

• 基础研究 •

BRD4 抑制剂 JQ1 对慢性阻塞性肺疾病模型小鼠肺功能的影响

厦门大学附属福州第二医院呼吸与危重症医学科 (福州 350007) 刘雪君 余 晖¹ 郑玲容 王玲琼

【摘要】 目的 探讨溴结构域蛋白 4 抑制剂 (JQ1) 对慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 小鼠肺功能的影响及其机制。**方法** 15 只小鼠随机分成对照组、COPD 模型组、JQ1 治疗组, 每组 5 只。采用 24 周慢性烟雾暴露联合脂多糖制备 COPD 小鼠模型, JQ1 治疗组小鼠经 5 周腹腔注射 JQ1 溶液。治疗结束后检测各组小鼠第 0.1 秒用力呼气量与用力肺活量之比 ($FEV_{0.1}/FVC$)、最大呼气中期流速 (MMF)、呼气峰流速 (PEF)、呼气气道阻力 (Re)、肺动态顺应性 (C_{dyn})。后留取小鼠眼球血及肺组织, 对比各组小鼠炎症因子 (IL-6、IL-8、TNF- α) 及肺组织平均内衬间隔 (MLI)、平均肺泡密度 (MAN)、气道周围胶原面积占比和波形蛋白 (vimentin VIM) 等气道重塑指标情况。**结果** 与对照组比较, COPD 模型组的 $FEV_{0.1}/FVC$ 、PEF、MMF 和 C_{dyn} 均显著降低, Re 升高; 与 COPD 模型组比较, JQ1 治疗组的 $FEV_{0.1}/FVC$ 、PEF、MMF 和 C_{dyn} 升高, Re 降低。JQ1 治疗组较 COPD 模型组小鼠血清及肺组织中的 IL-6、IL-8、TNF- α 降低; 肺组织 MLI 减少、MAN 增加, 气道周围胶原蛋白沉积减少, VIM mRNA 及蛋白表达水平降低。差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** BRD4 抑制剂 JQ1 可能通过改善气道炎症及气道重塑来提高 COPD 模型组小鼠的肺功能。

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病; 肺功能; BRD4; JQ1; 气道重塑

【中图分类号】 R563 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2022)01-0107-05

Effect of BRD4 inhibitor JQ1 on lung function in mice with chronic obstructive pulmonary disease LIU Xue-jun, SHE Hui, ZHENG Lingrong, WANG Lingqiong, Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the Affiliated Municipal Second Hospital of Xiamen University, Fuzhou, Fujian 350007, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of bromodomain protein 4 (BRD4) inhibitor JQ1 on lung function in mice with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and its mechanism. **Methods** A total of 15 mice were randomly divided into control group, COPD group, and JQ1 intervention group, with 5 mice in each group. After 24 weeks of chronic CS/LPS exposure and 5 weeks of JQ1 treatment, the mice were anesthetized, and the lung function were determined including the changes of $FEV_{0.1}/FVC$, maximal midexpiratory flow (MMF), peak expiration flow (PEF), resistance of expiration (Re), and respiratory dynamic compliance (C_{dyn}). Then eyeball blood and lung tissue samples were collected to determine the levels of IL-6, IL-8, and TNF- α , and the airway remodeling indexes, such as the mean alveolar number (MAN), mean linear intercept (MLI), the ratio of collagen area around airways, and the mRNA and protein expression of vimentin (VIM). **Results** In the COPD group, the $FEV_{0.1}/FVC$, PEF, MMF, and C_{dyn} were significantly lower than those in the control group, while the Re was higher ($P < 0.05$). Compared with the COPD group, JQ1 treatment could significantly alleviate the $FEV_{0.1}/FVC$, PEF, MMF, and C_{dyn} , meanwhile decrease the Re ($P < 0.05$). Contrast to the COPD group, the levels of IL-6, IL-8, and TNF- α in serum and lung tissue were significantly decreased in the JQ1 intervention group, as well as the levels of the mRNA and protein expression of VIM ($P < 0.05$). The MLI and the ratio of collagen area around airways were significantly lower ($P < 0.05$), but the MAN was significantly higher ($P < 0.05$) in the JQ1 intervention group. **Conclusion** The BRD4 inhibitor JQ1 may protect lung function of the mice with COPD via abrogating chronic CS/LPS-induced airway inflammation and remodeling.

【Key words】 COPD; lung function; BRD4; JQ1; airway remodeling

慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 以慢性气道炎症及气道重塑为特征, 其可导致患者肺功能下降, 气流受限及不良预后, 是全球第三大死因, 对全世界公共卫生系统构成重大的经济负担, 而吸烟是其主要危险因素。目前针对 COPD 的治疗主要是减轻症状, 降低急性发作的频率及严重程度, 改善运动耐量, 但无法改变 COPD 患者肺功能的长期下降趋势^[1]。溴结构域蛋白 4 (BRD4) 是溴结构域蛋白的一种,

目前的研究表明, BRD4 参与 NF- κ B 信号通路相关的慢性炎症及气道重塑^[2], 鉴于慢性炎症及气道重塑是 COPD 患者肺功能下降的重要因素, 我们推测 BRD4 抑制剂 JQ1 可能通过减少慢性炎症及气道重塑来改善 COPD 患者的肺功能下降, 有望成为治疗 COPD 的新药物。故本研究采用慢性烟雾暴露联合脂多糖诱发的 COPD 小鼠模型, 探索 BRD4 抑制剂 JQ1 对慢性烟雾暴露小鼠肺功能的影响。

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2019J01542); 福建省科技计划项目 (引导性项目, 2019D005); 福州市科技计划项目 (2018-S-101-1)

1 通信作者, Email: shui_317@163.com

1 材料与方法

1.1 COPD 模型的建立及分组: 成年雄性 C57BL/6J 小鼠 (18~20 g) 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 实验动物的生产许可证号为 SCXK (沪) 2017-0005, 实验动物使用许可证号为: SYXK (闽) 2016-0006, 动物质量合格证号为 20170005000506。动物实验方案经福建医科大学伦理委员会批准 (2018068 号)。动物房温度控制在 25℃, 12 h/12 h 光暗周期, 并允许自由摄食及饮水。经过 2 周的适应, 15 只小鼠被随机分为 3 组, 分别为对照组、COPD 模型组、JQ1 治疗组。对照组暴露于室内空气, 为期 24 周, 在第 1 天和第 15 天经鼻滴入无菌生理盐水 (50 μ L/只), 接着使用无菌生理盐水治疗腹腔注射 5 周 (0.3 mL/只, 1 次/d, 5 d/周)。COPD 模型组香烟烟雾暴露 24 周, 其中每周 5 天。在第 1 天和第 15 天经鼻滴入脂多糖 (50 μ L/只, 含 7.5 μ g 脂多糖, 大肠杆菌 O55:B5 血清型, L2880, Sigma, 美国), 接着使用无菌生理盐水治疗腹腔注射 5 周 (0.3 mL/只, 1 次/d, 5 d/周)。JQ1 治疗组香烟及脂多糖暴露同 COPD 模型组, 接着使用 JQ1 腹腔注射 5 周 (50 mg/kg, S7110, Selleck, 1 次/d, 5 d/周)。烟熏方式: 小鼠被放置在 72 cm \times 39 cm \times 32 cm 的烟盒中, 2 次/d, 每次点燃 6 支香烟 (10 mg 焦油和 1.0 mg 尼古丁, 古田, 中国福建中烟工业有限责任公司)。每次香烟烟雾暴露持续约 45 min, 两次烟雾暴露至少间隔 4 h 以上。

1.2 检测方法:

1.2.1 肺功能检测: 使用 1% 的戊巴比妥 (100 mg/kg) 腹腔注射麻醉小鼠, 使用动物肺功能分析系统 (AniRes2005, 中国) 检测各组小鼠肺功能。主要包含以下指标: 第 0.1 秒用力呼气量与用力肺活量之比 (FEV_{0.1}/FVC)、最大呼气中期流速 (maximal midexpiratory flow curve, MMF)、呼气峰流速 (peak expiration flow, PEF)、呼气气道阻力 (resistance of expiration, Re)、肺动态顺应性 (respiratory dynamic compliance, Cdyn)。

1.2.2 标本采集和处理: 小鼠肺功能测定后, 摘眼球取血, 离心后取上层血清, 置于 -80℃ 保存用于后续炎症指标酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测。取右上肺组织, 固定于 4% 多聚甲醛中用于病理学检测。其余肺组织存入 -80℃ 冰箱冻存, 用于后续 ELISA、实时荧光定量聚合酶链反应技术 (RT-PCR) 及蛋白质印迹法 (Western blot) 的检测。

1.2.3 肺组织病理学检查: 小鼠的右上肺组织, 固定, 包埋, 切成 4 μ m 薄片。使用苏木素-伊红染色 (HE 染色), 光镜下观察染色结果, 并在 400 倍下计算肺组织平均内衬间隔 (mean linear intercept, MLI)、平均肺泡密度 (mean

alveolar number, MAN)。使用马松染色 (Masson 染色), 光镜下观察染色结果, 并在 200 倍下计算气道周围胶原面积占比 (%)。病理分析应用 Image-Pro Plus 6.0 软件。

1.2.4 ELISA 测定小鼠炎症指标: 应用 ELISA, 按照试剂盒说明的方法, 比较各组小鼠血清及肺组织中白细胞介素-6 (IL-6, 试剂盒: ab222503, Abcam, 美国)、白细胞介素-8 (IL-8, 试剂盒: EMC104, 欣博盛生物科技有限公司, 中国)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α , 试剂盒: ab208348, Abcam, 美国) 的水平。

1.2.5 RT-PCR 测定波形蛋白 (vimentin, VIM) mRNA 表达: 使用 TRIzol 试剂从 3 组小鼠肺组织中提取总 RNA。参照反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, VIM 引物进行扩增。使用 $\Delta\Delta$ CT 方法计算相对 VIM mRNA 水平。GAPDH 被作为内参。引物由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

名称	引物序列 (5' \rightarrow 3')	
	正向:	反向:
M-GAPDH	CCTCGTCCCGTAGA- CAAAATG	TGAGGTCAATGA- AGGGGTCGT
M-VIM	ACCTTGAACG- GAAAGTGGAATC	CAGTGAGGTCAGGCT- TGGAAA

1.2.6 Western blot 测定 VIM 蛋白表达: 3 组样品肺组织经研磨消化后, 采用 RIPA 缓冲液裂解提取蛋白, 上样, 电泳后转膜, 封闭, 加入兔抗 VIM 抗体 (1:2 000, ab92547, Abcam, 美国), 和兔抗 GAPDH 抗体 4℃ 过夜, 使用 HRP 标记的山羊抗兔二抗孵育 1 h, 用 ECL 化学发光底物显色后, 凝胶成像仪曝光显影。AlphaEaseFC (Alpha Innotech, 美国) 软件分析目标带的光密度值。

1.3 统计学方法: 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数 \pm 标准差表示, 采用 Shapiro-Wilk 检验用于确定数据是否符合正态分布。采用单因素方差分析进行组间比较。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肺功能情况: 与对照组比较, COPD 模型组小鼠的 FEV_{0.1}/FVC、PEF、MMF 和 Cdyn 均显著降低, Re 升高。与 COPD 模型组小鼠比较, JQ1 治疗组小鼠的 FEV_{0.1}/FVC、PEF、MMF 和 Cdyn 升高, 同时 Re 降低。差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组小鼠肺功能情况 (n=5, $\bar{x}\pm s$)

组别	FEV _{0.1} /FVC/%	MMF / (mL/s)	PEF / (mL/s)	Re / (cm H ₂ O \cdot s/mL)	Cdyn / (mL/cm H ₂ O)
对照组	59.326 \pm 2.638	4.609 \pm 0.376	5.544 \pm 0.389	0.940 \pm 0.033	0.036 \pm 0.003
COPD 模型组	45.728 \pm 6.585 *	2.704 \pm 1.009 *	3.796 \pm 1.029 *	2.409 \pm 0.636 *	0.020 \pm 0.004 *
JQ1 治疗组	53.422 \pm 1.832 #	4.128 \pm 0.689 #	4.970 \pm 0.667 #	1.171 \pm 0.195 #	0.032 \pm 0.003 #
F 值	12.999	9.003	7.193	21.092	29.321
P 值	0.001	0.004	0.009	<0.001	<0.001

注: 与对照组比较, * $P<0.05$; 与 COPD 模型组比较, # $P<0.05$ 。

2.2 各组小鼠肺组织病理形态变化:肺病理染色提示对照组小鼠气道结构完整清晰,小气道上皮排列整齐,无脱落。COPD 模型组小鼠肺组织可见明显肺泡间隔断裂和肺泡扩大融合形成囊腔,形成肺气肿样改变,小气道上皮细胞排列紊乱,脱落,气道管壁及气道周围组织增厚,细胞外基质增多,伴大量炎性细胞浸润,小气道周围胶原沉着增加,符合 COPD 典型病理特征。JQ1 治疗组小鼠肺气肿、气道上皮细胞紊乱、气道周围胶原沉积及气道炎症细胞浸润等情况均较 COPD 模型组改善。图 1 (见封四)。COPD 模型组较对照组小鼠 MLI 增加,MAN 降低;JQ1 治疗组较 COPD 模型组小鼠,MLI 降低,MAN 升高。COPD 模型组较对照组小鼠气道周围胶原面积占比升高,而 JQ1 治疗组较 COPD 模型组气道周围胶原面积占比降低。差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组小鼠病理形态分析 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	MLI/ μm	MAN/ mm^2	气道周围胶原面积占比/%
对照组	45.998 \pm 4.453	264.890 \pm 44.661	0.428 \pm 0.191
COPD 模型组	86.966 \pm 7.125 *	81.448 \pm 15.707 *	1.572 \pm 0.703 *
JQ1 治疗组	58.532 \pm 9.145 * #	153.724 \pm 45.573 * #	0.909 \pm 0.407 * #
F 值	42.856	29.661	129.907
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与 COPD 模型组比较, # $P < 0.05$ 。

2.3 各组小鼠肺及血液炎症因子情况:与对照组比较,COPD 模型组小鼠血清及肺组织中的 IL-6、IL-8、TNF- α 升高 ($P < 0.05$)。与 COPD 模型组比较,JQ1 治疗组小鼠血清及肺组织中的 IL-6、IL-8、TNF- α 降低 ($P < 0.05$)。见表 4。

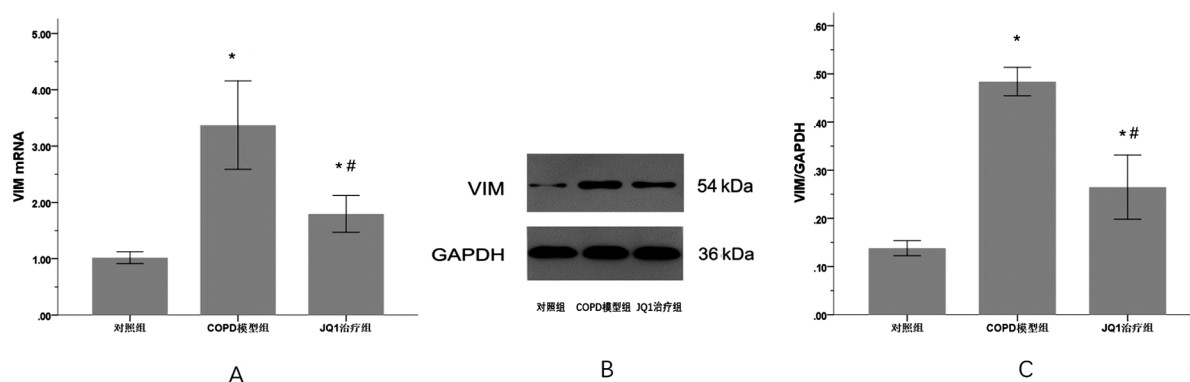
表 4 各组小鼠血液及肺组织炎症指标情况 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	血液			肺组织		
	IL-6 / (pg/mL)	IL-8 / (pg/mL)	TNF- α / (pg/mL)	IL-6 / (pg/mL)	IL-8 / (pg/mL)	TNF- α / (pg/mL)
对照组	8.792 \pm 2.705	48.054 \pm 7.188	11.362 \pm 1.552	81.602 \pm 9.185	107.368 \pm 16.200	45.237 \pm 2.439
COPD 模型组	16.808 \pm 1.362 *	108.892 \pm 8.848 *	19.356 \pm 2.448 *	135.318 \pm 3.133 *	257.214 \pm 26.789 *	68.492 \pm 3.631 *
JQ1 治疗组	10.702 \pm 2.406 #	63.762 \pm 3.848 * #	13.708 \pm 1.417 #	90.724 \pm 11.875 #	149.538 \pm 15.016 * #	47.754 \pm 2.509 #
F 值	17.578	103.357	24.326	52.690	74.293	96.070
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与 COPD 模型组比较, # $P < 0.05$ 。

2.4 各组小鼠气道重塑指标 VIM 的 mRNA 及蛋白表达情况:与对照组比较,COPD 模型组肺组织中的 VIM mRNA 及蛋白表达水平升高。与 COPD 模型组比较,JQ1 治疗组肺

组织中的 VIM mRNA 及蛋白表达水平降低。差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。



注: A, 各组小鼠波形蛋白 (VIM) mRNA 表达情况; B, 各组小鼠 VIM 蛋白表达情况 (电泳图); C, 各组小鼠 VIM 蛋白表达相对含量。与对照组比较, * $P < 0.05$;与 COPD 模型组比较, # $P < 0.05$ 。

图 2 各组小鼠 VIM mRNA 及蛋白表达情况

3 讨论

COPD 是最常见的慢性气道疾病,我国 40 岁以上人群 COPD 患病率高达 13.7%^[3],给患者家庭及社会带来沉重的经济负担。吸烟是 COPD 最主要的致病因素,吸入烟草烟雾等有害颗粒或气体可引起气道慢性炎症,而慢性炎症导

致肺实质组织破坏,并导致异常修复引发气道重塑,从而引发气体滞留和进行性气流受限^[1]。慢性炎症及气道重塑与 NF- κ B/BRD4 信号通路密切相关,有研究表明,BRD4 抑制剂 JQ1 有抗炎及抗气道纤维化的作用,但较少研究将其应用于 COPD 小鼠模型来观察其对 COPD 小鼠肺功能改变情

况^[4-5]。本研究通过慢性烟雾联合脂多糖暴露建立 COPD 小鼠模型,并应用 JQ1 治疗,主要得到以下结论:1) JQ1 治疗可以降低 COPD 小鼠的气道阻力,改善 COPD 模型小鼠的 FEV_{0.1}/FVC、PEF、MMF 和 Cdyn 等肺功能指标。2) JQ1 治疗可以改善 COPD 小鼠的炎症指标。3) JQ1 治疗可以改善 COPD 小鼠的气道重塑。

在本研究中,小鼠肺组织病理 HE 染色提示 COPD 模型组小鼠肺组织 MLI 增加,MAN 减少,呈现肺气肿样改变,小气道上皮细胞低矮,排列紊乱,脱落,气道管壁及气道周围组织增厚,细胞外基质增多,伴大量炎性细胞浸润。上述呈现出 COPD 典型病理特征,提示本研究模型复制成功。COPD 的气流受限与小气道阻力增加和肺泡弹性回缩力下降相关,表现为第 1 秒用力呼气量与用力肺活量之比 (FEV₁/FVC) 及第 1 秒用力呼气量 (FEV₁) 的降低^[6]。本研究发现在 COPD 模型组中,Re 升高,同时伴有 PEF、MMF、Cdyn、FEV_{0.1}/FVC 下降。同时我们发现 JQ1 能够改善 COPD 小鼠的小气道阻力增加和肺泡弹性回缩力降低,提高 FEV_{0.1}/FVC 及 FEV_{0.1},改善 COPD 小鼠肺功能。

COPD 患者肺功能下降等病理生理学变化主要源于肺部慢性炎症^[7]。慢性炎症与吸入香烟烟雾密切相关,主要表现为肺部巨噬细胞、嗜中性粒细胞和淋巴细胞的数量增加以及 TNF- α 、IL-8、IL-6 等炎症指标的增高。COPD 患者的血清 TNF- α 与患者肺功能相关,随着疾病的严重程度加重而增加,并参与 COPD 患者的全身炎症的发生和发展^[8]。IL-6 和 IL-8 均与 COPD 患者肺气肿及气流阻塞相关,IL-6 水平高的患者,长期肺功能下降更快,而 IL-8 高的患者其肺气肿发展的速度更快^[9]。在我们的研究中,我们发现炎症细胞被渗透到 COPD 小鼠的小气道周围,肺组织表达的 IL-8、IL-6 和 TNF- α 水平增高。COPD 是一种全身炎症相关的疾病,我们同时发现 COPD 小鼠血清里的炎症因子增高。最近的研究表明,BRD4 在 COPD 患者的肺部表达增加^[10],NF- κ B/BRD4 信号通路可能是调节气道黏膜炎症的关键因子^[11]。本研究发现,作为 BRD4 的抑制剂,JQ1 可以显著减少小气道周围的炎症渗透,减少肺组织及全身炎症水平,这可能是其改善 COPD 模型小鼠肺功能的机制之一。

气道重塑可表现为气道上皮屏障破坏、上皮间充质转换 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 以及气道周围胶原蛋白沉积^[12]。慢性炎症导致的组织损伤及异常修复导致 COPD 气道重塑的发生和发展,进而导致 COPD 患者肺功能的减退。在本研究中,我们发现 COPD 模型小鼠气道上皮细胞的扁平及排列紊乱,部分脱落。Masson 染色提示小气道周围胶原沉积明显增多,气道周围胶原面积占比增高,出现气道重塑。气道上皮细胞具有高度可塑性,其在香烟烟雾等有害物质的影响下出现损伤,释放 TGF- β ,而后转变为间充质表型,称为 EMT。EMT 与细支气管周围纤维化、气道重塑有关,是 COPD 发生和发展的关键机制,与 COPD 患者肺功能下降相关^[13]。VIM 是一种主要的 III 型中间丝蛋白,在间充质细胞中表达上调,是 EMT 的代表指标^[14]。在本研究中,我们发现 COPD 小鼠 VIM 的 mRNA 及蛋白表达均增高,提示出现上皮间充质转换。由 BRD4 介导的、依赖 NF- κ B/ReLA 的信号通路在 EMT 发生、发展过程中至关重

要,在炎症的微环境中 BRD4 可以与 ReLA 连接并参与形成转录延伸复合物,该复合物连接到 EMT 相关基因的启动子,参与其转录延伸,从而增强 EMT 相关基因的表达^[2,15],从而在慢性炎症介导的气道纤维化中起到重要作用。在我们的研究中,BRD4 抑制剂 JQ1 治疗可以改善 COPD 小鼠气道重塑的病理变化以及气道上皮细胞表达的间充质标记,这可能亦是 JQ1 改善 COPD 模型小鼠肺功能的机制之一。

综上所述,BRD4 抑制剂 JQ1 可能通过改善慢性烟雾联合脂多糖暴露建立的 COPD 模型小鼠的气道炎症及气道重塑来改善小鼠的肺功能情况。BRD4 可能是 COPD 的一个新的治疗靶点,而 JQ1 及其类似物有望成为治疗 COPD 的一类新药物。但本研究存在一定的局限性,比如使用的实验动物数量较少;NF- κ B/BRD4 信号通路对 COPD 小鼠气道炎症及气道重塑的机制研究欠深入;未使用对 BRD4 更加特异性的小分子抑制剂进行研究等,相关研究有待进一步完善。

参考文献

- [1] Global initiative for chronic obstructive lung disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (2021 report) [EB/OL]. 2021; <https://goldcopd.org/gold-reports/>. Accessed 2020-11-17.
- [2] Tian B, Zhao Y, Sun H, et al. BRD4 mediates NF- κ B-dependent epithelial-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis via transcriptional elongation [J]. American journal of physiology, Lung cellular and molecular physiology, 2016, 311 (6): L1183-L1201.
- [3] Wang C, Xu J, Yang L, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health [CPH] study): a national cross-sectional study [J]. Lancet, 2018, 391 (10131): 1706-1717.
- [4] Tang X, Peng R, Phillips J E, et al. Assessment of Brd4 inhibition in idiopathic pulmonary fibrosis lung fibroblasts and in vivo models of lung fibrosis [J]. Am J Pathol, 2013, 183 (2): 470-479.
- [5] Wang H, Huang W, Liang M, et al. (+)-JQ1 attenuated LPS-induced microglial inflammation via MAPK/NF κ B signaling [J]. Cell & Bioscience, 2018, 8: 60.
- [6] 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.
- [7] Stockley R A, Halpin D M G, Celli B R, et al. Chronic obstructive pulmonary disease biomarkers and their interpretation [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2019, 199 (10): 1195-1204.
- [8] Barnes P J. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD [J]. Clin Sci (Lond), 2017, 131 (13): 1541-1558.
- [9] Bradford E, Jacobson S, Varasteh J, et al. The value of blood cytokines and chemokines in assessing COPD [J]. Respir Res, 2017, 18 (1): 180.
- [10] Zheng C, Zhang Y, Zhao Y, et al. Circ-OSBPL2 contributes to smoke-related chronic obstructive pulmonary disease by

- targeting miR-193a-5p/BRD4 Axis [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2021, 16: 919-931.
- [11] Tian B, Yang J, Zhao Y, et al. BRD4 Couples NF- κ B/RelA with Airway Inflammation and the IRF-RIG-I Amplification Loop in Respiratory Syncytial Virus Infection [J]. J Virol, 2017, 91 (6): e00007-17.
- [12] Wang Y, Xu J, Meng Y, et al. Role of inflammatory cells in airway remodeling in COPD [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2018, 13: 3341-3348.
- [13] Jolly M K, Ward C, Eapen M S, et al. Epithelial-mesenchymal transition, a spectrum of states: Role in lung development, homeostasis, and disease [J]. Dev Dyn, 2018, 247 (3): 346-358.
- [14] Dave J M, Bayless K J. Vimentin as an integral regulator of cell adhesion and endothelial sprouting [J]. Microcirculation, 2014, 21 (4): 333-344.
- [15] Tian B, Li X, Kalita M, et al. Analysis of the TGF β -induced program in primary airway epithelial cells shows essential role of NF- κ B/RelA signaling network in type II epithelial mesenchymal transition [J]. BMC Genomics, 2015, 16 (1): 529.

• 基础研究 •

从 Cyclin E1-CDK2- CKIs 通路探讨芪灵扶正清解方抑制肝癌细胞株 Hep1-6 增殖的作用机制

福建中医药大学中西医结合研究院 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室 (福州 350122) 刘海琴
沈冬祎¹ 吕嘉婧² 罗 秀² 陈旭征 林久茂 章尤权³

【摘要】 目的 从周期蛋白 Cyclin E1-细胞周期依赖性蛋白激酶 2 (CDK2)-CDKs 抑制因子 CKIs (Cyclin E1-CDK2-CKIs) 信号通路角度探讨芪灵扶正清解方 (QL) 调控小鼠肝癌 Hep1-6 细胞株增殖的机制。方法 体外培养 Hep1-6 细胞, 分别给予不同剂量的 QL 醇提物 (0、31.25、62.5、125、250、500、1 000 μ g/mL) 干预 Hep1-6 细胞株 24 h、48 h 和 72 h。MTT 法检测细胞活力; 流式细胞术检测细胞周期各个时相的比例; Western blot 检测 CDK2、周期蛋白 Cyclin E1、视网膜母细胞瘤 Rb、磷酸化 Rb (p-Rb) 以及 CDKs 抑制因子 (CKIs) p57^{KIP2} 和 p27^{KIP1} 的蛋白水平。结果 QL 醇提物能显著抑制 Hep1-6 细胞的生长活力, 呈剂量依赖性; Hep1-6 细胞周期被阻滞在 G0/G1 期, S 期的 DNA 合成被抑制; QL 醇提物下调了 CDK2、Cyclin E1、p-Rb 的蛋白水平, 上调了 p57^{KIP2} 和 p27^{KIP1} 的蛋白水平。结论 QL 方通过抑制 CDK2 与 Cyclin E1 的结合, 同时正向调控 CKIs 抑制 Cyclin E1-CDK2 复合物的激酶活性, 从两方面抑制下游 Rb 的磷酸化水平, 进而有效抑制肝癌 Hep1-6 细胞的增殖。

【关键词】 芪灵扶正清解方; Hep1-6 细胞; 细胞周期; CDK2; CKIs

【中图分类号】 R73-3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2022)01-0111-04

Qiling Fuzheng Qingjie decoction inhibit the proliferation of hepatoma cell line Hep1-6 via Cyclin E1-CDK2-CKIs signaling pathway

LIU Haiqin, SHEN Dongyi, LV Jiajing, LUO Xiu, CHEN Xuzheng, LIN Jiumao, ZHANG Youquan. Fujian Provincial Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine geriatric Diseases, Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of Qiling Fuzheng Qingjie decoction (QL) on the proliferation of hepatoma cell line Hep1-6 via Cyclin E1-CDK2-CKIs signaling pathway. **Methods** Hep1-6 cells were cultured in vitro and treated with different doses of QL ethanol extract (0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1 000 μ g/mL) for 24 h, 48 h and 72 h. Cell viability was detected by MTT method; Flow cytometry was used to detect the ratio of each phase of the cell cycle; Western blot was used to detect cycle-dependent protein kinases CDK2, Cyclin E1, retinoblastoma Rb, phosphorylated Rb (p-Rb) and CDKs inhibitor (CKIs) p57^{KIP2} and p27^{KIP1}. **Results** QL ethanol extract could significantly inhibit the growth activity of Hep1-6 cells in a dose-dependent manner. Cell cycle was blocked in G0/G1 phase, and DNA synthesis in S phase was inhibited. The QL ethanol extract down-regulated the protein levels of CDK2, Cyclin E1 and p-Rb, and up-regulated the protein levels of p57^{KIP2} and p27^{KIP1}. **Conclusion** QL decoction could inhibit the proliferation of hepatoma Hep1-6 cells by inhibiting the binding of CDK2 and Cyclin E1 and positively regulating CKIs to inhibit the kinase activity of Cyclin E1-CDK2 complex, then inhibiting the phosphorylation of Rb.

基金项目: 福建省自然科学基金 (2019J01479), 福建省大学生创新创业训练计划 (S202110393010)

1 福建中医药大学中西医结合学院; 2 福建中医药大学药学院; 3 福建中医药大学附属第二人民医院, 通信作者, Email: cxz5000@sina.com

BRD4 抑制剂 JQ1 对慢性阻塞性肺疾病模型小鼠肺功能的影响

(见正文第 107 页)

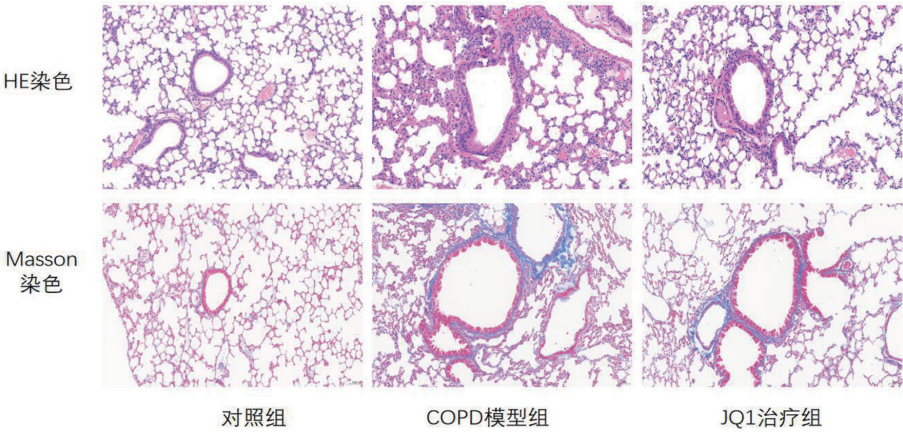


图 1 各组小鼠肺病理 HE 染色及 Masson 染色情况

外周 T 细胞淋巴瘤合并弥漫大 B 细胞淋巴瘤 1 例报告

(见正文第 176 页)

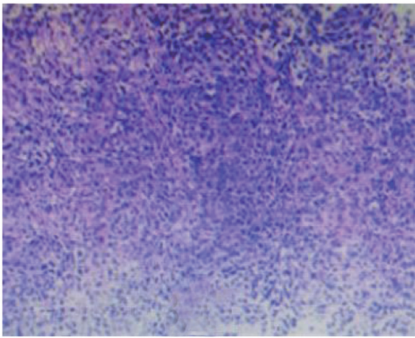


图 3 肝脏穿刺组织 (HE×40)

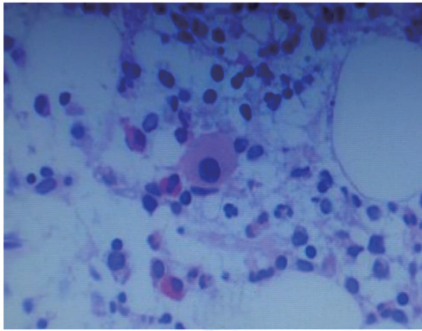


图 4 骨髓病理 (HE×400)

腮腺低度恶性黏液纤维肉瘤 1 例报告

(见正文第 177 页)

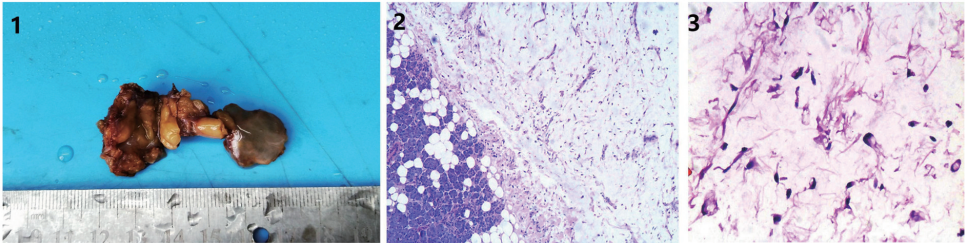


图 1 腮腺低度恶性黏液纤维肉瘤的病理检查大体图 图 2 结节与周围腮腺组织之间纤维的纤维性假包膜 (HE ×100) 图 3 黏液背景中的肿瘤细胞 (HE ×200)