

· 基础研究 ·

利拉鲁肽对博来霉素诱导大鼠肺纤维化的作用及其机制研究

朱家丽[△], 徐 健, 韩宏浩, 何梦钰, 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:研究利拉鲁肽(liraglutide, Li)对博来霉素(bleomycin, BLM)诱导大鼠肺纤维化的影响及其机制。方法:将SD大鼠随机分为4组:对照组(Con)、BLM组、BLM+Li组、Li组。气管内一次性注入BLM(4 U/kg)后, BLM+Li组、Li组大鼠予以每日皮下注射Li(0.2 mg/kg)。28 d后处死大鼠, 采用HE、Masson三色染色法评估肺组织病理情况;甲苯胺蓝染色法评估肥大细胞浸润情况;碱水解法测定肺组织羟脯氨酸水平;RT-qPCR法检测肺组织I型胶原蛋白 α 1、II型胶原蛋白 α 1、III型胶原蛋白 α 1、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 、白介素(interleukin, IL)-6、IL-1 β 、转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)mRNA水平;ELISA法检测肺组织TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量;免疫荧光法检测上皮细胞钙连蛋白(E-cadherin)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)的表达;Western blot法检测E-cadherin、紧密连接蛋白1(zona occluden-1, ZO-1)、闭合蛋白(Occludin)、 α -SMA、TGF- β 1的表达。结果:与BLM组相比, BLM+Li组肺组织炎症细胞浸润、肺泡结构破坏及纤维化程度减轻, 羟脯氨酸及胶原含量显著降低。Li能抑制BLM诱导的肺组织TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、TGF- β 1表达上调, 并抑制上皮细胞标志物E-cadherin、ZO-1、Occludin下调及间质细胞标志物 α -SMA的上调。结论:Li可减轻BLM诱导的大鼠肺纤维化, 这种保护作用与其减轻肺内炎症反应、降低TGF- β 1的表达及抑制上皮细胞间质转化有关。Li有望成为未来治疗肺纤维化的候选药物之一。

[关键词] 利拉鲁肽; 胰高血糖素样肽-1; 肺纤维化; 博来霉素; 上皮间质转化

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)02-166-08

doi: 10.7655/NYDXBNS20200204

Effects and potential mechanisms of liraglutide on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rat

ZHU Jiali[△], XU Jian, HAN Honghao, HE Mengyu, 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 investigate the effects of liraglutide (Li) on bleomycin (BLM)-induced pulmonary fibrosis in rat and the potential mechanisms underlying. **Methods:** SD rats were randomly divided into four groups: control group (Con), BLM group, BLM+Li group and Li group. After BLM (4 U/kg) was intratracheally administered once to induce pulmonary fibrosis, Li (0.2 mg/kg) was subcutaneously injected daily in BLM+Li and Li group while the control group was given the same volume of normal saline. On the day 28, all rats were anesthetized and the lung tissues were rapidly excised. Pulmonary injury and pulmonary fibrosis was evaluated by the hematoxylin-eosin and masson's trichrome staining. Mast cells were detected with toluidine blue staining. The hydroxyproline content in the lung was detected by alkali hydrolysis assay. Collagen type I α 1, collagen type II α 1, collagen type III α 1, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6, IL-1 β and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) mRNA were detected by real time quantitative PCR. ELISA was performed to analyze the level of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in the lung homogenates. E-cadherin and α -smooth muscle actin (α -SMA) expression were evaluated by immunofluorescence. The protein levels of E-cadherin, zona occluden 1 (ZO-1), Occludin, α -SMA and TGF- β 1 were detected by Western blot. **Results:** Compared with the BLM group, Li reduced inflammatory cell infiltration, interstitial thickness, collagen deposition, significantly reduced the expression of TNF- α , IL-6, IL-1 β and TGF- β 1; up-regulated the expression of E-cadherin, ZO-1, Occludin and down-regulated the expression of α -SMA. **Conclusion:** Li

[基金项目] 国家科技重大专项(2018ZX10722301-002);江苏省卫生厅重点项目(H201601)

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

[△]现在江苏省肿瘤医院, 江苏省肿瘤防治所, 南京医科大学附属肿瘤医院疼痛科

attenuates BLM-induced pulmonary fibrosis in rat, which might be attributed to its effects on alleviating inflammation, suppressing the expression of TGF- β 1 and inhibiting epithelial-mesenchymal transition. Li might be a potential therapeutic option for pulmonary fibrosis in the future.

[Key words] liraglutide; glucagon like peptide-1; pulmonary fibrosis; bleomycin; epithelial-mesenchymal transition

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(02): 166-173]

肺纤维化是各种慢性间质性肺病的最终阶段,其特征是肺实质破坏,成纤维细胞/肌成纤维细胞增殖与活化增多,细胞外基质沉积,最终导致肺换气功能障碍,呼吸衰竭^[1-2]。肺纤维化患者病情进展快,病死率高,而目前肺纤维化的治疗手段有限且疗效欠佳,其中特发性肺纤维化患者的中位生存期仅2~4年^[3]。对肺纤维化机制的进一步研究及研发安全有效的抗纤维化药物迫在眉睫。近年来研究发现,上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是肺纤维化发生发展的重要机制之一,是肌成纤维细胞的重要来源^[4]。当上皮细胞受外界损伤因素刺激时,EMT过程被启动,上皮细胞逐渐失去极性,转化成纺锤形的间质细胞,参与肺组织重塑,细胞外基质堆积,促进肺纤维化发生发展^[5]。因此,能够抑制EMT过程的药物可能成为潜在的抗肺纤维化药物。

胰高血糖素样肽-1(glucagon like peptide-1, GLP-1)是一种肠道L细胞分泌的肽类激素,与其特异性受体(GLP-1 receptor, GLP-1R)结合后,可以促进胰岛素分泌,具有降血糖作用^[6]。近年来发现, GLP-1R不仅分布于胰腺组织,在中枢神经系统、心脏、肾脏、肺等组织均有表达,生物学作用广泛^[7]。利拉鲁肽(liraglutide, Li)是目前临床上常用的一种GLP-1类似物,用于2型糖尿病的治疗^[6]。目前已证实Li具有抗炎^[8],减轻心脏^[9-10]、肾脏^[11]等器官纤维化的作用^[11],提示其可能对纤维化过程中的重要环节-EMT具有调节作用。然而,在呼吸系统中, Li对纤维化的作用及与EMT的相关性尚未明确。因此,本研究的目的是探讨Li对博来霉素(bleomycin, BLM)诱导大鼠肺纤维化的作用及其机制,为肺纤维化的治疗提供新的策略。

1 材料和方法

1.1 材料

Li(Novo Nordisk公司,丹麦),BLM(浙江海正药业股份有限公司),羟脯氨酸测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),RT-qPCR试剂盒(TaKaRa公司,日本),I型胶原蛋白 α 1(collagen type I alpha 1,

COL1 α 1)、II型胶原蛋白 α 1(collagen type II alpha 1, COL2 α 1)、III型胶原蛋白 α 1(collagen type III alpha 1, COL3 α 1)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 、白介素(interleukin, IL)-6、IL-1 β 、转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)PCR引物(上海捷瑞生物工程有限公司),大鼠TNF- α 、IL-6、IL-1 β ELISA检测试剂盒(武汉华美生物工程有限公司),上皮细胞钙连蛋白(E-cadherin)、TGF- β 1抗体(CST公司,美国),紧密连接蛋白1(zona occluden 1, ZO-1)、闭合蛋白(Occludin)、 β -actin抗体(Proteintech公司,美国), α -平滑肌激动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(Abcam公司,英国)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立及给药方案

SPF级成年健康雄性SD大鼠40只,体重(220 \pm 20)g,由南京医科大学动物中心提供。大鼠随机分为4组:对照组(Con)、BLM组、BLM+Li组、Li组,每组10只。1%戊巴比妥钠腹腔麻醉后, BLM组与BLM+Li组大鼠予以一次性气管内注入4 U/kg BLM诱导肺纤维化, Con组和Li组予以等体积生理盐水。Li组和BLM+Li组每日予以皮下注射利拉鲁肽(0.2 mg/kg), Con组和BLM组分别给予等体积生理盐水皮下注射。每日监测大鼠生存状态及体重变化并记录。给药28 d后,处死大鼠,右肺中叶固定于4%多聚甲醛中,其余肺叶冻存于-80℃冰箱。

1.2.2 肺组织形态学分析

肺组织在4%多聚甲醛中固定24 h后,石蜡包埋,制成4 μ m厚的切片并进行HE、Masson三色及甲苯胺蓝染色,光学显微镜观察肺组织病理变化及肥大细胞浸润,每张切片随机选择10个不同视野拍照。根据肺组织切片肺泡周围间质增生及肺泡结构破坏程度,使用Ashcroft评分评估纤维化程度^[12]。用Image-Pro Plus 6.0软件统计Masson染色图片中蓝色区域面积与总面积的比值(%),评估胶原沉积的程度。

1.2.3 肺组织羟脯氨酸含量测定

羟脯氨酸水平间接反映组织的胶原含量。称取肺组织100 mg,剪碎匀浆,根据试剂盒操作步骤

采用碱水解法进行实验。

1.2.4 ELISA 法检测肺组织匀浆 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平

称取 100 mg 肺组织,加入 1 mL PBS 匀浆后于-20 ℃冰箱过夜,2 次冻融后,4 ℃离心机离心,3 000 g,5 min,取上清。按照 ELISA 试剂盒操作说明进行分析。肺组织中 TNF-α、IL-6、IL-1β 含量最终以 pg/mL 计算。

1.2.5 免疫荧光染色法检测肺组织 E-cadherin 和 α-SMA 的表达

石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水后,放入柠檬酸缓冲液中进行高温修复,蒸馏水冲洗,3% 过氧化氢封闭 10 min,PBS 冲洗,1% BSA 湿盒内封闭 1 h 后滴加含兔 α-SMA 抗体(1:200)、鼠 E-cadherin 抗体(1:200)的一抗,4℃摇床孵育过夜,PBS 冲洗,滴加稀释的二抗(1:1 000),室温避光孵育 1 h,滴加稀释的 DAPI 染色液,避光孵育 10 min 后用荧光猝灭剂封片,使用激光共聚焦显微镜拍照。

1.2.6 RT-qPCR

TRIzol 法提取大鼠肺组织总 RNA,以 β-actin 为内参,按试剂盒说明进行 RT-qPCR。引物序列见表 1。

表 1 目标基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of targeted genes

引物	序列(5'→3')
COL1α1	AGAAAAGGGAACCAAAAGG
	GGAAGCCAGTCATACCAG
COL2α1	CTTTCTCTTTGCCATTTCTTCCTTT
	ACTGCTCTGACCAATCCTTCTCTTT
COL3α1	GTTTGGAGAATCTATGAATGGTGGC
	GCTGGAAGAAGTCTGAGGAAGG
TNF-α	GCGTGTTTCATCCGTTCTCTACC
	CTACTTCAGCGTCTCGTGTGTTTCT
IL-6	AGACTTCACAGAGGATACCACCCAC
	CAATCAGAATTGCCATTGCACAA
IL-1β	ACAAGGAGAGACAAGCAACGACAA
	TTTCCATCTTCTTCTTTGGGTATTG
TGF-β1	ATTCTGGCGTTACCTTG
	CCCTGTATTCCGTCTCCT
β-actin	CTGAACCCTAAGGCCAACCG
	GACCAGAGGCATACAGGGACAA

1.2.7 Western blot

称取大鼠肺组织,加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,剪碎并匀浆,提取总蛋白,BCA 法测蛋白含量,加入适量的 5× SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液。蛋

白每孔上样量为 15 μL,10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,300 mA 恒流湿转,将蛋白转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1h,再分别加入 E-cadherin、ZO-1、Occludin、α-SMA、TGF-β1 抗体(1:1 000),β-actin 抗体(1:5 000),4 ℃摇床孵育过夜,TBST 洗涤后加入二抗(1:5 000),室温孵育 1 h,TBST 洗涤后均匀滴入化学发光液,上机显影,以 β-actin 为内参,使用 Image J 分析结果。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 进行统计学分析,计量数据用均数±标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示,统计分析采用单因素方差分析,组间均数比较采用 LSD 法。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Li 对 BLM 诱导的大鼠肺组织形态学的作用

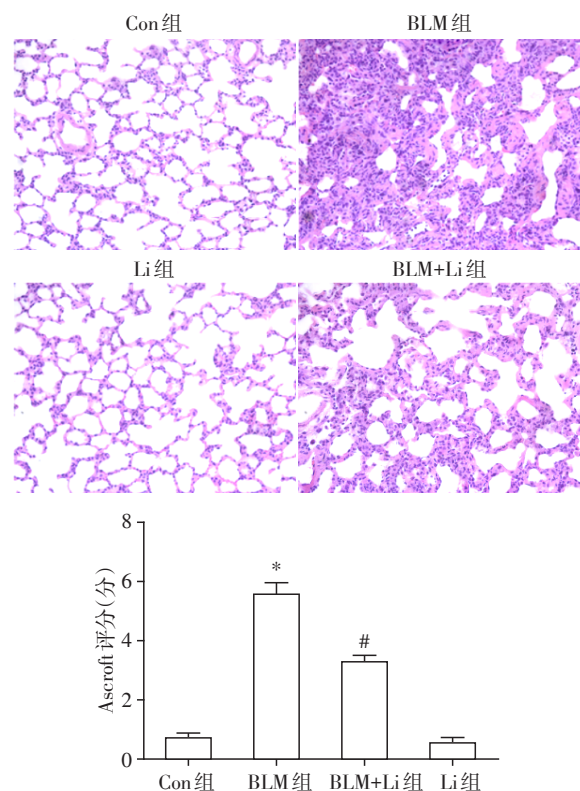
Con 和 Li 组肺组织结构正常,肺泡壁薄,间隔正常,无明显炎症细胞浸润;BLM 组肺泡结构破坏严重,部分肺泡出现断裂、融合,形成肺大泡,肺泡间隔明显增厚,间质炎症细胞浸润明显;BLM+Li 组肺泡破坏,间隔增厚,炎症细胞浸润程度均较 BLM 组为轻。Ashcroft 评分结果显示,Con 组和 Li 组 Ashcroft 评分均较低,BLM 组评分明显增加($P < 0.05$),Li 干预后,Ashcroft 评分较 BLM 组显著下降($P < 0.05$,图 1)。

2.2 Li 对 BLM 诱导的大鼠肺组织胶原沉积的作用

Masson 三色染色结果显示 Con 和 Li 组肺泡结构正常,被蓝染区域极少。BLM 组肺泡结构严重破坏,肺泡融合,被蓝染区域面积显著增加,Li 干预后,上述病变减轻(图 2)。统计结果显示,BLM 组胶原沉积面积较 Con 组显著增加($P < 0.05$,图 2),BLM+Li 组胶原沉积较 BLM 组减轻($P < 0.05$)。羟脯氨酸是胶原的主要成分之一,其水平间接反映组织中胶原含量。Con 和 Li 组羟脯氨酸含量无明显差异,BLM 组羟脯氨酸含量明显增加($P < 0.05$,图 3A),Li 治疗后其含量显著下降($P < 0.05$)。RT-qPCR 结果显示 BLM 组肺组织 COL1α1、COL2α1、COL3α1 mRNA 水平较 Con 组明显升高($P < 0.05$,图 3B~D),BLM+Li 组 mRNA 水平较 BLM 组显著下降($P < 0.05$)。

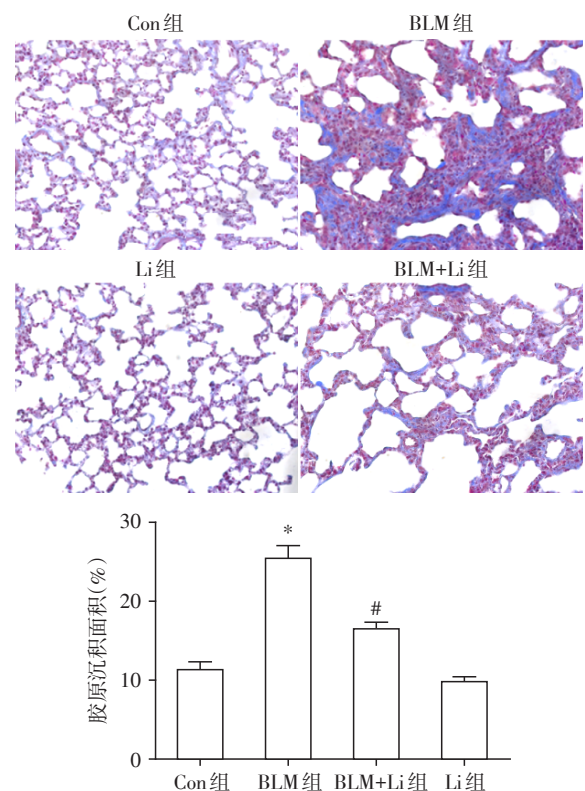
2.3 Li 对 BLM 诱导的大鼠肺组织肥大细胞浸润及 TNF-α、IL-6、IL-1β 的作用

甲苯胺蓝染色显示,Con 及 Li 组肺组织肥大细胞数量极少,BLM 组可见大量肥大细胞浸润($P <$



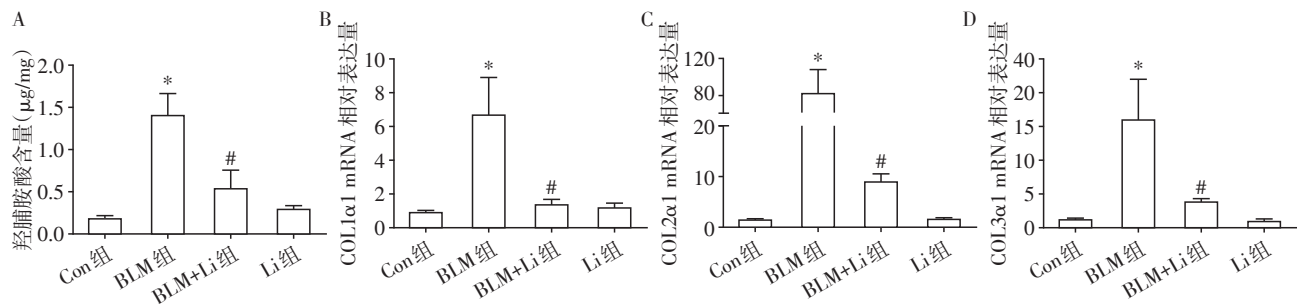
Con组和Li组肺泡结构正常,肺泡壁薄;BLM组肺泡结构严重破坏融合,肺泡壁增厚,广泛纤维增生,间质可见大量炎症细胞浸润;BLM+Li组肺泡破坏及炎症反应较BLM组为轻。Ashcroft评分结果显示,BLM组Ashcroft评分明显增加,利拉鲁肽干预后评分下降。与Con组比较,* $P < 0.05$;与BLM组比较,# $P < 0.05$ ($n=6$)。

图1 大鼠肺组织HE染色($\times 200$)与Ashcroft评分
Figure 1 Hematoxylin and eosin staining of rat lung tissues($\times 200$) and Ashcroft



Con和Li组仅有少量蓝色纤维,BLM组肺泡结构破坏,间隔明显增厚,蓝色胶原面积明显,BLM+Li组胶原沉积较BLM组减轻。与Con组比较,* $P < 0.05$;与BLM组比较,# $P < 0.05$ ($n=6$)。

图2 大鼠肺组织Masson三色染色($\times 200$)及胶原沉积面积统计
Figure 2 Masson's trichrome staining of rat lung tissues($\times 200$) and collagen deposition analysis

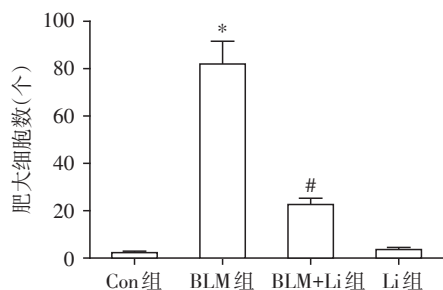
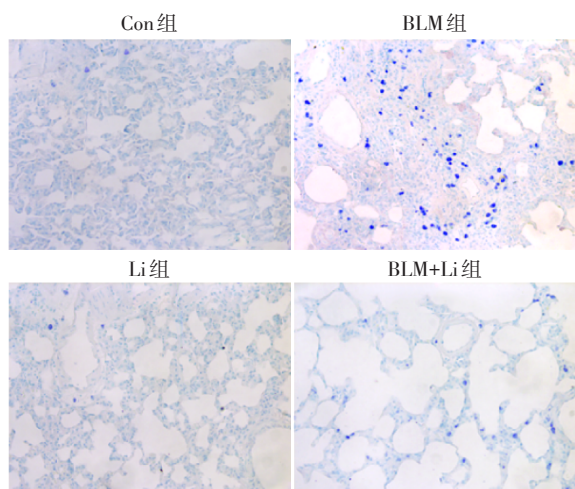


A:大鼠肺组织羟脯氨酸含量测定;B~D:RT-qPCR检测I、II、III型胶原的mRNA。与Con组比较,* $P < 0.05$;与BLM组比较,# $P < 0.05$ ($n=6$)。

图3 利拉鲁肽对BLM诱导的肺组织胶原组分及其编码mRNA的作用
Figure 3 Effects of liraglutide on content and mRNA of collagen in BLM-induced rat lung tissues

0.05,图4),予以利拉鲁肽治疗后肥大细胞浸润明显减少($P < 0.05$)。通过RT-qPCR检测肺组织TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的mRNA水平,ELISA法检测肺组织匀浆中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量。结果显示,Con与Li组TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的表达均无明显差异。与Con组相比,BLM组肺组织TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的mRNA及蛋白表达均明显升高($P < 0.05$,图5),BLM+Li组TNF- α 、

IL-6、IL-1 β 的表达较BLM组明显减轻($P < 0.05$)。
2.4 Li对BLM诱导的大鼠肺组织TGF- β 1含量的影响
RT-qPCR及Western blot结果显示,Con与Li组TGF- β 1表达均较低。BLM组TGF- β 1 mRNA及蛋白表达较Con组均明显升高($P < 0.05$,图6),Li干预后TGF- β 1下调($P < 0.05$)。



甲苯胺蓝染肥大细胞($\times 200$)。Con及Li组肥大细胞极少, BLM组肥大细胞浸润明显, BLM+Li组较BLM组数量明显减少。与Con组比较, $P < 0.05$; 与BLM组比较, $^{\#}P < 0.05$ ($n=6$)。

图4 利拉鲁肽对BLM诱导的肺组织肥大细胞浸润的影响 (甲苯胺蓝, $\times 200$)

Figure 4 Effects of liraglutide on mast cells in BLM-induced rat lung tissues

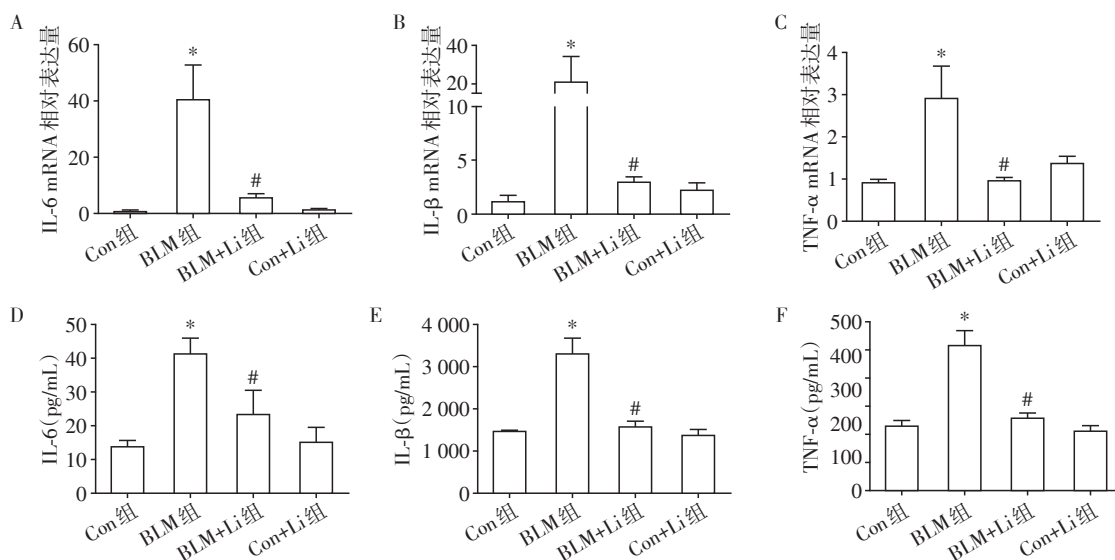
2.5 Li对BLM诱导的大鼠肺组织EMT的影响

Western blot半定量结果显示, BLM组肺组织E-

cadherin、ZO-1、Occludin表达显著下调($P < 0.05$, 图6A, C), α -SMA明显上调($P < 0.05$)。与BLM组相比, BLM+Li组E-cadherin、ZO-1、Occludin均上调, α -SMA下调($P < 0.05$)。免疫荧光染色结果显示, Con与Li组肺组织E-cadherin(红色)表达丰富, 主要位于肺泡上皮细胞膜上, α -SMA(绿色)表达量少, 仅在血管周围细胞胞质中可见; BLM组肺组织E-cadherin表达明显下调, 肺泡周围 α -SMA表达增多; 与BLM组相比, BLM+Li组E-cadherin表达增加, α -SMA表达减少(图7)。Li可抑制BLM诱导的肺组织EMT。

3 讨论

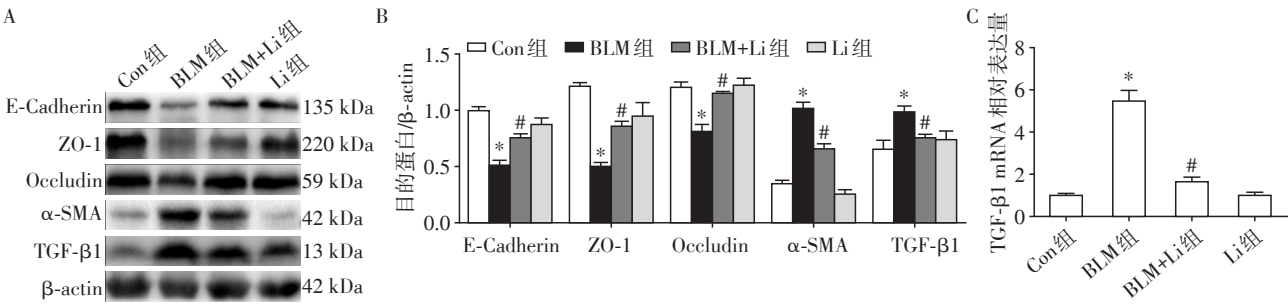
近年来发现, Li除了良好的降血糖作用外, 还具有抑制心肌、肾脏纤维化的作用。Li可以减轻糖尿病小鼠心脏的胶原沉积, I、III型胶原蛋白表达^[9]。有研究发现, 在肥胖、高血压、年龄分别诱导的小鼠心脏纤维化模型中, Li治疗后小鼠心肌肥厚、胶原沉积程度减轻, MCP-1、波形蛋白(Vimentin)、 α -SMA表达下调, 其可能是通过抑制NF- κ B活化、减少超氧化物产生发挥抗炎抗纤维化作用^[10]。Li减轻了肾纤维化小鼠肾组织的胶原沉积及纤连蛋白、I型胶原蛋白的表达^[11]。上述研究结果表明Li可以减轻组织胶原沉积程度, 改善组织纤维化, 提示其可能通过调节纤维化进程中的某些重要环节, 发挥抗纤维化作用。本研究使用BLM诱导的大鼠肺纤维化模型, 探讨Li的抗肺纤维化作用。结果显示, Li可



A~C: RT-qPCR法检测肺组织中IL-6、IL-1β mRNA、TNF-α表达; D~F: ELISA法检测IL-6、IL-1β、TNF-α含量。与Con组比较, $^*P < 0.05$; 与BLM组比较, $^{\#}P < 0.05$ ($n=6$)。

图5 利拉鲁肽对BLM诱导的肺组织TNF-α、IL-6、IL-1β表达的影响

Figure 5 Effects of liraglutide on TNF-α, IL-6 and IL-1β expression in BLM-induced rat lung tissues



A、B: Western blot 法检测 E-cadherin、ZO-1、Occludin、α-SMA、TGF-β1 蛋白表达(n=3); C: RT-qPCR 法检测 TGF-β1 mRNA 表达。与 Con 组比较,**P*<0.05;与 BLM 组比较,**P*<0.05(*n*=6)。

图6 利拉鲁肽对肺组织上皮间质转化及TGF-β1的影响
Figure 6 Effects of liraglutide on EMT and TGF-β1 in rat lung tissues

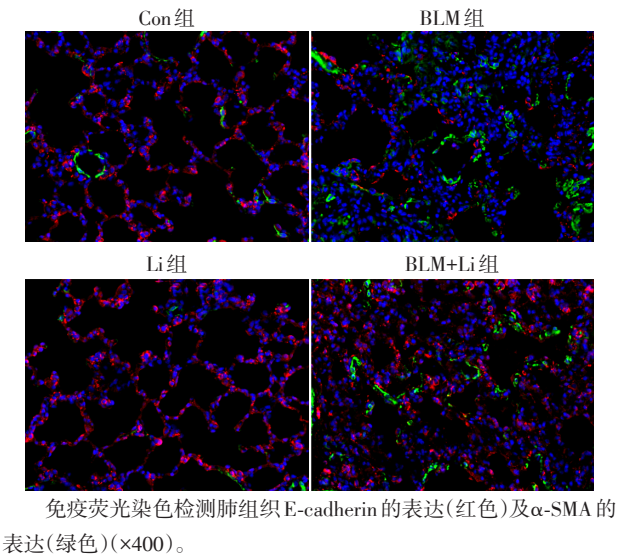


图7 利拉鲁肽对肺组织 EMT 的影响
Figure 7 Effects of liraglutide on EMT in rat lung tissues

减轻 BLM 诱导的大鼠肺组织结构破坏,显著抑制肺组织胶原沉积,降低羟脯氨酸含量及 I、II、III 型胶原 mRNA 水平,提示 Li 可减轻 BLM 诱导的肺纤维化。

BLM 诱导动物肺纤维化模型的主要特征为肺组织慢性炎症和纤维化^[13]。持续的慢性炎症反应是肺纤维化发生发展的主要机制之一。当组织损伤时,循环或组织中的炎症细胞(T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等)可产生大量趋化因子、细胞因子(如 TNF-α、IL-1β)、生长因子(如 TGF-β1)等,这些炎症因子可以损伤上皮细胞及内皮细胞;促进上皮及内皮间质转化;招募骨髓前体成纤维细胞;促进成纤维细胞增殖及分化,最终导致肌成纤维细胞增多,肺组织纤维化^[14-15]。已有研究发现,在肺纤维化动物模型及患者肺组织均可见大量肥大细胞浸润,并与纤维化程度相关。活化的肥大细胞可释放组胺、糜蛋白酶、碱性成纤维细胞生长

因子、TGF-β1,具有调节炎症反应及促进成纤维细胞增殖等作用^[16-17]。TNF-α 是关键的促炎因子,已被证实在肺纤维化中表达是升高的。BLM 可诱导小鼠肺组织 TNF-α 表达升高,而对于 TNF-α 受体敲除的小鼠,BLM 无法诱导其肺纤维化;IL-6 在多种慢性疾病中发挥重要的作用,可由 TGF-β1 等因子诱导多种炎症细胞产生,促进成纤维细胞增殖,促进肺纤维化进展;IL-1β 是新近极受关注的重要促炎因子,已被证实参与组织损伤修复,其在肺纤维化中的作用也逐渐被认识。IL-1β 可促进成纤维细胞分化,增加细胞外基质沉积^[15,18]。以上 3 种炎症因子均有报道其也可通过增强 TGF-β1 诱导的 EMT 过程,在肺纤维化发展中发挥重要作用^[19]。Li 已被证实具有良好的抗炎效果,可减轻 LPS 诱导的小鼠肺炎炎症浸润,抑制 IL-1β 等炎症因子的表达^[8]。本研究结果显示,Li 可显著抑制 BLM 诱导的肺组织肥大细胞等炎症细胞浸润及 TNF-α、IL-6、IL-1β 炎症因子的表达,提示 Li 可减轻 BLM 诱导的肺组织慢性炎症反应,可能是其减轻肺纤维化的重要原因之一。

TGF-β1 是重要的促纤维化因子,可由炎症细胞、上皮细胞等多种细胞产生,通过调节炎症、组织损伤和修复及细胞外基质代谢等,在肺纤维化的发生发展中起关键作用^[20]。近年来,EMT 被认为是纤维化发生发展中的重要机制之一,其中,TGF-β1 是诱导 EMT 的关键因子^[21]。缺氧、炎症、内质网应激等可显著上调 TGF-β1 水平,激活其下游信号通路:TGF-β1 与 I 型、II 型 TGF 受体结合后,I 型 TGF 受体磷酸化,激活下游分子,包括 Smad 2/3、MAPK 等,进一步活化 Snail、Twist 等 EMT 转录因子,调控 EMT 相关分子的表达^[22],最终导致上皮细胞表型分子 E-cadherin、Occludin、ZO-1 等表达下调,间质细胞标志分子 Vimentin、α-SMA 等表达上调,上皮细胞失去极

性,转化成纺锤形的间质细胞,参与肺组织重塑^[3,23]。已有研究证实,在BLM诱导的大鼠肺组织中TGF- β 1表达升高^[24],诱导EMT参与肺纤维化发生发展^[25],且TGF- β 1可体外诱导大鼠肺泡上皮细胞发生EMT^[26]。既往研究发现,Li抑制了肾纤维化小鼠肾组织EMT,其机制可能是通过激活GLP-1R,抑制TGF- β 1/Smad3和TGF- β 1/ERK1/2通路的活化,从而抑制EMT^[11]。Li可以改善血管紧张素II诱导的大鼠心脏纤维化,并抑制TGF- β 1/Smad 2/3信号通路^[27]。以上研究提示TGF- β 1可能是Li改善心脏、肾脏纤维化过程的重要调节分子之一。在本研究中,BLM组TGF- β 1表达较Con组明显增加,Li干预后TGF- β 1表达明显下调,可能部分通过抑制炎症反应发挥作用。同时,我们检测了EMT相关指标,BLM组肺组织上皮标志分子E-cadherin、ZO-1、Occludin表达明显下调,间质标志分子 α -SMA表达明显增加,Li可抑制BLM诱导的E-cadherin、ZO-1、Occludin下调及 α -SMA上调。结果表明Li可抑制肺组织EMT,可能与下调TGF- β 1的表达有关。

GLP-1R是一种G蛋白偶联受体,当GLP-1与其结合后,G蛋白被激活,活化腺苷酸环化酶,使得胞内cAMP浓度升高,依赖cAMP的蛋白激酶A(protein kinase A,PKA)被激活,产生广泛的生物学效应^[6]。已有研究发现,GLP-1可能部分通过激活cAMP-PKA信号通路,下调高糖诱导的人肾小球系膜细胞TGF- β 1的表达^[28]。cAMP-PKA信号通路亦参与缺氧诱导的A549细胞EMT过程^[29]。因此,推测Li可能通过与GLP-1R结合,激活cAMP-PKA通路,抑制TGF- β 1诱导的EMT。在今后研究中,将进一步探讨Li如何调控肺组织EMT及其对TGF- β 1下游通路的影响。

肺纤维化患者预后差,传统药物(强的松、乙酰胺半胱氨酸等)的治疗已被证实的无效的。近年来研究显示吡非尼酮或尼达尼布可改善肺纤维化,延缓患者肺功能的恶化,然而其有效性及安全性均未完全明确^[3]。吡非尼酮已在国内上市,但价格昂贵,尼达尼布目前尚未在国内上市。而本研究发现Li可明显减轻BLM诱导的肺纤维化,其机制可能与减轻肺组织炎症反应,下调TGF- β 1水平,抑制肺组织EMT有关,且Li作为临床广泛使用的治疗2型糖尿病的降糖药物,其安全性已被广泛证实,价格便宜,使用便利,有望成为未来治疗肺纤维化的候选药物之一。

[参考文献]

[1] WUYTS W A, AGOSTINI C, ANTONIOU K M, et al. The

- pathogenesis of pulmonary fibrosis: a moving target [J]. *Eur Respir J*, 2013, 41(5): 1207-1218
- [2] 许容容,孔辉,徐健,等. 帕夫林通过抑制NLRP3形成减轻博来霉素诱导的小鼠肺纤维化[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(7): 799-803
- [3] RICHELDI L, COLLARD H R, JONES M G. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10082): 1941-1952
- [4] BARTIS D, MISE N, MAHIDA R Y, et al. Epithelial-mesenchymal transition in lung development and disease: does it exist and is it important? [J]. *Thorax*, 2014, 69(8): 760-765
- [5] NIETO M A, HUANG R Y, JACKSON R A, et al. Emt: 2016 [J]. *Cell*, 2016, 166(1): 21-45
- [6] MARATHE C S, RAYNER C K, JONES K L, et al. Glucagon-like peptides 1 and 2 in health and disease: a review [J]. *Peptides*, 2013, 44: 75-86
- [7] MUSCOGIURI G, CIGNARELLI A, GIORGINO F, et al. GLP-1: benefits beyond pancreas [J]. *J Endocrinol Invest*, 2014, 37(12): 1143-1153
- [8] ZHOU F, ZHANG Y, CHEN J, et al. Liraglutide attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 791: 735-740
- [9] YAN F, ZHANG G H, FENG M, et al. Glucagon-like peptide 1 protects against hyperglycemic-induced endothelial-to-mesenchymal transition and improves myocardial dysfunction by suppressing poly (ADP-Ribose) polymerase 1 activity [J]. *Mol Med*, 2015, 21(1): 15-25
- [10] GASPARI T, BRDAR M, LEE H W, et al. Molecular and cellular mechanisms of glucagon-like peptide-1 receptor agonist-mediated attenuation of cardiac fibrosis [J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2016, 13(1): 56-68
- [11] LI Y K, MA D X, WANG Z M, et al. The glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analog liraglutide attenuates renal fibrosis [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 131: 102-111
- [12] ASHCROFT T, SIMPSON J M, TIMBRELL V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale [J]. *J Clin Pathol*, 1988, 41(4): 467-470
- [13] LIU T, DE LOS SANTOS F G, PHAN S H. The bleomycin model of pulmonary fibrosis [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1627(1): 27-42
- [14] COKER R K, LAURENT G J. Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance [J]. *Eur Respir J*, 1998, 11(6): 1218-1221
- [15] TODD N W, LUZINA I G, ATAMAS S P. Molecular and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis [J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2012, 5(1): 11
- [16] REBER L L, DAUBEUF F, PEJLER G, et al. Mast cells contribute to bleomycin-induced lung inflammation and injury in

- mice through a chymase/mast cell protease 4-dependent mechanism[J]. *J Immunol*, 2014, 192(4): 1847-1854
- [17] CRUSE G, BRADDING P. Mast cells in airway diseases and interstitial lung disease [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 778:125-138
- [18] KOTTMANN R M, HOGAN C M, PHIPPS R P, et al. Determinants of initiation and progression of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Respirology*, 2009, 14(7): 917-933
- [19] LI M, LUAN F, ZHAO Y, et al. Epithelial-mesenchymal transition: an emerging target in tissue fibrosis [J]. *Exp Biol Med*(Maywood), 2016, 241(1): 1-13
- [20] LEE C M, PARK J W, CHO W K, et al. Modifiers of TGF-beta1 effector function as novel therapeutic targets of pulmonary fibrosis[J]. *Korean J Intern Med*, 2014, 29(3): 281-290
- [21] KAGE H, BOROK Z. EMT and interstitial lung disease: a mysterious relationship [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2012, 18(5): 517-523
- [22] GONZALEZ D M, MEDICI D. Signaling mechanisms of the epithelial - mesenchymal transition [J]. *Sci Signal*, 2014, 7(344): re8
- [23] MARMAI C, SUTHERLAND R E, KIM K K, et al. Alveolar epithelial cells express mesenchymal proteins in patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, 301(1): L71-78
- [24] ZHAO J, SHI W, WANG Y L, et al. Smad3 deficiency attenuates bleomycin - induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 282(3): L585-593
- [25] DIVYA T, VELAVAN B, SUDHANDIRAN G. Regulation of TGF-beta/smad mediated epithelial-mesenchymal transition by celastrol provides protection against bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2018,
- [26] AOYAGI-IKEDA K, MAENO T, MATSUI H, et al. Notch induces myofibroblast differentiation of alveolar epithelial cells via transforming growth factor-{beta}-Smad3 pathway [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 45(1): 136-144
- [27] ZHANG L H, PANG X F, BAI F, et al. Preservation of glucagon-like peptide-1 level attenuates angiotensin II - induced tissue fibrosis by altering AT1/AT 2 receptor expression and angiotensin - converting enzyme 2 activity in rat heart[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2015, 29(3): 243-255
- [28] LI W, CUI M, WEI Y, et al. Inhibition of the expression of TGF-beta1 and CTGF in human mesangial cells by exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 30(3): 749-757
- [29] SHAIKH D, ZHOU Q, CHEN T, et al. cAMP-dependent protein kinase is essential for hypoxia-mediated epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion in lung cancer cells[J]. *Cell Signal*, 2012, 24(12): 2396-2406
- [收稿日期] 2019-06-17

(上接第165页)

- tures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line [J]. *Molecular Systems Biology*, 2010, 6: 400
- [22] MAYR C. Regulation by 3'-Untranslated regions[J]. *Annual Review of Genetics*, 2017, 51: 171-194
- [23] GEBAUER F, PREISS T, HENTZE M W. From cis-regulatory elements to complex RNPs and back [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2012, 4: a012245
- [24] FALK S, FINOGENOVA K, MELKO M, et al. Structure of the RBM7-ZCCHC8 core of the NEXT complex reveals connections to splicing factors[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13573
- [25] XIONG Y, HANNON G J, ZHANG H, et al. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases [J]. *Nature*, 1993, 366: 701-704
- [26] WEISS RH. p21Waf1/Cip1 as a therapeutic target in breast and other cancers[J]. *Cancer Cell*, 2003, 4: 425-429
- [27] 孙 卓, 卢今奇, 吴牧雨, 等. 干扰PTEN基因表达对宫颈癌细胞系HeLa细胞周期的影响及相关机制研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(9): 1175-1180
- [28] WANG W, FURNEAUX H, CHENG H, et al. HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20: 760-769
- [收稿日期] 2019-06-30