

· 肿瘤学研究 ·

紫杉醇影响TGF- β 1诱导的原代人肺成纤维细胞向肌成纤维细胞转化

韩宏浩, 俞敏, 孔辉, 解卫平*

南京医科大学第一附属医院呼吸与危重症学科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:研究紫杉醇(paclitaxel, PTX)对重组人转化生长因子- β 1(recombinant human transform growth factor- β 1, rhTGF- β 1)诱导人肺成纤维细胞(human lung fibroblasts, HLFs)向肌成纤维细胞转化的影响及其相关机制。方法:培养HLFs, 药物处理分为对照组、TGF- β 1组(5 ng/mL)、TGF- β 1+PTX(0.01 nmol/L)组、TGF- β 1+PTX(0.1 nmol/L)组、TGF- β 1+PTX(1 nmol/L)组、PTX组(1 nmol/L)。采用CCK8法测定细胞活性;显微镜下观察并分析细胞形态学变化;Transwell实验检测细胞迁移能力;免疫荧光观察细胞内 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达及分布情况;real-time PCR和Western blot检测各组 α -SMA、纤连蛋白(fibronectin)、I型胶原蛋白(collagen I)、III型胶原蛋白(collagen III)mRNA水平及蛋白含量;Western blot检测各组细胞内p-Smad3、Smad3、p-p38和p38蛋白含量。结果:CCK8结果显示,1 nmol/L PTX对细胞无毒性作用,0.01 nmol/L PTX不能抑制TGF- β 1诱导的HLFs活性增加,0.1和1.0 nmol/L PTX可以抑制TGF- β 1诱导的HLFs活性增加;细胞形态学结果显示,0.01 nmol/L PTX不能抑制TGF- β 1诱导的HLFs胞体宽度增加,0.1、1.0 nmol/L PTX可以抑制TGF- β 1诱导的HLFs胞体宽度增加;Transwell实验结果显示,0.01 nmol/L PTX不能抑制TGF- β 1诱导的HLFs迁移,0.1、1.0 nmol/L PTX可以抑制TGF- β 1诱导的HLFs迁移;免疫荧光结果显示,0.01 nmol/L PTX不能降低TGF- β 1诱导的HLFs内 α -SMA荧光强度,0.1、1.0 nmol/L PTX可以降低TGF- β 1诱导的HLFs内 α -SMA荧光强度;real-time PCR和Western blot结果显示,0.01 nmol/L PTX不能降低TGF- β 1诱导的HLFs表型转化标志物 α -SMA、fibronectin、collagen I、collagen III含量及p38的磷酸化水平,0.1、1.0 nmol/L PTX可以降低TGF- β 1诱导的HLFs表型转化标志物 α -SMA、fibronectin、collagen I、collagen III含量以及Smad3和p38的磷酸化水平。结论:紫杉醇可以抑制TGF- β 1诱导原代HLFs向肌成纤维细胞表型转化,这种作用可能与抑制TGF- β /Smad/MAPK信号通路激活有关。

[关键词] 肺纤维化;紫杉醇;成纤维细胞;TGF- β 1

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)08-1159-08

doi:10.7655/NYDXBNS20190812

The effects of paclitaxel on the differentiation of human lung fibroblasts into myofibroblasts induced by TGF- β 1

Han Honghao, Yu Min, Kong Hui, Xie Weiping*

Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to explore the effects of paclitaxel on the differentiation of human lung fibroblasts (HLFs) into myofibroblasts induced by recombinant human transform growth factor- β 1 (rhTGF- β 1) and potential mechanism. **Methods:** HLFs were cultured and divided into six groups: the control group, the TGF- β 1-treated group (5 ng/mL), the TGF- β 1 plus 0.01, 0.10, 1.00 nmol/L paclitaxel group and the paclitaxel-only (1 nmol/L) group. Cell viability was measured by CCK8 assay. Cell morphology changes were observed and analyzed by microscope. Transwell assay was carried out to assess cell migration. Immunofluorescence was employed to detect the expression of α -SMA. The levels of α -SMA, fibronectin, collagen I, collagen III were detected by real-time PCR and Western blot. The protein levels of phospho-Smad3, Smad3, phospho-p38 and p38 in cells were determined by Western blot. **Results:** The

[基金项目] 国家科技重大专项(2018ZX10722301-002);国家自然科学基金(81273571, 81870054);江苏省卫生厅重点项目(H201601);江苏省临床医学研究中心支撑体系建设(BL2014084)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wpxie@njmu.edu.cn

results of CCK8 showed that 1 nmol/L PTX had no toxic effect on HLFs, 0.01 nmol/L PTX could not inhibit the cell viability of HLFs induced by TGF- β 1, and 0.1, 1.0 nmol/L PTX could inhibit the cell viability of HLFs induced by TGF- β 1; The results of cell morphology showed that 0.01 nmol/L PTX could not reduce the width of HLFs induced by TGF- β 1, and 0.1, 1.0 nmol/L PTX could reduce the width of HLFs induced by TGF- β 1; The results of transwell assay showed that 0.01 nmol/L PTX could not inhibit the migration of HLFs induced by TGF- β , and 0.1, 1.0 nmol/L PTX could inhibit the migration of HLFs induced by TGF- β 1; The results of immunofluorescence showed that 0.01 nmol/L PTX could not decrease the fluorescence intensity of α -SMA induced by TGF- β 1, and 0.1, 1.0 nmol/L PTX could decrease the fluorescence intensity of α -SMA induced by TGF- β 1; The results of Real-time PCR and Western blot showed that 0.01 nmol/L PTX could not decrease the content of phenotypic transformation markers such as α -SMA, fibronectin, collagen I, collagen III and down-regulated the phosphorylation p38, and 0.1, 1.0 nmol/L PTX could decrease the content of phenotypic transformation markers such as α -SMA, fibronectin, collagen I, collagen III, and down-regulated the phosphorylation of Smad3 and p38. **Conclusion:** PTX inhibited the differentiation of human lung fibroblasts into myofibroblasts induced by TGF- β 1 via TGF- β /Smad/MAPK signaling pathway.

[Key words] pulmonary fibrosis; paclitaxel; fibroblast; TGF- β 1

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(08): 1159-1166]

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种慢性、进行性和不可逆转的间质性肺病,其组织学和胸部高分辨率CT表现为普通型间质性肺炎(usual interstitial pneumonia, UIP),病因不清^[1]。IPF患者预后差,中位生存期仅3~5年^[2]。目前尚缺乏有效的治疗手段。在IPF发生过程中,肺成纤维细胞通过异常增殖、向肌成纤维细胞表型转变、分泌过多的细胞外基质,推动肺纤维化进程^[3]。转化生长因子(transform growth factor β 1, TGF- β 1)是一类重要的致纤维化的细胞因子,可以活化下游转录因子 Smad3,或是通过激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路,促进细胞增殖和迁移,使细胞胶原合成增加,最终导致肺纤维化^[4]。紫杉醇(paclitaxel, PTX)是临床广泛使用的抗肿瘤药物^[5]。近年来有报道称PTX可以改善博来霉素诱导的小鼠肺纤维化^[6],但尚无研究证实该药可以抑制人肺成纤维细胞(human lung fibroblasts, HLFs)向肌成纤维细胞转化。本研究通过测定PTX对TGF- β 1诱导HLFs增殖迁移能力影响、表型转化分子标志物表达变化以及相关信号通路磷酸化水平,揭示PTX对成纤维细胞向肌成纤维细胞转化的影响及可能分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

HLFs、成纤维细胞培养基(ScienCell公司,美国),rhTGF- β 1(RD公司,美国),PTX(APEX BIO公司,美国),CCK8试剂盒(同仁公司,日本),结晶紫染液(上海碧云天生物技术公司),RT-PCR试剂盒

(TaKaRa公司,日本),GAPDH、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、纤连蛋白(fibronectin)、I型胶原蛋白(collagen I)、III型胶原蛋白(collagen III)PCR引物(上海捷瑞生物工程有限公司),GAPDH、 α -SMA、collagen I、collagen III抗体(Proteintech公司,美国),fibronectin抗体(Abcam公司,美国),p-Smad3、Smad3、p-p38、p38抗体(CST公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组

HLFs培养在含2%胎牛血清、1%成纤维细胞生长因子和100 U/mL青霉素及100 mg/L链霉素的成纤维细胞培养基中,置于37℃ 5%CO₂的培养箱内。待细胞生长至70%融合时分组处理,分为6组,对照组, TGF- β 1组(5 ng/mL), TGF- β 1+PTX(0.01 nmol/L)组、TGF- β 1+PTX(0.1 nmol/L)组、TGF- β 1+PTX(1 nmol/L)组、PTX组(1 nmol/L)。PTX在TGF- β 1处理前30 min加入。

1.2.2 细胞活性检测

取对数生长期HLFs以 1×10^4 个/孔的密度接种于96孔板,待细胞贴壁生长至70%融合时,用无血清培养基饥饿24 h。经过药物处理72 h后,每孔加入20 μ L CCK8试剂,孵育4 h后,用酶标仪检测细胞在波长450 nm处的吸光度。

1.2.3 细胞形态分析

取对数生长期HLFs以 1×10^5 个/孔的密度接种于6孔板,待细胞贴壁生长至70%融合时,用无血清培养基饥饿24 h。经药物处理72 h后,在倒置显微镜下观察细胞形态变化,每个孔随机选取5个视野。用Image Pro Plus测量每个视野细胞胞体最宽处的直径,取平均值,分析比较差异。

1.2.4 Transwell 迁移实验

取对数生长期 HLFs 制成 1×10^5 个/mL 无血清细胞悬液, 种于 $8 \mu\text{m}$ 孔径的 Transwell 上室中, 下室加入 $600 \mu\text{L}$ 无血清培养基, 根据分组在下室加入所需药物。培养 24 h 后取出小室, 多聚甲醛固定, 结晶紫染色, 于显微镜下每孔随机取 5 个视野计数迁移细胞。

1.2.5 细胞免疫荧光分析

取对数生长期 HLFs 以 1×10^4 个/孔的密度接种于 Milli cell 小室中, 待细胞贴壁生长至 70% 融合时, 用无血清培养基饥饿 24 h。给药处理 72 h 后, PBS 清洗 3 次, 多聚甲醛固定 30 min, TritonX-100 破膜 20 min, 5% 牛血清白蛋白(BSA)室温封闭 1 h, 随后加入 α -SMA 一抗(1:200, Proteintech 公司, 美国) 4°C 孵育过夜, PBS 清洗 3 次, 加入荧光二抗(1:1 000, Invitrogen 公司, 美国) 室温孵育 1 h。PBS 清洗后 Hoechst 33342 染核, 在显微镜下观察拍照。

1.2.6 real-time PCR

取对数生长期 HLFs 以 1×10^5 个/孔的密度接种于 12 孔板, 待细胞贴壁生长至 70% 融合时, 用无血清培养基饥饿 24 h。给药处理 72 h 后, 用 TRIzol 法提取各组细胞总 RNA, 逆转录之后进行定量 PCR。以 GAPDH 为内参, 引物序列如下: α -SMA 上游引物: 5'-TCTCTTGATGATGCTGATGC-3', 下游引物: 5'-GACACTCTAACACTTCATTC-3'。fibronectin 上游引物: 5'-GAGGGAGAATAAGCTGTACCATCG-3', 下游引物: 5'-CTTTTCCATTACCAAGACACACACA-3'。collagen I 上游引物: 5'-CGATGGATTCCAGTTCGAGTATG-3', 下游引物: 5'-TGTTCTTGCAGTGGTAGGTGATG-3'。collagen III 上游引物: 5'-TGGAATCTGTGAATCATGCCCTACT-3', 下游引物: 5'-CTGCGAGTCTCTACTGCTACT-3'。GAPDH 上游引物: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', 下游引物: 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'。

1.2.7 Western blot

取对数生长期的 HLFs 以 1×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板, 待细胞贴壁生长至 70% 融合时, 用无血清培养基饥饿 24 h。给药处理 72 h 后, 加入 RIPA 裂解液提取细胞蛋白。蛋白经电泳分离后转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h, 加入一抗(抗体稀释比例为 1:1 000) 4°C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入二抗(抗体稀释比例为 1:8 000), 孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。加入发光反应液, 测定蛋白表达含量。

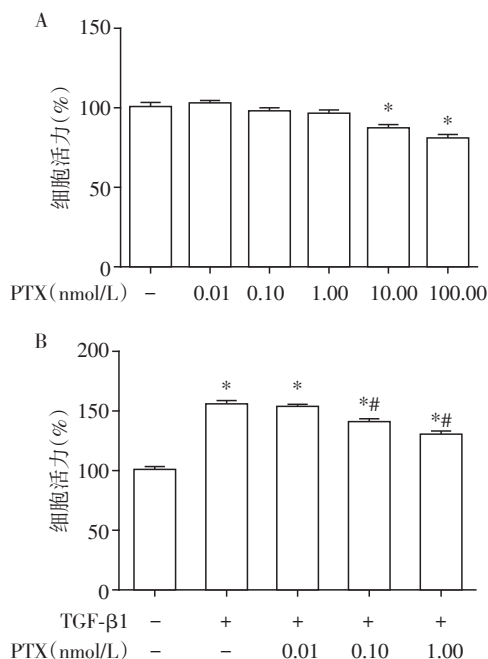
1.3 统计学方法

采用 SPSS22.0 统计软件对数据进行统计学处理, 所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 统计分析采用单因素方差分析, 并使用 LSD-*t* 法进行组间比较。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PTX 对 TGF-β1 诱导人肺成纤维细胞活性的影响

CCK8 结果显示, 与未加入药物刺激的对照组相比, PTX 在 1 nmol/L 浓度以下对 HLFs 细胞活性的影响差异没有统计学意义($P > 0.05$, 图 1A)。TGF-β1 (5 ng/mL) 作用 72 h 后 HLFs 细胞活性相较未用 TGF-β1 诱导的对照组相比, 细胞活性增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 1B); TGF-β1+PTX(0.01 nmol/L) 组与 TGF-β1 组相比, HLFs 细胞活性差异没有统计学意义($P > 0.05$)。0.1 nmol/L 及 1 nmol/L PTX 能显著抑制 TGF-β1 诱导所致的 HLFs 细胞活性升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 1B)。



A: CCK8 检测药物毒性($n=3$); B: 不同浓度 PTX+TGF-β1 处理后的细胞活性。与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 TGF-β1 组比较, # $P < 0.05$ ($n=3$)。

图1 PTX对TGF-β1诱导HLFs活性的影响

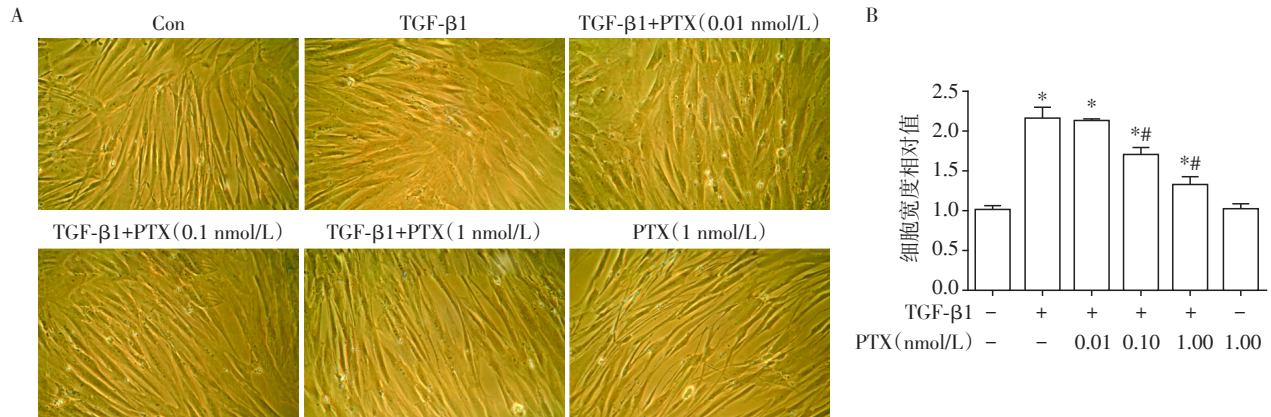
Figure 1 Effects of PTX on the viability of HLFs challenged by TGF-β1

2.2 PTX 对 TGF-β1 诱导 HLFs 形态学变化的影响

形态学分析结果显示, 与未加入药物刺激的对照组相比, TGF-β1 (5 ng/mL) 作用 72 h 后, HLFs 细胞

间空隙减少,细胞间出现重叠,胞体由细长形变为扁平形,细胞宽度增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。TGF- β 1+PTX(0.01 nmol/L)组与TGF- β 1组相比,HLFs细胞宽度差异没有统计学意义($P > 0.05$)。0.1 nmol/L及1.0 nmol/L PTX能显著抑制

TGF- β 1诱导所致的HLFs细胞宽度增加,差异有统计学意义($P < 0.05$,图2)。单独使用PTX(1 nmol/L)与对照组相比,HLFs细胞宽度差异没有统计学意义($P > 0.05$,图2)。这一结果提示PTX可以抑制TGF- β 1诱导的细胞形态变化。



A:显微镜下观察细胞形态学变化($\times 100$);B:细胞宽度相对值比较。与对照组比较,* $P < 0.05$;与TGF- β 1组比较,** $P < 0.05$ ($n=3$)。

图2 PTX对TGF- β 1诱导HLFs形态学变化的影响

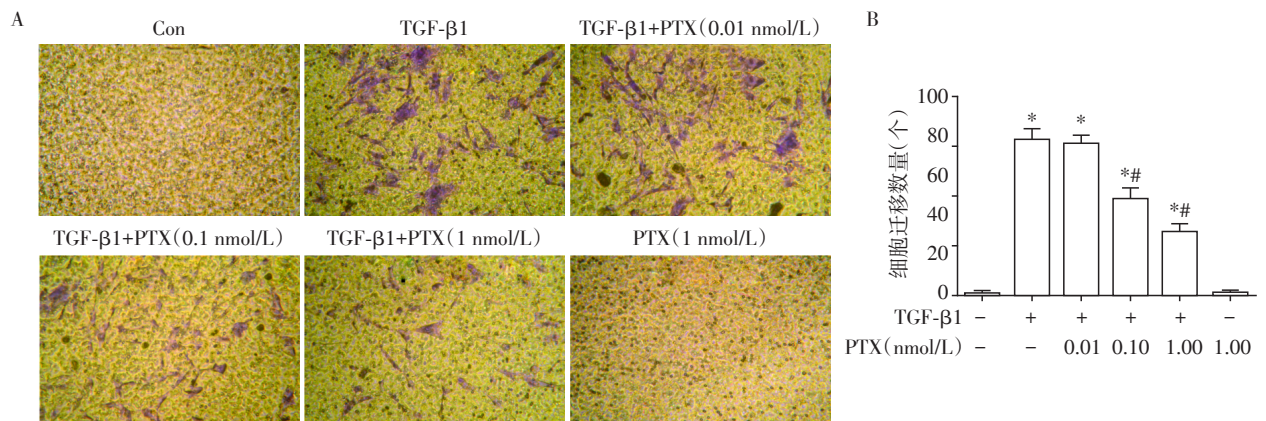
Figure 2 Effects of PTX on the morphological changes of HLFs challenged by TGF- β 1

2.3 PTX对TGF- β 1诱导HLFs迁移能力的影响

Transwell 迁移实验结果显示,与未加入药物刺激的对照组相比,TGF- β 1组(5 ng/mL)细胞迁移数目增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。TGF- β 1+PTX(0.01 nmol/L)对HLFs细胞迁移与TGF- β 1组相比,差异没有统计学意义($P > 0.05$)。0.1 nmol/L及1.0 nmol/L PTX能显著抑制TGF- β 1诱导所致的HLFs细胞迁移,差异有统计学意义($P < 0.05$,图3)。单独使用PTX(1 nmol/L)对HLFs细胞迁移与对照组相比,差异没有统计学意义($P > 0.05$,图3)。这一结果表明PTX可以抑制TGF- β 1诱导的细胞迁移。

2.4 PTX对TGF- β 1诱导HLFs表型转化标志物的影响

细胞免疫荧光结果显示,与未加入药物刺激的对照组相比,TGF- β 1组(5 ng/mL)细胞内 α -SMA表达增高,荧光强度增强。TGF- β 1+PTX(0.01 nmol/L)组对HLFs胞内 α -SMA表达与TGF- β 1组相比,荧光强度差异不明显。TGF- β 1+PTX(0.1 nmol/L)组和TGF- β 1+PTX(1 nmol/L)组相较于TGF- β 1组, α -SMA荧光强度减弱(图4A)。与对照组相比,TGF- β 1组HLFs内 α -SMA、fibronectin、collagen I、collagen III mRNA及蛋白表达增高,差异有统计学意义($P <$



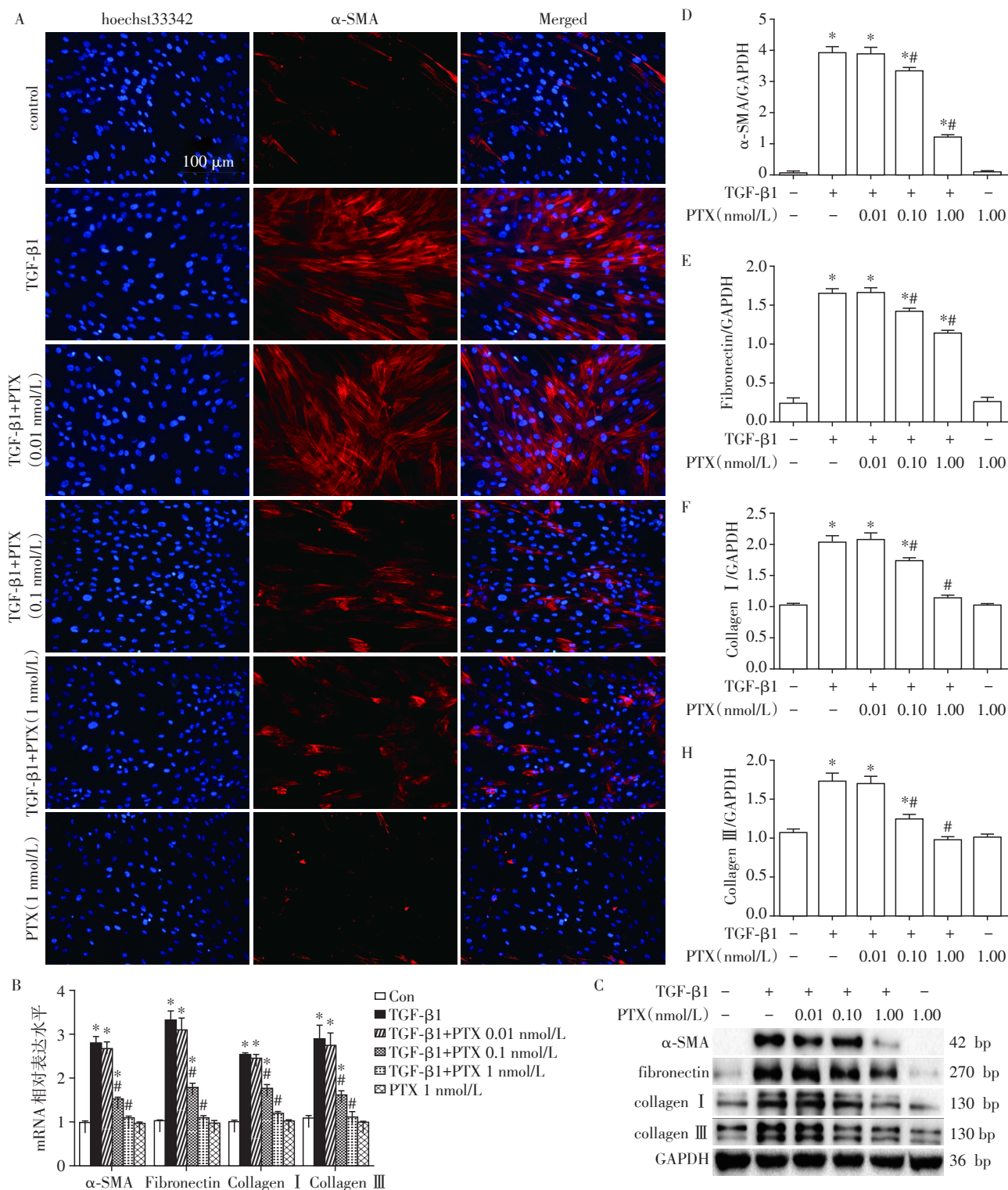
A:Transwell 实验检测细胞迁移能力($\times 100$);B:细胞迁移计量指标比较。与对照组比较,* $P < 0.05$;与TGF- β 1组比较,** $P < 0.05$ ($n=3$)。

图3 PTX对TGF- β 1诱导HLFs迁移能力的影响

Figure 3 Effects of PTX on the migration of HLFs challenged by TGF- β 1

0.05,图4B、C)。TGF-β1+PTX(0.01 nmol/L)组相较于TGF-β1组,各表型转化标志物差异没有统计学

意义($P > 0.05$)。TGF-β1+PTX(0.1 nmol/L)组和TGF-β1+PTX(1 nmol/L)组相较于TGF-β1组,各表



A: 免疫荧光实验观察细胞内α-SMA表达(×200); B: real-time-PCR检测α-SMA、fibronectin、collagen I、collagen III mRNA相对表达; C: Western blot检测α-SMA、fibronectin、collagen I、collagen III蛋白表达及相对定量分析。与对照组比较,* $P < 0.05$;与TGF-β1组比较,# $P < 0.05$ ($n=3$)。

图4 PTX对TGF-β1诱导HLFs向肌成纤维细胞转化特征性标志物的影响

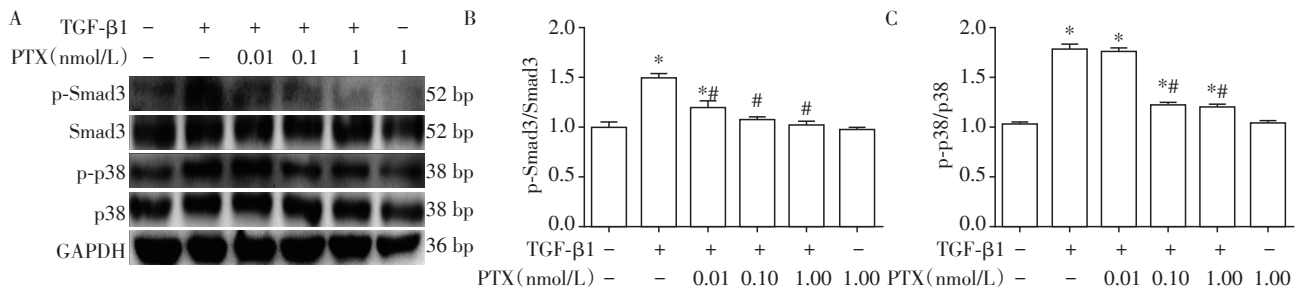
Figure 4 Effects of PTX on the expression of α-SMA, fibronectin, collagen I, collagen III of HLFs challenged by TGF-β1

型转化标志物表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$,图4C~G)。单独使用PTX(1 nmol/L)组与对照组相比,上述分子的mRNA及蛋白差异没有统计学意义($P > 0.05$)。这些结果表明,PTX可以抑制TGF- β 1诱导的成纤维细胞向肌成纤维细胞转化。

2.5 PTX对TGF- β 1诱导HLFs内Smad3及p38磷酸化水平的影响

Western blot结果显示,与未加入药物刺激的对照组相比,TGF- β 1作用30 min后,Smad3及p38磷酸化水平明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。TGF- β 1+PTX(0.01 nmol/L)组、TGF- β 1+PTX

(0.1 nmol/L)组和TGF- β 1+PTX(1 nmol/L)组相较于TGF- β 1组,Smad3磷酸化水平下降,差异有统计学意义($P < 0.05$,图5A、B)。TGF- β 1+PTX(0.01 nmol/L)组相较于TGF- β 1组,p38磷酸化水平差异没有统计学意义($P > 0.05$)。TGF- β 1+PTX(0.1 nmol/L)组和TGF- β 1+PTX(1 nmol/L)组相较于TGF- β 1组,p38磷酸化水平下降,差异有统计学意义($P < 0.05$,图5A、C)。单独使用PTX(1 nmol/L)组与对照组相比,Smad3及p38磷酸化水平差异没有统计学意义($P > 0.05$)。因此,Smad3及p38信号与PTX对TGF- β 1诱导的HLFs向肌成纤维细胞转化的抑制作用相关。



Western blot检测Smad3及p38磷酸化水平。与对照组比较,* $P < 0.05$;与TGF- β 1组比较,# $P < 0.05$ ($n=3$)。

图5 PTX对TGF- β 1诱导HLFs中Smad3及p38磷酸化水平影响

Figure 5 Effects of PTX on the expression of Smad3 and p-p38 of HLFs challenged by TGF- β 1

3 讨论

IPF是一种病因未明的慢性进行性间质性肺病,好发于老年人,病死率较高。持续的慢性炎症反应被认为在肺纤维化早期进程中发挥重要作用,可以诱导肺泡损伤^[7]。IPF病程后期为肺组织过度修复及重塑的过程,以成纤维细胞异常增殖并向肌成纤维细胞表型转化、纤维母细胞灶形成、胶原纤维过度合成及分泌为最显著的病理改变。导致成纤维细胞发生表型转化的因素很多,TGF- β 是诱导这一过程最主要的细胞因子。本研究采用TGF- β 1诱导肺成纤维细胞向肌成纤维细胞转化,结果显示,1 nmol/L PTX对细胞无毒性作用,且0.1 nmol/L及1.0 nmol/L PTX可以抑制TGF- β 1诱导的成纤维细胞的增殖、迁移及形态变化。进一步研究显示,PTX能抑制TGF- β 1诱导的 α -SMA、fibronectin、collagen I、collagen III蛋白表达上调,并抑制TGF- β 1诱导的Smad3和p38磷酸化。

PTX是从红豆杉树皮中提取分离出的一种天然产物,具有良好的抗肿瘤作用,用于治疗卵巢癌、转移性乳腺癌和肺癌等疾病。相关研究发现,PTX具

有抗有丝分裂的作用,诱导微管蛋白装配成微管防止解聚,最终引起细胞死亡^[8]。微管是组成细胞骨架的重要成分之一,具有维持细胞形态、辅助细胞内物质运输、构成鞭毛纤毛参与细胞运动功能^[9]。细胞迁移是指细胞在接收到迁移信号或感受到某些物质的梯度后而产生移动,是活细胞普遍存在的一种运动形式^[10]。细胞迁移离不开细胞骨架的参与。细胞接受外界刺激因素后可影响细胞骨架,进而影响细胞迁移和正常的细胞形态^[11]。研究发现,PTX可以激活FoxO₁,在肿瘤细胞迁移过程中发挥重要作用^[12-13]。此外,PTX可以改善TGF- β 1诱导A549形态改变,减少间质标志物如波形蛋白的表达^[6]。最近研究发现,除了抗癌作用,PTX还具有多种生物学功能。PTX可以通过上调miR-140,抑制肺内TGF- β 1/Smad3信号通路的激活,从而改善博来霉素诱导的小鼠肺纤维化^[6]。上述研究表明PTX具有抗炎、抗纤维化及促凋亡等生物学功能。本研究通过离体细胞模型,研究PTX对TGF- β 1诱导HLFs向具有分泌胶原纤维功能的肌纤维母细胞转化过程的作用,发现PTX能够有效抑制TGF- β 1诱导的HLFs增殖迁移、形态变化、表型转化,表明低浓度的PTX可

能具有抑制成纤维细胞介导的肺纤维化过程。

细胞外基质(ECM)是指分布于细胞膜外,由细胞分泌的蛋白及多糖构成的复杂的网状结构,包括胶原蛋白、非胶原蛋白、弹性蛋白、蛋白聚糖与氨基聚糖,参与细胞的生长、极性、迁移和代谢活动^[14]。正常情况下,ECM的合成与降解处于动态平衡,表达稳定。成纤维细胞向肌成纤维细胞转化后,细胞外基质分泌增多,以collagen I及collagen III为主,同时细胞内高表达 α -SMA,细胞的收缩能力增强,这也是成纤维细胞与肌成纤维细胞间的主要区别之一^[15]。研究显示collagen I可以促使肾小管上皮细胞形态改变^[16],collagen I含量增加时,细胞迁移能力增强^[17]。当 α -SMA表达升高时,不仅收缩能力增强,迁移能力也增强^[18]。研究显示PTX可以降低肺纤维化大鼠模型胶原蛋白及 α -SMA的表达^[19],相似的结果也在小鼠肺纤维化模型证实。本实验通过细胞免疫荧光、real-time PCR及Western blot显示,PTX可以降低TGF- β 1诱导的肺成纤维细胞 α -SMA、fibronectin、collagen I、collagen III的表达,提示PTX可能通过减少细胞外基质的分泌参与TGF- β 1诱导的肺成纤维细胞表型转化过程。

肺成纤维细胞与肺纤维化发生发展关系密切,可通过自身异常增殖和分泌过多的细胞外基质两个方面促进纤维化的发生。正常情况下,肺成纤维细胞胞体较小,呈梭形,在促纤维化因素作用下,肺成纤维细胞可被持续激活,除表现为细胞增殖能力增强外,还表现为胞体变大及外形不规则、胞质内有丰富的粗面内质网和高尔基复合体,同时细胞的迁移能力也增强^[20]。本研究结果显示,PTX可以抑制TGF- β 1诱导的成纤维细胞增殖、改善细胞形态变化、减弱细胞迁移能力。既往研究显示,作为一种抗微管类抗肿瘤药物,PTX可以调控MAPK通路的激活进而抑制多种肿瘤细胞增殖和迁移^[21]。PTX还可以调控TGF- β /Smad3通路的激活进而抑制肿瘤细胞增殖^[22]。因此,PTX可能通过调节Smad及MAPK信号转导参与了调控TGF- β 1诱导的肺成纤维细胞活化过程。

TGF- β 1属于可以调节细胞生长和分化的TGF- β 超家族,能使正常的成纤维细胞表型发生转化,被认为是促进纤维化形成的重要细胞因子。Smads家族蛋白是TGF- β 信号转导过程中的主要蛋白激酶之一,可以将TGF- β 信号从细胞表面受体转导至细胞核,促进细胞外基质蛋白的合成。大量研究结果表明,肺纤维化过程中,肺组织内TGF- β 1含量升高,

通过激活TGF- β 1/Smad2/3信号通路促进成纤维细胞向肌成纤维细胞转化^[23]。除Smad信号通路之外,MAPK通路也是TGF- β 下游重要的信号转导通路。MAPK是一组能被不同细胞外刺激激活的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶,调节细胞生长分化等多种生理过程^[24]。有报道表明成纤维细胞向肌成纤维细胞转化过程中p38 MAPK信号通路激活^[25]。此外,Smad和MAPK信号通路可能具有“cross-talk”。研究显示,使用Smads特异性抑制剂可以抑制TGF- β 诱导的MAPK信号通路激活^[26],而用丝裂原活化蛋白激酶激酶1/2(MEK1/2)抑制剂U0126或p38 MAPK抑制剂SB202190预处理抑制非Smad通路,并没有消除TGF- β 1诱导的Smad2磷酸化^[27],提示Smad信号通路可能处于上游位置。本研究结果显示,细胞经TGF- β 1刺激后Smad3及p38磷酸化水平增加,PTX可以逆转Smad3磷酸化水平,部分抑制p38磷酸化水平,提示PTX可能通过抑制TGF- β /Smads/MAPK信号通路从而抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞转化。

综上所述,本研究结果表明,PTX抑制了TGF- β 1诱导的HLFs的增殖及迁移,降低 α -SMA、fibronectin、collagen I、collagen III蛋白表达,下调Smad3和p38磷酸化水平。现有的治疗肺纤维化药物疗效有限,仍需要更为有效的治疗手段。PTX作为一种抗肿瘤药物问世,在今后的研究中,可以在动物模型中探寻合适的给药剂量和给药途径,减少药物引起的不良反应;寻找合适的载体,增强药物的靶向作用;研究更深层次的分子作用机制以及信号通路间的相互作用,为PTX治疗IPF提供更多的理论和实验依据。

[参考文献]

- [1] Lynch DA, Sverzellati N, Travis WD, et al. Diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis: a Fleischner Society White Paper [J]. *Lancet Respir Med*, 2018, 6(2): 138-152
- [2] Thannickal VJ. Mechanistic links between aging and lung fibrosis [J]. *Biogerontology*, 2013, 14(6): 609-615
- [3] Wolters PJ, Collard HR, Jones KD, et al. Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2014, 9: 157-179
- [4] Zheng X, Qi C, Zhang S, et al. TGF-beta1 induces Fstl1 via the Smad3-c-Jun pathway in lung fibroblasts [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017, 313(2): L240-L251
- [5] Huang ST, Wang YP, Chen YH, et al. Liposomal paclitaxel induces fewer hematopoietic and cardiovascular complications than bioequivalent doses of Taxol [J]. *Int J Oncol*,

- 2018,53(3):1105-1117
- [6] Wang C, Song X, Li Y, et al. Low-dose paclitaxel ameliorates pulmonary fibrosis by suppressing TGF- β 1/Smad3 pathway via miR-140 upregulation[J]. PLoS One, 2013,8(8):e7072
- [7] Adegunsoye A, Balachandran J. Inflammatory response mechanisms exacerbating hypoxemia in coexistent pulmonary fibrosis and sleep apnea [J]. Mediators Inflamm, 2015,2015:510105
- [8] Sloboda RD. Isolation of microtubules and microtubule-associated proteins using paclitaxel [J]. Cold Spring Harb Protoc, 2015,2015(1). doi:10.1101/pdb prot081190
- [9] Ilan Y. Microtubules: from understanding their dynamics to using them as potential therapeutic targets [J]. J Cell Physiol, 2018,234(6):1-15
- [10] Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, et al. *In vitro* cell migration and invasion assays [J]. J Vis Exp, 2014(88):e51046
- [11] Zhao M, Zhou Q, He C, et al. Stored red blood cells enhance in vivo migration of dendritic cells by promoting reactive oxygen species-induced cytoskeletal rearrangement [J]. Transfusion, 2019,59(4):1312-1323
- [12] Wang F, Cao Y, Liu HY, et al. Anti-invasion and anti-angiogenesis effect of taxol and camptothecin on melanoma cells[J]. J Asian Nat Prod Res, 2003,5(2):121-129
- [13] 罗娟,周晓,程志祥. FoxO₃在非小细胞肺癌中的研究进展[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2018,38(8):1161-1166
- [14] White ES. Lung extracellular matrix and fibroblast function [J]. Ann Am Thorac Soc, 2018,12(Suppl 1):S30-S33
- [15] Wang Q, Wang J, Wang J, et al. HMGB1 induces lung fibroblast to myofibroblast differentiation through NF κ B-mediated TGF β 1 release [J]. Mol Med Rep, 2017,15(5):3062-3068
- [16] Stahl PJ, Felsen D, et al. Transforming growth factor- β , basement membrane, and epithelial-mesenchymal transdifferentiation: implications for fibrosis in kidney disease [J]. Am J Pathol, 2001,159(4):1187-1192
- [17] Liu J, Shen JX, Wu HT, et al. Collagen 1A1 (COL1A1) promotes metastasis of breast cancer and is a potential therapeutic target [J]. Discov Med, 2018,25(139):211-223
- [18] Liu K, Fang C, Shen Y, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α induces phenotype switch of human aortic vascular smooth muscle cell through PI3K/AKT/AEG-1 signaling [J]. Oncotarget, 2017,8(20):33343-33352
- [19] Zhou Y, Zhu WP, Cai XJ, et al. Atomized paclitaxel liposome inhalation treatment of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats [J]. Genet Mol Res, 2016,15(2). doi:10.4238/gmr.15027309
- [20] Cai GQ, Zheng A, Tang Q, et al. Downregulation of FAK-related non-kinase mediates the migratory phenotype of human fibrotic lung fibroblasts [J]. Exp Cell Res, 2010,316(9):1600-1609
- [21] Ren X, Zhao B, Chang H, et al. Paclitaxel suppresses proliferation and induces apoptosis through regulation of ROS and the AKT/MAPK signaling pathway in canine mammary gland tumor cells [J]. Mol Med Rep, 2018,17(6):8289-8299
- [22] Cheng H, Chen T, Tor M, et al. A High-throughput screening platform targeting PDLIM5 for pulmonary hypertension [J]. J Biomol Screen, 2016,21(4):333-341
- [23] Zhou XM, Wang GL, Wang XB, et al. GHK peptide inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by suppressing TGF β 1/Smad-mediated epithelial-to-mesenchymal transition [J]. Front Pharmacol, 2017,8:904
- [24] Sun Y, Liu WZ, Liu T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2015,35(6):600-604
- [25] Wang Y, Huang G, Wang Z, et al. Elongation factor-2 kinase acts downstream of p38 MAPK to regulate proliferation, apoptosis and autophagy in human lung fibroblasts [J]. Exp Cell Res, 2018,363(2):291-298
- [26] Boye A, Kan H, Wu C, et al. MAPK inhibitors differently modulate TGF- β /Smad signaling in HepG2 cells [J]. Tumour Biol, 2015,36(5):3643-3651
- [27] Wongnoppavich A, Dukaew N, Choonate S, et al. Upregulation of maspin expression in human cervical carcinoma cells by transforming growth factor β 1 through the convergence of Smad and non-Smad signaling pathways [J]. Oncol Lett, 2017,13(5):3646-3652

[收稿日期] 2019-01-17