

# 埃克替尼抑制肺泡上皮细胞上皮间充质转化进程改善博来霉素诱导的肺纤维化

许文奇<sup>1</sup>, 肖雷<sup>1</sup>, 徐炜<sup>2</sup>, 严静静<sup>3</sup>, 顾文强<sup>3</sup>, 李先伟<sup>3\*</sup> (1. 安徽医科大学第一附属医院东城院区, 合肥 230000; 2. 皖南医学院第二附属医院泌尿外科, 安徽 芜湖 241000; 3. 皖南医学院药理学教研室, 安徽 芜湖 241002)

**摘要:**目的 探究埃克替尼(icotinib, ICO)的抗肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)作用及其潜在的分子机制。方法 C57BL/6小鼠随机分为假手术(Sham)组、PF组、ICO 30 mg·kg<sup>-1</sup>剂量组及ICO 60 mg·kg<sup>-1</sup>剂量组,每组n=8。单次气管注射博来霉素(BLM, 3 mg·kg<sup>-1</sup>)建立小鼠PF模型。HE及Masson染色观察肺组织病理变化及胶原沉积情况。免疫组化检测肺组织I型胶原(collagen I)的表达。体外培养肺泡上皮细胞,实验设对照(control)组、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)组(100 ng·mL<sup>-1</sup>)及EGF联合ICO(0.1、1、10 mmol·L<sup>-1</sup>)3个剂量组。免疫荧光法检测细胞E-钙黏蛋白(E-cadherin)和 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)的表达及核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)p65核转移情况。Western blots检测肺组织和(或)细胞collagen I、E-cadherin、 $\alpha$ -SMA、Vimentin、磷酸化表皮生长因子受体(phosphorylation epidermal growth factor receptor, p-EGFR)、磷酸化核因子 $\kappa$ B抑制物 $\alpha$ (p-I $\kappa$ B $\alpha$ )、磷酸化NF- $\kappa$ B p65(p-NF- $\kappa$ B p65)的蛋白水平及NF- $\kappa$ B p65核转移情况。结果 动物实验表明,ICO抑制了BLM诱导的胶原沉积,减少了I型胶原的表达,减轻了博来霉素诱导的上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)(E-cadherin表达增加,Vimentin和 $\alpha$ -SMA表达减少),降低了EGFR、I $\kappa$ B $\alpha$ 和NF- $\kappa$ B p65的磷酸化水平并抑制了NF- $\kappa$ B p65的核转移。细胞实验发现,EGF可激活肺泡上皮细胞EMT和EGFR/NF- $\kappa$ B信号通路,而ICO可逆转这一作用。结论 ICO可能通过抑制EGFR/NF- $\kappa$ B信号通路的活化,逆转了EGF诱导的EMT和博来霉素诱导的小鼠肺纤维化。

**关键词:**埃克替尼;肺纤维化;上皮-间充质转化;表皮生长因子受体/核因子- $\kappa$ B信号通路

doi:10.11669/cpj.2024.12.007 中图分类号:R95.2 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)12-1120-09

## Icotinib Improves Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis by Inhibiting Epithelial-Mesenchymal Transition of Alveolar Epithelial Cells

XU Wenqi<sup>1</sup>, XIAO Lei<sup>1</sup>, XU Wei<sup>2</sup>, YAN Jingjing<sup>3</sup>, GU Wenqiang<sup>3</sup>, LI Xianwei<sup>3\*</sup> (1. Dongcheng District, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230000, China; 2. Department of Urology, The Second Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241000, China; 3. Department of pharmacology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** This study aimed to investigate the role and potential mechanisms of Icotinib (ICO) on pulmonary fibrosis. **METHODS** C57BL/6 mice were randomly divided into Sham group, PF group, ICO 30 mg·kg<sup>-1</sup> group and ICO 60 mg·kg<sup>-1</sup> group, 8 rats in each group. A mouse model of PF was induced by intratracheal injection of bleomycin (3 mg·kg<sup>-1</sup>). Hematoxylin-eosin staining and Masson trichrome staining for lung tissues were performed to observe the pathological alterations and collagen deposition. Immunohistochemical detection of lung tissue collagen type I (collagen I) expression. *In vitro*, the lung epithelial cells were divided into control group, epidermal growth factor (EGF) group, EGF combined with ICO (0.1, 1, 10 mmol·L<sup>-1</sup>) groups. The protein expression of E-cadherin,  $\alpha$ -SMA and nuclear transfer of NF- $\kappa$ B p65 were detected by immunofluorescence. The protein levels of Collagen I, E-cadherin,  $\alpha$ -SMA, Vimentin, phosphorylation epidermal growth factor receptor (p-EGFR), p-I $\kappa$ B $\alpha$ , p-NF- $\kappa$ B p65 and nuclear NF- $\kappa$ B p65 were detected by Western blot analysis in lung tissue and (or) cells. **RESULTS** The results demonstrated that ICO inhibited bleomycin-induced collagen deposition, reduced type I collagen expression, alleviated bleomycin-induced EMT (increased E-cadherin expression and decreased Vimentin and  $\alpha$ -SMA expression), and decreased phosphorylation of EGFR, I $\kappa$ B $\alpha$ , NF- $\kappa$ B p65 and nuclear translocation of NF- $\kappa$ B p65 *in vivo*. Furthermore, incubation of lung epithelial cells with EGF activated EMT and EGFR/NF- $\kappa$ B signaling pathway, and these effects were reversed by ICO *In vitro*. **CONCLUSION** In conclu-

**基金项目:**安徽省高校自然科学研究重大项目资助(KJ2021ZD0106);安徽省卫生健康委科研重点项目资助(AHWJ2021a033);皖南医学院教育基金会项目资助(HXKT2022028)

**作者简介:**许文奇,女,硕士研究生,主管药师 研究方向:药物作用机制及药物变态反应 \* **通讯作者:**李先伟,男,博士,教授,硕士生导师 研究方向:分子药理与呼吸系统药理 Tel:(0553)3932464

sion, ICO attenuates EGF-induced EMT in lung epithelial cells and bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by downregulating EGFR/NF- $\kappa$ B pathway.

**KEY WORDS:** Icotinib; Pulmonary fibrosis; epithelial-mesenchymal transition; EGFR/NF- $\kappa$ B signaling pathway

肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)是一种以细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积,气体交换和肺功能受损为特征的慢性、致死性肺部疾病<sup>[1]</sup>。目前治疗 PF 的药物主要为吡非尼酮和尼达尼布,但其阻止纤维化进展的效果有限,且伴有不同程度的不良反应,阻碍了其广泛应用。因此,急需新的治疗方法来预防和治疗 PF<sup>[2]</sup>。

PF 的发病机制尚不明确,目前的研究认为它始于肺损伤后的异常组织修复<sup>[3]</sup>。肺损伤后,肺泡 II 型上皮细胞通过自我更新和分化为肺泡 I 型上皮细胞参与修复过程<sup>[4]</sup>。此外,肺泡 II 型上皮细胞通过上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)获得间充质表型,刺激成纤维细胞活化和分化,并产生大量与肺纤维化相关的 ECM 分子<sup>[5]</sup>。而抑制肺泡 II 型上皮细胞 EMT 的发生,能够减轻 PF 的发生发展<sup>[6]</sup>。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)属于酪氨酸激酶受体家族,研究发现表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)通过 EGF/EGFR 信号通路可诱导肿瘤细胞发生 EMT,从而促进肿瘤细胞的侵袭和转移<sup>[7]</sup>。而最新研究还发现 EGF 通过 EGFR 也可以诱导肺泡 II 型上皮细胞发生 EMT<sup>[8]</sup>,但具体机制不清楚。

埃克替尼(icotinib, ICO)是我国自主研发的 EGFR-酪氨酸激酶抑制剂,可抑制肿瘤血管生成、增殖和转移,临床用于晚期非小细胞肺癌的治疗<sup>[9]</sup>。研究发现 ICO 可抑制非小细胞肺癌 A549 细胞增殖和 EMT<sup>[10]</sup>。而近期研究还发现 ICO 对肺动脉高压肺血管重构具有一定的抑制作用<sup>[11]</sup>。本研究以 EMT 为切入点,通过体内和体外实验探究 ICO 对肺纤维化的抑制作用及其机制,为延缓 PF 的发展提供新的思路和潜在的药物。

## 1 材料

### 1.1 动物与细胞

SPF 级 C57BL/6 小鼠(体质量 22 ~ 24 g)[塞业(苏州)生物科技有限公司,许可证号:SCXK(苏)2022-0016]。实验动物遵守皖南医学院动物伦理委员会伦理要求(伦理批号:LLSC-2022-052)。小鼠肺泡上皮细胞(MLE-12)(美国

生物标准品典藏中心)。

### 1.2 药品与试剂

盐酸埃克替尼(icotinib, ICO)片(杭州贝达药业股份有限公司,批号:A230403;规格:每片 0.125 g);细胞实验用 ICO(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,货号:I129405;纯度 $\geq$ 99%)。注射液盐酸博来霉素(日本化药株式会社,批号:220015;规格:每支 15 mg)。Masson 染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号:G1340)。免疫组化试剂盒(北京百奥莱博科技有限公司,货号:ZN1824)。I 型胶原(collagen I)抗体(货号:bsm-52478R)、上皮钙黏附分子(E-cadherin)抗体(货号:bs-10009R)、肌动蛋白 $\alpha$ ( $\alpha$ -SMA)抗体(货号:bsm-33187M)和波形蛋白(Vimentin)抗体(货号:bs-23063R)(北京博奥森生物技术有限公司)。表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)(美国 Sigma 公司,货号:SRP3196)。Coralite488 标记山羊抗小鼠 IgG(货号:SA00013-1)和 Coralite594 标记山羊抗兔 IgG(货号:SA00013-4)(武汉 Proteintech 公司)。细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒(货号:P0027)、NF- $\kappa$ B 激活-核转运检测试剂盒(货号:SN371)、GAPDH(货号:AF0006)及 Histone H3 抗体(货号:AF0009)(上海碧云天生物技术有限公司)。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)(货号:sc-373746)和磷酸化 EGFR(p-EGFR)抗体(货号:sc-57542)、核因子 $\kappa$ B-p65(NF- $\kappa$ B p65)抗体(货号:sc-8008)、磷酸化 NF- $\kappa$ B p65(phosphorylated NF- $\kappa$ B p65, p-NF- $\kappa$ B p65)抗体(货号:sc-136548)及 NF- $\kappa$ B 抑制物 $\alpha$ (inhibitor of NF- $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ )抗体(货号:sc-1643)、磷酸化 I $\kappa$ B $\alpha$ (phosphorylated I $\kappa$ B $\alpha$ , p-I $\kappa$ B $\alpha$ )抗体(货号:sc-8404)(美国 Santa Cruz 公司)。

### 1.3 仪器

HistoCore 石蜡切片机和 STELLARIS DIVE 激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司);JEM1400 Flash 透射电镜(日本电子公司);Axio Vert. A1 荧光倒置显微镜(德国 ZEISS 公司);infinite M200PRO 多功能酶标仪(瑞士 TECAN 公司);GE Amersham Imager600 自动化学发光凝胶成像分析仪(美国通用电气公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物实验分组与给药

C57BL/6 小鼠随机分为假手术 (Sham) 组、PF 组、ICO 30 mg · kg<sup>-1</sup> 剂量组及 ICO 60 mg · kg<sup>-1</sup> 剂量组, 每组  $n = 8$ , ICO 给药剂量参照文献[11]方法设置。参照文献[12]方法单次气管注射博来霉素 (3 mg · kg<sup>-1</sup>) 建立小鼠 PF 模型。博来霉素注射后第 3 天开始灌胃给予 ICO, Sham 和 PF 组灌胃给予等体积的 3 g · L<sup>-1</sup> 甲基纤维素钠溶液。连续给药 4 周处理动物, 进行相关指标检测。

### 2.2 HE 和 Masson 染色观察肺组织病理变化

小鼠三溴乙醇 (300 mg · kg<sup>-1</sup>) 腹腔注射麻醉后, 取左肺用 4% 多聚甲醛固定后, 根据我们前期实验方法进行 HE 和 Masson 染色<sup>[13]</sup>, 光镜下观察肺组织病理变化和胶原沉积情况。

### 2.3 免疫组织化学染色检测肺组织 collagen I 蛋白表达

石蜡切片脱蜡至水, 抗原修复后用 50 g · L<sup>-1</sup> BSA 封闭液室温封闭 20 min, 分别滴加兔抗 Collagen I 抗体 (1:400), 4 °C 过夜; 充分洗涤后, 滴加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1:2 000), 室温孵育 60 min; 充分洗涤后, 滴加 SABC-AP (1:100), 室温孵育 60 min; BCIP/NBT 室温显示 10 min。collagen I 蛋白阳性表达呈黄色或棕黄色颗粒。利用 Image J 软件进行 collagen I 阳性表达定量分析, 步骤如下: 在软件中设置相同的光密度校正参数、测量环境参数及选色条件参数; 先测量 collagen I 阳性染色区域的面积, 即积分光密度 (integrated optical density, IOD), 再测量选定范围的面积 (Area)。计算 collagen I 阳性表达平均光密度 (mean optical density, MOD), MOD = IOD/Area。

### 2.4 细胞实验分组与处理

体外培养肺泡上皮细胞。细胞实验设对照 (Control) 组、EGF 组 (100 ng · mL<sup>-1</sup>) 及 EGF 联合 ICO (0.1、1、10 mmol · L<sup>-1</sup>) 3 个剂量组。细胞先用 ICO 预处理 30 min, 再用 EGF 处理 48 h。每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

### 2.5 免疫荧光检测细胞 E-cadherin 及 $\alpha$ -SMA 蛋白表达情况

细胞接种于激光共聚焦培养皿中, 根据细胞实验分组及方法处理细胞后。分别进行固定、破膜、洗涤和封闭处理后, 分别加入兔抗 E-cadherin 抗体 (1:200) 和小鼠抗  $\alpha$ -SMA 抗体 (1:100), 4 °C 过夜。洗涤后分别加入 Coralite488 标记山羊抗小鼠 IgG (1:500) 和 Coralite594 标记山羊抗兔 IgG

(1:1 000), 室温避光孵育 2 h。洗涤后滴加 DAPI 染色 5 min。用激光共聚焦显微镜 (绿色荧光, 激发波长 488 nm; 红色荧光, 激发波长 594 nm; 蓝色荧光, 激发波长 405 nm) 观察蛋白表达情况并拍照。

### 2.6 免疫荧光检测 NF- $\kappa$ B p65 核转移情况

细胞接种于激光共聚焦培养皿中, 根据细胞实验分组及方法处理细胞后。分别进行固定、洗涤、封闭处理后, 滴加 NF- $\kappa$ B p65 抗体 (1:500) 1 mL, 4 °C 过夜。洗涤后再滴加 200  $\mu$ L 抗小鼠 Cy3 抗体, 室温避光孵育 1 h。滴加 DAPI 染色 5 min。用激光共聚焦显微镜 (红色荧光, 激发波长 594 nm; 蓝色荧光, 激发波长 405 nm) 观察 NF- $\kappa$ B p65 核转移情况并拍照。

### 2.7 蛋白质印迹法 (Western blot, WB) 检测肺组织和肺泡上皮细胞相关蛋白的表达

低温条件下提取右肺和肺泡上皮细胞总蛋白或核蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。参照前期的研究方法进行 Western blot 检测<sup>[13]</sup>。相关一抗稀释浓度分别为 collagen I (1:1 000)、E-cadherin (1:1 000)、 $\alpha$ -SMA (2:1 000)、Vimentin (1:1 000)、EGFR (1:1 000)、p-EGFR (1:500)、NF- $\kappa$ B p65 (1:1 000)、p-NF- $\kappa$ B p65 (1:500)、I $\kappa$ B $\alpha$  (1:1 000)、p-I $\kappa$ B $\alpha$  (1:500)、NF- $\kappa$ B p65 (核内) (1:1 000)、GAPDH (1:3 000) 及 Histone H3 (1:2 000)。相应 HRP 标记的山羊抗小鼠或 HRP 标记的山羊抗兔二抗稀释浓度 (1:2 000 ~ 1:4 000)。用 Image J 1.52 软件进行灰度值测量并统计分析蛋白相对表达量。

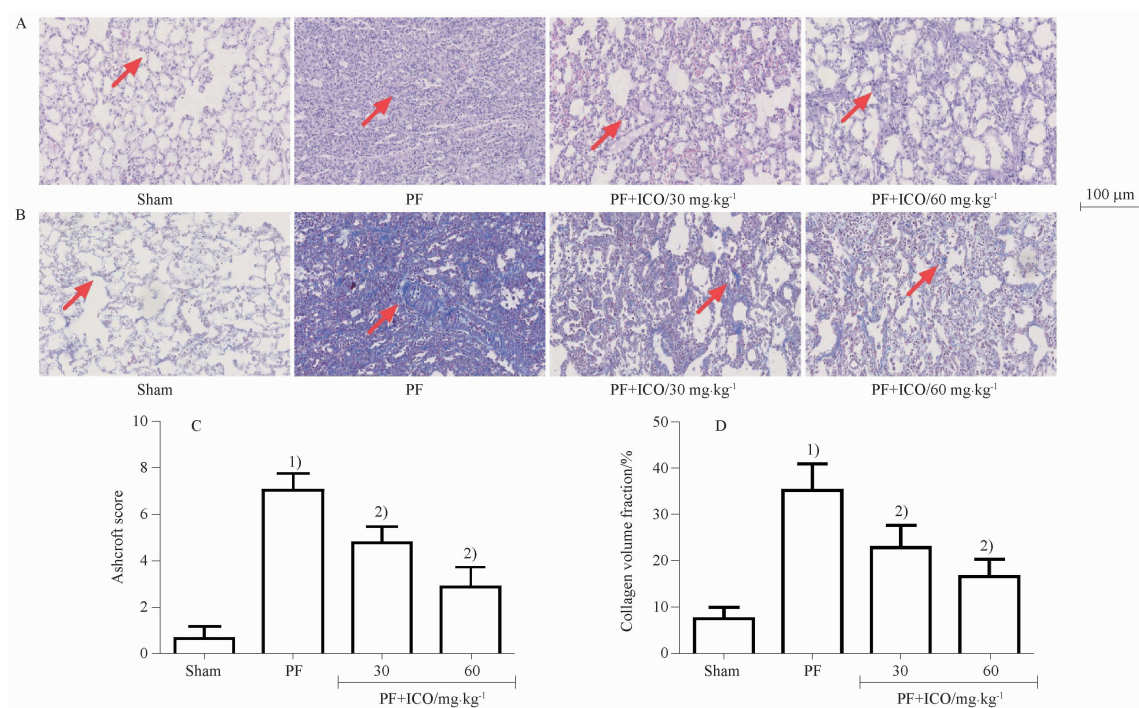
### 2.8 统计学分析

数据以均数  $\bar{x} \pm s$  表示。用 SPSS 22 统计软件中的 one-way ANOVA 及 SNK- $q$  检验方法进行统计分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 ICO 改善博来霉素诱导的小鼠肺纤维化

HE 和 Masson 染色结果显示, Sham 组小鼠肺组织结构完整, 肺泡间隔正常, 未见明显炎症细胞浸润和蓝色胶原纤维沉积, PF 组肺组织结构紊乱, 肺泡间隔增厚, 并伴有明显的炎症细胞浸润和大量蓝色胶原纤维沉积, 而 ICO 治疗组肺组织病理损伤和胶原纤维沉积均有不同程度减轻。定量分析结果发现, 与 Sham 组相比, PF 组肺纤维化程度 Ashcroft 评分和 CVF 百分比明显升高 ( $P < 0.01$ ), 而与 PF 组相比, ICO 治疗组 Ashcroft 评分和 CVF 百分比均有不同程度的降低 ( $P < 0.01$ ), 且 ICO 高剂量组作用优于 ICO 低剂量组 (图 1)。



A - 肺组织苏木精-伊红(HE)染色( $\times 200$ ); B - 肺组织马松(Masson's)染色( $\times 200$ ); C - 肺组织阿什克罗夫特(Ashcroft)纤维化评分; D - 肺组织胶原容积分数(CVF)与假手术组相比,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与肺纤维化组相比,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ; A图箭头所示纤维化程度; B图箭头所示胶原沉积情况。

A - HE staining of lung tissue ( $\times 200$ ); B - Masson's trichrome staining of lung tissue ( $\times 200$ ); C - quantification of fibrosis using Ashcroft scale score; D - collagen volume fraction (CVF) of lung tissue;<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ , vs sham group;<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ , vs PF group; Arrows show the degree of fibrosis in Fig. A; Arrows show collagen deposition in Fig. B.

**图1** 埃克替尼(ICO)减轻博来霉素诱导的小鼠肺纤维化(PF)。  $n = 8, \bar{x} \pm s$

**Fig. 1** Icotinib ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice.  $n = 8, \bar{x} \pm s$

### 3.2 ICO抑制博来霉素诱导的肺纤维化小鼠肺组织I型胶原的表达

WB结果显示,与Sham组相比,PF组I型胶原蛋白表达显著升高( $P < 0.01$ ),而与PF组相比,ICO治疗组I型胶原蛋白表达均有不同程度的降低( $P < 0.01$ ),且ICO高剂量组抑制作用优于ICO低剂量组(图2A、B)。免疫组化结果显示,与Sham组相比,PF组I型胶原阳性表达平均光密度(MOD)显著升高( $P < 0.01$ ),而与PF组相比,ICO治疗组I型胶原阳性表达MOD均有不同程度的降低( $P < 0.01$ )(图2C、D)。

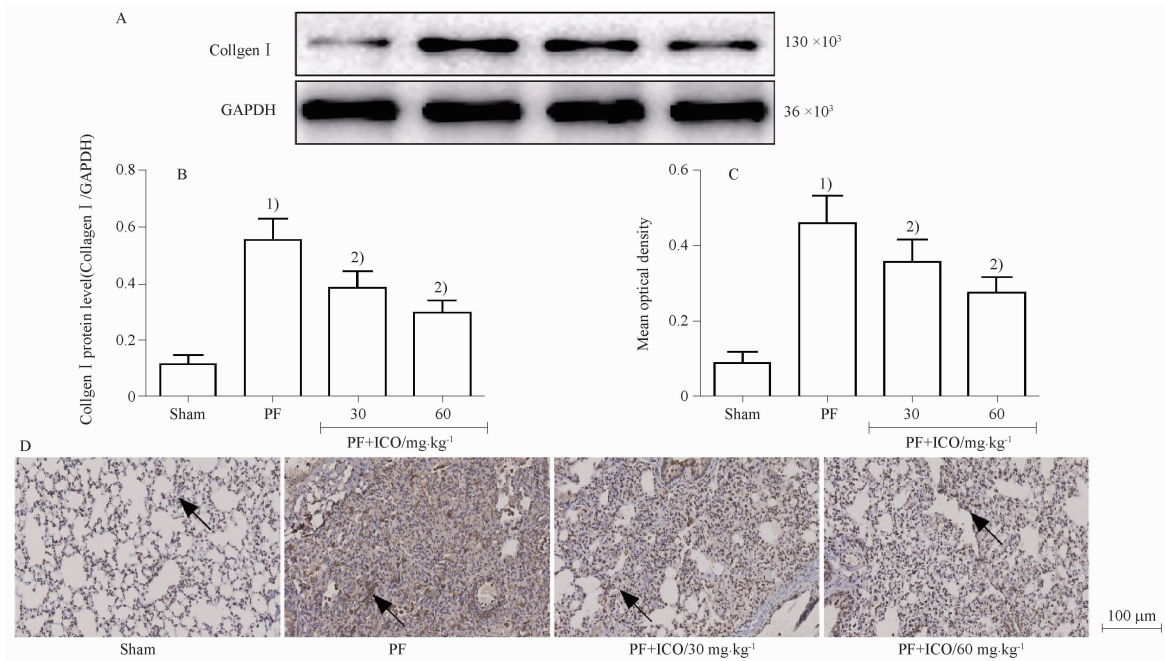
### 3.3 ICO抑制肺泡上皮细胞EMT进程

动物实验结果显示,与Sham组相比,PF组肺泡上皮细胞标志物E-cadherin的表达明显下调而间质细胞标志物 $\alpha$ -SMA和Vimentin的表达明显上调( $P < 0.01$ )。而与PF组相比,ICO治疗组E-cadherin的表达明显升高而 $\alpha$ -SMA和Vimentin的表达明显降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),且ICO高剂量组逆转作用优于ICO低剂量组(图3)。细胞实验结果发现,EGF处理肺泡上皮细胞后,经WB和

免疫荧光染色检测发现E-cadherin表达明显降低而 $\alpha$ -SMA和(或)Vimentin表达明显升高( $P < 0.01$ )。而ICO处理组可明显逆转EGF引起的E-cadherin表达降低和 $\alpha$ -SMA、Vimentin表达升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),从而抑制了EMT进程(图4~5)。

### 3.4 ICO对EGFR、I $\kappa$ B $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B p65磷酸化水平及NF- $\kappa$ B p65核转移的影响

动物实验结果所示,与Sham相比,PF组肺组织EGFR、I $\kappa$ B $\alpha$ 及NF- $\kappa$ B p65磷酸化水平明显上调、NF- $\kappa$ B p65核转移程度明显增加( $P < 0.01$ )。与PF组比较,ICO治疗组p-EGFR、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 及p-NF- $\kappa$ B p65水平及NF- $\kappa$ B p65核转移程度均不同程度降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )(图6)。体外实验结果所示,与Control组相比,EGF组EGFR、I $\kappa$ B $\alpha$ 及NF- $\kappa$ B p65磷酸化水平明显上调、NF- $\kappa$ B p65核转移程度显著增加( $P < 0.01$ )。与EGF组相比,ICO(0.1、1、10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)3个剂量组EGFR、I $\kappa$ B $\alpha$ 及NF- $\kappa$ B p65磷酸化水平及NF- $\kappa$ B p65核转移程度均不同程度下降( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )(图7~8)。

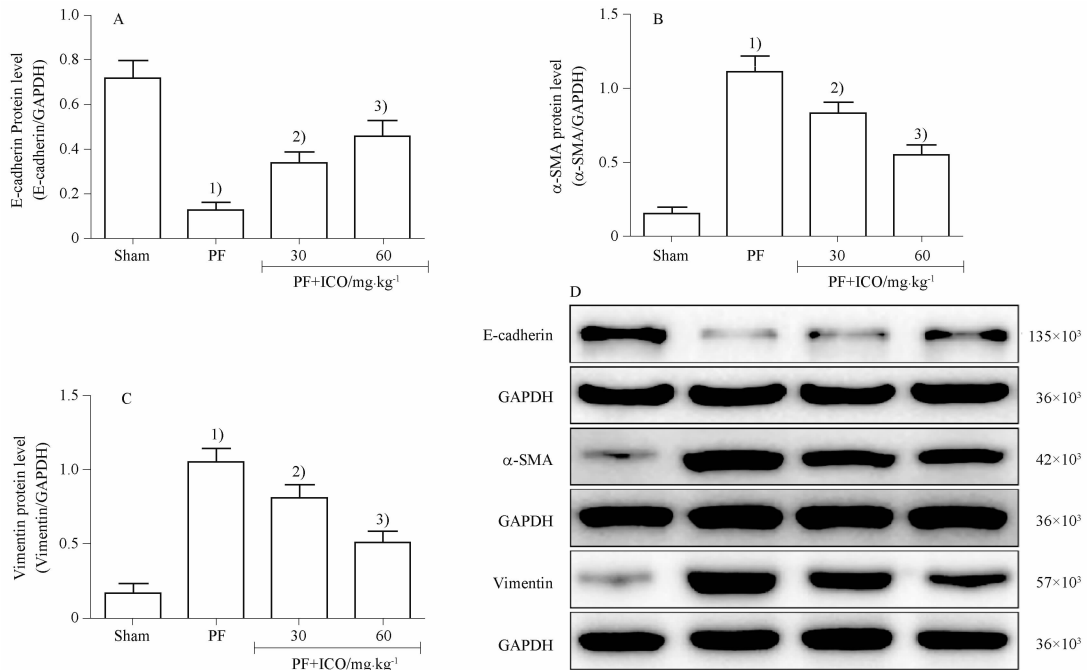


A - collagen I 蛋白条带; B - collagen I 蛋白相对表达量; C - 肺组织 collagen I 阳性表达平均光密度; D - 肺组织 collagen I 蛋白免疫组化染色 ( $\times 200$ , 箭头所示为阳性表达); 与假手术组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与肺纤维化组相比, <sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

A - the band of collagen I protein; B - the collagen I relative expression level; C - mean optical density of Collagen I positive expression; D - immunohistochemistry staining of Collagen I in lung tissues (arrows indicate immunostaining positive,  $\times 200$ ); <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , vs sham group; <sup>2)</sup> $P < 0.01$ , vs PF group.

**图 2** ICO 对肺纤维化小鼠肺组织 I 型胶原 (collagen I) 蛋白表达的影响。  $n = 8, \bar{x} \pm s$

**Fig. 2** Effects of Icotinib on the collagen I expression of lung tissues in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice.  $n = 8, \bar{x} \pm s$

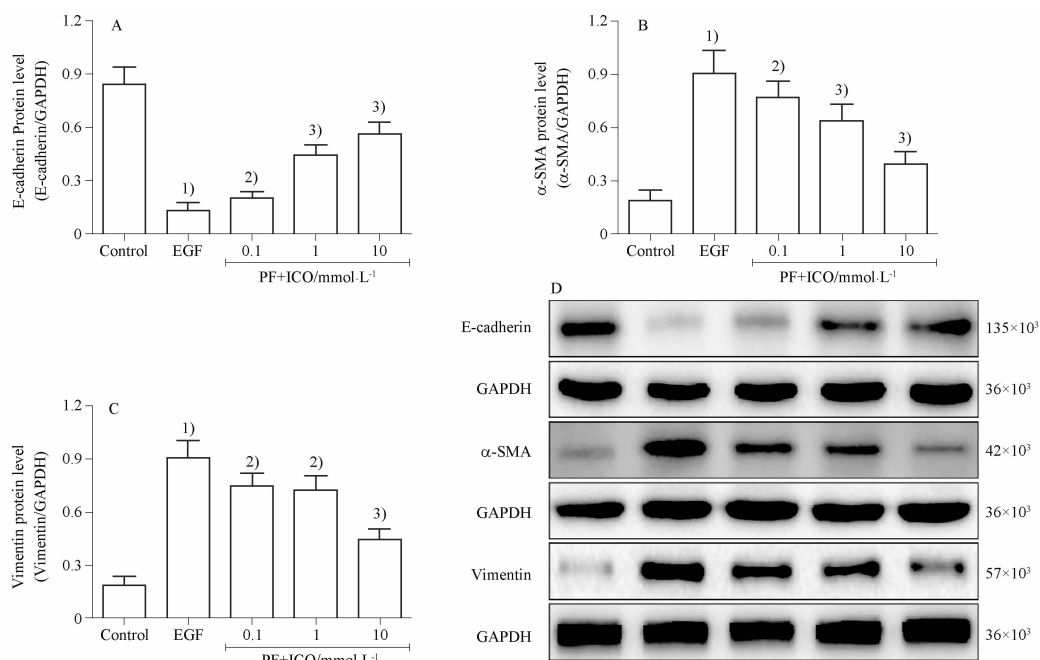


A - E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 蛋白相对表达量; B -  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 蛋白相对表达量; C - 波形蛋白 (vimentin) 蛋白相对表达量; D - E-cadherin、 $\alpha$ -SMA 和 vimentin 蛋白条带; 与假手术组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与肺纤维化组相比, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

A - the E-cadherin relative expression level; B - the  $\alpha$ -SMA relative expression level; C - the vimentin relative expression level; D - the band of E-cadherin,  $\alpha$ -SMA and vimentin protein; <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , vs sham group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ , vs PF group.

**图 3** ICO 抑制博莱霉素诱导的上皮-间充质转化 (EMT) 过程。  $n = 8, \bar{x} \pm s$

**Fig. 3** Icotinib reduced the BLM-induced EMT process.  $n = 8, \bar{x} \pm s$



A - E-cadherin 蛋白相对表达量; B -  $\alpha$ -SMA 蛋白相对表达量; C - vimentin 蛋白相对表达量; D - E-cadherin、 $\alpha$ -SMA 和 vimentin 蛋白条带; 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与 EGF 组相比, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

A - the E-cadherin relative expression level; B - the  $\alpha$ -SMA relative expression level; C - the Vimentin relative expression level; D - the band of E-cadherin,  $\alpha$ -SMA and vimentin protein; <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , vs control group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ , vs EGF group.

图 4 ICO 抑制表皮生长因子(EGF)诱导的肺泡上皮细胞 EMT 过程。  $n = 9, \bar{x} \pm s$

Fig. 4 Icotinib ameliorated EGF-induced EMT in alveolar epithelial cells *in vitro*.  $n = 9, \bar{x} \pm s$

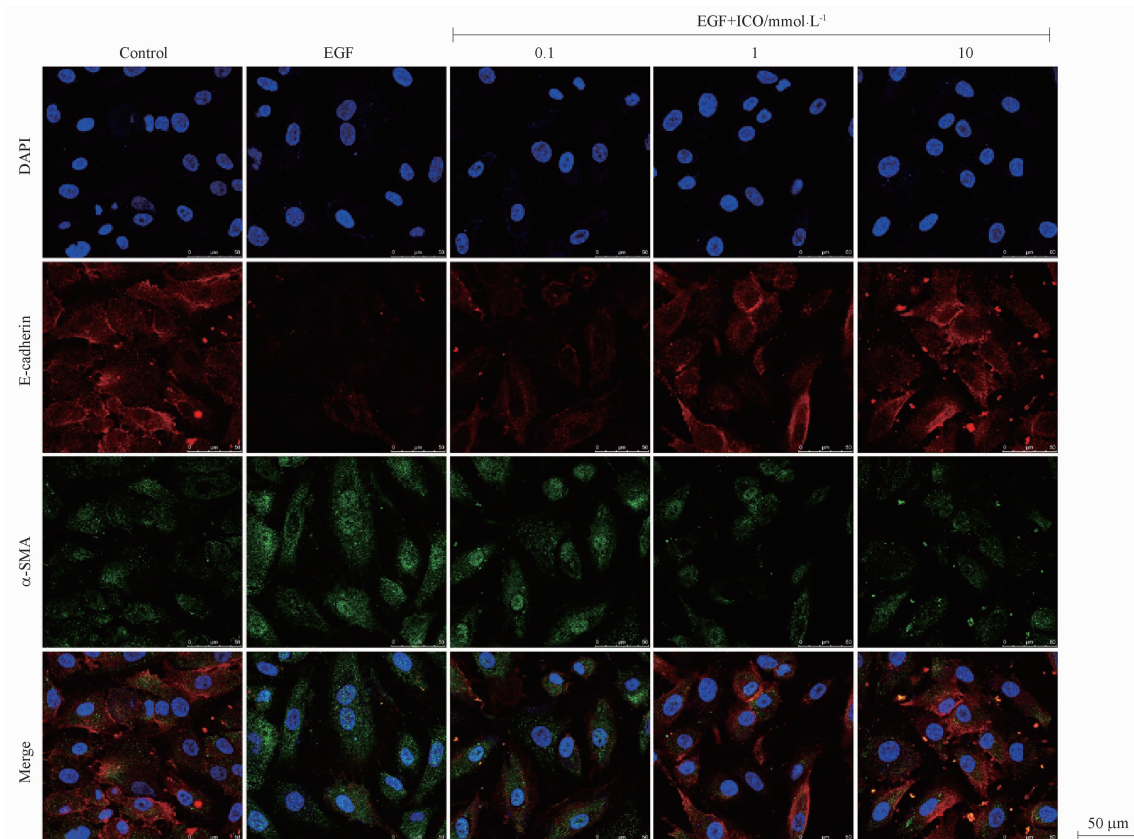
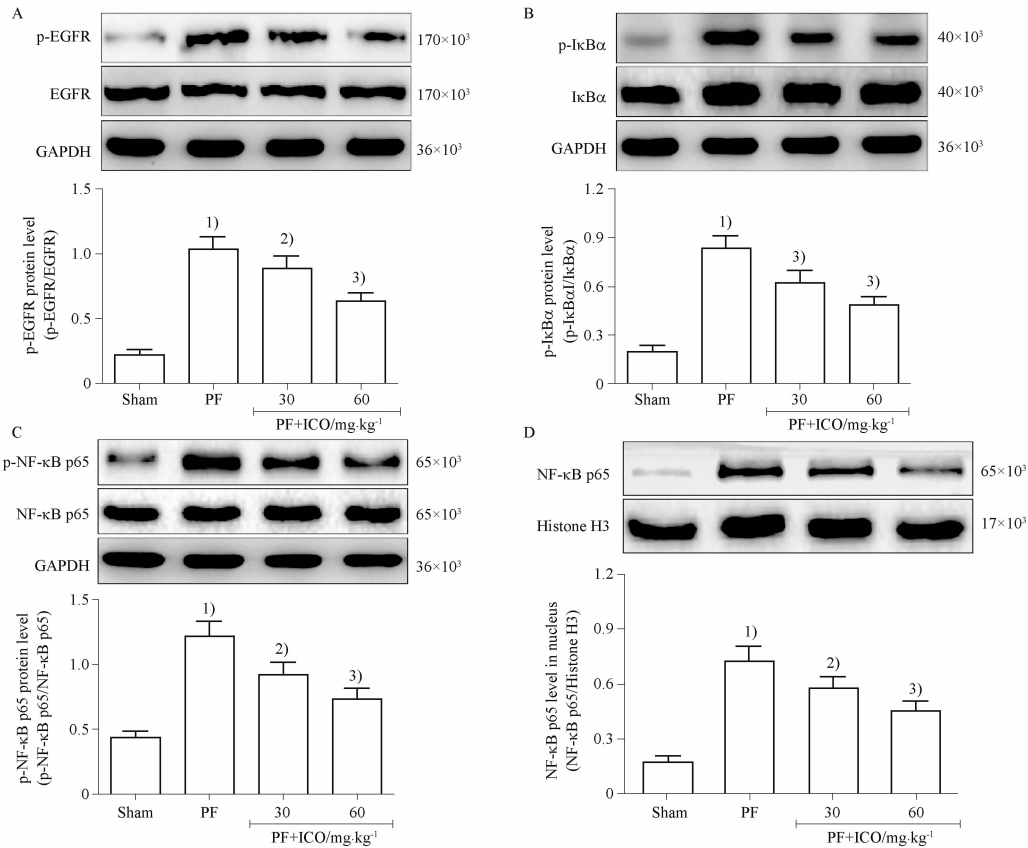


图 5 ICO 对 EGF 诱导肺泡上皮细胞 E-cadherin 和  $\alpha$ -SMA 表达的影响(免疫荧光染色,  $\times 800$ )

Fig. 5 Effects of icotinib on EGF-induced expression of E-cadherin and  $\alpha$ -SMA in alveolar epithelial cells (immunofluorescence staining,  $\times 800$ )



A - EGFR 磷酸化水平; B - 核因子  $\kappa$ B 抑制物  $\alpha$  ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ) 磷酸化水平; C - NF- $\kappa$ B p65 磷酸化水平; D - NF- $\kappa$ B p65 核转移程度; 与假手术组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与肺纤维化组相比, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

A - the level of EGFR phosphorylation; B - the level of  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  phosphorylation; C - the level of NF- $\kappa$ B p65 phosphorylation; D - the level of NF- $\kappa$ B p65 nuclear translocation; <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , vs sham group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ , vs PF group.

图 6 ICO 对小鼠肺组织表皮生长因子受体 (EGFR) 及核转录因子的影响。  $n = 8, \bar{x} \pm s$

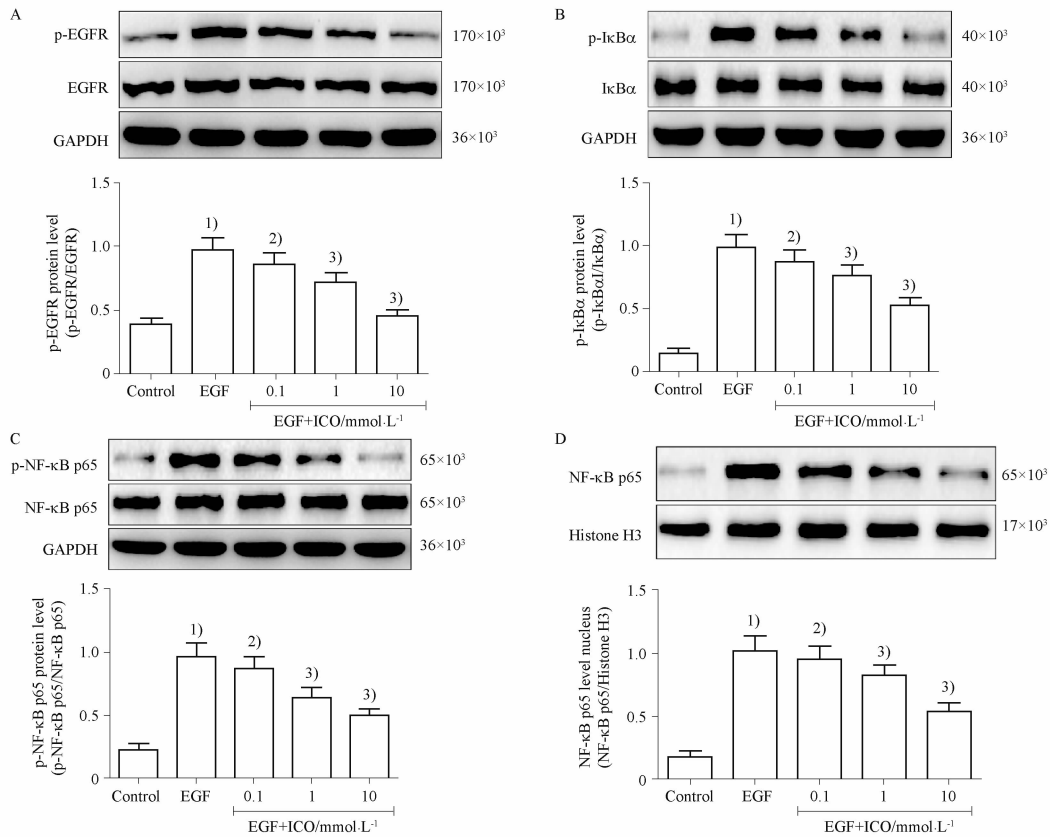
Fig. 6 Effects of icotinib on phosphorylation of EGFR,  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  and NF- $\kappa$ B p65 and nuclear translocation of NF- $\kappa$ B p65 in lung tissue of mice.  $n = 8, \bar{x} \pm s$

#### 4 讨论

PF 是一种以肺泡上皮损伤和胶原生成异常为特征的慢性进行性肺疾病,其发生机制尚不完全清楚,药物对 PF 的治疗效果也不尽如人意,因此,探究其发病机制、寻找潜在的药物对临床治疗具有重要意义<sup>[14]</sup>。博来霉素通过引起 DNA 链断裂和氧化损伤诱导肺损伤,可以复制肺纤维化的病理过程,是目前应用最广泛的动物模型<sup>[15]</sup>。在本研究中,HE 和 Masson 染色的组织病理学检查显示 BLM 诱导的小鼠有严重的肺组织结构紊乱,肺泡间隔增厚,并伴有大量胶原纤维沉积;WB 和免疫组化实验显示 I 型胶原的表达明显增加,从而验证了模型复制成功。而给药 ICO 干预后,上述肺组织病理损伤均有所改善,胶原沉积和 I 型胶原的表达水平均降低,从而产生了抗纤维化作用。

EMT 是上皮细胞向间充质细胞表型转化的过程,上皮细胞失去原有的接触黏附和极性,获得间充

质细胞的侵袭、迁移和产生 ECM 的特性<sup>[16]</sup>。大量研究表明 EMT 在 PF 发生发展中发挥着重要作用,抑制 BLM 或 TGF- $\beta$ 1 诱导的 EMT 进程能够不同程度缓解 PF 的进程<sup>[6,17]</sup>。研究表明,小鼠气管注射博来霉素后可引起肺损伤,持续的损伤可进一步导致炎症细胞分泌 TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1、EGF 等细胞因子激活成纤维细胞,促进成纤维细胞的增殖与活化,诱导肺泡上皮细胞 EMT,促进胶原蛋白的合成而引起 ECM 合成增加,促使肺纤维化的发生与发展<sup>[15]</sup>。EGF 作为一种生长因子,不仅参加了肿瘤细胞的 EMT 进程,也参与了肺泡上皮细胞 EMT 进程<sup>[7,18]</sup>。而近期的研究表明 ICO 可抑制 A549 细胞的 EMT 进程<sup>[10]</sup>,故本研究采用 EGF 诱导的肺上皮细胞 EMT 模型。而本研究发现,ICO 不仅对 BLM 诱导的肺组织 EMT 进程有明显的抑制作用,对 EGF 诱导的肺泡上皮细胞 EMT 进程也有显著的抑制作用 (E-cadherin 的表达明显升高而  $\alpha$ -SMA 和 Vimentin

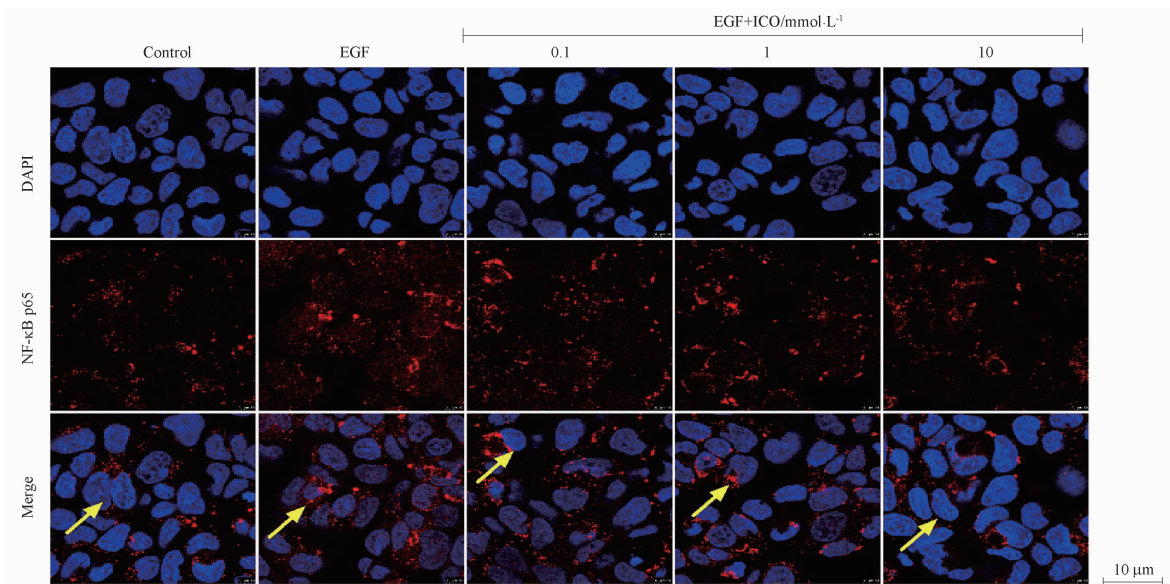


A - EGFR 磷酸化水平; B - IκBα 磷酸化水平; C - NF-κB p65 磷酸化水平; D - NF-κB p65 核转移程度; 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与 EGF 组相比, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

A - the level of EGFR phosphorylation; B - the level of IκBα phosphorylation; C - the level of NF-κB p65 phosphorylation; D - the level of NF-κB p65 nuclear translocation; <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , vs control group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ , vs EGF.

图 7 ICO 对 EGF 诱导的肺泡上皮细胞 EGFR 及核转录因子的影响。  $n = 9, \bar{x} \pm s$

Fig. 7 Effects of icotinib on EGF-induced phosphorylation of EGFR, IκBα and NF-κB p65 and nuclear translocation of NF-κB p65 in alveolar epithelial cells.  $n = 9, \bar{x} \pm s$



箭头所示 NF-κB p65 核转移情况。

Arrows show NF-κB p65 nuclear transfer situation.

图 8 ICO 对 EGF 诱导肺泡上皮细胞 NF-κB p65 核转移的影响(免疫荧光染色,  $\times 800$ )

Fig. 8 Effects of icotinib on EGF-induced NF-κB p65 nuclear translocation in alveolar epithelial cells (immunofluorescence staining,  $\times 800$ )

的表达明显降低)。提示,ICO 通过抑制肺泡上皮细胞 EMT 的发生来减缓肺纤维化的发展。

研究表明,NF- $\kappa$ B 信号通路在肾纤维化、肝纤维化、肺纤维化中发挥调控作用,抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活可能是治疗肺纤维化的有效策略<sup>[19]</sup>。而研究还发现 BLM 诱导的 EMT 发生和 EGF 诱导的肿瘤细胞 EMT 发生都与 NF- $\kappa$ B 信号通路活化有关<sup>[20-21]</sup>。而本研究动物实验发现,ICO 能够抑制 BLM 诱导的 EGFR、I $\kappa$ B $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B p65 的磷酸化,抑制 NF- $\kappa$ B p65 的核转移。体外实验也发现,ICO 能够降低 EGF 诱导的 EGFR、I $\kappa$ B $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B p65 的磷酸化水平,抑制 NF- $\kappa$ B p65 的核转移,进而影响了下游靶基因 E-cadherin、 $\alpha$ -SMA 和 Vimentin 的表达。因此,我们推测 ICO 可能通过阻断 EGFR、抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的活化而产生抗纤维化作用。

综上所述,EGF/NF- $\kappa$ B 信号通路调控了肺泡上皮细胞 EMT 的发生,ICO 可能通过抑制 EGF/NF- $\kappa$ B 信号通路的活化,逆转肺泡上皮细胞 EMT 进程而改善了肺纤维化,为进一步应用 ICO 治疗肺纤维化提供新的思路。

## REFERENCES

[ 1 ] MOSS B J, RYTER S W, ROSAS I O. Pathogenic Mechanisms Underlying Idiopathic Pulmonary Fibrosis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2022, 17(1):515-546.

[ 2 ] TRACHALAKI A, IRFAN M, WELLS A U. Pharmacological management of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: current and emerging options [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2021, 22(2):191-204.

[ 3 ] SUN T, LI H, ZHANG Y, et al. Inhibitory effects of 3-Cyclopropylmethoxy-4-(difluoromethoxy) benzoic acid on TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transformation of *in vitro* and bleomycin-induced pulmonary fibrosis *in vivo* [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7):6172-6188.

[ 4 ] ALAAELDIN R, MOHYELDIN R H, BEKHIT A, et al. Vincamine Ameliorates Epithelial-Mesenchymal Transition in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Rats; Targeting TGF- $\beta$ /MAPK/Snai1 Pathway [J]. *Molecules*, 2023, 28(12):4665-4680.

[ 5 ] ZHOU S, ZHU J, ZHOU P K, et al. Alveolar type 2 epithelial cell senescence and radiation-induced pulmonary fibrosis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10:999600. DOI: 10.3389/fcell.2022.999600.

[ 6 ] LI J, WEI Q, SONG K, et al. Tangeretin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibiting epithelial-mesenchymal transition via the PI3K/Akt pathway [J]. *Front Pharmacol*,

2023,14:1247800. DOI: 10.3389/fphar.2023.1247800.

[ 7 ] GUO Q, QUAN MY, XU L, et al. Enhanced nuclear localization of YAP1-2 contributes to EGF-induced EMT in NSCLC [J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(4):1013-1023.

[ 8 ] SCHRAMM F, SCHAEFER L, WYGRECKA M. EGFR Signaling in Lung Fibrosis [J]. *Cells*, 2022, 11(6):986-1001.

[ 9 ] TAN F, SHI Y, WANG Y, et al. Icotinib, a selective EGF receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of non-small-cell lung cancer [J]. *Future Oncol*, 2015, 11(3):385-397.

[ 10 ] WANG G H, HU Z Y. Icotinib inhibits proliferation and epithelial-mesenchymal transition of non-small cell lung cancer A549 cells [J]. *Math Biosci Eng*, 2019, 16(6):7707-7718.

[ 11 ] PENG L Y, YU M, YANG M X, et al. Icotinib attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension by preventing pulmonary arterial smooth muscle cell dysfunction [J]. *Am J Hypertens*, 2020, 33(8):775-783.

[ 12 ] PARK S J, RYU H W, KIM J H, et al. Daphnetin alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis through inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition and IL-17A [J]. *Cells*, 2023, 12(24):2795. DOI: 10.3390/cells12242795.

[ 13 ] ZHANG Z, LI Z, CHEN X, et al. Effect of AR gene-specific knockout on the process of radiation-induced pulmonary fibrosis and its mechanism [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2023, 69(5):156-162.

[ 14 ] PEI Z, QIN Y, FU X, et al. Inhibition of ferroptosis and iron accumulation alleviates pulmonary fibrosis in a bleomycin model [J]. *Redox Biol*, 2022,57:102509. DOI: 10.1016/j.redox.2022.102509.

[ 15 ] DING Y, WANG L, LIU B, et al. Bryodulcosigenin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibiting AMPK-mediated mesenchymal epithelial transition and oxidative stress [J]. *Phytother Res*, 2022, 36(10):3911-3923.

[ 16 ] NIETO M A, HUANG R Y, JACKSON R A, et al. EMT; 2016 [J]. *Cell*, 2016, 166(1):21-45.

[ 17 ] MAO X, XIE X, MA J, et al. Chlorogenic acid inhibited epithelial-mesenchymal transition to treat pulmonary fibrosis through modulating autophagy [J]. *Biol Pharm Bull*, 2023, 46(7):929-938.

[ 18 ] ALIPIO ZA, JONES N, LIAO W, et al. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) induced by bleomycin or TFG(b1)/EGF in murine induced pluripotent stem cell-derived alveolar Type II-like cells [J]. *Differentiation*, 2011, 82(2):89-98.

[ 19 ] WANG X, YANG J, WU L, et al. Adiponectin inhibits the activation of lung fibroblasts and pulmonary fibrosis by regulating the nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) pathway [J]. *Bioengineered*, 2022,13(4):10098-10110.

[ 20 ] BEGUM G, SINGH N D, LEISHANGTHEM G D, et al. Amelioration of bleomycin induced pulmonary fibrosis by administration of Salvianolic acid B in mice [J]. *Vet Ital*, 2022,58(1):87-101.

[ 21 ] LIU P, YANG P, ZHANG Z, et al. Ezrin/NF- $\kappa$ B pathway regulates EGF-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT), metastasis, and progression of osteosarcoma [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24:2098-2108.

(收稿日期:2023-12-22)