

· 经典名方 ·

补阳还五汤含药血清对人肺动脉内皮细胞间质转化的影响

渠景连, 杨邗捷, 赵惠亮*
(贵州中医药大学, 贵阳 550025)

[摘要] **目的:** 研究补阳还五汤含药血清对人肺动脉内皮细胞 (HPAEC) 间质转化 (EndMT) 的调控作用, 并从 Jagged1/Notch1 信号传导进一步分析其作用机制。**方法:** 以 $53.36 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量灌胃家兔, 制备补阳还五汤含药血清, 等容积生理盐水灌胃制备空白血清。体外培养 HPAEC 细胞, 转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 诱导建立 EndMT 模型, 设立空白组 (10% 空白血清), 模型组 (10% 空白血清 + TGF- β_1), 补阳还五汤含药血清高剂量组 (10% 含药血清 + TGF- β_1), 补阳还五汤含药血清中剂量组 (5% 含药血清 + 5% 空白血清 + TGF- β_1) 和补阳还五汤含药血清低剂量组 (2.5% 含药血清 + 7.5% 空白血清 + TGF- β_1) 5 组。采用噻唑蓝 (MTT) 比色法检测细胞增殖能力, transwell 和划痕实验检测细胞迁移能力, 免疫荧光观察内皮细胞标志物血小板内皮细胞黏附分子 1 (CD31), 血管内皮钙黏蛋白 (VE-cadherin) 和间质细胞标志物成纤维细胞特异性蛋白 1 (FSP1), α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 的表达, 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 Notch1, Jagged1 及 CBF1 蛋白的表达。**结果:** 与空白组比较, 模型组 HPAEC 细胞增殖能力、迁移能力均显著增强 ($P < 0.01$), CD31 和 VE-cadherin 表达呈下降趋势, FSP1 和 α -SMA 表达呈上升趋势, Notch1, Jagged1 和 CBF1 表达显著上调 ($P < 0.01$)。补阳还五汤含药血清干预后, 与模型组比较, 细胞增殖能力、迁移能力均明显减弱 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且 CD31 和 VE-cadherin 表达呈上升趋势, FSP1 和 α -SMA 表达呈下降趋势, Notch1, Jagged1 和 CBF1 表达明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 随着含药血清浓度的增加, 作用越明显。**结论:** 补阳还五汤含药血清可部分抑制人肺动脉内皮细胞发生间质转化, 这一过程可能与调控 Jagged1/Notch1 信号有关。

[关键词] 补阳还五汤; 特发性肺纤维化; 人肺动脉内皮细胞; 内皮间质转化

[中图分类号] R2-0; R285.5; R289; R318.13 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)19-0001-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192036

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190703.1442.003.html>

[网络出版时间] 2019-07-04 11:25

Effect of Serum Containing Buyang Huanwu Tang on Endothelial-to-mesenchymal Transition of Human Pulmonary Artery Endothelial Cells

QU Jing-lian, YANG Han-jie, ZHAO Hui-liang*

(Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the regulatory effect of serum containing Buyang Huanwu Tang on endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) in human pulmonary artery endothelial cells (HPAEC), and make further analysis on its mechanism from the perspective of the signal transduction of Jagged1/Notch1. **Method:** Rabbit serum containing Buyang Huanwu Tang was prepared by gavage with dosage of $53.36 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, and blank serum was prepared by gavage with same volume of normal saline. The HPAECs cultured *in vitro*, EndMT model was established by the transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) induced, which were divided into five groups: the control group (10% blank serum), the model group (10% blank serum + TGF- β_1), the serum containing high-dose Buyang Huanwu Tang group (10% medicated serum + TGF- β_1), the medium-dose group

[收稿日期] 20190413(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81660789);贵州省科技厅科技计划项目(黔科合基础[2017]1013);贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合 KY 字[2017]177);贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究项目(QZYY-2018-104)

[第一作者] 渠景连, 博士, 讲师, 从事温病治则治法的机制研究, E-mail: qqpsy2009@126.com

[通信作者] * 赵惠亮, 硕士, 讲师, 从事中医心理学研究, E-mail: 413385641@qq.com

(5% medicated serum + 5% blank serum medicated + TGF- β_1) and the low-dose group (2.5% medicated serum + 7.5% blank serum + TGF- β_1). Cell proliferation was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. Cell migration was detected by transwell and scratch assay. The endothelial markers platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31), vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) and the mesenchymal markers fibroblast-specific protein 1 (FSP1), α -smooth muscle actin (α -SMA) were observed by immunofluorescence assay. The expression levels of Notch1, Jagged1 and CBF1 were detected by Western blot assay. **Result:** Compared with the control group, the proliferation and migration abilities of the HPAEC cells in model group were enhanced ($P < 0.01$), and the expressions of CD31 and VE-cadherin were decreased, while the expressions of FSP1 and α -SMA were increased. Further study found that the expressions of Notch1, Jagged1 and CBF1 were up-regulated ($P < 0.01$). After the intervention of the serum containing Buyang Huanwu Tang, compared with model group, the proliferation and migration abilities of cells were decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the expressions of CD31 and VE-cadherin were on the rise, while the expressions of FSP1 and α -SMA were on the decline. The expressions of Notch1, Jagged1 and CBF1 were also significantly lower than those in model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). With the increase of serum concentration, the effect was more obvious. **Conclusion:** The serum containing Buyang Huanwu Tang can partly inhibit the EndMT in human pulmonary artery endothelial cells, which may be related to the regulation effect of Jagged1/Notch1 signaling.

[Key words] Buyang Huanwu Tang; idiopathic pulmonary fibrosis; human pulmonary artery endothelial cells; endothelial-to-mesenchymal transition

特发性肺纤维化 (IPF) 是最常见、最具侵袭性的间质性肺疾病之一,好发于中老年人,其影像学 (或) 组织学特征表现为普通型间质性肺炎,主要症状是刺激性干咳,进行性的呼吸困难,肺功能提示限制性通气功能障碍,弥散功能降低,由于缺乏有效的治疗方法,很多患者在确诊后 3 至 5 年内死亡^[1-4]。2018 年 5 月国家卫健委等部门制定的《第一批罕见病目录》中,IPF 被收录其中,因此本病已成为急需攻克的医学难题之一。

成纤维细胞灶的形成是 IPF 的特征性病变,主要表现为强有力的成纤维细胞增殖和细胞外基质的过度沉积,成纤维细胞也是细胞外基质的主要来源。有研究表明,从 IPF 肺组织中分离出来的成纤维细胞具有不同于正常肺成纤维细胞的异质性表现和特性^[5-6]。这种异质性的原因可能是由于成纤维细胞来源于多种不同的细胞,肺泡上皮细胞已被证明是其来源之一,其可以通过上皮间质转化 (EMT) 成为肺成纤维细胞^[7]。有研究发现,内皮细胞也是成纤维细胞的潜在贡献者^[8],内皮间质转化 (EndMT) 是 IPF 发生发展的又一重要步骤,肺纤维化发生时肺血管内皮细胞可产生大量的成纤维细胞^[5]。这一过程又与 Jagged1/Notch1 信号传导有关,在博来霉素诱导的肺纤维化大鼠肺微血管内皮细胞中 Jagged1/Notch1 信号被激活,并可以通过核转录因子- κ B (NF- κ B) 通路诱导 α -平滑肌肌动蛋白

(α -SMA) 表达^[9-10]。

补阳还五汤是益气活血通络的代表方,能够有效防治 IPF^[11],也有学者对其作用机制进行了研究,但主要集中在与炎症损伤和细胞外基质代谢异常相关的细胞因子和信号通路的调控^[12-15]上,尚未见从内皮间质转化角度进行研究的报道。但补阳还五汤对 IPF 的调控是否与干预 EndMT 有关尚不明确,结合上述文献调研“Jagged1/Notch1 信号在 EndMT 过程中发挥重要作用”,课题组前期研究也发现补阳还五汤能够干预 IPF 大鼠 Jagged1/Notch1 信号传导,本研究基于血清药理学方法,从细胞增殖、迁移、特异性标志物等方面观察补阳还五汤含药血清对人肺动脉 EndMT 的影响,并从 Jagged1/Notch1 信号传导进一步分析其作用机制,以期为临床防治本病提供实验依据。

1 材料

1.1 动物与细胞株 健康 8 周龄新西兰兔 10 只,体质量 2 ~ 2.5 kg,由仪征安立卵生物科技有限公司提供,许可证号 SYXK (苏) 2016-0005,实验所用动物均符合贵州中医药大学动物伦理委员会的要求。人肺动脉内皮细胞 (HPAEC) 由广州吉妮欧生物科技有限公司提供。细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,常规传代培养,传至第 4 代用于实验。

1.2 药物及试剂 补阳还五汤由黄芪、当归、赤芍、

地龙、川芎、桃仁、西红花组成,药材购自贵阳同仁堂药房,经贵州中医药大学药学院孙庆文教授鉴定为正品。RPMI 1640 培养基,胎牛血清,青霉素/链霉素,胰酶(美国 Hyclone 公司,批号分别为 AC135526481, AC105264184, AC101511238, AC114002154);血小板内皮细胞黏附分子 1 (CD31),血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin),成纤维细胞特异性蛋白 1(FSP1), α -SMA 抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为 A004265948, AC03185478, AC09223656, AG02247616);兔抗免疫球蛋白(Ig)G,鼠抗 IgG,CBF1 抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 GR3232538-1, GR3184254-2, GR3180240-6);Notch1 抗体(美国 CST 公司,批号 3608);Jagged1 抗体(美国 Affinity 公司,批号 DF8269);RIPA 蛋白裂解液,BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 P0013B, P0011);转化生长因子(TGF)- β_1 (美国 Peprotech 公司,批号 031316-1);噻唑蓝(MTT,白鲨生物科技公司,批号 0739);二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司,批号 RNBF7438);transwell 小室, PVDF 膜(美国 Millipore 公司,批号分别为 A180022, R8DA5001);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(成都正能生物技术有限责任公司,批号 HH0607)。

1.3 仪器 BSC-03IIA2-SE 型生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司);Ts2R 型荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司);3131 型 CO₂ 培养箱, Multiskan 51119000 型酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司);LSM710 型激光共聚焦荧光显微镜(德国 Zeiss 公司);SDS-PAGE 型电泳仪及湿法转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);TY-80R 型脱色摇床(金坛市医疗仪器厂);Tanon 5200 型化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 补阳还五汤含药血清制备 根据人的用药量(黄芪 120 g, 当归 6 g, 赤芍 5 g, 地龙 3 g, 川芎 3 g, 桃仁 3 g, 西红花 3 g),及根据人和动物体表面积换算补阳还五汤的用药剂量,补阳还五汤的家兔等效剂量为 6.67 g·kg⁻¹·d⁻¹。10 只健康新西兰兔随机分为 2 组:含药血清组和空白血清组。含药血清组以家兔等效剂量的 8 倍进行灌胃,给药量为 53.36 g·kg⁻¹·d⁻¹,连续给药 3 d,末次给药 1 h 后颈动脉取血,常温下分离血清,56 °C 水浴灭活,过滤除菌,-80 °C 保存备用。空白血清组给予等容积的

生理盐水,相同方法制备空白血清。

2.2 人肺动脉内皮细胞间质转化模型制备 将 HPAEC 细胞种于 6 孔板中,待细胞长至 80%~90% 融合度时,去除完全培养基,加入 0.5% 胎牛血清(FBS)的 1640 培养基同步 24 h,使细胞处于同一生长周期。加 TGF- β_1 (5 mg·L⁻¹) 刺激细胞 72 h 后观察细胞形态变化,当细胞形态由铺路石样向梭形转化,细胞间连接减少,且细胞间隙变大时,提示内皮间质转化发生,细胞模型制备成功。

2.3 分组 设置空白组(10% 空白血清)和模型组(10% 空白血清 + TGF- β_1 5 mg·L⁻¹),补阳还五汤高剂量组(10% 含药血清 + TGF- β_1 5 mg·L⁻¹),补阳还五汤中剂量组(5% 含药血清 + 5% 空白血清 + TGF- β_1 5 mg·L⁻¹),补阳还五汤低剂量组(2.5% 含药血清 + 7.5% 空白血清 + TGF- β_1 5 mg·L⁻¹)。

2.4 MTT 比色法检测细胞增殖能力 收集对数生长期的 HPAEC 细胞,计数并调整细胞密度,按 5 × 10³ 个/孔细胞接种于 96 孔板内,0.5% FBS 的 1640 培养基同步 24 h,使细胞处于同一生长周期。按以上分组方法加入相应浓度的含药血清,并给予 TGF- β_1 造模。每组设 5 个复孔,培养箱继续培养。72 h 后,往培养基中加入 MTT 10 μ L (5 g·L⁻¹),操作尽量避免光,置培养箱继续培养。3 h 后取出 96 孔板,去除培养基,每孔加入 DMSO 150 μ L,摇晃均匀,酶标仪于 570 nm 波长处测定吸光度 A,并计算细胞生长抑制率。细胞生长抑制率 = (1 - 实验组 A/模型组 A) × 100%。

2.5 transwell 法检测细胞迁移能力 消化收集 HPAEC 细胞,计数并调整细胞密度,按每孔 5 × 10⁵ 个细胞接种于 6 孔板,0.5% FBS 的 1640 培养基同步 24 h,使细胞处于同一生长周期。去除培养基,按以上分组方法加入相应浓度的含药血清,并给予 TGF- β_1 造模,每孔加 2 mL,置培养箱培养。培养 72 h 后消化收集细胞,用无血清培养基将细胞重悬并计数,上室接种无血清细胞悬液,每孔接种量为 5 × 10⁵ 个,下室加入含 10% 血清培养基,培养箱中常规培养 8 h。吸干上室液体,PBS 冲洗 1 遍,加入甲醇 400 μ L 常温固定 10 min。吸干上室固定液,加入结晶紫染液 400 μ L,常温染色 10 min 后轻轻用 PBS 浸泡数次以去除多余染料。吸去上室液体,用湿棉棒小心擦去上室膜表面上的细胞以去除未迁移的细胞,放入倒置显微镜下观察迁移的细胞,并计数。

2.6 划痕实验检测细胞迁移能力 消化收集对数

生长期的 HPAEC 细胞,计数并调整细胞密度,按 5×10^6 个/孔细胞均匀接种于 6 孔板内,培养箱培养。待细胞贴壁后,0.5% FBS 的 1640 培养基同步 24 h,使细胞处于同一生长周期。去除培养基,按以上分组方法加入相应浓度的含药血清,并给予 TGF- β_1 造模,每孔 2 mL,培养箱培养。72 h 后去除培养基,PBS 冲洗 1 次细胞,用 200 μ L 枪头在 6 孔板中划 3 道直线,PBS 冲洗 2 遍,去除划出的细胞,再用 PBS 冲洗 2 遍,将残余的细胞洗干净,并在显微镜下拍照。加入培养基继续培养,12 h 后拍照,测定划痕距离,并计算迁移距离。

2.7 免疫荧光检测 CD31, VE-cadherin, FSP1, α -SMA 的表达 收集对数生长期的 HPAEC 细胞,接种于 6 孔板中,按以上分组方法加入相应浓度的含药血清,并给予 TGF- β_1 造模,每孔加 2 mL,置培养箱培养。72 h 后去除培养基,预冷的 PBS 洗 2 次,4% 多聚甲醛常温固定 10 min,预冷的 PBS 洗 3 次,加入 0.5% Triton X-100 的 PBS,在冰上将细胞膜穿刺 10 min,去除 PBS-triton,预冷的 PBS 洗 3 次,PBS-3% BSA 常温封闭 30 min,将一抗按照比例(CD31, 1:50, VE-cadherin, 1:200, FSP1, 1:100, α -SMA, 1:200)稀释,去除封闭液后,加入一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS-0.35% Tween 20 洗 3 遍,加入荧光二抗,室温避光孵育 1 h, PBS-0.35% Tween20 洗 3 次,加入 100 mg \cdot L $^{-1}$ DAPI 溶液,室温避光孵育 10 min, PBS-0.35% Tween 20 洗 3 次,加入防荧光淬灭溶液,激光共聚焦荧光显微镜下观察拍照。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Notch1, Jagged1, CBF1 蛋白的表达 收集 HPAEC 细胞,加入 RIPA 裂解液和 PMSF 蛋白酶抑制剂,冰上裂解 30 min,4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 5 min,收集上清液。取少量上清进行蛋白定量,其余尽快按照比例加入上样缓冲液,95 $^{\circ}$ C 水浴煮 5 min,然后保存于 -20 $^{\circ}$ C 待用。临用时根据蛋白分子量配制分离胶和浓缩胶,将已加入上样缓冲液的标准蛋白质样品及待测样品加入样品槽内,100 V 恒压电泳约 1.5 h,当溴酚蓝到达分离胶的底部,关闭电源。100 V,1 h 4 $^{\circ}$ C 转膜,5% 脱脂奶粉室温轻摇封闭 1 h。将一抗用含 5% BSA 的 TBST 溶液按照 1:1 000 稀释,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。将二抗用 TBST 按 1:5 000 稀释,室温下孵育 2 h,取出 PVDF 膜,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。在 Tanon 凝胶成像仪下拍照,用 Image J 软件分析目的蛋白的灰度值。

2.9 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 TGF- β_1 诱导的 HPAEC 细胞增殖能力的影响 与空白组比较,模型组细胞增殖显著增强($P < 0.01$);与模型组比较,补阳还五汤含药血清高、中、低剂量组细胞增殖均显著受到抑制($P < 0.01$),说明补阳还五汤含药血清对 TGF- β_1 诱导的 HPAEC 细胞增殖有一定的抑制作用,且含药血清浓度越高,抑制作用越强。见表 1。

表 1 补阳还五汤含药血清对 TGF- β_1 诱导的 HPAEC 细胞增殖能力的影响

Table 1 Effect of serum containing Buyang Huanwu Tang on proliferation of HPAECs induced by TGF- β_1

组别	体积分数 /%	细胞增殖 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)	抑制率 /%
空白	-	0.744 \pm 0.012	-
模型	-	1.203 \pm 0.042 ²⁾	-
补阳还五汤含药血清	10	0.847 \pm 0.055 ⁴⁾	29.592
	5	0.975 \pm 0.006 ⁴⁾	18.952
	2.5	1.054 \pm 0.041 ⁴⁾	12.385

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 1~3 同)。

3.2 对 TGF- β_1 诱导的 HPAEC 细胞迁移能力的影响 与空白组比较,模型组迁移到膜下表面的细胞数显著增加($P < 0.01$),迁移距离显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,补阳还五汤含药血清高、中、低剂量组迁移到膜下表面的细胞数明显减少($P < 0.05$),补阳还五汤含药血清高剂量组效果最显著($P < 0.01$),迁移距离显著减少($P < 0.01$)。见表 2。

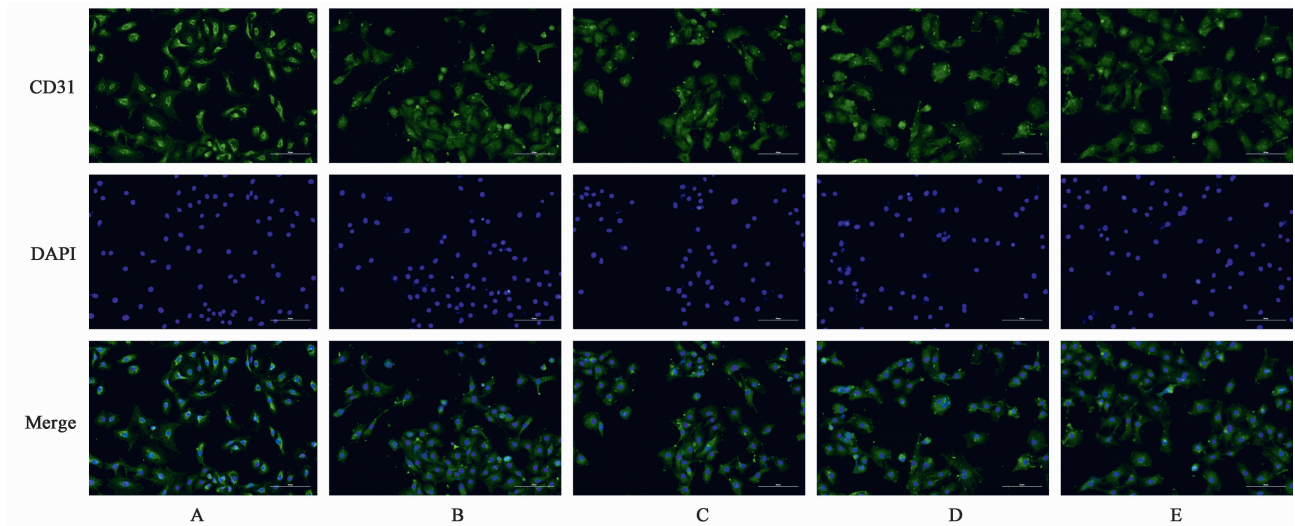
3.3 对 TGF- β_1 诱导的 HPAEC 细胞内皮标志物表达的影响 与空白组比较,模型组 CD31 和 VE-cadherin 表达量均呈下降趋势。与模型组比较,补阳还五汤含药血清高、中、低剂量组 CD31 和 VE-cadherin 表达量呈上升趋势,且随着含药血清浓度的增加,上升趋势越明显。见图 1,2。

3.4 对 TGF- β_1 诱导的 HPAEC 细胞间质标志物表达的影响 与空白组比较,模型组 FSP1 和 α -SMA 表达量均呈上升趋势;与模型组比较,补阳还五汤含药血清高、中、低剂量组 FSP1 和 α -SMA 表达量呈下降趋势,且随着含药血清浓度的增加,下降趋势越明显。见图 3,4。

表 2 补阳还五汤含药血清对 TGF-β₁ 诱导的 HPAEC 细胞迁移的影响

Table 2 Effect of serum containing Buyang Huanwu Tang on migration of HPAECs induced by TGF-β₁

组别	体积分数/%	细胞数($\bar{x} \pm s, n=3$)/个	迁移率/%	迁移距离($\bar{x} \pm s, n=3$)/μm
空白	-	38.333 ± 5.686	-	54.00 ± 5.56
模型	-	66.333 ± 6.506 ²⁾	100	157.33 ± 15.88 ²⁾
补阳还五汤含药血清	10	44.667 ± 6.028 ⁴⁾	67.337	102.00 ± 4.35 ⁴⁾
	5	49.333 ± 2.517 ^{1,3)}	74.371	81.66 ± 5.68 ⁴⁾
	2.5	55.000 ± 2.000 ^{1,3)}	82.914	113.66 ± 5.50 ⁴⁾



A. 空白组; B. 模型组; C. 补阳还五汤含药血清高剂量组; D. 补阳还五汤含药血清中剂量组; E. 补阳还五汤含药血清低剂量组(图 1~5 同)

图 1 补阳还五汤含药血清对 TGF-β₁ 诱导的 HPAEC 细胞 CD31 表达的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 1 Effect of serum containing Buyang Huanwu Tang on expression of CD31 in HPAECs induced by TGF-β₁ (IF, ×200)

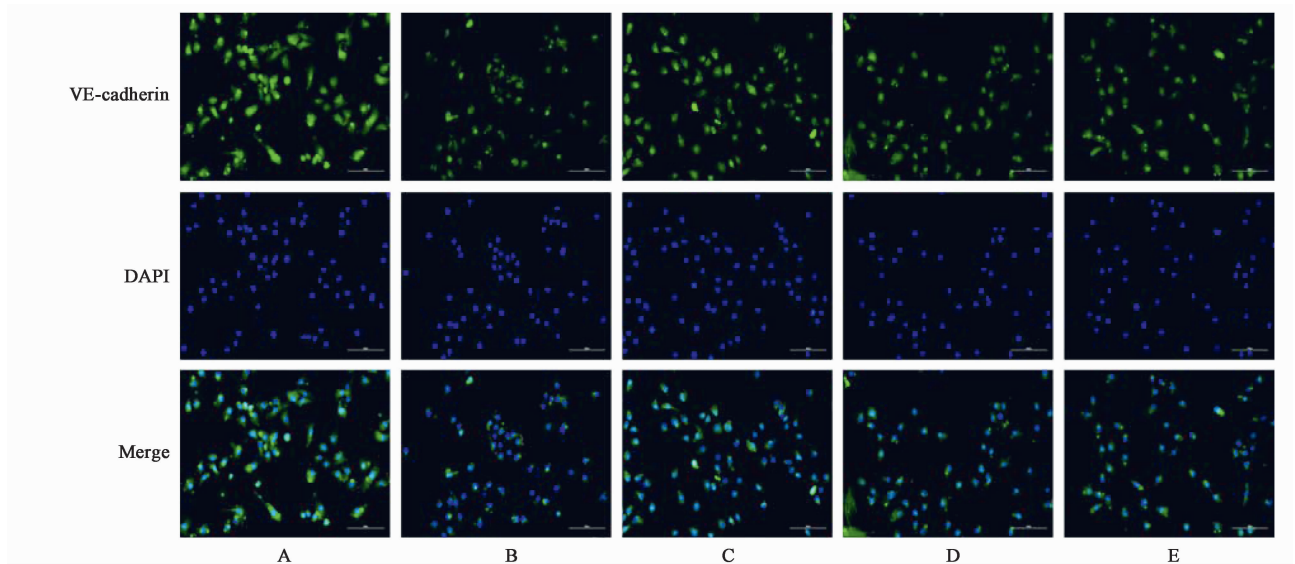


图 2 补阳还五汤含药血清对 TGF-β₁ 诱导的 HPAEC 细胞 VE-cadherin 表达的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 2 Effect of serum containing Buyang Huanwu Tang on expression of VE-cadherin in HPAECs induced by TGF-β₁ (IF, ×200)

3.5 对 TGF-β₁ 诱导的 HPAEC 细胞 Jagged1/Notch1 信号的影响 与空白组比较,模型组 Notch1, Jagged1

和 CBF1 蛋白表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,补阳还五汤含药血清高、中、低剂量组 Notch1,

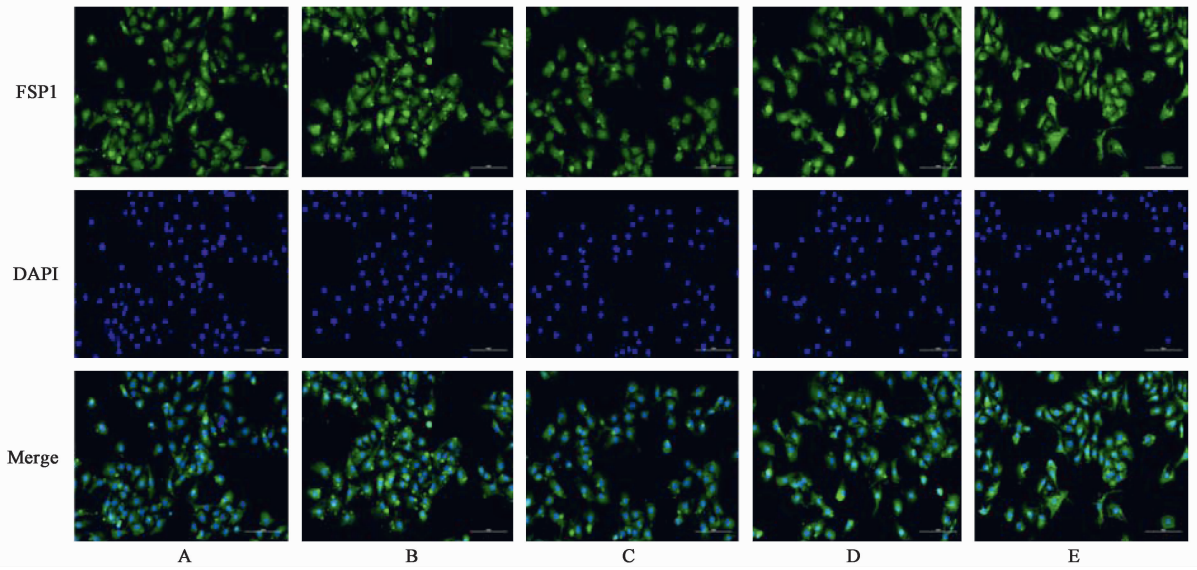


图 3 补阳还五汤含药血清对 TGF-β₁ 诱导的 HPAEC 细胞 FSP1 表达的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 3 Effect of serum containing Buyang Huanwu Tang on expression of FSP1 in HPAECs induced by TGF-β₁ (IF, ×200)

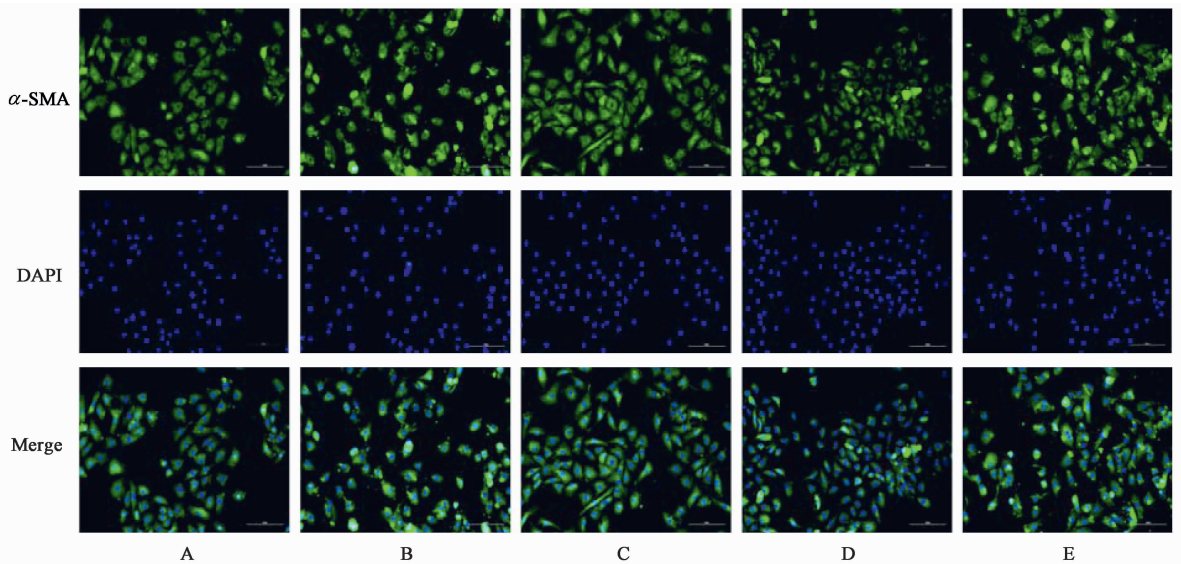


图 4 补阳还五汤含药血清对 TGF-β₁ 诱导的 HPAEC 细胞 α-SMA 表达的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 4 Effect of serum containing Buyang Huanwu Tang on expression of α-SMA in HPAECs induced by TGF-β₁ (IF, ×200)

Jagged1 和 CBF1 蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且随着含药血清浓度的增加, Notch1, Jagged1 和 CBF1 表达逐渐降低。见图 5, 表 3。

4 讨论

IPF 是一种难以治愈的慢性、进行性、纤维化性间质性肺疾病, 其最显著的特点就是正常的肺泡结构逐渐消失, 进而被纤维化组织所取代^[4]。在这一过程中, 成纤维细胞是主要的效应细胞, 目前普遍认为 EMT 是成纤维细胞的主要来源, 然而, 如前所述, EndMT 是成纤维细胞的又一潜在来源。EndMT 也就是内皮细胞在各种刺激因素的作用下向间质细胞

转化的过程, 在此过程中, 内皮细胞极性减弱, 细胞间紧密连接丢失, 并逐渐丧失 CD31, VE-cadherin 等内皮细胞标志物, 转而开始获得间质细胞表型, α-SMA, FSP1 等间质细胞标志物表达上调, 其结构也由铺路石样转变为细长梭形, 同时其增殖能力和迁移能力显著增强, 待迁徙至间质后就转变为成纤维细胞^[16-17]。

肺动脉内皮细胞是单层鳞状上皮细胞, 位于肺循环血液与血管壁内皮下组织之间, 通过各种结缔组织及纤维紧密附着于内皮下组织, 其在维护血管壁的完整性及正常的血液循环中发挥重要作用,

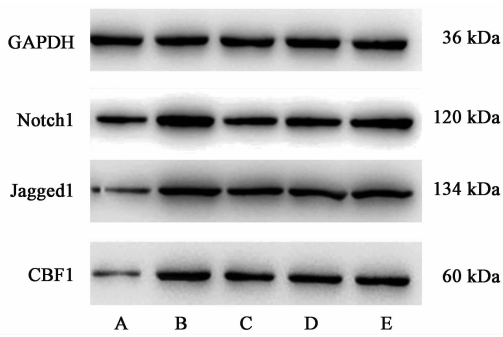


图 5 TGF-β₁ 诱导的 HPAEC 细胞 Notch1, Jagged1, CBF1 蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of Notch1, Jagged1, CBF1 protein expression in HPAEC cells induced by TGF-β₁

表 3 补阳还五汤含药血清对 TGF-β₁ 诱导的 HPAEC 细胞 Notch 1, Jagged 1, CBF 1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of serum containing Buyang Huanwu Tang on expression of Notch 1, Jagged 1, CBF 1 in HPAECs induced by TGF-β₁ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数/%	Notch1/GAPDH	Jagged1/GAPDH	CBF1/GAPDH
空白	-	0.602 ± 0.015	0.276 ± 0.034	0.244 ± 0.004
模型	-	1.201 ± 0.010 ²⁾	0.855 ± 0.038 ²⁾	0.806 ± 0.022 ²⁾
补阳还五汤含药血清	10	0.887 ± 0.037 ⁴⁾	0.635 ± 0.042 ⁴⁾	0.611 ± 0.009 ⁴⁾
	5	0.917 ± 0.013 ⁴⁾	0.663 ± 0.025 ⁴⁾	0.631 ± 0.037 ⁴⁾
	2.5	1.064 ± 0.025 ⁴⁾	0.769 ± 0.007 ³⁾	0.704 ± 0.028 ⁴⁾

和间质细胞标志物 (α-SMA, FSP-1) 上调, 说明 EndMT 细胞模型建立成功。

Notch 信号通路是在进化上高度保守的单次跨膜信号受体蛋白家族, 在哺乳动物体内由 Notch 受体 (Notch1-4), Notch 配体 (Dll 1, Dll 3, Dll 4, Jagged1 和 Jagged2) 和转录因子 CBF1/RBP-Jκ 组成^[22]。其中, Notch1 受体是血管发育过程中的主要功能受体^[23], 其与 Jagged1 配体结合可以激活 Jagged1/Notch1 信号传导, 促进转录因子 RBP-Jκ/CBF1 与 Notch 受体的活性形式 NICD 结合, 进而激活通路下游靶基因的转录。内皮细胞间激活的 Jagged1/Notch1 信号可导致形态学、表型和功能改变, 并诱导 EndMT^[24-25]。Snail 和 Slug 是已知能够抑制 VE-cadherin 表达的转录因子, 有研究表明, Notch1 可以上调内皮细胞中 Snail 和 Slug 蛋白的表达, 进而使 VE-cadherin 的表达受到抑制, 内皮细胞间紧密连接被破坏, 细胞更容易发生表型转变, 而内皮细胞特异性敲除 Jagged1 配体则能明显抑制 EndMT^[26-27]。在博来霉素诱导的肺纤维化早期, 一些细胞因子的过度分泌使 Jagged1 转录增加, 进而激活了 Jagged1/Notch1 信号传导, 促进了 EndMT 的

但受到低氧、炎症、机械损伤等刺激时, 其正常的生物学功能失调, 甚至可发生细胞形态和生物学特性的改变^[18-19]。TGF-β₁ 是由多种细胞分泌的具有多重生物学功能的生长因子, 也是肺纤维化发生过程中的重要因子。有研究证实, TGF-β₁ 在内皮细胞向平滑肌细胞转分化中发挥重要作用, 可以诱导 EndMT 的发生^[20-21]。因此本研究采用了 TGF-β₁ 诱导 HPAEC 细胞发生间质转化建立 EndMT 细胞模型。结果表明, 经 TGF-β₁ 诱导 72 h 后, MTT 实验显示 HPAEC 细胞增殖能力增强, transwell 实验和划痕实验显示 HPAEC 细胞迁移能力也增强, 免疫荧光法则提示内皮细胞标志物 (CD31, VE-cadherin) 下调

进展^[10]。本研究也显示经 TGF-β₁ 诱导后, HPAEC 细胞的 Notch1, Jagged1 和 CBF1 表达上调, 说明 Jagged1/Notch1 信号传导激活, 这一过程可能参与了 HPAEC 细胞的 EndMT 过程。

IPF 发病多因肺气亏虚, 肺络瘀滞, 在病变发展过程中, 二者又相互影响。肺气亏虚, 无力布津行血, 则血行缓慢, 停留而为瘀, 进而阻滞肺络; 肺络瘀滞, 治节无权则气血津液难以上行养肺, 以致肺体失养, 气机不利, 甚至瘀久生毒, 肺气受损更为严重, 进而引起特发性肺纤维化的各种表现^[25]。本病证多本虚标实, 益气活血法是其重要治法。补阳还五汤由清代名医王清任所创, 是补气活血通络的经典名方。方中重用黄芪四两为君药以“峻补气分”^[28], 以活血化瘀而不伤血的当归尾为臣药, 赤芍、川芎、西红花、桃仁助当归尾活血行瘀, 地龙行散走窜, 通经活络, 均为佐药。诸药合用, 使气旺血行以治本, 瘀消络通以治标, 标本兼顾。现代药理研究表明, 补阳还五汤不管是其中的单味药还是复方, 均显示了一定的抗肺纤维化作用^[12-15, 29-34]。本研究表明, 补阳还五汤含药血清可抑制 TGF-β₁ 诱导的 HPAEC 细胞的增殖和迁移, 且能上调内皮细胞标志物 (CD31,

VE-cadherin) 和下调间质细胞标志物 (α -SMA, FSP1) 的表达,说明补阳还五汤含药血清可部分抑制 HPAEC 细胞发生间质转化。而且,补阳还五汤含药血清可抑制 HPAEC 细胞的 Notch1, Jagged1 和 CBF1 的表达,调控 Jagged1/Notch1 信号传导可能是补阳还五汤含药血清抑制 EndMT 过程的机制之一。此外,本研究从 Jagged1/Notch1 信号传导研究了补阳还五汤含药血清对 HPAEC 细胞间质转化的影响,这其中机制如何,还有没有其他通路参与,这些将在以后的实验中进一步阐明。

[参考文献]

[1] 刘晓,于文涛,靳贺超,等. 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织 TGF- β_1 /Smads 通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(2):96-102.

[2] 范碧君,蒋捍东. 2015 版特发性肺纤维化治疗指南解读[J]. 世界临床药物,2016,37(7):453-456.

[3] Milara J, Serranomollar A, Xaubet A. Role of tetrahydrobiopterin in pulmonary vascular remodelling associated with pulmonary fibrosis[J]. Thorax, 2013, 68(10):938-948.

[4] Nataraj D, Ernst A, Kalluri R. Idiopathic pulmonary fibrosis is associated with endothelial to mesenchymal transition[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010, 43(2):129-130.

[5] Hashimoto N, Phan S H, Imaizumi K, et al. Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010, 43(2):161-172.

[6] Eickelberg O. The impact of TGF- β on lung fibrosis: from targeting to biomarkers[J]. Proc Am Thorac Soc, 2012, 9(3):111-116.

[7] 曾仁凤,何振华,张秀峰. 上皮细胞间质转化与肺纤维化的研究进展[J]. 当代医学,2014,20(2):12-13.

[8] Van M L A, Peter T D. Regulation of endothelial cell plasticity by TGF- β [J]. Cell Tissue Res, 2012, 347(1):177-186.

[9] TIAN D, ZENG X, WANG W, et al. Protective effect of rapamycin on endothelial-to-mesenchymal transition in HUVECs through the Notch signaling pathway[J]. Vascul Pharmacol, 2018, doi: 10.1016/j.vph.2018.10.004.

[10] YIN Q, WANG W, CUI G, et al. Potential role of the Jagged1/Notch1 signaling pathway in the endothelial-myofibroblast transition during BLM-induced pulmonary fibrosis[J]. J Cell Physiol, 2018. 233(3):2451-2463.

[11] 谭支奎,田正鉴. 田正鉴教授运用补阳还五汤加减方

治疗特发性肺纤维化疗效观察[J]. 四川中医,2014, 32(10):113-114.

[12] 潘怡,王振兴,郭静,等. 补阳还五汤对肺纤维化小鼠中介导细胞自噬的 mTOR 蛋白的调控机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(6):23-31.

[13] 王振兴,孙中莉,王明杰,等. 补阳还五汤对肺纤维化中 HMGB1-RAGE 信号通路的调控作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(13):138-144.

[14] 李水芹. 补阳还五汤大鼠含药血清对肺成纤维细胞 TGF- β_1 /Smad/ERK 信号通路调控研究[D]. 成都:成都中医药大学,2014.

[15] 杨庆. 基于 mTOR 信号转导通路的补阳还五汤拮抗肺纤维化机制研究[D]. 成都:成都中医药大学,2017.

[16] 何光庭,吴洁,黄巧冰. 内皮细胞间质转化的信号调节和生物学意义[J]. 中国循环杂志,2016,31(6):622-624.

[17] Pardali E, Sanchezduffhues G, Gomezpuerto M C, et al. TGF- β -induced endothelial-mesenchymal transition in fibrotic diseases [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(10):2157.

[18] 彭敏恋. HIF-1 α 调控 TGF- β_1 介导低氧培养的猪肺动脉内皮细胞间质转化[D]. 衡阳:南华大学,2013.

[19] Arciniegas E, Neves C, Carrillo L, et al. Endothelial-mesenchymal transition occurs during embryonic pulmonary artery development[J]. Endothelium, 2005, 12(4):193-200.

[20] Van M L A, Peter T D. Regulation of endothelial cell plasticity by TGF- β [J]. Cell Tissue Res, 2012, 347(1):177-186.

[21] Pardali E, Sanchezduffhues G, Gomezpuerto M C, et al. TGF- β -induced endothelial-mesenchymal transition in fibrotic diseases [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(10):2157.

[22] Ulla-Maj F Z, Arias A M. Cell and molecular biology of notch[J]. J Endocrinol, 2007,194(3):459-474.

[23] Krebs L T, Starling C, Chervonsky A V, et al. Notch1 activation in mice causes arteriovenous malformations phenocopied by ephrin $_2$ and Eph $_4$ mutants [J]. Genesis, 2010, 48(3):146-150.

[24] DING Y T, XU R J, XI Z, et al. Notch signaling in endothelial cells: is it the therapeutic target for vascular neointimal hyperplasia? [J]. Inter J Mol Sci, 2017, 18(8):1615.

[25] Noseda M, Mclean G, Niessen K, et al. Notch activation results in phenotypic and functional changes consistent with endothelial-to-mesenchymal transformation [J]. Circ Res, 2004, 94(7):910-917.

- [26] Lopez D, NIU G, Huber P, et al. Tumor-induced upregulation of Twist, Snail, and Slug represses the activity of the human VE-cadherin promoter[J]. Arch Biochem Biophys, 2009, 482(1/2): 77-82.
- [27] Hofmann J J, Briot A, Enciso J, et al. Endothelial deletion of murine Jag1 leads to valve calcification and congenital heart defects associated with Alagille syndrome [J]. Development, 2012, 139 (23): 4449-4460.
- [28] 张锡纯. 重订医学衷中参西录[M]. 北京:人民卫生出版社,2006;467.
- [29] 徐昌君,王鹏飞,刘杨,等. 黄芪甲苷对特发性肺纤维化自噬活性作用及 PI3K/Akt/mTOR 信号调控的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(18):75-82.
- [30] 任春贞,骆亚莉,刘永琦,等. 当归防治肺纤维化的研究进展[J]. 时珍国医国药,2017,28(1):199-201.
- [31] 葛敏,戴令娟. 川芎丹参提取液对大鼠肺纤维化的影响研究[J]. 实用临床医药杂志,2006,10(9):75-77.
- [32] 洪长福,娄金萍,周华仕,等. 桃仁提取物对大鼠实验性矽肺纤维化的影响[J]. 环境与职业医学,2000,17(4):218-219.
- [33] 李海. 基于 Hippo 信号通路的红花黄色素治疗百草枯中毒肺纤维化的研究[D]. 济南:山东大学,2017.
- [34] 杨京津. 地龙提取物减弱矽尘诱导的小鼠肺纤维化机制研究[D]. 南京:南京医科大学,2016.

[责任编辑 孙丛丛]