

本文引用: 肖雪飞, 刘 石, 符 艳, 游柏稳. 黄芪甲苷通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路对人成纤维细胞凋亡和肌成纤维细胞转化的作用[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(12): 2183-2192.

黄芪甲苷通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路对人成纤维细胞 凋亡和肌成纤维细胞转化的作用

肖雪飞¹, 刘 石¹, 符 艳¹, 游柏稳^{2*}

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005

〔摘要〕 目的 利用转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)刺激人成纤维细胞 HFL-1 模拟特发性肺纤维化的病理过程,探讨黄芪甲苷(astragaloside-IV, AS-IV)对人成纤维细胞凋亡和肌成纤维细胞转化的作用和机制。方法 采用 10 ng/mL TGF- β 1 刺激 HFL-1 细胞,给予不同浓度(0、1.25、2.5、5、10 μ mol/L)的 AS-IV 溶液干预 24 h 后,利用 RT-PCR 检测纤连蛋白(fibronectin, FN)mRNA 表达量。随后细胞分为空白组、TGF- β 1 组、TGF- β 1+AS-IV 组、TGF- β 1+XAV939 组。采用流式细胞术检测细胞凋亡率;采用 RT-PCR 法检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、FN、重组人胶原蛋白-1(collagen I)、B 淋巴细胞瘤 2(B-cell lymphoma 2, Bcl-2)及 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax) mRNA 表达情况;采用免疫荧光法检测 α -SMA、上皮细胞钙黏蛋白(E-Cadherin)、collagen I、FN、 β -联蛋白(β -catenin)及半胱氨酸蛋白酶蛋白-3(Cleaved Caspase-3)的蛋白表达;Western blot 检测 FN、 β -catenin、Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平。结果 与空白组比较,TGF- β 1 组细胞凋亡率上升($P < 0.05$),FN、collagen I、 α -SMA 和 Bcl-2 mRNA 表达增加($P < 0.05$),Bax mRNA 表达减少($P < 0.05$), α -SMA、collagen I、FN、Cleaved Caspase-3 及 β -catenin 蛋白表达增加($P < 0.05$);与 TGF- β 1 组比较,TGF- β 1+AS-IV 组和 TGF- β 1+XAV939 组细胞凋亡率下降($P < 0.05$),FN、collagen I、 α -SMA 和 Bcl-2 mRNA 表达减少($P < 0.05$),Bax mRNA 表达增加($P < 0.05$), α -SMA、collagen I、FN、Cleaved Caspase-3 及 β -catenin 蛋白表达减少($P < 0.05$);与 TGF- β 1+XAV939 组相比较,TGF- β 1+AS-IV 组细胞凋亡率下降($P < 0.05$),FN、collagen I、Bcl-2 和 α -SMA mRNA 表达量降低($P < 0.05$),Bax mRNA 表达量增加($P < 0.05$)。结论 AS-IV 可抑制 TGF- β 1 诱导的 HFL-1 细胞凋亡和肌成纤维细胞转化,该作用可能与 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。

〔关键词〕 黄芪甲苷;特发性肺纤维化;成纤维细胞;肌成纤维细胞转化;Wnt; β -联蛋白;凋亡

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.12.006

Effects of astragaloside-IV on human fibroblast apoptosis and myofibroblast transformation by regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway

XIAO Xuefei¹, LIU Shi¹, FU Yan¹, YOU Baiwen^{2*}

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. The Second Hospital of
Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China

〔Abstract〕 Objective To simulate the pathological process of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) by stimulating human

〔收稿日期〕 2024-06-09

〔基金项目〕 湖南省中医药科研计划项目(2021165)。

〔通信作者〕 * 游柏稳,男,博士,主任医师,硕士研究生导师, E-mail: 1326493020@qq.com。

fibroblast (HFL-1) cells with transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), and to explore the effects and mechanism of astragaloside-IV (AS-IV) on human fibroblast apoptosis and myofibroblast transformation. **Methods** HFL-1 cells were stimulated with 10 ng/mL TGF- β 1 and then treated with different concentrations (0, 1.25, 2.5, 5, 10 μ mol/L) of AS-IV solution for 24 h. The mRNA expression of fibronectin (FN) was determined by RT-PCR. Subsequently, the cells were divided into blank group, TGF- β 1 group, TGF- β 1+AS-IV group, and TGF- β 1+XAV939 group. Flow cytometry was used to measure cell apoptosis rate, RT-PCR to examine the mRNA expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA), FN, recombinant human collagen-1 (collagen I), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), and Bcl-2 associated X protein (Bax), immunofluorescence to determine the protein expressions of α -SMA, E-Cadherin, collagen I, FN, β -catenin, and Cleaved Caspase-3, and Western blot to check the protein expression levels of FN, β -catenin, and Cleaved Caspase-3. **Results** The optimal concentration of AS-IV for inhibiting FN expression was 5 μ mol/L. Compared with the blank group, the cell apoptosis rate in the TGF- β 1 group increased ($P<0.05$), the mRNA expressions of FN, collagen I, α -SMA, and Bcl-2 were elevated ($P<0.05$), while Bax mRNA expression decreased ($P<0.05$). Additionally, the protein expressions of α -SMA, collagen I, FN, Cleaved Caspase-3, and β -catenin also increased ($P<0.05$). Compared with the TGF- β 1 group, both the TGF- β 1+AS-IV group and TGF- β 1+XAV939 group showed decreased cell apoptosis rates ($P<0.05$), reduced mRNA expressions of FN, collagen I, α -SMA, and Bcl-2 ($P<0.05$), increased Bax mRNA expression ($P<0.05$), and decreased protein expressions of α -SMA, collagen I, FN, Cleaved Caspase-3, and β -catenin ($P<0.05$). Compared with the TGF- β 1+XAV939 group, the cell apoptosis rate in the TGF- β 1+AS-IV group decreased ($P<0.05$), the mRNA expressions of FN, collagen I, Bcl-2, and α -SMA decreased ($P<0.05$), while that of Bax increased ($P<0.05$). **Conclusion** AS-IV can inhibit TGF- β 1-induced HFL-1 cell apoptosis and myofibroblast transformation, which may be related to the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

[**Keywords**] astragaloside-IV; idiopathic pulmonary fibrosis; fibroblast; myofibroblast transformation; Wnt; β -catenin; apoptosis

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种常见的以气道重塑、炎症、肺泡破坏和纤维化为特征的致死性间质性肺病^[1-2]。IPF 也是进展最快的纤维化疾病之一,其诊断后中位生存期为 3.5 年^[3],5 年生存率仅为 20%~30%^[4]。近十年,IPF 相关临床试验呈指数级增长,其中吡非尼酮和尼达尼布这两种药物用于治疗 IPF^[5-6]。然而,该药物只能减缓患者疾病进展的速度,进行性的肺纤维化最终仍会导致患者死亡。因此,目前迫切需要新的抗纤维化药物延缓 IPF 患者的疾病进程,改善患者的生活质量。临床研究及荟萃分析结果表明,中药在改善 IPF 患者的肺功能、运动能力和生活质量等方面具有良好的疗效^[7-8]。中医立足于患者整体,其治疗作用具有多环节、多靶点的特点。

目前研究认为,IPF 发病的主要原因是反复肺泡上皮细胞(alveolar epithelial cell, AEC)损伤^[9-10]。初始损伤会导致 AEC 异常激活,从而在纤维化环境中聚集产生胶原的成纤维细胞和肌成纤维细胞。肌成纤维细胞不存在于正常肺组织中,但肌成纤维细胞是胶原和其他基质蛋白的重要产生者,促进成纤

维细胞凋亡和抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞转化,能有效抑制肺纤维化^[11]。而转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)促进肌成纤维细胞分化和胶原表达的关键细胞因子,在肺纤维化的进展中起到了重要的作用^[12]。迄今为止,已提出通过 3 种肌成纤维细胞募集机制,肺成纤维细胞的增殖和分化、上皮间充质转化、骨髓来源的纤维细胞或循环祖细胞向成纤维细胞的转化,其中纤连蛋白(fibronectin, FN)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、重组人胶原蛋白-1(collagen I)是成纤维细胞转化肌成纤维细胞过程中常见的标志物,在肺纤维化发生发展中发挥着重要作用^[13]。

Wnt/ β -联蛋白(Wnt/ β -catenin)是一个在进化上高度保守的细胞信号系统,在胚胎发育、维持器官及组织稳态方面,发挥了至关重要的作用,并且与人类许多疾病的发病机制有关。目前,已有大量研究证实经典的 Wnt/ β -catenin 通路在肺纤维化起到重要的作用。SONG 等^[14]研究发现,Wnt1 处理人成纤维细胞能促进细胞增殖,使得 α -SMA、波形蛋白和 I 型胶原表达量显著增加。从博来霉素诱导的肺纤维

化大鼠提取支气管肺泡灌洗液培养人成纤维细胞也能起到相同作用,而转染 β -catenin shRNA 序列可抑制这一过程。由此可知 Wnt1/ β -catenin 信号通路可促进人成纤维细胞增殖,诱导人成纤维细胞转化为肌成纤维细胞,促进细胞外基质沉积。

黄芪甲苷(astragaloside-IV, AS-IV)是黄芪的有效活性成分之一,是我国药典检测黄芪质量的指标成分之一。目前,AS-IV的抗纤维化作用已得到研究证实。研究发现,AS-IV能够通过减少细胞外基质沉积、氧化应激和炎症反应,改善博来霉素诱导的大鼠肺纤维化^[15-16],但其作用机制有待进一步探究。本研究以人成纤维细胞 HFL-1 细胞作为研究对象,探讨 AS-IV通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路对人成纤维细胞凋亡和肌成纤维细胞转化的作用。

1 材料

1.1 细胞

人成纤维细胞 HFL-1 细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司,货号:CL-0106)。

1.2 药品与试剂

AS-IV(上海研域生物科技有限公司,批号:110781-200512);含 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的完全培养基、胎牛血清、青链霉素混合液(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号分别为 PM150910、164210、PB180120);胰蛋白酶(美国 Cytiva 公司,批号:SH40003.01);细胞凋亡检测试剂盒(苏州四正柏生物公司,批号:20220718);TGF- β 1 抗体(美国 Peprotech 公司,批号:100-21-10uG);蛋白裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、山羊抗兔免疫球蛋白抗体、山羊抗鼠免疫球蛋白抗体(中国 Abiowell 公司,批号分别为 AWB0136、AWB0104、AWH0645、AWH0650、AWS0002、AWS0001);mRNA 逆转录试剂盒、miRNA 逆转录试剂盒(中国北京康为世纪生物科技有限公司,批号分别为 CW2569、CW2141);总 RNA 抽提试剂盒(美国 Thermo 公司,批号:15596026); β -actin 抗体、PCNA 抗体、FN 抗体、GAPDH 抗体(美国 proteintech 公司,批号分别为 66009-1-Ig、10205-2-AP、66042-1-Ig、10494-1-AP); β -catenin 抗体(湖南艾方生物公司,批号:AF10715);半胱氨酸蛋白酶蛋白-3(Cleaved Caspase-3)抗体(美国 CST 公司,批号:9664T);抗荧光

淬灭封片剂(美国 South biotech 公司,批号:0100-01);Tankyrase 抑制剂 XAV939(美国 Target Molecule Corp 公司,批号:225249)。

1.3 仪器

HERAcell2401 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher 公司);XDS-3 型倒置生物显微镜(中国粤显光学仪器有限责任公司);Enspire 型多功能酶标仪(美国 Perkinelmer 公司);H1850R 型台式冷冻离心机(中国湖南湘仪公司);BD FACSAria III 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司);TS-1 型水平摇床(中国江苏其林贝尔公司);DYCP-31BN 型电泳槽、DYCZ-40D 型蛋白转印槽、DYCZ-24FN 型高电流电泳仪(北京六一生物科技有限公司);ChemiScope 6000 系列化学发光成像系统(中国勤翔公司);ViiATM 7 型荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo 公司);BioDrop ulite 型核酸蛋白浓度测定仪(英国 Biochrom 公司);Eclipse CI 型正置荧光显微镜、DS-u3 型成像系统(日本尼康公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

人胚肺成纤维细胞 HFL-1 细胞用含 1%青链霉素和 10%胎牛血清的含 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的完全培养基在 37 °C 5%CO₂ 条件下的恒温培养箱中培养,待细胞融合度达到 80%时进行传代。

2.2 AS-IV 药物溶液配制

AS-IV用二甲基亚砷溶解成高浓度(100 mmol/L)的储备液,分装后-20 °C避光保存;临用时用含 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的完全培养基稀释成 5 μ mol/L 的干预浓度。

2.3 细胞分组与干预

HFL-1 细胞分为空白组、TGF- β 1 组、TGF- β 1+AS-IV组、TGF- β 1+XAV939 组。其中,空白组给予含 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的完全培养基培养 24 h;TGF- β 1 组给予含 10 ng/mL TGF- β 1 的培养基干预 24 h,观察细胞形态,细胞从椭圆形变成长条形;TGF- β 1+AS-IV组给予含 10 ng/mL TGF- β 1 和 5 μ mol/L AS-IV培养基干预 24 h;TGF- β 1+XAV939 组给予含 10 ng/mL TGF- β 1 和 5 μ mol/L XAV939 培养基干预 24 h^[17]。

2.4 指标检测

2.4.1 最佳浓度的选取 取对数生长期 HFL-1 细胞胰蛋白酶消化后细胞计数,6 孔板每孔加入 HFL-1 细胞悬液,培养过夜后,每孔加入 100 μ L 基础培养基同步化 24 h,分为 6 组。空白组不含细胞、只含等体积培养基;其余 5 组加入 10 ng/mL TGF- β 1,再分别加入 0、5、10、20、40 μ mol/L 的 AS-IV 分别加入 TGF- β 1 组、5 μ mol/LAS-IV 组、10 μ mol/LAS-IV 组、20 μ mol/LAS-IV 组、40 μ mol/LAS-IV 组。继续在培养箱中孵育 72 h,随后采用 RT-PCR 检测 FN 的 mRNA 表达量。半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)=抑制率/抑制剂浓度-log(抑制率/抑制剂浓度),采用 GraphPad Prism 9.0 软件计算相应的 IC₅₀ 值。

2.4.2 流式细胞术检测细胞凋亡率 用细胞凋亡检测试剂盒进行流式细胞术测定,取对数生长期 HFL-1 细胞,用 2.3 所示干预浓度及分组处理,24 h 后收集细胞上清液至离心管,用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化贴壁细胞,将消化好的细胞与收集好的上清混合后离心,吸除上清液,用预冷 PBS 洗涤 2 次后加入 100 μ L 1 $\times$ 结合缓冲液重悬细胞,每管细胞分别加入 5 μ L 的 FITC-Annexin V 和 5 μ L 的 PI 工作液,放置室温避光孵育 10 min,再加入 400 μ L 的 PBS 混合后用流式细胞仪进行检测,结果用 FlowJo 软件分析。

2.4.3 RT-PCR 法检测 FN、collagen I、Bax、Bcl-2、 α -SMA mRNA 的表达 细胞按 2.3 的分组方法给药,用 RNA 提取液提取总 RNA,采用 mRNA 逆转录试剂盒将 RNA 转录为 cDNA,反应条件为 50 $^{\circ}$ C 50 min,85 $^{\circ}$ C 5 min。引物由北京擎科生物科技有限公司合成,详见表 1。以反转录后的 cDNA 为模板,GAPDH 为内参,对各基因进行 PCR 扩增,扩增采用 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 60 s,40 个循环,65 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。使用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算 mRNA 的相对表达量。

2.4.4 免疫荧光染色法检测 α -SMA、E-Cadherin、collagen I、FN、Cleaved Caspase-3、 β -catenin 蛋白表达 细胞按 2.3 的分组方法给药后,用 4%多聚甲醛固定 15 min。加入 100 μ L 破膜工作液,室温孵育 10 min,3% BSA 封闭 30 min。分别加入 α -SMA(1:100)、E-Cadherin(1:200)、collagen I (1:200)、FN(1:200)、Cleaved Caspase-3(1:200)、 β -catenin(1:200)

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	正向 ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	252
	反向 TTTGAGGGTGCAGCGAACTT	
Bax	正向 TTGCTACAGGGTTTCATCCAGG	70
	反向 GCTCCAAGGTCAGCTCAGGT	
Bcl-2	正向 CTGGTGGACAACATCGCTCT	100
	反向 ATAGTTCCACAAAGGCATCCCA	
FN	正向 CGCCCTTTTCTCTGTTGTGG	135
	反向 CTCCTTCCTCGCTCAGTTCGT	
collagen I	正向 CTGGCTCTCTGTACCCCT	160
	反向 GGACCACGTTCACTTGCT	
α -SMA	正向 ATCACCATCGGAATGAACGC	79
	反向 TGCCCCGCCGACTCCATTCCA	

一抗稀释液 4 $^{\circ}$ C 孵育。PBS 洗涤后加二抗稀释液室温孵育,孵育完成后 PBS 洗涤,再加 DAPI 染液室温避光染色,用抗荧光淬灭封片剂封片,于荧光显微镜下观察并采集图像,使用 Image J 软件分析平均荧光强度。

2.4.5 Western blot 检测 FN、 β -catenin、Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平 按 2.3 的分组方法给药后,使用 RIPA 裂解液提取总蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度。再进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后将凝胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上,用封闭液室温封闭 2 h,加入 β -actin(1:5 000)、PCNA(1:5 000)、FN(1:5 000)、GAPDH(1:5 000)、 β -catenin(1:1 000)、Cleaved Caspase-3(1:1 000)一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。膜用 TBST 洗 3 次,加入二抗(1:5 000)室温下孵育 2 h,TBST 洗 3 次后显影成像,用 Image J 软件对结果进行分析。

2.5 统计学分析

本实验数据由 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析,实验数据符合正态分布用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间比较使用单因素方差分析,多重比较使用 Holm-Sidak 检验。数据不符合正态性和(或)方差齐性用 Kruskal-Wallis 检验。

3 结果

3.1 AS-IV 最佳浓度的筛选

与空白组比较,其余各组细胞 FN mRNA 表达量上升($P<0.05$);与 TGF- β 1 组比较,AS-IV 各浓度组细胞 FN mRNA 表达量均下降($P<0.05$);与 5 μ mol/L AS-IV 组比较,10 μ mol/L AS-IV 组、20 μ mol/L AS-IV

组、40 $\mu\text{mol/LAS-IV}$ 组细胞 FN 的 mRNA 表达量上升($P<0.05$);与 10、20 $\mu\text{mol/L AS-IV}$ 组比较,40 $\mu\text{mol/L AS-IV}$ 组细胞 FN 的 mRNA 表达量上升($P<0.05$)。经计算 IC_{50} 值,5 $\mu\text{mol/L AS-IV}$ 组、10 $\mu\text{mol/L AS-IV}$ 组、20 $\mu\text{mol/L AS-IV}$ 组、40 $\mu\text{mol/L AS-IV}$ 组的 IC_{50} 值分别为 1.01、1.43、1.70、2.46,所以选择 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 AS-IV 组为后续实验组。详见表 2。

表 2 不同浓度 AS-IV 对 TGF- β 1 诱导 HFL-1 细胞 FN mRNA 表达量的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Effects of different concentrations of AS-IV on the expression of FN in HFL-1 cells induced by TGF- β 1 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	ASIV 浓度/($\mu\text{mol/L}$)	FN 的表达量
空白组	0	1.00 $\pm$ 0.14
TGF- β 1 组	0	5.54 $\pm$ 3.52 [#]
5 $\mu\text{mol/LAS-IV}$ 组	5	1.76 $\pm$ 4.75 ^{*#}
10 $\mu\text{mol/LAS-IV}$ 组	10	3.27 $\pm$ 3.53 ^{*#&}
20 $\mu\text{mol/LAS-IV}$ 组	20	3.04 $\pm$ 5.06 ^{*#&}
40 $\mu\text{mol/LAS-IV}$ 组	40	4.76 $\pm$ 4.49 ^{*#&@%}

注:与空白组比较,[#] $P<0.05$;与 TGF- β 1 组比较,^{*} $P<0.05$;与 5 $\mu\text{mol/L AS-IV}$ 组比较,^{*} $P<0.05$;与 10 $\mu\text{mol/LAS-IV}$ 组比较,[@] $P<0.05$;与 20 $\mu\text{mol/LAS-IV}$ 组比较,[%] $P<0.05$ 。

3.2 AS-IV 对 TGF- β 1 诱导下 HFL-1 细胞凋亡的影响

与空白组比较,其余各组细胞凋亡率升高($P<0.05$);与 TGF- β 1 组比较,TGF- β 1+AS-IV 组和 TGF- β 1+XAV939 组细胞凋亡率降低($P<0.05$);与 TGF- β 1+AS-IV 组比较,TGF- β 1+XAV939 组细胞凋亡率升高($P<0.05$)。详见图 1、表 3。

3.3 AS-IV 对 TGF- β 1 诱导下 HFL-1 细胞 FN、collagen I、Bax、Bcl-2、 α -SMA mRNA 的表达

与空白组比较,其余各组 FN、collagen I、Bcl-2 和 α -SMA mRNA 表达量增加($P<0.05$),Bax mRNA 表达量降低($P<0.05$)。与 TGF- β 1 组比较,TGF- β 1+

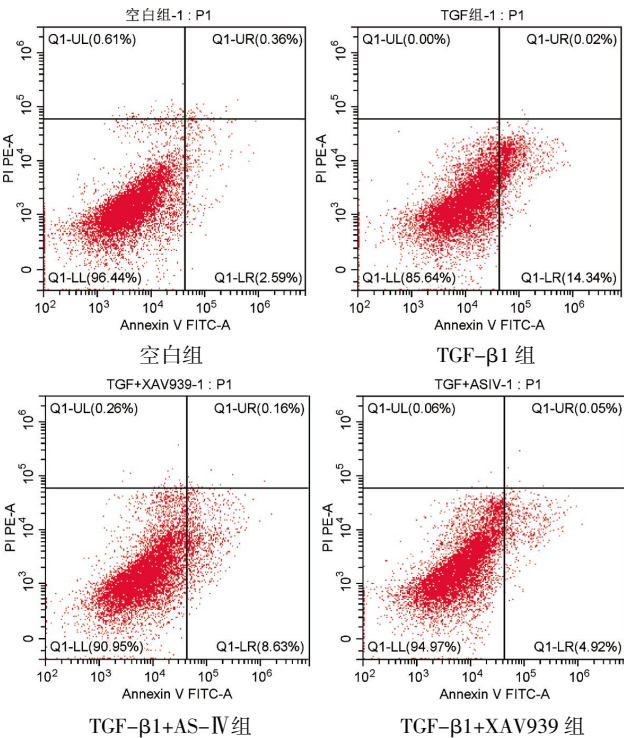


图 1 AS-IV 对 HFL-1 细胞凋亡的影响

Fig.1 Effects of AS-IV on HFL-1 cell apoptosis

表 3 AS-IV 对 HFL-1 细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effects of AS-IV on HFL-1 cell apoptosis ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	凋亡率/%
空白组	3.48 $\pm$ 1.59
TGF- β 1 组	14.88 $\pm$ 0.37 [#]
TGF- β 1+AS-IV 组	5.37 $\pm$ 0.35 ^{*#}
TGF- β 1+XAV939 组	7.80 $\pm$ 0.71 ^{*#&}

注:与空白组比较,[#] $P<0.05$;与 TGF- β 1 组比较,^{*} $P<0.05$;与 TGF- β 1+AS-IV 组比较,[&] $P<0.05$ 。

AS-IV 组和 TGF- β 1+XAV939 组 FN、collagen I、Bcl-2、 α -SMA mRNA 表达量降低($P<0.05$),Bax mRNA 表达量增加($P<0.05$)。与 TGF- β 1+AS-IV 组比较,TGF- β 1+XAV939 组 FN、collagen I、Bcl-2、 α -SMA mRNA 表达量增加($P<0.05$),Bax mRNA 表达量降低($P<0.05$)。详见表 4。

表 4 AS-IV 对 TGF- β 1 诱导 HFL-1 细胞 FN、collagen I、Bax、Bcl-2、 α -SMA mRNA 表达的作用($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effects of AS-IV on mRNA expressions of FN, collagen I, Bax, Bcl-2, and α -SMA in HFL-1 cells induced by TGF- β 1 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	FN	collagen I	Bcl-2	α -SMA	Bax
空白组	1.04 $\pm$ 0.09	0.99 $\pm$ 0.10	0.97 $\pm$ 0.14	1.01 $\pm$ 0.01	1.11 $\pm$ 0.09
TGF- β 1 组	3.13 $\pm$ 0.14 [#]	2.88 $\pm$ 0.23 [#]	2.92 $\pm$ 0.12 [#]	3.23 $\pm$ 0.15 [#]	0.34 $\pm$ 0.03 [#]
TGF- β 1+ASIV 组	1.61 $\pm$ 0.06 ^{*#}	1.48 $\pm$ 0.09 ^{*#}	1.43 $\pm$ 0.09 ^{*#}	1.62 $\pm$ 0.04 ^{*#}	0.81 $\pm$ 0.04 ^{*#}
TGF- β 1+XAV939 组	2.32 $\pm$ 0.05 ^{*#&}	2.14 $\pm$ 0.09 ^{*#&}	2.14 $\pm$ 0.22 ^{*#&}	2.25 $\pm$ 0.13 ^{*#&}	0.61 $\pm$ 0.05 ^{*#&}

注:与空白组比较,[#] $P<0.05$;与 TGF- β 1 组比较,^{*} $P<0.05$;与 TGF- β 1+AS-IV 组比较,[&] $P<0.05$ 。

3.4 免疫荧光染色法检测 α -SMA、E-Cadherin、collagen I、FN、Cleaved Caspase-3、 β -catenin 的蛋白表达

与空白组比较,其余各组 α -SMA、collagen I、FN、Cleaved Caspase-3、 β -catenin 蛋白表达量增加($P<0.05$),E-Cadherin 蛋白表达量减少($P<0.05$)。与TGF- β 1 组比较,TGF- β 1+AS-IV 组和 TGF- β 1+XAV939 组 α -SMA、collagen I、FN、Cleaved Caspase-3、 β -catenin 蛋白表达量减少($P<0.05$),E-Cadherin 蛋白表达量增加($P<0.05$)。与 TGF- β 1+AS-IV 组比较,FN、Cleaved Caspase-3 蛋白表达量下降($P<0.05$)。详见图 2—6。

3.5 Western blot 检测 FN、 β -catenin、Cleaved Caspase-3 的蛋白表达

与空白组比较,其余各组的 FN、 β -catenin、Cleaved Caspase-3 蛋白表达升高($P<0.05$);与TGF- β 1 组比较,TGF- β 1+AS-IV 组和 TGF- β 1+XAV939 组 FN、 β -catenin、Cleaved Caspase-3 蛋白表达降低($P<0.05$);与 TGF- β 1+AS-IV 组比较,TGF- β 1+XAV939 组的 FN、Cleaved Caspase-3 蛋白表达升高($P<0.05$), β -catenin 的蛋白表达降低($P<0.05$)。详见图 7、表 5。

4 讨论

IPF 属于中医学“肺痿”“肺痹”范畴,发病原因复杂,基本病机为肺虚络瘀、本虚标实,本虚为肺、脾、肾三脏皆虚,标实为痰浊、瘀血痹阻于肺络^[18-20],治疗上应补肺健脾益肾、祛痰活血通络^[21]。黄芪具有补肺健脾、补气活血的功效。AS-IV 为中药黄芪的药材成份,现代药理学研究发现,AS-IV 可增强机体免疫力及抗病能力,改善肺功能,能延缓肺纤维化发展^[22]。研究发现,AS-IV 可以通过 miR-21 介导的途径激活肺泡细胞自噬,从而抑制 IPF 发生发展^[23]。TONG 等^[24]使用博来霉素诱导小鼠 IPF 的发生,结果显示,黄芪甲苷治疗后可以减少羟脯氨酸的合成,延缓肺纤维化的发展。同样有研究表明,AS-IV 还可通过能被转化生长因子激活的长链非编码 RNA/微小 RNA-200c/锌指转录因子 1 信号通路抑制上皮间充质转化和肺纤维变性^[25]。

Wnt 参与细胞增殖、分化与再生,其经典通路通过调控下游关键转录因子 β -catenin 以激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,随后相关配体与受体结合形成蛋白复合体,调控肺组织血管新生,对损伤的气道内皮

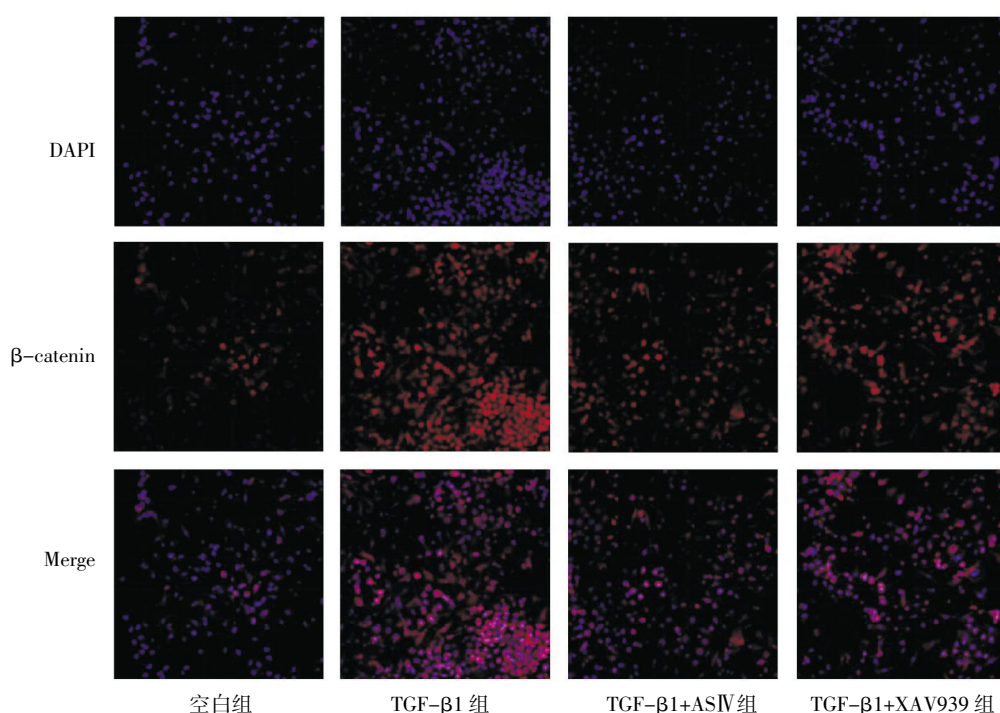


图 2 AS-IV 对 TGF- β 1 诱导 HFL-1 细胞 β -catenin 蛋白表达的影响(免疫荧光, $\times 200$)

Fig.2 Effects of AS-IV on β -catenin protein expression in HFL-1 cells induced by TGF- β 1 (immunofluorescence, $\times 200$)

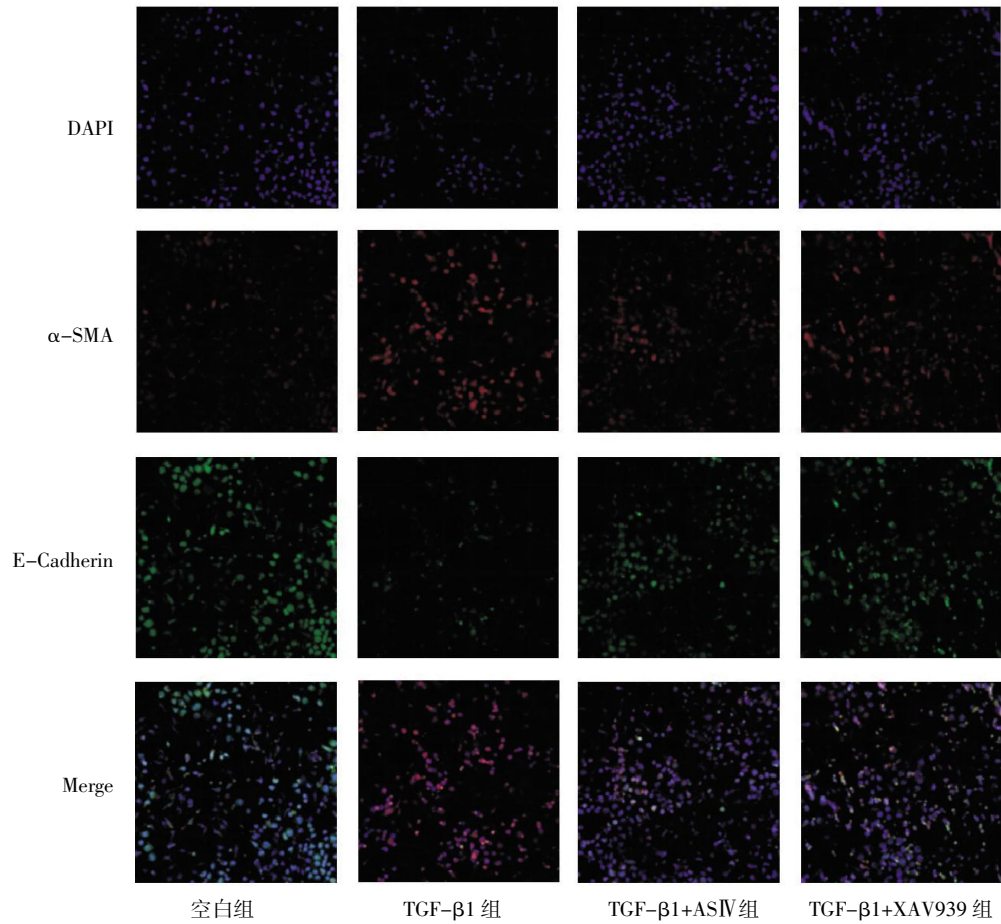


图 3 AS-IV 对 TGF- β 1 诱导 HFL-1 细胞 α -SMA、E-Cadherin 蛋白表达的影响(免疫荧光, $\times 200$)

Fig.3 Effects of AS-IV on protein expressions of α -SMA and E-Cadherin in HFL-1 cells induced by TGF- β 1 (immunofluorescence, $\times 200$)

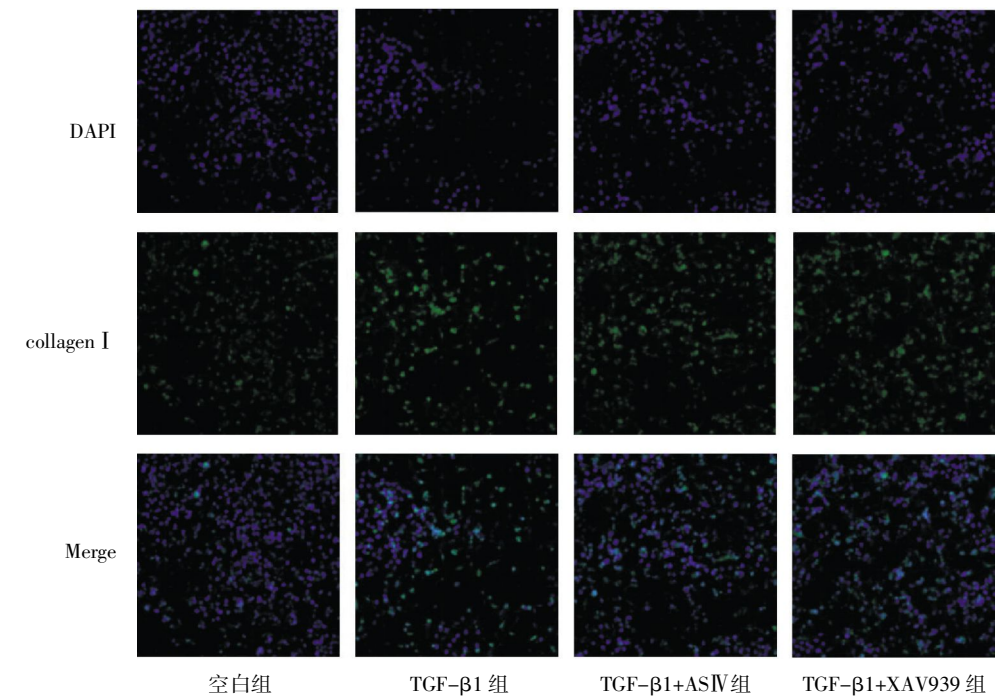


图 4 AS-IV 对 TGF- β 1 诱导 HFL-1 细胞 collagen I 蛋白表达的影响(免疫荧光, $\times 200$)

Fig.4 Effects of AS-IV on collagen I protein expression in HFL-1 cells induced by TGF- β 1 (immunofluorescence, $\times 200$)

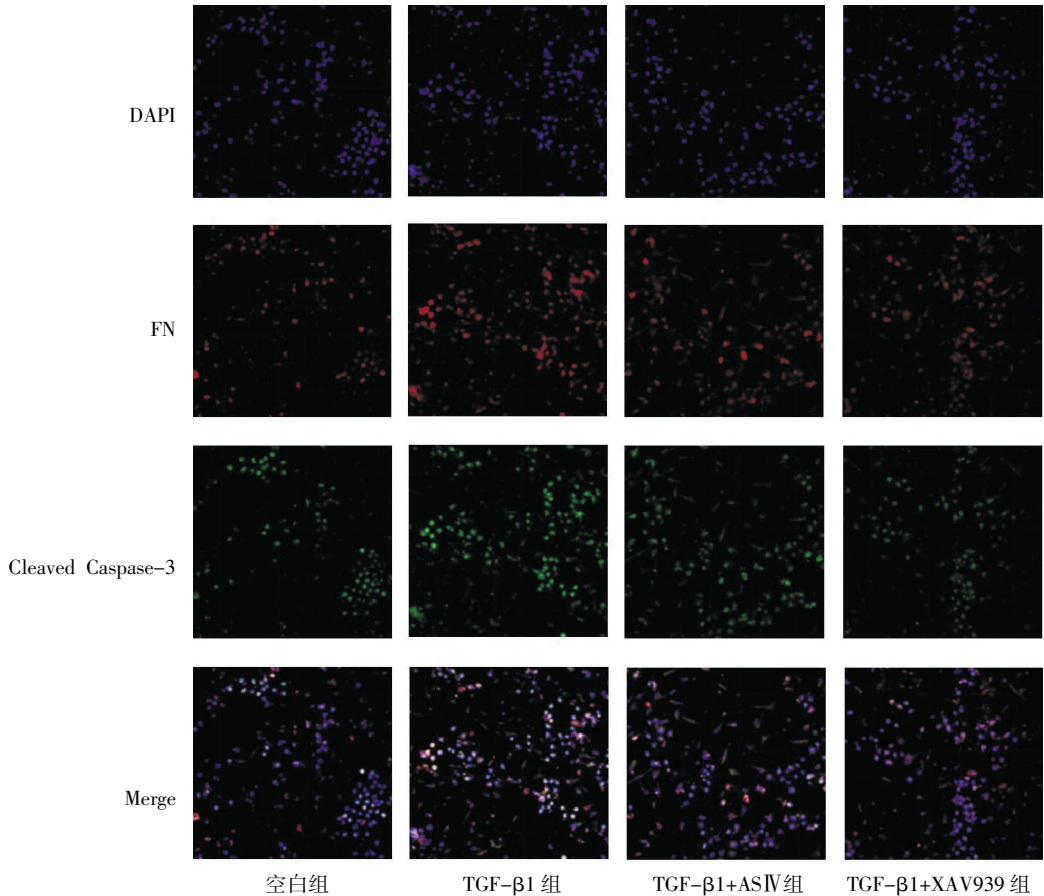


图 5 AS-IV 对 TGF- β 1 诱导 HFL-1 细胞 FN、Cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响(免疫荧光, $\times 200$)

Fig.5 Effects of AS-IV on protein expressions of FN and Cleaved Caspase-3 in HFL-1 cells induced by TGF- β 1 (immunofluorescence, $\times 200$)

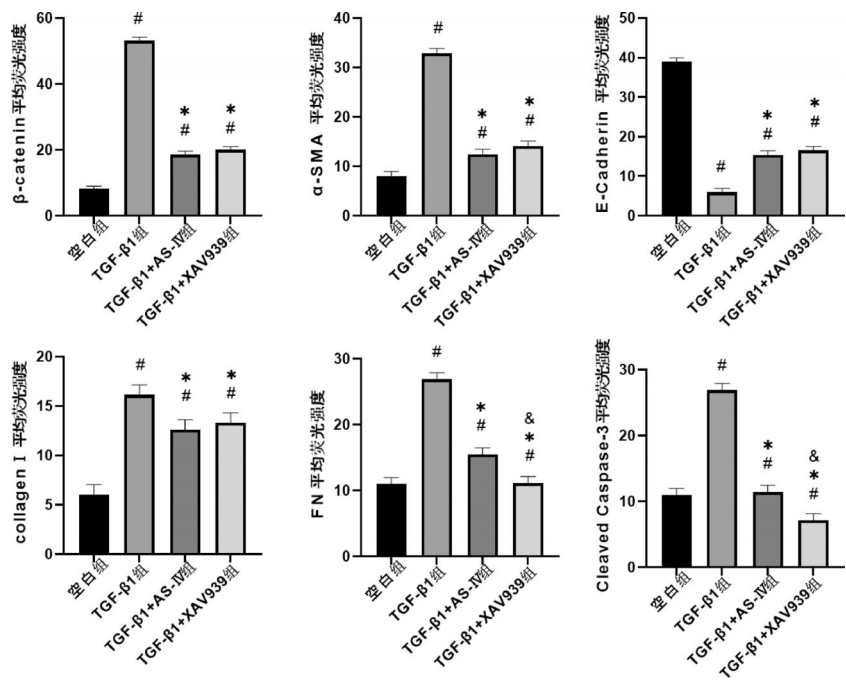


图 6 AS-IV 对 TGF- β 1 诱导 HFL-1 细胞 α -SMA、E-Cadherin、collagen I、FN、Cleaved Caspase-3、 β -catenin 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.6 Effects of AS-IV on protein expressions of α -SMA, E-Cadherin, collagen I, FN, Cleaved Caspase-3, and β -catenin in HFL-1 cells induced by TGF- β 1 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与空白组比较, [#] $P < 0.05$;与 TGF- β 1 组比较, ^{*} $P < 0.05$;与 TGF- β 1+AS-IV 组比较, [&] $P < 0.05$ 。

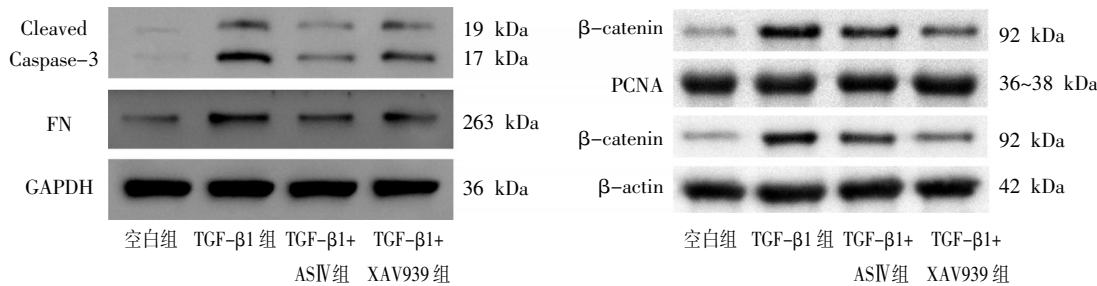


图 7 AS-Ⅳ对 TGF-β1 诱导下 HFL-1 细胞 FN、β-catenin、Cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响
Fig.7 Effects of AS-Ⅳ on protein expressions of FN, β-catenin, and Cleaved Caspase-3 in HFL-1 cells induced by TGF-β1

表 5 AS-Ⅳ对 TGF-β1 诱导下 HFL-1 细胞 FN、β-catenin、Cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effects of AS-Ⅳ on protein expressions of FN, β-catenin, and Cleaved Caspase-3 in HFL-1 cells induced by TGF-β1 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	FN/GAPDH	β-catenin/β-actin	β-catenin/PCNA	Cleaved Caspase-3(19 kDa)/GAPDH	Cleaved Caspase-3(17 kDa)/GAPDH
空白组	0.05±0.03	0.10±0.02	0.15±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01
TGF-β1 组	0.38±0.02 [#]	0.51±0.02 [#]	0.75±0.01 [#]	0.24±0.04 [#]	0.36±0.04 [#]
TGF-β1+AS-Ⅳ组	0.19±0.05 ^{*#}	0.36±0.05 ^{*#}	0.51±0.04 ^{*#}	0.08±0.02 ^{*#}	0.10±0.03 ^{*#}
TGF-β1+XAV939 组	0.30±0.03 ^{*#&}	0.19±0.03 ^{*#&}	0.28±0.02 ^{*#&}	0.17±0.03 ^{*#&}	0.26±0.04 ^{*#&}

注:与空白组比较,[#] $P<0.05$;与 TGF-β1 组比较,^{*} $P<0.05$;与 TGF-β1+AS-Ⅳ组比较,[&] $P<0.05$ 。

细胞进行修复,促使间质纤维细胞激活与重构,引起肺组织胶原沉积,参与 IPF 进程^[26]。研究使用 Wnt/β-catenin 信号通路抑制剂后发现,Wnt 相关配体与 LRP-5/6 共受体,发生竞争性结合,减弱了信号之间的传导,从而逆转了肺成纤维细胞和肌成纤维细胞的增殖与分化,从而发挥改善 IPF 的作用。OKAZAKI 等^[27]使用新型 Wnt/β-catenin/结合蛋白信号抑制剂 PRI-724,能通过调节肺中巨噬细胞的活性,从而改善博来霉素诱导的小鼠肺纤维化,因此,Wnt/β-catenin 信号通路与肺纤维化的发生发展密切相关。中医药治疗肺纤维化源远流长,许多研究发现,某些中药单体的有效成分,尤其是苷类化合物可以通过调控 Wnt/β-catenin 信号通路从而抑制肺纤维化的发生发展^[28]。有研究证实,用淫羊藿苷作用于肺成纤维细胞后,下调了氧化产物的浓度,同时提高了抗氧化物水平,从而抑制肺纤维化的产生,这与抑制 Wnt/β-catenin 信号传导相关^[29]。WANG 等^[30]通过博来霉素诱导小鼠肺纤维化,使用五味子苷进行干预后检测相关指标发现相关炎症因子、Wnt 及 β-catenin 等的表达受到抑制。

本研究流式细胞术检测结果显示,AS-Ⅳ能够抑制 TGF-β1 诱导下 HFL-1 细胞的凋亡。RT-PCR 法检测结果显示,TGF-β1 处理能够上调人成纤维细胞转化为肌成纤维细胞过程中标志物 α-SMA、FN、collagen I、抗凋亡蛋白 Bcl-2 mRNA 的表达,下调促凋亡蛋白 Bax mRNA 的表达;而 AS-Ⅳ能够下调 α-SMA、FN、collagen I、抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达,上调促凋亡蛋白 Bax 表达。本实验通过 Western blot 法检测相关蛋白表达,结果提示 TGF-β1 诱导 HFL-1 细胞后,FN、β-catenin、Cleaved Caspase-3 蛋白表达增加,AS-Ⅳ作用后蛋白表达下降,同样免疫荧光染色检测结果显示 TGF-β1 诱导 HFL-1 细胞后 α-SMA、E-Cadherin、collagen I、FN、β-catenin、Cleaved Caspase-3 蛋白表达增加,AS-Ⅳ作用后蛋白表达下降。结果证明,AS-Ⅳ能够抑制 TGF-β1 所诱导的细胞凋亡,抑制肌成纤维细胞转化,其作用机制可能与 Wnt/β-catenin 信号通路密切相关。

综上,本研究发现 AS-Ⅳ能够抑制 TGF-β1 诱导的 HFL-1 细胞凋亡和肌成纤维细胞转化,该作用可能与 Wnt/β-catenin 信号通路有关,为 AS-Ⅳ治疗 IPF 的临床应用提供了理论依据。

参考文献

- [1] 黄元, 管艳云, 蔡欣蕊, 等. 特发性肺纤维化发病机制的研究进展[J]. 中国医刊, 2024, 59(10): 1054–1059.
- [2] 宋思雨, 丁露, 赵美茹, 等. 特发性肺纤维化中医病机及防治策略的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(11): 6020–6025.
- [3] 曹婷. 特发性肺纤维化患者预后相关指标的临床研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2020.
- [4] 欧阳小荔, 彭红. 特发性肺纤维化预后的影响因素[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2021, 20(11): 824–830.
- [5] 宋璐, 李红燕, 姚渊, 等. 吡非尼酮联合尼达尼布对特发性肺纤维化治疗的作用[J]. 深圳中西医结合杂志, 2022, 32(24): 105–108.
- [6] 邓泽, 戢新平. 吡非尼酮联合尼达尼布治疗特发性肺纤维化患者的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(11): 1174–1176, 1194.
- [7] 唐会猛, 田燕歌, 杨曙光, 等. 基于数据挖掘和网络药理学探究中医药治疗特发性肺纤维化的用药规律及作用机制[J]. 中医研究, 2024, 37(6): 61–69.
- [8] 邹恩国, 黄天宇, 王木兰, 等. 特发性肺纤维化的发病机制及中药调节作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(10): 280–289.
- [9] 韩晓静, 韩齐齐, 钱峰. 特发性肺纤维化的炎症机制与潜在药物靶标[J]. 中国药理学通报, 2024, 40(5): 828–832.
- [10] 李斯宇, 庞立健, 吕晓东, 等. 特发性肺纤维化复杂网络发病机制与络病理理论[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(2): 640–645.
- [11] ZHANG J X, HUANG P J, WANG D P, et al. m6A modification regulates lung fibroblast-to-myofibroblast transition through modulating KCNH6 mRNA translation [J]. *Molecular Therapy*, 2021, 29(12): 3436–3448.
- [12] 张映驰, 史新琛, 吴梦宇, 等. 转化生长因子 $\beta 1$ 及相关生物分子在肺纤维化中作用的研究进展[J]. 现代预防医学, 2021, 48(13): 2473–2478.
- [13] BOROK Z. Role for $\alpha 3$ integrin in EMT and pulmonary fibrosis[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2009, 119(1): 7–10.
- [14] SONG P, ZHENG J X, LIU J Z, et al. Effect of the Wnt1/ β -catenin signalling pathway on human embryonic pulmonary fibroblasts[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2014, 10(2): 1030–1036.
- [15] LI L C, XU L, HU Y, et al. Astragaloside IV improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats by attenuating extracellular matrix deposition[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2017, 8: 513.
- [16] YU W N, SUN L F, YANG H. Inhibitory effects of astragaloside IV on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats via attenuation of oxidative stress and inflammation[J]. *Inflammation*, 2016, 39(5): 1835–1841.
- [17] 李姐, 沈泉, 吴趋荟, 等. 柴胡含药血清通过 Smad3/Rheb 轴调节 HFL1 细胞凋亡和肌成纤维细胞转化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(11): 89–96.
- [18] 邹吉宇, 庞立健, 吕晓东, 等. “肺虚络瘀”病机观与“机械应力异常”在特发性肺纤维化发病过程中的相关性[J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(2): 686–689.
- [19] 王省, 李艳, 周璐, 等. 浅析特发性肺纤维化的病机及治法[J]. 中医学报, 2023, 38(5): 978–982.
- [20] 于睿智, 庞立健, 王天娇, 等. 从虚、毒、痰、瘀辨治特发性肺纤维化[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(10): 5815–5818.
- [21] 王彦君, 王雪林, 李欣泽, 等. 中医药治疗特发性肺纤维化研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(6): 1033–1035.
- [22] 叶敏, 何光亮, 刘磊, 等. 黄芪甲苷在肺部疾病防治中的作用和机制研究进展[J/OL]. 中华中医药学刊, 1–15[2024–04–03]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.r.20241121.1042.078.html>.
- [23] LI T H, GAO X J, JIA R, et al. Astragaloside IV inhibits idiopathic pulmonary fibrosis through activation of autophagy by miR-21-mediated PTEN/PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Cellular and Molecular Biology*, 2024, 70(2): 128–136.
- [24] TONG J H, WU Z S, WANG Y C, et al. Astragaloside IV synergizing with ferulic acid ameliorates pulmonary fibrosis by TGF- $\beta 1$ /Smad3 signaling [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2021, 2021: 8845798.
- [25] GUAN Y Y, ZHANG J, CAI X R, et al. Astragaloside IV inhibits epithelial-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis via lncRNA-ATB/miR-200c/ZEB1 signaling pathway[J]. *Gene*, 2024, 897: 148040.
- [26] 周云越, 陈星彤, 杨金彪, 等. 肺纤维化中 Wnt/ β -catenin 和 TGF- $\beta 1$ /Smad 信号通路之间的串扰研究[J/OL]. 海南医学院学报, 1–10[2024–12–03]. <https://doi.org/10.13210/j.cnki.jhmu.20241108.002>.
- [27] OKAZAKI H, SATO S, KOYAMA K, et al. The novel inhibitor PRI-724 for Wnt/ β -catenin/CBP signaling ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice[J]. *Experimental Lung Research*, 2019, 45(7): 188–199.
- [28] 邓雅茹, 陈同生. 中药单体抗肺纤维化研究进展[J/OL]. 中医学报, 1–6[2024–04–03]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/41.1411.R.20240729.1640.056.html>.
- [29] 王培. 淫羊藿苷通过 Wnt/ β -catenin 信号通路对肺纤维化的作用机制研究及相关临床分析[D]. 济南: 山东中医药大学, 2018.
- [30] WANG Y, DONG X M, ZHAO N, et al. Schisandrin B attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice through the wntless/integrase-1 signaling pathway[J]. *Experimental Lung Research*, 2020, 46(6): 185–194.

(本文编辑 田梦妍)