

黄芩苷对转化生长因子 $\beta 1$ 诱导的 A549 细胞自噬作用的影响

王栋¹, 陈召慧², 陈海红¹, 徐梦真¹, 巩丽丽¹, 许艳³, 朱庆均^{4,5,6}(1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355; 2. 山东省即墨市中医院, 山东 青岛 266200; 3. 山东中医药大学中医学院, 山东 济南 250355; 4. 山东中医药大学中医药创新研究院, 山东 济南 250355; 5. 山东省高校中医药抗病毒协同创新中心, 山东 济南 250355; 6. 教育部中医药经典理论研究重点实验室, 山东 济南 250355)

摘要: **目的** 探讨黄芩苷对转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)诱导的 A549 细胞自噬作用的影响。**方法** 采用不同浓度 TGF- $\beta 1$ (2.5、5、10 ng·mL⁻¹)诱导 A549 细胞 48 h 后, 检测其 Collagen I 基因与自噬相关基因表达水平, 以确定模型复制的最佳条件。在高、中、低剂量(200、100、50 μ g·mL⁻¹)黄芩苷对 TGF- $\beta 1$ 诱导的 A549 细胞模型干预后, 采用 RT-qPCR 法检测细胞的肺纤维化标志基因 Collagen I 及自噬相关基因(ATG3、ATG5、ATG7、ATG12)的表达; Western Blot 法检测自噬调节标志蛋白 p62、LC3B II/I 的表达; 通过转染 Ad-mCherry-GFP-LC3B 双荧光标记腺病毒检测细胞中自噬流的情况。**结果** 使用 10 ng·mL⁻¹ TGF- $\beta 1$ 诱导 A549 细胞 48 h 后, Collagen I 基因表达显著上调, ATG3、ATG5、ATG7、ATG12 基因表达明显下调, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。经黄芩苷干预后, 与模型组相比, 黄芩苷高剂量组(200 μ g·mL⁻¹)A549 细胞的 Collagen I 基因表达显著下调($P < 0.01$), ATG3、ATG5、ATG7、ATG12 基因表达明显上调($P < 0.05$); 黄芩苷各给药组 A549 细胞的 p62 蛋白表达显著下调($P < 0.05$, $P < 0.01$), LC3B II/I 蛋白表达显著上调($P < 0.05$, $P < 0.01$); 黄芩苷高剂量组的细胞自噬能力明显激活。**结论** 黄芩苷可能在减少 TGF- $\beta 1$ 诱导的 A549 细胞外基质沉积的同时, 能够增强细胞的自噬水平, 可能是治疗肺纤维化的有效成分。

关键词: 黄芩苷; 肺纤维化; 细胞外基质沉积; 自噬; 转化生长因子 $\beta 1$; A549 细胞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)09-1254-06

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.09.004

Effect of Baicalin on Autophagy in A549 Cells Induced by TGF- $\beta 1$

WANG Dong¹, CHEN Zhaohui², CHEN Haihong¹, XU Mengzhen¹, GONG Lili¹, XU Yan³, ZHU Qingjun^{4,5,6}(1. College of Pharmaceutical Science, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355 Shandong, China; 2. Jimo Municipal Hospital of Chinese Medicine, Qingdao 266200 Shandong, China; 3. College of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355 Shandong, China; 4. Innovative Institute of Chinese Medicine and Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355 Shandong, China; 5. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Classical Theory, Jinan 250355 Shandong, China; 6. The Ministry of Education Antiviral Synergistic Innovation Center of Traditional Chinese Medicine in Universities of Shandong, Jinan 250355 Shandong, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of baicalin on autophagy in A549 cell model induced by transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). **Methods** A549 cells were induced and cultured with different concentrations of TGF- $\beta 1$ (2.5 ng·mL⁻¹, 5 ng·mL⁻¹, 10 ng·mL⁻¹) for 48 h. The expression of Collagen I and autophagy related genes were detected. After the TGF- $\beta 1$ induced A549 cell model was stimulated by baicalin (200 μ g·mL⁻¹, 100 μ g·mL⁻¹, 50 μ g·mL⁻¹), the expression of Collagen I and autophagy related genes (ATG3, ATG5, ATG7, ATG12) was detected by RT-qPCR. The expression of p62 and LC3B II/I was detected by Western Blot. The changes of

收稿日期: 2020-11-25

作者简介: 王栋, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中医药治疗纤维化疾病的药效与机制研究。Email: 1192672578@qq.com。通信作者: 朱庆均, 男, 博士, 教授, 研究方向: 中医药治疗肿瘤、纤维化疾病的药效与机制研究。Email: zhuqingjunen@hotmail.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81774169); 山东省中医药科技发展计划项目(2019-0040); 山东中医药大学优秀青年科学基金项目(2018ZK36)。

autophagy flow were detected by transforming Ad-mCherry-GFP-LC3B(double-labeled fluorescent protein). **Results** After A549 cells were induced with $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TGF- $\beta 1$ for 48 h, the expression of Collagen I was significantly increased ($P < 0.05$), and the expression of autophagy related genes (ATG3, ATG5, ATG7, ATG12) was significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). After $200 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ baicalin stimulation, compared with the model group, the expression of Collagen I was decreased ($P < 0.05$), and the expression of autophagy related genes (ATG3, ATG5, ATG7, ATG12) was increased ($P < 0.05$). In all baicalin treated groups, the expression of p62 protein in A549 cells was significantly down-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the expression of LC3B II/I was significantly up-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The effect of baicalin on autophagy may be related to the increase of LC3B I to LC3B II transformation ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the decrease of p62 protein accumulation ($P < 0.05$), and the enhancement of autophagy flow was significantly enhanced in high dose baicalin group. **Conclusion** Baicalin can enhance the level of autophagy in A549 cell model induced by TGF- $\beta 1$ at the same time of reducing extracellular matrix deposition, which may be an effective component in the treatment of pulmonary fibrosis.

Keywords: Baicalin; pulmonary fibrosis; extracellular matrix deposition; autophagy; TGF- $\beta 1$; A549 cells

肺纤维化是一种慢性、进行性和破坏性的间质性肺病,其病理特征是细胞外基质过度沉积,肺间质纤维瘢痕化和肺组织结构重塑^[1]。近年来,肺纤维化的发病率与死亡率逐步上升^[2]。转化生长因子 $\beta 1$ (Transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)可促进肺纤维化的发生,其介导人肺泡上皮细胞发生上皮间质转化后,造成细胞外基质沉积^[3]。研究^[4]发现,人肺癌 A549 细胞为类 II 型肺泡上皮细胞,使用 TGF- $\beta 1$ 诱导后成为研究肺纤维化相关作用机制的常用体外模型。此外,越来越多的证据表明维持细胞内环境稳态的自噬与肺纤维化的发生发展过程密切相关^[5]。

黄芩苷是从唇形科植物黄芩的干燥根中提取的黄酮类化合物,是中药黄芩的主要有效成分。已有研究发现,黄芩苷具有抗器官纤维化^[6]、抗肿瘤^[7]等药理作用。本研究拟通过 TGF- $\beta 1$ 诱导 A549 细胞复制肺纤维化体外模型。基于前期研究^[8]基础,以高、中、低(200 、 100 、 $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)浓度黄芩苷干预 TGF- $\beta 1$ 诱导的 A549 细胞模型,探讨黄芩苷治疗肺纤维化的自噬调节作用,以期为其在治疗肺纤维化方面的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞 人肺癌 A549 细胞,由山东中医药大学实验中心王晓龙老师惠赠。

1.2 药物及试剂 黄芩苷(纯度 $\geq 98\%$),北京索莱宝生物科技有限公司,批号:SB8020。称取黄芩苷 10 mg ,加入二甲基亚砷溶液定容至 25 mL ,溶解后配成浓度为 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液; $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存,使用时用培养液按比例稀

释至所需浓度。

新生牛血清,浙江天杭生物科技股份有限公司,批号:22012-8612;PRMI 1640 培养基(批号:8117069)、青链霉素混合液(批号:15140-122),均购自美国 Gibco 公司;重组人 TGF- $\beta 1$,美国 Peprotech 公司,批号:0614209-1;RNAiso Plus(批号:AKA5502)、反转录试剂盒(批号:AK3001)、RT-qPCR 试剂盒(批号:AK7001),均购自日本 TaKaRa 公司;RIPA 蛋白裂解液(批号:P0013B)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:P0012S)、鼠单抗 p62(批号:AF0279)、兔多抗 LC3B(批号:AL221)、鼠单抗 β -actin(批号:AF0003)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔(批号:A0208)及山羊抗鼠(批号:A0206) IgG、Ad-mCherry-GFP-LC3B(批号:C3011-1ml),均购自上海碧云天生物技术公司。

1.3 主要仪器 EX225ZH/AD 万分之一电子天平,常州奥斯豪仪器有限公司;HERACELL 150i CO_2 培养箱、QuantStudio 5 高分辨实时荧光定量 PCR 仪,美国 Thermo Scientific 公司;5424R 型高速低温离心机,德国 Eppendorf 公司;Cytation 5 细胞成像酶标仪,美国 Bio-Tek 公司;1658004 型垂直电泳槽、Trans-Blot Turbo 转印系统,美国 Bio-Rad 公司;AI600 型自动化学发光凝胶成像仪,美国 GE 公司;CKX41SF 型倒置荧光显微镜,日本 Olympus 公司。

1.4 细胞培养及肺纤维化体外模型的复制 用含 10% 新生牛血清、1% 青链霉素混合液的 PRMI 1640 培养基培养 A549 细胞,置于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。选择处于对数生长期的细胞进行实验,调整细胞密度为 $1.0 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$,接种于 6 孔板中;分为对照

组、TGF- β 1 组(TGF- β 1 终浓度为 2.5、5、10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 每组重复 3 个复孔, 于培养箱中培养 48 h。采用 RT-qPCR 法检测细胞的肺纤维化标志基因 Collagen I 及自噬相关基因 ATG3、ATG5、ATG7、ATG12 的表达, 以确定模型复制最佳条件。

1.5 RT-qPCR 法检测 Collagen I 基因及自噬相关基因的表达 将 A549 细胞以 $1.0\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$ 细胞密度接种于 6 孔板, 设置对照组、模型组(10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ TGF- β 1)及黄芩苷高、中、低剂量组(10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ TGF- β 1+200、100、50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 黄芩苷), 重复 3 个复孔。培养 48 h 后收集细胞, 根据试剂盒说明书提取总 RNA, 检测 RNA 含量与纯度后逆转录为 cDNA, 逆转录条件为: 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保持。然后进行 PCR 反应, 循环条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 40 个循环。以 β -actin 为内参基因, 检测 Collagen I 基因及自噬相关基因 ATG3、ATG5、ATG7、ATG12 的相对表达水平。相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算, 对照组基因表达量设为 1。PCR 引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Sequences of primers used in quantitative PCR

引物名称	引物序列
β -actin	Forward primer: 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3'
	Reverse primer: 5'-CTGGAAGTGGACAGCGAGG-3'
Collagen I	Forward primer: 5'-GCTTGGTCCACTTGCTTGAAGA-3'
	Reverse primer: 5'-GAGCATTCCTTTGATTGCTG-3'
ATG3	Forward primer: 5'-CGGCTCTGGCTGTTTGGCTATG-3'
	Reverse primer: 5'-GCTGCTGGGAGGTGAGGATGG-3'
ATG5	Forward primer: 5'-ATATGAAGGCACACCCCTGAAATGG-3'
	Reverse primer: 5'-GTGATGTTCCAAGGCAGAGCTGAG-3'
ATG7	Forward primer: 5'-GATGCTGAACCTCAGCGGATGTATG-3'
	Reverse primer: 5'-CCAGCAGCAGGCACTTGACAG-3'
ATG12	Forward primer: 5'-CCAGAAACAGCCATCCAGAGC-3'
	Reverse primer: 5'-GGAAGGGGCAAAGGACTGATTAC-3'

1.6 Western Blot 法检测自噬调节标志蛋白 p62、LC3B II/I 的表达 选择对数生长期 A549 细胞, 调整细胞密度为 $1.0\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$, 接种于 6 孔板; 设置对照组、模型组(10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ TGF- β 1)及黄芩苷高、中、低剂量组(10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ TGF- β 1+200、100、50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 黄芩苷), 重复 3 个复孔。细胞培养 48 h 后, 使用含 PMSF 的 RIPA 裂解液提取总蛋白(含有 1%磷酸酶抑制剂: 1% PMSF), 以 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 $\times g$ 离心 15 min; 依据 BCA 试剂盒说明书步骤检测上清液蛋白浓度; 加上样缓冲液和 RIPA 制备样品。上样

30 μg 样品蛋白与 Marker 蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳, 转移至 PVDF 膜, 5%脱脂奶粉封闭 2 h; 过夜孵育一抗[p62(1:800)、 β -actin(1:1 000)鼠抗单克隆抗体及 LC3B(1:1 000)兔抗多克隆抗体]、洗涤; 加入二抗[辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG 抗体(1:1 000)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 抗体(1:1 000)], 室温孵育 1 h。使用 ECL 显影并扫描, 采用 ImageJ 软件计算 Western Blot 蛋白条带 OD 值, 以 β -actin 为内参, 进行半定量分析。

1.7 腺病毒转染法检测细胞中自噬流的情况 将细胞密度为 $1.0\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 A549 细胞接种于 24 孔板, 按照“1.5”项下方法分组、培养。依照试剂盒说明书步骤操作, 采用 Ad-mCherry-GFP-LC3B 双荧光标记腺病毒转染细胞, 除去病毒后添加培养液。于荧光显微镜下拍摄上、下、左、右、中 5 个视野的细胞, 获得自噬流图片, 进行相关分析。

1.8 统计学处理方法 采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析; 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示; 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 检验; 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

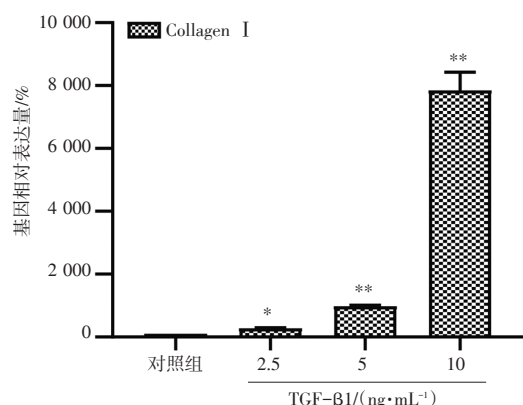
2 结果

2.1 TGF- β 1 诱导 A549 细胞 Collagen I 基因与自噬相关基因表达的变化 结果见图 1、图 2。TGF- β 1 诱导 A549 细胞后, 细胞肺纤维化标志基因 Collagen I 随 TGF- β 1 浓度增加而呈上升趋势, 而自噬相关基因 ATG3、ATG5、ATG7、ATG12 的表达出现不同程度降低, 反映 A549 细胞中存在自噬水平降低。与对照组相比, 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ TGF- β 1 组的 Collagen I 基因表达显著上调, ATG3、ATG5、ATG7、ATG12 基因表达明显下调, 差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。因此, 本实验选择使用 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ TGF- β 1 诱导 A549 细胞复制肺纤维化体外模型, 培养时间为 48 h。

2.2 黄芩苷对 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞 Collagen I 基因及自噬相关基因表达的影响 结果见图 3、图 4。与对照组相比, 模型组 A549 细胞 Collagen I 基因表达显著上调($P<0.01$), ATG3、ATG5、ATG7、ATG12 基因表达明显下调($P<0.05$)。与模型组比较, 黄芩苷高剂量组(200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)A549 细胞的 Collagen I 基因表达显著下调($P<0.01$), ATG3、ATG5、ATG7、ATG12 基因表达明显上调($P<0.05$)。

2.3 黄芩苷对 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞自噬调节蛋白 p62、LC3B II/I 表达的影响

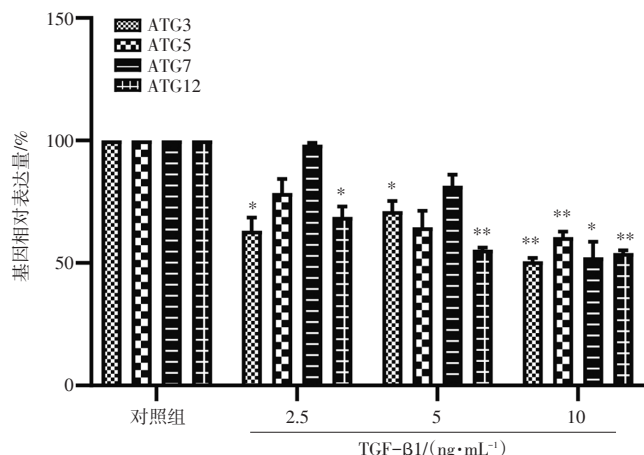
结果见图 5、图 6。与对照组相比,模型组 A549 细胞的 p62 及 LC3B II/I 蛋白表达均有下调,但差异无统计学意义($P>0.05$)。模型组细胞 p62 蛋白表达略有下调的原因,可能是 p62 蛋白在细胞内过表达导致 p62 蛋白包涵体样堆积,特别是自噬流受阻时, p62 出现不可溶堆积,造成 Western Blot 实验检测其可溶形式出现略有下降^[9]。与模型组比较,黄芩苷给药组 A549 细胞的 p62 蛋白表达显著下调($P<0.05$, $P<0.01$), LC3B II/I 蛋白表达显著上调($P<0.05$, $P<0.01$)。结果表明,黄芩苷能够调节 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞自噬调节蛋白 p62、LC3B II/I 的表达。



注:与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图 1 不同浓度 TGF- β 1 诱导 A549 细胞的 Collagen I 基因表达情况($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 1 The expression of Collagen I gene in A549 cells induced by different concentrations of TGF- β 1($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



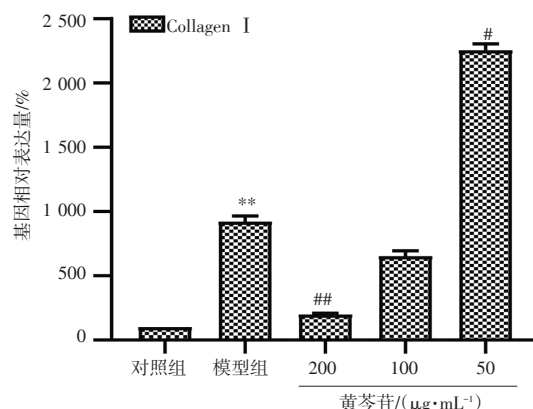
注:与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图 2 不同浓度 TGF- β 1 诱导 A549 细胞的自噬相关基因表达情况($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 2 The expression of autophagy-related genes in A549 cells induced by different concentrations of TGF- β 1($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.4 黄芩苷对 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞自噬流的影响

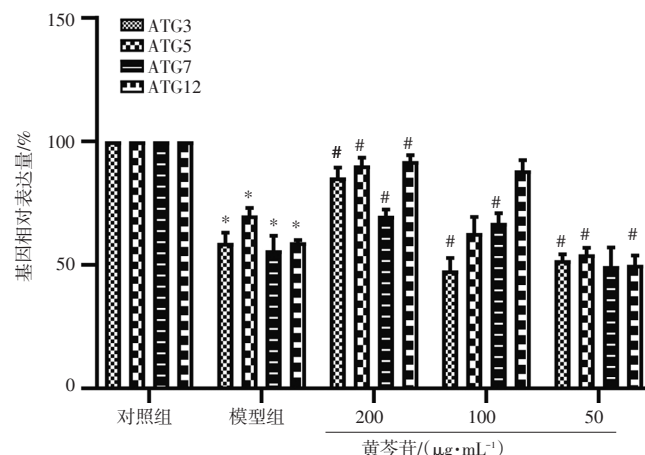
结果见图 7。通过融合表达 mCherry-GFP-LC3B 蛋白,可以有效地追踪自噬过程。在荧光显微镜下,可见 mCherry-GFP-LC3B 聚集在自噬体膜上,以黄色斑点的形式表现,当自噬体与溶酶体融合后,因 GFP 荧光部分淬灭而以红色斑点的形式表现。与对照组相比,模型组 A549 细胞的黄色斑点多于红色斑点,提示自噬体与溶酶体融合可能出现异常,自噬流阻断。与模型组相比,黄芩苷给药组 A549 细胞的红色、黄色斑点数量增多,且黄芩苷高剂量组($200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)细胞的红色斑点数量明显多于黄色斑点数量,表明细胞自噬能力明显激活。



注:与对照组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

图 3 黄芩苷对 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞 Collagen I 基因表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

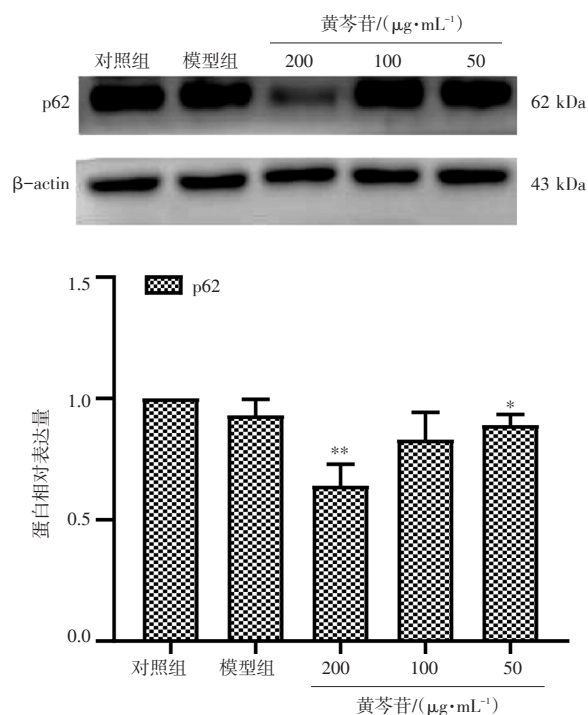
Figure 3 Effect of baicalin on Col I gene expression in A549 cells induced by TGF- β 1($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注:与对照组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, # $P<0.05$

图 4 黄芩苷对 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞自噬相关基因表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

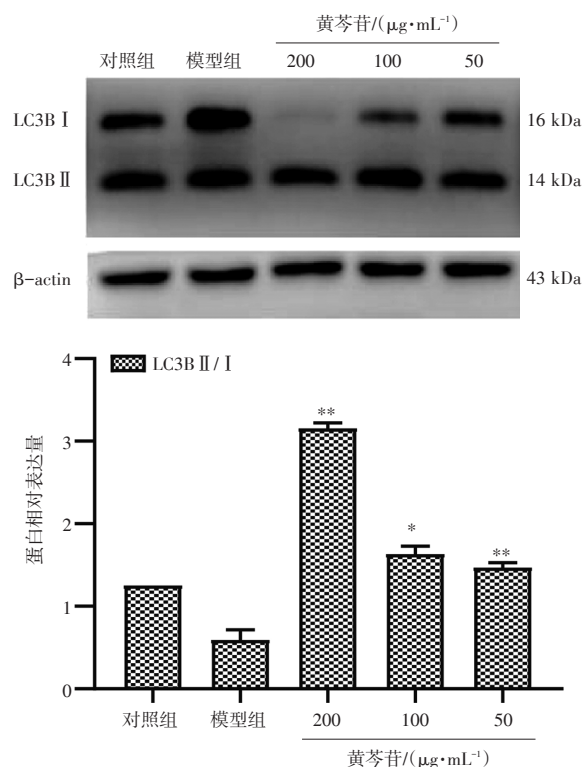
Figure 4 Effects of baicalin on the expression of autophagy-related genes in A549 cells induced by TGF- β 1($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注：与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

图5 黄芩苷对TGF- β 1诱导的A549细胞p62蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

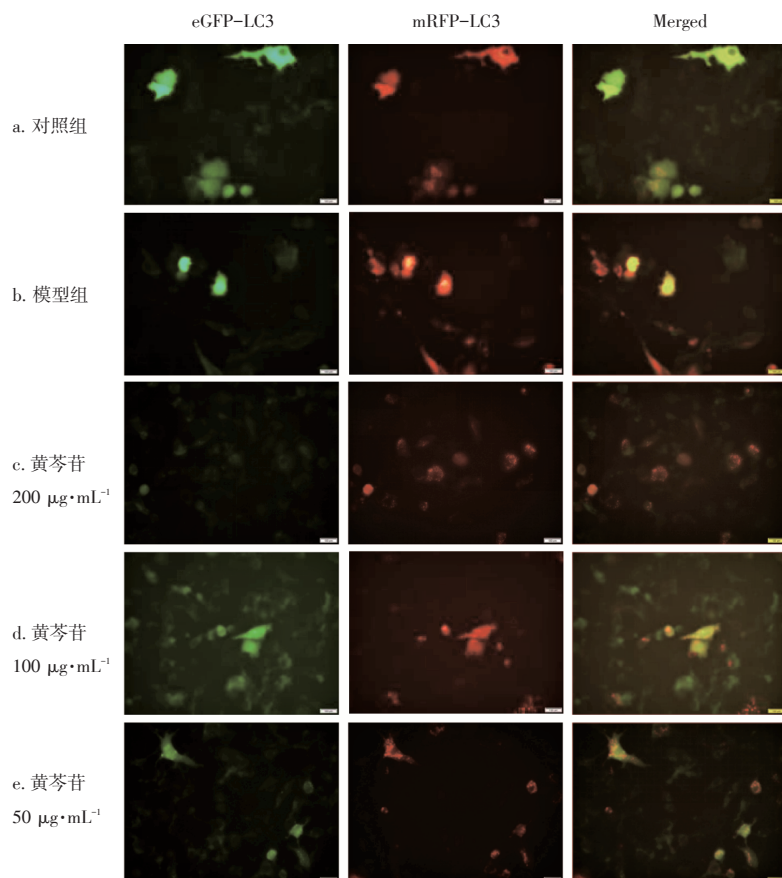
Figure 5 Effect of baicalin on p62 protein expression in A549 cells induced by TGF- β 1($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注：与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

图6 黄芩苷对TGF- β 1诱导的A549细胞LC3B II/I蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 6 Effect of baicalin on LC3B II/I protein expression in A549 cells induced by TGF- β 1($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注：绿色表示荧光蛋白 GFP 与 LC3B 的融合蛋白；红色表示荧光蛋白 mCherry 与 LC3B 的融合蛋白；红色亮点表示自噬溶酶体；黄色亮点表示自噬体

图7 黄芩苷对TGF- β 1诱导的A549细胞自噬流的影响(Ad-mCherry-GFP-LC3B, $\times 200$)

Figure 7 Effects of baicalin on autophagy flow induced by TGF- β 1 in A549 cells (Ad-mCherry-GFP-LC3B, $\times 200$)

3 讨论

细胞外基质沉积是肺纤维化发生发展的重要特征^[10]。转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 能够诱导内皮细胞、上皮细胞和成纤维细胞增殖, 并产生表型改变, 进一步导致 Collagen I 的合成与分泌增加。Collagen I 作为细胞外基质的主要成分之一, 参与构成组织修复的结构骨架, 在肺纤维化进程中起促进作用^[11]。在肺纤维化患者的肺组织中, Collagen I 与其他胶原亚型相比, 在细胞外基质中的沉积量更高^[12]。

有研究^[13]表明, 黄芩苷具有改善肺纤维化的作用, 在博来霉素诱导的大鼠肺纤维化模型中, 黄芩苷可以下调模型大鼠肺组织中结缔组织生长因子 (CTGF) 的表达, 同时抑制肺成纤维细胞增殖和胶原蛋白合成。还有研究^[14]表明, 黄芩苷在某些病理状态下能够增强自噬水平, 其可通过上调腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 磷酸化水平和下调哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 磷酸化水平而诱导自噬, 从而保护人皮肤成纤维细胞免受紫外线照射诱导的细胞凋亡。

本研究采用 TGF- $\beta 1$ 诱导 A549 细胞复制肺纤维化体外模型, 观察了黄芩苷对其自噬水平的影响。通过检测 Collagen I 基因与自噬相关基因 (ATG3、ATG5、ATG7、ATG12) 的表达, 确定最佳造模条件为 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TGF- $\beta 1$ 诱导 48 h。已有研究^[15]证明, 在肺纤维化患者的肺组织中可以检测到自噬活性的标志物蛋白 LC3B II 减少、p62 增加, 以及电镜下自噬体数量下降。自噬小体中存在的 LC3B I 和 LC3B II 均被视为细胞发生自噬的分子标志, 并且 LC3B II 的含量和发生自噬的程度成正比^[16]。p62 是检测自噬水平的标志性蛋白, 能够识别细胞废物, 结合多聚泛素化底物和自噬体形成成分, 当其发生积聚时被认为反映自噬水平不足^[17]。另外, 自噬流是自噬调节过程中连续出现的动态性过程, 其出现障碍后自噬将无法完成其生物学功能^[9]。本研究结果表明, 黄芩苷不仅能够下调 TGF- $\beta 1$ 诱导的 A549 细胞 Collagen I 基因的表达, 而且能够增强 LC3B I 向 LC3B II 转化, 减少 p62 蛋白积累。通过转染 Ad-mCherry-GFP-LC3B 双荧光标记腺病毒后发现, 黄芩苷能够增强 TGF- $\beta 1$ 诱导的 A549 细胞的自噬流水平。上述结果说明, 黄芩苷可能在减少 TGF- $\beta 1$ 诱导的 A549 细胞外基质沉积的同时, 能够增强细胞的自噬水平。

综上所述, 黄芩苷可能通过增强细胞自噬水平和减轻胶原积累而改善肺纤维化, 可作为治疗肺纤维化的有效药物而值得深入研究。而进一步探索肺纤

维化上皮细胞的胶原积累与自噬变化规律, 寻找相关作用靶点, 对于治疗肺纤维化具有一定意义。

参考文献:

- [1] GLASS D S, GROSSFELD D, RENNA H A, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: molecular mechanisms and potential treatment approaches[J]. *Respir Investig*, 2020, 58(5): 320-335.
- [2] RICHELDI L, COLLARD H R, JONES M G. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *New England Journal of Medicine*, 2018, 378(19): 1811-1823.
- [3] UPAGUPTA C, SHIMBORI C, ALSILMI R, et al. Matrix abnormalities in pulmonary fibrosis[J]. *Eur Respir Rev*, 2018, 27(148): e180033.
- [4] FOSTER K A, OSTER C G, MAYER M M, et al. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism[J]. *Exp Cell Res*, 1998, 243(2): 359-366.
- [5] MI S, LI Z, YANG H Z, et al. Blocking IL-17A promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis via TGF- $\beta 1$ -dependent and -independent mechanisms[J]. *J Immunol*, 2011, 187(6): 3003-3014.
- [6] 朱庆均. 黄芩苷与黄芩素治疗纤维化疾病研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(7): 1271-1276.
- [7] 褚冬青, 马春宇. 黄芩苷增强阿霉素抗人舌癌细胞活性及其机制研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(9): 1062-1068.
- [8] ZHU H Y, HAN L, SHI X L, et al. Baicalin inhibits autophagy induced by influenza A virus H3N2[J]. *Antiviral Res*, 2015, 113: 62-70.
- [9] 秦正红. 自噬——生物学与疾病: 基础卷[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2015: 415-435.
- [10] DENG Z, FEAR M W, SUK CHOI Y, et al. The extracellular matrix and mechanotransduction in pulmonary fibrosis[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2020, 126: e105802.
- [11] BRADLEY K, MCCONNELL-BREUL S, CRYSTAL R G, et al. Collagen in the human lung—quantitation of rates of synthesis and partial characterization[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2013, 123(3): 543-550.
- [12] YUKIKO N, GUOJUN S. EMT in developmental morphogenesis[J]. *Cancer Letters*, 2013, 341(1): 9-15.
- [13] 贾慧, 陈晓玲, 陈超, 等. 黄芩苷防止肺纤维化大鼠肺内结缔组织生长因子的上调[J]. *生理学报*, 2010, 62(6): 535-540.
- [14] ZHANG J A, LUAN C, HUANG D, et al. Induction of autophagy by baicalin through the AMPK-mTOR pathway protects human skin fibroblasts from ultraviolet B radiation-induced apoptosis[J]. *Drug Design Development and Therapy*, 2020, 14: 417-428.
- [15] PATEL A S, LIN L, GEYER A, et al. Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Plos One*, 2012, 7(7): e41394.
- [16] VISHNUPRIYA S, PRIYA DHARSHINI L C, SAKTHIVEL K M, et al. Autophagy markers as mediators of lung injury—implication for therapeutic intervention[J]. *Life Sci*, 2020, 260: e118308.
- [17] FAN L, YIN S, ZHANG E, et al. Role of p62 in the regulation of cell death induction[J]. *Apoptosis*, 2018, 23(3-4): 187-193.

(编辑: 邹元平)