

慢病毒靶向溴样结构域蛋白 4 通过抑制 SHH 通路对非小细胞肺癌细胞 A549 能量代谢水平的影响

攀枝花市中心医院 刘继东* 杨燕 刘莹, 攀枝花 617067

摘要 目的: 探究溴样结构域蛋白 4(BRD4) siRNA 通过 SHH 通路对非小细胞肺癌细胞 A549 能量水平的影响。方法: RT-qPCR 分析非小细胞肺癌细胞 A549、HLF-1 细胞内 BRD4 表达水平; 将 BRD4 siRNA 转入 A549 细胞内, 细胞计数试剂盒-8(CCK-8) 和细胞克隆形成实验检测 BRD4 siRNA 对 A549 生长增殖的影响; 2-[N-(7-硝基苯并-2-氧-1,3-二唑-4-基)氨基]-2-脱氧葡萄糖法(2-NBDG) 法和乳酸检测试剂盒检测 BRD4 siRNA 对 A549 细胞葡萄糖摄取率和乳酸生成量的影响; RT-qPCR 和 Western blot 检测 BRD4 siRNA 对基因 SHH、胶质瘤相关癌基因同源物 1(GLI1) 的 mRNA 和蛋白表达水平的影响。结果: BRD4 基因在 A549 细胞中上调表达($P < 0.05$); BRD4 siRNA 对 A549 细胞的增殖、克隆形成、葡萄糖摄入和乳酸生成具有抑制作用($P < 0.05$), 且能够促进 SHH 和 GLI1 基因的 mRNA 和蛋白表达显著下调(均 $P < 0.05$)。结论: 慢病毒靶向 BRD4 基因能够通过抑制 SHH 通路降低非小细胞肺癌细胞 A549 的能量代谢水平。

关键词 BRD4; SHH; 非小细胞肺癌; 能量代谢

中图分类号 R734.2

文献标识码 A

DOI 10.11768/nkjwzzz20190518

Effect of lenti-siRNA against BRD4 on energy metabolism in non-small cell lung cancer A549 cells by inhibiting SHH pathway LIU Ji-dong*, YANG Yan, LIU Ying. Panzhihua Central Hospital, Panzhihua 617067, China

Abstract Objective: To investigate the effect of lenti-siRNA against BRD4 on energy metabolism in non-small cell lung cancer A549 cells by SHH pathway. Methods: The expression of BRD4 in A549 and HLF-1 cells was detected by RT-qPCR. After BRD4 siRNA was transferred into A549 cells, the effects of BRD4 siRNA on the growth and proliferation of A549 cells were detected by CCK8 and cell cloning assays. The effects of BRD4 siRNA on the glucose uptake and lactic acid production of A549 cells were detected by 2-NBDG and lactic acid test kit. The expression levels of SHH, GLI1 mRNA and protein were detected by RT-qPCR and Western blotting respectively. Results: The expression of BRD4 mRNA was up-regulated in A549 cells ($P < 0.05$), and BRD4 siRNA inhibited the proliferation, cloning, glucose intake and lactic acid production of A549 cells ($P < 0.05$), and promoted the significant down-regulation of mRNA and protein expression of SHH and GLI1 genes ($P < 0.05$). Conclusion: The lenti-siRNA against BRD4 could reduce the level of energy metabolism in non-small cell lung cancer A549 cells by inhibiting the SHH pathway.

Key words BRD4; SHH; Non-small cell lung cancer; Energy metabolism

肺癌是当今世界上致死率最高的恶性肿瘤之一, 具有发病率高、预后差等特点, 并且发病隐匿不易被察觉, 大多数接受治疗的患者已处于癌症晚期^[1]。据统计, 我国 2004~2010 年的肺癌死亡率在恶性肿瘤中居首位, 并呈现逐年上升的趋势^[2]。其中 80% 以上的肺癌病理类型为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)。

有报道称溴样结构域蛋白 4(bromodomain containing 4, BRD4) 基因的异常上调表达与肝癌、结肠癌、胃癌等多种癌症的发生有关^[3~6]。BRD4 是 BRT 家族中的一员, 含有 2 个溴结构域和 1 个超末端结构域, 具有重塑染色质、调控基因转录和维持细胞正常周期等多重功效^[7,8]。本研究将通过慢病毒

介导法转染 BRD4 siRNA 至非小细胞肺癌细胞中, 探讨 BRD4 基因对非小细胞肺癌细胞增殖生长和能量代谢的影响以及可能的作用机制。

材料与方法

材料 非小细胞肺癌细胞系 549 购于北京北纳创联生物技术研究院(货号 BNCC100258), RPMI-1640、不含葡萄糖的 RPMI-1640 培养基、胎牛血清培养基购于美国 Grand Island Biological Company(货号 11875093、10099141、11879020), 2-[N-(7-硝基苯并-2-氧-1,3-二唑-4-基)氨基]-2-脱氧葡萄糖法(2-NBDG) 购于 APExBIO(货号 B6035), 乳酸含量试剂盒、BCA 定量购于美国 Sigma-Aldrich 公司(货号 MAK064-1KT、BCA1-1KT), RT-qPCR 试剂购于 Invitrogen(货号 4402954), Lipofectamine® 2000 试剂盒

* 通信作者: 刘继东, E-mail: 2471330487@qq.com

购于美国 Thermo Fisher Scientific(货号 11668027),慢病毒载体和引物分别由上海吉玛制药技术有限公司和上海生物工程技术服务有限公司合成。

方法

1. 细胞培养 A549 细胞培养采用含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 mg/L 的链霉素的 RPMI-1640 培养基于 5% CO₂、37℃ 恒温培养箱进行培养, 2 d 换液 1 次, 待细胞生长融合度达到 60% ~ 80% 左右时, 使用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 进行传代培养。

2. 细胞转染 设置空白对照组、siRNA-对照组和 BRD4 siRNA 组, 操作参考上海吉玛公司说明书。

3. RT-qPCR 分析 使用 TRIZOL 法提取细胞 RNA, 琼脂糖电泳检测 RNA 条带完整性, 使用试剂盒将其反转为 cDNA 备用。反应程序采用两步法, 为 98℃ 5 min; 98℃ 30 s, 60℃ 30 s, 40 个循环。反应体系选择 20 μL 体系, 为 Taq SYBR 混合液 10 μL, 上下游引物各 0.4 μL, 模板 0.5 ng, ddH₂O 补足 20 μL。本研究所用 BRD4 引物上游为 5'... CCCAATTACAAC-CCCGACATC... 3'; 下游为 5'... TCACCCG-CAGTTCACTCCT... 3'; GLI1 引物上游为 5'... ATCCT-TACCTCCCAACCTCTGT... 3'; 下游为 5'... AACTTCTG-GCTCTCCTGTAGC... 3'; SHH 上游为 5'... GTCTC-CTCGCTGCTGGTATG... 3'; 下游为 5'... TTGGGGATA-AACTGCTTGTAGC... 3'; β-action 上游为 5'... GAAT-CAATGCAAGTCGGTTCC... 3'; 下游为 5'... TCATCTC-CGCTATTAGCTCCG... 3'。每组实验设置 3 个重复, 以 GAPDH 为内参, 2^{-△△t} 法计算各个基因相对表达水平。

4. Western blot 分析 离心收集 A549 细胞, 加入 RIAP 细胞裂解液裂解 40 min, 12 000 转/min 离心 10 min, 收集上清溶液, BCA 法对上清蛋白定量, 取 50 μg 蛋白沸水处理 10 min 后做 SDS-PAGE, 结束后使用湿电转膜仪将蛋白条带转移至 PVDF 膜上。加入 5% 脱脂奶粉封闭液封闭 3 h, TBST 冲洗 2 次, 每次 10 min; 1:1 000 稀释浓度一抗溶液 4℃ 反应 12 h, TBST 冲洗 2 次, 每次 10 min; 1:2 000 稀释浓度二抗溶液室温反应 1 h, TBST 冲洗 3 次, 每次 10 min; 稍微晾干后暗室中进行显色, 保存图片并对蛋白条带进行灰度分析。

5. 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK8) 实验 使用胰蛋白酶制备细胞单悬液, 以 3 × 10⁴ 个/孔的浓度接种于 96 孔板中, 接种体积为 100 μL, 37℃ 孵育培养 48 h 后, 避光加入 10 μL CCK8 溶液继续培养 24、48、72 h 后, 使用酶标仪检

测 450 nm 处的吸光值, 并绘制细胞增殖曲线。

6. 细胞克隆形成实验 取 3 组细胞使用 0.25% 胰蛋白酶消化处理为细胞单悬液并做梯度稀释, 以 50、100、200 个/皿的密度接种于含有 10 mL 培养基的培养皿中, 轻轻混匀后于 37℃ 培养 2~3 周。待出现肉眼可见的细胞克隆时, 使用预冷 PBS 冲洗 2 次, 加入 5 mL 4% 多聚甲醛固定 15 min, 弃固定液加入 GAMSA 染色 20 min, 洗去染液进行计数。

7. 细胞葡萄糖摄取率的检测 将对数生长期的细胞按照 5 × 10⁵ 个/孔的浓度接种于 6 孔细胞板中, 于 37℃ 条件下培养 48 h, 使用无菌预冷 PBS 洗涤 3 次, 添加不含糖的 RPMI-1640 培养基于 37℃ 下孵育 2 h, 添加终浓度为 10 μmol/L 的 2-NBDG 至培养基中, 避光孵育 1 h 后使用预冷的 PBS 溶液洗涤 2 次, 使用 0.25% 胰蛋白酶处理 3 min 制作细胞单悬液, 细胞流式仪上机进行检测。

8. 乳酸生成量检测 将试剂盒中不同浓度的乳酸标准样品在室温条件下融化, 取出 50 μL 添加至 96 孔板中, 添加 50 μL 乳酸生成检测液至标准品于 37℃ 条件下避光孵育 30 min, 加入 50 μL 浓度为 0.5 μM 的乙酸溶液终止反应, 使用酶标仪检测 OD490 处的吸光值, 绘制乳酸生成量标准曲线。之后收集培养 0、24、48、72 h 的细胞培养液上清, 使用 ddH₂O 稀释 4 倍后同样取出 50 μL 添加至 96 孔板中, 37℃ 避光孵育 30 min 后加入 50 μL 0.5 M 乙酸溶液终止反应, 使用酶标仪检测 OD490 处的吸光值并代入标准曲线中计算 A549 细胞培养液的乳酸含量。

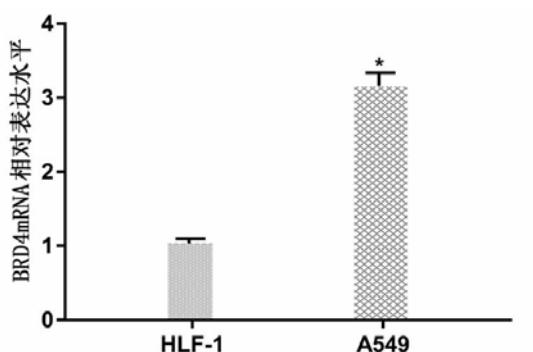
统计学处理 采用 GraphPad Prism 7.00 统计软件。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 2 组间数据比较使用 *t* 检验, 多组间比较使用单因素方差分析, 组间多重比较使用 SNK-q 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

BRD4 在 A549 细胞中高表达 正常细胞 HLF-1 和非小细胞肺癌 A549 细胞的 BRD4 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.04 和 3.14 ± 0.29 (*P* < 0.05), 见图 1。

BRD4 siRNA 干扰效率 BRD4 siRNA 组的 BRD4 mRNA 表达水平显著下调约 5 倍, 蛋白表达水平显著下调约 2 倍 (*P* < 0.05), 见表 1, 图 2。

BRD4 siRNA 抑制 A549 细胞的增殖转染 BRD4 转染 BRD4 siRNA 后的 A549 细胞增殖速度受到抑制, 显著低于对照组 (*P* < 0.05)。空白对照组、siRNA-对照组和 BRD4 siRNA 组的克隆形成个数分



注:与 HLF-1 细胞相比, * $P < 0.05$

图 1 BRD4 在 A549 细胞中的相对表达水平

表 1 BRD4 siRNA 干扰效率 ($\bar{x} \pm s$)

组别	mRNA	蛋白
空白对照组	1.00 ± 0.05	0.41 ± 0.03
siRNA-对照组	0.94 ± 0.04	0.43 ± 0.04
BRD4 siRNA 组	$0.20 \pm 0.01^*$	$0.19 \pm 0.02^*$

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$

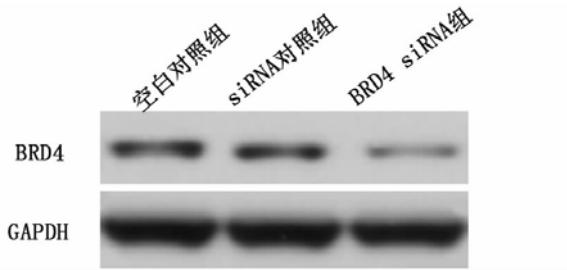
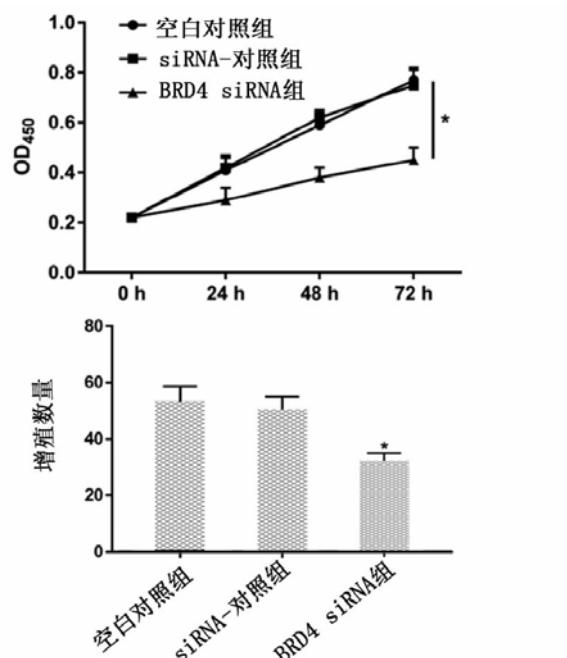


图 2 BRD4 siRNA 对 BRD4 蛋白表达水平的影响

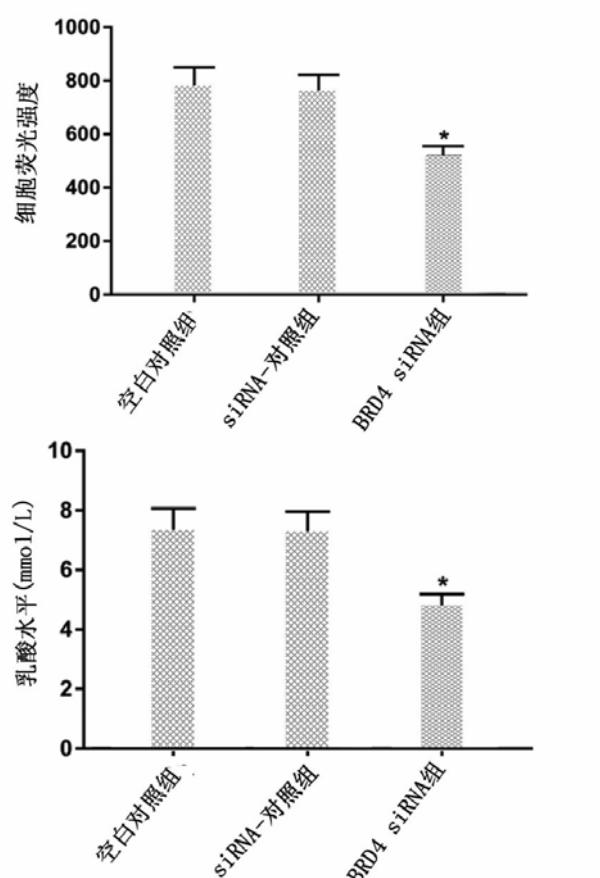
分别为 52.6 ± 6.1 、 49.8 ± 5.5 和 31.4 ± 3.6 , 可见 BRD4 siRNA 组的 A549 细胞克隆形成能力弱于两对照组 ($P < 0.05$), 见图 3。



注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$

图 3 BRD4 对 A549 细胞生长增殖的影响

BRD4 siRNA 降低 A549 细胞能量代谢水平 本研究使用荧光标记的 2-NBDG 检测空白对照组、siRNA-对照组和 BRD4 siRNA 组的葡萄糖摄取能力, 检测的荧光强度分别为 769.48 ± 80.19 、 751.29 ± 70.48 、 514.17 ± 40.93 。使用 L-乳酸检测试剂盒检测乳酸生成量, 空白对照组、siRNA-对照组和 BRD4 siRNA 组的乳酸产量 (mmol/L) 为 7.42 ± 0.82 、 7.19 ± 0.76 和 4.68 ± 0.51 。BRD4 siRNA 组的 A549 细胞的葡萄糖摄取率显著低于空白对照组 ($P < 0.05$) ; 且 BRD4 siRNA 显著抑制细胞的乳酸生成量 ($P < 0.05$), 见图 4。



注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$

图 4 BRD4 siRNA 对 A549 能量代谢的影响

BRD4 siRNA 抑制 SHH 信号通路 A549 细胞转染 BRD4 siRNA 后 SHH 通路中的 SHH 和 GLI1 表达受到抑制, 其蛋白和 mRNA 表达水平均显著下调 ($P < 0.05$), 见表 2, 图 5, 说明 BRD4 siRNA 对 SHH 信号通路具有抑制作用。

讨 论

肿瘤具有抗凋亡、高侵袭能力和无限增殖复制等潜能, 而肿瘤细胞所特有的异质性使其对自身能量代谢途径重新编程, 通过调控糖代谢满足对 ATP

表2 BRD4 siRNA 对 SHH 和 GLI 表达水平的影响

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

组别	mRNA		蛋白	
	SHH	GLI1	SHH	GLI1
空白对照组	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.04	1.27 ± 0.11	1.36 ± 0.15
siRNA-对照组	0.96 ± 0.05	1.02 ± 0.06	1.31 ± 0.14	1.40 ± 0.12
BRD4 siRNA 组	0.46 ± 0.04 *	0.39 ± 0.02 *	0.26 ± 0.02 *	0.23 ± 0.01 *

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$

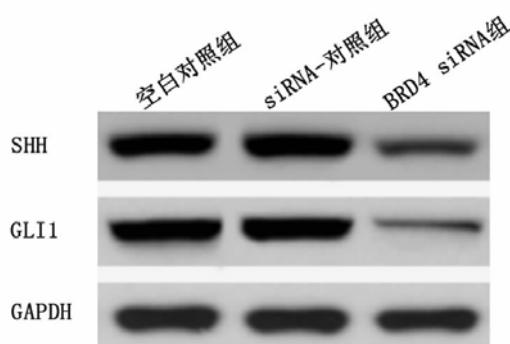


图5 BRD4 siRNA 对 SHH 和 GLI1 蛋白表达水平的影响
和 NADH 的需求,达到快速增殖的目的^[9,10]。即使在供氧充足条件下,肿瘤仍优先选择糖酵解产能,细胞的迅速增殖往往伴随着葡萄糖摄取量增加、糖酵解酶活性提高和乳酸大量堆积的现象^[11,12]。

BRD4 是一种在生物体内广泛表达的表观遗传信号分子,与 BRD2、BRD3 和 BRDT 共属于 BET 家族成员,含有两个高度保守的串联的溴样结构功能域,可特异性识别结合乙酰化染色质,参与调控基因的转录激活^[13]。Gao 等^[14]提出抑制 BRD4 表达能够抑制甲状腺肿瘤的生长,并增加其对碘的摄取能力,Hu 等^[15]发现添加 BRD4 抑制剂对结肠癌的生长代谢具有抑制作用,并且 Venkataraman 等^[16]也证明 BRD4 下调表达对髓母细胞瘤的自我更新能力以及信号转导功能同样具有抑制作用。研究发现,BRD4 基因在非小细胞肺癌中高表达^[6]。本研究显示 BRD4 在非小细胞肺癌细胞中显著上调表达,与上诉文献报道一致。本研究证实,BRD4 基因下调表达抑制 A549 细胞的生长增殖。且发现,沉默 BRD4 基因后 A549 细胞内糖酵解水平减弱,葡萄糖摄入量和乳酸生成量显著下降,表明 BRD4 siRNA 对 A549 的显著抑制效果。

SHH 信号通路主要由分泌信号糖蛋白配体 SHH、受体蛋白和 SMO、下游转录因子 GLI 组成,其通路的异常活化往往与肿瘤密切相关^[17~19]。在 SHH 通路失活状态下,SMO 蛋白以抑制剂的形式与 PTCH 形成复合物,使其无法发挥作用;当存在 SHH 配体时,SHH 与 PTCH 跨膜蛋白受体竞争性结合,

解除对 SMO 蛋白的抑制,使其进入胞浆,活化下游转录因子 GLI-1 入核,进而激活相关基因的转录。研究表明,BRD4 基因能够激活胰腺癌细胞中的 SHH 信号通路^[20],并且 PTH2 和 GLI1 基因表达水平与髓母细胞瘤患者存活率负相关^[21]。本研究显示,敲低 BRD4 后,SHH 和 GLI1 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低,表明 BRD4 基因可能通过上调 SHH 信号通路相关基因的表达参与调控 A549 细胞的能量代谢和生长增殖。

综上所述,BRD4 在非小细胞肺癌 A549 细胞中异常表达,敲低 BRD4 基因的表达水平可抑制 A549 细胞的生长增殖和能量代谢水平。

参 考 文 献

- 1 Lim H, Devesa SS, Sosa JA, et al. Trends in thyroid cancer incidence and mortality in the united states, 1974-2013 [J]. Jama, 2017, 317(13):1338-1348.
- 2 屈若祎,周宝森.2004-2010年中国肺癌死亡分布及趋势分析[J].中国卫生统计,2014,31(6):932-935.
- 3 Hong SH, Woo EJ, Kyung CS, et al. Epigenetic reader BRD4 inhibition as a therapeutic strategy to suppress E2F2-cell cycle regulation circuit in liver cancer [J]. Oncotarget, 2016, 7(22):32628-32640.
- 4 Hu Y, Zhou J, Ye F, et al. BRD4 inhibitor inhibits colorectal cancer growth and metastasis. [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(10):1928.
- 5 Ba M, Long H, Yan Z, et al. BRD4 promotes gastric cancer progression through the transcriptional and epigenetic regulation of c-MYC. [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1):973-982.
- 6 Liao YF, Wu YB, Xiang L, et al. High level of BRD4 promotes non-small cell lung cancer progression [J]. Oncotarget, 2016, 7(8):9491-9500.
- 7 Filippakopoulos P, Picaud S, Mangos M, et al. Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family [J]. Cell, 2012, 149(1):214-31.
- 8 Devaiah BN, Gegonne A, Singer DS. Bromodomain 4: a cellular Swiss army knife [J]. J Leukoc Biol, 2016, 100(4):679-686.
- 9 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 144(5):646-74.
- 10 郭敦伟,王建祥,周锐.二甲双胍联合奥沙利铂抗肿瘤作用[J].内科急危重症杂志,2018(1):64-66.
- 11 Pastò A, Bellio C, Pilotto G, et al. Cancer stem cells from epithelial ovarian cancer patients privilege oxidative phosphorylation, and resist glucose deprivation [J]. Oncotarget, 2014, 5(12):4305-4319.

- 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)