

· 基础研究 ·

柴胡皂甙 d 对特发性肺纤维化肺泡上皮细胞
自噬作用机制研究尚璐璐¹ 张 军² 黄 彬¹ 丁慢玲¹ 吴 妍¹ 郑金旭¹

摘要 目的 研究柴胡皂甙 d (SSd) 对特发性肺纤维化 (IPF) 中 II 型肺泡上皮细胞 (AT- II) 自噬的调控作用及其对纤维化程度的干预作用。方法 转化生长因子 β_1 (TGF- β_1 , 5 ng/mL) 诱导 A549 细胞 48 h 建立肺纤维化细胞模型, 分别联合 SSd 低、中、高浓度 (2.5、5、10 μ g/mL)、雷帕霉素 (100 ng/mL) 处理细胞。CCK8 法检测各组细胞存活率, Western Blot 法检测 E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、I 型胶原蛋白 (Col- I)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、Beclin1、微管相关蛋白 1 轻链 3B- II (LC3B- II) /LC3B- I、p62、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路活化蛋白表达水平, 单丹磺酰尸胺 (MDC) 染色法检测细胞内自噬泡形成。结果 与正常组比较, 模型组细胞存活率下降 ($P<0.05$), E-cadherin、Beclin1、LC3B- II /LC3B- I 蛋白表达水平亦降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), Col- I、 α -SMA、p62、mTOR 通路活化蛋白表达水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), 胞质内荧光标记的自噬泡较少。与模型组比较, SSd 高浓度组细胞存活率升高 ($P<0.05$), SSd 组及雷帕霉素组 E-cadherin、Beclin1、LC3B- II /LC3B- I 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), Col- I、 α -SMA、p62 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), SSd 高浓度组及雷帕霉素组 p-mTOR/mTOR、p-AKT1/AKT1、p-S6K1/S6K1 表达水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), SSd 高浓度组及雷帕霉素组细胞质内荧光标记的自噬泡增多。与 SSd 低、中低浓度组比较, SSd 高浓度组及雷帕霉素组 E-cadherin、LC3B- II /LC3B- I 表达水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), Col- I、 α -SMA、p62 表达水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 SSd 可改善 TGF- β_1 诱导的 AT II 纤维化改变, 可能通过抑制 mTOR 通路激活诱导细胞自噬发挥作用。

关键词 特发性肺纤维化; 柴胡皂甙 d; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; 巨自噬

Mechanism of Saikosaponin d on Autophagy of Alveolar Epithelial Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis SHANG Lu-lu¹, ZHANG Jun², HUANG Bin¹, DING Man-ling¹, WU Yan¹, and ZHENG Jin-xu¹
1 Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Jiangsu (212001); 2 Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Affiliated Aoyang Hospital of Jiangsu University, Jiangsu (215600)

ABSTRACT Objective To study the regulatory effect of Saikosaponin d (SSd) on autophagy of type II alveolar epithelial cells (AT- II) in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), and to explore its intervention of the severity of fibrosis. **Methods** A cell model of pulmonary fibrosis was built with A549 cells induced by transforming growth factor β_1 (TGF- β_1 , 5 ng/mL) for 48 h. Combined treatments with SSd of different concentrations (2.5, 5, and 10 μ g/mL) and rapamycin (100 ng/mL) were given to the cells respectively. The cell viability in different groups were determined by CCK8. The expression level of E-cadherin, Col- I, α -SMA, Beclin1, microtubule associated protein 1 light chain 3B- II (LC3B- II) /LC3B- I, p62 and activated protein in mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway were detected by Western Blot. The formation of autophagic vacuoles in cell was detected by monodansylcadaverine. **Results** Compared with the normal group, the cell viability decreased ($P<0.05$), the protein expression levels of E-cadherin, Beclin1 and LC3B- II /LC3B- I

基金项目: 镇江市重大 (社会发展) 项目 (No. SH2018048); 苏州市社会发展 (民生医疗) 项目 (No. SYSD2020010)

作者单位: 1. 江苏大学附属医院呼吸与危重症医学科 (江苏 212001); 2. 江苏大学附属澳洋医院呼吸与危重症医学科 (江苏 215600)

通讯作者: 郑金旭, Tel: 0511-85026593, E-mail: Jxuzh135@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20220217.037

decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the expression levels of Col- I, α -SMA, p62 and active protein in mTOR pathway increased in the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and fewer fluorescein-labelled autophagic vacuoles in cytoplasm. Compared with the model group, the cell viability increased in high concentration SSd group ($P < 0.05$). The expression of E-cadherin, Beclin1 and LC3B-II/LC3B-I protein increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the expression of Col- I, α -SMA and p62 protein decreased in SSd groups and rapamycin group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expression of p-mTOR/mTOR, p-AKT1/AKT1, p-S6K1/S6K1 decreased in high concentration SSd group and rapamycin group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). There were more fluorescently labeled autophagic vesicles in the cytoplasm of high concentration SSd group and rapamycin group. Compared with low and media concentration SSd group, the expression of E-cadherin, LC3B-II/LC3B-I increased in the high concentration SSd group and rapamycin group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the expression of Col- I, α -SMA, p62 decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** SSd could improve TGF- β_1 -induced fibrotic changes of AT- II, which might be induced cell autophagy through inhibition of the activation of mTOR pathway.

KEYWORDS idiopathic pulmonary fibrosis; Saikosaponin d; mammalian target of rapamycin; macroautophagy

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种病因不明的慢性、进行性纤维化肺疾病, 确诊后中位生存期为 2~5 年^[1]。目前认为 IPF 发病的核心机制为 II 型肺泡上皮细胞 (alveolar epithelial type II cells, AT- II) 持续受损及异常修复, 发生上皮间充质转化 (epithelial to mesenchymal transition, EMT) 改变, 获得纤维化表型, 在促纤维化因子及肌成纤维细胞等多种因素下共同作用下促进 IPF 发生发展^[2, 3]。在 IPF 肺纤维灶中的 AT- II 及成纤维细胞中均发现自噬水平下降^[4], 这可能促使肺成纤维细胞和上皮细胞衰老以及成肌纤维细胞分化^[5]。mTOR 通路抑制剂雷帕霉素干预能够诱导自噬并减轻肺纤维化程度^[6]。目前仅有吡非尼酮、尼达尼布两种药物被批准用于治疗 IPF, 但它们只能延缓肺功能下降并不能逆转肺纤维化^[7]。戚建华等^[8]研究发现柴胡渗湿汤可明显缓解 IPF 患者的咳嗽、憋喘等症状。柴胡皂甙 d (Saikosaponin d, SSd) 是从柴胡中提取的活性最强的单体^[9]。本课题组既往的研究发现 SSd 具有抗肺纤维化的作用^[10, 11]。近年来发现 SSd 在肝癌和骨关节炎中可通过诱导细胞自噬发挥保护作用, 且能够抑制 mTOR 活化^[12, 13], 但 SSd 对肺纤维灶中的 AT- II 细胞自噬调节作用尚未有研究。A549 细胞具有 AT- II 细胞的形态和特征^[14], 使用重组人转化生长因子 β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF- β_1) 诱导 A549 是目前常用的体外构建肺纤维化细胞模型的方法, 5 ng/mL TGF- β_1 作用于 A549 细胞 48 h 足以诱导 A549 细胞发生 EMT 改变^[15]。本实验通过 TGF- β_1 刺激肺泡上皮细胞 (A549), 在体外构建肺纤维化模型, 研究 SSd 能否通过调控 mTOR 通路诱

导自噬以及其对肺纤维化的干预。

材料与方法

1 细胞 A549 细胞 (批号: KG007) 购于江苏凯基生物技术有限公司, 培养于含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中 24 h, 待细胞贴壁后予以干预。

2 药物 SSd (货号: SS8010, 纯度: HPLC $\geq$ 98%) 购自北京索莱宝科技有限公司。

3 主要试剂及仪器 二甲基亚砜 (批号: RNBH8338)、0.25% 胰蛋白酶 (货号: T4049) 购自美国 Sigma 公司。TGF- β_1 购自派普泰克生物科技 (苏州) 有限公司 (批号: 0817354)。DMEM 培养基 (批号: 8120427)、胎牛血清 (批号: 42F1376K) 购自美国 Gibco 公司。RIPA 裂解液 (货号: P0013B)、青霉素链霉素溶液 (货号: C0222)、BCA 蛋白定量试剂盒 (货号: P0010) 购自碧云天生物技术有限公司。E-cadherin (货号: 3195)、 α -肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA, 货号: 19245)、Beclin1 (货号: 3495)、微管相关蛋白轻链 3B (microtubule-associated protein light chain 3B, LC3B, 货号: 2868)、p62/SQSTM1 (货号: D8D6T)、蛋白激酶 B1 (Protein kinase B1, AKT1, 货号: 76839)、p-AKT1 (货号: 9031)、mTOR (货号: 2983)、p-mTOR (货号: 5586)、S6 激酶 1 (p70S6 kinase1, S6K1, 货号: 97596)、p-S6K1 (货号: 2708) 兔抗人一抗及 HRP 标记的羊抗兔二抗 (货号: 7074) 购于美国 CST 公司。I 型胶原蛋白 (collagen type I, Col- I, 货号: 14695-1-AP)、GAPDH 兔抗

人一抗(货号: 10494-1-AP)购自苏州 proteintech 公司。单丹磺酰尸胺(Monodansylcadaverin, MDC)染色试剂盒(货号: G0170, 索莱宝生物科技有限公司), CCK8 试剂盒(货号: CK04, 日本同仁化工)。全波长酶标自动分析仪(美国 Bio-Rad 公司)、蛋白电泳仪及转膜仪器(美国 Bio-Rad 公司)、全自动化学发光成像分析系统(上海天能科技有限公司)、倒置显微镜(日本 Olympus 公司)、荧光正置显微镜(荷兰 PHILIPS 公司)。

4 细胞分组及干预方法 细胞分为正常组、模型组、SSd 低浓度组、SSd 中浓度组、SSd 高浓度组、雷帕霉素组。取对数生长期状态良好的 A549 细胞消化、离心, 接种至培养皿, 常规培养 24 h, 待细胞贴壁后更换无血清培养基培养 24 h。分组处理: 正常组更换新鲜培养液、模型组予 5 ng/mL TGF- β_1 处理、SSd 低浓度组予 5 ng/mL TGF- β_1 联合 2.5 μ g/mL SSd 处理、SSd 中浓度组予 5 ng/mL TGF- β_1 联合 5 μ g/mL SSd 处理、SSd 高浓度组予 5 ng/mL TGF- β_1 联合 10 μ g/mL SSd 处理^[16]、雷帕霉素组予 5 ng/mL TGF- β_1 联合 100 ng/mL 雷帕霉素处理, 继续培养 48 h。

5 检测指标及方法

5.1 CCK8 法检测 SSd 对模型组细胞存活率的影响 取对数生长期状态良好的 A549 细胞消化、离心, 以 5×10^3 个/mL 接种于 96 孔板, 每组 5 个复孔, 按正常、模型、SSd 低、中、高浓度组分组干预后吸出培养基, 每孔加入含 10 μ L CCK8 溶液的培养基, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1~4 h, 酶标仪测定 450 nm 波长吸光度, 计算细胞存活率, 实验独立重复 3 次。

5.2 Western Blot 法检测 E-cadherin、 α -SMA、Col-I、Beclin1、LC3B、p62/SQSTM1、AKT1、p-AKT1、mTOR、p-mTOR、S6K1、p-S6K1 蛋白表达水平 按 4 造模及干预分组处理细胞后, RIPA 裂解液混合液提取各组细胞总蛋白, BCA 法蛋白定量, 按照 1:4 向上清液中加入 5 $\times$ 上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 加热 10 min 变性。每孔取 20 μ g 蛋白, SDS-PAGE 垂直分离, 湿转法转膜, 5% BSA 室温封闭 1 h, 与一抗 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜, TBST 溶液洗膜 3 次, 5 min/次, 以 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1:2 000) 室温孵育 1 h, TBST 溶液洗膜 3 次, 5 min/次。滴加 ECL 发光液后于凝胶成像仪进行曝光拍照。Image J 软件测定条带吸光度, 以 GAPDH 为内参照, 计算相对含量, 实验独立重复 3 次。通过检测自噬及纤维化相关蛋白发现仅 SSd 高浓度组与雷帕霉素组作用差异无统计

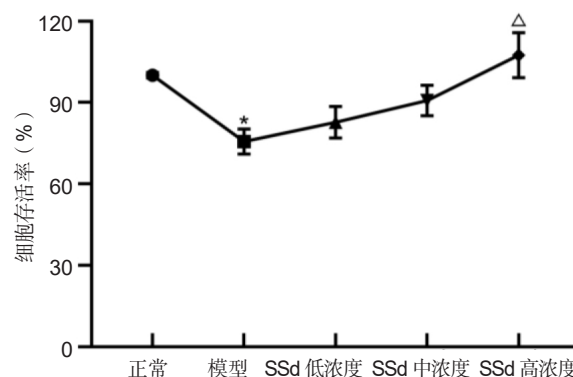
学意义 ($P>0.05$), 遂后续 mTOR 通路相关实验只选取了 SSd 高浓度组作为实验组进行实验。

5.3 MDC 染色法检测自噬小体形成 取正常、模型、SSd 高浓度、雷帕霉素组, 按分组处理细胞, 制备细胞爬片, 用 1 $\times$ Wash buffer 清洗 3 次, MDC 试剂染色 40 min, 1 $\times$ Wash buffer 清洗 3 次, 在载玻片滴 10 μ L 抗荧光淬灭剂, 将爬片盖于在玻片上, 荧光显微镜下观察并拍照。

6 统计学方法 应用 SPSS 20.0 统计软件和 Graphpad prism 8.0 进行数据统计分析与制图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间两两比较采用 LSD-t 检验, 多组比较采用单因素方差分析法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组细胞存活率比较(图 1) 以 5 ng/mL TGF- β_1 刺激 A549 细胞后, 细胞存活率下降 ($P<0.05$), 予 SSd 联合 TGF- β_1 处理细胞后, 细胞存活率上升, SSd 高浓度组作用与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。



注: 与正常组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, ^ $P<0.05$

图 1 各组细胞存活率比较

2 各组 E-cadherin、Col-I、 α -SMA、LC3B、Beclin1、p62、蛋白表达比较(表 1, 图 2、3) 与正常组比较, 模型组 E-cadherin、Beclin1、LC3B-II/LC3B-I 表达水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), Col-I、 α -SMA、p62 表达水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较, SSd 低、中、高浓度组及雷帕霉素组 E-cadherin、Beclin1、LC3B-II/LC3B-I 表达水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), Col-I、 α -SMA、p62 表达水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与 SSd 低浓度组比较, SSd 高浓度组、雷帕霉素组 E-cadherin、LC3B-II/LC3B-I 表达水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), SSd 高浓度组 Col-I、 α -SMA 表达水平降低 ($P<0.05$), 雷

表 1 各组 E-cadherin、Col- I、 α -SMA、LC3B- II /LC3B- I、Beclin1、p62 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	E-cadherin	Col- I	α -SMA	LC3B- II /LC3B- I	Beclin1	p62
正常	3	0.97 ± 0.07	0.61 ± 0.05	0.40 ± 0.04	0.92 ± 0.05	1.04 ± 0.04	0.72 ± 0.03
模型	3	0.44 ± 0.02*	0.86 ± 0.03*	0.92 ± 0.07**	0.12 ± 0.01**	0.67 ± 0.03**	0.99 ± 0.06*
SSd 低浓度	3	0.70 ± 0.04 $\Delta\Delta$	0.56 ± 0.04 $\Delta\Delta$	0.62 ± 0.07 Δ	0.14 ± 0.02	1.00 ± 0.06 Δ	0.86 ± 0.02
SSd 中浓度	3	0.85 ± 0.05 $\Delta\Delta$	0.54 ± 0.02 $\Delta\Delta$	0.52 ± 0.04 Δ	0.66 ± 0.06 $\Delta\Delta$	1.10 ± 1.04 $\Delta\Delta$	0.80 ± 0.04
SSd 高浓度	3	1.03 ± 0.03 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.42 ± 0.01 $\Delta\Delta\Delta$	0.38 ± 0.02 $\Delta\Delta$	0.84 ± 0.09 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	1.13 ± 0.03 $\Delta\Delta$	0.70 ± 0.05 Δ
雷帕霉素	3	0.95 ± 0.05 $\Delta\Delta\Delta$	0.41 ± 0.06 $\Delta\Delta$	0.30 ± 0.03 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.92 ± 0.06 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	1.01 ± 0.02 $\Delta\Delta$	0.63 ± 0.03 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$;与 SSd 低浓度组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$;与 SSd 中浓度组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$

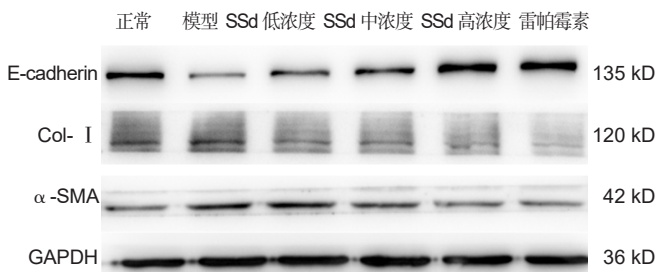
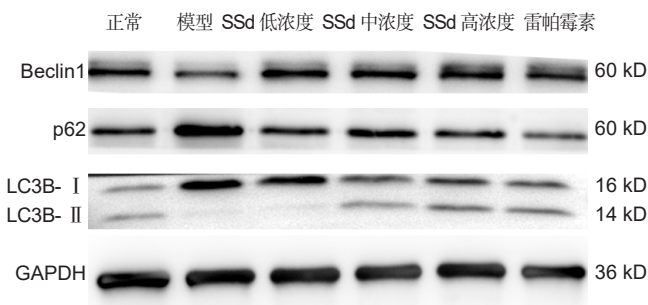
图 2 各组 E-cadherin、Col- I、 α -SMA 蛋白表达电泳图

图 3 各组 LC3B、Beclin1、p62 蛋白表达电泳图

帕霉素组 α -SMA、p62 表达水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与 SSd 中浓度组比较, SSd 高浓度组 E-cadherin 表达水平升高 ($P<0.05$), 雷帕霉素组 LC3B- II /LC3B- I 表达水平较高 ($P<0.01$), α -SMA、p62 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$)。SSd 高浓度组与雷帕霉素组 E-cadherin、Col- I、 α -SMA、LC3B、Beclin1、p62 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 各组 AKT1、p-AKT1、mTOR、p-mTOR、S6K1、p-S6K1 蛋白表达 (表 2, 图 4) 与正常组比较, 模型组 p-mTOR/mTOR、p-AKT1/AKT1、p-S6K1/S6K1 升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较, SSd 高浓度组及雷帕霉素组 p-mTOR/mTOR、p-AKT1/AKT1、p-S6K1/S6K1 降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与雷帕霉素组比较, SSd 高浓度组 p-mTOR/mTOR、p-S6K1/S6K1 升高 ($P<0.01$), p-AKT1/AKT1 两组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 各组细胞内自噬体形成 (图 5) 模型组细胞胞浆中 MDC 标记的囊泡数量和荧光强度均明显

表 2 各组 p-mTOR/mTOR、p-AKT1/AKT1、p-S6K1/S6K1 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p-mTOR/mTOR	p-AKT1/AKT1	p-S6K1/S6K1
正常	3	0.75 ± 0.10	0.78 ± 0.07	0.50 ± 0.03
模型	3	1.11 ± 0.16*	1.08 ± 0.06*	0.90 ± 0.07**
SSd 高浓度	3	0.45 ± 0.08 $\Delta\Delta\Delta$	0.84 ± 0.04 Δ	0.68 ± 0.05 $\Delta\Delta\Delta$
雷帕霉素	3	0.06 ± 0.01 $\Delta\Delta$	0.66 ± 0.07 $\Delta\Delta$	0.18 ± 0.03 $\Delta\Delta$

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$;与雷帕霉素组比较, Δ $P<0.01$

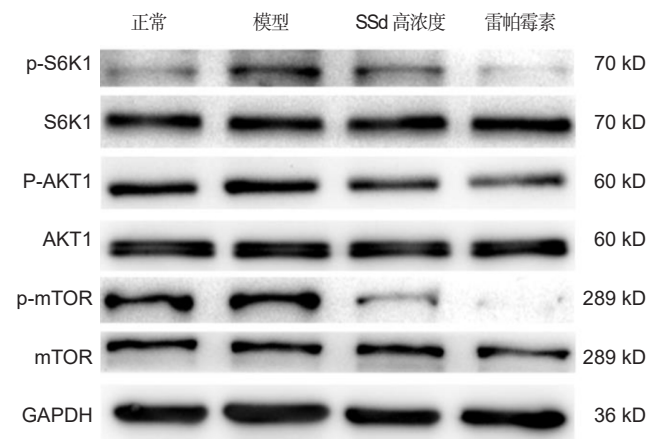
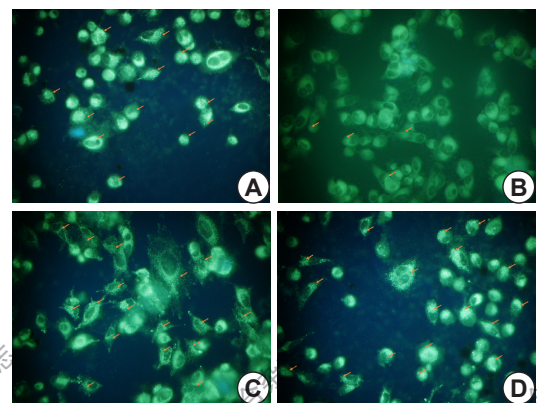


图 4 各组 p-mTOR/mTOR、p-AKT1/AKT1、p-S6K1/S6K1 蛋白表达电泳图



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为 SSd 高浓度组; D 为雷帕霉素组; 箭头所指为自噬囊泡荧光颗粒

图 5 各组细胞中自噬囊泡的形成 (MDC, $\times 400$)

低于正常组,反映了 TGF- β_1 对 A549 细胞自噬体形成具有抑制作用,与模型组比较,SSd 高浓度组及雷帕霉素组 MDC 标记的囊泡数量和荧光强度明显增强。

讨 论

IPF 发生的核心机制是远端肺组织的慢性损伤导致 AT-Ⅱ 细胞功能的丧失或改变,失去了对肺泡的修复作用,促进成纤维细胞的失调修复和致病激活^[17, 18]。TGF- β_1 被认为是最重要的促纤维化因子,能够诱导 AT-Ⅱ 发生 EMT 获得纤维化表型^[19],亦具有诱导 AT-Ⅱ 凋亡的能力, TGF- β_1 的过度表达导致 AT-Ⅱ 凋亡和小鼠肺纤维化^[20]。在人 IPF 肺组织病理中亦发现 AT-Ⅱ 凋亡增加^[21]。与此一致,本实验观察到 TGF- β_1 刺激 A549 细胞 24 h 后细胞存活率下降,并且 Col-Ⅰ、 α -SMA 表达水平上升, E-cadherin 上皮化指标下降。使用 SSd 干预后可拮抗 TGF- β_1 的致纤维化作用、促进正常肺泡上皮细胞的生长。

细胞凋亡与自噬的调控密切相关,自噬是一种保守的溶酶体降解途径,在应激下,自噬通过清除受损分子和动员细胞内储存的能量和营养来促进生存^[22]。在 IPF 肺组织中分离出的 AT-Ⅱ 中观察到自噬体形成被抑制^[23]。Sosulski ML 等^[24]发现肺纤维化中 TGF- β_1 具有抑制细胞自噬的作用。本研究 CCK8 实验发现 TGF- β_1 作用于 A549 细胞后,细胞存活率下降,予 SSd 干预后可相对促进细胞增殖。结合本实验结果,考虑 IPF 中 AT-Ⅱ 凋亡与自噬过程被抑制导致细胞不能正常自我修复以及获得纤维化表型后增殖能力降低有关。LC3 是参与形成自噬体膜的泛素样蛋白,具有 LC3A、LC3B 和 LC3C 三种形式,其中 LC3B 与自噬体的发育和成熟有关。LC3B-I 是 LC3B 蛋白的胞质形式,与磷脂酰乙醇胺发生泛素样结合,形成 LC3B-II,在自噬体的整个生命周期中定位于自噬体膜上,可以作为自噬体形成的标志, LC3B-II/LC3B-I 比率增加被认为是自噬流的标志^[25], p62 蛋白连接 LC3B 和泛素,随着自噬体进入溶酶体被降解^[26]。本研究发现模型组与正常比较 LC3B-II/LC3B-I 比率下降, Beclin1 表达减少, p62 表达增多,胞质中自噬体形成减少,提示肺纤维化中自噬流受到限制,中、高浓度 SSd 干预后可明显提高自噬流,高浓度 SSd 作用下自噬体形成增多,并且促进细胞增殖,对细胞具有保护作用。SSd 可能是通过提高细胞自噬水平,改善 AT-Ⅱ 凋亡及抑制其活化发生 EMT 改变。

为进一步研究 SSd 调控细胞自噬的机制,本实验选取自噬经典通路 mTOR 进行检测。mTOR 是 PI3K 相关激酶家族中的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,形成两种 mTOR 复合物, mTORC1 和 mTORC2^[27]。其中 mTORC1 调节细胞生长代谢,对雷帕霉素敏感,肺纤维化中主要激活 mTORC1 下调自噬水平,雷帕霉素可以减轻 mTORC1 活化引起的自噬抑制,从而减轻肺纤维化程度^[28]。mTORC1 活化后磷酸化 S6K1,促进蛋白质翻译、合成, S6K1 还可以磷酸化 mTORC2 成分 mSIN1 上 T86 和 T398 位点,从而抑制 mTORC2 介导 AKT 激活^[29]。本研究 TGF- β_1 刺激 A549 细胞后, p-mTOR、p-AKT1、p-S6K1 蛋白相对表达水平升高,提示肺纤维化中 mTOR 通路活化,予高浓度 SSd 及雷帕霉素干预后 p-mTOR、p-AKT1、p-S6K1 蛋白相对表达水平下降。可见 SSd 对 mTOR 通路关键蛋白的活化具有明显的抑制作用,但 SSd 的抑制作用弱于 mTOR 抑制剂。

本研究发现 SSd 通过抑制 mTOR 通路活化缓解 TGF- β_1 对 AT-Ⅱ 细胞自噬的抑制作用,从而减轻肺纤维化改变。本研究为临床治疗 IPF 提供可选择的新靶点及药物,为中医药精准治疗 IPF 提供了一定的实验证据。但 IPF 的发生发展是一个复杂的生物过程,涉及多种细胞及生物活性物质,可进一步完善体内实验研究 SSd 对 IPF 各细胞自噬活性的调控作用。

利益冲突:本研究不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Richeldi L, Collard HR, Jones MG. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Lancet, 2017, 389 (10082): 1941-1952.
- [2] Katzen J, Beers MF. Contributions of alveolar epithelial cell quality control to pulmonary fibrosis[J]. J Clin Invest, 2020, 130 (10): 5088-5099.
- [3] O'Dwyer DN, Ashley SL, Moore BB. Influences of innate immunity, autophagy, and fibroblast activation in the pathogenesis of lung fibrosis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2016, 311 (3): L590-601.
- [4] Racanelli AC, Kikkers SA, Choi AMK, et al. Autophagy and inflammation in chronic respiratory disease[J]. Autophagy, 2018, 14 (2): 221-232.
- [5] Araya J, Kojima J, Takasaka N, et al. Insufficient autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Am J

- Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013, 304 (1): L56-69.
- [6] Gui X, Chen H, Cai H, et al. Leptin promotes pulmonary fibrosis development by inhibiting autophagy via PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 498 (3): 660-666.
- [7] Torrisi SE, Kahn N, Vancheri C, et al. Evolution and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Presse Med, 2020, 49 (2): 104025.
- [8] 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.
- [9] 杨军, 李承晏. 柴胡皂甙 d 的药理毒理作用及药代学研究进展[J]. 湖北医药学院学报, 2018, 37 (2): 194-198.
- [10] 孙金玲, 郑金旭, 史小东, 等. 柴胡皂甙 D 通过调控 TGF- β_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.
- [11] 郑金旭, 卢坤琴, 夏德刚, 等. 柴胡皂甙 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.
- [12] Jiang J, Meng Y, Hu S, et al. Saikosaponin D: a potential therapeutic drug for osteoarthritis[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2020, 14 (8): 1175-1184.
- [13] Tian YD, Lin S, Yang PT, et al. Saikosaponin-d increases the radiosensitivity of hepatoma cells by adjusting cell autophagy[J]. J Cancer, 2019, 10 (20): 4947-4953.
- [14] Bélanger MM, Gaudreau M, Roussel E, et al. Role of caveolin-1 in etoposide resistance development in A549 lung cancer cells [J]. Cancer Biol Ther, 2004, 3 (10): 954-959.
- [15] Kasai H, Allen JT, Mason RM, et al. TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT) [J]. Resp Res, 2005, 6 (1): 56.
- [16] 周航. 柴胡皂甙 D 对肺腺癌 A549 细胞凋亡的研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2008.
- [17] Epa AP, Thatcher TH, Pollock SJ, et al. Normal human lung epithelial cells inhibit transforming growth factor- β induced myofibroblast differentiation via prostaglandin E₂[J]. PLoS One, 2015, 10 (8): e0135266.
- [18] Parimon T, Yao C, Stripp BR, et al. Alveolar epithelial type II cells as drivers of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21 (7): 2269.
- [19] Goldmann T, Zissel G, Watz H, et al. Human alveolar epithelial cells type II are capable of TGF β -dependent epithelial-mesenchymal-transition and collagen-synthesis[J]. Resp Res, 2018, 19(1): 138.
- [20] Sauler M, Bazan IS, Lee PJ. Cell death in the lung: the apoptosis-necroptosis axis [J]. Annu Rev Physiol, 2019, 81 (1): 375-402.
- [21] Barbas-Filho JV, Ferreira MA, Sesso A, et al. Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IFP) / usual interstitial pneumonia (UIP) [J]. J Clin Pathol, 2001, 54 (2): 132-138.
- [22] Leidal AM, Levine B, Debnath J. Autophagy and the cell biology of age-related disease[J]. Nat Cell Biol, 2018, 20 (12): 1338-1348.
- [23] Patel AS, Lin L, Geyer A, et al. Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. PLoS One, 2012, 7 (7): e41394.
- [24] Sosulski ML, Gongora R, Danchuk S, et al. Deregulation of selective autophagy during aging and pulmonary fibrosis: the role of TGF β_1 [J]. Aging Cell, 2015, 14 (5): 774-783.
- [25] Schaaf MB, Keulers TG, Vooijs MA, et al. LC3/ GABARAP family proteins: autophagy- (un) related functions[J]. Faseb J, 2016, 30 (12): 3961-3978.
- [26] Liu WJ, Ye L, Huang WF, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation[J]. Cell Mol Biol Lett, 2016, 21 (1): 1-14.
- [27] Lawrence J, Nho R. The role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in pulmonary fibrosis[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19 (3): 778.
- [28] Romero Y, Bueno M, Ramirez R, et al. mTORC1 activation decreases autophagy in aging and idiopathic pulmonary fibrosis and contributes to apoptosis resistance in IPF fibroblasts [J]. Aging Cell, 2016, 15 (6): 1103-1112.
- [29] Popova NV, Jücker M. The role of mTOR signaling as a therapeutic target in cancer[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22 (4): 1743.

(收稿: 2021-04-26 在线: 2022-08-01)

责任编辑: 白霞