

• 论著 •

地高辛可通过调控 PI3K/Akt 信号抑制成纤维细胞活化改善肺纤维化——一项体内与体外实验

贾利丹 杨苗 田鑫荣 赵鹏 梅雪 白云苹

河南中医药大学呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心,河南省中医药防治呼吸病重点实验室,郑州 450046

通信作者:白云苹, Email: baiyunping@126.com

【摘要】 目的 通过体内实验和体外实验探讨地高辛对博莱霉素诱导肺纤维化小鼠的作用及其可能机制。**方法** ① 体内实验:将 60 只 C57/BL6J 小鼠按随机数字表法分为对照组、肺纤维化模型组(模型组)、吡非尼酮(300 mg/kg)组及地高辛 1.0 mg/kg、0.2 mg/kg 组,每组 12 只。一次性气管内滴注博莱霉素 5 mg/kg 制备小鼠肺纤维化模型;对照组给予等量无菌生理盐水。制模后次日起各组灌胃相应药物,每日 1 次,持续 28 d;对照组及模型组给予等量生理盐水。处死小鼠取肺组织,检测肺系数;苏木素-伊红(HE)及 Masson 染色后,光镜下观察肺组织形态学和胶原变化;采用免疫组化法检测肺组织中肌成纤维细胞标志物 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)及细胞外基质(ECM)胶原蛋白(COL- I、COL- III)阳性表达;采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测肺组织中 ECM 纤维连接蛋白(FN)、转化生长因子- β (TGF- β)及磷酸化 Smad3(p-Smad3)的蛋白表达。② 体外实验:体外培养人胚肺成纤维细胞(HFL-1),当细胞密度达到 70%~90% 时分为空白对照组、细胞活化模型组(模型组)、吡非尼酮(2.5 mmol/L)组及地高辛 100 nmol/L、50 nmol/L 组。给予相应药物处理 3 h 后,除空白对照组外,其余各组加入诱导剂 TGF- β 处理 48 h 制备细胞活化模型。Western blotting 检测细胞中 α -SMA、FN、p-Smad3 蛋白表达及磷脂酰肌醇 3 激酶/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(PI3K/Akt)通路蛋白 PI3K、Akt 的磷酸化(p-PI3K、p-Akt)水平。**结果** ① 体内实验结果:与对照组比较,模型组小鼠肺泡结构破坏明显,大量炎症细胞浸润,肺间质内胶原沉积,且肺组织中 ECM 沉积增加, α -SMA、FN、TGF- β 、p-Smad3 的蛋白表达水平均显著升高,说明博莱霉素诱导小鼠肺纤维化模型制备成功。与模型组比较,地高辛可以显著抑制气道炎症、胶原纤维沉积,减少 ECM 沉积,降低 α -SMA、FN、TGF- β 、p-Smad3 的蛋白表达,且效果优于吡非尼酮组,除 FN 外以地高辛 1.0 mg/kg 组效果更好[α -SMA(A 值): 5.37 ± 1.10 比 9.51 ± 1.66 , TGF- β 蛋白(TGF- β /GAPDH): 0.09 ± 0.04 比 0.33 ± 0.23 , p-Smad3 蛋白(p-Smad3/GAPDH): 0.05 ± 0.01 比 0.20 ± 0.07 , 均 $P < 0.01$]。② 体外实验结果:与空白对照组比较,模型组细胞 FN、 α -SMA、p-Smad3 及 PI3K/Akt 信号蛋白表达均增加,表明 TGF- β 诱导的成纤维细胞活化模型建立成功。与模型组比较,地高辛可以显著抑制成纤维细胞活化,明显降低 FN、 α -SMA、p-Smad3 及 PI3K/Akt 通路蛋白表达,且效果优于吡非尼酮组,其中以地高辛 100 nmol/L 组 FN、 α -SMA 及 p-Akt 表达降低更为明显[FN 蛋白(FN/GAPDH): 0.21 ± 0.15 比 0.88 ± 0.22 , α -SMA 蛋白(α -SMA/GAPDH): 0.20 ± 0.01 比 0.50 ± 0.08 , p-Akt 蛋白(p-Akt/GAPDH): 0.30 ± 0.01 比 0.65 ± 0.10 , 均 $P < 0.01$]。**结论** 地高辛对博莱霉素诱导的小鼠肺纤维化具有保护作用,其机制可能与调节 PI3K/Akt 信号通路抑制成纤维细胞活化有关,并呈一定剂量依赖性。

【关键词】 肺纤维化; 地高辛; 成纤维细胞; 磷脂酰肌醇 3 激酶/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶**基金项目:** 国家自然科学基金(81904170);河南省科技发展计划项目(212102310356, 202102310496);河南省高等学校青年骨干教师培养计划项目(2018GGJS085)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220628-00508

Digoxin alleviates pulmonary fibrosis by regulating phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signaling through inhibiting the activation of fibroblast: an *in vivo* and *in vitro* experiment

Jia Lidan, Yang Miao, Tian Xinrong, Zhao Peng, Mei Xue, Bai Yunping

Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education Ministry, Henan Key Laboratory of Chinese Medicine for Respiratory Disease, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan, China

Corresponding author: Bai Yunping, Email: baiyunping@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of digoxin on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice, and investigate its possible mechanism through *in vitro* and *in vivo* experiments. **Methods** ① *In vivo* experiment: 60 C57/BL6J mice were randomly divided into control group, pulmonary fibrosis model group (model group), pirfenidone (300 mg/kg) group, digoxin 1.0 mg/kg and 0.2 mg/kg groups, with 12 mice in each group. The pulmonary fibrosis model of mice was reproduced by single intratracheal infusion of bleomycin (5 mg/kg). The control group was given the same

amount of sterile normal saline. From the next day after modeling, each group was received corresponding drugs by intragastric administration once a day for 28 days. Control group and model group were given the same amount of normal saline. The mice were sacrificed and the lung tissue was collected to detect the lung coefficient. After hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining, the lung tissue morphology and collagen changes were observed under light microscope. Immunohistochemistry was used to detect the positive expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA) and extracellular matrix (ECM) collagen (COL- I and COL- III) in lung tissue. The protein expressions of ECM fibronectin (FN), transforming growth factor- β (TGF- β) and phosphorylation of Smad3 (p-Smad3) in lung tissue were detected by Western blotting. ② *In vitro* experiment: human embryonic lung fibroblast-1 (HFL-1) cells were cultured and divided into blank control group, fibroblast activation model group (model group), pirfenidone (2.5 mmol/L) group and digoxin 100 nmol/L and 50 nmol/L groups when cell density reached 70%–90%. After 3-hour treatment with corresponding drugs, except blank control group, the other groups were treated with TGF- β for 48 hours to establish fibroblast activation model. The expressions of α -SMA, FN and p-Smad3 proteins and the phosphorylations of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt pathway proteins PI3K and Akt (p-PI3K, p-Akt) were detected by Western blotting. **Results** ① *In vivo*, compared with the control group, the alveolar structure of mice in the model group was significantly damaged, a large number of inflammatory cells infiltrated, collagen deposition in the lung interstitium was increased, the deposition of ECM in the lung tissue was also increased, and the expressions of α -SMA, FN, TGF- β and p-Smad3 protein were increased, indicating that the model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice was successfully prepared. Compared with the model group, digoxin significantly inhibited airway inflammation and collagen fiber deposition, reduced ECM deposition, and decreased the protein expressions of α -SMA, FN, TGF- β and p-Smad3, while the effect was better than that of the pirfenidone group, and the digoxin 1.0 mg/kg group had a better effect except FN [α -SMA (A value): 5.37 ± 1.10 vs. 9.51 ± 1.66 , TGF- β protein (TGF- β /GAPDH): 0.09 ± 0.04 vs. 0.33 ± 0.23 , p-Smad3 protein (p-Smad3/GAPDH): 0.05 ± 0.01 vs. 0.20 ± 0.07 , all $P < 0.01$]. ② *In vitro*, compared with the blank control group, the expressions of FN, α -SMA, p-Smad3 and PI3K/Akt signaling proteins in the model group were increased, indicating that the fibroblast activation model induced by TGF- β was successfully reproduced. Compared with the model group, digoxin significantly inhibited fibroblast activation, and decreased the expressions of FN, α -SMA, p-Smad3, and PI3K/Akt pathway proteins, moreover, the effect was better than that of the pirfenidone group, and decreased FN, SMA and p-Akt protein expressions were more obvious in digoxin 100 nmol/L group [FN protein (FN/GAPDH): 0.21 ± 0.15 vs. 0.88 ± 0.22 , α -SMA protein (α -SMA/GAPDH): 0.20 ± 0.01 vs. 0.50 ± 0.08 , p-Akt protein (p-Akt/GAPDH): 0.30 ± 0.01 vs. 0.65 ± 0.10 , all $P < 0.01$]. **Conclusion** Digoxin could suppress the pulmonary fibrosis in mice induced by bleomycin, which might be associated with the regulation of fibroblast activation via suppressing PI3K/Akt signaling pathway in a dose-dependent manner.

【Key words】 Pulmonary fibrosis; Digoxin; Fibroblast proliferation; Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81904170); Henan Provincial Key Scientific and Technological Research and Development Planning Project (212102310356, 202102310496); Training Program for Young Backbone Teachers of Colleges and Universities in Henan Province (2018GCGJS085)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220628-00508

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种典型的慢性进行性间质性肺病, 主要病理表现是细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 沉积, 肺部结构破坏, 肺顺应性下降, 出现进行性呼吸困难、呼吸衰竭^[1-2], 患者中位生存期仅 2~4 年^[3]。吡非尼酮和尼达尼布是治疗 IPF 的两种新药, 可延缓疾病进程^[4-5], 但患者需终生用药, 经济负担大, 且具有肝毒性^[6]。因此, 寻找有效、经济的 IPF 治疗药物具有重要意义。

IPF 发病机制尚无明确定论, 普遍认为是肺组织反复损伤与异常修复, 其中成纤维细胞过度增殖、活化成为肌成纤维细胞, 高表达 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、胶原蛋白 (collagens, COL- I、COL- III) 和纤维连接蛋白 (fibronectin, FN), 造成了 ECM 堆积^[7-9]。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 与成纤维细胞表面相应受体结合, 经 Smad 信号通路转导, 使该诱导因子与成

纤维细胞相互作用, 诱导成纤维细胞活化为肌成纤维细胞^[10]。磷脂酰肌醇 3 激酶 / 丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase/Akt, PI3K/Akt) 信号可独立于 TGF- β /Smad 信号, 参与 TGF- β 诱导成纤维细胞活化过程^[11]。

老药新用是对现有临床药物的适应证进行再探索, 也是寻找有效药物的重要途径^[12]。地高辛是治疗心力衰竭等心脏疾病的临床常用药物^[13]。本研究基于博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型, 探讨地高辛对肺纤维化的作用及其调控 PI3K/Akt 信号抑制成纤维细胞活化的机制。

1 材料与方法

1.1 伦理学: 本次研究属于国家自然科学基金项目 (81904170) 内容, 动物及细胞处置方法符合伦理法规定, 并通过河南中医药大学第一附属医院实验动物福利伦理审查委员会审批 (审批号: YFYDW2017013)。

1.2 体内实验: SPF 级健康 C57/BL6J 小鼠 60 只, 雄

性,体质量 18~20 g,购于北京维通利华有限公司,许可证号:SCXK(京)2016-0002。正常饲养,环境温度 18~26 ℃,12 h/12 h 明暗周期照射。适应性饲养 1 周,按随机数字表法分为对照组、肺纤维化模型组(模型组)、吡非尼酮(300 mg/kg)组和地高辛 1.0 mg/kg、0.2 mg/kg 组,每组 12 只。腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉小鼠,一次性气管内滴注博来霉素 5 mg/kg 制备肺纤维化模型;对照组滴注等量无菌生理盐水。制模后次日起各组给予相应药物灌胃,每日 1 次,持续 28 d;对照组及模型组给予等量生理盐水。

1.3 体外实验:人胚胎肺成纤维细胞(human fetal lung fibroblast-1, HFL-1)培养于含 10% 胎牛血清的 F-12k 培养基中,当细胞密度达 70%~90% 时,分为空白对照组、细胞活化模型组(模型组)、吡非尼酮(2.5 mmol/L)组和地高辛 50 nmol/L、100 nmol/L 组。给予相应药物处理 3 h 后,除空白对照组外,其余各组加入诱导剂 TGF- β 处理 48 h 制备细胞活化模型。

1.4 检测指标及方法:体内实验各组于给药后第 29 天处死 6 只小鼠,取肺组织称重,计算肺系数(肺系数=肺湿质量/体质量 $\times$ 100%);取左肺固定于多聚甲醛中,其余肺组织经液氮速冻后 -80 ℃ 保存。

1.4.1 肺组织病理检测:取浸泡于多聚甲醛中的左肺组织,石蜡包埋、切片(厚度 4 μ m),行苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)和 Masson 染色,在显微镜下观察肺组织的形态结构及胶原纤维变化,并进行肺泡炎和肺纤维化评分。

1.4.2 肺组织免疫组化检测:取肺组织,石蜡包埋、切片,烘片、脱蜡、抗原修复,3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,封闭 30 min,分别滴加一抗 COL- I、COL- III、 α -SMA,4 ℃ 过夜,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)清洗后加入二抗,3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色,苏木素复染,盐酸乙醇分化后 PBS 水洗返蓝,脱水透明,中性树胶封片,通风橱晾干。于显微镜下观察 COL- I、COL- III 和 α -SMA 表达(阳性表达呈棕褐色),拍照记录,使用 ImagePro-Plus 6.0 软件分析免疫组化染色结果,用吸光度(absorbance, A)值反映表达量。

1.4.3 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting):提取肺组织或 HFL-1 细胞的总蛋白,采用 BCA 法进行蛋白定量。制备分离浓缩胶,经上样、电泳、转膜后,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入 FN、 α -SMA、TGF- β 和磷酸化 Smad3、PI3K、Akt(phosphorylations of Smad3, PI3K, Akt; p-Smad3, p-PI3K, p-Akt),以

及内参照 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体,置于摇床上 4 ℃ 孵育过夜;洗膜后,加入二抗室温孵育 1 h;洗膜后,电化学发光法显影,应用 Image Lab 软件分析条带灰度值,以目的蛋白与 GAPDH 的灰度值比值表示目的蛋白表达量。

1.5 统计学方法:采用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计学分析。计量资料均符合正态分布,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)进行统计描述,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐者采用最小显著差异法(least-significant difference, LSD),方差不齐者则采用 Dunnett T3 法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体内实验结果

2.1.1 地高辛可改善肺纤维化小鼠肺组织病理学改变(表 1;图 1):对照组肺组织无明显病理学改变及胶原沉积;与对照组比较,模型组肺泡结构完整性遭到破坏,大量炎症细胞浸润,肺泡壁和肺间隔明显增厚,肺间质内有蓝色胶原沉积,且肺泡炎和肺纤维化评分均明显升高(均 $P<0.01$);与模型组比较,地高辛 1.0 mg/kg、0.2 mg/kg 组炎症细胞浸润减少,肺泡壁增厚程度减轻,肺间质胶原沉积减少,肺泡炎和肺纤维化评分均明显降低(均 $P<0.01$),且效果优于吡非尼酮组,其中以地高辛 1.0 mg/kg 组效果更为显著。

表 1 各组小鼠肺组织病理学评分及肺系数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数 (只)	肺泡炎 评分(分)	肺纤维化 评分(分)	肺系数 (%)
对照组	6	0.94 $\pm$ 0.57	1.11 $\pm$ 1.36	0.48 $\pm$ 0.07
肺纤维化模型组	6	2.67 $\pm$ 0.30 ^a	4.61 $\pm$ 0.98 ^a	0.67 $\pm$ 0.05 ^a
吡非尼酮组	6	1.94 $\pm$ 0.77 ^b	2.67 $\pm$ 0.87 ^b	0.53 $\pm$ 0.09 ^c
地高辛 1.0 mg/kg 组	6	1.33 $\pm$ 0.42 ^c	1.33 $\pm$ 0.42 ^c	0.46 $\pm$ 0.09 ^c
地高辛 0.2 mg/kg 组	6	1.39 $\pm$ 0.33 ^c	1.39 $\pm$ 0.39 ^c	0.54 $\pm$ 0.04 ^c

注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与肺纤维化模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$

2.1.2 地高辛可降低肺纤维化小鼠肺系数(表 1):与对照组比较,模型组肺系数明显升高($P<0.01$);与模型组比较,地高辛 1.0 mg/kg、0.2 mg/kg 组肺系数显著降低(均 $P<0.01$),其中以地高辛 1.0 mg/kg 组效果更好,且优于吡非尼酮组。

2.1.3 地高辛可抑制肺纤维化小鼠肺组织 COL- I、COL- III 及 α -SMA 阳性表达(表 2;图 2):与对照组比较,模型组小鼠肺组织 COL- I、COL- III、 α -SMA 阳性表达显著增加(均 $P<0.01$);与模型组比较,地高辛 1.0 mg/kg、0.2 mg/kg 组肺组织 COL- I、COL- III、

α -SMA 阳性表达显著降低(均 $P<0.01$),且效果优于吡非尼酮组,其中以地高辛 1.0 mg/kg 组效果更好。

2.1.4 地高辛可以抑制肺纤维化小鼠肺组织中 FN、TGF- β 、p-Smad 蛋白表达(图 3;表 3):与对照组比较,模型组小鼠肺组织 FN、TGF- β 、p-Smad3 蛋白表达均显著增加(均 $P<0.05$);与模型组比较,地高辛 1.0 mg/kg、0.2 mg/kg 组肺组织上述蛋白表达均显著下调(均 $P<0.05$),且效果优于吡非尼酮组,其中以地高辛 1.0 mg/kg 组 TGF- β 、p-Smad3 下调更为明显。

表 2 各组小鼠肺组织 COL- I、COL- III 及 α -SMA 阳性表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	COL- I (A 值)	COL- III (A 值)	α -SMA (A 值)
对照组	6	5.85 $\pm$ 0.56	5.50 $\pm$ 0.96	4.96 $\pm$ 0.60
肺纤维化模型组	6	9.80 $\pm$ 1.35 ^a	13.27 $\pm$ 1.95 ^a	9.51 $\pm$ 1.66 ^a
吡非尼酮组	6	7.50 $\pm$ 1.59 ^b	7.15 $\pm$ 1.04 ^b	5.70 $\pm$ 0.63 ^c
地高辛 1.0 mg/kg 组	6	7.20 $\pm$ 1.42 ^b	6.58 $\pm$ 3.00 ^b	5.37 $\pm$ 1.10 ^b
地高辛 0.2 mg/kg 组	6	7.44 $\pm$ 0.68 ^b	6.91 $\pm$ 2.53 ^b	5.51 $\pm$ 0.72 ^b

注:COL 为胶原蛋白, α -SMA 为 α -平滑肌肌动蛋白;与对照组比较,^a $P<0.01$;与肺纤维化模型组比较,^b $P<0.01$,^c $P<0.05$

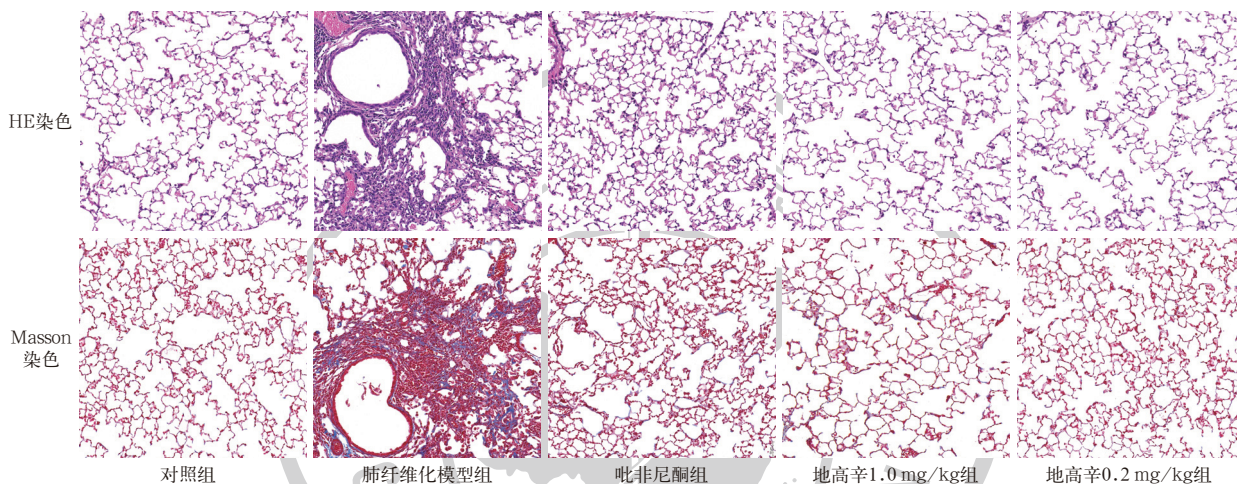


图 1 光镜下观察各组小鼠肺组织病理学改变 对照组肺泡形态基本正常,肺组织无明显病理学改变(HE 染色)和胶原沉积(Masson 染色)。肺纤维化模型组肺组织有大量炎症细胞浸润,肺泡破裂充血,肺泡壁增厚(HE 染色);蓝色胶原沉积,且集中于大支气管周围(Masson 染色)。吡非尼酮组肺组织有少量炎症细胞浸润(HE 染色)及胶原沉积(Masson 染色);地高辛 1.0 mg/kg、0.2 mg/kg 组肺组织炎症细胞浸润较模型组明显减少,肺泡结构明显改善(HE 染色);胶原沉积亦较模型组明显减少(Masson 染色) 中倍放大

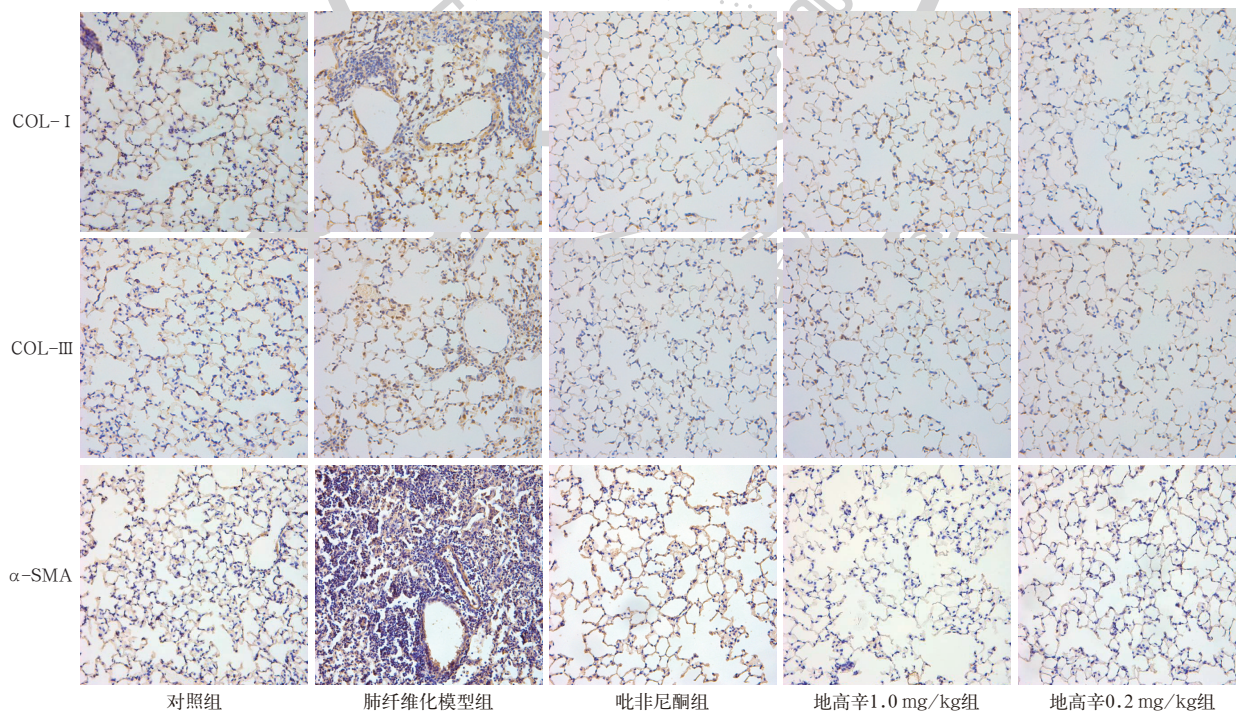
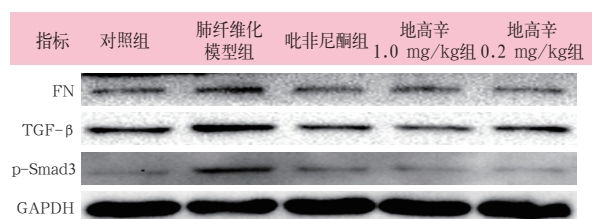


图 2 光镜下观察各组小鼠肺组织胶原蛋白(COL- I、COL- III)及 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)阳性表达 蛋白阳性表达呈棕褐色。对照组肺组织胶原沉积不明显,仅有少量 COL- I、COL- III 和 α -SMA 阳性表达;肺纤维化模型组肺组织胶原沉积明显,COL- I、COL- III 和 α -SMA 阳性表达明显增加,且多集中在气管周围表达;吡非尼酮组、地高辛 1.0 mg/kg、0.2 mg/kg 组肺组织 COL- I、COL- III 及 α -SMA 阳性表达均较模型组明显减少 中倍放大



Western blotting 为蛋白质免疫印迹试验, FN 为纤维连接蛋白, TGF-β 为转化生长因子-β, p-Smad3 为磷酸化 Smad3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 3 Western blotting 检测各组小鼠肺组织 FN、TGF-β 及 p-Smad3 的蛋白表达

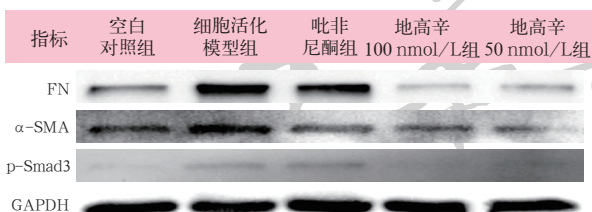
表 3 各组小鼠肺组织 FN、TGF-β 及 p-Smad3 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	FN 蛋白 (FN/GAPDH)	TGF-β 蛋白 (TGF-β/GAPDH)	p-Smad3 蛋白 (p-Smad3/GAPDH)
对照组	6	0.02 ± 0.01	0.11 ± 0.08 ^a	0.05 ± 0.02
肺纤维化模型组	6	0.10 ± 0.03 ^a	0.33 ± 0.23 ^b	0.20 ± 0.07 ^b
吡非尼酮组	6	0.07 ± 0.05	0.14 ± 0.05	0.08 ± 0.08 ^b
地高辛 1.0 mg/kg 组	6	0.04 ± 0.02 ^c	0.09 ± 0.04 ^c	0.05 ± 0.01 ^c
地高辛 0.2 mg/kg 组	6	0.04 ± 0.01 ^c	0.10 ± 0.07 ^c	0.05 ± 0.05 ^c

注: FN 为纤维连接蛋白, TGF-β 为转化生长因子-β, p-Smad3 为磷酸化 Smad3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与对照组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与肺纤维化模型组比较, ^c $P < 0.05$

2.2 体外实验结果

2.2.1 地高辛可抑制成纤维细胞活化(图 4; 表 4): 与空白对照组比较, 模型组细胞中的 FN、α-SMA、p-Smad3 蛋白表达显著增加(均 $P < 0.05$); 与模型组比较, 地高辛 100 nmol/L、50 nmol/L 组 FN、α-SMA、p-Smad3 蛋白表达显著减少(均 $P < 0.01$), 且效果优于吡非尼酮组, 以地高辛 100 nmol/L 组 FN、α-SMA 降低更为明显。



Western blotting 为蛋白质免疫印迹试验, HFL-1 为人胚肺成纤维细胞, FN 为纤维连接蛋白, TGF-β 为转化生长因子-β, p-Smad3 为磷酸化 Smad3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 4 Western blotting 检测各组小鼠 HFL-1 细胞中 FN、TGF-β 及 p-Smad3 的蛋白表达

2.2.2 地高辛可抑制成纤维细胞 PI3K/Akt 信号通路(图 5; 表 5): 与空白对照组比较, 模型组细胞 Akt、PI3K 磷酸化水平显著上调(均 $P < 0.05$); 与模型组比较, 地高辛 100 nmol/L、50 nmol/L 组 Akt、PI3K 磷酸化水平显著下调(均 $P < 0.05$), 且效果优于吡非尼酮组, 以地高辛 100 nmol/L 组 p-Akt 下调更为显著。

表 4 各组 HFL-1 细胞中 FN、α-SMA 及 p-Smad3 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量 (孔)	FN 蛋白 (FN/GAPDH)	α-SMA 蛋白 (α-SMA/GAPDH)	p-Smad3 蛋白 (p-Smad3/GAPDH)
空白对照组	3	0.36 ± 0.19	0.20 ± 0.03	0.11 ± 0.03
细胞活化模型组	3	0.88 ± 0.22 ^a	0.50 ± 0.08 ^a	0.24 ± 0.08 ^b
吡非尼酮组	3	0.56 ± 0.17	0.49 ± 0.08	0.20 ± 0.08
地高辛 100 nmol/L 组	3	0.21 ± 0.15 ^c	0.20 ± 0.01 ^c	0.09 ± 0.03 ^c
地高辛 50 nmol/L 组	3	0.22 ± 0.22 ^c	0.21 ± 0.04 ^c	0.06 ± 0.03 ^c

注: HFL-1 为人胚肺成纤维细胞, FN 为纤维连接蛋白, TGF-β 为转化生长因子-β, p-Smad3 为磷酸化 Smad3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与空白对照组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与细胞活化模型组比较, ^c $P < 0.01$



Western blotting 为蛋白质免疫印迹试验, HFL-1 为人胚肺成纤维细胞, p-Akt 为磷酸化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, p-PI3K 为磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 5 Western blotting 检测各组小鼠 HFL-1 细胞中 p-Akt、p-PI3K 蛋白表达

表 5 各组 HFL-1 细胞中 p-Akt、p-PI3K 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量 (孔)	p-Akt 蛋白 (p-Akt/GAPDH)	p-PI3K 蛋白 (p-PI3K/GAPDH)
空白对照组	3	0.30 ± 0.08	0.10 ± 0.03
细胞活化模型组	3	0.65 ± 0.10 ^a	0.34 ± 0.05 ^b
吡非尼酮组	3	0.61 ± 0.02	0.37 ± 0.34
地高辛 100 nmol/L 组	3	0.30 ± 0.01 ^c	0.14 ± 0.03 ^d
地高辛 50 nmol/L 组	3	0.41 ± 0.10 ^c	0.10 ± 0.03 ^d

注: HFL-1 为人胚肺成纤维细胞, p-Akt 为磷酸化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, p-PI3K 为磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与空白对照组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与细胞活化模型组比较, ^c $P < 0.01$, ^d $P < 0.05$

3 讨论

IPF 是一种慢性进行性、致命性的肺部疾病, 最终由于肺部功能下降而发生呼吸衰竭、死亡^[14-15]。IPF 的病理特征早期主要表现为肺泡上皮细胞的反复损伤和炎症浸润, 后期表现为成纤维细胞异常增殖、活化及 ECM 沉积^[16]。博来霉素诱导肺纤维化模型是研究肺纤维化的发病机制与新药研究的有效工具^[17]。本研究中采用一次性气管内滴注博来霉素建立小鼠肺纤维化模型, 病理观察结果显示小鼠肺泡结构遭到破坏, 大量炎症细胞浸润, 肺间质内可见胶原纤维沉积; 另外, 小鼠肺组织中 ECM(包括 FN、COL- I 和 COL- III) 沉积增加, 肌成纤维细胞标志物 α-SMA 表达升高, 说明博来霉素可诱导肺组织损

伤、炎症反应、成纤维细胞活化及纤维化进展。口服地高辛可显著抑制气道炎症、胶原纤维沉积,减少 ECM 沉积,降低 α -SMA 表达。说明地高辛对博莱霉素诱导的肺纤维化小鼠具有显著的保护作用。

成纤维细胞是形成肺组织的重要骨架,其增殖活化为肌成纤维细胞在肺纤维化发生发展过程中发挥着重要作用。TGF- β 作为致纤维化的关键细胞因子,可诱导成纤维细胞增殖分化和 ECM 生成^[18-20]。TGF- β 可刺激成纤维细胞,诱导细胞质中 Smad2 和 Smad3 磷酸化,并与 Smad4 形成复合体转运至细胞核,上调 ECM 等纤维化相关基因表达^[21-22]。本研究体内实验结果显示,地高辛能显著抑制小鼠肺组织 α -SMA 表达,降低肺组织 TGF- β 、p-Smad3 的表达水平,提示地高辛可能抑制了 TGF- β 介导的成纤维细胞活化;进一步体外实验证实,地高辛可降低 TGF- β 诱导成纤维细胞 α -SMA、FN 及 p-Smad3 表达水平。说明地高辛对肺纤维化有一定改善作用,其机制可能与抑制成纤维细胞活化有关。

PI3K/Akt 信号通路能调节细胞分化、增殖、运动和凋亡等细胞生物学过程,参与 TGF- β 介导的成纤维细胞活化^[23-24]。TGF- β 刺激可促进 PI3K 活化,使 Akt 磷酸化。一方面,磷酸化 Akt 可增强 TGF- β 受体稳定性;另一方面,磷酸化 Akt 可增强 Smad3 调控转录活性,上调 COL- I 表达。因此,PI3K/Akt 信号活化参与 TGF- β 诱导成纤维细胞活化^[25-27]。在博莱霉素诱导的肺纤维化模型中,PI3K/Akt 信号通过激活内质网应激促进肺成纤维细胞增殖^[28]。本研究显示,地高辛能抑制 TGF- β 诱导的成纤维细胞 PI3K、Akt 及 p-Smad3 表达水平,表明地高辛可能是通过 PI3K/Akt 通路抑制 TGF- β 诱导成纤维细胞活化。

综上所述,地高辛可有效改善博莱霉素诱导的肺纤维化,其作用机制可能与调节 PI3K/Akt 信号通路抑制成纤维细胞活化有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Richeldi L, Collard HR, Jones MG. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Lancet*, 2017, 389 (10082): 1941-1952. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30866-8.
- [2] Henderson NC, Rieder F, Wynn TA. Fibrosis: from mechanisms to medicines [J]. *Nature*, 2020, 587 (7835): 555-566. DOI: 10.1038/s41586-020-2938-9.
- [3] 胡旭,彭寿春.特发性肺纤维化预后相关因素的研究进展[J].实用检验医师杂志,2013,5(1):54-57,66. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2013.01.016.
- [4] 王春彬,张爽,张倩,等.两种新型抗纤维化药物治疗特发性肺纤维化的研究进展[J].中国药理学杂志,2019,54(9):682-686. DOI: 10.11669/cpj.2019.09.002.
- [5] 甘文华,黄凯,吕紫薇,等.吡非尼酮和尼达尼布体外抗肺纤维化作用[J].中国药理学通报,2019,35(10):1370-1375. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2019.10.009.
- [6] 沈俊,吴秋慧,葛卫红.吡非尼酮不良反应文献分析[J].中国药业,2019,28(15):81-84. DOI: 10.3969/j.issn.1006-4931.2019.15.028.
- [7] Boutanquoi PM, Burgoyne O, Beltramo G, et al. TRIM33 prevents pulmonary fibrosis by impairing TGF- β 1 signalling [J]. *Eur Respir J*, 2020, 55 (6): 1901346. DOI: 10.1183/13993003.01346-2019.
- [8] Li NN, Wu K, Feng FF, et al. Astragaloside IV alleviates silica-induced pulmonary fibrosis via inactivation of the TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47 (3): 16. DOI: 10.3892/ijmm.2021.4849.
- [9] 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. DOI: 10.1038/s41419-019-1873-x.
- [10] 宋佳易,刘春英.土荆皮乙酸通过 PI3K/AKT 通路抑制肺腺癌细胞 A549 上皮-间质转化[J].中国免疫学杂志,2022,38(2):171-174. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2022.02.008.
- [11] Woodcock HV, Eley JD, Guillotin D, et al. The mTORC1/4E-BP1 axis represents a critical signaling node during fibrogenesis [J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 6. DOI: 10.1038/s41467-018-07858-8.
- [12] 李敬,姜向毅,徐淑静,等.冠状病毒抑制剂研究的药物化学策略[J].药学报,2020,55(4):537-553. DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0131.
- [13] 张晓雨,李世一,辛光,等.地高辛对牛磺胆酸钠诱导小鼠胆源性急性胰腺炎的保护作用[J].华西药理学杂志,2021,36(3):258-261. DOI: 10.13375/j.cnki.wjps.2021.03.005.
- [14] Spagnolo P, Kropski JA, Jones MG, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: disease mechanisms and drug development [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 222: 107798. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107798.
- [15] 孙阳阳,王倩,孙明尧,等.巨噬细胞分泌转化生长因子 β 对百草枯中毒致肺纤维化的影响[J].中国药理学与毒理学杂志,2021,35(4):283-289. DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2021.04.006.
- [16] 高利红,周满红.百草枯中毒致肺纤维化信号通路研究进展[J].中华危重病急救医学,2021,33(3):377-380. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20000916-00628.
- [17] Della Latta V, Cecchetti A, Del Ry S, et al. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: from biological mechanisms to counteractions [J]. *Pharmacol Res*, 2015, 97: 122-130. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.04.012.
- [18] 曾令军,王文军,李雪森,等.P 物质对人胚肺成纤维细胞作用及机制[J].中国公共卫生,2021,37(5):849-852. DOI: 10.11847/zggwsw1127521-new.
- [19] 蔡欣,李炎玉,苏国媚,等.膜联蛋白 A1 促进肺成纤维细胞炎症反应及胶原合成的研究[J].中华全科医学,2021,19(11):1807-1810,1900. DOI: 10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.002172.
- [20] Saito A, Horie M, Micke P, et al. The role of TGF- β signaling in lung cancer associated with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (11): 3611. DOI: 10.3390/ijms19113611.
- [21] 秦静,张小强,庞国中,等.还原型谷胱甘肽通过抑制转化生长因子- β 1/Smads 信号通路减轻博莱霉素致大鼠肺纤维化[J].中国中西医结合急救杂志,2016,23(2):143-146. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.02.009.
- [22] Hong M, Wilkes MC, Penheiter SG, et al. Non-Smad transforming growth factor- β signaling regulated by focal adhesion kinase binding the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (20): 17841-17850. DOI: 10.1074/jbc.M111.233676.
- [23] Chitra P, Sairasad G, Manikandan R, et al. Berberine inhibits Smad and non-Smad signaling cascades and enhances autophagy against pulmonary fibrosis [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2015, 93 (9): 1015-1031. DOI: 10.1007/s00109-015-1283-1.
- [24] Zhao H, Li CD, Li LN, et al. Baicalin alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and fibroblast proliferation in rats via the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21 (6): 2321-2334. DOI: 10.3892/mmr.2020.11046.
- [25] Luo KX. Signaling cross talk between TGF- β /Smad and other signaling pathways [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, 9 (1): a022137. DOI: 10.1101/cshperspect.a022137.
- [26] Runyan CE, Schnaper HW, Poncelet AC. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway enhances Smad3-stimulated mesangial cell collagen I expression in response to transforming growth factor-beta 1 [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (4): 2632-2639. DOI: 10.1074/jbc.M310412200.
- [27] Zhang L, Zhou FF, Drabsch Y, et al. USP4 is regulated by AKT phosphorylation and directly ubiquitinates TGF- β type I receptor [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14 (7): 717-726. DOI: 10.1038/ncb2522.
- [28] Hsu HS, Liu CC, Lin JH, et al. Involvement of ER stress, PI3K/AKT activation, and lung fibroblast proliferation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 14272. DOI: 10.1038/s41598-017-14612-5.

(收稿日期:2022-06-28)