和 Cyclin E1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 13 The effect of IRN on proteins expression of p-ERK1/2, p27^{Kip1}, CDK2 and Cyclin E1 induced by TGF- β 1 in lung fibroblasts of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3 讨论与结论

肺纤维化是一种进行性间质性疾病,其特征是成纤维细胞过度增殖和细胞外基质沉积,最终导致肺结构的破坏和纤维病灶的形成,预后较差^[15]。目前,治疗肺纤维化的药物主要是糖皮质激素与免疫抑制剂,但其具有较严重的副作用。近年来,随着对肺纤维化研究的不断深入,利用中药治疗肺纤维化的探索与应用逐渐增多。中药及其有效成分通过降低炎症因子表达、抑制肺成纤维细胞增殖、诱导肺成纤维细胞凋亡、阻断纤维化进程,表现出了良好的抗肺纤维化活性,并能够有效改善纤维化症状并延缓病程进展^[16,17]。前期研究发现生物碱类中药单体如甲基莲心碱、氧化苦参碱等都具有一定的缓解肺纤维化的作用^[18,19]。我们课题组前期研究还发现,含羞草碱和吴茱萸次碱对博莱霉素诱导的肺纤维化也有一定的缓解作用^[10,20]。另有研究表明,中药丹参素、丹酚酸 B 等通过抑制肺成纤维细胞增殖分化而改善了博莱霉素诱导的肺纤维化^[21,22]。而前期研究发现 IRN 通过抑制 PSMCs 增殖并减轻肺血管重塑而缓解 MCT 诱导的 PAH^[7],通过抑制支气管

平滑肌细胞增殖而对支气管哮喘具有一定的缓解作用^[8]。而本研究发现,给予 IRN 处理 21 天后,PF 小鼠肺组织胶原沉积和 collagen I 的表达明显减少、 α -SMA 的表达明显降低、肺损伤程度明显减轻。体外实验进一步发现,IRN 能够明显抑制 TGF- β 1 诱导的肺成纤维细胞增殖、显著降低 TGF- β 1 诱导的细胞迁移,不同程度地抑制 TGF- β 1 诱导肺成纤维细胞 α -SMA 和 collagen I 的表达。这些结果表明异钩藤碱可能通过抑制肺成纤维化细胞增殖分化而改善了 BLM 诱导的肺纤维化。

研究表明肺成纤维细胞增殖、迁移和分化为 MFb 在肺纤维化发展过程中起着重要的作用^[2]。其中,TGF- β 1 在成纤维细胞向 MFb 的增殖分化中起着关键作用。研究发现 TGF- β 1 即可通过激活 Smad 信号通路促进肺成纤维细胞的增殖分化,也可通过激活 MAPK 信号通路诱导肺成纤维细胞的增殖分化^[23]。周期素依赖性激酶抑制蛋白 p27^{Kip1} 是 CDK 抑制蛋白 Cip/Kip 家族的成员,是蛋白激酶 CDK2/cyclin E 的负调节因子,可在 G₀/G₁ 期阻断细胞周期。p27^{Kip1} 在细胞周期的 G₀/G₁ 期水平较高,

在有丝分裂刺激下, p27^{Kip1} 迅速降解, 从而允许 CDK2/cyclin E 的促进细胞增殖作用^[24]。我们课题组前期研究发现, TGF- β 1 通过上调 ERK1/2 磷酸化水平、抑制 p27^{Kip1} 的表达而诱导肺成纤维化细胞的增殖分化, 而 ERK1/2 抑制剂 PD98059 通过抑制 ERK1/2 磷酸化、上调 p27^{Kip1} 的表达而抑制 TGF- β 1 诱导的肺成纤维化细胞增殖活化^[11]。同时我们还发现, 含羞草碱通过上调 p27^{Kip1} 的表达而抑制了 TGF- β 1 诱导的肺成纤维化细胞增殖活化^[10]。而前期研究发现, IRN 通过抑制 ERK1/2 的磷酸化、上调 p27^{Kip1} 的表达而抑制了血小板活化因子诱导的 PASMCs 而缓解了 MCT 诱导的 PAH^[7]。进一步研究还发现, IRN 通过抑制 MAPK 信号通路而抑制了心肌肥厚的发展^[12]。本研究发现, IRN 给药 3 周后能够明显降低肺纤维化小鼠肺组织 TGF- β 1 的表达、抑制 ERK1/2 的磷酸化、上调 p27^{Kip1} 的表达而下调 CDK2/cyclin E1 的表达。体外实验进一步发现, IRN 能够明显抑制 TGF- β 1 诱导的 ERK1/2 磷酸化、显著上调 p27^{Kip1} 的表达而明显下调 CDK2/cyclin E1 的表达。这些结果提示 IRN 可能通过调控 ERK/p27^{Kip1} 而抑制肺成纤维化细胞的增殖分化。

综上所述, 我们的研究表明 IRN 可能通过抑制 ERK 信号通路、上调 p27^{Kip1} 的表达而抑制了成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化, 从而减轻了 BLM 诱导的 PF。本研究为 IRN 的临床应用提供了新的理论依据, 并为 PF 的治疗提供了新的思路。

参考文献

- Phan THG, Paliogiannis P, Nasrallah GK, et al. Emerging cellular and molecular determinants of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78: 2031-2057.
- Misharin AV, Budinger GRS. Targeting the myofibroblast in pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 198: 834-835.
- Wei P, Xie Y, Abel PW, et al. Transforming growth factor (TGF)- β 1-induced miR-133a inhibits myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(9): 670.
- Gharaee-Kermani M, Hu B, Phan SH, et al. Recent advances in molecular targets and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: focus on TGF beta signaling and the myofibroblast [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16: 1400-1417.
- Zhou Z, Su Y, Fa XE. Isorhynchophylline exerts anti-inflammatory and anti-oxidative activities in LPS-stimulated murine alveolar macrophages [J]. *Life Sci*, 2019, 223: 137-145.
- Xian YF, Fan D, Ip SP, et al. Antidepressant-like effect of isorhynchophylline in mice [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42: 678-685.
- Guo H, Zhang X, Cui Y, et al. Isorhynchophylline protects against pulmonary arterial hypertension and suppresses PASMCs proliferation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450: 729-734.
- Zhu J, Wang W, Wu X. Isorhynchophylline exerts anti-asthma effects in mice by inhibiting the proliferation of airway smooth muscle cells: The involvement of miR-200a-mediated FOXO1/NF- κ B pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 521: 1055-1060.
- Qiu M, Yang Z, Bian M, et al. Protective effects of isorhynchophylline against silicon-dioxide-induced lung injury in mice [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48: 1125-1134.
- Li XW, Hu CP, Li YJ, et al. Inhibitory effect of l-mimosine on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats: Role of eIF3a and p27 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 27(1): 53-64.
- Li XW, Li XH, Du J, et al. Calcitonin gene-related peptide down-regulates bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2016, 94: 1315-1324.
- Zhang Y, Cui Y, Dai S, et al. Isorhynchophylline enhances Nrf2 and inhibits MAPK pathway in cardiac hypertrophy [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2020, 393: 203-212.
- Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale [J]. *J Clin Pathol*, 1988, 41: 467-470.
- Li XW, Du J, Hu GY, et al. Fluorofenidone attenuates vascular remodeling in hypoxia-induced pulmonary hypertension of rats [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2014, 92(1): 58-69.
- Chanda D, Otoupalova E, Smith SR, et al. Developmental pathways in the pathogenesis of lung fibrosis [J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65: 56-69.
- Ding DL, Shen XB, Yao JH, et al. Research progress on traditional Chinese medicine against treating pulmonary fibrosis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2021, 52: 7006-7024.
- Zhao MY, Jiang MB, Yang X, et al. Study on the molecular

- mechanism of Astragali Radix in treating idiopathic pulmonary fibrosis based on network pharmacology and molecular docking[J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2021, 33:1582-1592.
- 18 Niu CH, Wang Y, Liu JD, et al. Protective effects of neferine on amiodarone-induced pulmonary fibrosis in mice[J]. Eur J Pharmacol, 2013, 714(1-3):112-119.
- 19 Liu L, Lu W, Ma Z, et al. Oxymatrine attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice via the inhibition of inducible nitric oxide synthase expression and the TGF- β /Smad signaling pathway[J]. Int J Mol Med, 2012, 29:815-822.
- 20 Gao YX, Jiang LL, Zhang Q, et al. Rutaecarpine protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis through inhibiting Notch1/eIF3a signaling pathway in rats [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2018, 43:3530-3538.
- 21 Liu M, Xu H, Zhang L, et al. Salvianolic acid B inhibits myofibroblast transdifferentiation in experimental pulmonary fibrosis via the up-regulation of Nr2 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 495:325-331.
- 22 Liu H, Zhang X, Shao Y, et al. Danshensu alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibiting lung fibroblast-to-myofibroblast transition via the MEK/ERK signaling pathway[J]. Bioengineered, 2021, 12:3113-3124.
- 23 Liu J, Zhao B, Zhu H, et al. Wnt4 negatively regulates the TGF- β 1-induced human dermal fibroblast-to-myofibroblast transition via targeting Smad3 and ERK [J]. Cell Tissue Res, 2020, 379:537-548.
- 24 Egozi D, Shapira M, Paor G, et al. Regulation of the cell cycle inhibitor p27 and its ubiquitin ligase Skp2 in differentiation of human embryonic stem cells [J]. FASEB J, 2007, 21:2807-2817.

(上接第 779 页)

- 18 Elmowafy SA, Kh AEG, Elmessery SM, et al. Aspirin is an efficient inhibitor of quorum sensing, virulence and toxins in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Microb Pathogenesis, 2014, 74(1):25-32.
- 19 Garcíacontreras R, Pérezeretzta B, Jassochávez R, et al. High variability in quorum quenching and growth inhibition by furanone C-30 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from cystic fibrosis patients [J]. Pathog Dis, 2015, 73(6):ftv040.
- 20 Chen Y, Zhao J, Zhang JH, et al. Effect of gallnut decoction on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm [J]. J Mod Med Health (现代医药卫生), 2017, 33:3092-3094.
- 21 Song SS, Yang AH, Wang WW, et al. Study on the antibacterial activity of the extract from *Polygonum chinense* [J]. J Anhui Agr Sci (安徽农业科学), 2021, 49(12):187-189.
- 22 Pandey S. Preliminary phytochemical screening and *in vitro* antibacterial activity of *Bauhinia variegata* Linn. against human pathogens [J]. Asian Pac J Trop Dis, 2015, 5(2):123-129.