

硫化氢对博来霉素致肺纤维化大鼠 TGF- β 1 介导 上皮间充质转化过程影响

涂容芳,曾赛丽,何振华,谭小武,陈哲,夏叶舟,李雪花

摘要 **目的** 观察硫化氢(H_2S)对转化生长因子- β 1(TGF- β 1)及上皮间充质转化(EMT)过程中 E-钙黏素(E-cad)、波形蛋白(VIM)、 α -平滑肌蛋白(α -SMA)表达影响,探讨 H_2S 抗纤维化机制。**方法** 健康雄性 SD 大鼠 60 只,随机分为对照组、博来霉素组、NaHS + 博来霉素组、泼尼松 + 博来霉素组,15 只/组。于造模第 7、14 和 28 天处死各组大鼠 5 只,HE 和 Masson 染色,观察肺泡炎和肺纤维化改变程度;免疫组化和逆转录-聚合酶链反应法测定各组肺组织中 TGF- β 1、E-Cad、VIM 及 α -SMA 蛋白和 mRNA 的表达水平。**结果** ① HE 和 Masson 染色结果示对照组大鼠肺组织纤维化程度最低,博来霉素组程度最重,NaHS + 博来霉素组和泼尼松 + 博来霉素组肺组织也有肺泡炎和纤维化改变,但程度均较博来霉素组减轻。②博来霉素组、NaHS + 博来霉素组、泼尼松 + 博来霉素组各时间点 TGF- β 1、VIM、 α -SMA 的 mRNA 和蛋白表达水平较对照组均有升高($P < 0.05$),但 NaHS + 博来霉素组、泼尼松 + 博来霉素组各时间点三者表达水平较博来霉素组均有降低($P < 0.05$),以 NaHS + 博来霉素组第 28 天下降最多。③博来霉素组、NaHS + 博来霉素组、泼尼松 + 博来霉素组各时间点 E-Cad 的 mRNA 和蛋白表达水与对照相比均有降低($P < 0.05$),但 NaHS + 博来霉素组、泼尼松 + 博来霉素组各时间点 E-Cad 表达水平较博来霉素组均有升高($P < 0.05$),以 NaHS + 博来霉素组 28 d 升高最多。**结论** H_2S 可有效减轻大鼠肺纤维化程度,其机制可能与下调 TGF- β 1、降低 VIM 和 α -SMA 表达、增强 E-cad 表达、减少 EMT 过程发生有关。

关键词 硫化氢;肺纤维化;上皮间充质转化;TGF- β 1

中图分类号 R 563.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)01-0077-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.01.015

特发性肺间质纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)起病隐匿、进展迅速、病死率高,严重危

害人类健康。多种因素参与了 IPF 发生发展的过程,其中“损伤修复”机制受到高度关注^[1]。近年来研究^[2]表明,TGF- β 1 介导的上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程在“损伤修复”过程具有重要作用。 H_2S 是近年来被广泛关注的一种新型气体信号分子,其抗肺纤维化作用已得到包括本实验室在内的国内外多个研究小组的确认,但具体机制尚未阐明^[3]。本实验用博来霉素(bleomycin, BLM)气管内给药复制肺纤维化模型,采用外源性 NaHS 作为 H_2S 供体,通过比较 H_2S 干预前后大鼠肺组织中 TGF- β 1 及 EMT 过程相关指标 E-钙黏素(E-cadherin, E-cad)、波形蛋白(vimentin, VIM)、 α -平滑肌蛋白(alpha-smooth muscle actin, α -SMA)的表达变化,从而探讨 H_2S 对肺纤维化 EMT 过程作用机制,为靶向治疗肺纤维化提供新思路和新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只,7~8 周龄,体质量 280~300 g,购买于长沙市天勤生物技术有限公司(生产许可证号:SCXK[湘]2014-0011),动物饲养于南华大学实验动物部(使用许可证号:SYXK[湘]2020-0002)。实验方案通过南华大学实验动物伦理审查委员会审批(编号:N20190709003),实验过程中按实验动物使用的“3R”原则给予人道主义关怀。

1.1.2 主要试剂与仪器 醋酸泼尼松片剂(浙江新瓠医药有限公司生产,5 mg/片,国药准字:H33021207、生产批号:1405172)。注射用盐酸博来霉素针剂(日本化药株式会社生产,15 mg/支,国药准字:H20090885、生产批号:740422)。NaHS(sodium hydrosulfide)购自美国 Sigma 公司。兔抗鼠 TGF- β 1 单克隆抗体和兔抗鼠 α -SMA 体多克隆抗体分别购自美国 assaybiotech 和美国宜康有限公司;鼠抗人 E-cad 单克隆和鼠抗人 VIM 多克隆抗体均购自美国 Epitomics 公司。DAB 显色剂购自江苏艾佳生物技

2021-08-31 接收

基金项目:湖南省教育厅科学研究项目(编号:18C0453)

作者单位:南华大学衡阳医学院附属第二医院呼吸与危重症医学科,衡阳 421001

作者简介:涂容芳,女,硕士,主治医师,责任作者,E-mail:723372920@qq.com;

曾赛丽,女,硕士,副主任医师,责任作者,E-mail:35721583@qq.com.

术有限;RNA 提取试剂盒及 cDNA 合成试剂盒均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。主要仪器有:光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司);连续光谱酶标仪(美国 Thermo 公司);核酸蛋白检测仪、超速冷冻离心机(德国 EPPendorf 公司);凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 将实验动物随机均分为 4 组:对照组、博来霉素组、NaHS + 博来霉素组、泼尼松 + 博来霉素组。博来霉素组、NaHS + 博来霉素组、泼尼松 + 博来霉素组气管内灌注 BLM 溶液 5 mg/kg 建立肺纤维化模型。从造模后第 1 天开始,NaHS + 博来霉素组予 NaHS 溶液 28 $\mu\text{mol}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 腹腔注射,泼尼松 + 博来霉素组予醋酸泼尼松 0.56 mg/(kg · d) 经胃管灌入,对照组和博来霉素组注射等体积生理盐水。于造模后第 7、14、28 d 随机处死各组大鼠 5 只,将大鼠左肺组织 4% 甲醛固定后行 HE 和 Masson 染色,HE 和 Masson 染色光学显微镜观察各组肺炎和肺纤维化情况,根据 Szapiel et al^[4] 报道的评分方法对各组 HE 切片行肺炎及肺纤维化程度判断;免疫组化法测定各组肺组织中 TGF- β 1、E-Cad、VIM 及 α -SMA 蛋白表达水平。取大鼠右肺组织置于 -196 $^{\circ}\text{C}$ 液氮保存,RT-PCR 法测定各组肺组织中 TGF- β 1、E-Cad、VIM 及 α -SMA 的 mRNA 表达水平。

1.2.2 免疫组化方法(SP 法) 测定各组大鼠肺组织各指标蛋白表达 肺组织石蜡切片,采用 SP 法按试剂盒要求依次滴加相应浓度抗体,然后对切片依次行显色、脱水、透明、封固、镜检,阴性对照中采用 PBS 替代一抗行相同操作,测定各组 TGF- β 1、E-Cad、VIM、 α -SMA 蛋白表达。

1.2.3 RT-PCR 法测定肺组织中各指标 mRNA 的表达 依照试剂盒要求提取总 RNA 并合成 cDNA,按相应条件加入各指标引物并扩增:其中 TGF- β 1 序列 F:5'-GAACCAAGGAGACGGAATACAG-3' 及 R:5'-AACCCAGGTCCTTCCTAAAGTC-3',退火温度 56 $^{\circ}\text{C}$,扩增产物长度为 299 bp;E-cad 序列 F:5'-AGGGTCTGAGAAGACAGAAACG-3' 及 R:5'-GGATAAACTCTGGCCTGTTGTC-3',退火温度 57 $^{\circ}\text{C}$,扩增产物长度为 351 bp;VIM 序列 F:5'-AGGCAAAGCAGGAGTCAAAC-3' 及 R:5'-TCTTCCATTTACGCATCTG-3',退火温度 57 $^{\circ}\text{C}$,扩增产物长度为 115 bp; α -SMA 序列 F:5'-TTCCTTCGTGACTACTGCTGAG-3' 及 R:5'-CAATGAAAGATGGCTGGAAGAG-3',退火温度 55 $^{\circ}\text{C}$,扩增长度为 209 bp; β -actin 序列 F:5'-TCAGGTCAT-

CACTATCGGCAAT-3' 及 R:5'-AAAGAAAGGCTGTA-AAACGCA-3',退火温度 50 $^{\circ}\text{C}$,扩增长度为 432 bp。取扩增产物 5 μl 经 1.5% 的琼脂凝胶电泳,测定扩增条带的吸光光度值并计算 mRNA 的含量表达。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 医学统计软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析及 LSD-*t* 检验对所测的数据进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 和 Masson 染色光学显微镜观察 对照组大鼠肺组织结构正常,HE 染色未见明显炎症细胞渗出及出血,Masson 染色表现为细支气管壁旁及肺泡间隔内少量胶原纤维沉着。博来霉素组于造模后第 7 天、14 天、28 天均出现不同程度肺组织结构破坏,肺泡腔萎陷变窄、塌陷融合甚至消失、肺泡间隔增宽改变、细支气管壁旁及肺泡间隔内炎症细胞浸润、成纤维细胞增生及蓝绿色胶原纤维沉积等改变,以造模后第 28 天时最明显。与博来霉素组对应时间点相比,NaHS + 博来霉素组、泼尼松 + 博来霉素组大鼠肺组织在肺泡结构改变、炎症细胞浸润及胶原纤维沉积等各方面均有不同程度减轻,且 NaHS + 博来霉素组减轻程度高于泼尼松 + 博来霉素组。见图 1、2。

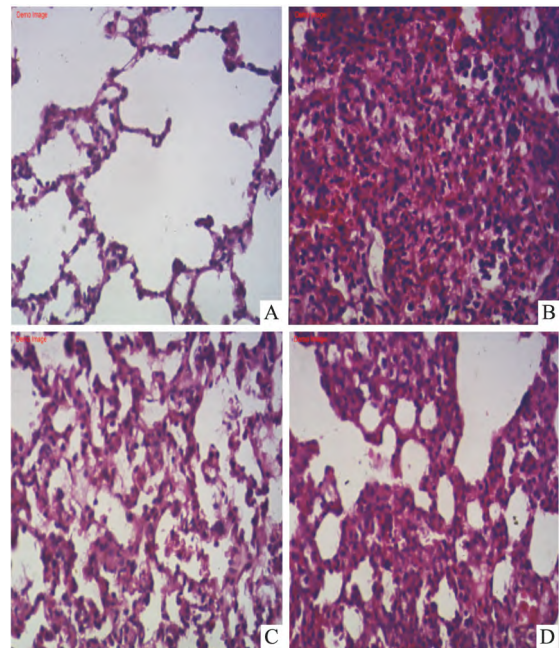


图 1 各组肺组织第 28 天 HE $\times 400$

A: 对照组; B: 博来霉素组; C: NaHS + 博来霉素组; D: 泼尼松 + 博来霉素组

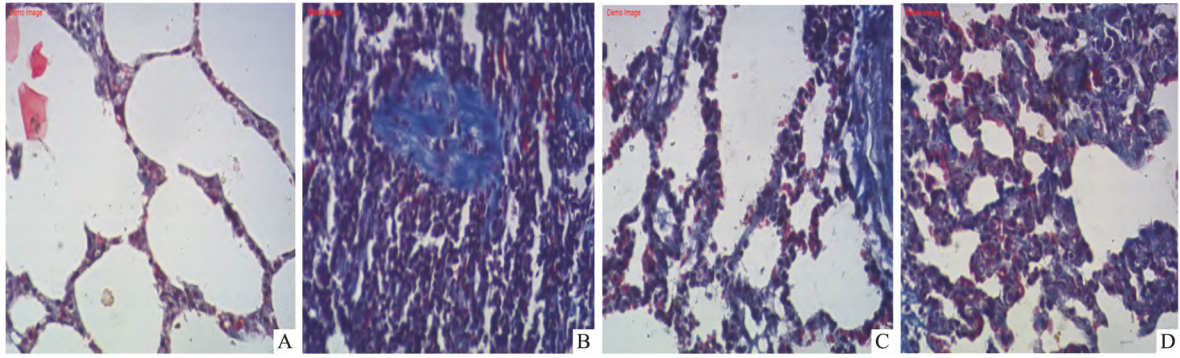


图2 各组肺组织第28天 Masson 染色 ×400

A: 对照组; B: 博来霉素组; C: NaHS + 博来霉素组; D: 泼尼松 + 博来霉素组

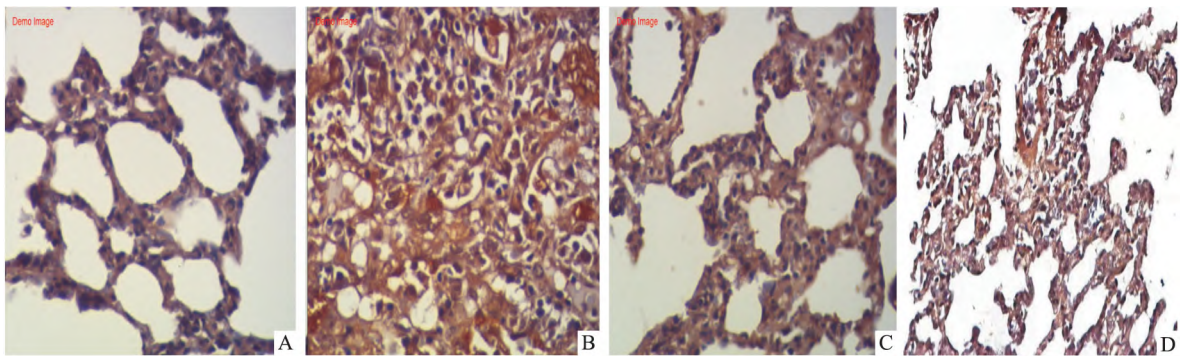


图3 各组肺组织第28天 E-cad 免疫组化 ×400

A: 对照组; B: 博来霉素组; C: NaHS + 博来霉素组; D: 泼尼松 + 博来霉素组

2.2 肺泡炎及肺纤维化程度判断 对各组肺组织 HE 染色切片进行肺纤维化程度半定量评分, 比较造模后第 7、14、28 天各组肺组织肺泡炎及肺纤维化程度, 结果显示各组之间差异有统计学意义 ($F = 286.91, 206.160, 357.53, P < 0.05$)。其中博来霉素组、NaHS + 博来霉素组、泼尼松 + 博来霉素组各时间点肺纤维化程度较对照组有不同程度增强 (均 $P < 0.05$), 以博来霉素组造模后第 28 天降低最多; NaHS + 博来霉素组、泼尼松 + 博来霉素组各时间点肺纤维化程度低于博来霉素组 (均 $P < 0.05$), 以 NaHS + 博来霉素组造模后第 28 天降低最多。见表 1。

表 1 肺泡炎及肺纤维化程度分级积分 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | 第 7 天 | 第 14 天 | 第 28 天 |
|-------------|------------------|------------------|------------------|
| 对照 | 0 | 0 | 0 |
| 博来霉素 | 3.27 ± 0.158 * | 3.53 ± 0.307 * | 3.89 ± 0.201 * |
| NaHS + 博来霉素 | 1.81 ± 0.123 ** | 2.11 ± 0.216 ** | 2.13 ± 0.185 ** |
| 泼尼松 + 博来霉素 | 2.53 ± 0.311 **▲ | 2.71 ± 0.126 **▲ | 2.82 ± 0.275 **▲ |

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与博来霉素组比较: # $P < 0.05$; 与 NaHS + 博来霉素组比较: ▲ $P < 0.05$

2.3 各组肺组织 E-cad 蛋白及 mRNA 表达变化

比较造模后第 7、14、28 天各组肺组织 E-cad 蛋白及 mRNA 表达水平, 结果显示各组之间差异有统计学意义 ($F = 30.833, 37.407, 100.76, P < 0.05; F = 214.179, 271.22, 266.200, P < 0.05$)。其中博来霉素组、NaHS + 博来霉素组、泼尼松 + 博来霉素组 E-cad 蛋白和 mRNA 含量在各时间点较对照组均有下降 (均 $P < 0.05$), 其中博来霉素组于造模后第 28 天时下降最多; 但 NaHS + 博来霉素组、泼尼松 + 博来霉素组 E-cad 蛋白和 mRNA 含量在各时间点较博来霉素组有升高 ($P < 0.05$), 其中以 NaHS + 博来霉素组造模后第 28 天升高最多。见图 3、4 和表 2。

2.4 各组大鼠肺组织 TGF-β1、VIM、α-SMA 蛋白及 mRNA 的表达变化

比较造模后第 7、14、28 天各组肺组织 TGF-β1、VIM、α-SMA 蛋白和 mRNA 表达水平, 结果发现各组之间差异有统计学意义 ($F = 40.278, 61.868, 71.004, F = 60.795, 75.407, 62.672, P < 0.05; F = 512.057, 864.781, 909.960, F = 52.301, 66.503, 48.344, P < 0.05; F = 387.370, 347.623, 1708.940, F = 226.534, 219.513, 778.064, P < 0.05$)。

其中博来霉素组、NaHS + 博来霉素组、泼尼松 + 博来霉素组 TGF-β1、VIM、α-SMA 蛋白和 mRNA 含量在各时间点较对照组有升高(均 $P < 0.05$),以博来霉素组造模后第 28 天升高最多;NaHS + 博来霉素

组、泼尼松 + 博来霉素组 TGF-β1、VIM、α-SMA 蛋白和 mRNA 含量在各时间点较博来霉素组有降低(均 $P < 0.05$),以 NaHS + 博来霉素组造模后第 28 天降低最多。见图 5~7 和表 3~5。

表 2 各组大鼠肺组织 E-cad 的 mRNA 和蛋白表达($n=5, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | E-cad 蛋白 OD 值 | | | E-cad mRNA OD 值 | | |
|-------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 第 7 天 | 第 14 天 | 第 28 天 | 第 7 天 | 第 14 天 | 第 28 天 |
| 对照 | 67.8 ± 0.734 | 68.0 ± 0.665 | 68.3 ± 2.38 | 1.19 ± 0.084 | 1.24 ± 0.073 | 1.26 ± 0.039 |
| 博来霉素 | 53.2 ± 0.883 * | 51.6 ± 1.019 * | 49.8 ± 1.43 * | 0.78 ± 0.048 * | 0.72 ± 0.061 * | 0.63 ± 0.045 * |
| NaHS + 博来霉素 | 59.8 ± 0.948a ** | 61.0 ± 0.932 ** | 62.9 ± 2.12 ** | 0.94 ± 0.078 ** | 1.08 ± 0.116 ** | 1.17 ± 0.101 ** |
| 泼尼松 + 博来霉素 | 54.9 ± 1.339 **▲ | 55.9 ± 1.15 **▲ | 57.1 ± 1.713 **▲ | 0.85 ± 0.072 **▲ | 0.90 ± 0.068 **▲ | 0.97 ± 0.046 **▲ |

与对照组比较: * $P < 0.05$;与博来霉素组比较: ** $P < 0.05$;与 NaHS + 博来霉素组比较: ▲ $P < 0.05$

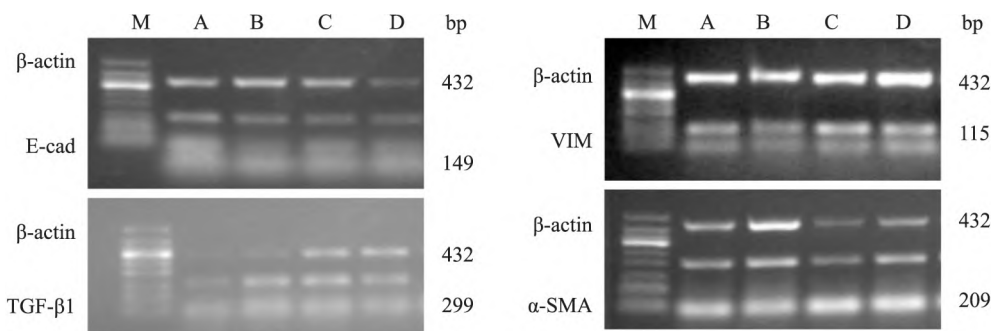


图 4 各组肺组织 E-cad、TGF-β1、VIM、α-SMA 的 mRNA 表达

A: 对照组; B: 博来霉素组; C: NaHS + 博来霉素组; D: 泼尼松 + 博来霉素组; M: DNA Marker

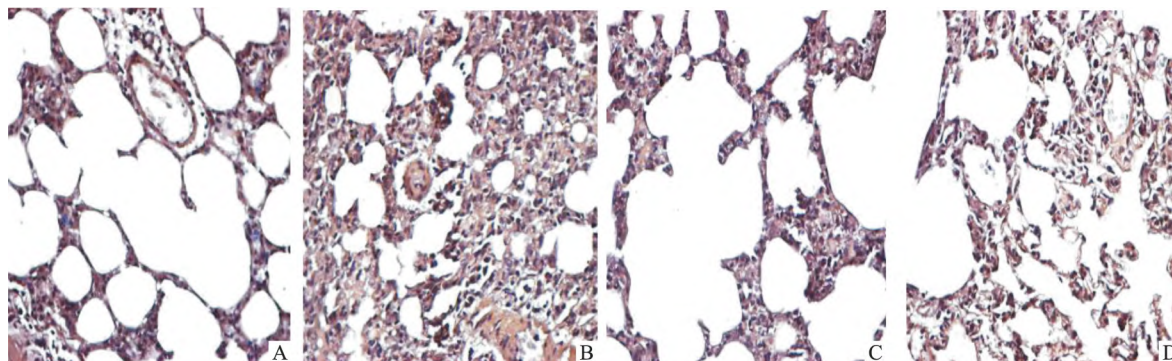


图 5 各组肺组织第 28 天 TGF-β1 免疫组化 ×400

A: 对照组; B: 博来霉素组; C: NaHS + 博来霉素组; D: 泼尼松 + 博来霉素组

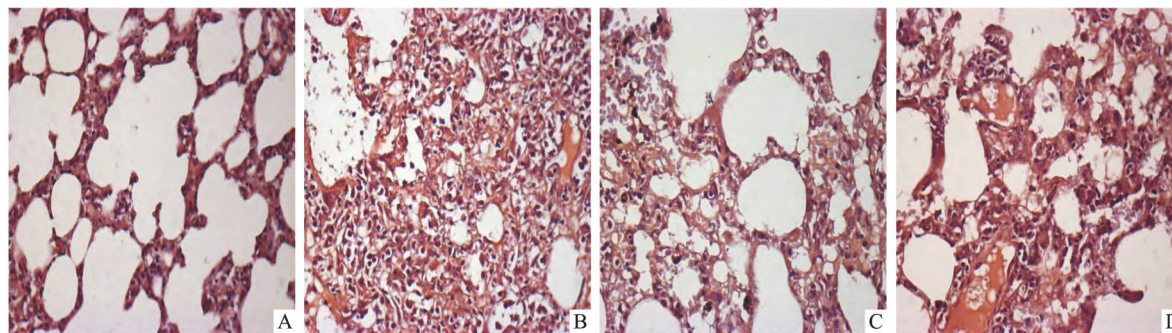


图 6 各组肺组织第 28 天 VIM 免疫组化 ×400

A: 对照组; B: 博来霉素组; C: NaHS + 博来霉素组; D: 泼尼松 + 博来霉素组

3 讨论

H₂S 是近年来被广泛关注的一种新型气体信号分子,具有抗炎、抗氧化应激、抗增殖、抗凋亡、调节血管张力、修复血管损伤等生物学作用,在肺、肝、肾、心脏等多种疾病中发挥重要作用^[5]。哺乳动物体内内源性 H₂S 主要是以体内半胱氨酸为底物,由胱硫醚 γ 裂解酶(cystathionine-γ-lyase, CSE)和半胱氨酸在磷酸吡多醛-5'-磷酸-依赖性酶胱硫醚 β 合成酶(cystathionine-β-synthase, CBS)催化形成,而外源

性 H₂S 主要可以 NaHS 为供体,其进入体内后可解释离为 Na⁺ 和 HS⁻,后者与体内 H⁺ 结合生成 H₂S。Tan et al^[6]已在多种纤维化动物模型中发现血浆 H₂S 水平有降低,外源性补充 H₂S 可部分逆转纤维化器官的纤维化,因此其被认为是潜在抗纤维化治疗靶点。Hamelet et al^[7]发现小鼠缺失 5-磷酸吡多醛依赖性酶后,内源性 H₂S 合成减少,小鼠肺纤维化形成,由此可以推测内源性 H₂S 与肺纤维化的病理过程有关。孙丹等^[8]通过 27 例 IPF 患者和 28 名健康体检者对比发现肺纤维化患者血浆中 H₂S

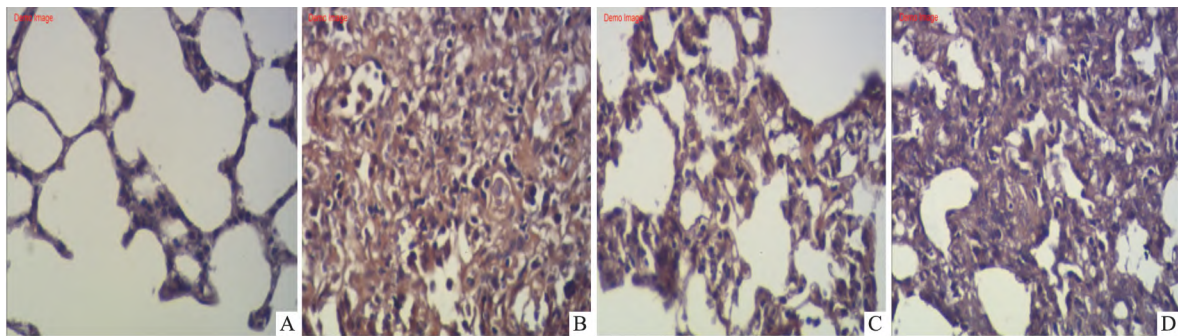


图 7 各组肺组织第 28 天 α-SMA 免疫组化 ×400

A: 正常组; B: 博来霉素组; C: NaHS + 博来霉素组; D: 泼尼松 + 博来霉素组

表 3 各组大鼠肺组织 TGF-β1 的 mRNA 和蛋白表达 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | TGF-β1 mRNA OD 值 | | | TGF-β1 蛋白 OD 值 | | |
|-------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 第 7 天 | 第 14 天 | 第 28 天 | 第 7 天 | 第 14 天 | 第 28 天 |
| 对照 | 0.638 ± 0.036 | 0.648 ± 0.035 | 0.64 ± 0.045 | 0.38 ± 0.029 | 0.37 ± 0.025 | 0.39 ± 0.024 |
| 博来霉素 | 1.02 ± 0.066 * | 1.16 ± 0.042 * | 1.28 ± 0.077 * | 0.808 ± 0.072 * | 0.846 ± 0.064 * | 0.898 ± 0.071 * |
| NaHS + 博来霉素 | 0.72 ± 0.022 ** | 0.78 ± 0.054 ** | 0.84 ± 0.033 ** | 0.53 ± 0.068 ** | 0.56 ± 0.079 ** | 0.58 ± 0.070 ** |
| 泼尼松 + 博来霉素 | 0.79 ± 0.051 **▲ | 0.89 ± 0.080 **▲ | 0.96 ± 0.118 **▲ | 0.63 ± 0.071 **▲ | 0.66 ± 0.042 **▲ | 0.67 ± 0.043 **▲ |

与对照组比较: * P < 0.05; 与博来霉素组比较, # P < 0.05; 与 NaHS + 博来霉素组比较: ▲ P < 0.05

表 4 各组大鼠肺组织 VIM 的 mRNA 和蛋白表达 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | VIM mRNA OD 值 | | | VIM 蛋白 OD 值 | | |
|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 第 7 天 | 第 14 天 | 第 28 天 | 第 7 天 | 第 14 天 | 第 28 天 |
| 对照 | 0.512 ± 0.032 | 0.499 ± 0.027 | 0.514 ± 0.053 | 56.0 ± 1.467 | 57.2 ± 1.284 | 56.8 ± 1.264 |
| 博来霉素 | 0.842 ± 0.044 * | 0.876 ± 0.062 * | 0.912 ± 0.067 * | 86.6 ± 1.545 * | 94.0 ± 1.430 * | 98.8 ± 1.903 * |
| NaHS + 博来霉素 | 0.574 ± 0.069 ** | 0.595 ± 0.055 ** | 0.602 ± 0.051 ** | 65.1 ± 0.951 ** | 66.5 ± 1.029 ** | 67.5 ± 1.174 ** |
| 泼尼松 + 博来霉素 | 0.682 ± 0.137 **▲ | 0.703 ± 0.042 **▲ | 0.676 ± 0.043 **▲ | 72.2 ± 1.031 **▲ | 74.4 ± 0.953 **▲ | 78.3 ± 0.678 **▲ |

与对照组比较: * P < 0.05; 与博来霉素组比较, # P < 0.05; 与 NaHS + 博来霉素组比较: ▲ P < 0.05

表 5 各组大鼠肺组织 α-SMA 的 mRNA 和蛋白表达 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | α-SMA mRNA OD 值 | | | α-SMA 蛋白 OD 值 | | |
|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 第 7 天 | 第 14 天 | 第 28 天 | 第 7 天 | 第 14 天 | 第 28 天 |
| 对照 | 0.467 ± 0.008 | 0.474 ± 0.010 | 0.463 ± 0.019 | 79.6 ± 0.790 | 80.2 ± 0.583 | 81.2 ± 0.748 |
| 博来霉素 | 0.619 ± 0.013 * | 0.752 ± 0.030 * | 0.909 ± 0.007 * | 99.8 ± 0.734 * | 111.4 ± 2.822 * | 130.1 ± 1.872 * |
| NaHS + 博来霉素 | 0.531 ± 0.009 ** | 0.582 ± 0.093 ** | 0.614 ± 0.015 ** | 83.5 ± 1.462 ** | 88.3 ± 0.710 ** | 91.6 ± 0.209 ** |
| 泼尼松 + 博来霉素 | 0.596 ± 0.008 **▲ | 0.685 ± 0.011 **▲ | 0.773 ± 0.016 **▲ | 89.1 ± 0.821 **▲ | 95.0 ± 0.506 **▲ | 98.9 ± 0.951 **▲ |

与对照组比较: * P < 0.05; 与博来霉素组比较, # P < 0.05; 与 NaHS + 博来霉素组比较: ▲ P < 0.05

含量比健康者明显降低,急性加重时 H₂S 含量明显高于症状缓解时,随着肺纤维化病变的进展,H₂S 含量无明显下降,提示 H₂S 与肺纤维化严重程度密切相关。本实验结果显示,博来霉素组肺泡炎及肺纤维化程度积分明显高于正常对照组,提示博来霉素致肺纤维化模型造模成功;NaHS + 博来霉素组大鼠的肺泡炎及肺纤维化程度较正常对照组有升高,但较博来霉素组及泼尼松 + 博来霉素组有减轻,提示 H₂S 可有效降低肺泡炎及肺纤维化程度,进一步完善其机制研究可为肺纤维化的治疗提供新策略。

Fang et al^[9] 研究发现外源性 H₂S 通过下调 TGF-β1 表达抑制人类成纤维细胞(MRC5)迁移、增殖和转型为肌成纤维细胞,抑制损伤后异常修复过程,减轻肺纤维化。Gao et al^[10] 在外源性 H₂S 对肺纤维化大鼠肺组织 TGF-β1 及结缔组织生长因子的干预作用实验中发现,BLM 造模后第 7、14、28 天大鼠肺组织 TGF-β1 及 CTGF 蛋白的表达有明显升高。给予 NaHS 处理后各期肺组织 TGF-β1 及 CTGF 蛋白表达均有显著下降,进一步证实 H₂S 抗肺纤维化机制可能与抑制 TGF-β1 有关。TGF-β1 是促进纤维细胞激活并向肌成纤维细胞转型的关键作用因子,其功能的发挥依赖于 TGF-β1/Smads 信号转导通路调控。TGF-β1/Smads 信号通路作为目前公认的主要致纤维化通路,除作用于成纤维细胞外,还是诱导 EMT 过程的关键途径^[11]。EMT 是指上皮细胞在细胞因子如 TGF-β1 等介导下失去其特定的内皮细胞标记物如 E-Cad,转变为拥有间质标记(如 α-SMA、N-cadherin)的肌成纤维细胞并在受损肺泡基底膜处聚集,转变成“成纤维细胞灶”并促进细胞外基质过量分泌(如 I 型胶原蛋白)和肺纤维化发生的过程^[12]。郭春玉等^[13] 已表明 EMT 与肺纤维化、心包纤维化、肾脏纤维化及类癌纤维相关等疾病密切相关,是成纤维化细胞灶的重要来源之一。Bai et al^[14] 研究表明外源性 H₂S 可通过调节 TGF-β1/Smad2/3 信号通路抑制百草枯诱导的 A549 细胞上皮间充质转化过程减轻肺纤维化。于是课题组推测 H₂S 可通过 TGF-β1 介导抑制 EMT 过程,减轻肺纤维化。本实验通过 SP 及 PCR 法测定 BLM 致大鼠肺纤维化模型中 E-cad、TGF-β1、VIM 和 α-SMA 的表达水平,结果显示:与对照组相比,博来霉素组从第 7 天开始 TGF-β1 及间质标志物 VIM、α-SMA 的蛋白和 mRNA 水平不断增强,而上皮细胞标志物 E-cad 的蛋白和 mRNA 水平均出现持续降低,肺纤维化程度逐渐发生,提示模型组大鼠肺组织造模成功

并出现了 EMT 改变,由此推测 EMT 为肺纤维化发生重要过程,且与 TGF-β1 密切相关,阻断该过程有可能会减轻肺纤维化。糖皮质激素如泼尼松片是一种传统抗纤维化药物,但临床因副作用大及总体获益有限等原因已不被临床推荐,但仍被认为对照实验疗效分析常规药物。本实验加入 NaHS 及泼尼松进行干预后发现各时间点 NaHS + 博来霉素组和泼尼松 + 博来霉素组 TGF-β1、VIM 和 α-SMA 蛋白和 mRNA 水平较博来霉素组有不同程度降低,而 E-cad 的蛋白和 mRNA 水平较博来霉素组有不同程度升高,且均以 NaHS + 博来霉素组第 28 天时明显,提示 H₂S 可能通过降低 TGF-β1 水平抑制 EMT 过程减轻肺纤维化。

IPF 病死率高且预后极差,严重危害人类健康,依据 2018 年特发性肺纤维化诊断临床实践指南^[15],目前尚无特效治疗药物。近年来吡啡尼酮、尼达尼布等新型抗纤维化药物相继问世,但因其价格昂贵且副作用大、疗效不完全确切,临床尚未广泛使用。深究 H₂S/TGF-β1/EMT 信号通路,不仅可进一步揭示肺纤维化发生机制,还可为靶向治疗肺纤维化提供新方向。

参考文献

- [1] Richeldi L, Collard H R, Jones M G. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Lancet, 2017,389(10082):1941-52.
- [2] Hewlett J C, Kropski J A, Blackwell T S. Idiopathic pulmonary fibrosis: epithelial-mesenchymal interactions and emerging therapeutic targets [J]. Matrix Biol,2018,71-2:112-7.
- [3] Bazhanov N, Ansar M, Ivanciuc T, et al. Hydrogen sulfide: a novel player in airway development, pathophysiology of respiratory diseases, and antiviral defenses [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2017,57(4):403-10.
- [4] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude athymic mouse [J]. Am Rev Respir Dis,1979,120(4):893-9.
- [5] Song K, Li Q, Yin X Y, et al. Hydrogen sulfide: a therapeutic candidate for fibrotic disease [J]. Oxid Med Cell Longev,2015, 2015:458720.
- [6] Tan G, Pan S, Li J, et al. Hydrogen sulfide attenuates carbon tetrachloride- induced hepatotoxicity, liver cirrhosis and portal hypertension in rats [J]. PLoS One,2011,6(10):e25943.
- [7] Hamelet J, Maurin N, Fulchiron R, et al. Mice lacking cystathionine beta synthase have lung fibrosis and air space enlargement [J]. Exp Mol Pathol,2007,83(2):249-53.
- [8] 孙丹,房立平,耿彬,等. 特发性肺纤维化患者血硫化氢水平下降 [J]. 基础医学与临床,2010,30(2):122-4.
- [9] Fang L P, Lin Q, Tang C S, et al. Hydrogen sulfide suppresses migration, proliferation and myofibroblast transdifferentiation of

- human lung fibroblasts[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2009, 22(6): 554-61.
- [10] Gao L, Jiang D, Geng J, et al. Hydrogen inhalation attenuated bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibiting transforming growth factor- β 1 and relevant oxidative stress and epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Exp Physiol, 2019, 104(12): 1942-51.
- [11] Qian W, Cai X, Qian Q, et al. Astragaloside IV modulates TGF- β 1-dependent epithelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(9): 4354-65.
- [12] 任周新, 沈俊岭, 李亚, 等. TGF- β 诱导肿瘤细胞上皮-间质转化的调节及信号转导机制研究进展[J]. 安徽医科大学报, 2015, 50(1): 124-8.
- [13] 郭春玉, 张诗晨, 方军. 特发性肺纤维化中氧化应激调控机制的研究进展[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(6): 999-1002.
- [14] Bai Y W, Ye M J, Yang D L, et al. Hydrogen sulfide attenuates paraquat-induced epithelial-mesenchymal transition of human alveolar epithelial cells through regulating transforming growth factor- β 1/Smad2/3 signaling pathway[J]. J Appl Toxicol, 2019, 39(3): 432-40.
- [15] 韩茜, 罗群. 2018年特发性肺纤维化诊断临床实践指南与2018年特发性肺纤维化诊断专家共识解读[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2018, 41(12): 923-5.

Effect of hydrogen sulfide on TGF- β 1 mediated epithelial-mesenchymal transformation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis rats

Tu Rongfang, Zeng Saili, He Zhenhua, Tan Xiaowu, Chen Zhe, Xia Yezhou, Li Xuehua

(Dept of Pulmonary and Critical Care Medicine, The Second Affiliated Hospital, Dept of Pulmonary and Critical Care Medicine, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001)

Abstract Objective To observe the effect of hydrogen sulfide (H_2S) on the expression of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), E-cadherin (E-CAD), Vimentin (VIM), α -smooth muscle actin (α -SMA) during epithelial-mesenchymal transformation (EMT), and to explore the anti-fibrosis mechanism of it. **Methods** Sixty rats (male SD) were randomly divided into control group, bleomycin group, NaHS + bleomycin group and prednisolone + bleomycin group, 15 rats per group. 5 rats of each group were sacrificed at random in 7th, 14th and 28th day. The degree of alveolitis and pulmonary fibrosis was observed. The expression of protein and mRNA of TGF- β 1, E-cad, VIM, α -SMA were determined by Immunohistochemistry and RT-PCR. **Results** ① HE and Masson staining showed that the lung tissue of fibrosis had the lowest degree in control group. and the most severe in bleomycin group. The lung tissue of NaHS + bleomycin group and prednisolone + bleomycin group also had alveolitis and fibrosis changes, but the degree were significantly less than bleomycin group. ② The mRNA and protein expression levels of TGF- β 1, VIM and α -SMA in bleomycin group, NaHS + bleomycin group and prednisolone + bleomycin group were all higher than that in control group at 7th, 14th and 28th day ($P < 0.05$), while the expression levels of them in NaHS + bleomycin group and prednisolone + bleomycin group were all lower than that in bleomycin group at each time ($P < 0.05$), which was significant at 28th day in NaHS + bleomycin. ③ The mRNA and protein expression levels of E-Cad in bleomycin group, NaHS + bleomycin group and prednisolone + bleomycin group were all lower than that in control group at 7th, 14th and 28th day ($P < 0.05$), but the expression levels of E-Cad in NaHS + bleomycin group and prednisolone + bleomycin group were higher than that in bleomycin group at each time ($P < 0.05$), which was significant at 28th day in NaHS + bleomycin. **Conclusion** H_2S can reduce the degree of pulmonary fibrosis in rats, its mechanism may be related to the down-regulation of TGF- β 1 and the inhibition of the EMT, which can enhance the expression of E-cad and reduce the expression of TGF- β 1, VIM and α -SMA.

Key words hydrogen sulfide; pulmonary fibrosis; epithelial-mesenchymal transition; TGF- β 1