

吡非尼酮抑制转化生长因子 β 1诱导肺成纤维细胞胶原合成的实验研究

枣庄矿业集团中心医院 周俊平* 陈德文 郑艳 黄贞,枣庄 277100

摘要 目的:探讨吡非尼酮对转化生长因子 β 1(TGF- β 1)诱导的肺成纤维细胞胶原合成的影响及机制。方法:以人胚胎肺成纤维MRC-5细胞为研究对象,用p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)信号抑制剂SB203580和吡非尼酮处理TGF- β 1诱导的肺成纤维细胞,MTT检测细胞增殖,Western blot检测细胞中Ⅲ型胶原酶(ColⅢ)、I型胶原酶(ColⅠ)蛋白表达和p38MAPK磷酸化水平。结果:TGF- β 1诱导处理后的肺成纤维细胞增殖能力升高,细胞中ColⅢ、ColⅠ和p38MAPK磷酸化水平升高。吡非尼酮处理可以降低TGF- β 1诱导的肺成纤维细胞增殖能力,减少细胞中ColⅢ、ColⅠ和p38MAPK磷酸化蛋白表达。p38MAPK信号抑制剂SB203580处理具有协同吡非尼酮降低TGF- β 1诱导的肺成纤维细胞增殖和表达蛋白ColⅢ、ColⅠ及p38MAPK磷酸化水平的作用。结论:吡非尼酮通过抑制p38MAPK信号,从而抑制TGF- β 1诱导的肺成纤维细胞胶原合成。

关键词 吡非尼酮;肺成纤维细胞;p38MAPK;胶原;TGF- β 1

中图分类号 R563.1⁺³ **文献标识码** A **DOI** 10.11768/nkjwzzzz20190517

Inhibitory effect of pifendone on collagen synthesis in lung fibroblasts induced by TGF- β 1 ZHOU Jun-ping*, CHEN De-wen, ZHENG Yan, HUANG Zhen. Zaozhuang Mining Group Central Hospital, Zaozhuang 277100, China

Abstract Objective: To investigate the effect of pifendone on collagen synthesis induced by TGF- β 1 in lung fibroblasts and its mechanism. Methods: Human embryonic lung fibroblast MRC-5 cells were used as objects of study. TGF- β 1 induced collagen synthesis in lung fibroblasts. The cells were treated with pifendone, cell proliferation was measured by MTT, Western blotting was used to detect the expression of Col III and Col I protein, and the level of p38MAPK phosphorylation in cells. The p38MAPK signal inhibitor SB203580 and pifendone were used to treat TGF- β 1-induced lung fibroblasts. MTT was used to detect cell proliferation, Western blotting was used to detect the expression of Col III and Col I protein, and the level of p38MAPK phosphorylation in cells. Results TGF- β 1 induced increased proliferation of lung fibroblasts after treatment, and the phosphorylation level of Col III, Col I and p38MAPK increased in cells. Pifendone treatment could reduce the proliferation of lung fibroblasts induced by TGF- β 1, and inhibit the expression of Col III, Col I and p38MAPK phosphorylation proteins in cells. The treatment of SB203580 could cooperate with pifendone to reduce the proliferation of lung fibroblasts induced by TGF- β 1 and the phosphorylation levels of Col III, Col I and p38 MAPK. Conclusion: Pifendone inhibits TGF- β 1-induced collagen synthesis in lung fibroblasts by inhibiting the p38MAPK signaling.

Key words Pifendone; Lung fibroblasts; p38MAPK; Collagen; TGF- β 1

肺纤维化是一种常见的肺间质疾病,其以弥漫性肺泡炎为主要病理特征,在肺纤维化发生的后期,成纤维细胞恶性增殖,导致细胞外基质积聚,从而引起肺组织过度修复和异常重塑^[1]。转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)是重要的促纤维化因子,其在肺组织纤维化时含量升高,TGF- β 1可以促进肺成纤维细胞合成胶原,促进肺组织中胶原沉积^[2]。吡非尼酮化学名为5-甲基-1苯基-2-吡啶酮,是一种新发现的抗纤维化药物^[3]。吡非尼酮对于博来霉素诱导的小鼠肺纤维化和肝纤维化等具有治疗作用^[4,5]。体外实验表明,吡非尼

酮对于TGF- β 1诱导的心肌细胞胶原合成具有抑制作用,吡非尼酮还能抑制TGF- β 1诱导的肺成纤维细胞骨架重排^[6,7]。p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinases, p38MAPK)在肺纤维化成纤维细胞中过度激活,诱导肺纤维化发生^[8,9]。本文探讨吡非尼酮对TGF- β 1诱导的肺成纤维细胞胶原合成的影响及机制,为提高吡非尼酮抗纤维化治疗效果提供参考。

材料与方法

材料 人胚胎肺成纤维MRC-5细胞购自上海通蔚实业有限公司;Ⅲ型胶原酶(collagen type III, ColⅢ)抗体、I型胶原酶(collagen type I, ColⅠ)抗

*通信作者:周俊平,E-mail:2738920058@qq.com

体购自加拿大 PL laboratories；吡非尼酮、TGF-β1 购自美国 Sigma 公司；p38MAPK 磷酸化(p-p38MAPK)抗体购自美国 R&D Systems；p38MAPK 信号抑制剂 SB203580 购自美国 Selleck chemicals 公司。

实验分组 MRC-5 细胞用含有 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养，细胞放置于 37°饱和湿度 5% CO₂ 培养箱中培养。MRC-5 细胞分成 3 组，对照组、TGF-β1 诱导组、吡非尼酮抑制组。对照组不加任何培养液；TGF-β1 诱导组用含有 5 μg/L 的 TGF-β1 细胞培养液培养；吡非尼酮抑制组用含有 5 μg/L 的 TGF-β1 和 0.2 mg/L 的吡非尼酮细胞培养液培养。

MTT 检测吡非尼酮对 TGF-β1 诱导的肺成纤维细胞增殖的影响 将 MRC-5 细胞调整为 1×10^4 个细胞/mL，接种到 96 孔细胞培养板中，12 h 以后，按照对照组、TGF-β1 诱导组、吡非尼酮抑制组分别处理，培养 48 h 以后，在每个孔中添加 MTT 溶液 20 μL，孵育 4 h 以后，把孔内的液体吸弃，继续添加 200 μL 的 DMSO 溶液，在酶标仪上测定 570 nm 的 OD 值。

吡非尼酮对 TGF-β1 诱导的肺成纤维细胞中 Col III、Col I 蛋白表达和 p38MAPK 磷酸化影响 取 3 组细胞，分别培养 48 h 以后，添加含有 10% PMSF 的 RIPA 裂解液，将细胞放置于冰上孵育 20 min，吸取裂解液至离心管中。吸取上清溶液，蛋白存在于上清中。依照 BCA 蛋白定量检测试剂盒对蛋白质进行定量检测。分别配制 5 mL 的 12% 分离胶和 2 mL 的 5% 的浓缩胶，在凝胶装置中添加电泳缓冲液，以 8 V/cm 凝胶进行电泳，直到溴酚蓝染料进入到凝胶底部以后，终止电泳。把 NC 膜浸泡至甲醇溶液中 10 s，再放在转移缓冲液中孵育 40 min。从正极到负极依次放置：滤纸、NC 膜、凝胶、滤纸，将电源打开，以恒压 15 V 电转移 15 min。把 NC 膜放在含有 10 mL 封闭液(5% 牛血清白蛋白)的平皿中，在室温中孵育 1 h。将一抗以适当比例稀释以后，把 NC 膜放在其中，在 4°C 孵育过夜。将二抗以 1:4 000 稀释以后，将 NC 膜置于其中反应 2 h。ECL 法显色以后，用 Image-Pro Plus 分析条带的灰度值。GAPDH 作为参照，分析目的蛋白表达水平。Col III、Col I 一抗稀释倍数为 1:1 000，p38MAPK 抗体稀释倍数为 1:600，p-p38MAPK 抗体稀释倍数为 1:400。

p38MAPK 信号抑制剂 SB203580 对吡非尼酮减少肺成纤维细胞胶原合成的影响 MRC-5 细胞用含有 5 μg/L 的 TGF-β1、0.2 mg/L 的吡非尼酮、

25 μmol/L 的 p38MAPK 信号抑制剂 SB203580 细胞培养液培养，记为吡非尼酮 + SB203580。取吡非尼酮、吡非尼酮 + SB203580 细胞培养 48 h 以后，用 Western blot 方法检测细胞中 Col III、Col I 蛋白表达和 p38MAPK 磷酸化水平，MTT 检测细胞增殖，步骤同上。

统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计学软件，计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示，2 组数据间比较用 *t* 检验，多组差异比较用单因素方差分析，组间比较采用 SNK-q 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

吡非尼酮对 TGF-β1 诱导的肺成纤维细胞增殖的影响 TGF-β1 处理后的肺成纤维细胞吸光度(OD 值)升高，吡非尼酮处理可以抑制 TGF-β1 诱导的肺成纤维细胞增殖，见表 1。

表 1 吡非尼酮对 TGF-β1 诱导的肺成纤维细胞增殖的影响

($\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值
对照组	0.46 ± 0.02
TGF-β1 组	0.69 ± 0.04 *
吡非尼酮组	0.56 ± 0.06 ▲

注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与 TGF-β1 组比较，▲ $P < 0.05$

吡非尼酮对 TGF-β1 诱导的肺成纤维细胞中 Col III、Col I 蛋白表达影响 TGF-β1 处理后的肺成纤维细胞中 Col III、Col I 蛋白表达水平升高，吡非尼酮处理可以抑制 TGF-β1 诱导的肺成纤维细胞中 Col III、Col I 蛋白的表达，见图 1、表 2。

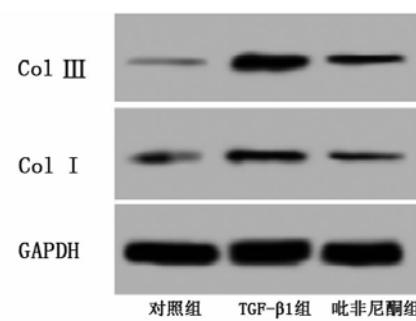


图 1 Western blot 检测吡非尼酮对 TGF-β1 诱导的肺成纤维细胞中 Col III、Col I 蛋白表达影响

表 2 吡非尼酮对 TGF-β1 诱导的肺成纤维细胞中

Col III、Col I 蛋白表达影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Col III	Col I
对照组	0.23 ± 0.02	0.38 ± 0.03
TGF-β1 组	0.69 ± 0.08 *	0.51 ± 0.04 *
吡非尼酮组	0.42 ± 0.06 ▲	0.43 ± 0.02 ▲

注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与 TGF-β1 组比较，▲ $P < 0.05$

吡非尼酮对TGF- β 1诱导的肺成纤维细胞中p38MAPK信号激活影响 TGF- β 1处理后的肺成纤维细胞中p-p38MAPK蛋白表达水平升高,吡非尼酮处理可以抑制TGF- β 1诱导的肺成纤维细胞中p-p38MAPK蛋白表达,见图2、表3。

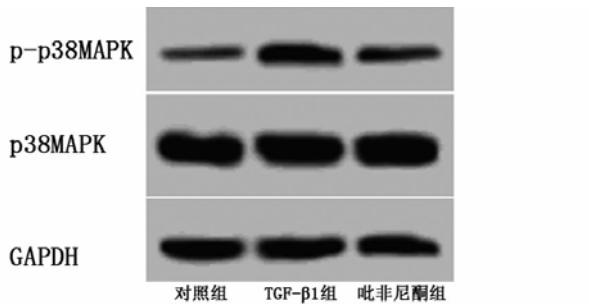


图2 Western blot检测吡非尼酮对TGF- β 1诱导的肺成纤维细胞中p38MAPK磷酸化水平影响

表3 吡非尼酮对TGF- β 1诱导的肺成纤维细胞中

p-p38MAPK、p38MAPK蛋白表达影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p38MAPK	p-p38MAPK
对照组	1.86 ± 0.13	0.46 ± 0.08
TGF- β 1组	1.84 ± 0.10	1.13 ± 0.11 *
吡非尼酮组	1.86 ± 0.12	0.71 ± 0.09 ▲

注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与TGF- β 1组比较, ▲ $P < 0.05$

p38MAPK信号抑制剂协同吡非尼酮抑制肺成纤维细胞中p38MAPK磷酸化影响 p38MAPK信号抑制剂SB203580和吡非尼酮共同处理后的肺成纤维细胞中p-p38MAPK蛋白表达水平降低,与单纯吡非尼酮处理的细胞比较,差异具有统计意义($P < 0.05$),见图3、表4。

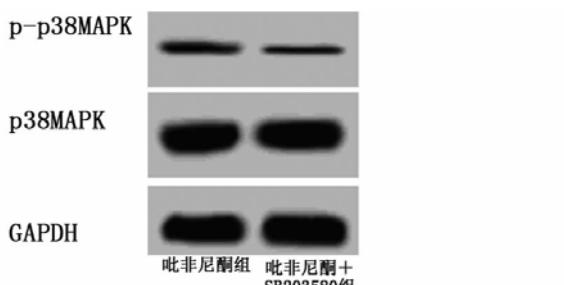


图3 Western blot检测SB203580+吡非尼酮对肺成纤维细胞中p38MAPK磷酸化水平影响

表4 p38MAPK抑制剂对肺成纤维细胞中

p-p38MAPK、p38MAPK蛋白表达影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p38MAPK	p-p38MAPK
吡非尼酮组	1.63 ± 0.14	0.60 ± 0.07
吡非尼酮 + SB203580组	1.62 ± 0.10	0.43 ± 0.05 *

注:与吡非尼酮组比较, * $P < 0.05$

p38MAPK信号抑制剂协同吡非尼酮抑制TGF- β 1诱导的肺成纤维细胞中Col III、Col I蛋白表达 p38MAPK

信号抑制剂SB203580和吡非尼酮共同处理后的肺成纤维细胞中Col III、Col I蛋白表达水平降低,细胞增殖能力降低,与单纯吡非尼酮处理的细胞比较,差异具有统计意义($P < 0.05$),见图4、表5。

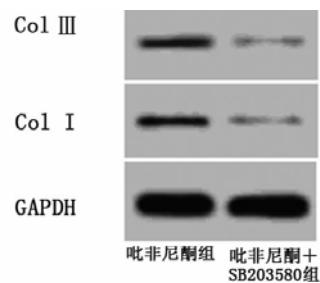


图4 Western blot检测p38MAPK信号抑制剂对肺成纤维细胞中Col III、Col I蛋白表达影响

表5 p38MAPK信号抑制剂对肺成纤维细胞中Col III、

Col I蛋白表达及细胞增殖影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Col III	Col I	OD值
吡非尼酮组	0.52 ± 0.05	0.49 ± 0.04	0.58 ± 0.06
吡非尼酮 + SB203580组	0.23 ± 0.02 *	0.25 ± 0.06 *	0.37 ± 0.04 *

注:与吡非尼酮组比较, * $P < 0.05$

讨 论

肺纤维化发生时,肺成纤维细胞受到细胞因子TGF- β 1等刺激后能够大量增殖并且分泌大量的细胞外基质,肺组织细胞外基质的主要胶原蛋白是Col III、Col I^[10,11]。本文中,TGF- β 1处理后的肺成纤维细胞增殖能力升高,细胞中Col III、Col I蛋白水平升高,说明成功构建了肺成纤维细胞纤维化模型。

吡非尼酮是一种广谱的抗纤维化药物,能够防止纤维化和瘢痕的形成,临幊上常用于治疗肺纤维化。研究证实,吡非尼酮对于肝纤维化、肾间质纤维化也具有较好的疗效。吡非尼酮是一种有效的细胞因子抑制剂,其可以抑制成纤维细胞的生物学活性,降低细胞增殖能力和胶原合成能力^[12,13]。研究显示,吡非尼酮可以抑制大鼠肝组织中胶原合成^[14]。细胞生长因子尤其是TGF- β 1在纤维化的发生发展中的起重要作用,被认为是组织纤维化形成与发展的枢纽^[15]。研究发现,吡非尼酮可以抑制TGF- β 1诱导的细胞表型转化,吡非尼酮可能通过调控肺成纤维细胞发挥抗肺纤维化的作用^[16]。本文中吡非尼酮处理可以抑制TGF- β 1诱导的肺成纤维细胞增殖和胶原合成,这与之前的研究结果相符,说明吡非尼酮具有抗肺纤维化的作用。

(下转第417页)

- 12 霍宏宇,胡苏琼,孙洋,等.肿瘤微环境及其能量代谢的重编程[J].生命科学,2017(1):70-76.
- 13 Wu S Y, Chiang C M. The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. [J]. J Biol Chem, 2007, 282(18):13141-13145.
- 14 Gao X, Wu X, Zhang X, et al. Inhibition of BRD4 suppresses tumor growth and enhances iodine uptake in thyroid cancer. [J]. Biochen Biophys Res Commun, 2016, 469(3):679-685.
- 15 Hu Y, Zhou J, Ye F, et al. BRD4 inhibitor inhibits colorectal cancer growth and metastasis. [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(1):1928-1948.
- 16 Venkataraman S, Alimova I, Balakrishnan I, et al. Inhibition of BRD4 attenuates tumor cell self-renewal and suppresses stem cell signaling in MYC driven medulloblastoma[J]. Oncotarget, 2014, 5(9):2355-2371.
- 17 Jiang W G, Ye L, Ruge F, et al. Expression of Sonic Hedgehog (SHH) in human lung cancer and the impact of YangZheng XiaoJi on SHH-mediated biological function of lung cancer cells and tumor growth[J]. Anticancer Res, 2015, 35(3):1321-1331.
- 18 Heiden K B, Williamson A J, Doscas M E, et al. The sonic hedgehog signaling pathway maintains the cancer stem cell self-renewal of anaplastic thyroid cancer by inducing snail expression. [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2014, 99(11):E2178.
- 19 Bohinc B, Michelotti G, Diehl A M. Hedgehog Signaling in Human Medullary Thyroid Carcinoma: A Novel Signaling Pathway[J]. Thyroid, 2013, 23(9):1119.
- 20 Wang Y H, Sui Y N, Yan K, et al. BRD4 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell proliferation and enhances gemcitabine resistance. [J]. Oncol Rep, 2015, 33(4):1699-1706.
- 21 Cordeiro B M, Oliveira I D, Alves M T D S, et al. SHH, WNT, and NOTCH pathways in medulloblastoma: when cancer stem cells maintain self-renewal and differentiation properties[J]. Child Nerv System, 2014, 30(7):1165-1172.

(2018-08-27 收稿 2019-09-09 修回)

(上接第412页)

p38MAPK是MAPK信号通路的重要分支,其在人类肾脏、肺脏等多种组织中广泛表达,参与炎症、氧化应激等生理病理过程。有研究显示,p38MAPK参与纤维化疾病的发生,其在肝组织纤维化、肺纤维化、肾组织纤维化等过程中过度激活,抑制p38MAPK可以降低肾小管上皮细胞等增殖能力,减少细胞胶原合成^[17]。本实验显示,TGF-β1处理后的肺成纤维细胞中p38MAPK磷酸化水平升高,吡非尼酮处理后p38MAPK磷酸化水平降低,并且p38MAPK信号抑制剂可以协同吡非尼酮抑制TGF-β1诱导的肺成纤维细胞胶原合成。

参 考 文 献

- 1 Dong Z, Yang Y, Zhang T, et al. siRNA-Act1 inhibits the function of IL-17 on lung fibroblasts via the NF-κB pathway[J]. Respiration, 2013, 86(4):332-340.
- 2 Li FZ, Cai PC, Song LJ, et al. Crosstalk between calpain activation and TGF-β1 augments collagen-I synthesis in pulmonary fibrosis[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852(9):1796-1804.
- 3 Galli JA, Pandya A, Vega-Olivo M, et al. Pirfenidone and nintedanib for pulmonary fibrosis in clinical practice: Tolerability and adverse drug reactions[J]. Respirology, 2017, 22(6):1171-1178.
- 4 Noble PW, Albera C, Bradford WZ. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials[J]. Lancet, 2011, 377(9779):1760-1769.
- 5 Zhao XY, Zeng X, Li XM, et al. Pirfenidone inhibits carbon tetrachloride- and albumin complex-induced liver fibrosis in rodents by preventing activation of hepatic stellate cells. [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010, 36(10):963-968.
- 6 Di SA, Bendaia E, Macarri G, et al. The anti-fibrotic effect of pirfenidone in rat liver fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1(I), TIMP-1 and MMP-2[J]. Dig Liver Dis, 2004, 36(11):744-751.
- 7 Nakayama S, Mukae H, Sakamoto N, et al. Pirfenidone inhibits the expression of HSP47 in TGF-beta1-stimulated human lung fibroblasts[J]. Life Sci, 2008, 82(3):210-217.
- 8 Yu M, Zheng Y, Sun HX, et al. Inhibitory effects of enalaprilat on rat cardiac fibroblast proliferation via ROS/P38MAPK/TGF-β1 signaling pathway[J]. Molecules, 2012, 17(3):2738-2751.
- 9 Lan CC, Fang AH, Wu PH, et al. Tacrolimus abrogates TGF-β1-induced type I collagen production in normal human fibroblasts through suppressing p38MAPK signalling pathway: implications on treatment of chronic atopic dermatitis lesions[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2014, 28(2):204-215.
- 10 Yang T, Liang Y, Lin Q, et al. miR-29 mediates TGFβ1-induced extracellular matrix synthesis through activation of PI3K-AKT pathway in human lung fibroblasts. [J]. J Cell Biochem, 2013, 114(6):1336-1342.
- 11 Kurundkar AR, Kurundkar D, Rangarajan S, et al. The matricellular protein CCN1 enhances TGF-β1/SMAD3-dependent profibrotic signaling in fibroblasts and contributes to fibrogenic responses to lung injury[J]. Faseb J, 2016, 30(6):2135-2150.
- 12 刘燕,樊均明,刘先蓉. 吡非尼酮在纤维化疾病治疗中的作用及机制[J]. 华西医学, 2004, 19(1):169-170.
- 13 纪春阳,李娣昕,曾红兵. 吡非尼酮对单侧输尿管梗阻大鼠肾脏间质纤维化的影响[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2010, 39(3):350-354.
- 14 Ji LU, Ping B, Jiang YM, et al. Effects of liver cirrhosis on the levels of manganese and the other 5 metal elements in whole-blood of rat and patient[J]. J Toxicol, 2006, 20(5):299-301.
- 15 唐锦辉,占成业. 丹参酮ⅡA对大鼠肾间质纤维化的抑制作用[J]. 内科急危重症杂志, 2008, 14(1):392-394.
- 16 吴超琛,林浩博,张晓. 吡非尼酮抑制TGF-β1诱导的人肺成纤维细胞表型转化[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(11):2049-2055.
- 17 Gao P, Wu X, Shui H, et al. Fluvastatin inhibits high glucose-induced nuclear factor kappa B activation in renal tubular epithelial cells[J]. J Nephrol, 2013, 26(2):289-296.

(2018-09-13 收稿 2019-03-21 修回)