

研究论文

LIMR参与了AF-1对A549细胞上皮间质转化的抑制作用

刘伟^{1,2}, 唐四元¹, 万静⁴, 赵飞艳², 程庆梅², 黄晓婷^{1,2}, 李晨^{3,*}, 罗自强^{2,*}

¹中南大学湘雅护理学院, 长沙 410000; ²中南大学基础医学院, 长沙 410000; ³长冶医学院基础医学部生理学教研室, 长冶 046000; ⁴中南大学湘雅医院新生儿科, 长沙 410000

摘要: 肺泡上皮细胞发生上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是肺纤维化时肺内肌成纤维细胞的主要来源之一, 在肺纤维化的发生和发展过程中具有重要作用。已有研究表明子宫球蛋白(uteroglobin, UG)的活性片段antiflammin-1 (AF-1)能够有效地抑制博来霉素诱导的肺纤维化, 然而, 其作用机制尚未阐明。本研究利用细胞形态学检测和Western blot技术观察AF-1对转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)诱导的A549细胞EMT的影响。结果显示, TGF- β 1处理A549细胞后, α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)的表达明显上升而E-cadherin的表达显著下降, A549细胞由鹅卵石样上皮细胞向长梭形间质细胞转变。给予TGF- β 1和AF-1共孵育细胞后, TGF- β 1诱导A549细胞EMT的作用受到明显抑制。抗脂质运载蛋白相互作用膜受体(lipocalin interacting membrane receptor, LIMR)抗体或细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)信号通路阻断剂PD98059均能够减弱AF-1对TGF- β 1诱导A549细胞EMT的抑制作用。上述结果表明, AF-1能够抑制TGF- β 1诱导的A549细胞EMT转变, 该作用有赖于LIMR及其下游ERK信号通路的参与。

关键词: 肺纤维化; 上皮间质转化; antiflammin-1; 脂质运载蛋白相互作用膜受体

中图分类号: R563

LIMR is involved in the inhibitory effect of antiflammin-1 on epithelial-mesenchymal transition in A549 cells

LIU Wei^{1,2}, TANG Si-Yuan¹, WAN Jing⁴, ZHAO Fei-Yan², CHENG Qing-Mei², HUANG Xiao-Ting^{1,2}, LI Chen^{3,*}, LUO Zi-Qiang^{2,*}

¹Xiangya Nursing School, Central South University, Changsha 410000, China; ²School of Basic Medical Science, Central South University, Changsha 410000, China; ³Department of Physiology, School of Basic Medical Science, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China; ⁴Department of Neonatology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410000, China

Abstract: Epithelial-mesenchymal transition (EMT) occurring in alveolar epithelial cells plays an important role in the development and progression of pulmonary fibrosis. Previous studies showed that antiflammin-1 (the active fragment of uteroglobin) effectively inhibited bleomycin-induced pulmonary fibrosis. However, its mechanism is still far from being clarified. In this study, we investigated the effects of antiflammin-1 on EMT in A549 cells induced by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and the underlying mechanism by using morphological observation and Western blot. The results showed that the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) increased significantly while the expression of E-cadherin decreased significantly in A549 cells following treatment with TGF- β 1,

Received 2018-04-20 Accepted 2018-07-12

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81500056, 81100057, 30870916, 81570065), the Natural Science Foundation of Shanxi Province, China (No. 201601D01114), the Natural Science Foundation of Hunan Province, China (No. 2016JJ3182, 2017JJ2400), the Open Fund for the Innovation Platform of Colleges and Universities of Hunan Province, China (No. 11K076), the Open Fund for the Innovation Platform of Education Department of Hunan Province, China (No. 17K101), the Open-End Fund for the Valuable and Precision Instrument of Central South University, China (No. CSUZC201740, CSUZC201735), and the Fund for the Key Laboratory of Hunan Province, China (No. 2017TP1004).

*Corresponding authors. LUO Zi-Qiang: Tel: +86-731-823550511; E-mail: luozq1962@163.com; LI Chen: Tel: +86-355-3012430; E-mail: chen.physiology@outlook.com

concomitant with morphological change of A549 cells from pebble-like shape epithelial cells to spindle-like mesenchymal shape. This process of EMT in A549 cells induced by TGF- β 1 was significantly inhibited when A549 cells were co-incubated with TGF- β 1 and antflammin-1. Furthermore, the anti-lipocalin interacting membrane receptor (LIMR) antibody and PD98059 (an ERK signaling pathway blocker) attenuated the inhibitory effect of antflammin-1 on TGF- β 1-induced EMT, respectively. Our findings indicate that antflammin-1 can inhibit EMT in A549 cells induced by TGF- β 1, which is related to LIMR and its downstream ERK signaling pathway.

Key words: pulmonary fibrosis; epithelial-mesenchymal transition; antflammin-1; lipocalin interacting membrane receptor

肺纤维化是严重危害健康的呼吸系统常见并发症,是各种不同病因的肺间质疾病的最后共同结局,其主要病理特征为肺内肌成纤维细胞大量聚集,细胞外基质过度沉积^[1]。目前肺纤维化的临床治疗以给予皮质类固醇类和其他免疫抑制剂药物为主,但是研究发现其只对部分肺纤维化患者有效,对特发性肺纤维化患者疗效较差^[2]。肺纤维化的发病率和死亡率近年呈逐渐上升态势,对人类健康危害极大。因此,寻找新的治疗方法迫在眉睫。

上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指上皮细胞在一些因素的作用下,转化为具有间质细胞形态和功能的细胞。其主要变化包括细胞间连接逐渐丧失;游离面-基底面极性的特征消失;细胞骨架发生重组,细胞形态改变;细胞游走迁移能力增强等^[3]。大量的研究表明,肺泡上皮细胞发生 EMT 是肺纤维化时肺内肌成纤维细胞的主要来源之一,在肺纤维化的发生和发展过程中具有重要作用^[4-6]。

Antflammin-1 (AF-1)是与子宫球蛋白(uteroglobin, UG)第三个 α -螺旋中的保守序列高度同源的一段寡肽,由于最初发现在体内具有较强的抗炎作用而得名^[7]。AF-1由九肽组成,对应于UG分子中的第39~47位氨基酸残基(MQMKKVLDS)。研究证实,AF-1具有抗炎、抑制细胞趋化及粘附等多种与UG相似的生物活性^[8]。我们在前期实验中首次证实,AF-1能够有效地抑制博来霉素诱导的小鼠肺纤维化,然而其作用机制还远未阐明^[9]。

我们前期研究显示,AF-1能够特异性地结合脂质运载蛋白相互作用膜受体(lipocalin interacting membrane receptor, LIMR, 又称UG受体或UG结合蛋白),并且通过与LIMR相互作用,抑制了转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)诱导的NIH3T3细胞的增殖^[9, 10]。本研究以肺泡上皮细胞为研究对象,观察AF-1是否能够抑制TGF- β 1诱导的肺泡上皮细胞EMT改变,并研究其作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 人肺腺癌细胞株 A549 细胞由中南大学遗传实验室惠赠, RPMI1640 培养基购自 Hyclone 公司, 胎牛血清和胰蛋白酶购自 Gibco 公司, 青链霉素购自华北制药股份有限公司, 蛋白 Marker 购自 NEB 公司, 蛋白酶抑制剂 cocktail 购自 Roche 公司, BCA 蛋白检测试剂盒购自碧云天生物有限公司, PVDF 膜购自 Millipore 公司, 重组 TGF- β 1 购自 Peprotech 公司, 抗 α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体购自 Abcam 公司, 抗 p-JNK 抗体购自 Santa Cruz 公司, 抗 E-cadherin、抗 β -actin、抗 p-ERK 及抗 p-p38 抗体购自 CST 公司, 抗 LIMR 抗体由实验室自行制备(制备方法参见文献^[11]), AF-1 由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2 细胞传代及实验处理 RPMI1640 完全培养基(含 10% FBS)培养 A549 细胞, 倒置显微镜下观察细胞的生长情况, 当 A549 细胞生长至 80% 汇合或即将汇合时进行细胞传代。根据不同的实验目的, 加入不同的处理因素: AF-1 (1、10、100 μ mol/L)、TGF- β 1 (5 ng/mL)、抗 LIMR 抗体 (50 μ g/mL)、PD98059 (10 μ mol/L)、SP600125 (10 μ mol/L) 或 SB203580 (10 μ mol/L), 对照组根据不同的实验处理加入等量的 PBS 或 DMSO, 进行细胞形态学观察和 Western blot 检测。

1.3 Western blot 检测及分析 Western blot 检测 α -SMA、E-cadherin 的表达情况以及 ERK、JNK 和 p38 的磷酸化水平。处理完毕后, 收集细胞, 向细胞中加入 RIPA 裂解液裂解细胞, 冰上孵育 30 min 后, 4 $^{\circ}$ C 下 10 000 g 离心 20 min, 取上清液进行 BCA 蛋白浓度测定, 用裂解液将各样本蛋白浓度调成一致。2 \times loading buffer 稀释蛋白后 100 $^{\circ}$ C 孵育 10 min 进行蛋白变性, 上样等量蛋白行 SDS-PAGE 电泳, 按浓缩胶 80 V, 分离胶 150 V 的条件恒压电泳至结束, 随后进行蛋白转印, 300 mA 恒流转膜, 按每 1 kDa 转膜 1 min, 蛋白转印至 PVDF 膜后, 采用 5% BSA 或 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, TBS

洗膜 2 次, 每次 5 min。一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 再加入二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 最后 TBS 洗膜 1 次, 10 min。加入 ECL 发光液进行曝光, Quantity One 软件分析目的蛋白的相对灰度值。

1.4 统计学分析 所有数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理。计量资料采用 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示, 多组样本均数比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 各组样本均数间多重比较采用 LSD (least-significant difference) 法。 $P \leq 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AF-1抑制TGF- β 1诱导的A549细胞形态的转变

对照组或单独给予 AF-1 处理的 A549 细胞呈扁平状、多边形, 有少量的突起, 细胞生长时连接紧密, 抱团或呈岛状生长; 当加入 5 ng/mL TGF- β 1 处理 48 h 后, 细胞纵轴变长, 变为梭形, 且分散生长, 呈现出纤维细胞样形态, 说明 A549 细胞在 TGF- β 1 诱导后发生了 EMT 改变; 在加入 1 或 10 $\mu\text{mol/L}$ AF-1 与 TGF- β 1 同时处理 48 h 后, A549 细胞形态

较 TGF- β 1 组未见明显改变, 而加入 100 $\mu\text{mol/L}$ AF-1 与 TGF- β 1 同时处理 48 h 后, A549 细胞的形态呈现出扁平状、多边形, 说明 100 $\mu\text{mol/L}$ AF-1 能够抑制 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞形态变化 (图 1)。

2.2 AF-1抑制TGF- β 1诱导的A549细胞EMT改变

E-cadherin 和 α -SMA 分别是上皮细胞和间质细胞的重要标志物之一, 我们观察到在对照组中 A549 细胞的 E-cadherin 表达很高, 而 α -SMA 表达水平较低。加入 5 ng/mL 的 TGF- β 1 48 h 后, E-cadherin 的表达显著降低, α -SMA 表达水平显著增高, 呈现 EMT 的表型变化。而给予 100 $\mu\text{mol/L}$ AF-1 与 TGF- β 1 同时处理 48 h 后, TGF- β 1 诱导的 E-cadherin 和 α -SMA 表达改变均被显著逆转, 该结果提示 AF-1 能够抑制 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞 EMT 改变 (图 2)。

2.3 LIMR参与了AF-1对TGF- β 1诱导A549细胞EMT改变的抑制作用

为探讨 AF-1 的作用是否与 LIMR 有关, 在加入 5 ng/mL TGF- β 1 和 100 $\mu\text{mol/L}$ AF-1 前 2 h 预先加入终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 抗 LIMR 抗体以阻断 AF-1 与 LIMR 的结合, 继续培养 48 h 后, 观察对 AF-1 抑制 TGF- β 1 诱导 A549 细胞 EMT 的影响。结果显

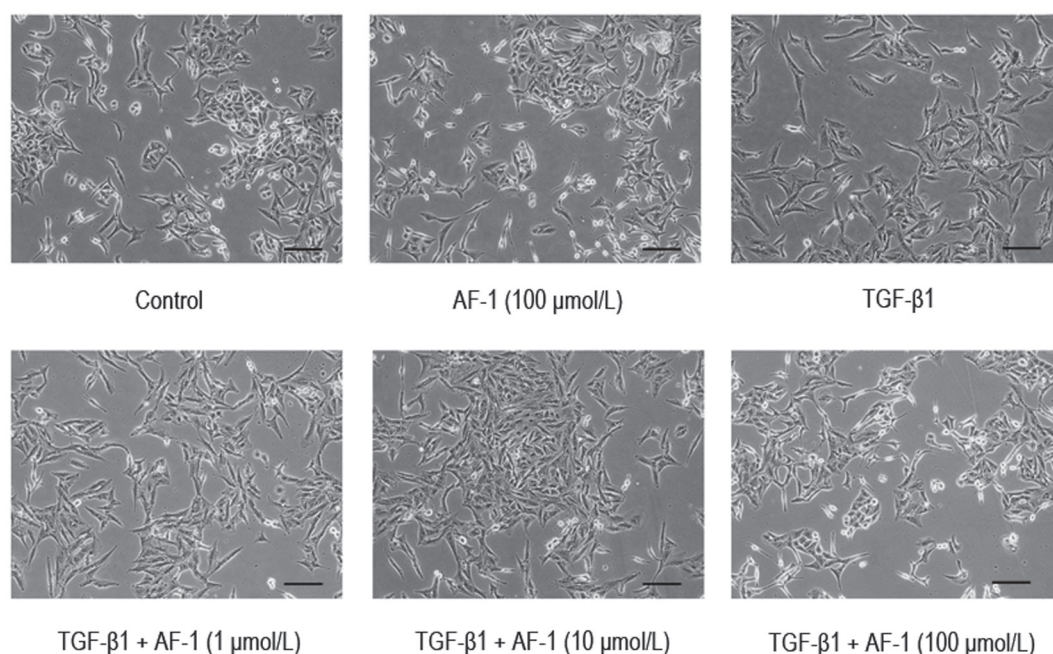


图 1. AF-1抑制TGF- β 1诱导的A549细胞形态的转变

Fig. 1. AF-1 inhibited the TGF- β 1-induced morphological changes of A549 cells. The degree of epithelial-mesenchymal transition (EMT) was assessed by cellular morphology. After culture for 48 h, the pebble-like shape and cell-cell adhesion were clearly observed in control group and AF-1-treated A549 cells. TGF- β 1-treated cells showed a decrease in cell-cell contacts and adopted a more elongated morphological shape. However, co-treatment with AF-1 (100 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h could significantly inhibit the TGF- β 1 (5 ng/mL)-induced morphological changes. Scale bar, 100 μm .

示, 预孵育抗 LIMR 抗体后, AF-1 对 TGF- β 1 调节 α -SMA 表达的作用被完全阻断, 即 TGF- β 1+AF-1+anti-LIMR Ab 组 α -SMA 的表达较 TGF- β 1 处理组无显著差异, 而 AF-1 对 TGF- β 1 调节 E-cadherin 表达的作用只被部分阻断, 即 TGF- β 1+AF-1+anti-LIMR Ab 组 E-cadherin 的表达明显高于 TGF- β 1 处理组 (图 3)。因此, 除了 LIMR 外, 可能还存在其他机制参与了 AF-1 对 TGF- β 1 诱导 A549 细胞 EMT 改变的抑制作用, 这有待进一步研究。

2.4 AF-1通过LIMR激活MAPK信号通路

为进一步探讨 AF-1 引起生物效应的细胞内信号途径, 在给予 100 μ mol/L 的 AF-1 30 min 后检测 A549 细胞内 JNK、p38 和 ERK 的磷酸化水平, 结果显示, 细胞内 ERK、p38 和 JNK 的磷酸化水平

显著增加, 但提前孵育抗 LIMR 抗体 2 h 后再给予 AF-1 处理, 细胞内 ERK、p38 和 JNK 磷酸化的水平显著下降, 说明 AF-1 通过 LIMR 诱导 ERK、p38 和 JNK 的磷酸化 (图 4)。

2.5 MAPK信号通路在TGF- β 1诱导的A549细胞EMT改变中的作用

为了揭示各 MAPK 信号通路在 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞 EMT 改变中的作用, 加入 TGF- β 1 (5 ng/mL) 之前 2 h 分别加入终浓度为 10 μ mol/L ERK 阻断剂 PD98059、10 μ mol/L JNK 阻断剂 SP600125 及 10 μ mol/L p38 阻断剂 SB203580, 继续培养 48 h 后, 观察对 TGF- β 1 诱导 A549 细胞 EMT 的影响。结果显示, 加入 SB203580 后, α -SMA 的表达较 TGF- β 1 组有所减少, 而 E-cadherin 的表达较 TGF- β 1 组显

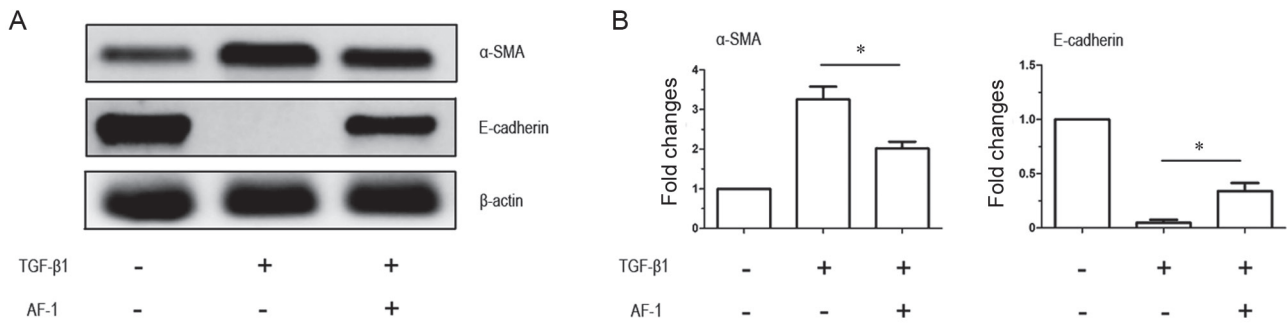


图 2. AF-1抑制TGF- β 1诱导的A549细胞EMT改变

Fig. 2. AF-1 attenuated TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in A549 cells. *A*: The representative Western blot of α -SMA and E-cadherin expression. *B*: The optical density analysis of α -SMA and E-cadherin expression. The result showed that AF-1 inhibited the effect of TGF- β 1 on the expression of α -SMA and E-cadherin. Before statistics and analysis, data are represented as a normalized relative fold change to control. The data are the results of three independent experiments. Bars: mean \pm SEM. * $P \leq 0.05$.

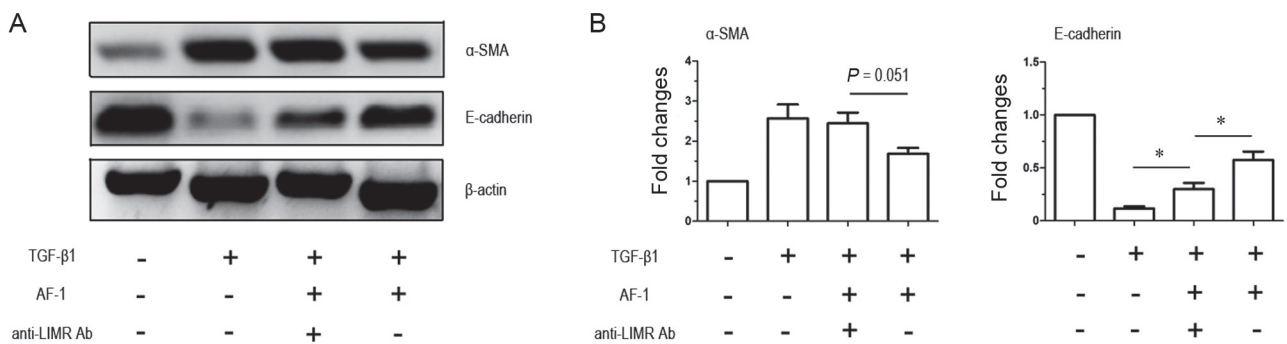


图 3. LIMR参与了AF-1对TGF- β 1诱导A549细胞EMT改变的抑制作用

Fig. 3. LIMR is involved in the inhibitory effect of AF-1 on epithelial-mesenchymal transition (EMT) in A549 cells. *A*: The representative Western blot of α -SMA and E-cadherin expression. *B*: The optical density analysis of α -SMA and E-cadherin expression. The result showed that AF-1 (100 μ mol/L) attenuated TGF- β 1-induced expression of α -SMA and restored cell border E-cadherin. However, the effect of AF-1 was inhibited by pretreatment with anti-LIMR antibody (50 μ g/mL). Before statistics and analysis, data are represented as a normalized relative fold change to control. The data are the result of three independent experiments. Bars: mean \pm SEM. * $P \leq 0.05$.

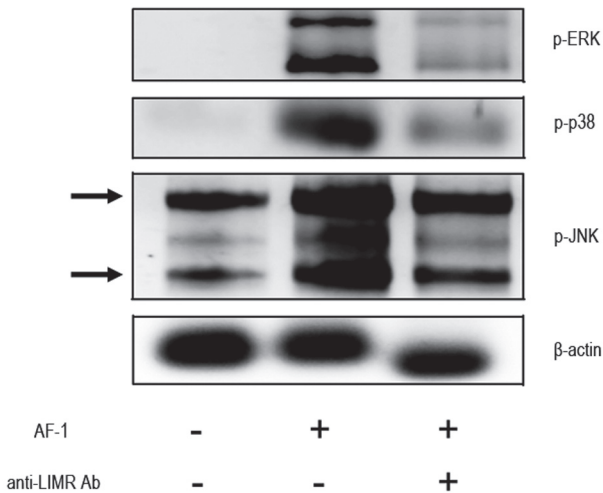


图 4. AF-1通过LIMR激活MAPK信号通路
Fig. 4. AF-1 induced JNK, p38, and ERK activation through LIMR. The representative Western blot results of the phosphorylation of JNK, p38 and ERK showed that the phosphorylation of JNK, p38 and ERK was induced by AF-1. After pretreatment with anti-LIMR antibody (50 μg/mL), the phosphorylation of JNK, p38 and ERK was reduced.

著增加，说明 p38 通路在 TGF-β1 诱导的 A549 细胞 EMT 改变中发挥了关键作用；在加入 SP600125 后，α-SMA 的表达较 TGF-β1 组未见明显变化，而 E-cadherin 的表达较 TGF-β1 组出现了明显增加，说明 JNK 通路在 TGF-β1 诱导的 A549 细胞的 EMT

改变中也发挥了重要作用；而加入 PD98059 后，我们发现 α-SMA 及 E-cadherin 的表达较 TGF-β1 组均没有明显改变，说明 ERK 通路在 TGF-β1 诱导的 A549 细胞的 EMT 改变中不发挥作用 (图 5)。

2.6 ERK信号通路参与了AF-1对TGF-β1诱导A549细胞EMT的抑制作用

由于 AF-1 激活了 LIMR 下游的 p38、JNK 和 ERK 信号通路，这些信号通路也可能对 AF-1 作用的发挥具有一定影响。因此我们采用对 TGF-β1 诱导的 EMT 无明显作用的 ERK 通路阻断剂 PD98059 来研究 AF-1 抑制 TGF-β1 诱导的 A549 细胞 EMT 的作用机制。结果显示，加入 ERK 阻断剂 PD98059 后，TGF-β1+AF-1+PD98059 组 α-SMA 的表达较 TGF-β1+AF-1 处理组无显著差异；而 TGF-β1+AF-1+PD98059 组 E-cadherin 的表达明显低于 TGF-β1+AF-1 处理组，表明 PD98059 在一定程度上减弱了 AF-1 对 TGF-β1 诱导的 A549 细胞 EMT 的抑制作用，提示 ERK 信号通路参与了 AF-1 对 TGF-β1 诱导 A549 细胞 EMT 的抑制作用 (图 6)。

3 讨论

目前研究认为，肺泡上皮细胞在肺纤维化的发生和发展中具有重要作用。一方面，肺泡上皮细胞大量减少，特别是具有再生和分化能力的 II 型上皮细胞的缺失，将不能修复损伤的肺组织，破坏的肺

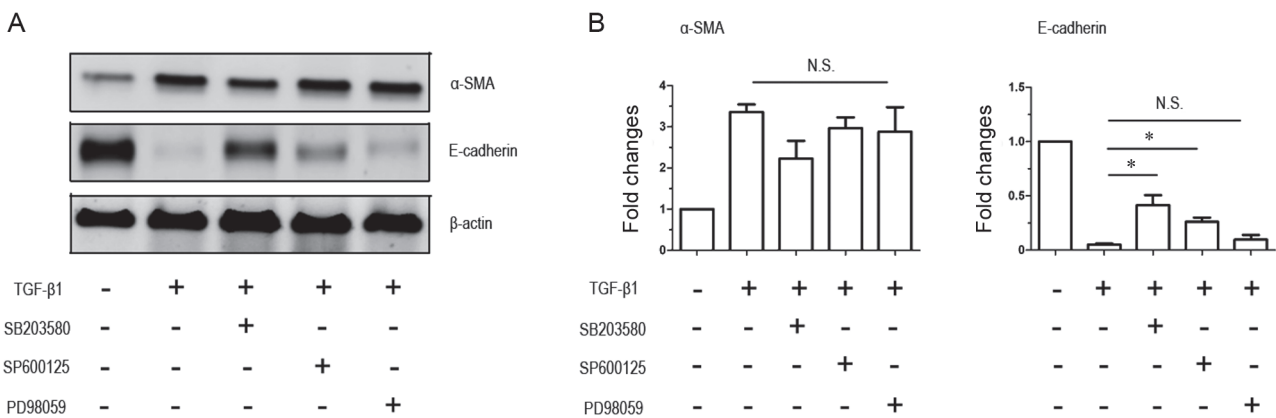


图 5. MAPK信号通路在TGF-β1诱导的A549细胞EMT改变中的作用
Fig. 5. The effect of MAPK pathway on TGF-β1-induced EMT in A549 cells. A: The representative Western blot of α-SMA and E-cadherin expression. B: The optical density analysis of α-SMA and E-cadherin expression. The result showed that the specific blocker of p38 (SB203580) attenuated TGF-β1-induced EMT in A549 cells and JNK blocker SP600125 had partial inhibitory effect on E-cadherin expression, whereas specific ERK blocker PD98059 had no effect on TGF-β1-induced EMT in A549 cells. Before statistics and analysis, data are represented as a normalized relative fold change to control. The data are the result of three independent experiments. Bars: mean ± SEM. *P ≤ 0.05. N. S.: no significance.

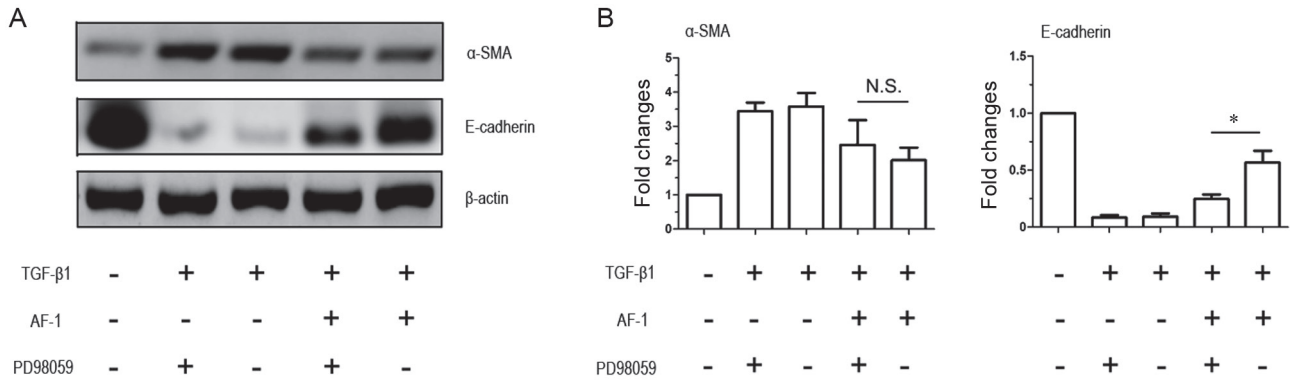


图 6. ERK信号通路参与了AF-1对TGF-β1诱导A549细胞EMT的抑制作用

Fig. 6. AF-1 suppressed the TGF-β1-induced EMT in A549 cells partly through ERK pathway. *A*: The representative Western blot of α-SMA and E-cadherin expression. *B*: The optical density analysis of α-SMA and E-cadherin expression. The result showed that AF-1 inhibited the effect of TGF-β1 on A549 cells. However, the effect of AF-1 (100 μmol/L) was partly blocked by pretreatment with specific ERK blocker PD98059 (10 μmol/L). Before statistics and analysis, data are represented as a normalized relative fold change to control. The data are the result of three independent experiments. Bars: mean ± SEM. * $P \leq 0.05$. N. S.: no significance.

泡结构被间质细胞填充^[12]。另一方面，肺泡上皮细胞通过EMT转化为肌成纤维细胞，进而参与肺纤维化的发生和发展。鉴于肺泡上皮细胞在肺纤维化发生和发展中发挥至关重要的作用，目前，许多抗肺纤维化药物的靶点都集中在抑制肺泡上皮细胞的间质转化上^[13-15]。由于目前尚无人肺泡上皮细胞株，而原代的人肺泡上皮细胞难以获取，因此，我们采用A549细胞来替代人肺泡上皮细胞进行相关研究。本研究探讨AF-1对TGF-β1诱导的A549细胞EMT的影响及其信号途径，以进一步揭示AF-1抗肺纤维化发生的机制。

E-cadherin是上皮细胞的主要标志物之一，是上皮细胞中维持细胞连接的主要蛋白，其蛋白特点为胞内和胞外都具有较长的结构域，这种结构特点能够促进和稳固细胞间的粘着。E-cadherin表达减少将会损害细胞间的连接，减弱对细胞迁移的束缚，同时释放β-catenin转移至细胞核而诱导EMT相关基因的表达^[3, 16]。α-SMA主要在血管平滑肌中表达，调节细胞的收缩，也在非肌肉细胞中表达，主要控制细胞的运动和结构。当上皮细胞发生EMT时，α-SMA基因的表达显著增加，细胞迁移能力增强^[17]。本研究结果显示，AF-1能够降低TGF-β1诱导的间质细胞标志物α-SMA基因的表达，而减弱了TGF-β1对上皮细胞标志物E-cadherin基因表达的压制。因此，AF-1能够抑制TGF-β1诱导的A549细胞EMT改变。

AF-1对应于UG分子中的第39~47位氨基酸残

基(MQMKKVLDS)，具有多种与UG相似的生物活性，我们在前期研究中证实AF-1能够特异性地与NIH3T3表面LIMR结合，而且，通过与LIMR相互作用，AF-1能够抑制TGF-β1诱导的NIH3T3细胞的增殖^[9, 10]。在本研究中，我们加入抗LIMR抗体来阻断AF-1与LIMR的结合，观察AF-1对TGF-β1诱导A549细胞EMT的抑制作用是否改变。结果表明，LIMR参与了AF-1对TGF-β1诱导A549细胞EMT改变的抑制作用。值得一提的是，预孵育抗LIMR抗体完全阻断了AF-1对TGF-β1调节α-SMA表达的作用，而只部分阻断了AF-1对TGF-β1调节E-cadherin表达的作用，因此，可能存在其他机制参与了AF-1对TGF-β1诱导A549细胞EMT改变的抑制作用。例如，AF-1能够显著抑制磷脂酶A2的活性和谷氨酰胺转移酶的活性^[7, 18]，而磷脂酶A2和谷氨酰胺转移酶在上皮细胞EMT的转变中都具有重要作用^[19, 20]。

MAPK是动物体内广泛存在的一类苏/丝氨酸蛋白激酶，可以被多种细胞外信号激活，并能够介导多种生物学效应。MAPK家族的信号通路主要包括ERK、JNK、p38、ERK5/BMK1四条途径，其中前三条途径研究的较为广泛^[21]。当给予AF-1处理A549细胞后，我们观察到AF-1能够促使A549细胞中ERK、JNK、p38的磷酸化水平升高，而在预孵育抗LIMR抗体后，ERK、JNK、p38的磷酸化水平平均明显降低，说明LIMR参与了AF-1对MAPK信号通路的激活。为了进一步研究AF-1抑

制 EMT 的作用机制, 我们研究了 MAPK 信号通路在 TGF- β 1 诱导 EMT 中的作用, 结果显示 JNK 和 p38 的通路阻断剂单独作用能够抑制 TGF- β 1 诱导的 EMT, 而 ERK 通路阻断剂则对 TGF- β 1 诱导的 EMT 无显著作用。目前, ERK 通路对 TGF- β 1 发挥作用的影响还存在一定争议, 有学者认为, 不同种类的细胞, ERK 通路对 TGF- β 1 作用的发挥存在不同的影响, 在间质细胞中, ERK 通路的影响较大, 而在上皮细胞中, ERK 通路则影响很小^[14, 22, 23]。本研究结果显示, ERK 通路在 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞 EMT 改变中不发挥作用。但是在 TGF- β 1+AF-1 组给予 ERK 通路阻断剂 PD98059 预孵育后, E-cadherin 的表达较未经 PD98059 处理组明显减少, 而 α -SMA 的表达较未经 PD98059 处理组未见明显变化, 说明 AF-1 的作用在一定程度上被 ERK 阻断剂所抑制。因此, 其他通路例如 JNK、p38 等对 AF-1 生物学作用的影响还有待进一步研究。

AF-1-LIMR-ERK 轴究竟以何种方式或途径抑制了 TGF- β 1 作用的发挥目前并不清楚, 是通过 ERK 直接影响了 EMT 相关基因的调节还是干扰了 TGF- β /Smad 信号通路还有待进一步研究。大量研究表明, Smad 信号通路和 MAPK 信号通路有交互影响^[24]。ERK 能够分别诱导 Smad2 和 Smad3 分子内链接区域的磷酸化位点发生磷酸化, 从而使 TGF- β 激活的 Smad 蛋白无法转移至核内, 造成 Smad 蛋白在胞浆内滞留从而抑制 TGF- β 的作用^[25, 26]。同时, ERK 并不是 MAPK 通路中唯一能够磷酸化 Smad 链接区的蛋白, JNK 同样能够诱导 Smad3 分子内链接区域的磷酸化位点发生磷酸化^[27]。并且, MAPK 信号通路能够通过调节 Smad7 的表达而影响 TGF- β 作用的发挥^[28]。

鉴于肺泡上皮细胞发生 EMT 在肺纤维化中具有重要作用, 本研究深入探讨了 AF-1 对 TGF- β 1 诱导的肺泡上皮细胞 EMT 的影响及其作用机制。结果证实 AF-1 能够抑制 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞 EMT 转变, 该作用有赖于 LIMR 及其下游 ERK 信号通路的参与。该研究为肺纤维化的治疗提供了新的方法并提示 LIMR 可以作为肺纤维化治疗的新靶点。

参考文献

- 1 Rossi G, Spagnolo P. Biopsy in idiopathic pulmonary fibrosis: back to the future. *Expert Rev Respir Med* 2017; 11(9): 679–684.
- 2 Kreuter M, Bonella F, Wijsenbeek M, Maher TM, Spagnolo P. Pharmacological treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: current approaches, unsolved issues, and future perspectives. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 329481.
- 3 Lee K, Nelson CM. New insights into the regulation of epithelial-mesenchymal transition and tissue fibrosis. *Int Rev Cell Mol Biol* 2012; 294: 171–221.
- 4 Gabasa M, Duch P, Jorba I, Giménez A, Lugo R, Pavelescu I, Rodríguez-Pascual F, Molina-Molina M, Xaubet A, Pereda J, Alcaraz J. Epithelial contribution to the profibrotic stiff microenvironment and myofibroblast population in lung fibrosis. *Mol Biol Cell* 2017; 28(26): 3741–3755.
- 5 Guan R, Wang X, Zhao X, Song N, Zhu J, Wang J, Wang J, Xia C, Chen Y, Zhu D, Shen L. Emodin ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats by suppressing epithelial-mesenchymal transition and fibroblast activation. *Sci Rep* 2016; 6: 35696.
- 6 Cabrera-Benítez NE, Parotto M, Post M, Han B, Spieth PM, Cheng WE, Valladares F, Villar J, Liu M, Sato M, Zhang H, Slutsky AS. Mechanical stress induces lung fibrosis by epithelial-mesenchymal transition. *Crit Care Med* 2012; 40(2): 510–517.
- 7 Miele L, Cordella-Miele E, Facchiano A, Mukherjee AB. Novel anti-inflammatory peptides from the region of highest similarity between uteroglobin and lipocortin I. *Nature* 1988; 335(6192): 726–730.
- 8 Miele L. Antiflammins. Bioactive peptides derived from uteroglobin. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 923: 128–140.
- 9 Liu W, Wan J, Han JZ, Li C, Feng DD, Yue SJ, Huang YH, Chen Y, Cheng QM, Li Y, Luo ZQ. Antiflammin-1 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Respir Res* 2013; 14: 101.
- 10 Li C, Han J, Li L, Yue S, Li J, Feng D, Liu H, Jiang D, Qin X, Luo Z. Interaction of antiflammin-1 with uteroglobin-binding protein induces phosphorylation of ERK1/2 in NIH 3T3 cells. *Peptides* 2007; 28(11): 2137–2145.
- 11 Li C (李晨), Liu W, Han JZ, Feng DD, Liu HJ, Luo ZQ. Bioinformatics of mouse uteroglobin binding protein and its polyclonal antibody preparation. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2013; 65(2): 217–223 (in Chinese with English abstract).
- 12 Yanagi S, Tsubouchi H, Miura A, Matsumoto N, Nakazato M. Breakdown of epithelial barrier integrity and overdrive activation of alveolar epithelial cells in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome and lung fibrosis. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 573210.
- 13 Zhou XM, Wang GL, Wang XB, Liu L, Zhang Q, Yin Y, Wang QY, Kang J, Hou G. GHK peptide inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by suppressing TGF β 1/Smad-mediated epithelial-to-mesenchymal transition. *Front Pharmacol* 2017; 8: 904.

- 14 Xi Y, Tan K, Brumwell AN, Chen SC, Kim YH, Kim TJ, Wei Y, Chapman HA. Inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis by methacycline. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014; 50(1): 51–60.
- 15 Chen H, Chen Q, Jiang CM, Shi GY, Sui BW, Zhang W, Yang LZ, Li ZY, Liu L, Su YM, Zhao WC, Sun HQ, Li ZZ, Fu Z. Triptolide suppresses paraquat induced idiopathic pulmonary fibrosis by inhibiting TGFB1-dependent epithelial mesenchymal transition. *Toxicol Lett* 2018; 284: 1–9.
- 16 Gloushankova NA, Rubtsova SN, Zhitnyak IY. Cadherin-mediated cell-cell interactions in normal and cancer cells. *Tissue Barriers* 2017; 5(3): e1356900.
- 17 Kyung SY, Kim DY, Yoon JY, Son ES, Kim YJ, Park JW, Jeong SH. Sulforaphane attenuates pulmonary fibrosis by inhibiting the epithelial-mesenchymal transition. *BMC Pharmacol Toxicol* 2018; 19(1): 13.
- 18 Moreno JJ. Effects of antiinflammins on transglutaminase and phospholipase A2 activation by transglutaminase. *Int Immunopharmacol* 2006 ; 6(2): 300–303.
- 19 Chen L, Fu H, Luo Y, Chen L, Cheng R, Zhang N, Guo H. cPLA2 α mediates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer through PI3k/Akt signaling. *Cell Death Dis* 2017; 8(4): e2728.
- 20 Kumar A, Xu J, Brady S, Gao H, Yu D, Reuben J, Mehta K. Tissue transglutaminase promotes drug resistance and invasion by inducing mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *PLoS One* 2010; 5(10): e13390.
- 21 Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011; 75(1): 50–83.
- 22 Tan WJ, Tan QY, Wang T, Lian M, Zhang L, Cheng ZS. Calpain 1 regulates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in human lung epithelial cells via PI3K/Akt signaling pathway. *Am J Transl Res* 2017; 9(3): 1402–1409.
- 23 Chen LX, Yang K, Sun M, Chen Q, Wang ZH, Hu GY, Tao LJ. Fluorofenidone inhibits transforming growth factor-beta1 induced cardiac myofibroblast differentiation. *Pharmazie* 2012; 67(5): 452–456.
- 24 West J. Cross talk between Smad, MAPK, and actin in the etiology of pulmonary arterial hypertension. *Adv Exp Med Biol* 2010; 661: 265–278.
- 25 Chen W, Kang KL, Alshaikh A, Varma S, Lin YL, Shin KH, Kim R, Wang CY, Park NH, Walentin K, Schmidt-Ott KM, Kang MK. Grainyhead-like 2 (GRHL2) knockout abolishes oral cancer development through reciprocal regulation of the MAP kinase and TGF- β signaling pathways. *Oncogenesis* 2018; 7(5): 38.
- 26 Javelaud D, Mauviel A. Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis. *Oncogene* 2005; 24(37): 5742–5750.
- 27 Wu YH, Ai X, Liu FY, Liang HF, Zhang BX, Chen XP. c-Jun N-terminal kinase inhibitor favors transforming growth factor- β to antagonize hepatitis B virus X protein-induced cell growth promotion in hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep* 2016; 13(2): 1345–1352.
- 28 Shukla MN, Rose JL, Ray R, Lathrop KL, Ray A, Ray P. Hepatocyte growth factor inhibits epithelial to myofibroblast transition in lung cells via Smad7. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009; 40(6): 643–653.