

# 蛇床子素通过抑制小鼠心肌成纤维细胞 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路降低胶原表达的研究

侯欢<sup>1,2</sup>, 刘金成<sup>3</sup>, 陈蓉<sup>1\*</sup> (1.苏州大学附属第一医院药理学部, 江苏 苏州 215006; 2.苏州大学药学院药理学系, 江苏 苏州 215123; 3.中国药科大学中药学院中药药理与中医药系, 南京 211198)

**摘要:** 目的 研究蛇床子素降低真核载体 pcDNA3.1(+)-TGF- $\beta$ 1 转染的小鼠心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)胶原的表达是否与抑制 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路相关。方法 用真核表达载体 pcDNA3.1(+)-TGF- $\beta$ 1 转染小鼠 CFs, 然后在 TGF- $\beta$ 1 受体抑制剂 SB431542 预处理或不预处理的情况下,用不同浓度的蛇床子素处理 CFs 24 h。ELISA 检测上清 TGF- $\beta$ 1 水平, Western blotting 检测细胞内  $\alpha$ -SMA、collagen I、collagen III、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad4 和 Smad7 的蛋白表达。结果 真核表达载体 pcDNA3.1(+)-TGF- $\beta$ 1 转染 CFs 后, TGF- $\beta$ 1 释放量增加, 提示建立了 TGF- $\beta$ 1 过表达的细胞模型。TGF- $\beta$ 1 过表达的 CFs 经蛇床子素(5~20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )处理 24 h 后, TGF- $\beta$ 1、 $\alpha$ -SMA、collagen I、collagen III、p-Smad2/3 和 Smad4 蛋白表达降低, Smad7 蛋白表达上升。TGF- $\beta$ 1 受体抑制剂 SB431542 预处理 2 h 后, 蛇床子素对  $\alpha$ -SMA、collagen I、collagen III、Smad2/3、p-Smad2/3 和 Smad4 蛋白表达的抑制作用进一步增强。结论 蛇床子素可以通过直接抑制 TGF- $\beta$ 1 的产生和 Smad 通路下调  $\alpha$ -SMA 和胶原蛋白的表达, 这可能是其抗纤维化的机制之一。

**关键词:** 蛇床子素; 转化生长因子- $\beta$ 1/Smad 信号通路;  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白; 胶原蛋白I; 胶原蛋白III

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)19-2437-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.19.002

引用本文: 侯欢, 刘金成, 陈蓉. 蛇床子素通过抑制小鼠心肌成纤维细胞 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路降低胶原表达的研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(19): 2437-2443.

## Study on Osthole Decreased Collagen Expression by Inhibiting TGF- $\beta$ 1/Smad Signaling Pathway in Mouse Cardiac Fibroblasts

HOU Huan<sup>1,2</sup>, LIU Jincheng<sup>3</sup>, CHEN Rong<sup>1\*</sup> (1.Department of Pharmacology, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China; 2.Department of Pharmacology, College of Pharmaceutical Science, Soochow University, Suzhou 215123, China; 3.Department of Pharmacology and Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore whether the reduction of collagen expression in mouse cardiac fibroblasts(CFs) transfected with eukaryotic vector pcDNA3.1(+)-TGF- $\beta$ 1 directly associated with inhibition of TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway. **METHODS** The mouse CFs were transfected with eukaryotic vector pcDNA3.1(+)-TGF- $\beta$ 1, and the TGF- $\beta$ 1-transfected CFs were then treated with different concentrations of osthole for 24 h in the presence or absence of pretreatment with TGF- $\beta$ 1 receptor I inhibitor SB431542. The supernatant TGF- $\beta$ 1 level was determined by ELISA method, and the intracellular  $\alpha$ -SMA, collagen I, collagen III, Smad2/3, p-Smad2/3 and Smad4 and Smad7 protein expressions were determined by Western blotting. **RESULTS** After transfection of CFs with eukaryotic vector pcDNA3.1(+)-TGF- $\beta$ 1, the release of TGF- $\beta$ 1 was increased, indicating that the cell model of TGF- $\beta$ 1-overexpression was established. Following treatment of TGF- $\beta$ 1-overexpressed CFs with osthole 5~20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for 24 h, the TGF- $\beta$ 1,  $\alpha$ -SMA, collagen I, collagen III, p-Smad2/3 and Smad4 protein expressions were decreased, while Smad7 protein expressions were increased. After pretreatment with TGF- $\beta$ 1 receptor I inhibitor SB431542 for 2 h, the inhibitory effects of osthole on  $\alpha$ -SMA, collagen I, collagen III, Smad2/3, p-Smad2/3 and Smad4 protein expressions were further enhanced. **CONCLUSION** Osthole can downregulate the expressions of  $\alpha$ -SMA and collagen proteins by directly inhibiting TGF- $\beta$ 1 production and the Smad pathway, which might be one of its anti-fibrotic mechanisms.

**KEYWORDS:** osthole; TGF- $\beta$ 1/Smad pathway;  $\alpha$ -smooth muscle actin( $\alpha$ -SMA); collagen I; collagen III

心肌纤维化是指在病理状态下心肌间质心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)增殖, 细胞外基质沉积异常增加, 导致心室顺应性下降, 从而影响心脏的正常舒张和收缩功能<sup>[1]</sup>。CFs 是正常心

基金项目: 国家自然科学基金项目(81302772); 江苏省卫生计生委青年医学重点人才培养项目(QNRC2016716); 苏州市科技发展计划项目(SYSD2020101)

作者简介: 侯欢, 女, 硕士生 E-mail: 1275590483@qq.com 共同第一作者: 刘金成, 男, 博士生 E-mail: 18051756832@163.com

\*通信作者: 陈蓉, 女, 博士, 副教授 E-mail: rongchen\_76@aliyun.com

脏生理和心血管疾病的中心角色,其主要功能是产生富含胶原的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)<sup>[2]</sup>。转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )是主要的促纤维化细胞因子之一,可诱导 CFs 的增殖和转化,导致  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)表达和胶原生成<sup>[3-5]</sup>。有研究者认为 TGF- $\beta$  产生的增加是器质性纤维化的共同特征,可能作为治疗靶点<sup>[6]</sup>。TGF- $\beta$  有 3 种亚型,包括 TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 和 TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 1 在内皮、造血和结缔组织细胞中表达, TGF- $\beta$ 2 在上皮细胞和神经元细胞中表达,而 TGF- $\beta$ 3 主要在间充质细胞中表达<sup>[5,7-8]</sup>。TGF- $\beta$ 1 长期以来被认为是最重要的促纤维化细胞因子,通过激活 Smad2/3 信号通路刺激 CFs,诱导胶原生成和纤维化形成<sup>[9]</sup>。TGF- $\beta$ 1 通过结合 TGF- $\beta$ 1 型和 II 型受体(T $\beta$ RI 和 T $\beta$ RII)激活包括 Smad2、Smad3 和 Smad4 在内的下游介质发挥其生物学效应,而受 Smad7 表达的负调控<sup>[10-12]</sup>。TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路的激活可通过刺激胶原合成同时抑制 ECM 降解来促进纤维化<sup>[12]</sup>。

蛇床子素是一种香豆素衍生物,从蛇床子果实中提取。它具有多种生物学功能,如降血压<sup>[6,13]</sup>、降血糖<sup>[14-15]</sup>、降脂<sup>[15-16]</sup>和抗骨质疏松<sup>[17]</sup>。随着蛇床子素多种生物活性的报道,蛇床子素及其衍生物新的药理作用越来越受到重视<sup>[18]</sup>。前期研究首次发现蛇床子素可以预防异丙肾上腺素诱导的小鼠心肌纤维化,其机制可能与降低 TGF- $\beta$ 1 表达有关<sup>[19]</sup>。本研究进一步探究了蛇床子素的抗纤维化作用是否与抑制 TGF- $\beta$ 1 过表达 CFs 中 TGF- $\beta$ 1 的产生和 Smad 信号通路有关。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、试剂与仪器

蛇床子素(西安绿泉生物技术有限公司,批号:061227;纯度:98%)。小鼠 CFs 购自苏州艾瑞德生物科技有限公司;0.25%胰蛋白酶(博奥森,货号:c7044);lipofectamine 2000 转染试剂(Invitrogen 公司,批号:11668019);真核表达载体 pcDNA3.1(+)-TGF- $\beta$ 1 由苏州大学毛新良教授课题组提供,由本实验室保存。TGF- $\beta$ 1 受体特异性选择性抑制剂 SB431542(美国 Selleckchem 公司,货号:s1067);小鼠 TGF- $\beta$ 1 ELISA 测定试剂盒(上海西唐生物科技有限公司,批号:F1159);Smad4(货号:ab40759)、collagen I(货号:ab260043)、collagen III(货号:ab7778)一抗购自 Abcam 公司; $\alpha$ -SMA(货号:

19245)、Smad2/3(货号:8685)、p-Smad2/3(货号:8828)和  $\beta$ -actin(货号:4970)一抗均购自 Cell Signaling Technology 公司;Smad7 一抗(EPitomics 公司,货号:3894-1);抗兔荧光二抗(LI-COR 公司,货号:925-68071)。

M1000 Pro 全波长酶标仪(瑞士 Tecan 公司);B CM-1000A 型生物超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);Fresco21 型高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司);BB15 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo Electron CO 公司);奥德赛红外成像系统(美国 LI-COR 公司);JY96-1 I 型超声细胞破碎仪(宁波科生仪器厂)。

### 1.2 细胞培养和转染

小鼠 CFs 在含 10%胎牛血清(Gibco 公司,货号:10099-141);100 U·mL<sup>-1</sup>青霉素和 100 U·mL<sup>-1</sup>链霉素的 DMEM/F12 培养基(Hyclone 公司,货号:SH30023.01B),37℃,5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。转染前,将 CFs 置于无血清培养基中培养。然后将质粒(5  $\mu$ g)预稀释在含 lipofectamine 2000 的 1 mL 无血清 DMEM/F12 溶液中。转染 4 h 后,细胞在含 10%胎牛血清的新鲜培养基中再孵育 20 h。收集上清,按照试剂盒说明书,采用 ELISA 法在全波长酶标仪,测定上清 TGF- $\beta$ 1 水平。

### 1.3 蛇床子素对转染后 CFs 中 $\alpha$ -SMA、collagen I、collagen III 和 p-Smad2/3 蛋白表达的影响

准确称取 0.195 4 g 蛇床子素,用 20 mL 的 DMSO 溶解,终浓度为 40 mmol·L<sup>-1</sup>,0.22  $\mu$ m 针头滤器过滤除菌后,分装 1.5 mL 的 EP 管中,-80℃保存,临用时稀释成所需浓度。培养的 CFs 分为 6 组:对照组、模型组[pcDNA3.1(+)-TGF- $\beta$ 1 转染建模]、溶媒组[转染后加 1% DMSO 孵育]和蛇床子素 5, 10, 20  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>组[转染后加相应浓度蛇床子素孵育]。除对照组外,其余各组 pcDNA3.1(+)-TGF- $\beta$ 1 转染 24 h 建模;随后,除对照组和模型组外,其余各组加入相应浓度的蛇床子素或 1% DMSO 孵育 24 h。Western blotting 分别检测  $\alpha$ -SMA、collagen I、collagen III 和 p-Smad2/3 蛋白的表达。

### 1.4 TGF- $\beta$ 1 受体抑制剂对转染后 CFs 中 $\alpha$ -SMA、collagen I、collagen III、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad4 和 Smad7 蛋白表达的影响

培养的 CFs 被分为 6 组:对照组、模型组[pcDNA3.1(+)-TGF- $\beta$ 1 转染建模]、溶媒组[转染后加 1% DMSO 孵育]、蛇床子素组[转染后加蛇床

子素  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  孵育]、抑制剂组[转染后, 用 TGF- $\beta$ 1 受体抑制剂 SB431542  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  处理细胞 2 h]<sup>[20]</sup>、蛇床子素+抑制剂组[转染后, SB431542  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  处理细胞 2 h, 再加蛇床子素  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  孵育]。除对照组外, 其余各组 pcDNA3.1(+)-TGF- $\beta$ 1 转染 24 h 建模; 加抑制剂的组别用 SB431542  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  处理细胞 2 h; 再加入蛇床子素或 DMSO 孵育 24 h。Western blotting 分别检测  $\alpha$ -SMA、collagen I、collagen III、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad4、Smad7 蛋白的表达。

### 1.5 Western blotting 检测蛋白表达

将蛋白样品上载于 10% SDS-PAGE 上, 恒压下进行电泳, 然后转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 90 min, 然后分别与  $\alpha$ -SMA、collagen I、collagen III、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad4、Smad7 和  $\beta$ -actin 一抗  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜。随后, 在室温下用荧光二抗孵育膜 1 h。每个目标蛋

白的相对比值用  $\beta$ -actin 进行测定, 并使用 Odyssey 红外成像系统和 Image J 3.0 软件进行分析。

### 1.6 统计学分析

数据以至少 3 个独立试验的  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用单因素方差分析和事后最小显著性差异检验,  $P < 0.05$  表示组间存在显著性差异。采用 Graph Pad Prism 5 软件作图, SPSS 25.0 软件进行数据分析统计。

## 2 结果

### 2.1 pcDNA3.1(+)-TGF- $\beta$ 1 转染 CFs 对 TGF- $\beta$ 1 蛋白的表达和释放的影响

ELISA 结果显示, 真核表达载体 pcDNA3.1(+)-TGF- $\beta$ 1 转染 CFs 24 h 后, 模型组和溶媒组细胞培养上清中 TGF- $\beta$ 1 水平较对照组明显升高 ( $P < 0.01$ ), 10 和  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  蛇床子素处理后细胞上清中 TGF- $\beta$ 1 的水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 结果见图 1。

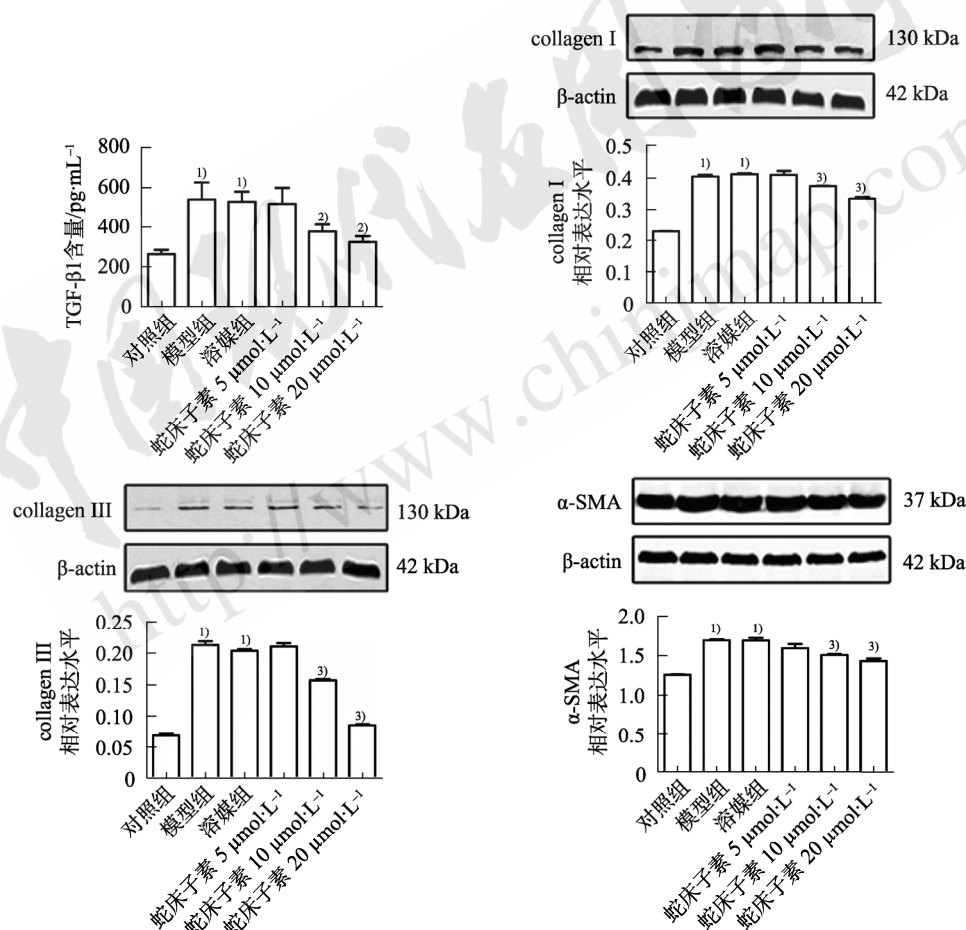


图 1 蛇床子素对转染后 CFs 上清 TGF- $\beta$ 1 含量及细胞内  $\alpha$ -SMA、collagen I 和 collagen III 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ ) 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组相比, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

Fig. 1 Effect of osthole on the expression of TGF- $\beta$ 1 and intracellular  $\alpha$ -SMA, collagen I and collagen III proteins in CFs supernatant after transfection ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Compared with the control group, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; compared with the model group, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ .

## 2.2 蛇床子素可降低转染后 CFs 上清 TGF- $\beta$ 1 含量及细胞内 $\alpha$ -SMA、collagen I、collagen III 和 p-Smad2/3 蛋白的表达

模型组和溶媒组细胞内  $\alpha$ -SMA 及胶原蛋白 collagen I 和 collagen III 表达均高于对照组 ( $P<0.01$ )。5~20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  蛇床子素处理 24 h 后, 这些指标随蛇床子素浓度的增加而逐渐降低, 特别是 10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  蛇床子素组差异有统计学意义 ( $P<0.01$ ), 结果见图 1。此外, p-Smad2/3 蛋白在转染后的 CFs 中表达量呈剂量依赖性降低 ( $P<0.01$ ), 结果见图 2。

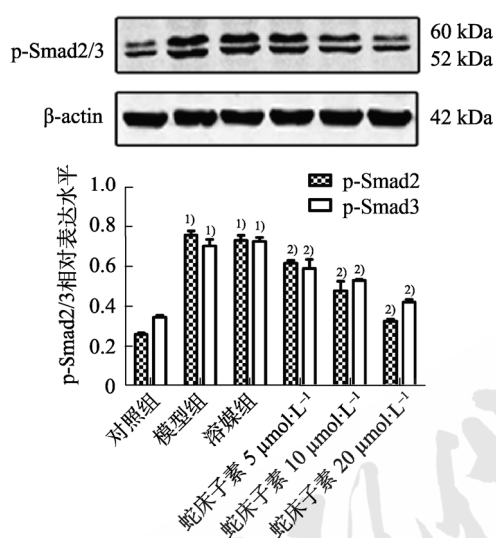


图 2 蛇床子素对转染后 CFs 细胞内 p-Smad2/3 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

与对照组相比, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组相比, <sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

Fig. 2 Effect of osthole on p-Smad2/3 protein expression in transfected CFs cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Compared with the control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with the model group, <sup>2)</sup> $P<0.01$ .

## 2.3 TGF- $\beta$ 1 受体抑制剂 SB431542 增强了蛇床子素对转染 CFs 后 $\alpha$ -SMA、collagen I 和 collagen III 蛋白表达的抑制作用

转染 CFs 后细胞内  $\alpha$ -SMA、collagen I 及 collagen III 蛋白的表达较对照组显著升高 ( $P<0.01$ )。在蛇床子素处理后, 观察到  $\alpha$ -SMA、collagen I 及 collagen III 蛋白的表达下降 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。经抑制剂 SB431542 单独处理后, 与模型组相比,  $\alpha$ -SMA、collagen I 及 collagen III 蛋白表达无明显差异。转染后的 CFs 经抑制剂 SB431542 预处理 2 h, 再经蛇床子素处理后, 这些蛋白的表达进一步降低 ( $P<0.01$ ), 结果见图 3。

## 2.4 TGF- $\beta$ 1 受体抑制剂 SB431542 增强了蛇床子素对转染后 CFs 中 Smad2/3、p-Smad2/3、Smad4 和 Smad7 蛋白表达的影响

转染 CFs 后, 细胞内 Smad2/3、p-Smad2/3 和 Smad4 蛋白表达较对照组升高 ( $P<0.01$ ), 而细胞内 Smad7 蛋白表达降低 ( $P<0.01$ )。经蛇床子素处理后, 观察到 Smad2/3、p-Smad2/3 和 Smad4 蛋白表达量下降 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), Smad7 蛋白表达量增加 ( $P<0.01$ )。单独使用抑制剂 SB431542 处理后, 与模型组相比 Smad2/3 和 p-Smad2/3 的蛋白表达量降低 ( $P<0.01$ ), 而 Smad4 和 Smad7 的蛋白量无明显变化。转染的 CFs 经 SB431542 预处理 2 h, 再经蛇床子素处理后 Smad2/3、p-Smad2/3 和 Smad4 蛋白表达量进一步下降 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。而经 SB431542 预处理后, 与模型组相比 Smad7 蛋白的表达没有受到影响。结果见图 4。

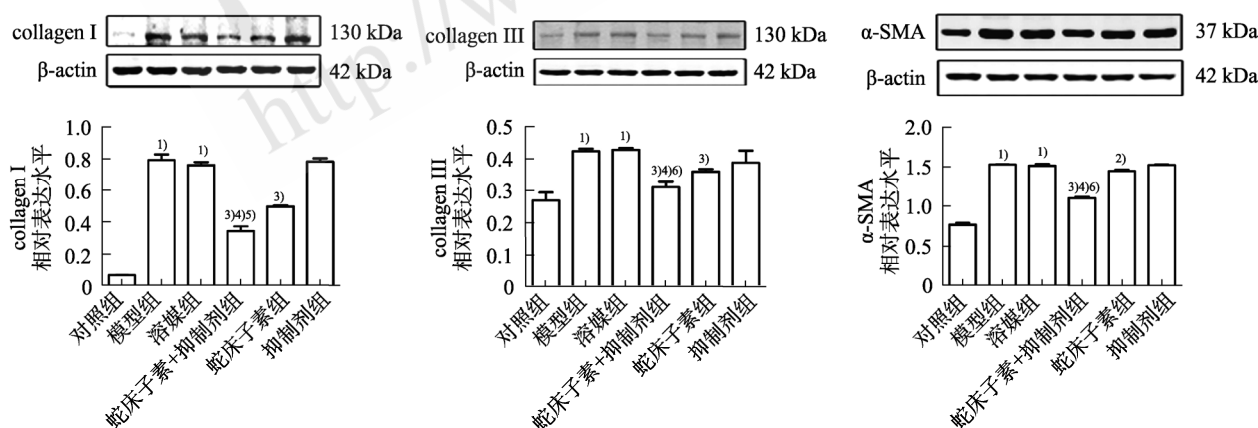


图 3 TGF- $\beta$ 1 受体抑制剂 SB431542 对转染后 CFs 细胞内  $\alpha$ -SMA、collagen I 和 collagen III 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

与对照组相比, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组相比, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$ ; 与蛇床子素组相比, <sup>4)</sup> $P<0.01$ ; 与抑制剂组相比, <sup>5)</sup> $P<0.05$ , <sup>6)</sup> $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effects of TGF- $\beta$ 1 receptor inhibitor SB431542 on  $\alpha$ -SMA, collagen I and collagen III protein expression in transfected CFs cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$ ; compared with osthole group, <sup>4)</sup> $P<0.01$ ; compared with inhibitor group, <sup>5)</sup> $P<0.05$ , <sup>6)</sup> $P<0.01$ .

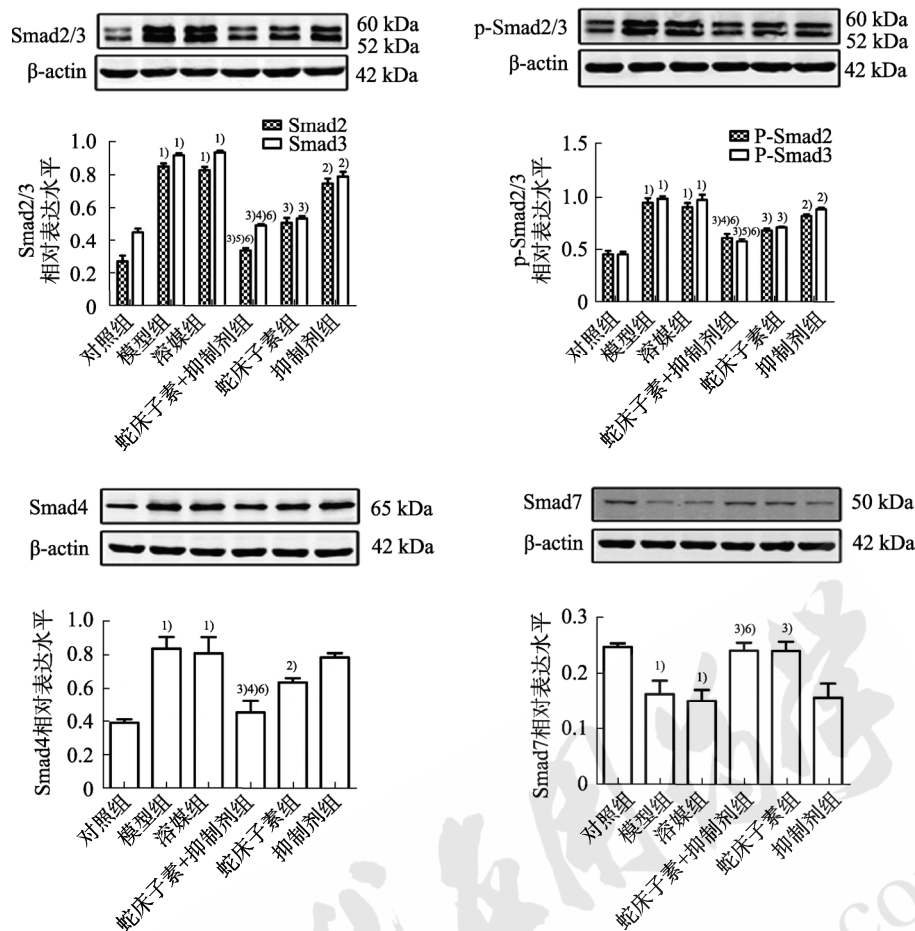


图4 TGF- $\beta$ 1受体抑制剂SB431542对转染后CFs细胞内Smad2/3、p-Smad2/3、Smad4和Smad7蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

与对照组相比, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组相比, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$ ; 与蛇床子素组相比, <sup>4)</sup> $P<0.05$ , <sup>5)</sup> $P<0.01$ ; 与抑制剂组相比, <sup>6)</sup> $P<0.01$ 。

**Fig. 4** Effects of TGF- $\beta$ 1 receptor inhibitor SB431542 on the expression of Smad2/3, p-Smad2/3, Smad4, and Smad7 proteins in transfected CFs cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$ ; compared with osthole group, <sup>4)</sup> $P<0.05$ , <sup>5)</sup> $P<0.01$ ; compared with inhibitor group, <sup>6)</sup> $P<0.01$ .

### 3 讨论

心肌纤维化的主要特征是ECM过度沉积和胶原蛋白水平增加。ECM过度沉积可加速合成 $\alpha$ -SMA<sup>[4,21]</sup>,表明成纤维细胞分化成肌成纤维细胞<sup>[22]</sup>。TGF- $\beta$ 1是促纤维化因子之一,在心肌纤维化过程中起重要作用,可诱导CFs分化,刺激胶原合成<sup>[23]</sup>。先前的研究表明,蛇床子素对器官纤维化(包括肾纤维化、肝纤维化、肺纤维化以及心肌纤维化)具有保护作用,这些研究主要与TGF- $\beta$ 的调控有关<sup>[19,24-26]</sup>。

本实验结果显示,转染pcDNA3.1(+)-TGF- $\beta$ 1后,上清中TGF- $\beta$ 1含量增加,说明TGF- $\beta$ 1过表达的细胞模型建立成功。重要的是,研究发现经蛇床子素处理后,转染的CFs中TGF- $\beta$ 1的表达和释放显著降低。TGF- $\beta$ 1过表达的CFs可明显提

高 $\alpha$ -SMA、collagen I和collagen III的表达水平,提示CFs向肌成纤维细胞分化。与先前的研究结果一致<sup>[27]</sup>,蛇床子素可降低由TGF- $\beta$ 1过表达引起的相关纤维化指标,发现经蛇床子处理后,转染的CFs中 $\alpha$ -SMA、collagen I和collagen III的表达水平显著降低,提示蛇床子素可能具有抗纤维化作用。

作为TGF- $\beta$ 1的关键下游调控因子,Smad信号通路被认为是进展性组织纤维化的主要途径<sup>[28]</sup>。大量研究表明,TGF- $\beta$ 1/Smad通路的失调可能是组织纤维化不可或缺的机制,而Smad3和Smad4促进了TGF- $\beta$ 1介导的组织纤维化<sup>[29]</sup>。TGF- $\beta$ 1首先与细胞膜上的跨膜受体T $\beta$ R结合,然后触发T $\beta$ RI和T $\beta$ RII相互作用,导致Smad2、Smad3磷酸化,这一步在激活Smad信号通路中起重要作用,这2

种蛋白质进一步与 Smad4 结合<sup>[30]</sup>。Smad7 是一种胞内抑制剂,通过与 Smad2 和 Smad3 竞争结合激活 T $\beta$ R,负调控 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路<sup>[31]</sup>。本实验结果表明,蛇床子素作用后 TGF- $\beta$ 1 的产生和 p-Smad2/3 蛋白表达降低。因此,推测蛇床子素抗纤维化作用的潜在机制可能与抑制 TGF- $\beta$ 1 的产生和 Smad 信号通路有关。

本研究使用特异性 TGF- $\beta$ 1 受体抑制剂 SB431542,为了进一步确认蛇床子素抗纤维化机制是否与 TGF- $\beta$ 1 介导的 Smad 信号通路有关。结果显示, TGF- $\beta$ 1 转染后, Smad2/3、p-Smad2/3、Smad4 蛋白表达增加, Smad7 蛋白表达减少。蛇床子素可逆转这些蛋白的表达,提示蛇床子素可能通过抑制 Smad 信号通路来发挥其抗纤维化的作用。先前的研究报道,经 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta$ 1 受体抑制剂 SB431542 单独处理后,  $\alpha$ -SMA、collagen I、Smad4、Smad2/3 和 p-Smad2/3 的蛋白表达量无明显变化<sup>[32-33]</sup>。在本研究中,经 SB431542 单独处理后,  $\alpha$ -SMA、collagen I、collagen III、Smad4 和 Smad7 的蛋白表达量无显著性变化,而 Smad2/3 和 p-Smad2/3 的蛋白表达显著降低,可能是由于单独使用 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SB431542 处理未达到使这些指标都产生显著变化的剂量。而经 SB431542 预处理后,蛇床子素减少 Smad2/3、p-Smad2/3 和 Smad4 蛋白表达的作用进一步增强,提示 TGF- $\beta$ 1 受体抑制剂可能协同增强了蛇床子素对 Smad 信号通路的抑制作用,进一步证实了蛇床子素抗纤维化机制可能与 TGF- $\beta$ 1 介导的 Smad 信号通路有关。但 TGF- $\beta$ 1 受体抑制剂预处理后 Smad7 蛋白表达未见进一步增加,可能是由于蛇床子素诱导 Smad7 蛋白表达增加到对照水平。

综上所述,蛇床子可通过抑制 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路降低  $\alpha$ -SMA、collagen I 和 collagen III 蛋白的表达,这为了解蛇床子素抗纤维化的分子机制提供了更详细的信息,也为心肌纤维化的预防和治疗提供了新的思路。

## REFERENCES

[1] ZHANG X Q, QU H Y, YANG T, et al. Regulation and functions of NLRP3 inflammasome in cardiac fibrosis: Current knowledge and clinical significance[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021(143): 112219.

[2] TALLQUIST M D. Cardiac fibroblast diversity[J]. *Annu Rev Physiol*, 2020(82): 63-78.

[3] XU P L, LIN X, FENG X H. Posttranslational regulation of smads[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(12): a022087.

[4] LIU Y, GAO L, ZHAO X Y, et al. Saikosaponin A protects from pressure overload-induced cardiac fibrosis via inhibiting fibroblast activation or endothelial cell EndMT[J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(13): 1923-1934.

[5] JIANG Y L, ZHOU X F, HU R C, et al. TGF- $\beta$ 1-induced SMAD2/3/4 activation promotes RELM- $\beta$  transcription to modulate the endothelium-mesenchymal transition in human endothelial cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018(105): 52-60.

[6] DOBACZEWSKI M, CHEN W, FRANGOIANNIS N G. Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  signaling in cardiac remodeling[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51(4): 600-606.

[7] MENG X M, NIKOLIC-PATERSON D J, LAN H Y. TGF- $\beta$ : The master regulator of fibrosis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(6): 325-338.

[8] NICKEL J, TEN DIJKE P, MUELLER T D. TGF- $\beta$  family co-receptor function and signaling[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2018, 50(1): 12-36.

[9] SUN Q Z, FANG L, TANG X M, et al. TGF- $\beta$  upregulated mitochondria mass through the SMAD2/3 $\rightarrow$ C/EB $\beta$  $\rightarrow$ PRMT1 signal pathway in primary human lung fibroblasts[J]. *J Immunol*, 2019, 202(1): 37-47.

[10] CHEN L, YANG T, LU D W, et al. Central role of dysregulation of TGF- $\beta$ /Smad in CKD progression and potential targets of its treatment[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018(101): 670-681.

[11] LUO B H, HE Z Y, HUANG S J, et al. Long non-coding RNA 554 promotes cardiac fibrosis via TGF- $\beta$ 1 pathway in mice following myocardial infarction[J]. *Front Pharmacol*, 2020(11): 585680.

[12] HU H H, CHEN D Q, WANG Y N, et al. New insights into TGF- $\beta$ /Smad signaling in tissue fibrosis[J]. *Chem Biol Interact*, 2018(292): 76-83.

[13] XU X M, ZHANG M L, ZHANG Y, et al. Osthole induces lung cancer cell apoptosis through inhibition of inhibitor of apoptosis family proteins[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(5): 3779-3784.

[14] LEE W H, WU H H, HUANG W J, et al. N-hydroxycinnamide derivatives of osthole ameliorate hyperglycemia through activation of AMPK and p38 MAPK[J]. *Molecules*, 2015, 20(3): 4516-4529.

[15] QI Z G, ZHAO X, ZHONG W, et al. Osthole improves glucose and lipid metabolism via modulation of PPAR $\alpha$ / $\gamma$ -mediated target gene expression in liver, adipose tissue, and skeletal muscle in fatty liver rats[J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(5): 882-888.

[16] NAM H H, JUN D W, JEON H J, et al. Osthol attenuates hepatic steatosis via decreased triglyceride synthesis not by insulin resistance[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(33): 11753-11761.

- [17] ZHANG Z R, LEUNG W N, LI G, et al. Osthole promotes endochondral ossification and accelerates fracture healing in mice[J]. *Calcif Tissue Int*, 2016, 99(6): 649-660.
- [18] ZHANG Z R, LEUNG W N, CHEUNG H Y, et al. Osthole: A review on its bioactivities, pharmacological properties, and potential as alternative medicine[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015(2015): 919616.
- [19] CHEN R, XUE J, XIE M L. Reduction of isoprenaline-induced myocardial TGF- $\beta$ 1 expression and fibrosis in osthole-treated mice[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 256(2): 168-173.
- [20] FANG M, WANG J H, LI S L, et al. Advanced glycation end-products accelerate the cardiac aging process through the receptor for advanced glycation end-products/transforming growth factor- $\beta$ -Smad signaling pathway in cardiac fibroblasts[J]. *Geriatr Gerontol Int*, 2016, 16(4): 522-527.
- [21] LIU J C, ZHOU L, WANG F, et al. Osthole decreases collagen I/III contents and their ratio in TGF- $\beta$ 1-overexpressed mouse cardiac fibroblasts through regulating the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway[J]. *Chin J Nat Med*, 2018, 16(5): 321-329.
- [22] SARRAZY V, KOEHLER A, CHOW M L, et al. Integrins  $\alpha$ v $\beta$ 5 and  $\alpha$ v $\beta$ 3 promote latent TGF- $\beta$ 1 activation by human cardiac fibroblast contraction[J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 102(3): 407-417.
- [23] CUI L, WANG Y P, YU R, et al. Jia-Shen Decoction-mediated serum inhibits angiotensin-II induced cardiac fibroblast proliferation via the TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(2): 1610-1616.
- [24] WU F, ZHAO Y, SHAO Q Q, et al. Ameliorative effects of osthole on experimental renal fibrosis *in vivo* and *in vitro* by inhibiting IL-11/ERK1/2 signaling[J]. *Front Pharmacol*, 2021(12): 646331.
- [25] LIU Y W, CHIU Y T, FU S L, et al. Osthole ameliorates hepatic fibrosis and inhibits hepatic stellate cell activation[J]. *J Biomed Sci*, 2015, 22(1): 63.
- [26] FANG L J, WANG W, CHEN J Z, et al. Osthole attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by modulating NADPH oxidase 4-derived oxidative stress in mice[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021(2021): 3309944.
- [27] LIU J C, WANG F, XIE M L, et al. Osthole inhibits the expressions of collagen I and III through Smad signaling pathway after treatment with TGF- $\beta$ 1 in mouse cardiac fibroblasts[J]. *Int J Cardiol*, 2017(228): 388-393.
- [28] CHEN D Q, FENG Y L, CAO G, et al. Natural products as a source for antifibrosis therapy[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2018, 39(11): 937-952.
- [29] LIN Y C, LUO H Y, LIU H F, et al. Anti-fibrotic mechanism of *Sedum sarmentosum* total flavanones in inhibiting activation of HSC by regulating Smads[J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2020, 45(3): 631-635.
- [30] CHEN K J, LI Q, WEN C M, et al. Bleomycin (BLM) induces epithelial-to-mesenchymal transition in cultured A549 cells via the TGF- $\beta$ /smad signaling pathway[J]. *J Cancer*, 2016, 7(11): 1557-1564.
- [31] ARNOTT J A, ZHANG X, SANJAY A, et al. Molecular requirements for induction of CTGF expression by TGF- $\beta$ 1 in primary osteoblasts[J]. *Bone*, 2008, 42(5): 871-885.
- [32] CHANG X H, TIAN M M, ZHANG Q, et al. Nano nickel oxide promotes epithelial-mesenchymal transition through transforming growth factor  $\beta$ 1/smads signaling pathway in A549 cells[J]. *Environ Toxicol*, 2020, 35(12): 1308-1317.
- [33] TIAN Y B, WANG N X, XU Y, et al. Hyaluronic acid ameliorates the proliferative ability of human amniotic epithelial cells through activation of TGF- $\beta$ /BMP signaling[J]. *PeerJ*, 2020(8): e10104.

收稿日期: 2021-12-25

(本文责编: 沈倩)