

汉防己甲素通过调控 CDK-Rb-E2F 信号通路抗肺纤维化作用机制

李 焱¹, 黄舒慈¹, 宋 玲¹, 高云航¹, 曹 科², 叶宇飞², 陈腾飞¹, 马 梦^{1*}, 霍 旺^{2*}

1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100029

2. 解放军总医院第六医学中心中医医学部, 北京 100853

摘要: 目的 考察汉防己甲素 (Tet) 对体内外肺纤维化模型中细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK)-成视网膜细胞瘤蛋白 (Rb)-E2F 转录因子 (E2F) 信号通路的影响。方法 将 60 只 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、吡非尼酮 (阳性药, $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组及 Tet 低、中、高剂量 ($13.5, 27.0, 54.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组, 通过气管内注入博来霉素 (BLM, $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 建立大鼠肺纤维化模型。造模 24 h 后, 给药组给予相应药物, 对照组与模型组给予等体积 0.9% 氯化钠溶液, 连续干预 28 d, 检测 Tet 对大鼠肺组织中细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)、E2F 及 α -平滑肌动蛋白 (α -SMA) 的蛋白表达影响; 体外实验以转化生长因子- β (TGF- β , $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 刺激人胚肺成纤维细胞 MRC-5 构建肺纤维化模型, 设对照组、模型组及 Tet 低、中、高剂量 ($5, 10, 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组, Western blotting 法检测 Tet 对 MRC-5 细胞增殖及 Cyclin D1、Rb、磷酸化-成视网膜细胞瘤蛋白 (p-Rb)、CDK4、CDK6 的蛋白表达影响。结果 体内实验显示, 与模型组相比, Tet 高剂量组 Cyclin D1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), 且 α -SMA、E2F 蛋白表达均下调; 体外实验中, Tet 高剂量组可显著抑制 MRC-5 细胞增殖 ($P < 0.01$); Western blotting 结果显示, Tet 低剂量组 CDK6 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$), 中剂量组 E2F、CDK6、CDK4 蛋白表达显著下调 ($P < 0.05, 0.001$), 高剂量组 p-Rb、E2F、CDK6、CDK4、Cyclin D1 蛋白表达均显著下调 ($P < 0.01, 0.001$); 免疫荧光结果显示, Tet 中、高剂量组 CDK6 相对荧光强度显著降低 ($P < 0.01, 0.001$)。结论 Tet 的抗肺纤维化作用可能通过调控 CDK-Rb-E2F 信号通路阻滞细胞周期, 进而抑制成纤维细胞异常增殖实现。

关键词: 肺纤维化; 汉防己甲素; 细胞增殖; 细胞周期; CDK-Rb-E2F 信号通路

中图分类号: R285.5; R563.9 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)12-3439-08

DOI:10.7501/j.issn.1674-6376.2025.12.003

Mechanism of tetrandrine in anti-pulmonary fibrosis by regulating CDK-Rb-E2F signaling pathway

LI Han¹, HUANG Shuci¹, SONG Ling¹, GAO Yunhang¹, CAO Ke², YE Yufei², CHEN Tengfei¹, MA Meng¹, HUO Wang²

1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100029, China

2. Department of Traditional Chinese Medicine, the Sixth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Abstract: Objective To investigate the effects of tetrandrine (Tet) on the cyclin-dependent kinase (CDK)-retinoblastoma protein (Rb)-E2F transcription factor (E2F) signaling pathway *in vivo* and *in vitro* pulmonary fibrosis models. **Methods** Sixty Wistar rats were randomly divided into the control group, the model group, the pirfenidone (positive drug, $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, and the Tet low-, medium-, and high-dose ($13.5, 27.0$, and $54.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) groups. A rat pulmonary fibrosis model was established by intratracheal injection of bleomycin (BLM, $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). 24 hours after modeling, the drug groups were given the corresponding drugs, while the control and model groups were given the same volume of 0.9% sodium chloride solution. The intervention lasted for 28 days. The effects of Tet on the protein expression of cyclin D1 (Cyclin D1), E2F, and α -smooth muscle actin (α -SMA) in rat lung tissue were

收稿日期: 2025-09-04

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (82204740); 解放军总医院第六医学中心创新培育基金资助项目 (CXPY202406); 中央级公益性科研院所基本业务费专项资金资助 (ZXKT22045); 中国中医科学院中央级公益性课题 (ZXKT25006); 中国中医科学院优秀青年科技人才培养专项 (ZZ16-YQ-027)

作者简介: 李 焱 (1989—), 女, 副研究员, 研究方向为中药药理。E-mail: hli1989@icmm.ac.cn

*通信作者: 马 梦 (1991—), 女, 助理研究员, 研究方向为中药药理。E-mail: mma@icmm.ac.cn

霍 旺 (1987—), 男, 主治医师, 研究方向为中西医结合。E-mail: huowang1987@163.com

detected. In the *in vitro* experiment, a pulmonary fibrosis model was established by stimulating human embryonic lung fibroblasts MRC-5 with transforming growth factor- β (TGF- β , 5 ng·mL $^{-1}$). The control group, the model group, and the Tet low-, medium-, and high-dose (5, 10, and 50 μ mol·L $^{-1}$) groups were set up. The effects of Tet on the proliferation of MRC-5 cells and the protein expression of Cyclin D1, Rb, phosphorylated retinoblastoma protein (p-Rb), CDK4, and CDK6 were detected by Western blotting method. **Results** In the *in vivo* experiment, compared with the model group, the high-dose Tet group showed a significant decrease in Cyclin D1 protein expression ($P < 0.01$), and the protein expressions of α -SMA and E2F were also downregulated. In the *in vitro* experiment, the high-dose Tet group significantly inhibited the proliferation of MRC-5 cells ($P < 0.01$). Western blotting results showed that the low-dose Tet group significantly downregulated the protein expression of CDK6 ($P < 0.01$), the medium-dose group significantly downregulated the protein expressions of E2F, CDK6, and CDK4 ($P < 0.05, 0.001$), and the high-dose group significantly downregulated the protein expressions of p-Rb, E2F, CDK6, CDK4, and Cyclin D1 ($P < 0.01, 0.001$). Immunofluorescence results showed that the relative fluorescence intensity of CDK6 in the medium- and high-dose Tet groups was significantly decreased ($P < 0.01, 0.001$). **Conclusion** The anti-pulmonary fibrosis effect of Tet may be achieved by regulating the CDK-Rb-E2F signaling pathway to arrest the cell cycle and thereby inhibit the abnormal proliferation of fibroblasts.

Key words: pulmonary fibrosis; tetrandrine; cell proliferation; cell cycle; CDK-Rb-E2F signaling pathway

肺纤维化 (PF) 是一种慢性、进行性、纤维化性间质性肺炎, 以起病隐匿、病情不可逆进展及肺功能进行性下降为核心特征, 属于致死性肺部疾病^[1]。患者 5 年生存率仅约 30%, 且随着肺功能持续恶化, 生活质量受到严重影响, 日常简单活动亦感困难, 多数需依赖辅助供氧缓解呼吸负担^[2]。目前临床常用的吡非尼酮 (PFD) 和尼达尼布 (BIBF) 虽能在一定程度上延缓肺功能下降, 但无法从根本上阻止或逆转 PF 的病理进程^[3]。因此, 深入阐明 PF 的发病机制、挖掘更有效的药物作用靶点, 已成为该领域的研究重点。尽管 PF 的病理机制尚未完全阐明, 但大量研究证实, 成纤维细胞的异常增殖与活化是驱动疾病进展的核心环节^[4-6]。

汉防己甲素 (Tet) 是从中草药粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 的根块中提取的双苄基异喹啉类生物碱^[7], 具有抗炎、镇痛、降压及抗矽肺等多种药理活性^[8-9]。本团队前期药效学研究证实 Tet 具有显著的抗 PF 作用, 不仅能抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 表达、减少肺组织胶原沉积^[10], 还可通过诱导 G₁ 期细胞周期阻滞抑制肺成纤维细胞增殖, 提示细胞周期调控可能是其发挥抗 PF 作用的关键环节。细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK) -视网膜母细胞瘤蛋白 (Rb) -E2F 转录因子 (E2F) 信号通路是调控细胞周期进程的核心通路^[11]。

基于此, 本研究聚焦该信号通路, 深入探究 Tet 是否通过靶向调控该通路抑制成纤维细胞异常增殖, 进而阐明其抗 PF 的分子机制, 旨在为 Tet 的进一步药物开发及临床应用于 PF 治疗提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 Wistar 雄性大鼠, 60 只, 体质量 180~220 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证编号 SCXK (京) 2023-0077。饲养于中国中医科学院中药研究所 SPF 级动物房, 12 h 明暗交替, 温度 (23±1) °C, 湿度 (50±15) %, 自由进食饮水。研究方案获得中国中医科学院中药研究所医学伦理委员会审核批准, 实验动物伦理审查编号为 2023B148。

1.2 细胞

人胚肺成纤维细胞 MRC-5 细胞株, 购于中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。

1.3 药物和试剂

注射用盐酸博来霉素 (BLM, 日本化药株社会社, 15 mg, 批号 X10750); 汉防己甲素片 (浙江金华康恩贝生物制药有限公司, 批号 PH2110001A); 吡非尼酮 (PFD, 北京康蒂尼药业股份有限公司, 每片 100 mg, 批号 20220906); 转化生长因子蛋白 (TGF- β , MCE 中国生物科技有限公司, 批号 HY-P70543)。

BeyoClickTM EdU-488 细胞增殖检测试剂盒 (批号 Z918240805), 抗体: Rb (批号 042523240605)、磷酸化成视网膜细胞瘤蛋白 (p-Rb, 批号 031521240529)、特异性周期蛋白-D1 (Cyclin D1, 批号 010824240701)、CDK4 (批号 042924240701)、CDK6 蛋白 (批号 03272440523)、 β -actin 蛋白 (批号 091323240524)、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗兔 IgG (H+L) (批号 242570505)、cy3 标记山

羊抗小鼠 IgG(H+L)(批号 A173250430)、Alexa Fluor 标记山羊抗兔 IgG (H+L) (批号 A220250415)，上海碧云天生物技术股份有限公司； α -平滑肌肌动蛋白抗体 (α -SMA，批号 00016979)，美国 proteintech 公司；4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI，批号 ab104139)，英国 Abcam 公司；SDS-PAGE 凝胶试剂盒 (批号 CW0022M)，北京康为世纪生物科技有限公司，其他试剂均为国产分析纯。

1.4 仪器

Centrifuge 5810R 型离心机 (德国 Eppendorf 公司)；MP Fastprep-24 匀浆仪 (美国 MP Biomedicals 公司)；VIP-6 脱水机 (日本樱花有限公司)；KD-BM 包埋机 (科迪仪器设备有限公司)；NIKON CI-S 型倒置显微镜 (日本尼康公司)；Amersham Imager600 化学发光成像分析仪 (美国 GE Healthcare 公司)；Spectramax i3x 型酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司)；Mini-PROTEAN Tetra 电泳系统 (美国 Bio-Rad 公司)；化学发光成像分析仪 (美国 GE Healthcare 公司)；Cytation 5 高内涵成像检测系统 (美国 BioTeck 公司)；TCS SP8 激光扫描共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

大鼠适应性喂养 5 d 后称取体质量，依据体质量随机分为对照组、模型组、PFD (阳性药, $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组及 Tet 低、中、高剂量组 ($13.5, 27.0, 54.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)，每组 10 只。采用气管内注射 BLM 构建大鼠 PF 模型^[12]，具体操作流程如下：大鼠经 ip 0.8% 戊巴比妥钠 ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 麻醉后，对颈部皮肤进行消毒，沿正中线纵向切开皮肤，钝性分离皮下肌肉组织以充分暴露气管；使用 1 mL 注射器经气管一次性注入 BLM 溶液 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)，随后将大鼠直立并缓慢旋转，确保药液均匀分布于双侧肺叶，最后逐层缝合肌肉与皮肤切口，待大鼠苏醒后转移至 SPF 级动物房进行常规饲养。对照组大鼠采用相同操作流程，仅经气管注入等体积 0.9% 氯化钠溶液，其余步骤与模型组完全一致。造模 24 h 后启动给药干预：参考 Tet 治疗矽肺的临床单日最大剂量 (每次 100 mg)，经体表面积换算确定大鼠临床等效剂量为 $27 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，据此分别设置 0.5 倍临床等效剂量 ($13.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和 2 倍临床等效剂量 ($54.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 作为 Tet 低、高剂量组，Tet 各剂量组及 PFD 组均每日 1 次 ig 给予对应药物溶液，对照

组与模型组则 ig 等体积 0.9% 氯化钠溶液，所有组别均连续干预 28 d。

2.2 免疫组化法检测大鼠肺组织 Cyclin D1 蛋白表达

石蜡切片经脱蜡、水化及抗原修复后，按照试剂盒说明书进行操作。滴加 Cyclin D1 抗体 (1:200) 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗片后滴加相应的二抗，室温下孵育 1 h，PBS 洗片后进行 DAB 染色，苏木素复染细胞核后封片。于光学显微镜下观察肺组织 Cyclin D1 蛋白的阳性表达。采用 Image J 软件进行半定量分析。将图像类型设置为“RGB stack”，使用“Color Threshold”功能，选择“Red”通道设定阈值后选取视野，测量阳性表达区域的面积百分比 (%Area) 并进行统计。

2.3 免疫荧光法检测大鼠肺组织 α -SMA 和 E2F 蛋白表达

石蜡切片经脱蜡、水化及抗原修复及血清封闭后，与一抗 (α -SMA, 1:400；E2F, 1:400) 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBS 洗涤后，切片与偶联的二抗室温避光孵育 1 h。细胞核经 DAPI 复染后，使用抗荧光淬灭封片剂封片，最后在激光共聚焦显微镜下进行图像采集。

2.4 细胞培养及处理

MRC-5 细胞培养于含 10% 胎牛血清和 1% 非必需氨基酸的 MEM 培养基中，细胞置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 的恒温培养箱中孵育；待细胞融合度达 $70\% \sim 80\%$ 时按 1:3 的比例传代，并取对数生长期的细胞用于实验。根据实验要求将细胞分为 6 组并同步加药处理，分别为对照组、模型组 (仅培养基、无药物)、Tet 单独处理 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组及 Tet 低、中、高浓度 ($5, 10, 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组。除对照组和 Tet 单独处理组外，其余各组均加入质量浓度为 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TGF- β ^[13]。

2.5 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU) 法检测各组 MRC-5 细胞的增殖活性

将处于对数生长期的 MRC-5 细胞以每孔 1×10^5 个的密度接种于 96 孔透明底黑板中。细胞贴壁后，按照“2.4”项下的方法进行分组给药处理。并将细胞置于培养箱中继续培养 24 h。随后，每孔加入 EdU 工作液，避光孵育后，使用 DAPI 对细胞核进行复染，使用高内涵成像系统拍照并采集图像。使用 Image J 等图像分析软件对 EdU 阳性细胞 (绿色荧光) 与总细胞 (蓝色荧光) 进行计数，并计算

EdU 阳性细胞率。

EdU 阳性细胞率=EdU 阳性细胞数/总细胞数

2.6 Western blotting 法检测 MRC-5 细胞中 p-Rb、Rb、E2F、CDK6、CDK4 和 Cyclin D1 蛋白表达水平

取对数生长期细胞按每孔 8×10^5 接种于 6 孔板, 待细胞融合至 80% 时, 加入含药物的无血清培养基继续培养 48 h。培养结束后, 每孔加入 100 μ L 的 RIPA 裂解液, 于冰上裂解 30 min, 离心提取全蛋白。采用 BCA 法对蛋白样品进行定量, 以 50 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳分离, 转膜, 封闭; 加入一抗 (1:1 000) 孵育过夜, 加入二抗 (1:2 000) 孵育 30 min, 采用 ECL 发光液化学发光成像系统进行曝光显影。使用 Image J 软件对条带灰度值进行半定量分析, 计算目标蛋白与内参蛋白灰度值的比值。

2.7 数据处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示, 采用 SPSS

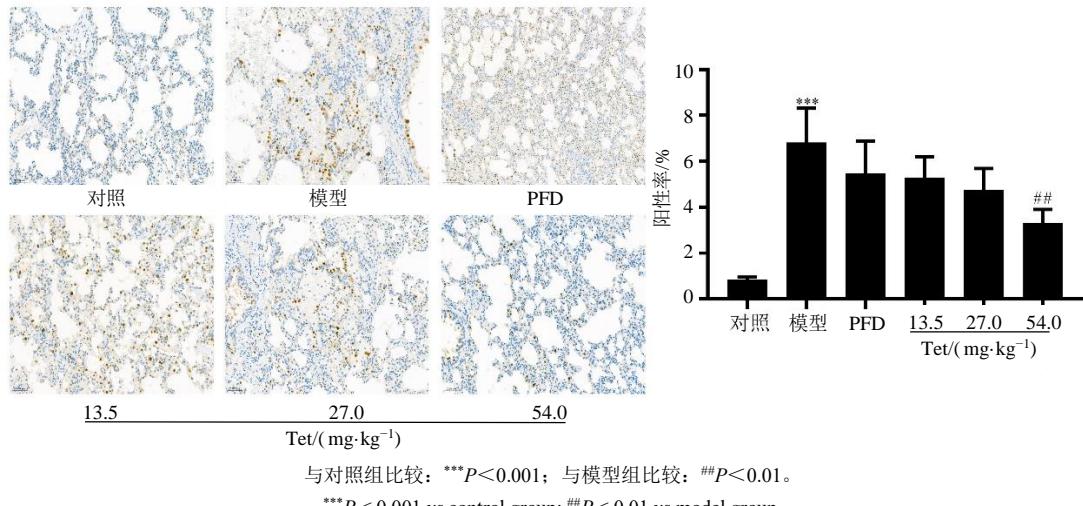


图 1 Tet 对 PF 模型大鼠肺组织 Cyclin D1 蛋白表达的影响 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 1 Effect of Tet on expression of Cyclin D1 protein in PF model rats ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=10$)

3.2 Tet 对 PF 模型大鼠肺组织 α -SMA 和 E2F 蛋白表达的影响

结果如图 2 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠肺组织中 α -SMA 和 E2F 蛋白表达水平升高; 与模型组相比, Tet 各剂量组的 α -SMA 和 E2F 蛋白表达水平均有降低, 其中 Tet 高剂量组的逆转效果更优。

3.3 Tet 对 MRC-5 细胞增殖的影响

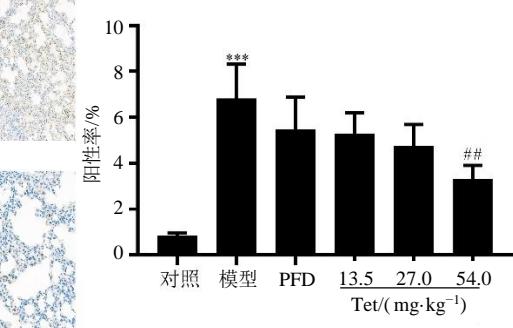
EdU 染色检测结果显示(图 3), 与对照组相比, 模型组 EdU 阳性细胞率显著性升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, Tet 各浓度组阳性细胞率降低, 其中 Tet 高剂量组的阳性细胞率显著性降低 ($P < 0.01$)。

Statistics 27 统计软件对各组数据进行统计分析, 采用单因素方差分析 (One-Way-Anova)。若方差齐, 组间两两比较采用 LSD 检验; 若方差不齐, 则采用 Dunnett's T3 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 Tet 对 PF 模型大鼠肺组织 Cyclin D1 蛋白表达的影响

结果如图 1 所示, 对照组大鼠肺组织中 Cyclin D1 呈弱阳性表达, 而模型组大鼠肺组织中 Cyclin D1 呈棕黄色阳性染色, 主要定位于细胞膜, 其表达水平较对照组显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 各给药组 Cyclin D1 阳性染色强度均有所减弱, 其中 Tet 低、中剂量组的 Cyclin D1 表达虽呈下调趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 Tet 高剂量组的 Cyclin D1 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。

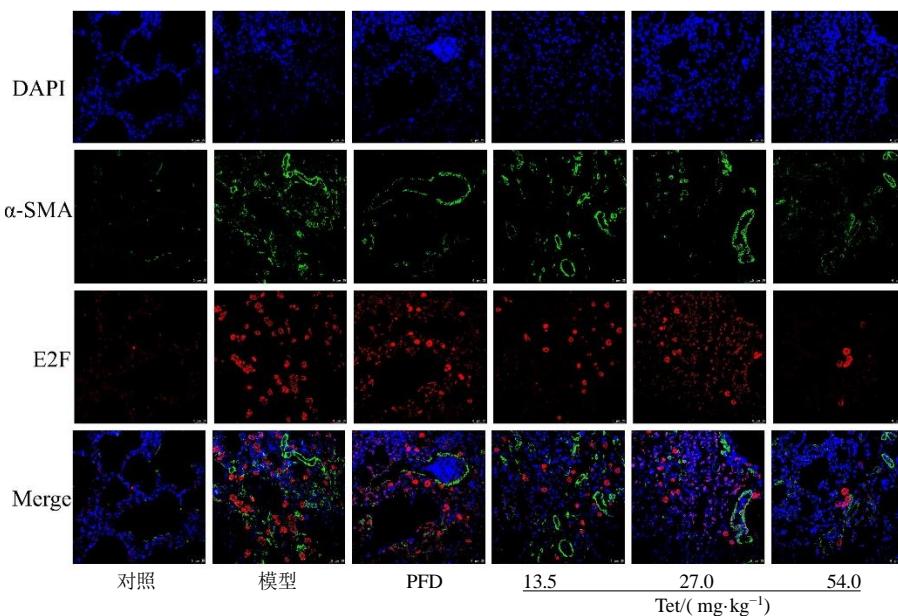
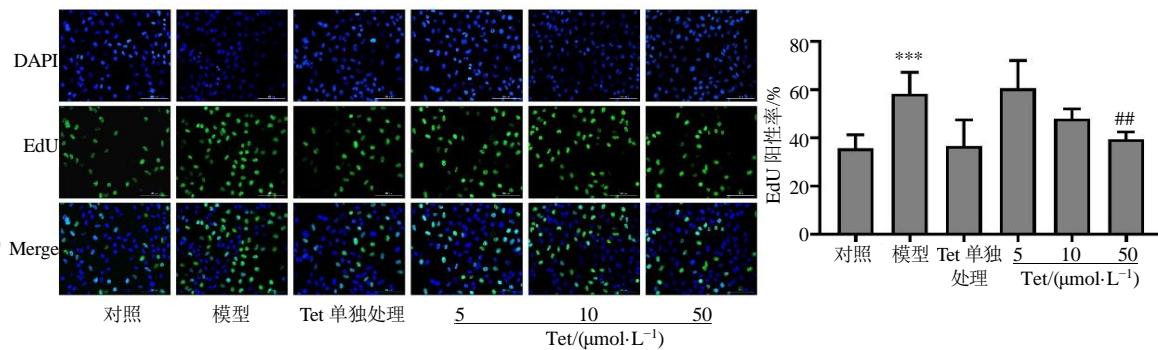


3.4 Tet 对 MRC-5 细胞中 p-Rb、Rb、E2F、CDK6、CDK4 和 Cyclin D1 蛋白表达水平的影响

结果如图 4 所示, 与对照组相比, 模型组 p-Rb、E2F、CDK6、CDK4 和 Cyclin D1 蛋白表达水平显著上调 ($P < 0.01$ 、 0.001), 而与模型组相比, Tet 低剂量组的 CDK6 蛋白表达水平显著下调 ($P < 0.001$), Tet 中剂量组的 E2F、CDK6、CDK4 蛋白表达水平显著下调 ($P < 0.05$ 、 0.001), Tet 高剂量组则上述 5 种蛋白表达水平均显著下调 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

3.5 Tet 对 MRC-5 细胞中 CDK6 蛋白表达的影响

免疫染色检测结果显示(图 5), 与对照组相比,

图2 Tet对PF模型大鼠肺组织 α -SMA和E2F蛋白表达的影响($\times 630$)Fig. 2 Effect of Tet on expression of α -SMA and E2F protein in pulmonary fibrosis model rats ($\times 630$)与对照组比较: *** $P<0.001$; 与模型组比较: ## $P<0.01$ 。*** $P<0.001$ vs control group; ## $P<0.01$ vs model group.图3 Tet对MRC-5细胞增殖活性的影响($\times 400$, $\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 3 Effect of Tet on proliferative activity of MRC-5 cells ($\times 400$, $\bar{x} \pm s, n=3$)

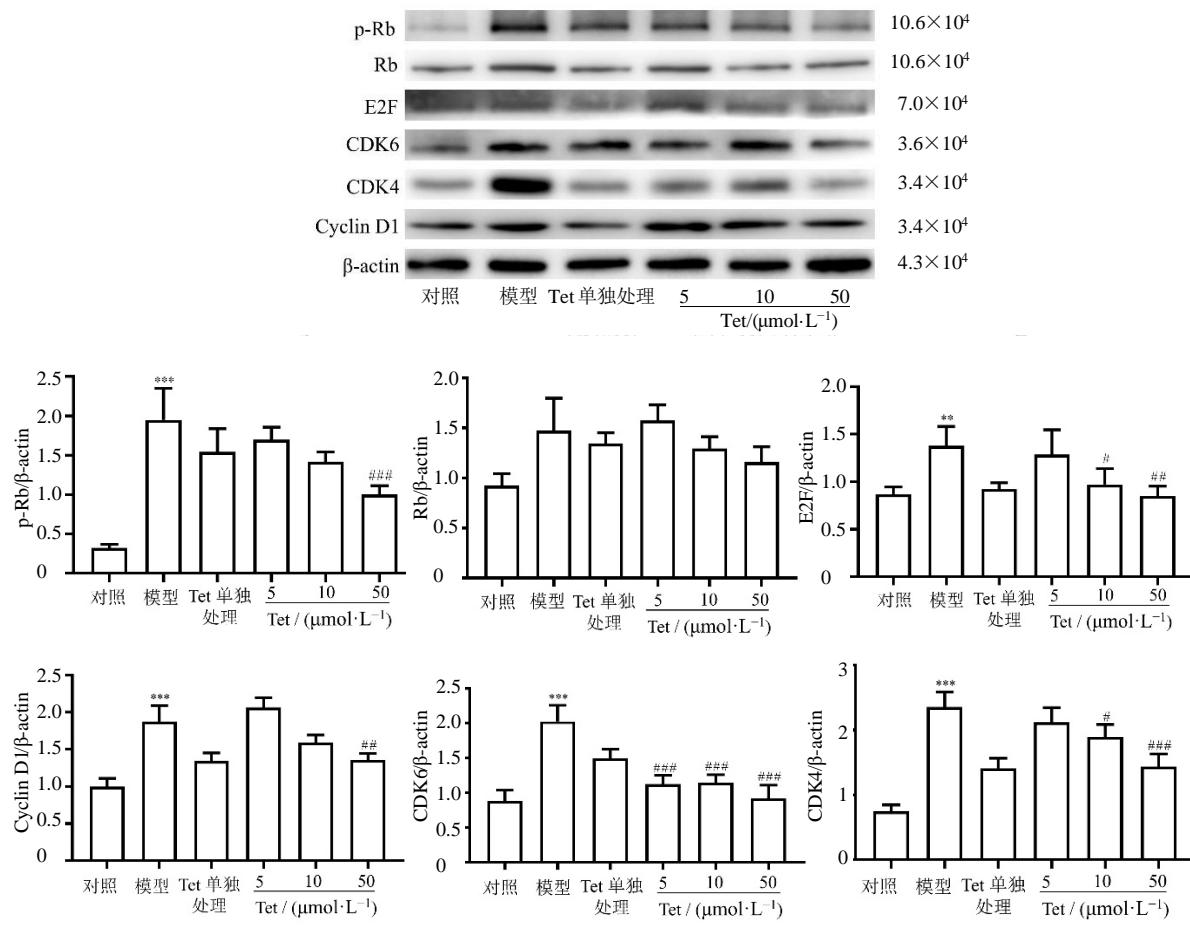
模型组的CDK6相对荧光强度显著性升高($P<0.001$);与模型组相比,Tet各剂量组的CDK6相对荧光强度降低,其中Tet中、高剂量组的相对荧光强度显著性降低($P<0.01$ 、 0.001)。

4 讨论

PF是一类以持续性咳嗽、进行性呼吸困难为典型临床特征的慢性进行性纤维化肺疾病,其典型病理特征为肺部间质瘢痕组织形成^[14-15]。近年来,受新型冠状病毒感染流行、人口老龄化加剧、环境因素变化、疾病认知水平提升及诊断技术改进等多重因素叠加影响,全球PF发病率呈逐年攀升态势,给患者家庭及社会医疗体系带来沉重的疾病负担

与经济压力。流行病学数据显示,未经规范治疗的PF患者中位生存期仅约3年^[16],凸显了该疾病的严重危害性与临床干预的迫切性。

成纤维细胞的异常增殖与活化是PF发生发展的核心病理环节,其直接驱动细胞外基质过度沉积及肺组织结构破坏,最终取代正常肺泡功能单位,导致肺功能进行性不可逆丧失^[17-18]。当前临床治疗中,尼达尼布、吡非尼酮、传统抗氧化剂及糖皮质激素等药物虽可在一定程度上缓解症状、减轻患者痛苦,但普遍存在疗效有限、不良反应显著等瓶颈问题。因此,开发新型高效的抗PF药物已成为呼吸病学领域的研究热点与迫切需求。

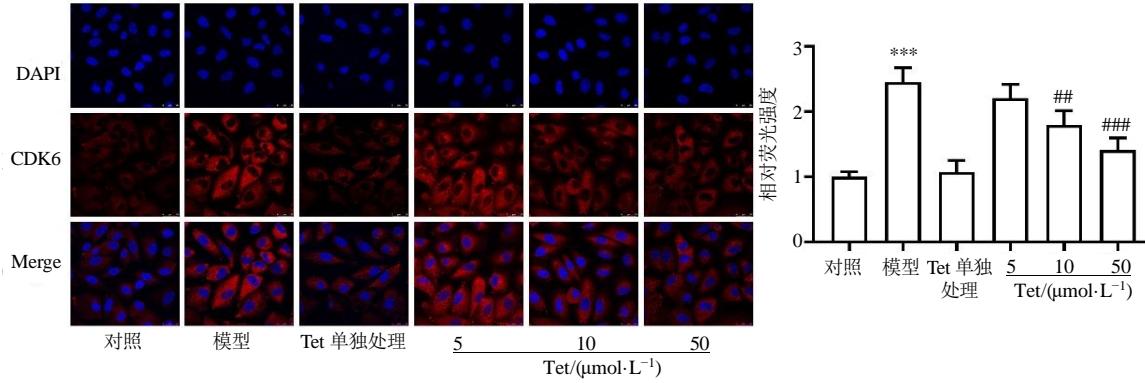


与对照组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ 。

** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group.

图 4 Tet 对 MRC-5 细胞 p-Rb、Rb、E2F、CDK6、CDK4 和 Cyclin D1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of Tet on protein expression of p-Rb、Rb、E2F、CDK6、CDK4 and Cyclin D1 in MRC-5 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与对照组比较: *** $P<0.001$; 与模型组比较: ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ 。

*** $P<0.001$ vs control group; ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group.

图 5 Tet 对 MRC-5 细胞 CDK6 蛋白表达的影响 ($\times 630, \bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effect of Tet on CDK6 protein expression in MRC-5 cells ($\times 630, \bar{x} \pm s, n=3$)

防己作为传统中药, 其药用价值最早见于《神农本草经》, 传统临床多用于风湿证、风水证、皮水

证及如狂、膈间支饮、肠间水气等病症的治疗。《本草品汇精要》明确记载: “肺痿咯血伴痰多者, 可取

防己与葶苈子等量,捣末后以糯米汤送服”,提示防己在肺部疾病治疗中具有悠久应用历史。Tet作为防己的主要活性成分,已被证实可用于肺癌、硅肺及煤矿尘肺等肺部疾病的临床治疗,相关研究显示其能有效改善患者胸闷、胸痛、咳嗽等症状,同时在提升肺活量、改善呼吸功能方面发挥积极作用^[9,19]。本课题组前期初步药效学研究发现,Tet可显著改善PF模型大鼠肺功能、减少促炎因子释放^[20],并有效缓解肺部纤维化病变;进一步机制探索提示,Tet可通过诱导G₁期细胞周期阻滞抑制肺成纤维细胞增殖,推测细胞周期调控可能是其抗PF作用的关键靶点^[10]。基于此,本研究在前期工作基础上开展了更为系统深入的机制探索,旨在明确Tet抗PF的核分子机制。

细胞周期作为调控细胞增殖的核心“执行者和规划者”,其异常驱动是成纤维细胞过度增殖的直接诱因^[4-6],因此靶向细胞周期调控通路已成为PF治疗的潜在策略。在细胞周期进程中,CyclinD1是调控G₁期增殖进程的关键调节蛋白:正常生理状态下,CyclinD1与细胞CDK4/6结合形成具有激酶活性的复合物,催化Rb磷酸化;Rb作为G₁/S期转换节点的核心调控分子,在G₁期早期以低磷酸化状态与转录因子E2F结合并抑制其活性,从而阻遏细胞进入S期。当CyclinD1-CDK4/6复合物激活后,Rb发生多位点磷酸化,其空间构象发生改变并与E2F解离,激活的E2F启动下游一系列DNA合成相关基因表达,推动细胞完成G₁期向S期转换并启动增殖进程^[21-22]。在PF病理状态下,CDK-Rb-E2F通路常出现异常激活,主要表现为CyclinD1表达上调加速G₁/S期转换,细胞快速通过G₁/S检查点,最终导致成纤维细胞大量增殖^[23]。

本研究首先采用气管内滴注BLM的方法构建PF大鼠模型,该模型所诱导的病理改变与人类PF临床表现高度吻合,且具有操作标准化、造模成功率高等优势,被广泛认为是表征PF的理想动物模型^[24-25]。实验结果显示,BLM干预后模型组大鼠肺组织中细胞周期通路正性调控蛋白CyclinD1及转录因子E2F表达水平显著升高,提示BLM可加速细胞G₁期向S期转换;同时成纤维细胞特异性标志物α-SMA表达上调,进一步证实细胞周期异常缩短已引发成纤维细胞过度增殖。而Tet干预后,CyclinD1与E2F蛋白表达水平显著降低,初步验证了Tet通过调控细胞周期缓解PF的可行性。

为进一步明确Tet的作用机制,本研究采用TGF-β刺激MRC-5,在细胞水平模拟PF核心病理过程^[26]。EdU增殖实验结果显示,TGF-β可显著促进MRC-5细胞增殖;Western blotting实验证实,TGF-β可上调CDK-Rb-E2F通路中p-Rb、E2F、CDK6、CDK4及CyclinD1的蛋白表达水平,导致细胞周期调控机制紊乱、进程加速,最终引发成纤维细胞异常增殖。而Tet干预后,上述p-Rb、E2F、CDK6、CDK4及CyclinD1蛋白表达水平呈浓度相关性降低,且总Rb蛋白表达量无明显变化。上述结果表明,Tet可通过抑制CDK4/6-CyclinD1复合物形成,进而阻断Rb蛋白磷酸化过程,最终将细胞周期阻滞于G₁期,抑制成纤维细胞异常增殖。

综上所述,本研究以传统中药活性成分Tet为研究切入点,首次系统证实其可有效抑制成纤维细胞异常增殖,该作用与Tet下调CyclinD1、CDK4及E2F表达并抑制Rb蛋白磷酸化密切相关,提示Tet可能通过靶向抑制CDK-Rb-E2F信号通路发挥抗PF作用。本研究不仅为Tet抗PF的临床应用提供了坚实的分子生物学依据,更为肝纤维化、肾纤维化等其他纤维化疾病的治疗提供了“靶向调控细胞周期”的新思路与潜在药物靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Jiang M N, Bu W X, Wang X H, et al. Pulmonary fibrosis: From mechanisms to therapies [J]. *J Transl Med*, 2025, 23(1): 515.
- [2] Golchin N, Patel A, Scheuring J, et al. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic literature review and Meta-analysis [J]. *BMC Pulm Med*, 2025, 25(1): 378.
- [3] Finnerty J P, Ponnuswamy A, Dutta P, et al. Efficacy of antifibrotic drugs, nintedanib and pirfenidone, in treatment of progressive pulmonary fibrosis in both idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and non-IPF: A systematic review and meta-analysis [J]. *BMC Pulm Med*, 2021, 21(1): 411.
- [4] Tsoyi K, Rosas I O. Fibroblast heterogeneity in pulmonary fibrosis: A new target for therapeutics development [J]. *Eur Respir J*, 2024, 63(2): 2302188.
- [5] Rajesh R, Atallah R, Bärnthalter T. Dysregulation of metabolic pathways in pulmonary fibrosis [J]. *Pharmacol Ther*, 2023, 246: 108436.
- [6] Younesi F S, Miller A E, Barker T H, et al. Fibroblast and

myofibroblast activation in normal tissue repair and fibrosis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25(8): 617-638.

[7] 席苑, 张海静, 叶祖光, 等. 汉防己甲素现代药理作用研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(1): 20-28.

Xi Y, Zhang H J, Ye Z G, et al. Research development on modern pharmacological effect of tetrandrine [J]. *China J Chin Mater Med*, 2020, 45(1): 20-28.

[8] Song J W, Liu Y S, Guo Y R, et al. Therapeutic effects of tetrandrine in inflammatory diseases: A comprehensive review [J]. *Inflammopharmacology*, 2024, 32(3): 1743-1757.

[9] 林峰. 汉防己甲素治疗矽肺III期的临床效果及对肺功能的影响 [J]. *临床合理用药杂志*, 2024, 17(28):75-77.

Lin Z. Clinical effect of tetrandrine in the treatment of silicosis stage III and its influence on lung function [J]. *Chin J Clin Ration Drug Use*, 2024, 17(28):75-77.

[10] 王翼遥, 宋玲, 高云航, 等. 雾化吸入粉防己碱对博来霉素致肺纤维化大鼠的药效作用 [J]. *药物评价研究*, 2023, 46(12): 2592-2600.

Wang Y Y, Song L, Gao Y H, et al. Pharmacodynamic study of atomized tetrandrine on bleomycin induced pulmonary fibrosis in rats [J]. *Drug Eval Res*, 2023, 46(12): 2592-2600.

[11] Rubin S M, Sage J, Skotheim J M. Integrating old and new paradigms of G₁/S control [J]. *Mol Cell*, 2020, 80(2): 183-192.

[12] Mouratis M A, Aidinis V. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2011, 17(5): 355-361.

[13] He J J, Peng H, Wang M F, et al. Isoliquiritigenin inhibits TGF-β1-induced fibrogenesis through activating autophagy via PI3K/Akt/mTOR pathway in MRC-5 cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2020, 52(8): 810-820.

[14] Raghu G, Remy-Jardin M, Richeldi L, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis (an update) and progressive pulmonary fibrosis in adults: An official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2022, 205(9): e18-e47.

[15] Mann J, Goh N S L, Holland A E, et al. Cough in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Front Rehabil Sci*, 2021, 2: 751798.

[16] Cox I A, Borchers Arriagada N, de Graaff B, et al. Health-related quality of life of patients with idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review and Meta-analysis [J]. *Eur Respir Rev*, 2020, 29(158): 200154.

[17] Phan T H G, Paliogiannis P, Nasrallah G K, et al. Emerging cellular and molecular determinants of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(5): 2031-2057.

[18] Ballester B, Milara J, Cortijo J. Idiopathic pulmonary fibrosis and lung cancer: Mechanisms and molecular targets [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(3): 593.

[19] 丁建花, 白金, 王郡甫. 汉防己甲素对矽肺患者抗肺纤维化的作用研究 [J]. *中国医药指南*, 2018, 16(30): 12-13.

Ding J H, Bai J, Wang J F. Effects of tetrandrine on pulmonary fibrosis in silicosis patients [J]. *Guide China Med*, 2018, 16(30): 12-13.

[20] 王逸飞, 宋玲, 高云航, 等. 汉防己甲素对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤的保护作用及机制研究 [J]. *现代药物与临床*, 2025, 40(1): 1-8.

Wang Y F, Song L, Gao Y H, et al. Protective effect and mechanism of tetrandrine on acute lung injury in mice induced by lipopolysaccharide [J]. *Drugs Clin*, 2025, 40(1): 1-8.

[21] Pandey K, An H J, Kim S K, et al. Molecular mechanisms of resistance to CDK4/6 inhibitors in breast cancer: A review [J]. *Int J Cancer*, 2019, 145(5): 1179-1188.

[22] Kent L N, Leone G. The broken cycle: E2F dysfunction in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(6): 326-338.

[23] Wei C H, Baratelli F E, Xiao G Q, et al. Evaluation of cyclin D1 as a discriminatory immunohistochemical biomarker for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2019, 27(2): e11-e15.

[24] Mohammed S M, Al-Saedi H F S, Mohammed A Q, et al. Mechanisms of bleomycin-induced lung fibrosis: A review of therapeutic targets and approaches [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2024, 82(3): 1845-1870.

[25] 穆素贞, 宋玲, 高云航, 等. 三七总皂苷通过调节蛋白酶激活受体-1 抗肺纤维化的作用机制研究 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(4): 701-710.

Mu S Z, Song L, Gao Y H, et al. Research on mechanism of Panax notoginseng saponins in inhibiting pulmonary fibrosis by regulating protease activated receptor-1 [J]. *Drug Eval Res*, 2024, 47(4): 701-710.

[26] 李智慧, 余学庆, 杨曙光, 等. 特发性肺纤维化实验模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(1): 118-127.

Li Z H, Yu X Q, Yang S G, et al. Research progress on experimental models of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Acta Lab Animalis Sci Sin*, 2024, 32(1): 118-127.

[责任编辑 孙英杰]