

# 红花黄色素对 TGF- $\beta$ 1 诱导的人肺泡上皮 A549 细胞转分化的抑制作用及其信号转导机制研究<sup>※</sup>

● 郭迎科 李瑞琴<sup>▲</sup>

**摘要** 目的:通过体外培养人肺泡上皮细胞 A549,用 TGF- $\beta$ 1 刺激其发生上皮-间质转化,运用现代分子生物学和超微病理学实验技术,探讨红花黄色素在防治肺间质纤维化上皮间质转化中的干预作用及机制。方法:将正常培养的人肺泡上皮细胞 A549 分 6 组:正常对照组、TGF- $\beta$ 1 诱导组(TGF- $\beta$ 1 终浓度为 5ng/ml,诱导 24h)、地塞米松组(地塞米松 2 $\mu$ g/mL)、红花黄色素低、中、高 3 个剂量干预组(红花黄色素 25 $\mu$ g/mL + TGF- $\beta$ 1 5ng/mL、红花黄色素中剂量组红花黄色素 50 $\mu$ g/mL + TGF- $\beta$ 1 5ng/mL、红花黄色素高剂量组红花黄色素 75 $\mu$ g/mL + TGF- $\beta$ 1 5ng/mL)。TGF- $\beta$ 1 5ng/L 干预 A549 细胞生长 24h,采用四甲基偶氮唑盐法(MTT 法)检测不同剂量红花黄色素作用于 TGF- $\beta$ 1 刺激 A549 细胞后其发生上皮-间质转化后各组的吸光值(OD 值),计算其增殖活性,绘制细胞增殖曲线。采用倒置显微镜观察各组细胞的生长状态与形态变化。结果:(1)MTT 检测结果显示:与正常对照组相比较,TGF- $\beta$ 1 诱导组细胞活力略高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );红花黄色素中药干预组细胞的增殖活力下降,与正常对照组和 TGF- $\beta$ 1 诱导组相比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。 (2)倒置显微镜观察显示:经过 TGF- $\beta$ 1 刺激后,A549 细胞由正常的铺路石样贴壁生长呈现出间质细胞的特征,呈明显的拉长状态,由鹅卵石状转变为纺锤型或梭型,出现伪足样改变,藤索样生长,类似于成纤维细胞,且细胞之间间隙增大。结论:通过观察红花黄色素各剂量组发现,细胞的形态逐渐接近正常的 A549 细胞,视野内细胞的数目按一定的剂量效应关系减少。

**关键词** 肺纤维化 红花黄色素 上皮-间质转分化

肺纤维化又称肺间质纤维化(Pulmonary fibrosis, PF),是以弥漫性肺炎、肺间质炎症和间质纤维化为特征的病变。随着近年来汽车尾气、工厂废气和工地的扬尘等增多,大气污染加剧,雾霾频发,肺纤维化发病率持续攀升<sup>[1]</sup>。中医中药在治疗肺纤维化方面具有独特的优势。本实验运用现代分子生物学实验技术,探讨红花黄色素对 TGF- $\beta$ 1 诱导的人肺泡上皮

A549 细胞转分化的抑制作用及其信号转导机制研究,为临床应用红花黄色素治疗肺纤维化提供实验室依据。

## 1 材料

1.1 细胞株 人肺泡上皮细胞 A549(凯基生物公司)

1.2 主要药物与试剂 人重组 TGF- $\beta$ 1(美国 PEP-ROTECH 公司);重组细胞因子溶解液稀释套装(联科生物)红花黄色素(山西德元堂药业有限公司,批号 H41020330);地塞米松磷酸钠注射液(河南润弘制药股份有限公司,批号 1607206);0.9%氯化钠注射液(山东华鲁制药有限公司,批号 H37022750)RPMI 1640 培养基(Solarbio 生物公司);青、链霉素混合液(Solarbio 生物公司);胎牛血清(杭州四季青);四甲

**※基金项目** 2017 年度河南省高等学校重点科研项目(No. 17A310020);河南省科技厅基础与前沿技术研究(No. 112300410052);河南省高等学校重点科研项目(No. 17A310020);河南中医药大学研究生创新项目(No. 2016YCX004)

**▲通讯作者** 李瑞琴,女,教授,硕士生导师。主要从事中医药防治肺纤维化。E-mail:xyzjane1314@163.com

• 作者单位 河南中医药大学(450046)

基偶氮唑蓝 (MTT, 美国 Sigma 公司); 0.25% 胰蛋白酶 (Solarbio 生物公司); 二甲基亚砷 (DMSO, Solarbio 生物公司)。

1.3 仪器 二氧化碳培养箱 (美国 Thermo 公司); 超净工作台 (北京世安公司); 全自动高压蒸汽灭菌器 (日本 TOMY 公司); 超低温冰箱 (美国 Thermo 公司); 倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司); 微量移液器 (德国 Eppendorf 公司); 水平摇床 (江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司); 酶标仪 (美国 Thermo 公司); 细胞培养瓶、96 孔细胞培养板 (上海圣纳堡生物公司); 超低温冰箱 (美国 Thermo 公司); 纯水机 (美国密理博公司); 制冰机 (常熟雪科公司); 电热恒温鼓风干燥箱 (上海一恒科技有限公司); 台式离心机 (德国 Eppendorf 公司); 低温离心机 (美国 Thermo 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养<sup>[2-3]</sup>

2.1.1 细胞复苏 将人肺泡上皮细胞 A549 从 -80℃ 冰箱中取出, 迅速置于 37℃ 水浴锅, 一次性手套包裹轻轻摇晃使细胞冻存块快速充分溶化; 消毒冻存管管口四周后开启, 将溶解好的细胞悬液吸入 10mL 离心管中, 加入双倍体积的 10% 1640 完全培养基, 800r/min 低速离心 5min; 去除冻存液, PBS 洗涤细胞 1~2 遍; 10% 完全培养基重悬细胞, 将细胞悬液按照预先设定好的实验步骤接种到新的培养瓶中; 标记后入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 浓度的培养箱。

2.1.2 细胞培养与传代 细胞培养 24h, 在倒置显微镜下观察其生长状态, 待细胞长满约 80% 时进行细胞传代; 弃旧的培养基, PBS 洗涤一次细胞, 去除多余的培养基; 加入适量的 0.25% 的胰酶消化, 消化时间根据镜下观察的细胞形态 (变小变圆, 即将开始脱落) 来控制, 终止消化时加入完全培养基进行终止; 收集细胞至 15mL 离心管, 离心、洗涤细胞 1~2 次后制成单细胞悬液; 将单细胞悬液接种于新的培养瓶里; 标记细胞与实验者信息, 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中继续培养。

2.1.3 细胞冻存 取指数生长期 A549 细胞, 消化、离心, 弃上清, 制成  $1 \times 10^6$  个/mL 的单细胞悬液, 加入冻存液 1mL (RPMI1640: FBS: DMSO = 7: 2: 1); 放入细胞冻存管并标记、封口, 依次于 4℃ 冰箱放置 60 分钟, -20℃ 冰箱放置 120 分钟, 最后放入 -80℃ 冰箱保存。

2.2 造模及分组 根据 MTT 预实验结果及实验的

综合考虑, 选取红花黄色素 75μg/mL、50μg/mL 及 25μg/mL 的浓度梯度来进行实验, 选取地塞米松 2μg/mL, 该实验分为 6 组: 正常对照组、TGF-β1 诱导组 (TGF-β1 终浓度为 5ng/ml, 诱导 24h)、地塞米松组 (地塞米松 2μg/mL)、红花黄色素低、中、高 3 个浓度干预组 (红花黄色素高浓度组 75μg/mL + TGF-β1 5ng/mL、红花黄色素中浓度组红花黄色素 50μg/mL + TGF-β1 5ng/mL、红花黄色素低浓度组 25μg/mL + TGF-β1 5ng/mL)。先用 5ng/mL TGF-β1 刺激 A549 细胞 24h, 然后加入地塞米松及各浓度的红花黄色素; 正常对照组则为 10% 1640 完全培养基培养 A549 细胞。

2.3 细胞增殖检测 收集细胞取正处于对数生长期的细胞, 加胰酶消化, 离心后用 10% 的 1640 完全培养基制成含  $2.5 \times 10^4$  个/mL 的单细胞悬液。接种 96 孔板根据预实验结果选取的红花黄色素 3 个浓度, 每个计量组设 6 个复孔, 4 个时间点, 每个时间点设 3 个复板; 在 96 孔板上加入所制成的细胞悬液, 每孔 200μL, 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中培养 24h 待细胞贴壁; 吸弃培养液, 加入不同浓度的药物和正常对照组的完全培养基 200μL, 培养箱里继续培养; 分别于 12h、24h、48h 取出细胞培养板, 每孔加入 20μL MTT, 继续培养 4h; 弃上清, 加 150μL DMSO/孔, 摇床震动约 20min, 充分溶解沉淀; 酶联免疫检测仪测定, 设定波长为 490nm, 测出各组的吸光度 (OD 值), 实验重复 5 次<sup>[4-5]</sup>; 以各时间点为横坐标, 各组细胞相应的 OD 值为纵坐标, 绘制 A549 细胞的生长曲线图。

2.4 细胞形态检测 培养细胞, 设置正常对照组、TGF-β1 模型诱导组、地塞米松组和红花黄色素高、中、低浓度干预组, 倒置显微镜下观察并拍照细胞在不同的时间点的状态表现并拍照保存, 取生长 24h 的细胞图片 (放大 100 倍), 对比各组细胞的变化及不同。

## 3 结果

3.1 倒置显微镜观察结果 倒置相差显微镜下, 采用 TGF-β1 5ng/mL 干预 A549 细胞生长 24h 后, 细胞出现显著变化。正常的 A549 细胞多呈铺路石样上皮细胞形态及生长状态, TGF-β1 刺激后, 细胞形态变为纺锤形或梭形, 出现伪足样改变, 呈现拉长状态, 细胞之间间隙加大, 藤索样生长, 连接变得稀疏, 类似于成纤维细胞。红花黄色素干预后 A549 细胞形态逐

渐趋于正常。见图1。

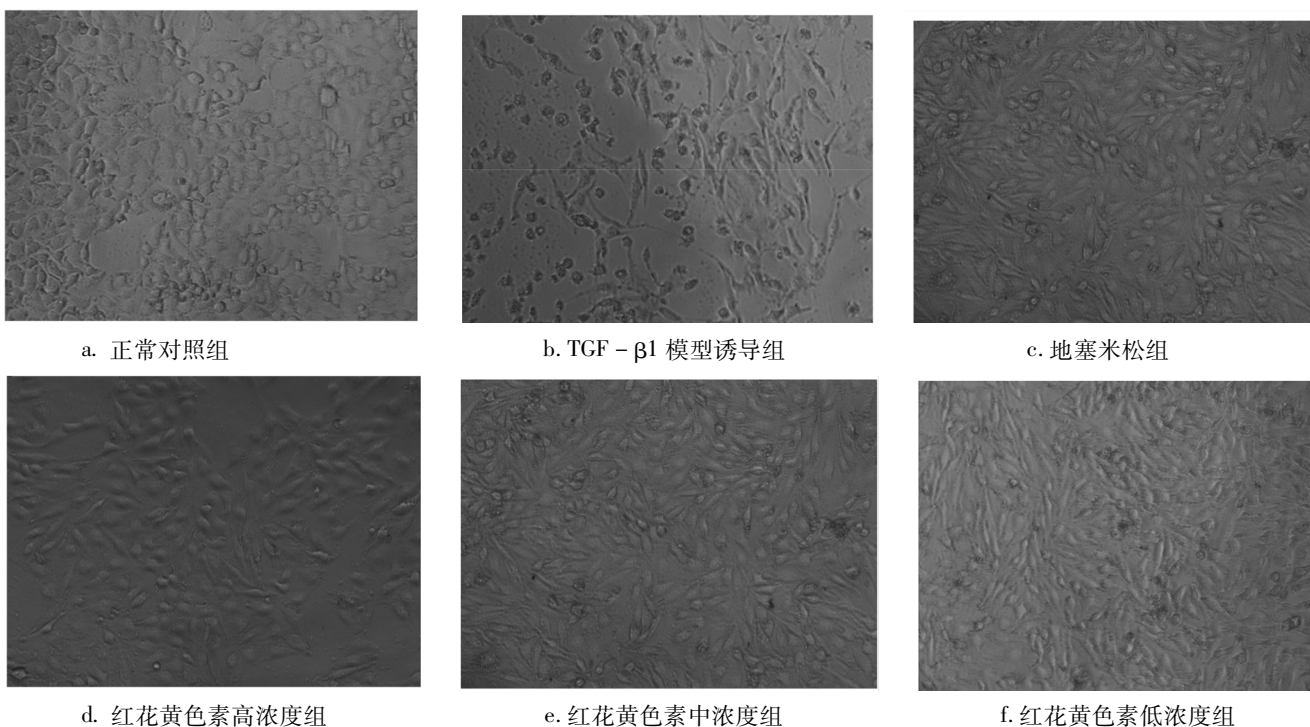


图1 倒置显微镜观察结果

3.2 MTT 检测结果 MTT 法中测得的实验各组的吸光值,计算出不同浓度的红花黄色素对细胞的增殖的作用。结果显示:TGF-β1 5ng/mL 诱导 A549 细胞,细胞的增殖活性略有增加,与正常对照组细胞比较,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );红花黄色素干预细胞后,在一定的药物剂量范围内,随药物剂量的增加,

细胞的增殖受到影响。各组间进行比较,12h、24h 及 48h 时,红花黄色素三个浓度组与正常对照组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );与 TGF-β1 诱导组比较,12h、24h 时红花黄色素三个浓度组均具有统计学意义( $P < 0.05$ ),48h 时仅低浓度组有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1、图2。

表1 红花黄色素对 A549 体外增殖的影响( $n = 5; \bar{x} \pm s$ ; 吸光值 A490nm)

组别	n	12h	24h	48h
正常对照组	5	0.904 ± 0.134 <sup>*</sup>	1.170 ± 0.017 <sup>*</sup>	1.328 ± 0.029 <sup>*</sup>
TGF-β1 诱导组	5	0.609 ± 0.067 <sup>#</sup>	0.737 ± 0.011 <sup>#</sup>	0.764 ± 0.027 <sup>#</sup>
地塞米松组	5	0.585 ± 0.032 <sup>#</sup>	0.645 ± 0.007 <sup>**</sup>	1.051 ± 0.052 <sup>**</sup>
红花黄色素 75μg/mL	5	0.682 ± 0.101 <sup>**</sup>	0.857 ± 0.013 <sup>**</sup>	0.751 ± 0.029 <sup>#</sup>
红花黄色素 50μg/mL	5	0.835 ± 0.032 <sup>**</sup>	0.892 ± 0.006 <sup>**</sup>	0.738 ± 0.009 <sup>#</sup>
红花黄色素 25μg/mL	5	0.816 ± 0.021 <sup>**</sup>	0.827 ± 0.014 <sup>**</sup>	0.669 ± 0.041 <sup>**</sup>

注:与正常对照组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与 TGF-β1 诱导组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。

红花黄色素对A549体外增殖的影响

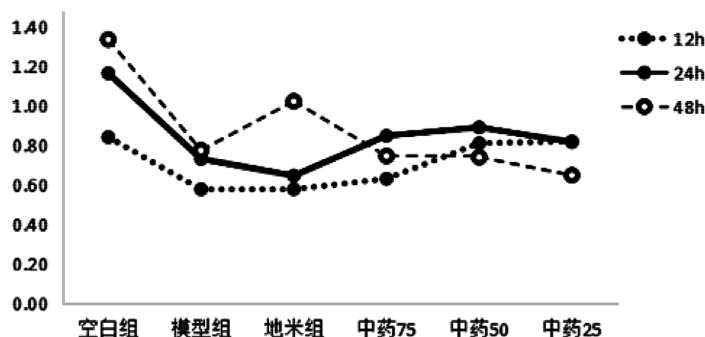


图2 红花黄色素对 A549 体外增殖的影响

#### 4 讨论

肺纤维化是一个不可逆的渐进性疾病,是多种肺部疾病的终末表现,目前缺乏有效的治疗手段和治疗药物。随着科学技术的不断发展与进步,肺纤维化发生机制的分子层次研究方兴未艾,单味或复方中药对不同通路的多靶点的协同治疗将成为中医药防治肺纤维化的新趋势<sup>[1]</sup>。

上皮间质转化是指有极性的上皮细胞失去其上皮特征并逐渐转化为具有迁徙和侵袭能力的间充质细胞的过程。在致病因素的长期作用下,肺泡上皮细胞的完整性和特征被打乱并重排,引起形态学或生理学上的改变,部分上皮细胞表型发生改变,发生上皮细胞-间质细胞转分化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)。EMT过程有多条信号通路参与,各条信号通路之间通过配体相互交联,使EMT过程在一定程度上维持稳态。

转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )是一种多效性的细胞因子,是目前肺纤维化的研究热点和重要的药物作用靶点。TGF- $\beta$ 可由淋巴细胞、单核细胞、上皮细胞和成纤维细胞等多种细胞产生,通过自分泌和旁分泌的方式调节细胞的增殖、分化、迁移、黏附,调节细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)的代谢,参与肺胚胎发育、组织损伤和修复。大量的实验研究表明,TGF- $\beta$ 在小鼠肺纤维化疾病的过程中起着关键的作用如调节胶原蛋白合成、成纤维细胞增生、细胞凋亡、以及成纤维细胞分化<sup>[6]</sup>。

研究<sup>[7]</sup>表明,其致纤维化作用不仅与下游Smad蛋白家族信号通路有关,还与丝裂原活化蛋白激酶家族ERK1/2信号通路密切相关,两者共同调控相应的靶分子转录。有研究显示,博来霉素(BLM)诱导大鼠

肺纤维化模型中肺组织各时间段ERK1、ERK2、磷酸化ERK1/2的表达明显高于同期对照组,说明信号蛋白ERK1/2在肺泡炎症和纤维化阶段均参与了BLM致肺纤维化的发病过程<sup>[8]</sup>。国内外研究表明,在博来霉素、二氧化硅、石棉和电离辐射致肺纤维化的人和动物模型中均有磷酸化的ERK(p-ERK)表达增加,再次证明ERK信号通路在一定程度上参与了纤维化病变的发生<sup>[9]</sup>。由此可见,ERK信号通路可能是TGF- $\beta$ 1对细胞调控作用中最为重要的通路之一。Davis等<sup>[10]</sup>与Mucsi等<sup>[11]</sup>均在各自研究中发现,给细胞转染显性失活的ERK,可抑制TGF- $\beta$ 1刺激的纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)和I型胶原(COL-1)增强子等的活性;而转染相应的野生型ERK质粒却引起胶原基因的表达增加。TGF- $\beta$ 介导的ERK通路是肺纤维化形成最为重要的通路之一。研究发现<sup>[12]</sup>,TGF- $\beta$ 受体I(T $\beta$ R I)主要介导TGF- $\beta$ 1的促纤维化作用,TGF- $\beta$ 受体II(T $\beta$ R II)则主要参与抑制细胞生长。组织纤溶酶原激活物抑制因子(PAI-1)是重要的ECM成分。活化后的丝裂原活化蛋白激酶(motogen-activated protein kinases, MAPKs)转位到细胞核,激活转录因子,调节相应效应基因而发挥作用。研究显示<sup>[13]</sup>,ERK磷酸化(p-ERK)蛋白水平明显上调,ERK蛋白表达水平无大变化,T $\beta$ R I可经Ras/ERK通路促进胶原合成,印证了ERK依赖的受体活化型Smad(R-Smad)接头域的磷酸化作用增强了I型胶原合成,提示ERK和Smads信号之间在胶原产生上存在着协同作用。

TGF- $\beta$ 诱导的EMT在肺纤维化的形成过程中扮演非常重要的角色,EMT的分子机制及逆转EMT的分子机制目前尚不是很明确,进一步研究影响上皮间质转化这一病理生理现象的调控因素及其在肺纤

维化中的作用及相关信号通路,是目前肺纤维化的靶向药物研究和治疗思路。

红花黄色素(Safflower Yellower)是菊科植物红花<sup>[14]</sup>的干燥花的主要生理活性成分,具有扩张周围血管、降低血压、抑制血小板聚集、增强纤维蛋白溶解、降低全血黏度等作用。红花活血通经,祛瘀止痛,在临床上主要用于治疗闭塞性脑血管疾病、冠心病、脉管炎。近年来,关于红花黄色素的抗纤维化作用引起了人们的关注,并进行了许多体内外实验<sup>[2]</sup>。研究<sup>[3]</sup>已发现:红花黄色素可缓解大鼠和小鼠急性肺部炎症损伤所致的水肿、淤血及炎症因子表达的升高,红花黄色素能缓解大鼠慢性阻塞性肺疾病发病过程中的炎症损伤;以红花黄色素为主要成分的红花注射液能缓解博来霉素诱导的大鼠肺纤维化以及红花黄色素可抑制 TGF-β1 诱导人肺泡上皮细胞 A549 活化。

本研究表明 TGF-β1 能刺激人肺泡上皮细胞向间质细胞发生转变,红花黄色素作用后 12h、24h 及 48h 三个浓度组与正常对照组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),A549 细胞形态逐渐趋向于正常。与 TGF-β1 诱导组比较,12h、24h 时红花黄色素三个浓度组均具有统计学意义( $P < 0.05$ ),而 48h 时仅低浓度组有统计学意义( $P < 0.05$ ),由此可见红花黄色素能抑制 TGF-β1 诱导的人肺泡上皮细胞 A549 发生向间质细胞转变的趋势。其调控因素及在肺纤维化中的作用机制及相关信号通路的研究,是我们下一步探索的方向。

### 参考文献

[1]郭迎科,李瑞琴,丁玉文.肺纤维化发病机制的细胞因子研究进展

[J]. 亚太传统医药杂志,2016,12(19):69-71.

[2]赛利斯.细胞和组织培养相关技术、病毒、抗体、免疫细胞化学-细胞生物学实验手册[M].北京:科学出版社,2008:42-182.

[3]兰容,周珍辉.动物细胞培养基本技术方法[M].北京:化学工业出版社,2010:14-95.

[4]刘建文.细胞培养技术在药理学研究中的应用[M].北京:化学工业出版社,2010:56-120.

[5]向丽,朱江,曾静.细菌药敏试验 MTT 法与常量稀释法比较性研究[J].泸州医学院学报,2006,29(1):45-46.

[6]董晓峰,赵静,王献华,等.转化生长因子 β1 相关基因在肺纤维化中的作用[J].现代预防医学,2012,39(6):1548.

[7]KamarajuAK,Roberts A B. Role of Rho/ROCK and p38MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo[J]. J Biol Chem, 2005,280(2):1024-36.

[8]徐芳,徐启勇,叶燕青. ERK 信号通路在肺纤维化大鼠中的研究[J].武汉大学学报(医学版),2005,26(3):322-5.

[9]赵明哲,刘靖华,李玉花,等. ERK 信号通路的信号转导调控机制[J].国际病理科学与临床杂志,2009,29(1):15-19.

[10]DavisB H,Chen A,Beno D A. Raf and mitogen-activated protein kinase regulate stellate cell collagen gene expression[J]. J Biol Chem,1996,271:11039-42.

[11]Mucsi I,SkoreckiK L,GoldbergH J. Extracellular signal-regulated kinase and the small GTP-binding protein, rac, contribute to the effects of transforming growth factor-beta1 on gene expression[J]. J Biol Chem,1996,271:16567-72.

[4]杨雅茹,黄艳,李俊. TGF-β1 介导的 Smads 与 ERK 通路在肺纤维化中的作用及相互关系[J].中国药理学通报,2010,26(5):561-563.

[13]TaoYY,Wang X L,LiuCH. Salivianolic acid-B effects on TGF-β1/ERK signaling transduction in NIH/3T3 fibroblast[J]. J Cap Med Univ, 2007,28(2):192-195.

[14]高学敏.中药学[M].北京:中国中医药出版社,2006.

(上接第 38 页)

[4]王士贞.中医耳鼻咽喉科学[M].北京:中国中医药出版社,2003:122-123.

[5]中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会,中华医学会耳鼻咽喉分会.变应性鼻炎的诊治原则和推荐方案(2004年,兰州)[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2005,40(3):166-167.

[6]Dhillon S, Wagstaff AJ. Ciclesonide nasal spray: in allergic rhinitis[J]. Drugs, 2008, 68: 349-351.

[7]李石良,刘乃刚,金银花.针刺蝶腭神经节治疗变应性鼻炎远期疗效观察[J].上海针灸杂志,2016,35(8):971-973.

[8]陈晟,王军,白鹏,等.针刺治疗中重度持续性过敏性鼻炎:随机对照研究[J].中国针灸,2015,35(12):1209-1213.

[9]胡蓉,唐森,刘怀,等.艾灸配合自血穴位注射治疗变应性鼻炎:随机对照研究[J].中国针灸,2016,36(8):815-819.

[10]修猛刚,王大芬.自血穴位注射脱敏疗法治疗慢性荨麻疹疗效观察[J].中国针灸,2011,31(7):610-612.

[11]邱茂良.中国针灸治疗学[M].南京:江苏科学技术出版社,2009:653.