

# 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

李妲<sup>1</sup>, 沈泉<sup>2</sup>, 吴趋荟<sup>2</sup>, 郑蕾<sup>2</sup>, 赵四林<sup>1</sup>, 金朝晖<sup>1</sup>, 肖雪飞<sup>1</sup>, 范伏元<sup>1\*</sup>

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007;

2. 湖南中医药大学, 长沙 410208)

**[摘要]** 目的:利用转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )刺激人胚肺成纤维细胞(HFL1)模拟特发性肺纤维化(IPF)的病理过程,探讨柴胡含药血清对IPF的作用和机制。方法:采用 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta_1$ 刺激HFL1细胞,给予不同体积分数柴胡含药血清(5%、10%、15%、20%)干预24 h后,利用细胞增殖与活性检测试剂盒-8(CCK-8)检测细胞增殖率。随后细胞分为空白血清组(20%空白血清)、TGF- $\beta_1$ 组(20%空白血清和 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta_1$ )、TGF- $\beta_1$ +柴胡含药血清组(5%空白血清、15%含药血清和 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta_1$ )、TGF- $\beta_1$ +SIS3组( $3\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SIS3、20%空白血清和 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta_1$ )。采用原位末端标记法(TUNEL)检测细胞凋亡率;通过实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测凋亡相关蛋白B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)和肌成纤维细胞标志物 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)mRNA表达情况;通过免疫荧光法检测 $\alpha$ -SMA、脑Ras同源蛋白(Rheb)、磷酸化(p)-Smad3蛋白表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测Rheb、p-Smad3、Smad3蛋白表达。结果:与空白血清组比较,TGF- $\beta_1$ 组细胞增殖率明显上升( $P<0.05$ )。与TGF- $\beta_1$ 组比较,TGF- $\beta_1$ +15%柴胡含药血清组和TGF- $\beta_1$ +20%柴胡含药血清组细胞增殖率显著降低( $P<0.01$ )。与空白血清组比较,TGF- $\beta_1$ 组细胞凋亡率显著下降,Bcl-2、 $\alpha$ -SMA mRNA表达增加,Bax mRNA表达减少, $\alpha$ -SMA、Rheb蛋白表达增加,Smad3磷酸化水平明显上升( $P<0.05$ );与TGF- $\beta_1$ 组比较,TGF- $\beta_1$ +柴胡含药血清组和TGF- $\beta_1$ +SIS3组细胞凋亡率显著上升,Bcl-2、 $\alpha$ -SMA mRNA表达减少,Bax mRNA表达增加, $\alpha$ -SMA、Rheb蛋白表达减少,Smad3磷酸化水平下降( $P<0.05$ )。结论:柴胡能够抑制TGF- $\beta_1$ 诱导的HFL1细胞增殖和肌成纤维细胞转化,促进成纤维细胞凋亡,该作用可能与Smad3/Rheb轴有关。

**[关键词]** 特发性肺纤维化;柴胡;成纤维细胞;Smad3;脑Ras同源蛋白;成纤维细胞向肌成纤维细胞转化

**[中图分类号]** R2-0;R33;R289;R256.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)11-0089-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20222438

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20221201.1923.003.html>

**[网络出版日期]** 2022-12-02 16:51:18

## Medicated Serum of Bupleuri Radix Regulates HFL1 Apoptosis and Fibroblast-myofibroblast Transition via Smad3/Rheb Axis

LI Da<sup>1</sup>, SHEN Xiao<sup>2</sup>, WU Quhui<sup>2</sup>, ZHENG Lei<sup>2</sup>, ZHAO Silin<sup>1</sup>, JIN Zhaohui<sup>1</sup>,  
XIAO Xuefei<sup>1</sup>, FAN Fuyuan<sup>1\*</sup>

(1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

**[Abstract]** **Objective:** Transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) was used to stimulate human fetal lung fibroblast 1 (HFL1) for simulating the pathological process of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and thereby the effects and mechanism of medicated serum of Bupleuri Radix against IPF were investigated. **Method:** TGF-

**[收稿日期]** 2022-06-06

**[基金项目]** 湖南省卫生健康委员会科研计划课题项目(202203023299);湖南省教育厅科学研究项目(20B442);湖南省中医药科研计划项目(2021165);长沙市科技局重点研发计划项目(Kq1901096)

**[第一作者]** 李妲,博士,副主任医师,从事中医药防治呼吸系统疾病研究,E-mail:498472988@qq.com

**[通信作者]** \* 范伏元,教授,主任医师,博士生导师,从事中医药防治呼吸系统疾病研究,E-mail:ffy023@163.com

$\beta_1$  ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was employed to stimulate HFL1, and cells were treated with medicated serum of Bupleuri Radix (5%, 10%, 15%, 20%) for 24 h. Then cell proliferation rate was determined with cell counting kit-8 (CCK-8). Subsequently, cells were classified into the control group (20% blank serum), TGF- $\beta_1$  group (20% blank serum and  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta_1$ ), TGF- $\beta_1$  + medicated serum of Bupleuri Radix group (5% blank serum, 15% medicated serum, and  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta_1$ ), and TGF- $\beta_1$  + SIS3 group ( $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SIS3, 20% blank serum,  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta_1$ ). Based on in situ end labeling (TUNEL) staining, the apoptosis rate was examined, and mRNA expression of apoptosis-related proteins B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax) and myofibroblast marker  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) was detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). The protein expression of  $\alpha$ -SMA, Ras homolog enriched in brain (Rheb), and phosphorylated (p)-Smad3 was determined by immunofluorescence. Expression of Rheb, p-Smad3, and Smad3 was examined by Western blot. **Result:** The cell proliferation rate of TGF- $\beta_1$  group increased compared with that of the control group ( $P<0.05$ ). The cell proliferation rate of TGF+15% medicated serum of Bupleuri Radix group and TGF+20% medicated serum of Bupleuri Radix group decreased compared with that of the TGF- $\beta_1$  group ( $P<0.01$ ). Compared with the control group, TGF- $\beta_1$  group showed decrease in apoptosis rate, increase in mRNA expression of Bcl-2 and  $\alpha$ -SMA, reduction in Bax mRNA expression, and rise of  $\alpha$ -SMA and Rheb protein expression and p-Smad3 level ( $P<0.05$ ). Compared with TGF- $\beta_1$  group, TGF- $\beta_1$  + medicated serum of Bupleuri Radix group and TGF- $\beta_1$  + SIS3 group demonstrated high apoptosis rate, low Bcl-2 and  $\alpha$ -SMA mRNA expression, high Bax mRNA expression, and low  $\alpha$ -SMA and Rheb protein expression and p-Smad3 level ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Medicated serum of Bupleuri Radix can inhibit TGF- $\beta_1$ -induced HFL1 proliferation and fibroblast-myofibroblast transition and promote fibroblast apoptosis by regulating the Smad3/Rheb axis.

**[Keywords]** idiopathic pulmonary fibrosis; Bupleuri Radix; fibroblast; Smad3; RAS homolog enriched in brain; fibroblast-myofibroblast transition

特发性肺纤维化(IPF)是一种原因不明的以纤维化为特征的间质性肺疾病<sup>[1]</sup>。目前研究认为IPF是由于肺泡上皮细胞反复损伤后异常修复所致。上皮细胞损伤所释放的促纤维化因子诱导肌成纤维细胞募集、增殖及成纤维细胞向肌成纤维细胞转化(FMT)<sup>[2-3]</sup>。肌成纤维细胞并不存在于正常肺组织,但肌成纤维细胞是胶原和其他基质蛋白的重要产生者,促进肌成纤维细胞凋亡和抑制成纤维细胞FMT能够有效抑制肺纤维化<sup>[4]</sup>。

转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )是促进肌成纤维细胞分化和胶原表达的关键细胞因子。TGF- $\beta_1$ 可以活化经典Smad通路和其他非经典通路,在肺纤维化的发生、进展中起到了举足轻重的作用<sup>[5]</sup>。随着研究不断深入,非经典通路在TGF- $\beta_1$ 信号转导中的作用日益凸显。目前有研究已经证实哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物1/4E结合蛋白1(mTORC1/4E-BP1)轴的异常活化对TGF- $\beta_1$ 诱导IPF患者成纤维细胞I型胶原表达来说至关重要。敲除mTORC1的支架蛋白Raptor能够显著抑制TGF- $\beta_1$ 诱导的4E-BP1磷酸化和胶原表达<sup>[6]</sup>。值得注意的

是,TGF- $\beta_1$ /Smad通路是与mTORC1/4E-BP1轴有着重要的调控关系。TGF- $\beta_1$ 刺激后,Smad3早于4E-BP1发生磷酸化且4E-BP1磷酸化水平受到Smad3的调控<sup>[6]</sup>。目前Smad3调控mTORC1的中间蛋白尚待阐明,可能与脑Ras同源蛋白(Rheb)有关。Rheb属于Ras蛋白家族,具有三磷酸鸟苷(GTP)酶活性。Rheb在IPF患者成纤维灶中高表达,TGF- $\beta_1$ 能促进成纤维细胞Rheb蛋白表达并导致mTORC1下游蛋白磷酸化水平升高<sup>[7-8]</sup>。因此,TGF- $\beta_1$ 可能是通过Smad3/Rheb轴活化mTORC1,从而促进胶原等蛋白表达。

柴胡是伞形科植物柴胡*Bupleurum chinense*或狭叶柴胡*B. scorzonifolium*的干燥根。《神农本草经》云:“(柴胡)主心腹,去肠胃中结气,饮食积聚,寒热邪气,推陈致新。久服,轻身明目益精。”认为柴胡有调畅气机、推陈致新等作用。柴胡在临床上治疗肝纤维化的常用药物,但其应用并不局限于肝纤维化。IPF归属于中医学“肺痹”“肺痿”等范畴,中医病机关键为“虚、痰、瘀”。柴胡用于治疗IPF符合“异病同治”和“肝肺同治”的中医治疗思

路,同时也有多位中医临床大家的临床经验作为支撑<sup>[9-10]</sup>。本研究采用TGF- $\beta_1$ 刺激人胚肺成纤维细胞(HFL1)构建特发性肺纤维化的细胞模型,探讨Smad3/Rheb轴介导的凋亡和FMT在IPF中的作用及柴胡治疗IPF的作用和机制。

## 1 材料

**1.1 动物与细胞** SPF级雄性SD大鼠20只,体质量180~200 g,由湖南省斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物合格证号SCXK(湘)2019-0004。动物在湖南中医药大学SPF级动物实验中心饲养,实验单位使用许可证号SYXK(湘)2019-0009,常规照明,自由饮食饮水。实验方案经湖南中医药大学实验动物伦理委员会认证(伦理审查批准编号LL2021051903)。HFL1细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司,货号CL-0106。

**1.2 药品与试剂** 柴胡配方颗粒(湖南春光九汇现代中药有限公司,批号210839);细胞增殖活性检测(CCK-8)试剂盒(合肥白鲨生物科技有限公司,批号BS350B);RNA提取液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号G3013);TGF- $\beta_1$ (美国Peprotech公司,批号100-21-10UG);RevertAid™第一链cDNA合成试剂盒、Pierce™ Rapid Gold BCA蛋白测定试剂盒、PageRuler™ Plus预染蛋白分子量标准(美国Thermo Fisher公司,批号分别为K1622、A53225、26619);原位末端标记法(TUNEL)试剂盒、聚合酶链式反应(PCR)试剂盒(瑞士Roche公司,批号分别为11684817910、04913914001);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)兔单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗(美国Abcam公司,批号分别为ab181602、ab6721);p-Smad3、Smad3、Rheb兔多克隆抗体(美国Affinity公司,批号分别为AF3362、AF6362、DF6299); $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)小鼠单克隆抗体(中国博士德生物工程有限公司,批号BM0002);Alexa Fluor 488山羊抗鼠免疫球蛋白(Ig)G、Cy3山羊抗兔IgG(美国Jackson公司,批号分别为115-545-003、111-165-003);SIS3(美国Medchemexpress公司,批号HY-13013)。

**1.3 仪器** XDS-3型倒置显微镜(中国奥显公司),Enspire型多功能酶标仪(美国Perkinelmer公司),L530R型台式低速冷冻离心机(中国湘仪公司),Mini-PROTEAN Tetra型小型垂直电泳槽、PowerPac HC型高电流电泳仪、CheemiDoc XRS+Imager型化学发光系统(美国Bio-Rad公司),Z32HK型高速冷冻离心机(德国贺默公司),

Realplex2型实时荧光定量PCR(Real-time PCR)仪(德国艾本德公司),Eclipse CI型正置荧光显微镜、DS-U3型成像系统(日本尼康公司),1290UPLC-6540 Q-TOF色谱-质谱联用仪(美国Agilent公司)。

## 2 方法

**2.1 柴胡水溶液制备** 柴胡配方颗粒经超高效液相色谱-四级杆-时间飞行质谱仪分析(UPLC-Q-TOF-MS)检测柴胡皂苷A质量分数为0.097%,柴胡皂苷D质量分数为0.019%。将柴胡配方颗粒加入离心管中,加入适量蒸馏水,置于100℃水浴震荡至完全溶解,配置成1.05 g·mL<sup>-1</sup>柴胡水溶液,4℃保存。

**2.2 细胞培养** HFL1细胞用含有1%双抗、10%胎牛血清的Ham's F-12K培养基在37℃、5% CO<sub>2</sub>的条件下培养,待细胞融合度达到80%时进行传代。

**2.3 制备柴胡含药血清** 大鼠随机分为对照组和给药组,每组各10只。成人按60 kg体质量,根据人与大鼠换算系数,大鼠每日等效剂量为1.05 g·kg<sup>-1</sup>,实验以3倍剂量灌胃<sup>[11]</sup>。柴胡含药血清组给予柴胡水溶液灌胃,正常血清组给予等体积蒸馏水灌胃,1次/d,连续5 d。最后1次灌胃结束1 h后,麻醉大鼠,腹主动脉采血,室温静置1 h,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min(离心半径20 cm),56℃水浴30 min灭活,用0.22  $\mu$ m滤器过滤除菌,分装储存于-80℃冰箱。

**2.4 细胞分组与干预** HFL1细胞分为空白血清组、TGF- $\beta_1$ 、TGF- $\beta_1$ +柴胡含药血清组、TGF- $\beta_1$ +SIS3组。空白血清组予以含20%空白血清的培养基,TGF- $\beta_1$ 组予以含20%空白血清和10  $\mu$ g·L<sup>-1</sup> TGF- $\beta_1$ 的培养基,TGF- $\beta_1$ +柴胡含药血清组予以含空白血清、柴胡含药血清和10  $\mu$ g·L<sup>-1</sup> TGF- $\beta_1$ 的培养基,TGF- $\beta_1$ +SIS3组予以含3  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> SIS3、20%空白血清和10  $\mu$ g·L<sup>-1</sup> TGF- $\beta_1$ 的培养基。

## 2.5 指标检测

**2.5.1 CCK-8法检测细胞增殖率** 96孔板按照8 000个/孔接种HFL1细胞,培养过夜后,每孔加入基础培养基100  $\mu$ L同步化24 h。细胞随机分为6组,每组4个复孔。空白血清组予以20%空白血清,其余5组予以0%、5%、10%、15%、20%柴胡含药血清(分别含有20%、15%、10%、5%、0空白血清和10  $\mu$ g·L<sup>-1</sup> TGF- $\beta_1$ 的培养基),放入培养箱孵育24 h。加入稀释后的CCK-8试剂,避光孵育1.5 h后用酶标仪测定450 nm处的吸光度A,计算细胞增殖率。细胞增殖率=[(A<sub>实验孔</sub>-A<sub>空白孔</sub>)/(A<sub>对照孔</sub>-A<sub>空白孔</sub>)] $\times$ 100%。

**2.5.2 TUNEL染色法检测细胞凋亡率** 将HFL1

细胞接种于放有爬片的6孔板,按照2.4项下方法分组给药24 h,爬片用4%多聚甲醛固定30 min。加入破膜工作液100 μL,孵育20 min。将TUNEL试剂盒中的试剂1(TdT)和试剂2(dUTP)按1:10混合,滴加到爬片上覆盖细胞,37℃孵育2 h。加DAPI染液孵育10 min,用荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜下观察并采集图像,使用Image J软件进行分析。

**2.5.3 Real-time PCR检测B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、α-SMA mRNA的表达**  
细胞按2.5项下方法分组给药后,用RNA提取液提取总RNA,采用第一链cDNA合成试剂盒将RNA转录为cDNA,反应条件:42℃ 60 min,70℃ 5 min。引物由北京擎科生物科技有限公司,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℃变性15 s,60℃退火60 s,40个循环,65℃延伸1 min。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算mRNA的相对表达量。

表1 引物序列

Table 1 Sequence primers

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	197
	下游 GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	
Bcl-2	上游 GGTGGGGTCATGTGTGTGG	85
	下游 CGGTTTCAGGTAAGTCACTCAGTCATCC	
Bax	上游 CCCGAGAGGTCTTTTCCGAG	155
	下游 CCAGCCCATGATGGTTCTGAT	
α-SMA	上游 AGGAGCAAAATCTGTCCGATCT	240
	下游 GTGGGGGAATTATCTTTCCTGG	

**2.5.4 免疫荧光法检测α-SMA、Rheb、p-Smad3蛋白表达**  
细胞分组给药后,用4%多聚甲醛固定15 min。加破膜工作液孵育10 min,3%牛血清白蛋白(BSA)封闭30 min。分别加入α-SMA(1:100)、Rheb(1:200)、p-Smad3(1:200)一抗4℃孵育过夜。磷酸盐缓冲液(PBS)洗3次,加二抗稀释液室温避光孵育1 h,PBS洗3次。加DAPI染液室温避光染色10 min,PBS洗3次,封片,荧光显微镜下观察并采集图像,用Image J软件分析平均荧光强度。

**2.5.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测Rheb、p-Smad3、Smad3蛋白表达**  
细胞分组给药后,使用RIPA裂解液(加入蛋白酶、磷酸酶抑制剂)提取总蛋白,用BCA法测定蛋白浓度。在SDS-PAGE凝胶上分离蛋白,然后将凝胶上的蛋白转移到PVDF膜上,5% BSA 室温封闭2 h,加入Rheb(1:400)、Smad3

(1:400)和p-Smad3(1:400)一抗4℃孵育过夜。膜用TBST洗3次,加入二抗(1:10 000)室温孵育2 h, TBST洗3次后显影成像,用Image J软件进行分析。

**2.6 统计学分析**  
本实验数据由GraphPad Prism 9.0.0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,否则采用中位数表示。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。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对TGF-β<sub>1</sub>诱导下HFL1细胞增殖的作用**  
与空白血清组比较,TGF-β<sub>1</sub>组细胞增殖率明显上升( $P < 0.05$ );与TGF-β<sub>1</sub>组比较,TGF-β<sub>1</sub>+15%柴胡含药血清组和TGF-β<sub>1</sub>+20%柴胡含药血清组细胞增殖率显著降低( $P < 0.01$ )。因此后续实验柴胡含药血清体积分数选择为15%。见表2。

表2 不同浓度柴胡含药血清对TGF-β<sub>1</sub>诱导HFL1细胞增殖的干预作用( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table 2 Effect of medicated serum of Bupleuri Radix inhibits TGF-β<sub>1</sub>-induced proliferation ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

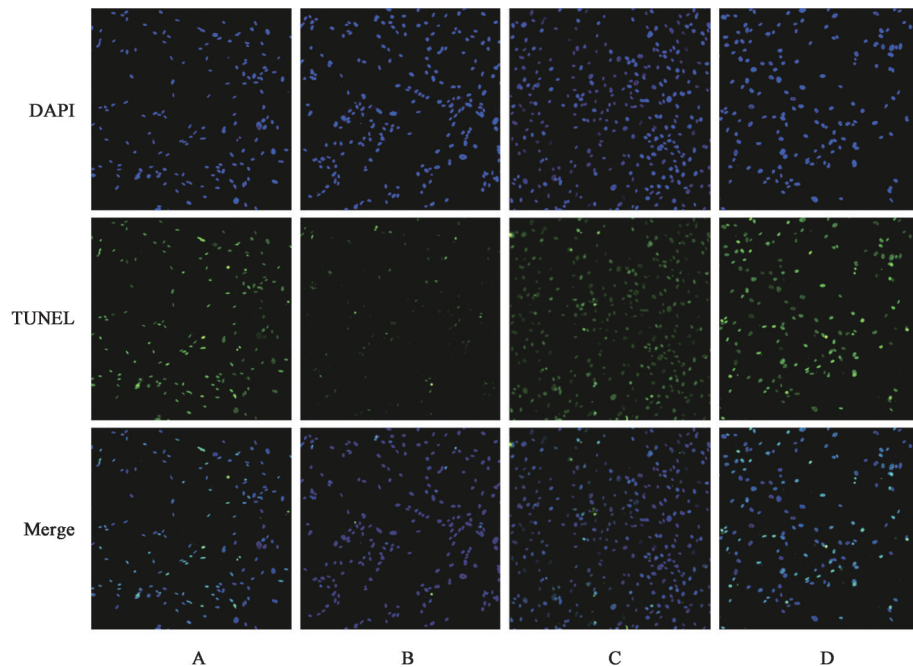
组别	体积分数/%	细胞增殖率/%
空白血清组		98.47±8.64
TGF-β <sub>1</sub> 组	10 <sup>3</sup>	127.80±7.60 <sup>1)</sup>
TGF-β <sub>1</sub> +柴胡含药血清组	10 <sup>3</sup> +5	113.30±13.58
	10 <sup>3</sup> +10	105.40±10.97
	10 <sup>3</sup> +15	91.33±14.25 <sup>2)</sup>
	10 <sup>3</sup> +20	90.04±15.89 <sup>2)</sup>

注:与空白血清组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与TGF-β<sub>1</sub>组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ; <sup>3)</sup>表示质量浓度单位为 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

**3.2 对TGF-β<sub>1</sub>诱导下HFL1细胞凋亡的影响**  
与空白血清组比较,TGF-β<sub>1</sub>组细胞凋亡率明显下降( $P < 0.05$ );与TGF-β<sub>1</sub>组比较,TGF-β<sub>1</sub>+柴胡含药血清组和TGF-β<sub>1</sub>+SIS3组细胞凋亡率明显上升( $P < 0.05$ )。见图1、表3。

**3.3 对TGF-β<sub>1</sub>诱导下HFL1细胞Bax、Bcl-2、α-SMA mRNA表达的影响**  
与空白血清组比较,TGF-β<sub>1</sub>组α-SMA、Bcl-2 mRNA表达量明显增加,Bax表达量明显降低( $P < 0.05$ );与TGF-β<sub>1</sub>组比较,TGF-β<sub>1</sub>+柴胡含药血清组和TGF-β<sub>1</sub>+SIS3组α-SMA和Bcl-2 mRNA表达减少,Bax mRNA表达明显增加( $P < 0.05$ )。见表4。

**3.4 对TGF-β<sub>1</sub>诱导下HFL1细胞α-SMA、Rheb、p-Smad3的影响**  
与空白血清组比较,TGF-β<sub>1</sub>组Rheb、α-SMA蛋白表达量明显增加,Smad3的磷酸



注:A.空白血清组;B.TGF-β<sub>1</sub>组;C.TGF-β<sub>1</sub>+柴胡含药血清组;D.TGF-β<sub>1</sub>+SIS3组(图2-图4同)

图1 柴胡含药血清对HFL1细胞凋亡的影响(TUNEL, ×100)

Fig. 1 Effect of medicated serum of Bupleuri Radix promotes apoptosis of HFL1 cells (TUNEL, ×100)

表3 柴胡含药血清对HFL1细胞凋亡的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of medicated serum of Bupleuri Radix promotes apoptosis of HFL1 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	体积分数/%	细胞凋亡率/%
空白血清组		39.40±1.21
TGF-β <sub>1</sub> 组	10 <sup>3</sup> )	6.11±5.77 <sup>1)</sup>
TGF-β <sub>1</sub> +柴胡含药血清组	10 <sup>3</sup> +15	70.62±19.33 <sup>2)</sup>
TGF-β <sub>1</sub> +SIS3组	10 <sup>3</sup> +3 <sup>4)</sup>	50.66±3.47 <sup>2)</sup>

注:与空白血清组比较<sup>1)</sup>P<0.05;与TGF-β<sub>1</sub>组比较<sup>2)</sup>P<0.05;<sup>3)</sup>表示质量浓度单位为μg·L<sup>-1</sup>;<sup>4)</sup>表示浓度单位为μmol·L<sup>-1</sup>(表4-表6同)

表4 柴胡含药血清对TGF-β<sub>1</sub>诱导HFL1细胞Bax、Bcl-2、α-SMA mRNA表达的作用( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of medicated serum of Bupleuri Radix on TGF-β<sub>1</sub>-induced mRNA expressions of Bax, Bcl-2 and α-SMA ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	体积分数/%	α-SMA	Bax	Bcl-2
空白血清组		1.13±0.15	0.93±0.06	1.01±0.05
TGF-β <sub>1</sub> 组	10 <sup>3</sup> )	2.02±0.29 <sup>1)</sup>	0.54±0.04 <sup>1)</sup>	1.94±0.23 <sup>1)</sup>
TGF-β <sub>1</sub> +柴胡含药血清组	10 <sup>3</sup> +15	1.38±0.17 <sup>2)</sup>	1.36±0.08 <sup>2)</sup>	1.16±0.10 <sup>2)</sup>
TGF-β <sub>1</sub> +SIS3组	10 <sup>3</sup> +3 <sup>4)</sup>	1.29±0.05 <sup>2)</sup>	2.34±0.09 <sup>2)</sup>	1.21±0.04 <sup>2)</sup>

化水平明显升高(P<0.05);与TGF-β<sub>1</sub>组比较, TGF-β<sub>1</sub>+柴胡含药血清组和TGF-β<sub>1</sub>+柴胡含药血清+SIS3组Rheb、α-SMA蛋白表达明显减少, Smad3磷酸化水平明显下降(P<0.05)。见图2、图3和表5。

3.5 对TGF-β<sub>1</sub>诱导下HFL1细胞Rheb蛋白表达和Smad3蛋白磷酸化的影响 与空白血清组比较,

TGF-β<sub>1</sub>组Rheb蛋白表达明显增加, Smad3磷酸化水平升高(P<0.05);与TGF-β<sub>1</sub>组比较, TGF-β<sub>1</sub>+柴胡含药血清组和TGF-β<sub>1</sub>+SIS3组Rheb蛋白表达下降, Smad3磷酸化水平降低(P<0.05)。见图4、表6。

#### 4 讨论

IPF归属于中医学“肺痹”“肺痿”等范畴, 中医病机关键为“虚、痰、瘀”。柴胡是中医治疗肝纤维化的常用药物, 但其也广泛应用于其他类型的纤维化疾病<sup>[9]</sup>。《本草思辨录》云:“少阳之火……不寒不热, 脾得之气升, 肺得之而降”“柴胡升少阳而使适于中, 则少阳自遂其生生之性而脾肺悉受其荫”。《本经疏证》云:“柴胡之通上焦……实系升之力, 盖肺不得肝胆之阳上畅, 则无以使阴下归, 复其升降之常。”表明柴胡能够升肝阳, 使得肝肺气机升降协调而不至肺气上逆。由此可知, 柴胡用于治疗肺系疾病有着充分的中医理论支持<sup>[10, 12-13]</sup>。此外, 柴胡复方、柴胡单药及柴胡有效成分抗纤维化的作用在多种纤维化性疾病中已得到充分证实<sup>[14-19]</sup>, 柴胡及其有效成分在肺纤维化中的作用也逐步得到了阐明。郑金旭等<sup>[18]</sup>发现柴胡皂苷D(SSD)能够显著缓解博来霉素所致的小鼠肺纤维化, 作用机制可能与抗脂质过氧化作用有关。孙金玲等<sup>[19]</sup>发现SSD可能通过调控TGF-β<sub>1</sub>/Smads信号通路从而抑制肺成纤维细胞增殖和胶原表达。此外, 柴胡皂苷对于脂多糖诱导的急性肺损伤和香烟烟雾引起的肺部

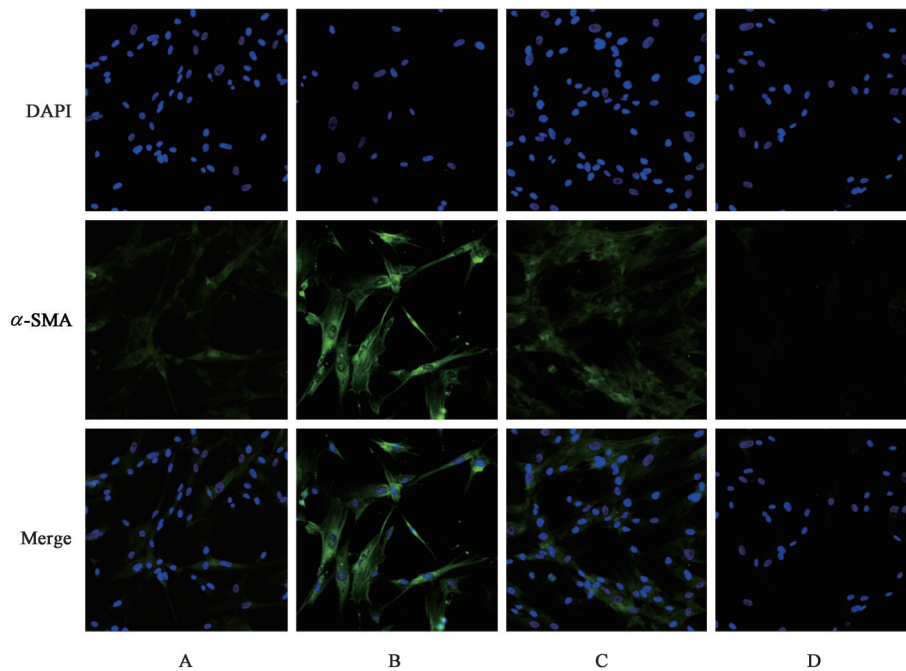


图2 柴胡含药血清对TGF- $\beta_1$ 诱导下HFL1细胞 $\alpha$ -SMA的影响(免疫荧光,  $\times 200$ )

Fig. 2 Effect of medicated serum of Bupleuri Radix on protein expression of  $\alpha$ -SMA in HFL1 cells (IF,  $\times 200$ )

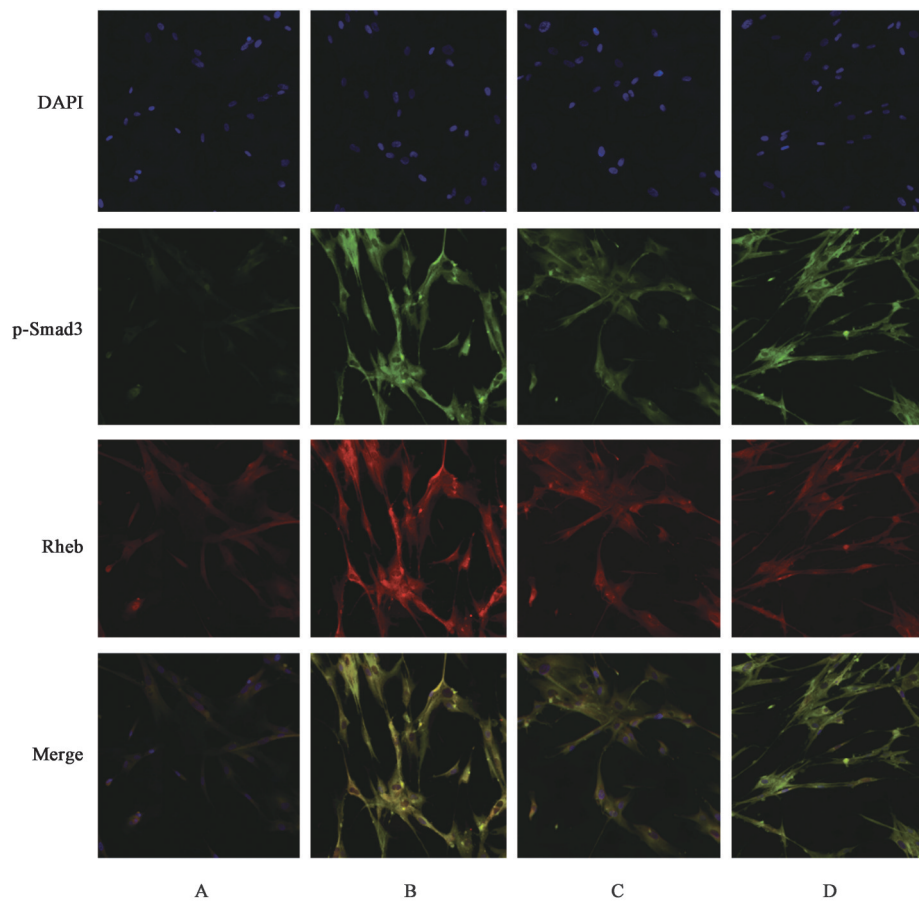


图3 柴胡含药血清对TGF- $\beta_1$ 诱导下HFL1细胞Rheb和p-Smad3的影响(免疫荧光,  $\times 200$ )

Fig. 3 Effect of medicated serum of Bupleuri Radix on protein expression of Rheb and p-Smad3 in HFL1 cells (IF,  $\times 200$ )

炎症均有一定的治疗作用<sup>[20-21]</sup>。研究柴胡在肺纤维化中的作用能够更好地帮助临床用药,也能为日后

分离有效成分提供药理学依据。

肌成纤维细胞是IPF患者肺组织胶原和各种基

表5 柴胡含药血清对TGF-β<sub>1</sub>诱导HFL1细胞α-SMA、Rheb和p-Smad3蛋白的影响(̄x±s, n=3)

Table 5 Effect of medicated serum of Bupleuri Radix on TGF-β<sub>1</sub>-induced protein expressions of α-SMA, Rheb, and p-Smad3 (̄x±s, n=3)

组别	含药血清体积分数/%	平均荧光强度		
		α-SMA	p-Smad3	Rheb
空白血清组		9.73±0.96	5.43±0.77	7.78±0.20
TGF-β <sub>1</sub> 组	10 <sup>3</sup> )	58.31±5.59 <sup>1)</sup>	34.53±3.51 <sup>1)</sup>	22.91±0.57 <sup>1)</sup>
TGF-β <sub>1</sub> +柴胡含药血清组	10 <sup>3</sup> +15	19.42±1.94 <sup>2)</sup>	15.77±1.33 <sup>2)</sup>	13.36±1.22 <sup>2)</sup>
TGF-β <sub>1</sub> +SIS3组	10 <sup>3</sup> +3 <sup>4)</sup>	6.71±1.49 <sup>2)</sup>	26.87±0.33 <sup>2)</sup>	10.96±0.16 <sup>2)</sup>

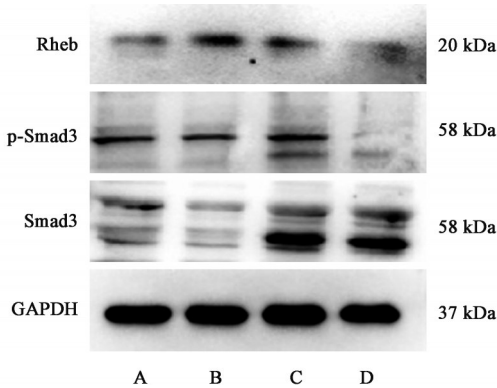


图4 TGF-β<sub>1</sub>诱导下HFL1细胞Rheb、Smad3、p-Smad3蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of TGF-β<sub>1</sub>-induced Rheb, Smad3, p-Smad3 protein expression in HFL1 cells

表6 柴胡含药血清对TGF-β<sub>1</sub>诱导下HFL1细胞Rheb蛋白表达和Smad3蛋白磷酸化的影响(̄x±s, n=3)

Table 6 Effect of medicated serum of Bupleuri Radix on TGF-β<sub>1</sub>-induced Rheb protein expression and Smad3 protein phosphorylation in HFL1 cells (̄x±s, n=3)

组别	含药血清 体积分数/%	Rheb /GAPDH	p-Smad3 /Smad3
空白血清组		0.52±0.05	1.17±0.34
TGF-β <sub>1</sub> 组	10 <sup>3</sup> )	0.63±0.02 <sup>1)</sup>	2.00±0.26 <sup>1)</sup>
TGF-β <sub>1</sub> +柴胡含药血清组	10 <sup>3</sup> +15	0.52±0.06 <sup>2)</sup>	0.91±0.34 <sup>2)</sup>
TGF-β <sub>1</sub> +SIS3组	10 <sup>3</sup> +3 <sup>4)</sup>	0.29±0.00 <sup>2)</sup>	0.82±0.44 <sup>2)</sup>

质蛋白的主要生产者,其在IPF的发病机制中起到了重要的作用,因此肌成纤维细胞的来源一直是基础研究的重点所在<sup>[4]</sup>。当肺泡上皮细胞损伤后,其释放的炎症因子、促纤维化因子会不断募集成纤维细胞并诱导成纤维细胞增殖、分化为肌成纤维细胞。本研究发现TGF-β<sub>1</sub>能促进HFL1细胞表达肌成纤维细胞标志物α-SMA,即促进FMT,而柴胡含药血清能够显著抑制α-SMA,从而逆转这一过程。通常情况下,肌成纤维细胞在完成其修复功能后会自行凋亡,但在肺纤维化患者的肺组织中肌成纤维细胞存在异常激活和凋亡抵抗。其可通过不断产生

细胞外基质、细胞因子等成分刺激微环境中的细胞并最终导致肺组织重构和纤维化<sup>[3,22]</sup>。本研究通过CCK-8检测发现,10 μg·L<sup>-1</sup> TGF-β<sub>1</sub>能够显著提高细胞增殖率,15%柴胡含药血清能够显著降低细胞增殖率。TUNEL结果显示,TGF-β<sub>1</sub>处理能够降低HFL1凋亡率,Real-time PCR结果显示,TGF-β<sub>1</sub>处理能够上调抗凋亡蛋白Bcl-2的表达和下调促凋亡蛋白Bax的表达,而柴胡含药血清能够提高细胞凋亡率,下调抗凋亡蛋白Bcl-2表达和上调促凋亡蛋白Bax表达。结果证明柴胡含药血清能够抑制TGF-β<sub>1</sub>所诱导的细胞增殖,促进成纤维细胞凋亡和FMT。

mTORC1/4E-BP1轴在肺纤维化中有着重要的作用<sup>[6]</sup>,其上游可能与TSC2/Rheb轴活化有关。TGF-β<sub>1</sub>/Smad信号通路是IPF病理机制中极为重要的一环,研究显示TGF-β<sub>1</sub>/Smad通路能够调控mTORC1/4E-BP1轴介导的胶原表达<sup>[6]</sup>。TGF-β<sub>1</sub>刺激能够促使Smad3磷酸化,磷酸化的Smad2、Smad3与Smad4形成复合物转位入核,促进早期I型胶原的表达<sup>[23]</sup>。与此同时,Smad3还能够激活mTORC1/4E-BP1轴并通过这一机制实现后续的胶原表达,siRNA敲减Smad3能够降低4E-BP1的磷酸化水平并减少胶原表达<sup>[6]</sup>。目前尚不明确Smad3是通过何种蛋白调控mTORC1活性及4E-BP1磷酸化水平的,故本研究拟初步验证Smad3对于mTORC1经典上游Rheb蛋白的调控作用。Rheb属于Ras蛋白家族,具有GTP酶活性。Rheb对mTORC1下游P70S6K和4E-BP1磷酸化及胶原的表达有重要的作用。GUILLOTIN等<sup>[7]</sup>研究通过生信分析发现TSC2/Rheb轴在IPF患者成纤维灶中高表达。通过CRISPR-Cas9敲除IPF患者肺成纤维细胞的Rheb基因能够显著抑制TGF-β<sub>1</sub>诱导的P70S6K和4E-BP1的磷酸化及I型胶原的表达。LIU等<sup>[8]</sup>研究发现TGF-β<sub>1</sub>刺激能够增加大鼠原代肺成纤维细胞Rheb蛋白的表达并导致mTORC1下游蛋白磷酸化水平升高。前人研究结果分别证明了TGF-β<sub>1</sub>刺激

能够促使 Smad3 磷酸化、增加 Rheb 蛋白表达,但 Smad3 磷酸化与 Rheb 之间的关系尚未有研究证实。本研究发现 TGF- $\beta_1$  能促进 Smad3 蛋白磷酸化、Rheb 蛋白表达,选择性 Smad3 抑制剂 SIS3 能抑制 Smad3 蛋白磷酸化和 Rheb 蛋白表达。由此可知,Smad3 能够调控 Rheb 蛋白表达,但两者之间的直接调控机制有待进一步研究证实。此外,柴胡含药血清能够抑制 Rheb 表达及 Smad3 磷酸化,以上结果证明柴胡含药血清可能对于 Smad3/Rheb 轴有调控作用。

综上所述,本研究发现柴胡能够抑制 TGF- $\beta_1$  诱导的 HFL1 细胞增殖和 FMT,促进成纤维细胞凋亡,该作用可能与 Smad3/Rheb 轴有关,为柴胡治疗 IPF 的临床应用提供了理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] LEDERER D J, MARTINEZ F J. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(19): 1811-1823.
- [2] BURMAN A, TANJORE H, BLACKWELL T S. Endoplasmic reticulum stress in pulmonary fibrosis[J]. *Matrix Biol*, 2018, 68-69:355-365.
- [3] MICHALIK M, WÓJCIK-PSZCZOŁA K, PAW M, et al. Fibroblast-to-myofibroblast transition in bronchial asthma[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(21): 3943-3961.
- [4] ZHANG J X, HUANG P J, WANG D P, et al. m(6)A modification regulates lung fibroblast-to-myofibroblast transition through modulating KCNH6 mRNA translation[J]. *Mol Ther*, 2021, 29(12):3436-3448.
- [5] KIM K K, SHEPPARD D, CHAPMAN H A. TGF- $\beta_1$  signaling and tissue fibrosis [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A022293.
- [6] WOODCOCK H V, ELEY J D, GUILLOTIN D, et al. The mTORC1/4E-BP1 axis represents a critical signaling node during fibrogenesis[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):6.
- [7] GUILLOTIN D, TAYLOR A R, PLATÉ M, et al. Transcriptome analysis of IPF fibroblastic foci identifies key pathways involved in fibrogenesis [J]. *Thorax*, 2021, 76(1):73-82.
- [8] LIU Y, ZHONG W, ZHANG J, et al. Tetrandrine modulates Rheb-mTOR signaling-mediated selective autophagy and protects pulmonary fibrosis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:739220.
- [9] 沈泉,何凌林,范伏元,等. 特发性肺纤维化中 mTORC1/4E-BP1 轴的作用探讨及柴胡对其干预的

研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(10): 239-250.

- [10] 沈泉,何凌林,欧慧萍,等. 范伏元教授从肝论治类风湿关节炎继发肺间质病变经验[J]. *中医导报*, 2021, 27(10):191-193,197.
- [11] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9):1069-1072.
- [12] 刘森,廖尖兵,王文譔,等. 从肝论治特发性肺纤维化[J]. *中医学报*, 2019, 34(5):920-923.
- [13] 常虹,孟洪宇,王宇,等. 基于代谢组学的肝、肺纤维化“异病同治”科学内涵研究[J]. *中草药*, 2018, 49(21):5116-5124.
- [14] LIU H, YU H, CAO Z, et al. Kaempferol modulates autophagy and alleviates silica-induced pulmonary fibrosis[J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38(12):1418-1426.
- [15] CHO I H, CHOI Y J, GONG J H, et al. Astragalín inhibits autophagy-associated airway epithelial fibrosis [J]. *Respir Res*, 2015, 16(1):51.
- [16] WANG Y C, DONG J, NIE J, et al. Amelioration of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by chlorogenic acid through endoplasmic reticulum stress inhibition [J]. *Apoptosis*, 2017, 22(9):1147-1156.
- [17] 臧建华,周兆山. 柴胡渗湿汤治疗特发性肺纤维化61例疗效观察[J]. *中医药临床杂志*, 2015, 27(9):1280-1283.
- [18] 郑金旭,卢坤琴,夏德刚,等. 柴胡皂苷 D 对博来霉素诱导肺纤维化小鼠的治疗作用及机制研究[J]. *中华医学杂志*, 2010, 90(12):808-812.
- [19] 孙金玲,郑金旭,史小东,等. 柴胡皂苷 D 通过调控 TGF- $\beta_1$ /Smads 信号通路抑制人胚肺成纤维细胞增殖和胶原蛋白产生[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2019, 35(3):256-261.
- [20] CHEN R J, GUO X Y, CHENG B H, et al. Saikosaponin a inhibits cigarette smoke-induced oxidant stress and inflammatory responses by activation of Nrf2 [J]. *Inflammation*, 2018, 41(4): 1297-1303.
- [21] DU Z A, SUN M N, HU Z S. Saikosaponin a ameliorates LPS-induced acute lung injury in mice[J]. *Inflammation*, 2018, 41(1):193-198.
- [22] BURGESS J K, MAUAD T, TJIN G, et al. The extracellular matrix-the under-recognized element in lung disease?[J]. *J Pathol*, 2016, 240(4):397-409.
- [23] VERRECCHIA F, CHU M L, MAUVIEL A. Identification of novel TGF-beta/Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(20):17058-17062.

[责任编辑 孙丛丛]