

右归丸含药血清通过下调瘦素表达抑制 RLE-6TN 细胞上皮间质转化的机制研究

萧 闵^{1,2}, 邓朝阳³, 江晓翠^{1,2}, 郑 岚^{2,4*}

1. 湖北中医药大学 实验动物中心, 湖北 武汉 430065

2. 湖北时珍实验室, 湖北 武汉 430065

3. 湖北中医药大学基础医学院, 湖北 武汉 430065

4. 湖北中医药大学附属湖北省中医院, 湖北 武汉 430061

摘要: 目的 研究右归丸含药血清抑制香烟烟雾提取物 (cigarette smoke extract, CSE) + 转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 诱导的大鼠 II 型肺泡上皮细胞 (RLE-6TN) 上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的作用机制。方法 RLE-6TN 细胞经 5% CSE 处理 12 h, 再给予 10 mg/L TGF- β 1 处理 72 h 建立 EMT 模型, 给予 5%、10%、15%、20% 右归丸含药血清进行干预, 采用 CCK-8 法测定细胞活力; 采用免疫荧光法检测瘦素 (leptin, LEP) 表达; 采用 Western blotting 检测 LEP、E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 表达。构建 100 ng/mL LEP 干预 RLE-6TN 细胞模型, 给予 10% 右归丸含药血清进行干预, 采用 CCK-8 法测定细胞活力; 采用划痕实验测定细胞迁移能力; 采用免疫荧光法检测 E-cadherin、 α -SMA 表达; 采用 qRT-PCR 法检测 E-cadherin、 α -SMA 表达; 采用 Western blotting 检测 E-cadherin、 α -SMA 及 Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2) / 信号传导及转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号通路相关蛋白表达。结果 RLE-6TN 细胞经 5% CSE + 10 mg/L TGF- β 1 干预后, LEP、 α -SMA 表达显著升高 ($P < 0.01$), E-cadherin 表达显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 给予右归丸含药血清干预后, LEP、 α -SMA 表达显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), E-cadherin 表达显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)。RLE-6TN 细胞经 100 ng/mL LEP 干预后, 细胞迁移率显著降低 ($P < 0.01$), α -SMA 蛋白及 mRNA 的表达显著升高 ($P < 0.01$), E-cadherin 蛋白及 mRNA 的表达显著降低 ($P < 0.01$), p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 表达显著升高 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比较, 给予 10% 右归丸含药血清干预后, 细胞迁移率显著升高 ($P < 0.01$), α -SMA 蛋白及 mRNA 的表达显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), E-cadherin 蛋白及 mRNA 的表达显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 表达显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。结论 右归丸含药血清能够通过降低 LEP 表达, 抑制 JAK2/STAT3 信号通路, 从而抑制 RLE-6TN 细胞 EMT 进程。

关键词: 右归丸; 瘦素; 上皮间质转化; RLE-6TN 细胞; 马钱苷; JAK2/STAT3 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2024)18 - 6250 - 11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.18.014

Mechanism of Yougui Pills containing serum on inhibiting epithelial-mesenchymal transition in RLE-6TN cells by down-regulating leptin expression

XIAO Min^{1,2}, DENG Chaoyang³, JIANG Xiaocui^{1,2}, ZHENG Lan^{2,4}

1. Laboratory Animal Center, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, China

3. College of Basic Medical Sciences, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

4. Hubei Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital of Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China

Abstract: Objective To study the mechanism of Yougui Pills (右归丸) containing serum on inhibiting epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by cigarette smoke extract (CSE) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in rat type II alveolar epithelial

收稿日期: 2024-04-22

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (82104825)

作者简介: 萧 闵, 副研究员, 硕士生导师, 从事动物模型及中西医结合基础研究。E-mail: 531637551@qq.com

*通信作者: 郑 岚, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 从事中医防治呼吸疾病研究。E-mail: zhenglan5225@126.com

cells (RLE-6TN). **Methods** RLE-6TN cells were treated with 5% CSE for 12 h, followed by treatment with 10 mg/L TGF- β 1 for 72 h to establish an EMT model. 5%, 10%, 15% and 20% Yougui Pills containing serum was administered for intervention, and cell viability was measured using CCK-8 method. Immunofluorescence method was used to detect the expression of leptin (LEP). Western blotting was used to detect the expressions of LEP, E-cadherin and α -smooth muscle actin (α -SMA). A model of RLE-6TN cells treated with 100 ng/mL LEP was established, followed by treatment with 10% Yougui Pills containing serum, and cell viability was measured using CCK-8 method, and measure cell viability using CCK-8 method. Scratch test was used to determine cell migration ability. Immunofluorescence assay was used to detect the expressions of E-cadherin and α -SMA. qRT-PCR was used to detect the expressions of *E-cadherin* and *α -SMA*. Western blotting was used to detect the expressions of E-cadherin, α -SMA and Janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway related proteins. **Results** After intervention with 5% CSE + 10 mg/L TGF- β 1 in RLE-6TN cells, the expressions of LEP and α -SMA were significantly increased ($P < 0.01$), while the expression of E-cadherin was significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with model group, after intervention with Yougui Pills containing serum, the expressions of LEP and α -SMA were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$), and the expression of E-cadherin was significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). After intervention with 100 ng/mL LEP, the cell migration rate of RLE-6TN cells was significantly reduced ($P < 0.01$), the expressions of α -SMA protein and mRNA were significantly increased ($P < 0.01$), the expressions of E-cadherin protein and mRNA were significantly reduced ($P < 0.01$), the expressions of p-JAK2/JAK2 and p-STAT3/STAT3 were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). Compared with model group, after intervention with 10% Yougui Pills containing serum, the cell migration rate was significantly increased ($P < 0.01$), the expressions of α -SMA protein and mRNA were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), the expressions of E-cadherin protein and mRNA were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), the expressions of p-JAK2/JAK2 and p-STAT3/STAT3 were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Yougui Pills serum containing can inhibit the EMT process of RLE-6TN cells by reducing LEP expression and inhibiting the JAK2/STAT3 signaling pathway.

Key words: Yougui Pills; leptin; epithelial-mesenchymal transition; RLE-6TN cells; loganin; JAK2/STAT3 signaling pathway

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 的主要病理表现为累及中央及外周气道、肺实质和肺血管的慢性气道炎症导致的肺组织损伤^[1]。上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是决定肺组织损伤后愈合的重要生理过程。EMT 具体表现为上皮细胞失去细胞黏附功能, 并逐渐转变为具有迁移和侵入能力的中淋巴样细胞^[2]。研究表明, 在吸烟者的气道组织中, 特别是在经常吸烟的 COPD 患者中, EMT 被激活^[3]。因此, EMT 可能是 COPD 进程的临床治疗靶点。

在 EMT 过程中, 上皮组织或间充质组织特有蛋白的存在/缺乏可以用来确定细胞表型, E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 是经典的上皮表型标记物, α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 是经典的间充质表型标记物^[4]。瘦素 (leptin, LEP) 是一种由白色脂肪组织分泌的蛋白, 其含量升高会加速 COPD 进程^[5]。研究显示, 在受 EMT 调控的疾病中, LEP 扮演着重要角色。LEP 可以激活肺癌细胞中细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 信号通路, 诱导上皮向间充质转变^[6]; LEP 通过 Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2) /信号传导及转录激活因子 3 (signal transducer and

activator of transcription 3, STAT3) 信号通路呈剂量相关性地加速子宫内膜癌细胞进展并促进 EMT^[7]。课题组前期采用“香烟烟熏+脂多糖+氢化可的松”复合法诱导肾阳虚 COPD 大鼠模型, 证实了右归丸能降低 COPD 大鼠肺组织 LEP 及 JAK2/STAT3 信号通路表达, 抑制气道重构, 减轻气道阻力^[8], 但尚未明确与 EMT 的关系。因此, 本研究以大鼠 II 型肺泡上皮细胞 (RLE-6TN) 为研究对象, 观察右归丸含药血清对香烟烟雾提取物 (cigarette smoke extract, CSE) + 转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 诱导的 RLE-6TN 细胞 EMT 发生和转移能力的影响; 并考察右归丸含药血清对 LEP 诱导的 RLE-6TN 细胞 EMT 发生和转移能力的影响, 明确 LEP 在右归丸含药血清对 RLE-6TN 细胞 EMT 发生和转移影响中的作用, 初步探讨右归丸抑制肺泡 II 型上皮细胞 EMT 影响 COPD 进程的作用机制。

1 材料

1.1 细胞株与动物

RLE-6TN 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只, 12 周龄, 体质量 280~300 g, 购自三峡大学实验动物中心, 许可证

号 SCXK(鄂)2017-0012。动物饲养于湖北中医药大学动物实验中心,使用许可证号 SCXK(鄂)2017-0067。动物实验经湖北中医药大学动物伦理委员会批准(批准号 HUCMS202209006)。

1.2 药材

右归丸由熟地黄、山药、山茱萸、枸杞子、菟丝子、鹿角胶、杜仲、肉桂、当归、制附子组成,以上饮片均购自湖北天济药业有限公司,批号分别为 202207014、20220911、20220611、20220714、20220817、20220904、20220817、20220814、20220817、20220617,经湖北中医药大学吕银娟教授鉴定分别为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch.的块根经加工炮制而成、薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb.的干燥根茎、山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.的干燥成熟果肉、茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L.的干燥成熟果实、旋花科植物菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam.的干燥成熟种子、鹿科动物马鹿 *Cervus elaphus* Linnaeus 已骨化的角煎熬浓缩而成的胶块、杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv.的干燥树皮、樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥树皮、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根、毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx.的子根的加工品。

1.3 药品与试剂

CCK-8 试剂(批号 MA0218)、胰蛋白酶-EDTA 消化液(批号 MA0233)购自大连美仑生物技术有限公司;胎牛血清(批号 C04001-500)购自 Vivacell 公司;马血清(批号 S9050)、RIPA 裂解液(批号 R0010)、ECL 超敏发光液(批号 PE0010)购自北京索莱宝科技有限公司;DMSO(批号 GC203005)、青霉素/链霉素混合液(批号 G4003)购自 Servicebio 公司;鼠单克隆 LEP 抗体(批号 sc-8391)购自 SANTN 公司;LEP(批号 L118995)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;鼠单克隆甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 ab8245)购自英国 Abcam 公司;兔多抗 STAT3 抗体(批号 30835S)、兔多抗 p-STAT3 抗体(批号 9145T)、兔多抗 JAK2 抗体(批号 3230T)、兔多抗 p-JAK2 抗体(批号 3771T)、二抗(批号 7077S)、荧光二抗(批号 4416S)购自美国 CST 公司;总 RNA 提取试剂盒(批号 TSP413)、逆转录 cDNA 试剂盒(批号 TSK313S)、PCR 试剂

盒(批号 TSE202)购自北京擎科生物技术股份有限公司。

1.4 仪器

MCO-15A 型 CO₂ 培养箱(日本 SANYO 公司);CKX53 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);701-058112 型超微定量核酸蛋白检测仪、Multiskan FC 型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);DYCZ-24DH 型电泳仪、DYCZ-40 型电转仪(北京六一仪器厂);KZ-III-F 型高速低温组织研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司);CR21G 型冷冻高速离心机(日本日立公司);9500 型荧光定量聚合酶链式反应仪(美国 ABI 公司);E100 型显微镜、DS-U3 型成像系统(日本 Nikon 公司);GE Healthcare Life sciences 凝胶成像仪(美国伯乐公司)。

2 方法

2.1 右归丸含药血清的制备

右归丸临床成人的用药剂量为熟地黄 24 g、山药 12 g、山茱萸 9 g、枸杞子 9 g、菟丝子 12 g、鹿角胶 12 g、杜仲 12 g、肉桂 6 g、当归 9 g、制附子 6 g^[8]。根据《中国药典》2020 版一部项下方法制备右归丸水煎液(1 g/mL,以生药量计),经检测右归丸水煎液中马钱苷质量浓度为 0.35 mg/mL,符合《中国药典》2020 版规定。

40 只雄性 SD 大鼠随机分为空白组和右归丸(5.85 g/kg^[9])组,每组 20 只。右归丸组大鼠 ig 右归丸水煎液,空白组 ig 等体积的生理盐水,1 次/d,连续给药 7 d。末次给药前 12 h 禁食不禁水,末次给药 1 h 后麻醉大鼠,于无菌状态下腹主动脉采血,置于无抗凝剂的采血管中,室温静置 2 h,待血清析出后,4 °C、2 500 r/min 离心 15 min(离心半径 13 cm),分离血清,将同组血清合并,56 °C 灭活 30 min,0.22 μm 微孔滤膜滤过,分装,于-80 °C 保存备用。

2.2 CSE 的制备

参考文献方法^[10-11],在串联的 2 个大包氏管内各加入 20 mL DMEM 吸收液,管的一端连接去掉滤嘴的香烟,另一端连接 1 个 50 mL 注射器。香烟点燃后,匀速抽取烟雾直至香烟燃尽,轻轻摇晃玻璃瓶使烟雾充分溶解。共点燃 3 支香烟,每支香烟抽吸次数控制在 15 次。将收集到的悬液移入离心管中,用 1 mmol NaOH 调 pH 至 7.4,以 0.22 μm 混孔滤膜滤过除菌。CSE 原液现配现用,用无血清培养基成不同浓度于 30 min 内用于实验。

2.3 细胞培养

RLE-6TN 细胞用含 10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素混合液的 RPMI 1640 培养液, 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 待细胞融合度达到 80%且呈对数生长时, 加入 1 mL 0.25%胰蛋白酶消化细胞, 按 1:2 的比例进行传代培养, 常规培养至第 3 代后用于后续实验。

2.4 CCK-8 法测定细胞存活率

2.4.1 CSE 对 RLE-6TN 细胞存活率的影响 取对数生长期的 RLE-6TN 细胞, 制备单细胞悬液, 以 1×10³ 个/孔接种于 96 孔板, 培养 24 h。分别加入 2.5%、5.0%、7.5%、10.0%、15.0% CSE 处理 12 h, 另设置对照组加入不含 CSE 的培养基, 以及不接种细胞不含药物的空白孔。每孔加入 5 mg/mL CCK-8 试剂 20 μL 和无血清培养基 180 μL, 孵育 2 h 后, 弃去上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 采用酶标仪测定 492 nm 处各孔的吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.4.2 右归丸含药血清对 CSE + TGF-β1 诱导的 RLE-6TN 细胞存活率的影响 设置对照组、模型组和不同体积分数 (5%、10%、15%、20%) 的右归丸含药血清组。除对照组外, 其余各组给予 5% CSE 处理 12 h, 再给予 10 mg/L TGF-β1 处理 72 h^[12]。各给药组分别给予右归丸含药血清继续干预 24 h, 对照组和模型组给予不含药物的培养基, 采用 CCK-8 试剂盒测定细胞存活率。

2.4.3 LEP 对 RLE-6TN 细胞存活率的影响 取对数生长期的 RLE-6TN 细胞, 制备单细胞悬液, 以 1×10³ 个/孔接种于 96 孔板, 培养 24 h。分别加入 50、100、150、200、400 ng/mL 的 LEP 处理 12 h, 另设置对照组加入不含 LEP 的培养基, 采用 CCK-8 试剂盒测定细胞存活率。

2.4.4 右归丸含药血清对 LEP 诱导的 RLE-6TN 细胞存活率的影响 设置对照组、模型组和右归丸含药血清组, 除对照组外, 其余各组给予 100 ng/mL LEP 处理 12 h 后, 模型组加入不含药物的培养基, 右归丸含药血清组加入 10%右归丸含药血清继续培养 24 h。采用 CCK-8 试剂盒测定细胞存活率。

2.5 划痕实验检测细胞迁移能力

RLE-6TN 细胞以 6×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板, 用 20 μL 枪头在 6 孔板中水平、垂直各画 1 条交叉直线, PBS 洗涤后于显微镜下拍照。按“2.4.4”项

下方法进行分组和给药, 给药 24 h 后拍照测定划痕距离并计算迁移率。

$$\text{迁移率} = (0 \text{ h 划痕面积} - \text{给药 24 h 后划痕面积}) / 0 \text{ h 划痕面积}$$

2.6 免疫荧光法检测 LEP、E-cadherin、α-SMA 表达

2.6.1 右归丸含药血清对 CSE + TGF-β1 诱导的 RLE-6TN 细胞 LEP 表达的影响 按“2.4.2”项下方法进行分组和给药, PBS 洗涤, 经固定、通透、封闭后, 加入 LEP 一抗 (1:200), 4 °C 孵育过夜; PBS 洗涤后加入荧光二抗 (1:1000), 室温避光孵育 1 h, 加入 100 mg/L DAPI 染液于室温避光孵育 5 min, 加入防荧光猝灭溶液, 观察荧光强度。

2.6.2 右归丸含药血清对 LEP 诱导的 RLE-6TN 细胞 E-cadherin、α-SMA 表达的影响 按“2.4.4”项下方法进行分组和给药, PBS 洗涤, 经固定、通透、封闭后, 加入 E-cadherin、α-SMA 一抗 (1:200), 4 °C 孵育过夜, 洗涤后加入荧光二抗 (1:1000), 室温避光孵育 1 h, 加入 DAPI 染液于室温避光孵育 5 min, 加入防荧光猝灭溶液, 观察荧光强度。

2.7 qRT-PCR 检测右归丸含药血清对 LEP 诱导的 RLE-6TN 细胞 E-cadherin、α-SMA 表达的影响

按“2.4.4”项下方法进行分组和给药, 按照试剂盒说明书提取细胞中总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。GAPDH、E-cadherin、α-SMA 引物均委托武汉赛维尔生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')	长度/bp
<i>E-cadherin</i>	F: CCAGTGCTTGCTCTTCTT	120
	R: ACCGCCTTCCTCATCATA	
<i>α-SMA</i>	F: GGCAGCAACTCAATTACAG	145
	R: ATCTTCTCCAGCAACTTCTT	
<i>GAPDH</i>	F: TTCAACGGCACAGTCAAG	196
	R: TACTCAGCACCAGCATCA	

2.8 Western blotting 检测 LEP、E-cadherin、α-SMA、STAT3、p-STAT3、JAK2、p-JAK2 蛋白表达

2.8.1 右归丸含药血清对 CSE + TGF-β1 诱导的 RLE-6TN 细胞 LEP、E-cadherin、α-SMA 蛋白表达的影响 按“2.4.2”项下方法进行分组和给药, 收集细胞, 加入 RIPA 裂解液于冰上提取蛋白, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min (离心半径 9 cm), 取上清, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基

硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后加入一抗 (1:1 000), 于 4 °C 孵育过夜; TBST 洗涤后, 加入二抗 (1:2 000), 室温孵育 1 h; TBST 洗涤后, 加入显影液显影, 使用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.8.2 右归丸含药血清对 LEP 诱导的 RLE-6TN 细胞 E-cadherin、 α -SMA、STAT3、p-STAT3、JAK2、p-JAK2 蛋白表达的影响 按“2.4.4”项下方法进行分组和给药, 收集细胞, 提取蛋白, 按“2.8.1”项下方法检测相关蛋白表达。

2.9 统计学分析

采用 Image Pro Plus 5 软件作图, SPSS 24.0 软件进行数据分析。数据先进行正态及方差齐性检测, 若两项皆符合, 运用单因素方差分析; 若数据不符合正态分布, 用邓恩检验, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 CSE 对 RLE-6TN 细胞存活率的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 2.5%、5.0%、7.5%、10.0%、15.0% CSE 作用 RLE-6TN 细胞 12 h 后, 细胞存活率均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 且呈剂量相关性。因此选取 5% CSE 为干预剂量进行后续实验。

3.2 右归丸含药血清对 CSE + TGF- β 1 诱导的 RLE-6TN 细胞存活率的影响

如图 2 所示, RLE-6TN 细胞给予 5% CSE 处理 12 h, 再给予 10 mg/L TGF- β 1 处理 72 h, 细胞形态由相互黏附性强的鹅卵石样变为纺锤状或狭长形, 细胞间隙变大, 提示 EMT 细胞模型制备成功。如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组细胞存活率显著降

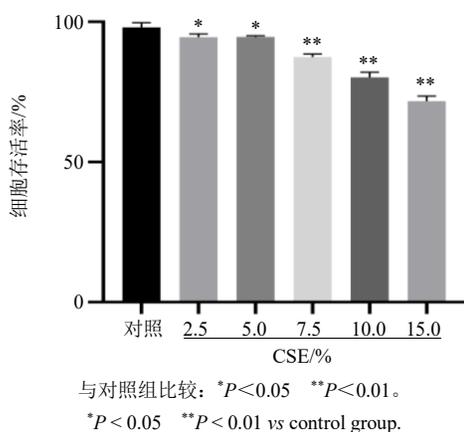


图 1 CSE 对 RLE-6TN 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of CSE on survival rate of RLE-6TN cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

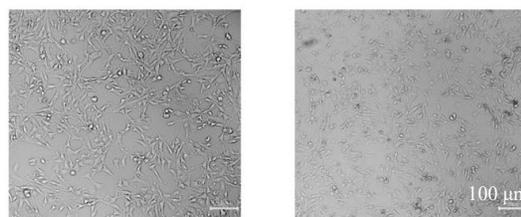
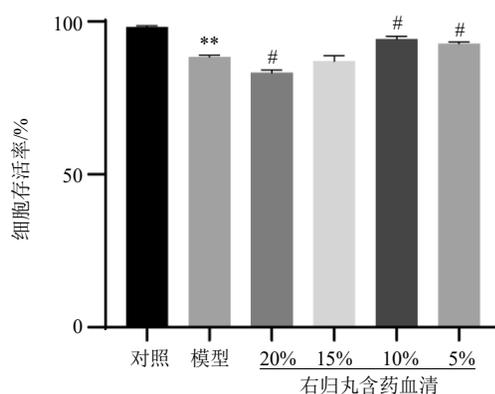


图 2 CSE + TGF- β 1 对 RLE-6TN 细胞形态的影响 ($\times 200$)

Fig. 2 Effect of CSE + TGF- β 1 on morphology of RLE-6TN cells ($\times 200$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 下图同。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 3 右归丸含药血清对 CSE + TGF- β 1 诱导的 RLE-6TN 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of Yougui Pills containing serum on survival rate of RLE-6TN cells induced by CSE + TGF- β 1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 5%、10%右归丸含药血清组细胞存活率显著升高 ($P < 0.05$), 20%右归丸含药血清组细胞存活率显著降低 ($P < 0.05$)。

3.3 右归丸含药血清对 CSE + TGF- β 1 诱导的 RLE-6TN 细胞 LEP 表达的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组 LEP 荧光染色强度显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 5%、10%、15%、20%右归丸含药血清组 LEP 荧光染色强度均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。

3.4 右归丸含药血清对 CSE + TGF- β 1 诱导的 RLE-6TN 细胞 LEP、E-cadherin、 α -SMA 蛋白表达的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组 LEP、 α -SMA 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$), E-cadherin 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较,

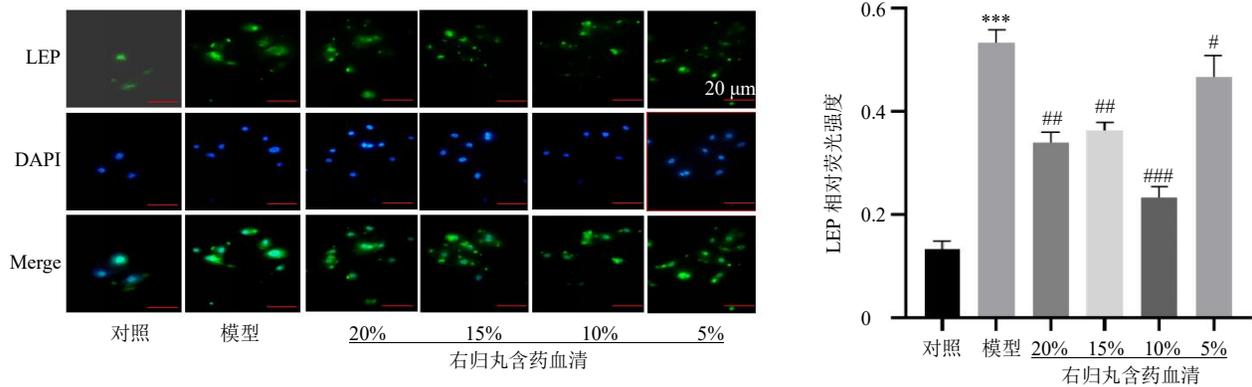


图4 右归丸含药血清对CSE+TGF-β1诱导的RLE-6TN细胞LEP表达的影响(×200, $\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Fig. 4 Effect of Yougui Pills containing serum on expression of LEP in RLE-6TN cells induced by CSE + TGF-β1 (× 200, $\bar{x} \pm s, n = 3$)

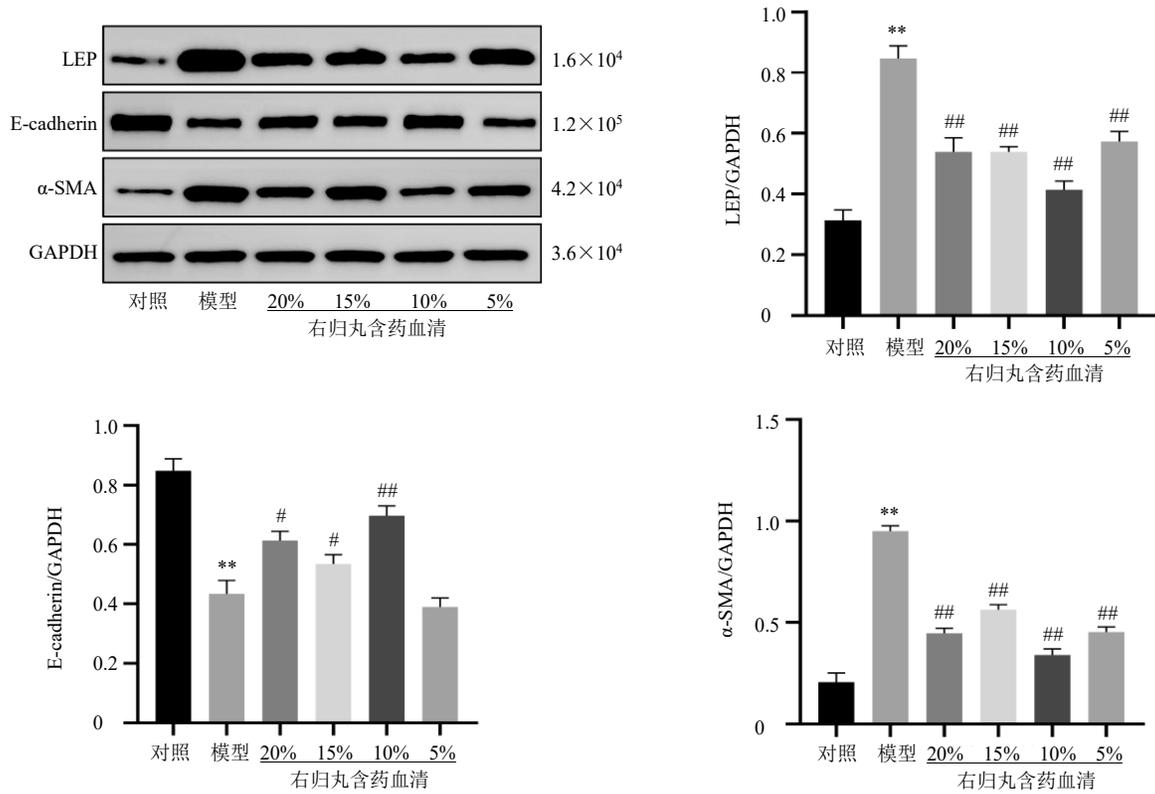


图5 右归丸含药血清对CSE+TGF-β1诱导的RLE-6TN细胞LEP、E-cadherin、α-SMA蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Fig. 5 Effect of Yougui Pills containing serum on expressions of LEP, E-cadherin and α-SMA proteins in RLE-6TN cells induced by CSE + TGF-β1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

5%、10%、15%、20%右归丸含药血清组 LEP、α-SMA 蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$), 10%、15%、20%右归丸含药血清组 E-cadherin 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05, 0.01$)。上述结果中, 10%右归丸含药血清对各指标的调控作用最佳, 采用 10%右归丸含药血清进行后续研究。

3.5 LEP 对 RLE-6TN 细胞存活率的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, 50、100、150、200、400 ng/mL 的 LEP 作用于 RLE-6TN 细胞 12 h 后, 细胞存活率显著降低($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 且呈剂量相关性。因此, 选取 100 ng/mL 的 LEP 为干预质量浓度进行后续实验。

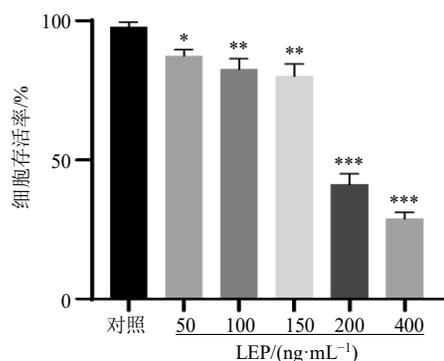


图6 不同质量浓度 LEP 对 RLE-6TN 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of LEP on survival rate of RLE-6TN cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 右归丸含药血清对 LEP 诱导的 RLE-6TN 细胞存活率的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 右归丸含药血清组细胞活力显著升高 ($P < 0.05$)。

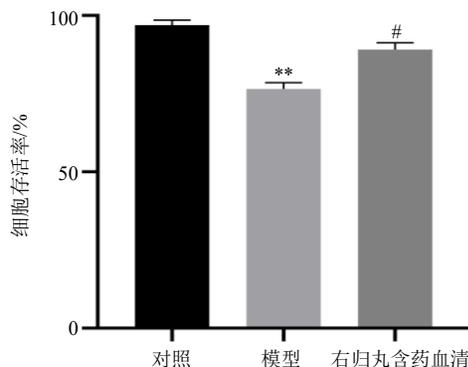


图7 右归丸含药血清对 LEP 诱导的 RLE-6TN 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of Yougui Pills containing serum on survival rate of LEP-induced RLE-6TN cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.7 右归丸含药血清对 LEP 诱导的 RLE-6TN 细胞迁移能力的影响

如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组细胞迁移率显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 右归丸含药血清组细胞迁移率显著升高 ($P < 0.01$)。

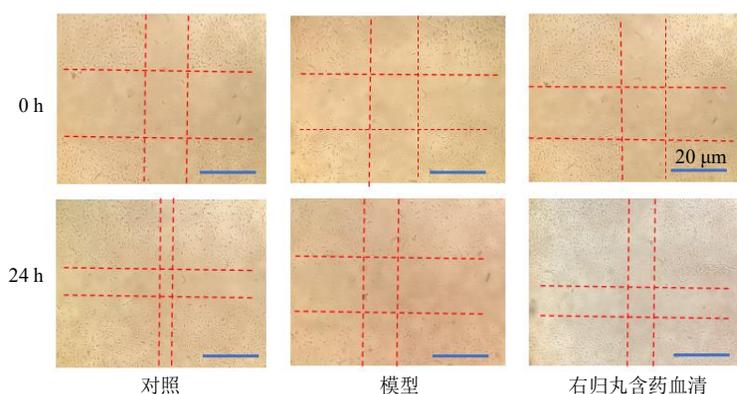
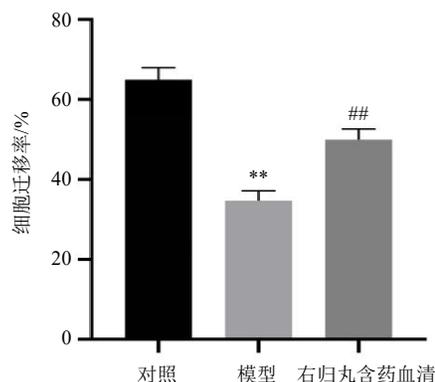


图8 右归丸含药血清对 LEP 诱导的 RLE-6TN 细胞迁移能力的影响 ($\times 200, \bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of Yougui Pills containing serum on migration of LEP-induced RLE-6TN cells ($\times 200, \bar{x} \pm s, n = 3$)



3.8 右归丸含药血清对 LEP 诱导的 RLE-6TN 细胞 E-cadherin、 α -SMA 表达的影响

如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组 α -SMA 荧光强度显著升高 ($P < 0.01$), E-cadherin 荧光强度显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 右归丸含药血清组 α -SMA 荧光强度显著降低 ($P < 0.01$), E-cadherin 荧光强度显著升高 ($P < 0.01$)。

3.9 右归丸含药血清对 LEP 诱导的 RLE-6TN 细胞 E-cadherin、 α -SMA mRNA 表达的影响

如图 10 所示, 与对照组比较, 模型组 E-cadherin mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), α -SMA mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 右

归丸含药血清组 E-cadherin mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), α -SMA mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

3.10 右归丸含药血清对 LEP 诱导的 RLE-6TN 细胞 E-cadherin、 α -SMA、STAT3、p-STAT3、JAK2、p-JAK2 蛋白表达的影响

如图 11 所示, 与对照组比较, 模型组 E-cadherin 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), α -SMA、p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比较, 右归丸含药血清组 E-cadherin 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), α -SMA、p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 蛋白表达水平明显

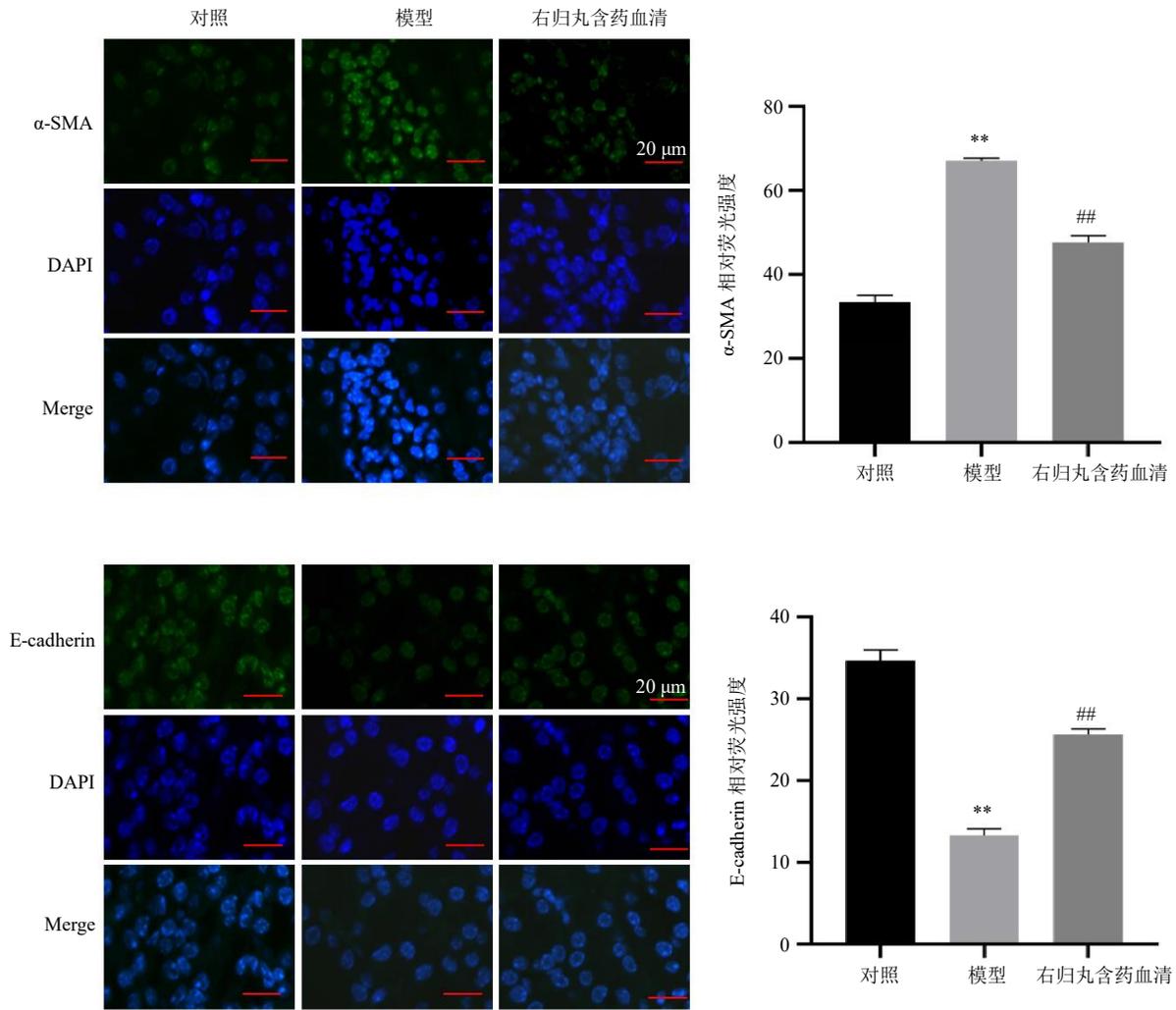


图9 右归丸含药血清对 LEP 诱导的 RLE-6TN 细胞 E-cadherin 和 α -SMA 表达的影响 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 9 Effect of Yougui Pills containing serum on expressions of E-cadherin and α -SMA proteins in LEP-induced RLE-6TN cells ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

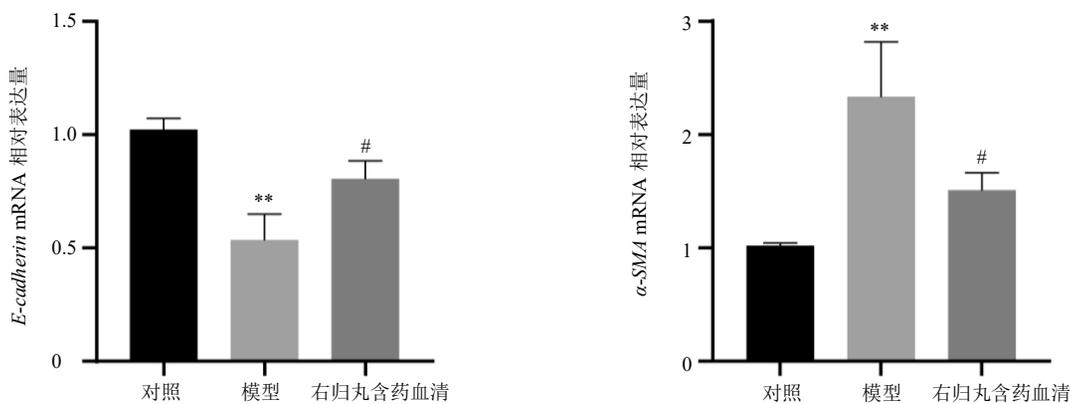


图10 右归丸含药血清对 LEP 诱导的 RLE-6TN 细胞 E-cadherin、 α -SMA mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 10 Effect of Yougui Pills containing serum on expressions of E-cadherin and α -SMA mRNA in LEP-induced RLE-6TN cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

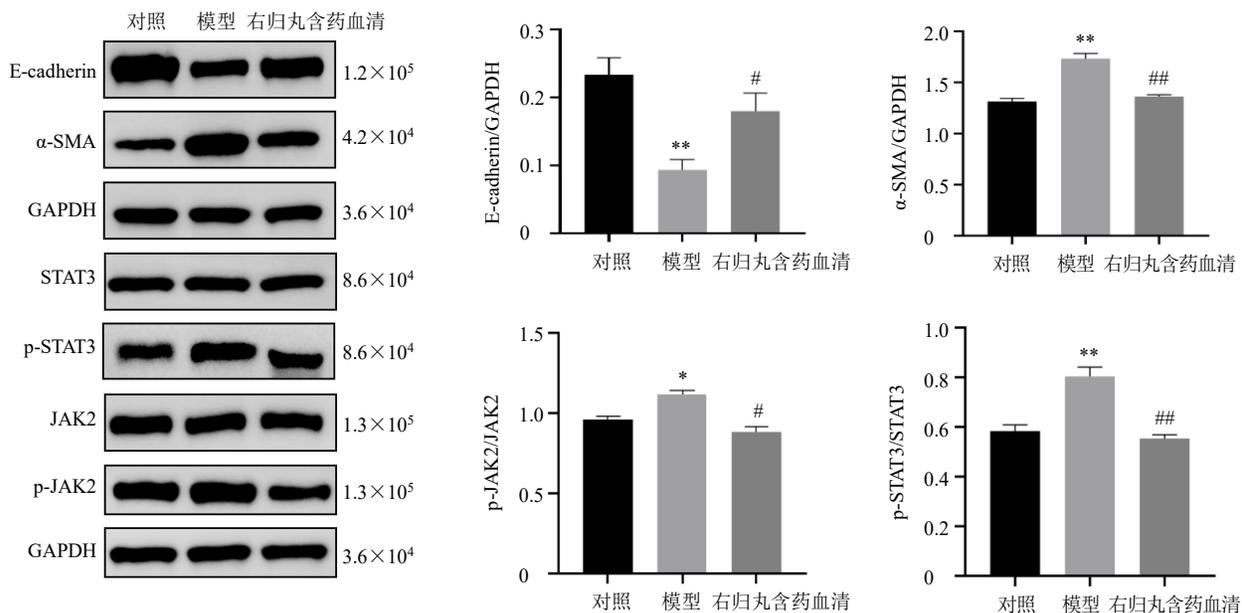


图 11 右归丸含药血清对 LEP 诱导的 RLE-6TN 细胞 E-cadherin、 α -SMA、STAT3、p-STAT3、JAK2、p-JAK2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Effect of Yougui Pills containing serum on expressions of E-cadherin, α -SMA, STAT3, p-STAT3, JAK2 and p-JAK2 proteins in LEP-induced RLE-6TN cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

降低 ($P < 0.05, 0.01$)。

4 讨论

COPD 是一种慢性进展性肺部疾病，不完全可逆性气流受限为其主要特征^[13-14]。气流受限主要是气道平滑肌的收缩痉挛、长期慢性炎症反应导致细胞肿胀、气道分泌物阻塞和上皮层、黏膜结缔组织的肥厚和增生。《素问》曰：“诸寒收引，皆属于肾”；细胞肿胀、气道分泌物等有形病理性物质增多，归属“阴成形”^[15]，因此，温阳补肾是缓解 COPD 病理产物聚积、影响细胞表型转化的重要治法。右归丸作为经典补肾方剂，具有温肾助阳之功；方中鹿角胶、附子、肉桂培补肾之元阳，温里祛寒，为君药；熟地、山药、山茱萸、枸杞子滋阴益肾，取“阴中求阳”之义，共为臣药，右归丸可以治疗肾阳虚 COPD 稳定期。课题组前期采用“香烟烟熏+脂多糖+氢化可的松”复合法诱导肾阳虚 COPD 大鼠模型，发现右归丸可以通过抗炎作用抑制气道重构，减轻气道阻力，从而增强模型大鼠肺功能^[16]，但是尚未从细胞层面进行机制探讨。

在 COPD 中，EMT 的发生与气道结构的重建和纤维化密切相关，可能导致气道壁增厚、弹性减退和气道狭窄，进而加剧气流受限和呼吸困难的症状。在与吸烟有关的 COPD 中，EMT 与气道重塑、

气道纤维化及随后的气流阻塞有关，并可能与肺癌发病率较高有关^[17-19]。EMT 进展过程伴随多个细胞分子标志物的变化，E-cadherin 主要在上皮组织中表达，是能够介导同质细胞间黏附的钙依赖性跨膜糖蛋白^[20]。 α -SMA 是肌成纤维细胞活化的指标，也是反映肺纤维化疾病进程的重要指标，其表达的升高为 EMT 发生的重要标志^[21]。本研究采用 CSE+TGF- β 1 刺激 RLE-6TN 细胞建立体外烟熏+EMT 模型，通过 CCK-8 法检测发现，CSE 能明显抑制 RLE-6TN 细胞活性，并且 5% CSE 干预 12 h 为最佳造模条件；经 5% CSE 处理 RLE-6TN 细胞 12 h，再给予 10 mg/L TGF- β 1 处理 72 h 后，RLE-6TN 细胞明显呈现 EMT 激活状态，E-cadherin 表达降低， α -SMA 表达升高；5%、10%、15%、20% 右归丸含药血清干预 24 h 后，能明显抑制 EMT，升高 E-cadherin 表达，降低 α -SMA 表达，其中 10% 右归丸含药血清对各指标的调控作用最佳。

LEP 是一种由肥胖基因编码的相对分子质量为 1.6×10^4 的非糖基化激素，可以降低能量摄入并增加能量消耗，调节肺的生理功能，参与炎症反应，是目前与 COPD 有明显相关性的细胞因子之一，在脂肪细胞、下丘脑、支气管黏膜上皮细胞、巨噬细胞、II 型肺泡上皮细胞中均有分泌^[22]。本研究采用

CSE+TGF- β 1 刺激 RLE-6TN 细胞,发现 LEP 表达显著升高,给予右归丸含药血清干预 24 h 后 LEP 表达显著降低,提示右归丸含药血清可能通过下调 LEP 的表达来抑制 RLE-6TN 细胞 EMT 发生及转移能力。在此基础上,采用 100 ng/mL LEP 干预 RLE-6TN 细胞,结果显示,细胞迁移能力、E-cadherin 表达均降低, α -SMA 表达升高;给予 10%右归丸含药血清干预后,细胞迁移能力、E-cadherin 表达均升高, α -SMA 表达降低,提示 LEP 能诱导 RLE-6TN 细胞 EMT 发生,而右归丸含药血清能抑制 LEP 诱导的 RLE-6TN 细胞 EMT 发生。

JAK/STAT 信号通路是最为重要的 LEP 下游信号通路,与慢性气道炎症密切相关,广泛参与 COPD 病理过程中的细胞炎症及免疫应答^[23-24]。课题组前期的动物实验已经证实,右归丸能够通过减轻 COPD 大鼠炎性反应及胶原沉积来阻止气道重塑,其机制可能与抑制 LEP 介导的 JAK2/STAT3 信号通路相关^[8]。有报道显示 LEP 通过 JAK2/STAT3 信号通路调控促进 EMT 影响子宫内膜癌的进展,提示 LEP 通过 JAK2/STAT3 与 EMT 密切相关。本研究采用右归丸含药血清干预 LEP 诱导的 RLE-6TN 细胞,结果显示 JAK2、STAT3 磷酸化水平均显著降低,提示右归丸可能通过下调 LEP 的表达来抑制 JAK2/STAT3 通路,抑制 RLE-6TN 细胞 EMT 发生。

综上,右归丸含药血清干预 CSE+TGF- β 1 诱导的 RLE-6TN 细胞后,能上调上皮细胞标志物 E-cadherin 和下调间质细胞标志物 α -SMA 的表达,提示右归丸含药血清可抑制 RLE-6TN 细胞 EMT。此外,本研究通过靶向 LEP 观察右归丸含药血清对 RLE-6TN 细胞的影响,发现右归丸含药血清可抑制 RLE-6TN 细胞 p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达,提示 JAK2/STAT3 通路可能是右归丸含药血清抑制 EMT 过程的机制之一。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Agustí A, Celli B R, Criner G J, et al. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease 2023 Report: GOLD executive summary [J]. *Respirology*, 2023, 28(4): 316-338.
- [2] 陈冠颖,俞万钧,王华英. 上皮间充质转化与呼吸系统疾病研究进展 [J]. *医学理论与实践*, 2021, 34(18): 3144-3146.
- [3] Brake S J, Lu W Y, Chia C, et al. Transforming growth factor- β 1 and SMAD signalling pathway in the small airways of smokers and patients with COPD: Potential role in driving fibrotic type-2 epithelial mesenchymal transition [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1216506.
- [4] Karetnikova E S, Jarzebska N, Rodionov R N, et al. mRNA levels of epithelial and mesenchymal markers in lung epithelial cell lines [J]. *Rep Biochem Mol Biol*, 2023, 12(2): 211-219.
- [5] Jiang C, Peng M J, Dai Z Y, et al. Screening of lipid metabolism-related genes as diagnostic indicators in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2023, 18: 2739-2754.
- [6] Xu M, Cao F L, Li N Y, et al. Leptin induces epithelial-to-mesenchymal transition via activation of the ERK signaling pathway in lung cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(4): 4782-4788.
- [7] Shen L F, Zhang C, Cui K Y, et al. Leptin secreted by adipocytes promotes EMT transition and endometrial cancer progression via the JAK2/STAT3 signalling pathway [J]. *Adipocyte*, 2024, 13(1): 2293273.
- [8] 郑岚,罗泽源,萧闵,等. 右归丸调节 Leptin/JAK2/STAT3 信号通路抑制肾阳虚 COPD 大鼠气道炎症 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(14): 17-26.
- [9] 陈奇. *中药药理研究方法学* [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1261.
- [10] 屈满英,罗百灵,陈红梅,等. 分泌型白细胞蛋白酶抑制剂对香烟烟雾提取物诱导人支气管上皮细胞炎症介质表达的影响 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2008, 31(5): 352-355.
- [11] 胡春萌,孙德俊. 香烟烟雾提取物对 BEAS-2B 细胞生长及炎症因子分泌的影响 [J]. *临床肺科杂志*, 2022, 27(9): 1336-1341.
- [12] 巫凤苹,陈虹,余秀英,等. 烟草烟雾通过 TGF- β 1/Smad2 通路诱导 RLE-6TN 发生上皮间质转化 [J]. *中国免疫学杂志*, 2016, 32(5): 615-619.
- [13] 周哲旭,王省,唐洲,等. 基于 Rac1 信号通路研究淫羊藿苷对慢性阻塞性肺疾病模型小鼠肺泡巨噬细胞胞葬及吞噬功能的影响 [J]. *中草药*, 2024, 55(1): 159-170.
- [14] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组,中国医师协会呼吸医师分会慢性阻塞性肺疾病工作委员会. *慢性阻塞性肺疾病诊治指南 (2021 年修订版)* [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2021, 44(3): 170-205.
- [15] 卢用涛,范伏元. 基于“阳化气,阴成形”理论探讨从“痰”论治慢性阻塞性肺疾病 [J]. *中医药临床杂志*, 2021, 33(6): 1027-1030.
- [16] 郑岚,萧闵. 右归丸对肾阳虚 COPD 大鼠 LEP/NPYR5 信号通路及 TGF- β 影响 [J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(4): 845-847.
- [17] Hikichi M, Mizumura K, Maruoka S, et al. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced

- by cigarette smoke [J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(S17): S2129-S2140.
- [18] 刘军辉, 胡雪茹, 曾婷婷, 等. 线粒体分裂抑制剂-1 在香烟诱导小鼠气道炎症与氧化应激中的作用机制 [J]. 西南医科大学学报, 2022, 45(5): 387-392.
- [19] Kourliouros A, Hogg R, Mehew J, *et al*. Patient outcomes from time of listing for lung transplantation in the UK: Are there disease-specific differences? [J]. *Thorax*, 2019, 74(1): 60-68.
- [20] 王贵佐, 杨淑梅, 刘璐. 脂氧素 A4 对 II 型肺泡上皮细胞-间质转化的抑制作用及其机制 [J]. 山西医科大学学报, 2024, 55(2): 157-163.
- [21] 秦善博, 谭鹏, 郝露, 等. 基于空间代谢组学探究川贝母抗肺纤维化的作用机制(II) [J]. 中草药, 2024, 55(2): 479-488.
- [22] 罗健达, 黄淑君, 梁蕊. 瘦素与 COPD 患者预后因素相关性的研究进展 [J]. 临床肺科杂志, 2019, 24(3): 546-549.
- [23] Verres Y, da Silva C O, Aljebawi B, *et al*. Impact of JAK/STAT inhibitors on human monocyte-derived-macrophages stimulated by cigarette smoke extract and lipopolysaccharide [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2022, 49(11): 1187-1196.
- [24] Zhao K, Dong R, Yu Y, *et al*. Cigarette smoke-induced lung inflammation in COPD mediated via CCR1/JAK/STAT/NF- κ B pathway [J]. *Aging*, 2020, 12(10): 9125-9138.
- [责任编辑 李亚楠]

• 封面图片介绍 •

凤眼果



凤眼果为锦葵科苹婆属苹婆 *Sterculia monosperma* Ventenat 的果实, 别名为九层皮、苹婆果、频婆果、罗望子、罗晃子、七姐果、富贵子等。种子(凤眼果): 甘, 温。温胃, 杀虫; 用于虫积腹痛, 翻胃吐食, 疝痛。果荚(凤眼果壳): 平, 淡; 用于中耳炎, 血痢, 疝气; 外用于痔疮。

苹婆树皮褐黑色, 小枝幼时略有星状毛。叶薄革质, 矩圆形或椭圆形, 长 8~25 cm, 宽 5~15 cm, 顶端急尖或钝, 基部浑圆或钝, 两面均无毛; 叶柄长 2~3.5 cm, 托叶早落。圆锥花序顶生或腋生, 柔弱且披散, 长达 20 cm, 有短柔毛; 花梗远比花长; 萼初时乳白色, 后转为淡红色, 钟状, 外面有短柔毛, 长约 10 mm, 5 裂, 裂片条状披针形; 雄花较多, 雌雄蕊柄弯曲, 无毛, 花药黄色; 雌花较少, 略大, 子房圆球形, 有 5 条沟纹, 密被毛, 花柱弯曲, 柱头 5 浅裂。蓇葖果鲜红色, 厚革质, 矩圆状卵形, 长约 5 cm, 宽 2~3 cm, 顶端有喙, 每果内有种子 1~4 个; 种子椭圆形或矩圆形, 黑褐色, 直径约 1.5 cm。花期 4~5 月, 但在 10~11 月常见少数植株开第 2 次花。

凤眼果含有多种对人体有益的微量元素。凤眼果具有和胃消食、解毒杀虫的功效。主要用于翻胃吐食、虫积腹痛、疝痛、小儿烂头疮等症状。凤眼果还可以提高脑细胞的活性、提高人体记忆力、预防视网膜变形、解毒、增强肠胃功能、增强免疫力、促进生长发育、清肝明目、保护胃和呼吸道黏膜的功能。但是脾虚、便泄者禁止服用。

(封面图片 由南宁青秀山风景名胜旅游开发有限责任公司 黎舒 提供)