DOI: 10.16016/j.1000-5404.201909108

七甲川花菁类荧光小分子 IR-61 改善大鼠肺纤维化

黄 玉[1,2],王子文[2],王会兰[3],罗 敏[1,2],张爱华[1],史春梦[1,2] 550025 贵阳,贵州医科大学公共卫生学院,环境污染与疾病监控教育部重点实验室[1]; 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系火箭军医学教研室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[2];646000 四川 泸州,西南医科大学附属医院肿瘤科[3]

[**摘要**] **目的** 探索七甲川花菁类荧光小分子 IR-61 在肺纤维化发生过程中的作用以及对肺成纤维细胞转分化、增殖和迁移的影响。**方法** 采用气管滴注博来霉素(bleomycin, BLM,2.5 mg/kg)建立大鼠肺纤维化模型;腹腔注射 PBS 或 IR-61(2.0 mg/kg,每周 2 次);BLM 处理 10 d 后,尾静脉注射 IR-61(2.0 mg/kg),于 24 h 后取各器官行近红外荧光成像(near infrared fluorescence imaging,NIR),观察 IR-61 在各器官的蓄积情况;治疗 28 d 后,取肺组织制作切片,行 HE 和 Masson 染色,显微镜下观察;采用 RT-PCR、Western blot 测定人肺成纤维细胞(human fetal lung fibroblast, HFL1)与原代大鼠肺成纤维细胞转分化及增殖相关基因 Collagen-1、Collagen-3、α-SMA、Fibronectin、FOXM1、CCNB1、CDC25b 和 AURKB 的 mRNA 及蛋白表达;用细胞划痕实验进行迁移检测。**结果** ①NIR 显示:IR-61 可靶向至博来霉素诱导的受损伤肺组织。②形态学观察显示:BLM+IR-61 组较博来霉素组形态改善,肺塌陷少,纤维结节少。经组织学鉴定,BLM+IR-61 处理组较 BLM 处理组肺纤维化程度低[(0.103 3±0.014 5 3) *vs* (0.460 0±0.037 8 6), $P<0.05$]。IR-61 预处理 HFL1 与原代大鼠肺成纤维细胞后,用 TGF-β1 刺激,Western blot 和 RT-PCR 分析结果显示:TGF-β1+IR-61 处理组较 TGF-β1 处理组转分化特异性基因 Collagen-1、Collagen-3、α-SMA、Fibronectin 的 mRNA 及蛋白表达降低($P<0.05$),同时,增殖特异性 FOXM1、CCNB1、CDC25b 和 AURKB 基因的表达也降低($P<0.05$),说明 IR-61 可以抑制 TGF-β1 诱导的肺成纤维细胞的转分化与增殖的作用。③细胞划痕实验结果显示:TGF-β1 诱导肺成纤维细胞迁移活性增强,IR-61 能有效抑制肺成纤维细胞的迁移能力。**结论** IR-61 通过靶向到受损伤的肺组织并通过抑制肺成纤维细胞的转分化、增殖和迁移来减轻博来霉素诱导的肺纤维化。

[**关键词**] IR-61;肺纤维化;成纤维细胞;细胞转分化;细胞增殖;细胞迁移
[**中图法分类号**] R563.13;R966;R977.6 [**文献标志码**] A

Fluorescent small molecule IR-61 improves pulmonary fibrosis induced by intratracheal bleomycin in rats

HUANG Yu[1,2], WANG Ziwen[2], WANG Huilan[3], LUO Min[1,2], ZHANG Aihua[1], SHI Chunmeng[1,2] [1]Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control of Ministry of Education, School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province, 550025; [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department of Rocket Force Medicine, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [3]Department of Oncology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan Province, 646000, China

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the effects of IR-61 on the development of pulmonary fibrosis and on the proliferation and migration of lung fibroblasts in rats. **Methods** Forty male SD rats (6 to 8 weeks old)

[**基金项目**] 国家重点研发计划课题(2016YFC1000805);重庆市高校创新团队资助项目(CXTDG201602020);军队后勤科研重大项目(AWS17J007)
[**通信作者**] 史春梦,E-mail: shicm@sina.com
张爱华,E-mail: aihuagzykd@163.com

were randomized equally into normal control group, IR-61 group, bleomycin group and bleomycin+IR-61 group. In the latter 2 groups, rat models of pulmonary fibrosis were established by intratracheal infusion of bleomycin (2.5 mg/kg). In the 2 groups with IR-61 treatment, IR-61 was intraperitoneally injected at the dose of 2.0 mg/kg 30 min following intratracheal bleomycin infusion and was then administered twice a week. At 10 d after bleomycin treatment, 3 rats from each group were selected for IR-61 injection (2 mg/kg) *via* the tail vein to observe the accumulation of IR-61 in each organ at 24 h using near infrared fluorescence imaging (NIR). After 28 d of treatment, the rats were euthanized and the lung tissue was collected for HE and Masson staining. RT-PCR and Western blotting were performed to detect the changes of the expression of the genes related with lung fibroblast transdifferentiation and proliferation (including Collagen-1, Collagen-3, α-SMA, fibronectin, FOXM1, CCNB1, CDC25b and AURKB) in human lung fibroblasts (HFL1) and primary rat lung fibroblasts in response to IR-61 and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) treatments; the migration of the cells was assessed using cell scratch test. **Results** NIR imaging showed that IR-61 could target the injured lung tissue induced by bleomycin. Morphological observation showed that compared with bleomycin-treated rats, the rats with IR-61 treatment presented with better structural integrity of the lungs with less obvious lung collapse, fewer fibrotic nodules and a significantly milder of pulmonary fibrosis (0.103 3±0.014 53 *vs* 0.460 0±0.037 86, $P<0.05$). In HFL1 cells and primary rat lung fibroblasts, IR-61 pretreatment prior to TGF-β1 stimulation resulted in significantly lowered mRNA and protein expression of collagen-1, collagen-3, α-SMA, and fibronectin as well as the proliferation-specific genes FOXM1, CCNB1, CDC25b and AURKB ($P<0.05$). Cell scratch test showed that TGF-β1 treatment significantly increased the cell migration activity, which was effectively suppressed by IR-61 treatment. **Conclusion** IR-61 ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats by targeting the injured lung tissue and inhibiting the transdifferentiation, proliferation and migration of lung fibroblasts.

[**Key words**] IR-61; pulmonary fibrosis; lung fibroblasts; cell transdifferentiation; cell proliferation; cell migration

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFC1000805), University Innovation Team Building Program of Chongqing (CXTDG201602020), and the Major Project of Military Logistics Research (AWS17J007). Corresponding author: SHI Chunmeng, E-mail: shicm@sina.com; ZHANG Aihua, E-mail: aihuagzykd@163.com

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种慢性、进展性、致死性的肺部疾病,其病理特征包括肺泡上皮细胞损伤、肺结构被重塑、细胞外基质沉积、成纤维细胞和肌成纤维细胞累积等[1-2]。目前尚没有有效的靶向药物来治疗特发性肺纤维化。越来越多的研究证据表明肺成纤维细胞的异常活化在特发性肺纤维化的发病机制中起着至关重要的作用[3],抑制肺成纤维细胞的转分化和细胞外基质的分泌是治疗特发性肺纤维化的潜在策略。本课题组前期鉴定了1组七甲川花菁类线粒体靶向荧光小分子,对成纤维细胞功能可能具有潜在的调控作用[4]。本研究通过构建博来霉素致大鼠肺纤维化模型,发现IR-61能够靶向到博莱霉素处理的肺组织,并改善博来霉素引起的肺损伤和纤维化。

1 材料与方法

1.1 材料及动物

IR-61由所在实验室合成和纯化,合成方法和分子结构同前期研究[4];博来霉素粉剂(bleomycin, BLM)购自美国MEC公司;苏木精伊红(HE)及马松三色染色试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术研究所;F12K培养基购自上海中乔新舟公司;PVDF膜购自美国Millipore公司;反转录试剂盒购自美国Thermo公司;荧光定量试剂盒购自日本TaKaRa公司;TRIzol购自北京康为世纪生物科技有限公司;Collagen-1、α-SMA、Fibronectin等抗体及引物购自武汉三鹰公司。

1.2 实验动物及分组

清洁级(SD)大鼠40只,雄性,6~8周龄,体质量

230~250 g,从陆军军医大学实验动物中心购买。根据陆军军医大学实验动物中心制订的实验室动物的护理和使用指导原则进行体内实验,所有程序经陆军军医大学实验动物中心动物保护和使用委员会批准。适应性喂养 2 周后,采用随机数字表法分为 4 组:正常对照组、IR-61 处理组、BLM 处理组和 BLM+IR-61 处理组,每组 10 只。采用气管内滴注博莱霉素建立大鼠肺纤维化模型,除正常对照组、IR-61 处理组外,其余两组以 0.1%戊巴比妥腹腔注射麻醉大鼠,按 2.5 mg/kg 缓慢往大鼠气管内注入博莱霉素建立肺纤维化模型。BLM+IR-61 处理组经博莱霉素气管滴注 30 min,IR-6 处理组腹腔注射 IR-61(2.0 mg/kg,用 PBS 溶解),随后该两组以每周 2 次的频率腹腔注射 IR-61。每天观察。所有大鼠于博莱霉素治疗后 28 d 处死,取肺及其他器官作进一步分析。

1.3 近红外荧光成像(near infrared fluorescence imaging, NIR)

大鼠行气管内滴注博莱霉素 10 d 后,取正常对照组、IR-61 处理组和 BLM+IR-61 处理组大鼠各 3 只,IR-61 处理组和 BLM+IR-61 处理组大鼠尾静脉注射剂量为 2.0 mg/kg 的 IR-61,24 h 后腹腔注射 1%戊巴比妥钠麻醉大鼠,分离大鼠肺及重要内脏进行 NIR,观测大鼠肺及重要内脏荧光信号情况,进一步研究 IR-61 的肺蓄积特性。

1.4 组织学检查

28 d 后处死各组大鼠,将大鼠肺固定于 4%多聚甲醛,包埋于石蜡中,按 3 μm 切片,按照实验规程进行 HE 染色,光学显微镜观察组织细胞变化。采用 Masson 三色染色法评价肺纤维化的严重程度,使用 Image J 对 Masson 染色结果进行半定量分析。为了区分胶原纤维和其他纤维,采用 Masson 染色法将细胞核染成黑色,细胞质和肌肉呈红色,胶原蛋白呈蓝色。

1.5 细胞培养及处理

从新生 SD 大鼠中分离出原代大鼠肺成纤维细胞。大鼠肺成纤维细胞在第 3 代和第 6 代之间使用。人肺成纤维细胞株(human fetal lung fibroblast, HFL1)购自美国 ATCC。原代大鼠肺成纤维细胞与 HFL1 均培养在 F12K(添加 10%胎牛血清和 1%链霉素/青霉素)培养基中。细胞均在 37℃、CO_2 含量为 5%的恒温孵育箱中生长。

TGF-β1 是调节纤维化过程的重要促纤维化细胞因子[5],可以影响细胞的增生、转分化、凋亡和细胞外基质生成来调节组织的形态发生及转分化。肺成纤维细胞在受到 TGF-β1 刺激后,向肌成纤维细胞转化,并分泌细胞外基质蛋白来促进胶原的沉积和纤维化的发生[6],因此,本研究对 IR-61 抗纤维化作用进行了体外研究。原代大鼠肺成纤维细胞与 HFL1 用 IR-61 预处理后,再用 TGF-β1 刺激 24 h。将细胞分为 4 组:正常对照组、IR-61 处理组、TGF-β1 处理和 TGF-β1+IR-61 处理组。IR-61 处理组与 TGF-β1+IR-61 处理组在 37 ℃的黑暗条件下,用 20 μmol/L IR-61(溶解在无血清的培养基中)预处理细胞 15 min,除去游离染料后,细胞用 PBS 洗涤 2 次,然后在新鲜的完全培养基中培养。在 IR-61 预处理后,TGF-β1 和 TGF-β1+IR-61 处理组加入 20 μmol/L TGF-β1,恒温孵育箱培养 24 h 后提取 RNA 或蛋白。

1.6 Western blot 分析

将处理后 4 组(正常对照组、IR-61 处理组、TGF-β1 处理组和 TGF-β1+IR-61 处理组)原代肺成纤维细胞和 HFL1 于 24 h 后提取总蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度,配平后沸水浴 10 min 使蛋白变性,取 40 μg 蛋白样品于 10% SDS-PAGE 凝胶中,电泳 1.5 h 后经转膜至 PVDF 膜上。用快速封闭液常温封闭 30 min,抗体 Fibronectin、Collagen、α-SMA、Gapdh 和 Actin 于 4 ℃孵育一抗过夜。TBST 洗膜 3 次,10 min/次,于 TBST 中,按照 1∶1 000 加入二抗孵育 1 h。TBST 洗膜 4 次,15 min/次,ECL 显影成像。

1.7 RT-PCR 分析

将处理后 4 组(正常对照组、IR-61 处理组、TGF-β1 处理组和 TGF-β1+IR-61 处理组)原代肺成纤维细胞和 HFL1 于 24 h 后用 TRIzol 一步法提取转染细胞总 RNA,反转录,使用 SYBR Green qPCR (TaKaRa)进行实时 PCR。检测相关转分化、增殖、迁移特异性基因(Collagen-1、Collagen-3、α-SMA、Fibronectin、FOXM1、CCNB1、CDC25b 和 AURKB)的表达。引物序列见表 1。

1.8 细胞划痕实验

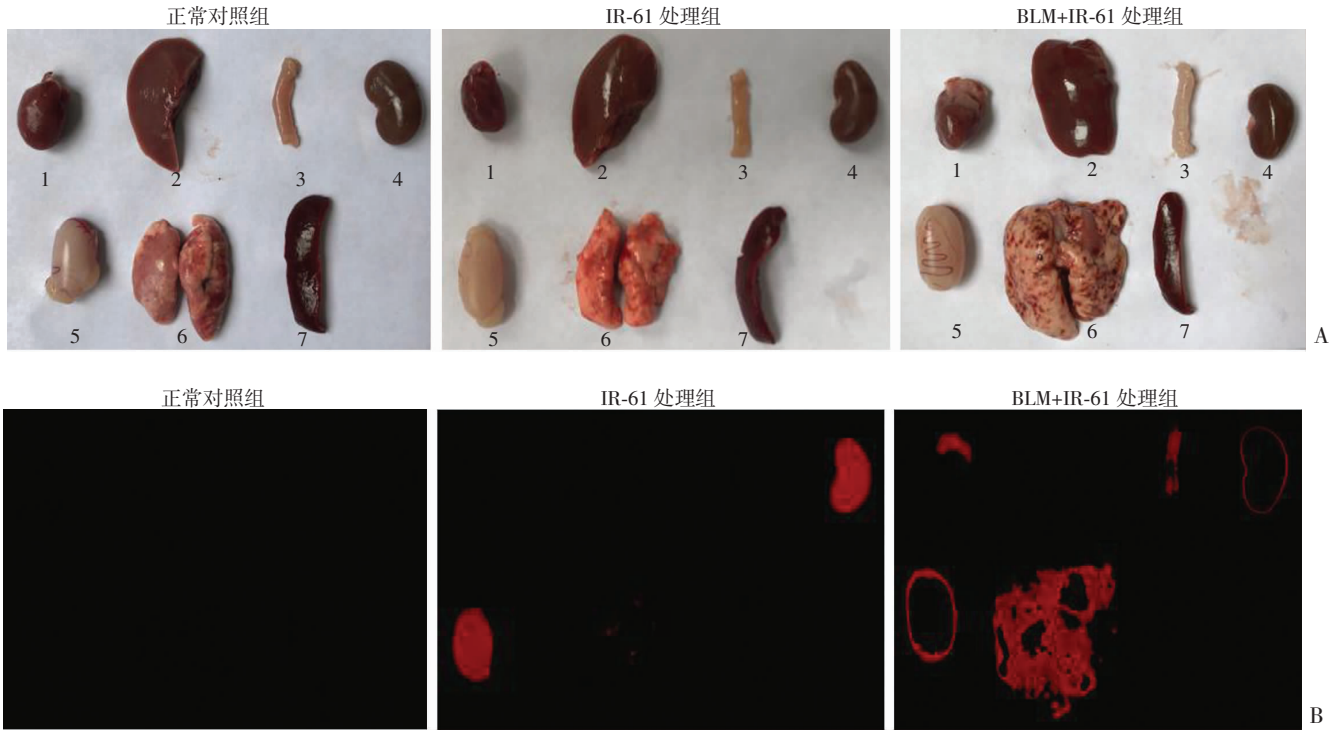
有研究表明在肺纤维化的发展进程中,肺成纤维细胞迁移和侵袭性增强[7-8]。因此,本研究采用细胞划痕实验观察各组细胞迁移情况。将原代肺成纤维细胞和 HFL1 铺于 6 孔板上生长,直至形成汇合的单层细胞。用无菌的 200 μL 微吸管针尖作划痕,用 PBS 清洗细胞。取 4 孔分为 4 组(正常对照组、IR-61 处理组、TGF-β1 处理组和 TGF-β1+IR-61 处理组),经相应处理后,通过相差显微镜观察细胞迁移情况。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件。所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用学生 t 检验和单因素方差分析。检验水准:$\alpha=0.05$。

表 1　RT-PCR 引物序列与片段长度

引物	上游引物(5′→3′)	下游引物(5′→3′)	片段大小/bp
COL1A1(Rat)	CCTGCCGATGTCGCTATCC	CTTCTTGAGGTTGCCAGTCTGTT	126
COL1A1(Homo)	GTGCGATGACGTGATCTGTGA	CGGTGGTTTCTTGGTCGGT	119
COL3A1(Rat)	TGCCACCCTGAACTCAAGAGC	AGCACCAGCATCTGTCCACCA	162
COL3A1(Homo)	GCCAAATATGTGTCTGTGACTCA	GGGCGAGTAGGAGCAGTTG	145
α-SMA(Rat)	TGAACCCTAAGGCCAACCG	TCCAGAGTCCAGCACAATACCA	140
α-SMA(Homo)	GATGCTCCCAGGGCTGTTTT	CCTCTTTTGCTCTGTGCTTCGTC	135
Fibronectin(Rat)	GACACTATGCGGGTCACTTGG	GCTGTTCGTACACGCTGGAGA	193
Fibronecti(Homo)	GGAGAATTCAAGTGTGACCCT	TGCCACTGTTCTCCTACGTGG	184
Aurkb(Rat)	CGCACCTGAAACATCCCAATA	TCCGCTCTTCTGTAGTTCCTTGTA	122
Aurkb(Homo)	CAGTGGGACACCCGACATC	GTACACGTTTCCAAACTTGCC	94
Ccnb1(Rat)	CCCTACCAAAACCTGTGGACAA	CACATCGGAGAAAGCCTGACA	194
Ccnb1(Homo)	AATAAGGCGAAGATCAACATGGC	TTTGTTACCAATGTCCCCAAGAG	111
Cdc25b(Rat)	CATCCCATCACGCCTTGTAAC	AACTCCTTGTAGCCGCCTTTG	179
Cdc25b(Homo)	ACGCACCTATCCCTGTCTC	CTGGAAGCGTCTGATGGCAA	195
Foxm1(Rat)	CCACAGAACTCTATTCGTCACAACC	CCAATGTCAAGTAGCGATTAGCAC	121
Foxm1(Homo)	GGAGCAGCGACAGGTTAAGG	GTTGATGGCGAATTGTATCATGG	115



A:大鼠各脏器形态观察　1:心;2:肝;3:肠;4:肾;5:睾丸;6:肺;7:脾;B:近红外成像仪观察 IR-61 在各脏器的分布

图 1　近红外成像仪下观察 IR-61 在各组大鼠体内的分布

2　结果

2.1　IR-61 靶向博莱霉素损伤的肺组织

将正常对照组、IR-61 处理组和 BLM+IR-61 处理组大鼠行 NIR,IR-61 处理组和 BLM+IR-61 处理组尾静脉注射 IR-61(2.0 mg/kg),于 24 h 后用近红外成像仪比较不同组肺组织的荧光强度。结果显示:BLM+IR-61 组肺组织荧光强度强,且未行气管内滴注 BLM 的 IR-61 组肺组织荧光强度弱,进一步证实了 IR-61 可相对靶向蓄积于受损伤肺组织(图 1)。表明 IR-61

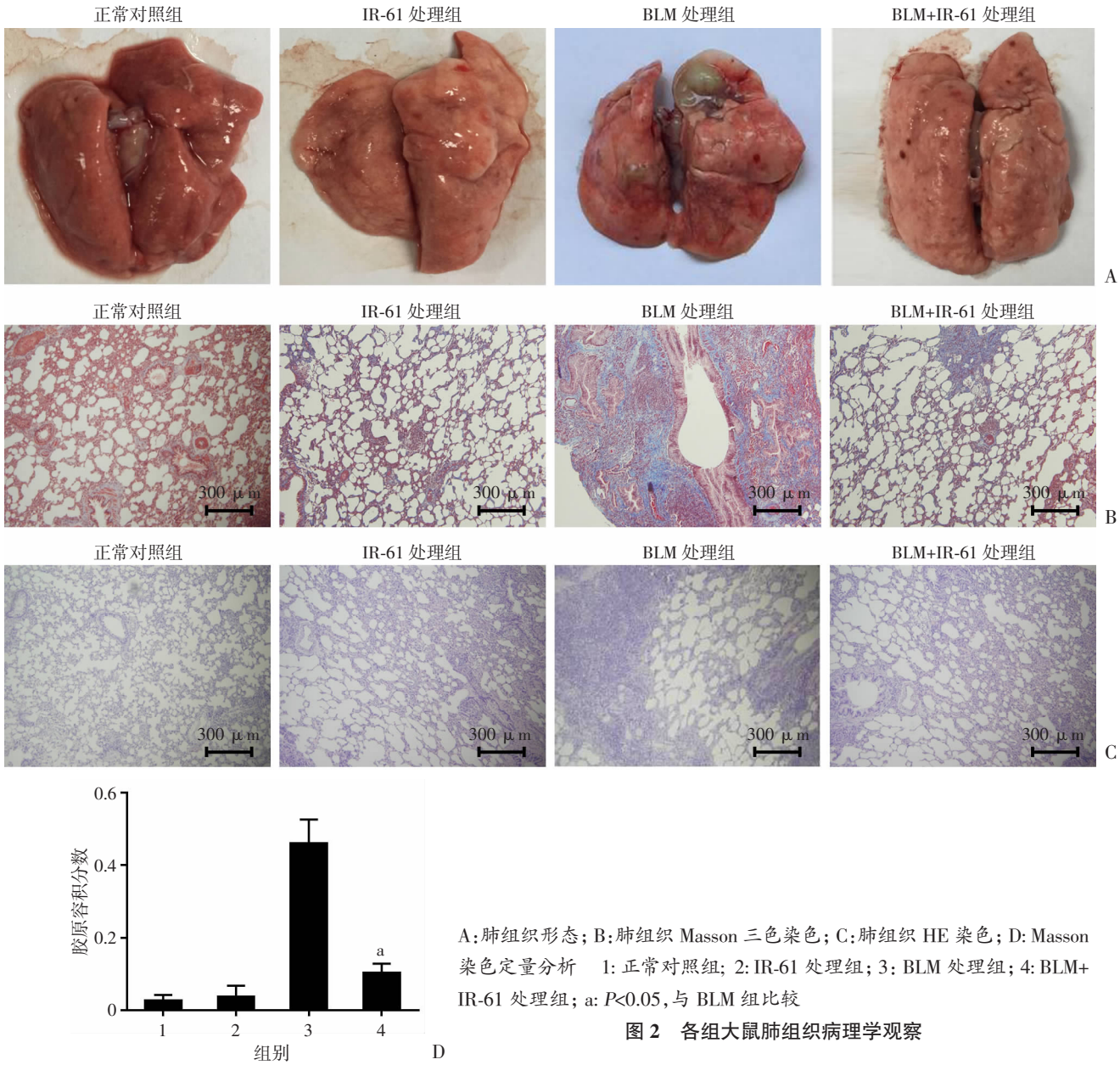
选择性地蓄积到受损伤肺组织中,在体内成像和跟踪方面表现出良好的光学特性。

2.2 IR-61 减轻 BLM 诱导的肺损伤和纤维化

在形态学方面,BLM 处理组的动物表现为肺组织塌陷、表面粗糙,有白色/灰色纤维结节形成,BLM+IR-61 处理组大鼠肺形态改善,肺塌陷少,纤维结节少。经组织学鉴定,与正常对照组相比博莱霉素可增强肺炎症反应,肺泡间隔增厚和肺泡间隙塌陷(图 2)。HE 染色和 Masson 三色染色及定量分析结果表明:博莱霉素诱导的大鼠经 IR-61 处理后,肺纤维化的严重程度要低得多。单独接受 IR-61 的大鼠与对照组大鼠相比,对肺没有明显的影响,表明 IR-61 体内具有较强的抗纤维化作用和较好的安全性。

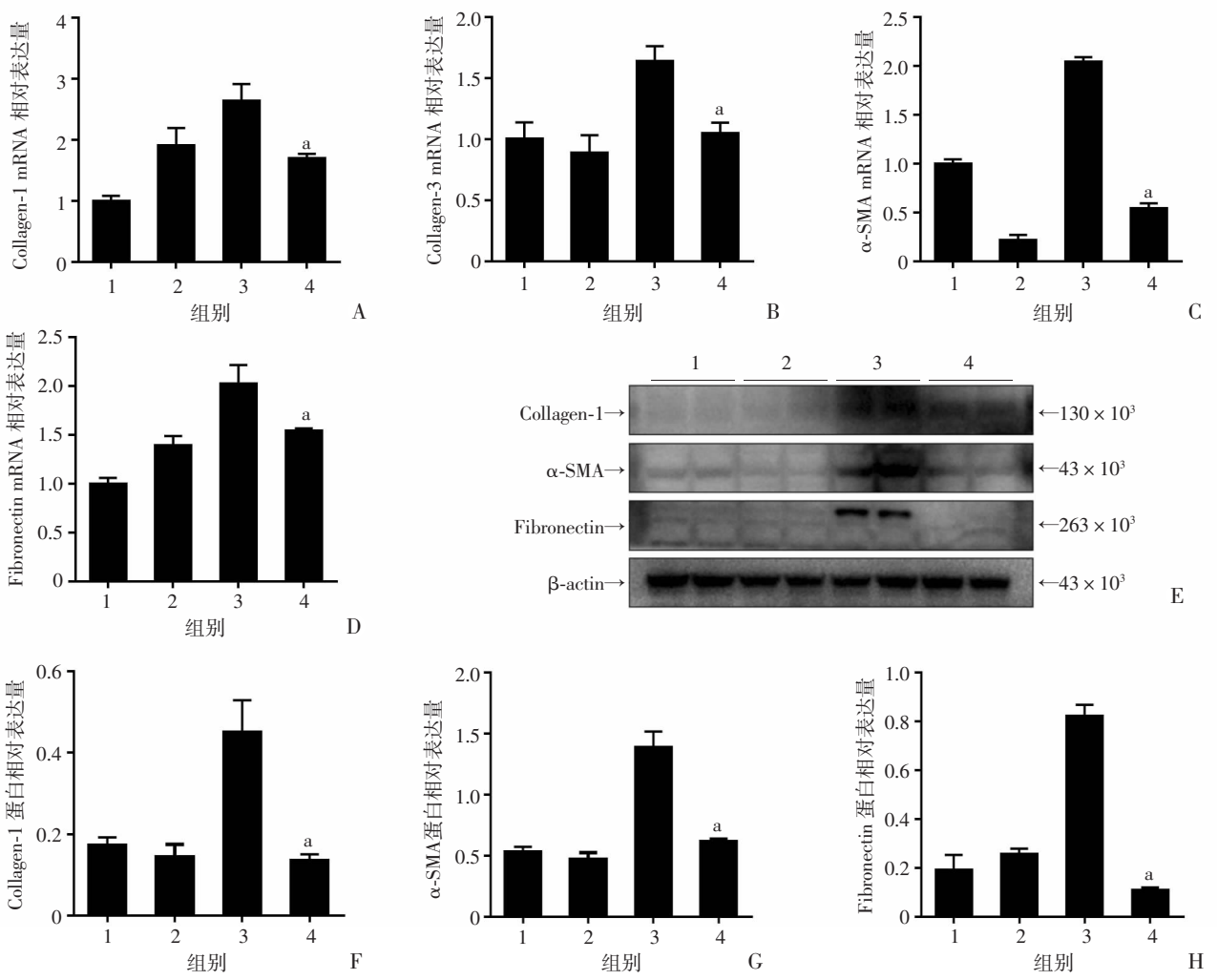
2.3 IR-61 抑制肺成纤维细胞转分化

原代大鼠肺成纤维细胞与 HFL1 用 IR-61 预处理后,再用 TGF-β1 刺激 24 h,收集蛋白和 RNA。Western blot 检测结果显示:IR-61 可以降低 TGF-β1 诱导的 Fibronectin、Collagen 和 α-SMA 蛋白表达;RT-PCR 分析结果与 Western blot 一致,TGF-β1+IR-61 组较 TGF-β1 组 Collagen-1、Collagen-3、α-SMA、Fibronectin 的 mRNA 水平明显下调(图 3、4)。表明 IR-61 抑制了 TGF-β1 诱导的肺成纤维细胞转分化。



A:肺组织形态;B:肺组织 Masson 三色染色;C:肺组织 HE 染色;D: Masson 染色定量分析 1: 正常对照组; 2: IR-61 处理组; 3: BLM 处理组; 4: BLM+IR-61 处理组; a: $P<0.05$,与 BLM 组比较

图 2 各组大鼠肺组织病理学观察



1:正常对照组; 2: IR-61 处理组;3:TGF-β1 处理组;4:TGF-β1+IR-61 处理组;a:$P<0.05$,与 TGF-β1 处理组比较

A~D:RT-PCR 检测 Collagen-1、Collagen-3、α-SMA 和 Fibronectin 的 mRNA 表达;E:Western blot 检测 Collagen-1、α-SMA 和 Fibronectin 的蛋白表达;F~H:Collagen-1、α-SMA 和 Fibronectin 相对表达量分析

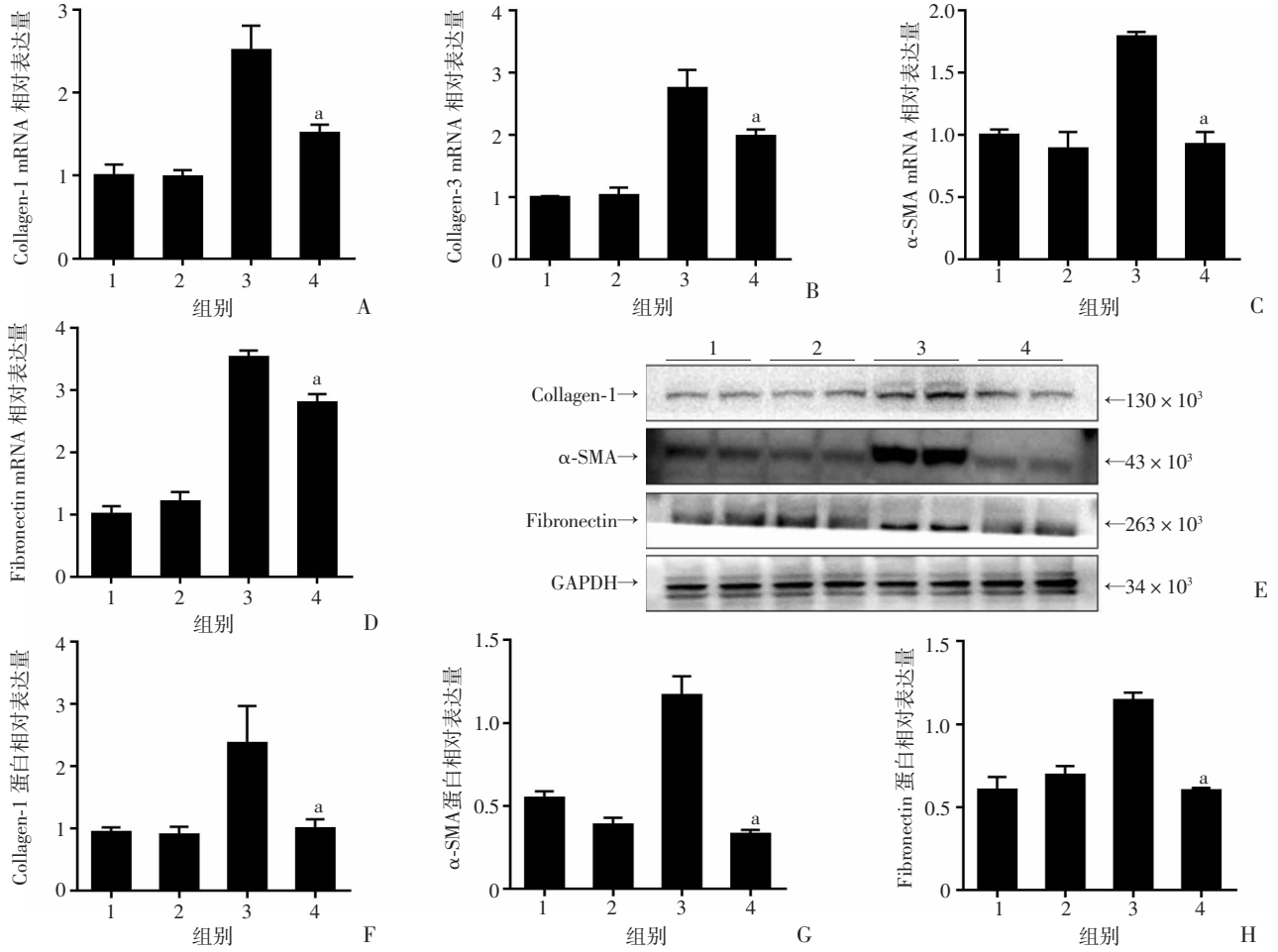
图 3 RT-PCR 和 Western blot 检测大鼠原代肺成纤维细胞 Collagen、α-SMA 和 Fibronectin 的 mRNA 和蛋白表达

2.4 IR-61 抑制肺成纤维细胞增殖和迁移

TGF-β1 刺激成纤维细胞后,增殖特异性 FOXM 1、CCNB 1、CDC25b 和 AURKB 基因的表达增加,而 IR-61 可以抑制 TGB-β1 的作用(图 5、6)。细胞划痕实验结果显示(图 7):TGF-β1 处理引起细胞迁移水平增强,而 IR-61 可以明显降低 HFL1 和原代肺成纤维细胞的迁移能力。提示 IR-61 可以抑制肺纤维化过程中 TGF-β1 诱导的肺成纤维细胞的增殖和迁移。

3 讨论

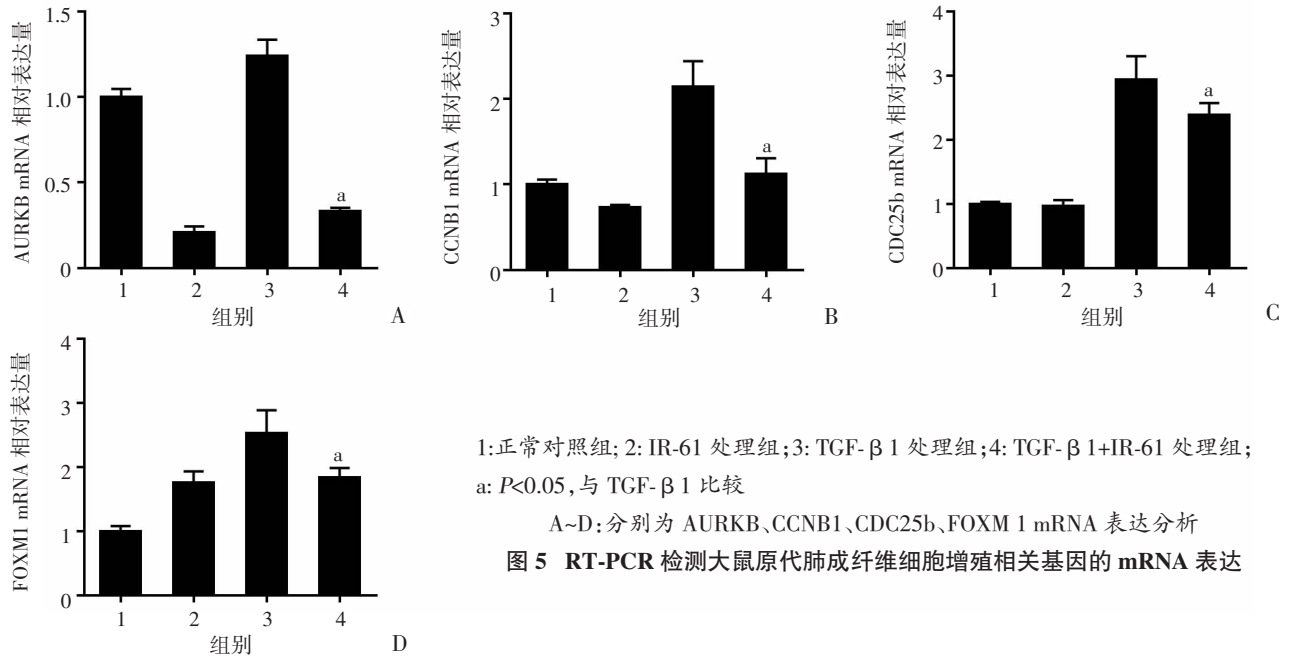
纤维化是组织损伤异常修复的结果,发生在包括肺在内的许多器官[9]。IPF 是进展性的肺部疾病,尚没有有效的治疗方法。IPF 的特点是肌成纤维细胞的无序积聚和过度的基质沉积。本课题组在前期研究中,通过对七甲川花菁类近红外荧光小分子的侧链进行化学结构修饰,改变其水溶性和电离常数,合成了一系列具有特定生物学活性的新型线粒体靶向荧光小分子[10-12]。本研究发现新型小分子染料七甲川花菁类荧光小分子 IR-61 可以靶向博来霉素损伤的肺组织。形态学、HE、Masson 染色等研究结果显示:BLM 处理大鼠 28 d 后,肺纤维化程度严重,肺组织塌陷、表面粗糙,有白色/灰色纤维结节形成,IR-61 干预组大鼠的肺与 BLM 处理组相比,肺纤维化程度得到有效改善,肺塌陷少,形态改善,纤维结节少并减少了胶原沉积,为肺纤维化的靶向治疗研究提供了依据。



1:正常对照组; 2: IR-61 处理组;3:TGF-β1 处理组;4: TGF-β1+IR-61 处理组;a:$P<0.05$,与 TGF-β1 处理组比较

A~D:RT-PCR 检测 Collagen-1、Collagen-3、α-SMA 和 Fibronectin 的 mRNA 表达;E:Western blot 检测 Collagen-1、α-SMA 和 Fibronectin 的蛋白表达;F~H:Collagen-1、α-SMA 和 Fibronectin 相对表达量分析

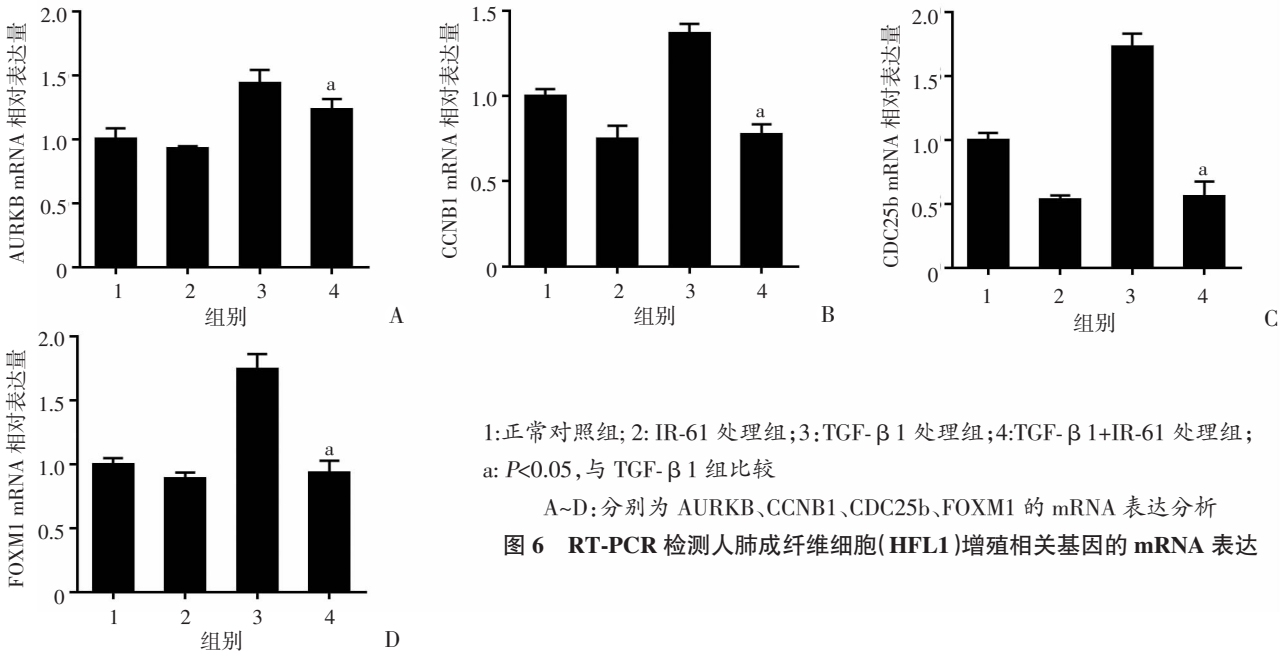
图 4 RT-PCR 和 Western blot 检测人肺成纤维细胞(HFL1)Collagen、α-SMA 和 Fibronectin 的 mRNA 和蛋白表达



1:正常对照组; 2: IR-61 处理组;3: TGF-β1 处理组;4: TGF-β1+IR-61 处理组;a: $P<0.05$,与 TGF-β1 比较

A~D:分别为 AURKB、CCNB1、CDC25b、FOXM 1 mRNA 表达分析

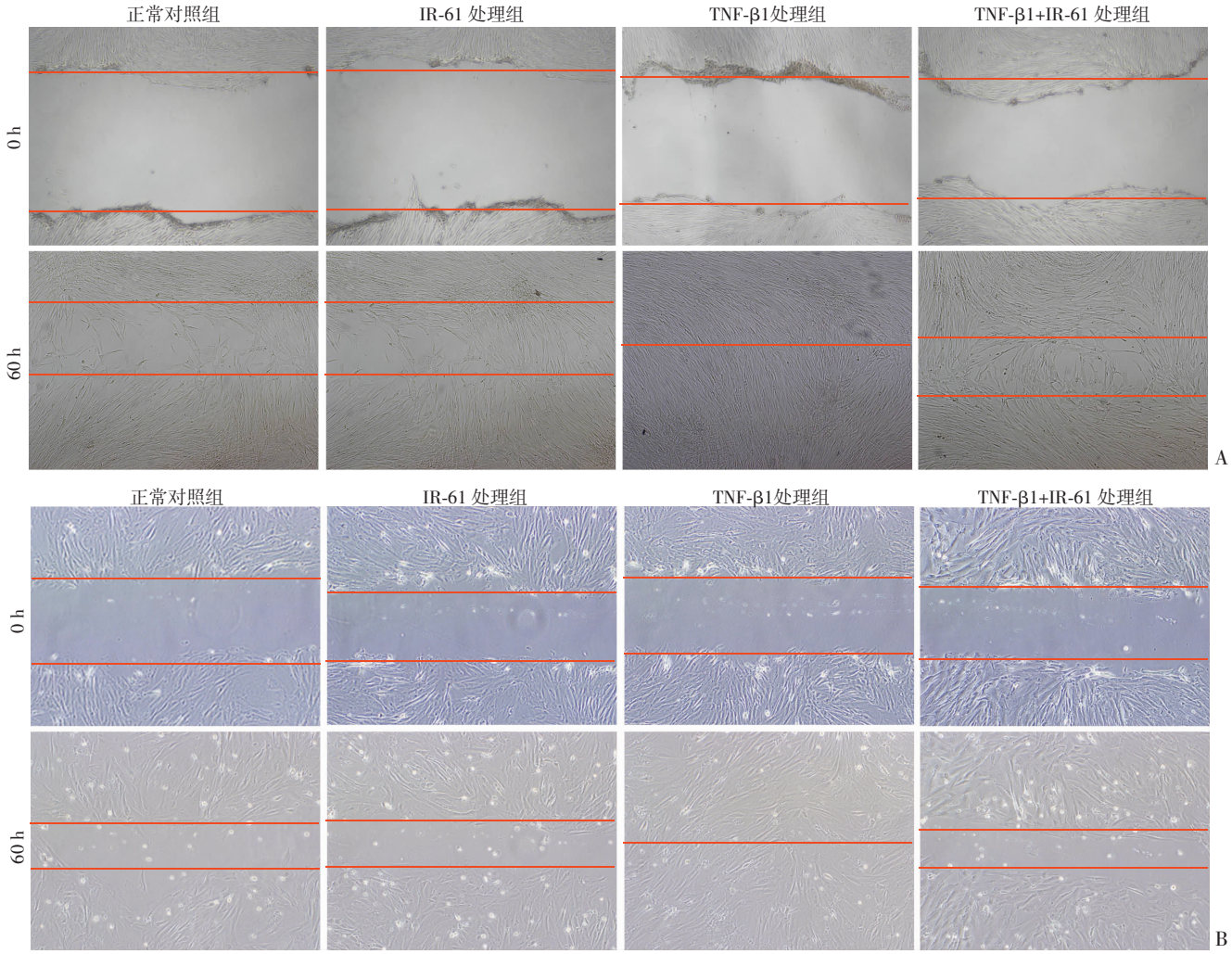
图 5 RT-PCR 检测大鼠原代肺成纤维细胞增殖相关基因的 mRNA 表达



1:正常对照组;2:IR-61 处理组;3:TGF-β1 处理组;4:TGF-β1+IR-61 处理组;a:$P<0.05$,与 TGF-β1 组比较

A~D:分别为 AURKB、CCNB1、CDC25b、FOXM1 的 mRNA 表达分析

图 6 RT-PCR 检测人肺成纤维细胞(HFL1)增殖相关基因的 mRNA 表达



A:大鼠原代肺成纤维细胞;B:人肺成纤维细胞(HFL1)

图 7 光学显微镜观察肺成纤维细胞划痕愈合情况 (×400)

在肺纤维化过程中,由于各种细胞因子的刺激和信号通路的激活,肺泡上皮细胞和气道上皮细胞发生间质转化,并促使成纤维细胞转分化为肌成纤维细胞[13]。肺成纤维细胞是纤维化的关键效应细胞,肺成纤维细胞聚集、增殖和细胞外基质重构是肺纤维化的重要病理特征,可导致肺结构的不可逆损伤,以肺成纤维细胞功能为靶点的治疗已被证明是延缓 IPF 进展的有效方法[14]。本研究通过 Western blot 和 RT-PCR 分析发现:IR-61 可有效降低肺成纤维细胞纤维化标志物 Collagen-1、Collagen-3、α-SMA 和 Fibronectin 的表达。此外,肺成纤维细胞迁移和浸润也在 IPF 发病机制中发挥重要作用[14]。有研究表明:与正常肺成纤维细胞相比,IPF 肺成纤维细胞表现出高度增殖和迁移的表型[6]。为了确定 IR-61 在肺纤维化过程中是否调节肺成纤维细胞的增殖,本研究评估了 HFL1 和原代肺成纤维细胞的增殖情况。RT-PCR 结果显示:TGF-β1 诱导的肺成纤维细胞增殖特异性基因 FOXM1、CCNB1、CDC25b 和 AURKB 的表达增高,且 IR-61 处理的肺成纤维细胞组增殖特异性基因的表达趋于正常化水平,从而达到抑制肺成纤维细胞增殖的作用。细胞划痕实验结果也显示 IR-61 可抑制肺成纤维细胞迁移。

综上所述,七甲川花菁类荧光小分子 IR-61 可以靶向到受损伤肺组织并通过抑制肺成纤维细胞的转分化、增殖和迁移来抑制肺纤维化的发生、发展,其具体作用机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] FANER R, ROJAS M, MACNEE W, *et al*. Abnormal lung aging in chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 186(4): 306-313. DOI:10.1164/rccm.201202-0282PP.

[2] ROCKEY D C, BELL P D, HILL J A. Fibrosis: A common pathway to organ injury andfailure[J]. N Engl J Med, 2015, 372(12): 1138-1149. DOI:10.1056/nejmra1300575.

[3] Selman M, Pardo A. Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. an integral model[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2014, 189(10): 1161-1172. DOI: 10.1164/rccm.201312-2221PP.

[4] WANG X, CHEN Z L, LUO S L, *et al*. Development of therapeutic small-moleculefluorophore for cell transplantation[J]. Adv Funct Mater, 2016, 26(46): 8397-8407. DOI: 10.1002/adfm.201600996.

[5] WILLIS B C, BOROK Z. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lungdisease[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 293(3): L525-L534. DOI: 10.1152/ajplung.00163.2007.

[6] AL-TAMARI H M, DABRAL S, SCHMALL A, *et al*. FoxO3 an important player infibrogenesis and therapeutic target for idiopathic pulmonary fibrosis[J]. EMBO Mol Med, 2018, 10(2): 276-293. DOI: 10.15252/emmm.201606261.

[7] THIERY J P, SLEEMAN J P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7(2): 131-142. DOI: 10.1038/nrm1835.

[8] BLACK M, MILEWSKI D, LE T E, *et al*. FOXF1 inhibits pulmonary fibrosis by preventing CDH2-CDH11 cadherin switch inmyofibroblasts[J]. Cell Rep, 2018, 23(2): 442-458. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.03.067.

[9] WYNN T A, RAMALINGAM T R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibroticdisease[J]. Nat Med, 2012, 18(7): 1028-1040. DOI: 10.1038/nm.2807.

[10] HUANG Y H, ZHOU J, LUO S L, *et al*. Identification of a fluorescent small-molecule enhancer for therapeutic autophagy in colorectal cancer by targeting mitochondrial protein-translocase TIM44[J]. Gut, 2018, 67(2): 307-319. DOI: 10.1136/gutjnl-2016-311909.

[11] WANG Y, LIAO X Y, SUN J G, *et al*. Characterization of HIF-1α/glycolysis hyperactive cell population via small-molecule-based imaging of mitochondrial transporteractivity[J]. Adv Sci (Weinh), 2018, 5(3): 1700392. DOI: 10.1002/advs.201700392.

[12] WANG Y, LUO S L, ZHANG C, *et al*. An NIR-fluorophore-based therapeutic endoplasmic reticulum stress inducer[J]. Adv Mater,2018,1:e1800475. DOI: 10.1002/adma.201800475.

[13] JOHNSON N A, SACHINWALLA T, WALTON D W, *et al*. Aerobic exercise training reduces hepatic and visceral lipids in obese individuals without weightloss[J]. Hepatology, 2009, 50(4): 1105-1112. DOI:10.1002/hep.23129.

[14] 曾仁凤, 何振华, 张秀峰. 上皮细胞间质转化与肺纤维化 的研究进展[J]. 当代医学, 2014, 20(2): 12-13. DOI: 10.3969/j.issn.1009-4393.2014.2.007.
ZENG R F, HE Z H, ZHANG X F, *et al*. Research progress of interstitial transformation of epithelial cells and pulmonary fibrosis[J]. Contemp Med, 2014, 20(2): 12-13. DOI: 10.3969/j.issn.1009-4393.2014.2.007.

(收稿:2019-09-15;修回:2019-12-11)

(编辑 王 红)