

• 研究论文 •

汉防己甲素抑制 ROS 介导的成纤维细胞活化治疗肺纤维化

严业超, 郭春佚, 张家铭, 李云炫, 李珂*

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 肺纤维化是一种威胁人类健康的慢性进展性肺部疾病, 目前临床治疗方法有限, 迫切需要研究其发病机制并开发有效治疗策略。汉防己甲素 (tetrandrine, TET) 是一种从粉防己中提取的双苄基异喹啉生物碱, 具有一定的抗炎和抗纤维化作用, 但具体机制尚不明确。本研究进一步明确了 TET 在慢性肺纤维化疾病模型中的抗肺纤维化作用, 并探索了 TET 抑制成纤维细胞活化的分子机制。结果显示, TET 显著减轻多次博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型的病理改变, 并有效抑制 TGF- β 1 诱导的成纤维细胞活化; 机制上, TET 主要通过抑制 TGF- β /SMAD 信号通路以及减少细胞内活性氧水平的方式来发挥作用。通过 CRISPR-Cas9 文库筛选, 本研究发现血管紧张素 II 1 型受体相关蛋白 (angiotensin II type 1 receptor associated protein, AGTRAP) 与膜棕榈酰化蛋白 6 (membrane palmitoylated protein 6, MPP6) 在 TET 抑制活性氧水平过程中发挥重要调控作用, 敲除 *Agtrap* 和 *Mpp6* 基因可以抑制 TET 的抗成纤维细胞活化作用。本研究所有动物实验均通过中国医学科学院医药生物技术研究所伦理审查委员会批准 (IMB-20230406D507)。本研究不仅阐释了汉防己甲素的药理学作用机制, 也为肺纤维化治疗提供了新的选择。

关键词: 肺纤维化; 汉防己甲素; 成纤维细胞活化; 活性氧; 线粒体

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)08-2216-11

Tetrandrine ameliorates pulmonary fibrosis by inhibiting ROS-mediated fibroblast activation

YAN Ye-chao, GUO Chun-yi, ZHANG Jia-ming, LI Yun-xuan, LI Ke*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Pulmonary fibrosis is a chronic and progressive lung disease that poses a threat to human health. Current treatment options are limited, highlighting the urgent need for more effective therapeutic strategies. Tetrandrine (TET), a bis-benzylisoquinoline alkaloid extracted from *Stephania tetrandra*, has been known for its anti-inflammatory and anti-fibrotic effects, but its specific mechanisms remain unclear. This study investigated the anti-fibrotic effects of TET in a chronic model of pulmonary fibrosis, aiming to delineate the molecular mechanisms underlying TET-mediated inhibition of fibroblast activation. The results showed that TET significantly alleviated the pathological changes in a murine model of multiple bleomycin-induced pulmonary fibrosis and effectively inhibited TGF- β 1-induced fibroblast activation. Mechanistically, TET predominantly inhibited the TGF- β /SMAD signaling pathway and diminished intracellular reactive oxygen species (ROS) levels. Utilizing CRISPR-Cas9 library screening, we identified that angiotensin II type 1 receptor associated protein (AGTRAP) and membrane palmitoylated protein 6 (MPP6) played important roles in TET's suppressive impact of ROS levels, with the knockout of two genes attenuating TET's antifibrotic activity. All animal treatment procedures were approved according to the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Institute of Medicinal

收稿日期: 2024-04-02; 修回日期: 2024-05-11.

基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFA1106100); 国家自然科学基金资助项目 (82222070).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63024341, E-mail: like1986@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0313

Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences (IMB-20230406D507). This research not only elucidates the pharmacological mechanism of TET but also provides a novel therapeutic avenue for the treatment of pulmonary fibrosis.

Key words: pulmonary fibrosis; tetrandrine; fibroblast activation; reactive oxygen species; mitochondria

肺纤维化 (pulmonary fibrosis, PF) 是一种慢性、进行性肺部疾病, 其特征为肺组织中细胞外基质过度沉积以及正常肺组织瘢痕化, 导致肺功能逐渐丧失^[1]。特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 患者的中位生存期仅为3~5年^[2], 当前针对肺纤维化的治疗手段十分有限且存在较大局限性。尽管目前几种针对肺纤维化的药物, 如吡非尼酮和尼达尼布, 已经得到上市批准, 但这些治疗方案通常只能缓解症状而无法达到治疗效果; 此外, 一些抗炎药物和免疫抑制剂能够减轻肺部炎症, 但其往往伴有严重不良反应, 无法达到理想临床效果; 另外, 肺部康复、供氧治疗能够改善患者生活质量, 但难以停止疾病进展; 对于严重肺纤维化患者, 肺移植是唯一治疗手段, 但始终存在手术风险、排斥反应、供体短缺等问题^[3]。因此, 深入研究肺纤维化的发病机制、开发靶向药物迫在眉睫。

成纤维细胞的过度活化是肺纤维化发病的关键起始因素^[4]: 成纤维细胞在细胞因子如转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β) 的刺激下, 增殖分化为肌成纤维细胞, 过量合成及分泌包括胶原蛋白 (collagen)、纤连蛋白 (fibronectin) 在内的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 导致结缔组织过度沉积, 促进肺纤维化发病。TGF- β 是目前研究最广泛的促纤维化因子, 在成纤维细胞活化中发挥重要功能^[5]。经典的TGF- β 信号转导主要通过结合TGF- β 受体, 磷酸化SMAD2/3, 与SMAD4形成复合物, 入核调控基因转录, 促进纤维化相关蛋白表达, 推动肺纤维化疾病进程。近期研究发现, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 在调节TGF- β 信号通路中发挥重要作用^[6]。一方面, ROS通过SMAD^[7]、MAPK^[8]、Rho-GTPase^[9]等信号通路活化TGF- β 信号通路^[6]; 另一方面, TGF- β 通过抑制线粒体功能^[10]、诱导NADPH氧化酶^[11]、抑制抗氧化系统^[12]等机制, 促进ROS的产生^[13], 进而导致氧化应激及氧化还原失衡, 该失衡状态进一步维持TGF- β 的促纤维化作用^[6,14]。因此, 靶向TGF- β 与ROS循环可能具有一定的抗肺纤维化前景。

天然药物在治疗肺纤维化方面的研究相对较少, 市场上针对此病的中药产品稀缺, 反映了在传统治疗方法中还存在着明显的研发不足。汉防己甲素 (tetrandrine, TET) 是一种从传统中药粉防己中提取的

双苯并异喹啉生物碱, 具有抗炎、抗纤维化和免疫调节作用, 临床多用于风湿痛、关节痛及硅肺病的治疗^[15,16]。有研究表明, TET能够改善小鼠特定病理条件下的生理状态及存活率^[17,18]; 此外, 在单次博来霉素 (single bleomycin, sBLM) 诱导的肺纤维化中也能发挥一定的抗纤维化作用^[19], 但其在多次博来霉素 (multiple bleomycin, mBLM) 诱导的慢性肺纤维化模型中的抗纤维化作用及其抑制ROS产生的生物学机制尚不明确。本研究观察了TET在慢性肺纤维化模型中抗纤维化的药理学作用, 同时分析了TET抑制TGF- β /SMAD信号通路与ROS产生循环的分子机制。本研究不仅为理解汉防己甲素的治疗机制提供了新的见解, 也为开发新的抗肺纤维化药物策略提供了理论依据。

材料与方法

细胞 人肺成纤维细胞MRC5、小鼠肺成纤维细胞MLg购自ATCC; HEK293T购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。

质粒 LentiCas9-blast质粒 (plasmid #52962)、MMT文库 (Mouse CRISPR Deletion Library-Trafficking, mitochondrial, motility) (1000000126) 购自Addgene。

试剂及仪器 博来霉素 (bleomycin, BLM, C0022) 购自北京兰杰柯科技有限公司; 汉防己甲素 (HY-13764) 购自美国MCE公司; 人源TGF- β 1 (CA59)、鼠源TGF- β 1 (CK33) 购自苏州近岸蛋白质科技股份有限公司; CCK8 (T005-00000005) 购自上海陶术生物科技有限公司; LipofectamineTM 3000 (L3000015) 购自美国Invitrogen公司; 2 \times Phanta Flash Master Mix (P510) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 羟脯氨酸测定试剂盒 (A030-2-1) 购自南京建成生物工程技术有限公司; 活性氧检测试剂盒 (CA1410) 购自北京索莱宝科技有限公司; α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 抗体 (Ab5694)、I型胶原 (collagen I) 抗体 (Ab260043)、SMAD3 (phosphoS208) 抗体 (Ab192195) 购自英国Abcam公司; 波形蛋白 (vimentin) 抗体 (5741S)、SMAD3抗体 (9523S) 购自美国CST公司; 纤维连接蛋白 (fibronectin) 抗体 (15613-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; CRISPR-Cas9 SP antibody (CY6852) 购自上海泊湾生物技术有限公司; 实验相关

qPCR引物序列 [*FNI*、*Vim*、*Acta2*、*Coll1A1*、血管紧张素 II 1 型受体相关蛋白 (angiotensin II type 1 receptor associated protein, *Agtrap*)、膜棕榈酰化蛋白 6 (membrane palmitoylated protein 6, *Mpp6*) 等] 来源于 Origene 官网; *Agtrap*、*Mpp6* 的 sgRNA 序列: *sgAgtrap*-F: 5'-CACCGCACATGCACCGTGAACGAGG-3', *sgAgtrap*-R: 5'-AAACCCTCGTTCACGGTGCATGTGC-3'; *sgMpp6*-F: 5'-CACCGGGAGGAATGATAGATCGACA-3', *sgMpp6*-R: 5'-AAACTGTCGATCTATCATTCTCCC-3'。DYY-7C 型电泳仪购自北京六一生物技术有限公司; Bio-Rad 电泳仪及湿转系统购自美国 Bio-Rad 公司、Tanon 5200 全自动化学发光图像分析系统购自上海天能生命科学有限公司; ABI 7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司; FlexiVent 肺功能分析系统购自加拿大 SCIREQ 公司; CKX41 倒置显微镜、CX33 显微镜购自日本 OLYMPUS 公司; Beckman Coulter 流式细胞仪 (A00-1-1102) 购自美国 Beckman 公司。

肺纤维化动物模型 本研究所有动物实验均通过中国医学科学院医药生物技术研究所伦理审查委员会审查 (IMB-20230406D507)。雄性 C57BL/6J 小鼠, SPF 级别, 22 g, 6~8 周龄, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司 (实验动物许可证号: 002802)。多次博莱霉素诱导肺纤维化模型制备方法: 使用三溴乙醇通过腹腔注射麻醉小鼠, 随后气管插管滴注 50 μL 博莱霉素 ($1 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[20], 给药后立起并迅速旋转操作板, 使博莱霉素能够均匀进入左右各肺叶, 直立放置 5 min, 取下放回鼠笼, 等待苏醒。小鼠每 2 周造模 1 次, 共 6 次^[21]。在最后一次造模后第 10 天开始, 通过灌胃方式给予汉防己甲素 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 连续治疗 30 天后进行分析。

小鼠肺功能检测 小鼠使用三溴乙醇麻醉后通过气管插管与 Flexivent 小动物肺功能仪连接, 检测小鼠的深吸气量 (inspiratory capacity, IC) 及动态顺应性 (respiratory system compliance, Crs) 数据, 并进行数据分析。

羟脯氨酸含量检测 称量小鼠左肺湿重, 取 30~100 mg 组织, 后续按照试剂盒说明书进行操作: 1.5 mL 离心管中加入 550 μL 水解液, 95 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴水解 20 min, 转移到 10 mL 离心管中调节 pH 值后定容, 每管取相同体积经活性炭吸附处理后离心, 取 200 μL 上清于 96 孔板中, 检测 450 nm 处的吸光度, 并根据肺湿重计算羟脯氨酸的含量。具体操作步骤详见南京建成公司羟脯氨酸测定试剂盒 (碱水解法) (A030-2-1) 说明书。

形态学和组织学分析 将利用 4% 多聚甲醛固定的肺组织包埋在石蜡中并进行切片 (厚度 5 μm)。对切片进行 H&E 和 Masson 三色染色以评估肺组织病理变化, 使用光学显微镜在 100 \times 放大倍数下进行图像采

集。根据 Szapiel 评分标准^[22]和 Ashcroft 评分标准^[23], 分别对肺炎程度和纤维化程度进行评分。

人原代成纤维细胞分离 在无菌超净工作台中, 将人肺组织切割成数个 2 mm \times 2 mm 的小块, 置于 T75 培养瓶中, 倒置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 环境的细胞培养箱中培养 2 h 后, 将培养瓶翻转至正向位置, 加入 1 mL 完全培养基 (DMEM+10% FBS+2% 双抗), 继续培养两天, 等待成纤维细胞从肺组织块中迁出后, 对细胞进行消化处理及传代培养。

半数抑制浓度 (IC_{50}) 检测 各种细胞计数并接种至 96 孔板中; 从 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 开始等比梯度稀释 10 个浓度给予 TET, 共 10 组, 每组 6 次重复; 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内孵育 2 h, 在酶标仪 450 nm 处测定吸光度, 利用 GraphPad Prism 6.0 计算 IC_{50} 。

蛋白免疫印迹 收集细胞, RIPA 裂解液提取蛋白, BCA 法进行蛋白定量, 加入 5 \times loading, 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, SDS-PAGE 电泳后进行湿转, 5% BSA 封闭液室温封闭 1 h; 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 次日 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 二抗室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 1:1 混合 ECL 发光液后使用 Tanon 发光成像系统进行曝光及图像采集, 利用 ImageJ 对 Western blot 图片进行归一化定量。

实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 使用 Cell/Tissue Total RNA Kit (RN001) 试剂盒提取细胞总 RNA, 利用 NanoDrop2000 进行定量; 使用 EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis Super Mix (AT311) 进行逆转录得到 cDNA; 根据 NovoStart SYBR Qpcr SuperMix Plus (E096-01A) 说明书进行相应 qPCR 反应。

流式细胞术检测 ROS 生成以及流式分选 利用胰酶消化收集经药物处理的成纤维细胞, 利用 ROS 检测试剂盒 (CA1410) 在避光、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下染色 20 min, 具体操作步骤详见说明书; 清洗 3 次后, 使用 Beckman Coulter 流式细胞仪对 20 000 个活细胞发出的 DCF-DA 荧光进行定量, 并使用 Flow-jo 10.8.1 进行数据分析。MLg-Cas9-MMT 细胞经 ROS 试剂盒染色后利用中国医学科学院基础医学研究所的流式细胞分选器 ARIA III 进行流式分选, 分选得到 FITC 阳性及阴性细胞。

病毒包装 在无血清 DMEM 培养基分别加入慢病毒骨架蛋白 5.4 μg pMD2.G、2.7 μg psPAX2 及 10.6 μg 目标质粒, 之后加入 153 μL PEI 转染试剂并温和混匀, 室温静置 10 min, 将预混合的转染液均匀地添加到 15 cm 细胞培养皿的 HEK293T 细胞中, 培养 72 h 后, 收集上清, 加入 6 \times 病毒浓缩试剂, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜静置; 次日

3 500 ×g, 4 °C离心 25 min, 按照原体积的 1/50 加入完全培养基重悬沉淀, 分装置于-80 °C备用。

Cas9 稳转细胞株及 MMT 文库感染 使用 Lipo3000 转染试剂, 将 Lenti-Cas9-BSD 质粒转染至 MLg 细胞, 48 h 后加入杀稻瘟菌素 (5 μg·mL⁻¹), 持续培养 72 h, 获得 Cas9 稳定转染的 MLg-Cas9 细胞系; 使用 MMT 病毒文库感染 MLg 细胞, 48 h 后加入嘌呤霉素 (1 μg·mL⁻¹), 确定 MOI=0.3 时的病毒用量; 使用 MOI=0.3 的病毒量感染 MLg-Cas9 细胞, 72 h 后加入嘌呤霉素 (1 μg·mL⁻¹), 获得 MLg-Cas9-MMT 细胞。

基因组 DNA 提取, 建库测序及分析 流式分选后收集 ROS 阳性及 ROS 阴性细胞, 利用通用型柱式基因组 DNA 提取试剂盒 (CW2298S) 进行 DNA 的提取, 具体步骤详见说明书。使用建库引物 oMCB_1562 (5'-AGGCTTGGATTTCTATAACTTCGTATAGCATAC-ATTAC-3') 和 oMCB_1563 (5'-ACATGCATGGCGG-TAATACGGTTATC-3') 以及引物 oMCB_1349 (5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCACAAA-AGGAACTCACCT-3') 和条形码引物 (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCAGTCACATAT-ATATCGACTCGGTGCCACTTTTTTC-3') 进行 PCR 建库, 高通量测序由安诺优达基因科技 (北京) 有限公司完成, CRISPR/Cas9 筛选下游分析基于 MAGeCK 算法完成^[24]。

统计学分析 本文所有实验数据均采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计分析。两组参数之间的差异采用非配对 Student's *t* 检验进行比较; 两组以上参数之间的差异采用单因素方差分析 (one way ANOVA) 进行比较。所有数据均采用平均值 (mean) ± 标准误 (standard error of mean, SEM) 表示。

结果

1 TET 改善慢性肺纤维化病理改变

TET 在二氧化硅及 sBLM 诱导的小鼠肺纤维化模型已被证明具备显著的抗炎和抗纤维化能力^[15,16,25], 但在慢性肺纤维化小鼠模型中的药理学作用未知。因此, 本研究采用 mBLM 诱导慢性肺纤维化模型, 观察 TET 的抗肺纤维化作用 (图 1A)。虽然 mBLM 处理的小鼠体重没有明显变化 (图 1B), 但肺功能检测显示其深吸气量 (IC) 以及呼吸系统顺应性 (Crs) 显著降低 (图 1C); 此外, 其肺重指数 (图 1D) 和肺部羟脯氨酸含量 (图 1E) 显著增加; 肺组织切片的 H&E 和 Masson 染色结果同样显示, mBLM 小鼠肺部组织结构紊乱, 肺泡壁增厚, 肺泡及间质腔内存在大量的炎性细胞浸润

及纤维化病理改变, 炎症评分和纤维化评分显著升高 (图 1F、G), 这些结果均证明肺部发生了明显的纤维化病理改变。令人欣喜的是, 经过连续 30 天每日给予小鼠 10 mg·kg⁻¹ TET 治疗后, 小鼠体重并未发生显著变化, 同时其肺功能得到明显改善, 肺重指数和肺部羟脯氨酸含量显著降低, 炎症及纤维化评分显著下降 (图 1B~G)。这些结果表明, TET 对于 mBLM 诱导的慢性肺纤维化具有良好的治疗效果。

2 TET 通过抑制 TGF-β/SMAD3 信号通路、降低 ROS 水平抑制成纤维细胞活化

TET 已被证明能够抑制成纤维细胞活化^[26], 但具体机制尚未阐明。因此, 本研究进一步评估 TET 对 TGF-β1 诱导的原代人肺成纤维细胞 (pulmonary lung fibroblast, PLF)、人肺成纤维细胞系 MRC5 以及小鼠肺成纤维细胞系 MLg 活化的抑制作用。通过 CCK-8 检测, 本课题组首先确定了 TET 在这 3 种细胞系中 24 h 的 IC₅₀ 分别为 4.979、4.942、8.763 μmol·L⁻¹ (图 2A~C), 据此确定 TET 的最高加药浓度为 10 μmol·L⁻¹。随后, 向 TGF-β1 (10 ng·mL⁻¹) 诱导的成纤维细胞添加不同浓度的 TET (0.5、1、5、10 μmol·L⁻¹), 检测成纤维细胞的活化指标。结果显示, 成纤维细胞活化相关蛋白, 包括 fibronectin、collagen I、vimentin 和 α-SMA 的蛋白表达水平均在 TGF-β1 诱导后显著上调, 而 TET 能够剂量依赖性地抑制上述活化相关蛋白的表达 (图 2D~F); 同时, TET 对这些蛋白的基因转录水平同样存在抑制效果 (图 2G~I)。此外, 明场观察进一步证实, 0.5 μmol·L⁻¹ TET 即能显著抑制 TGF-β1 诱导的成纤维细胞活化及其伴随的形态学变化, 具体表现为细胞极化现象明显减少 (图 2J)。上述结果说明, TET 能够有效抑制 TGF-β1 诱导的成纤维细胞活化。

在肺纤维化进展过程中, TGF-β 激活 SMAD 信号通路、升高细胞内 ROS 水平是成纤维细胞活化和纤维化形成的关键因素之一^[27]。本研究发现, TET 能剂量依赖性地抑制 TGF-β1 诱导的 Smad3 蛋白磷酸化 (图 2D~F); 此外, 流式细胞术分析显示, TET 同样能够剂量依赖性地抑制 TGF-β1 诱导的成纤维细胞内的 ROS 水平升高 (图 2K)。以上结果表明, TET 能够抑制 TGF-β/SMAD3 信号通路, 降低 ROS 水平, 从而抑制成纤维细胞的活化。

3 筛选 TET 降低成纤维细胞 ROS 水平的关键基因

线粒体是 ROS 的主要来源, 在产生 ATP 的同时, 线粒体消耗氧气并产生 ROS^[28]。因此, 为了研究 TET 调控成纤维细胞 ROS 水平的关键基因, 本研究进一步采用 CRISPR/Cas9 文库筛选技术, 在过表达 Cas9 蛋白的小鼠成纤维细胞株中感染线粒体相关基因文库, 获

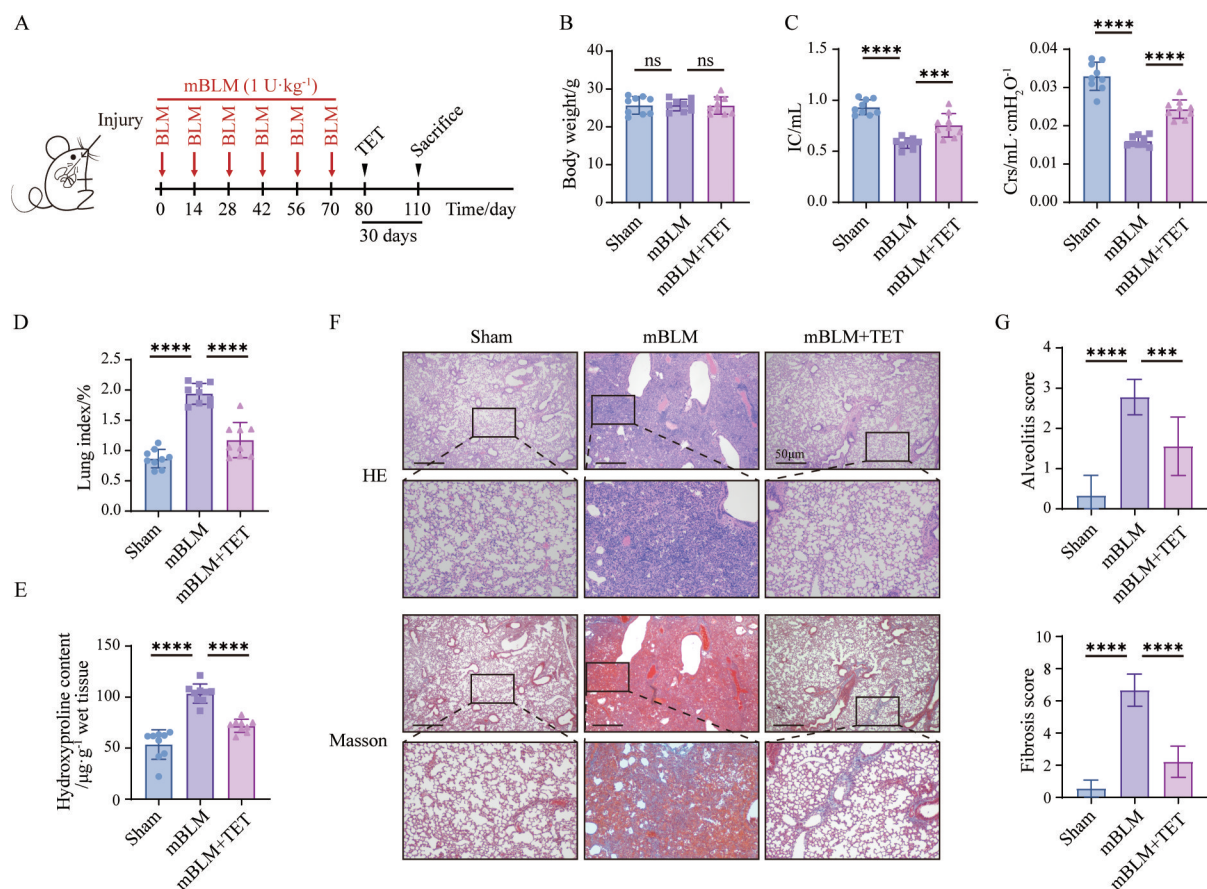


Figure 1 Tetrandrine (TET) attenuates pulmonary fibrosis (PF) development. A: Schematic of $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TET administration in the model of multiple bleomycin (mBLM) lung fibrosis mice; B: The mouse body weights; C: Pulmonary function indices including inspiratory capacity (IC) and respiratory system compliance (CrS); D, E: Lung indexes (D) and hydroxyproline contents (E) were assessed to evaluate the PF changes; F: H&E staining (up) and Masson staining (down) were analyzed to evaluate fibrotic changes of mBLM-challenged mice along with $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TET treatment. Scale bars, $50 \mu\text{m}$; G: The alveolitis score (Szapiel score) and the fibrosis score (Ashcroft score) were assessed for determining the degree of lung inflammatory response and fibrotic changes. $n = 9$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

得 MLg-Cas9-MMT 细胞株, 实现了 MLg 细胞中线粒体相关基因的敲除 (图 3A、B)。在 TGF- β 1 ($10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 刺激下, MLg-Cas9-MMT 细胞经 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TET 处理, 并使用 ROS 检测试剂盒中 DCFH-DA 染料进行染色, 之后利用流式分选技术分离 ROS 水平高 (FITC 阳性) 和 ROS 水平低 (FITC 阴性) 的细胞 (图 3C)。随后, 从这些细胞中提取基因组 DNA, 构建文库进行高通量测序, 利用 MAGeCK 算法进行下游分析 (图 3D); 并结合 GEO 数据库中肺纤维化数据集 (GSE173355、GSE47460) 的表达量分析 (图 3E) 及相关性分析 (图 3F) 结果, 识别到 TET 调节 ROS 水平、抑制肺纤维化的关键基因: 高通量测序结果显示, *Agtrap* 与 *Mpp6* 基因在筛选结果中排名靠前 (图 3D); 表达量分析显示, *Agtrap* 与 *Mpp6* 在肺纤维化患者中显著下调 (图 3E); 且与一氧化碳弥散量 (DLCO)、支气管扩张剂前用力肺活量 (FVC_pre_bd)、支气管扩张剂前第一秒用力呼

气量 (FEV1_pre_bd) 3 种肺功能指标均呈正相关 (图 3F); 另外, 在 PLF、MRC5、MLg3 种成纤维细胞接受 TGF- β 1 刺激后, *Agtrap* 和 *Mpp6* 基因表达显著下降, 而在 TET 治疗后, 两种基因表达水平随 TET 浓度增加有明显上升 (图 3G)。上述结果提示, TET 可能通过表达 AGTRAP 及 MPP6 蛋白降低 ROS 水平, 抑制成纤维细胞活化。

4 TET 通过 AGTRAP 及 MPP6 抑制 ROS 水平

先前研究表明, AGTRAP^[29]能够特异性结合血管紧张素 II 1 型受体 AT1R 并促进其内化, 从而抑制 ROS 产生、抑制成纤维细胞活化及促纤维化级联反应。MPP6 是构成外周膜相关鸟苷酸激酶 (MAGUK) 的重要亚家族之一, 参与细胞黏附、细胞极性调节等多种生物学过程, 其缺失能够显著提高细胞 ROS 水平, 影响线粒体功能及细胞活性^[30], 对成纤维细胞的活化和极化有抑制作用。为了进一步探索 AGTRAP 和 MPP6 在

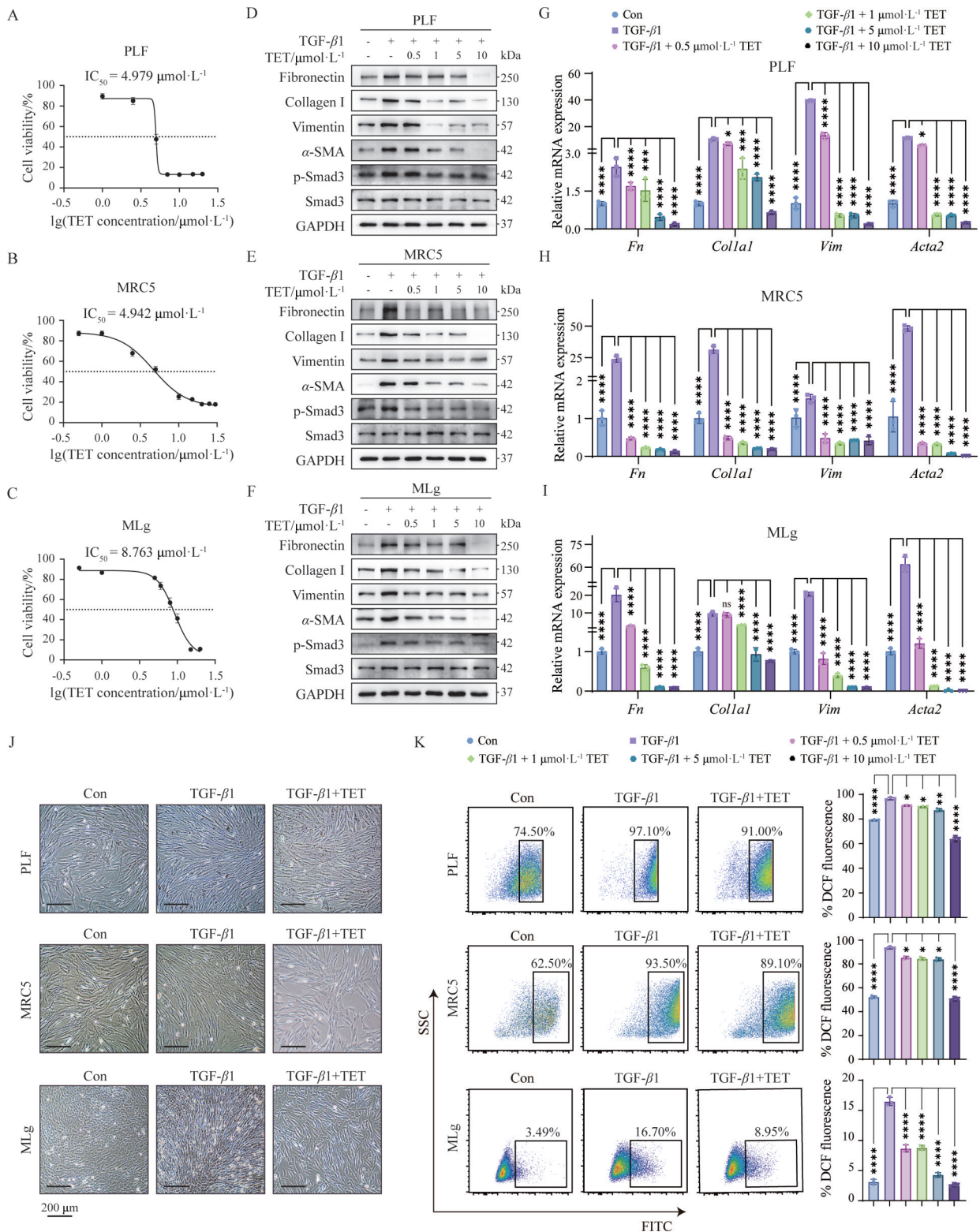


Figure 2 TET suppresses TGF- β signaling pathway and reduces reactive oxygen species (ROS) levels in fibroblasts. A–C: IC_{50} graph of TET in PLF (A), MRC5 (B), and MLg (C) at 24 h to test the cytotoxicity of TET by CCK-8 assay; D–F: Western blot of fibronectin, collagen I, vimentin, α -SMA, p-Smad3, and Smad3 proteins in PLF (D), MRC5 (E), and MLg (F) after 10 ng·mL $^{-1}$ TGF- β 1 and different concentrations of TET exposure (0.5, 1, 5, and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); G–I: Quantitative real-time PCR (qPCR) of *Fn*, *Colla1*, *Vim*, *Acta2* mRNA expression in PLF (G), MRC5 (H), and MLg (I) after TET treatment in the TGF- β 1 model; J: Cell morphology images of three fibroblast cells after the treatment of 10 ng·mL $^{-1}$ TGF- β 1 and 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TET. Scale bars, 200 μm ; K: Flow cytometry analysis (left, 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TET) and quantitative diagram (right) of DCF-FITC positive cell percentage in fibroblast cells after the treatment of TGF- β 1 and different concentrations of TET using ROS reagent kit. $n = 3, \bar{x} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

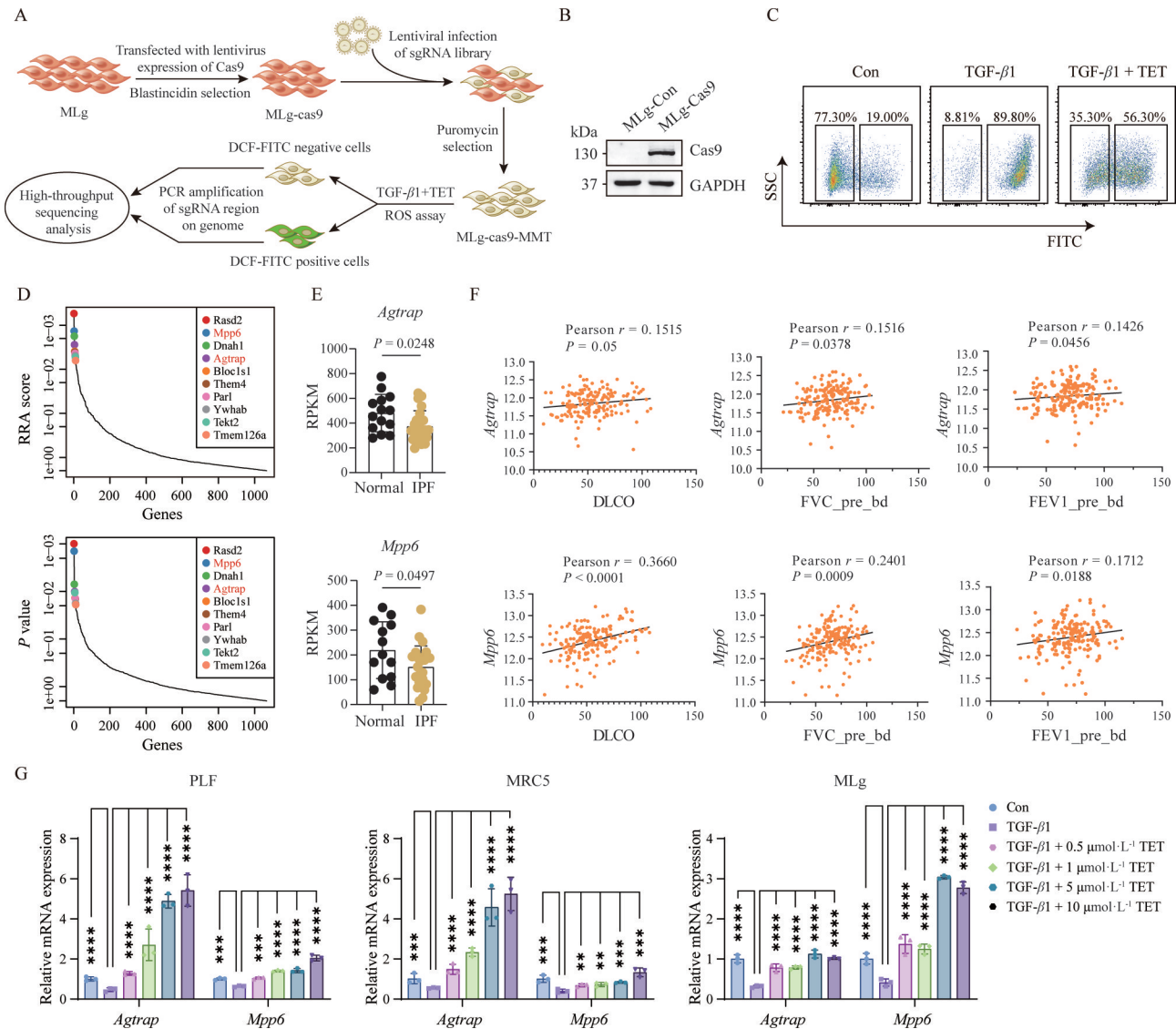


Figure 3 Angiotensin II type 1 receptor associated protein (AGTRAP) and membrane palmitoylated protein 6 (MPP6) are associated with the therapeutic effectiveness of TET treatment. A: Schematic diagram illustrates the workflow of MMT CRISPR/Cas9 knockout library screening; B: Western blot of Cas9 protein to detect the stable overexpression of Cas9 protein in MLg cells; C: The sorting strategy of MLg-Cas9-MMT cells after the treatment of 10 ng·mL⁻¹ TGF-β1 and 0.5 μmol·L⁻¹ TET; D: RRA score and P value of MAGeCK tests; E, F: AGTRAP and MPP6 protein expressions in GSE173355 dataset (E) and their correlation with lung function parameters in GSE47460 dataset (F); G: qPCR of *Agtrap* and *Mpp6* mRNA expression in PLF, MRC5, and MLg cells after TET treatment in the TGF-β1 model. *n* = 3, $\bar{x} \pm$ SEM. ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001

TET 抑制成纤维细胞活化中的作用, 本研究利用 CRISPR/Cas9 技术在 MLg-Cas9 细胞中敲除 *Agtrap* 和 *Mpp6* 基因 (图 4A、B), 随后检测在基因缺失条件下 TET 对 TGF-β1 诱导的成纤维细胞活化的抑制作用。通过 Western blot (图 4C~E) 和 qPCR (图 4F~H) 分析显示, 与对照组相比, 敲除 *Agtrap* 和 *Mpp6* 的细胞中, TET 对 TGF-β1 诱导表达的 fibronectin、vimentin、collagen I、α-SMA 以及 Smad3 蛋白磷酸化形式的抑制能力显著减弱。这表明敲除这两个基因降低了 TET 对成纤维细胞活化的抑制作用。此外, 明场观察进一

步发现, 在 *Agtrap* 及 *Mpp6* 基因缺失的条件下, TET 抑制成纤维细胞向更细长形态的转变能力也明显减弱 (图 4I)。同时, 流式细胞术结果也显示, TET 对 ROS 的抑制作用在 *Agtrap* 及 *Mpp6* 缺失后同样有所下降 (图 4J)。以上结果均提示, TET 可能通过表达 AGTRAP 和 MPP6 降低 ROS 水平, 从而抑制成纤维细胞活化。

讨论

肺纤维化始终是人类难以攻克的慢性疾病, 治疗

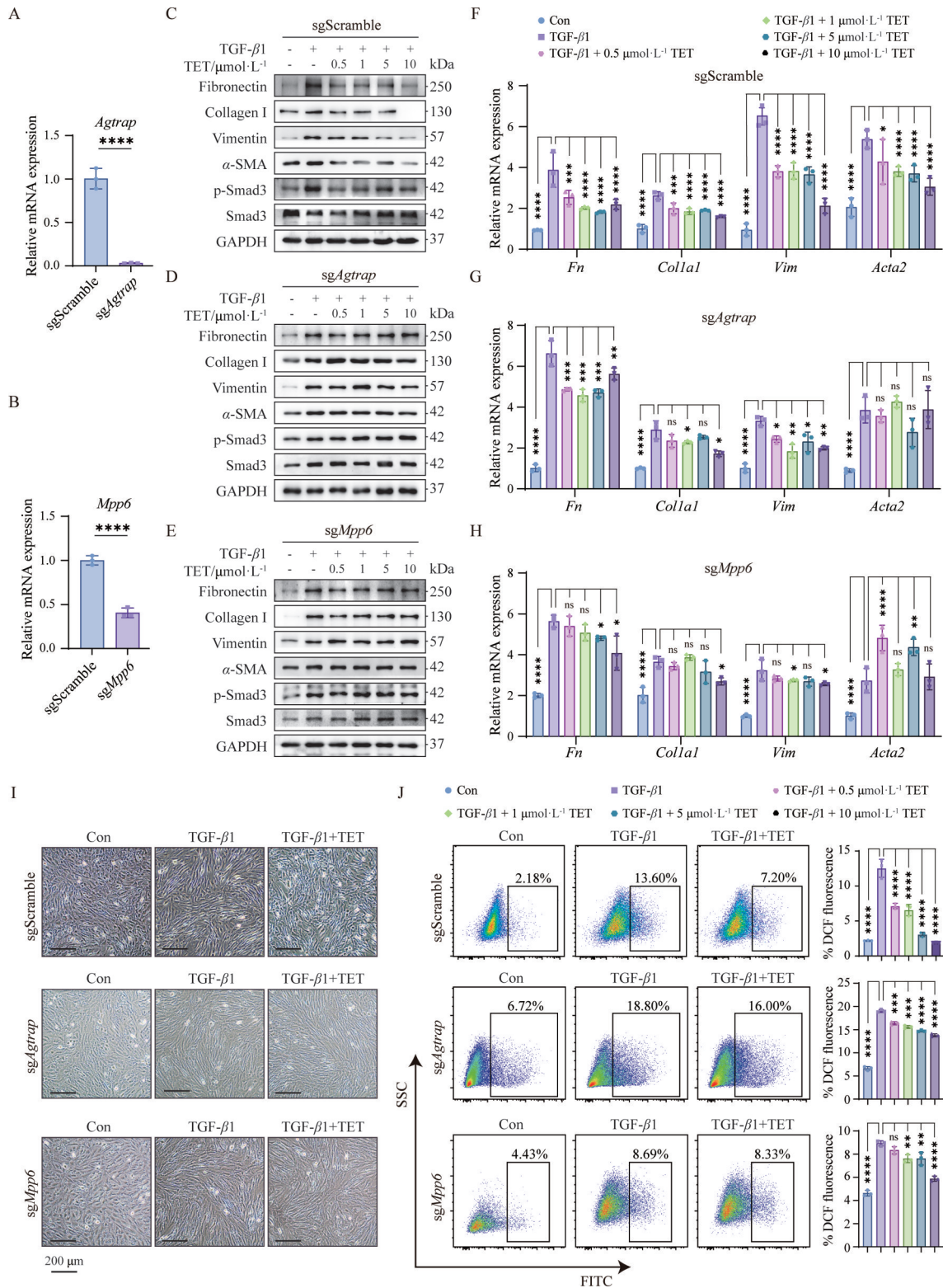


Figure 4 TET exerts its anti-fibrosis effects through the mechanisms involving AGTRAP and MPP6. A, B: qPCR analysis of mRNA levels of *Agtrap* (A) or *Mpp6* (B) in MLg-Cas9-sgScramble, sgAgtrap and sgMpp6 cells; C–E: Protein expressions of fibronectin, collagen I, vimentin, α -SMA, p-Smad3, and Smad3 in MLg-Cas9-sgScramble, sgAgtrap and sgMpp6 cells after the treatment of TGF- β 1 and different concentrations of TET; F–H: qPCR of *Fn*, *Coll1a1*, *Vim*, *Acta2* mRNA expressions in MLg-Cas9-sgScramble, sgAgtrap and sgMpp6 cells; I: Cell morphology of MLg-Cas9-sgScramble, sgAgtrap and sgMpp6 cells after the treatment of TGF- β 1 and 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TET. Scale bars, 200 μm ; J: Flow cytometry analysis (left, 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TET) and quantitative diagram (right) of DCF-FITC positive cell percentage in MLg-Cas9-sgScramble, sgAgtrap and sgMpp6 cells after the treatment of TGF- β 1 and different concentrations of TET using ROS assay kit. $n = 3$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

手段十分有限^[3]。虽然已有吡非尼酮和尼达尼布作为治疗用药,但疗效不佳且不良反应明显^[31]。中药活性成分由于成本低、毒副作用小、易于获得等特点,为肺纤维化的治疗提供了新的选择。

TET源自植物粉防己,已显示出明显的抗炎、抗纤维化作用^[15],且在矽肺治疗的临床应用上已有50余年历史^[32]。研究表明,TET在不同的动物模型中通过调节自噬^[33]、抑制炎症通路^[25]等多种机制,减轻肺部炎症,发挥抗纤维化作用。然而,以往研究采用的动物模型均有其局限性:如二氧化硅模型更贴近矽肺特征^[34];高氧及sBLM诱导则倾向于模拟急性肺损伤,且纤维化进程会自行消退;这些模型均未能完全再现人类肺纤维化疾病的复杂性^[35]。相比之下,mBLM模型通过模拟肺损伤的反复发生,更贴近人类肺纤维化的病理特征^[36]。因此,本研究通过重复气管内滴注博来霉素($1 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[21,36],更准确地模拟人类慢性肺纤维化的发病进程,从而进行TET治疗肺纤维化的机制探索。

成纤维细胞活化是肺纤维化形成和发展的关键驱动因素^[37],在此过程中,TGF- β 作为一种主要的促纤维化因子^[38],通过SMAD途径(经典途径)发挥作用。近期研究发现,TGF- β 1能够通过激活SMAD3信号通路促进NADPH氧化酶4(NOX4)基因表达^[11],并且通过抑制抗氧化酶[如过氧化氢酶^[39]、超氧化物歧化酶(SOD)^[12]或谷胱甘肽^[40]]的表达,影响线粒体功能及其代谢产物水平,促进ROS水平升高^[10,13,41];增加的ROS则能通过诱导NOX4表达^[42]、激活丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)、抑制MAPK磷酸酶功能^[6]或刺激大量炎症介质产生^[43],进一步激活TGF- β /SMAD信号通路,最终导致成纤维细胞活化和肺纤维化形成^[6]。本研究证明,通过抑制TGF- β /SMAD3通路的激活及ROS的产生,TET能够显著抑制成纤维细胞活化及肺纤维化进展。

血管紧张素II(Ang II)作为肾素-血管紧张素系统的关键神经激素配体,能够结合AT1R,诱导炎症,产生ROS,促进成纤维细胞活化及纤维化疾病进展^[44,45],而AGTRAP作为血管紧张素II 1型受体AT1R的特异性结合蛋白^[46,47],能够促进AT1R内化,抑制该过程的ROS产生及后续的纤维化进程^[48]。研究表明,Agtrap敲除会导致线粒体异常,增加ROS产生,加剧肾纤维化进程^[29];MPP6是构成外周膜相关鸟苷酸激酶(MAGUK)的重要亚家族之一,参与细胞黏附、细胞极性调节等多种生物学过程,研究人员^[49]发现Mpp6缺失能够显著提高卵母细胞ROS水平,影响线粒体功能从而改变卵母细胞活性。上述研究证明,AGTRAP和MPP6能够影响线粒体代谢功能及ROS水平,但其与

肺纤维化的关系尚不清楚。本研究不仅通过体内外实验验证了TET对肺纤维化及成纤维细胞活化的抑制作用;同时通过CRISPR/Cas9文库筛选技术揭示了TET能够通过促进AGTRAP与MPP6的表达,抑制TGF- β /SMAD3信号通路及ROS产生,发挥抗肺纤维化作用;因此,Agtrap与Mpp6可能是TET抗纤维化作用的潜在靶点。然而,本研究主要依赖体外细胞实验模型探究TET抗肺纤维化的作用机制,其在体内模型中的效果尚待验证;此外,Agtrap与Mpp6等线粒体相关基因在肺纤维化中的具体功能,以及TET调控其表达的分子机制仍需深入研究。综上所述,本研究不仅探索了TET在慢性肺纤维化治疗中的应用前景,筛选了其潜在的靶点,也为开发新的抗肺纤维化治疗策略提供了新的选择。

作者贡献: 严业超负责Western blot、qPCR、流式细胞术等实验工作;郭春伙负责细胞实验及流式分选工作;张家铭负责数据分析及文献整理工作;李云炫负责相关动物实验及数据库分析工作;李珂为文章框架的构思者及负责人。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Lederer DJ, Martinez FJ. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. N Engl J Med, 2018, 378: 1811-1823.
- [2] Zheng Q, Cox IA, Campbell JA, et al. Mortality and survival in idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review and meta-analysis [J]. ERJ Open Res, 2022, 8: 00591-02021.
- [3] Sharif R. Overview of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and evidence-based guidelines [J]. Am J Manag Care, 2017, 23: S176-S182.
- [4] Wilson MS, Wynn TA. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation [J]. Mucosal Immunol, 2009, 2: 103-121.
- [5] Frangogiannis NG. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis [J]. J Exp Med, 2020, 217: e20190103.
- [6] Liu RM, Desai LP. Reciprocal regulation of TGF- β and reactive oxygen species: a perverse cycle for fibrosis [J]. Redox Biol, 2015, 6: 565-577.
- [7] Samarakoon R, Chitnis SS, Higgins SP, et al. Redox-induced src kinase and caveolin-1 signaling in TGF- β 1-initiated SMAD2/3 activation and PAI-1 expression [J]. PLoS One, 2011, 6: e22896.
- [8] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15: 178-196.
- [9] Manickam N, Patel M, Griendling KK, et al. RhoA/Rho kinase mediates TGF- β 1-induced kidney myofibroblast activation through Poldip2/Nox4-derived reactive oxygen species [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 307: F159-F171.
- [10] Bueno M, Calyeca J, Rojas M, et al. Mitochondria dysfunction

- and metabolic reprogramming as drivers of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Redox Biol*, 2020, 33: 101509.
- [11] Hecker L, Vittal R, Jones T, et al. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury [J]. *Nat Med*, 2009, 15: 1077-1081.
- [12] Cui Y, Robertson J, Maharaj S, et al. Oxidative stress contributes to the induction and persistence of TGF- β 1 induced pulmonary fibrosis [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43: 1122-1133.
- [13] Richter K, Konzack A, Pihlajaniemi T, et al. Redox-fibrosis: impact of TGF β 1 on ROS generators, mediators and functional consequences [J]. *Redox Biol*, 2015, 6: 344-352.
- [14] Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Oxidative stress induced by reactive oxygen species (ROS) and NADPH oxidase 4 (NOX4) in the pathogenesis of the fibrotic process in systemic sclerosis: a promising therapeutic target [J]. *J Clin Med*, 2021, 10: 4791.
- [15] Jiang Y, Liu M, Liu H, et al. A critical review: traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Stephania tetrandra* S. Moore (Fen Fang Ji) [J]. *Phytochem Rev*, 2020, 19: 449-489.
- [16] Xi Y, Zhang H, Ye Z, et al. Research development on modern pharmacological effect of tetrandrine [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2020, 45: 20-28.
- [17] Lu Q, Jiang H, Zhu Q, et al. Tetrandrine ameliorates rheumatoid arthritis in mice by alleviating neutrophil activities [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: e8589121.
- [18] Li G, Li WR, Jin YG, et al. Tetrandrine attenuated doxorubicin-induced acute cardiac injury in mice [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: e2616024.
- [19] Liang Y, Sun L, Ma X, et al. Inhalation of tetrandrine liposomes for the treatment of bleomycin induced idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2022, 74: 103492.
- [20] Lv XX, Liu S, Li YX, et al. A simple method and the application of mouse tracheal intubation [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2020, 55: 1187-1192.
- [21] Cao Z, Lis R, Ginsberg M, et al. Targeting of the pulmonary capillary vascular niche promotes lung alveolar repair and ameliorates fibrosis [J]. *Nat Med*, 2016, 22: 154-162.
- [22] Szapiel SV, Elson NA, Fulmer JD, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120: 893-899.
- [23] Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale [J]. *J Clin Pathol*, 1988, 41: 467-470.
- [24] Li W, Xu H, Xiao T, et al. MAGECK enables robust identification of essential genes from genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screens [J]. *Genome Biol*, 2014, 15: 554.
- [25] Song M, Wang J, Sun Y, et al. Tetrandrine alleviates silicosis by inhibiting canonical and non-canonical NLRP3 inflammasome activation in lung macrophages [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43: 1274-1284.
- [26] Xi Y, Zhang H, Gao YH, et al. Effect of tetrandrine on Col-I and FN in TGF- β 1-induced MRC-5 cells [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2020, 26: 94-99.
- [27] Ong CH, Tham CL, Harith HH, et al. TGF- β -induced fibrosis: a review on the underlying mechanism and potential therapeutic strategies [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 911: 174510.
- [28] Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species [J]. *Biochem J*, 2009, 417: 1-13.
- [29] Uneda K, Wakui H, Maeda A, et al. Angiotensin II type 1 receptor-associated protein regulates kidney aging and lifespan independent of angiotensin [J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6: e006120.
- [30] Peng RR, Wang LL, Gao WY, et al. The 5.8S pre-rRNA maturation factor, M-phase phosphoprotein 6, is a female fertility factor required for oocyte quality and meiosis [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53: e12769.
- [31] Li YX, Lv XX, Liu C, et al. Pirfenidone and nintedanib inhibit the lung alveolar regeneration in chronic pulmonary fibrosis mouse [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2020, 55: 861-867.
- [32] Shang L, Dong Y, Liu B, et al. Pharmacological research and application progress of tetrandrine in treating idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *J Tianjin Univ Tradit Chin Med* (天津中医药大学学报), 2018, 37: 256-260.
- [33] Liu Y, Zhong W, Zhang J, et al. Tetrandrine modulates Rheb-mTOR signaling-mediated selective autophagy and protects pulmonary fibrosis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 739220.
- [34] Ma R, Huang X, Sun D, et al. Tetrandrine alleviates silica-induced pulmonary fibrosis through PI3K/AKT pathway: network pharmacology investigation and experimental validation [J]. *Inflammation*, 2024. DOI: 10.1007/s10753-023-01964-6.
- [35] Gul A, Yang F, Xie C, et al. Pulmonary fibrosis model of mice induced by different administration methods of bleomycin [J]. *BMC Pulm Med*, 2023, 23: 91.
- [36] Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, et al. Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 299: L442-L452.
- [37] Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators [J]. *Front Pharmacol*, 2014, 5: 123.
- [38] Peng D, Fu M, Wang M, et al. Targeting TGF- β signal transduction for fibrosis and cancer therapy [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21: 104.
- [39] Michaeloudes C, Sukkar MB, Khorasani NM, et al. TGF- β regulates Nox4, MnSOD and catalase expression, and IL-6 release in airway smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, 300: L295-L304.
- [40] Liu RM, Vayalil PK, Ballinger C, et al. Transforming growth factor β suppresses glutamate-cysteine ligase gene expression and induces oxidative stress in a lung fibrosis model [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 53: 554-563.
- [41] Lee JU, Song KS, Hong J, et al. Role of lung ornithine

- aminotransferase in idiopathic pulmonary fibrosis: regulation of mitochondrial ROS generation and TGF- β 1 activity [J]. *Exp Mol Med*, 2024, 56: 478-490.
- [42] Jain M, Rivera S, Monclus EA, et al. Mitochondrial reactive oxygen species regulate transforming growth factor- β signaling [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288: 770-777.
- [43] Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, et al. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20: 1126-1167.
- [44] Lu G, Xu S, Peng L, et al. Angiotensin II upregulates Kv1.5 expression through ROS-dependent transforming growth factor-beta1 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 signalings in neonatal rat atrial myocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 454: 410-416.
- [45] Campbell SE, Katwa LC. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, 29: 1947-1958.
- [46] Lopez-Illasaca M, Liu X, Tamura K, et al. The angiotensin II type I receptor-associated protein, ATRAP, is a transmembrane protein and a modulator of angiotensin II signaling [J]. *Mol Biol Cell*, 2003, 14: 5038-5050.
- [47] Wakui H. The pathophysiological role of angiotensin receptor-binding protein in hypertension and kidney diseases: Oshima Award Address 2019 [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2020, 24: 289-294.
- [48] Kobori H, Nangaku M, Navar LG, et al. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease [J]. *Pharmacol Rev*, 2007, 59: 251-287.
- [49] Cheng Q, Wang W, Liu J, et al. Elevated MPP6 expression correlates with an unfavorable prognosis, angiogenesis and immune evasion in hepatocellular carcinoma [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1173848.