

论著 DOI: 10.16369/j.oh.er.issn.1007-1326.2024.03.003

·专稿:化学中毒卫生应急新技术·

结缔组织生长因子介导的 PI3K/Akt 和 RhoA/ROCK 信号通路在百草枯中毒致肺泡上皮细胞间充质化的作用

苏艺伟^{1,2}, 李广珍³, 方文馨³, 唐侍豪^{1,2}, 王致^{1,2}

1. 广州市第十二人民医院(广州市职业病防治院), 广东 广州 510620; 2. 广州医科大学职业与环境卫生研究所, 广东 广州 511436; 3. 暨南大学基础医学与公共卫生学院, 广东 广州 510632

摘要:目的 探讨结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)与 PI3K/Akt、RhoA/ROCK 信号通路在百草枯(paraquat, PQ)中毒致肺泡上皮细胞间充质化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)中的作用机制。方法 将 RLE-6TN 细胞分成 4 组,分别为对照组、PQ 组、无关质粒组和干扰质粒组,干扰质粒组细胞转染含对 CTGF 具有高抑制效应的 CTGF-shRNA 质粒,无关质粒组转染对 CTGF 无干扰效应的质粒,检测分析各组细胞 PI3K/Akt 和 RhoA/ROCK 信号通路及 EMT 相关分子 mRNA 和蛋白的表达;为进一步阐明两条信号通路在 PQ 中毒致 RLE-6TN 细胞 EMT 中的作用关系,将 RLE-6TN 细胞分成 5 组,分别为对照组、PQ 组、PI3K 抑制组、RhoA 抑制组、联合抑制组,检测分析各组细胞 EMT 相关分子 mRNA 及蛋白的表达情况。结果 特异性抑制 CTGF 的表达后,干扰质粒组细胞 CTGF、PI3K、Akt、RhoA、ROCK mRNA 及蛋白的表达量较 PQ 组和无关质粒组降低($P < 0.05/6$);进一步检测 RLE-6TN 细胞 EMT 相关分子表达情况,结果显示,与 PQ 组和无关质粒组相比,干扰质粒组细胞 E-cadherin mRNA 和蛋白表达量升高, α -SMA mRNA 和蛋白表达量降低($P < 0.05/6$)。利用特异性抑制剂阻断信号通路活性后,与 PQ 组相比,PI3K 抑制组、RhoA 抑制组、联合抑制组细胞 α -SMA mRNA 和蛋白表达量降低($P < 0.05/10$),而 E-cadherin mRNA 和蛋白表达量升高($P < 0.05/10$);与 PI3K 抑制组和 RhoA 抑制组相比,联合组细胞 E-cadherin 蛋白表达量升高($P < 0.05/10$), α -SMA 蛋白表达量降低($P < 0.05/10$)。结论 CTGF 可通过激活 PI3K/Akt 和 RhoA/ROCK 信号通路,促进 PQ 致肺泡上皮细胞 EMT 过程,且 PI3K/Akt 通路和 RhoA/ROCK 通路在 PQ 致肺泡上皮细胞 EMT 中具有协同作用。

关键词:百草枯;肺泡上皮细胞;间充质化;结缔组织生长因子

中图分类号: R135;S884.9⁺;R563

文献标志码: A

文章编号: 1007-1326(2024)03-0295-07

引用: 苏艺伟,李广珍,方文馨,等. 结缔组织生长因子介导的 PI3K/Akt 和 RhoA/ROCK 信号通路在百草枯中毒致肺泡上皮细胞间充质化的作用[J]. 职业卫生与应急救援, 2024, 42(3): 295-301.

CTGF-mediated PI3K/Akt and RhoA/ROCK signaling pathways in alveolar epithelial-mesenchymal transition caused by paraquat poisoning

SU Yiwei^{1,2}, LI Guangzhen³, FANG Wenxin³, TANG Shihao^{1,2}, WANG Zhi^{1,2} (1. Guangzhou Twelfth People's Hospital, Guangzhou Occupational Disease Prevention and Treatment Hospital, Guangzhou, Guangdong 510620, China; 2. Institute of Occupational and Environmental Health, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 511436, China; 3. School of Basic Medicine and Public Health, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of connective tissue growth factor (CTGF) and PI3K/Akt, RhoA/ROCK signaling pathways in alveolar epithelial-mesenchymal transition (EMT) caused by paraquat (PQ) poisoning. **Methods** RLE-6TN cells were divided into four groups, namely the control group, PQ group, irrelevant plasmid group, and interfering plasmid group. Cells in the interfering plasmid group were transfected with CTGF-shRNA plasmid, while those in the irrelevant plasmid group were transfected with plasmid that had no interfering effect on CTGF. The expression of the mRNAs and proteins of the PI3K/Akt and RhoA/ROCK signaling pathways and the molecules related to EMT were detected and analyzed. In order to further elucidate the relationship between the roles of the two signaling pathways in

基金项目:广东省基础与应用基础研究基金联合基金项目(2021A1515110663);广州市校(院)企联合资助项目(2023A03J0977);广州市科学技术局重点研发计划项目(202206010061)

作者简介: 苏艺伟(1988—),男,硕士,副主任医师

通信作者: 王致,主任医师, E-mail: zhi_wang@outlook.com

EMT in RLE-6TN cells caused by PQ poisoning, RLE-6TN cells were divided into five groups, namely the control group, PQ group, PI3K inhibition group, RhoA inhibition group, and co-inhibition group. The expression of EMT-related molecules, mRNAs, and proteins in the cells in each group was detected and analyzed. **Results** After specific inhibition of CTGF expression, the expression of CTGF, PI3K, Akt, RhoA, and ROCK mRNAs and proteins in the cells of the interfering plasmid group was reduced compared with those of the PQ group and the irrelevant plasmid group ($P < 0.05/6$). The examination of the expression of EMT-related molecules in RLE-6TN cells showed that E-cadherin mRNA and protein expression were elevated and α -SMA mRNA and protein expression were decreased in cells in the interfering plasmid group, compared with the PQ group and the irrelevant plasmid group ($P < 0.05/6$). After blocking the signaling pathway activity using specific inhibitors, the cellular α -SMA mRNA and protein expression were decreased in the PI3K-inhibited, RhoA-inhibited, and combined-inhibited groups compared with the PQ group ($P < 0.05/10$), whereas the E-cadherin mRNA and protein expression were elevated ($P < 0.05/10$). Compared with the PI3K-inhibited and RhoA-inhibited groups, cellular E-cadherin protein expression was elevated ($P < 0.05/10$) and α -SMA protein expression was decreased ($P < 0.05/10$) in the combined treatment group. **Conclusions** CTGF can promote the process of PQ-induced EMT in alveolar epithelial cells by activating the PI3K/Akt and RhoA/ROCK signaling pathways, and the PI3K/Akt pathway and the RhoA/ROCK pathway have synergistic roles in PQ-induced EMT in alveolar epithelial cells.

Keywords: paraquat; alveolar epithelial cell; epithelial-mesenchymal transition; connective tissue growth factor

百草枯(paraquat, PQ)属于高效能除草剂,广泛运用于农业生产,是全球第二大常用除草剂^[1]。PQ自1962年进入市场后,全球每年约有20万~30万急性PQ中毒病例。由于缺乏特效解毒剂和有效治疗方法,中毒致死率高达60%以上,成为了亚洲和太平洋沿岸农村地区中毒死亡的主要原因^[2]。虽然我国于2020年9月停止了PQ在国内的销售和使用,但市场上仍存在贴标或混有PQ成分的除草剂,在临床上急性PQ中毒患者仍然屡见不鲜^[3-4]。肺是PQ中毒的主要靶器官,中毒急性期诱发的呼吸功能衰竭及晚期触发的不可逆性肺纤维化是PQ中毒致死的主要原因^[5]。有研究^[6]发现,肺泡上皮细胞受PQ攻击后,各种与纤维化相关的细胞因子组成复杂而庞大的网络被激活,信号转导在其中起关键作用,但其具体机制目前仍未阐明。有研究^[7]发现,肺纤维化患者的肺泡上皮细胞同时表达上皮细胞标志物E-钙黏蛋白(E-cadherin)和间质细胞标志物 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA),通过转基因小鼠证实发生上皮间充质化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的肺泡上皮细胞是纤维化病灶中间质细胞的主要来源之一,肺泡上皮细胞EMT改变是肺纤维化的关键过程。因此,本研究拟通过构建肺泡上皮细胞EMT体外模型,借助shRNA干扰技术和通路特异性抑制剂,探索结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)介导的PI3K/Akt和RhoA/ROCK两条信号通路在PQ中毒致肺泡上皮细胞EMT中的作用机制,为进一步探讨PQ中毒致肺泡上皮细胞EMT作用机制、寻找有效干预肺纤维化疾病的分子靶标提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与试剂

百草枯(国家农药质量监督检验中心,质量分数95%以上);II型肺泡上皮细胞RLE-6TN细胞系(河南省工业微生物菌种工程技术研究中心);PI3K抑制剂LY294002(MCE公司,美国);RhoA抑制剂CCG-1423(MCE公司,美国);Lipofectamine 3000转染试剂盒(Thermo Fisher Scientific公司,美国);DMEM高糖细胞培养基(Gibco公司,美国);胎牛血清(Gibco公司,美国);青霉素链霉素混合液(Gibco公司,美国);RNAiso Plus(TaKaRa公司,中国);总蛋白抽提试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,中国);BCA蛋白定量试剂盒(Thermo Fisher Scientific公司,美国);E-cadherin抗体、 α -SMA抗体、PI3K抗体、Akt抗体、RhoA抗体、ROCK抗体均购置于中国Proteintech公司,CTGF抗体(Abcam公司,美国),二抗HRP-山羊抗兔IgG(Jackson Immuno Research公司,美国);ECL显色试剂盒(Thermo Fisher Scientific公司,美国)。

1.1.2 仪器

高速冷冻离心机(湖南可成仪器设备有限公司,中国),超声破碎仪(上海新芝生物技术研究所以,中国),FR200型紫外可见分析仪(上海复日科技有限公司,中国),ABI 3900型高通量DNA合成仪(Thermo Fisher Scientific公司,美国),凝胶成像系统(中国杭州朗基科学仪器有限公司,中国),Step One qPCR仪(Applied Biosystems公司,美国),转移电泳仪(北京市六一仪器厂,中国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将 RLE-6TN 细胞培养于 DMEM 高糖细胞培养基(含质量分数 10% 的胎牛血清),同时加入质量分数 1% 的青霉素链霉素混合液,置于 37 ℃、体积分数 5% 的 CO₂ 细胞培养箱中,恒温恒湿培养 24 h,待细胞融合至 80% 后,使用质量分数 0.25% 的胰蛋白酶进行消化、传代,观察细胞形态,取对数生长期的细胞开展实验研究。

1.2.2 细胞分组及干预

为探讨特异性抑制肺泡上皮细胞 CTGF 表达后的 PI3K/Akt 及 RhoA/ROCK 通路活性变化,本实验取对数生长期的 RLE-6TN 细胞,分成 4 组,每组重复 3 次,分别为对照组、PQ 组、无关质粒组、干扰质粒组。细胞培养 24 h 后,无关质粒组在 PQ 染毒前转染对 CTGF 无抑制效应的质粒,干扰质粒组转染对 CTGF 具有高抑制效应的含 CTGF-shRNA 质粒,转染 2 h 后,PQ 组、无关质粒组、干扰质粒组分别加入 200 μmol/L PQ 溶液^[8],对照组加入等量 DMEM 高糖细胞培养基。细胞继续培养 48 h 后,观察各组细胞形态改变,并检测各组细胞两条信号通路相关分子、CTGF 及 EMT 相关分子表达变化情况。

为进一步研究单独阻断或联合阻断 PI3K/Akt、RhoA/ROCK 通路后,肺泡上皮细胞 EMT 相关分子变化情况,本实验取对数生长期的 RLE-6TN 细胞,分成 5 组,分别为对照组、PQ 组、PI3K 抑制组、RhoA 抑制组、联合抑制组,细胞培养 24 h 后进行相应干预处理,PQ 组加入 200 μmol/L PQ 溶液,PI3K 抑制组加入 200 μmol/L PQ 溶液 + 20 μmol/L PI3K 抑制剂 LY294002 溶液,RhoA 抑制组加入 200 μmol/L PQ 溶液 + 10 μmol/L RhoA 抑制剂 CCG-1423 溶液,联合抑制组加入 200 μmol/L PQ 溶液 + 20 μmol/L PI3K 抑制剂 LY294002 溶液 + 10 μmol/L RhoA 抑制剂 CCG-1423 溶液,对照组加入等量 DMEM 高糖细胞培养液,细胞继续培养 48 h 后,观察各组细胞形态,并检测细胞 EMT 相关分子表达变化情况。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测细胞各分子 mRNA 表达

各组细胞干预 48 h 后,舍去上层细胞培养基,于 4 ℃ 的磷酸盐缓冲液(phosphate balanced solution, PBS)轻柔清洗 2 次,使用 RNAiso Plus 提取细胞总 RNA,凝胶成像系统检验抽提 RNA 的完整性。利用抽提的总 RNA 逆转录合成 cDNA,并进行 PCR 扩增反应。以 β-actin 作为参照基因,根据每个反应的循环数阈值(cycle threshold values, Ct 值),使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$

标准方法计算各实验组细胞相应分子 mRNA 的表达水平。

1.2.4 蛋白免疫印记(Western Blot)检测细胞各分子蛋白表达情况

各组 RLE-6TN 细胞干预后 48 h,舍去上层细胞培养基,4 ℃ PBS 轻柔清洗 2 次,加入预冷的细胞裂解液,提取细胞总蛋白,应用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。使用预制胶,电泳分离蛋白,转膜,质量分数 5% 的脱脂奶粉室温封闭 2 h,与相应的特异性一抗共同孵育,4 ℃ 孵育过夜,PBS 洗膜,孵育二抗,室温孵育 2 h,使用 PBS 洗膜 3 次。使用 ECL 显色试剂盒结合凝胶成像系统进行显影成像,应用图像分析软件 Image J 测读各组细胞蛋白积分光密度,结合内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, GAPDH)进行标准化分析,以积分光密度描述各蛋白的相对表达量。

1.2.5 统计学分析

使用 SPSS 21.0 软件进行数据统计学分析。定量资料且符合正态分布的数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)描述;组间差异比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;进一步两两之间比较用 Bonferroni 法进行检验,以 $P < 0.05$ /比较次数为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 特异性抑制 CTGF 表达后 PI3K/Akt 及 RhoA/ROCK 通路活性情况

利用 shRNA 干扰技术,特异性抑制 RLE-6TN 细胞 CTGF 的表达,各组细胞 CTGF、PI3K、Akt、RhoA、ROCK mRNA 的相对表达量差异均有统计学意义($P < 0.01$);进一步两两比较的结果显示,干扰质粒组细胞 CTGF、PI3K、Akt、RhoA、ROCK mRNA 的相对表达量均较 PQ 组和无关质粒组降低,且差异有统计学意义($P < 0.05/6$)。见表 1。

采用 Western-Blot 法检测各组细胞蛋白表达情况,结果显示,各组细胞 CTGF、PI3K、Akt、RhoA、ROCK 蛋白的相对表达量差异均有统计学意义($P < 0.01$);进一步两两比较的结果显示,与 PQ 组和无关质粒组相比,干扰质粒组细胞 CTGF、PI3K、Akt、RhoA、ROCK 蛋白的相对表达量均降低,且差异有统计学意义($P < 0.05/6$)。见图 1 及表 2。

2.2 特异性抑制 CTGF 表达后肺泡上皮细胞 EMT 相关分子表达情况

特异性抑制 CTGF 表达后,各组细胞 CTGF、E-Cadherin、α-SMA mRNA 的相对表达量差异均有统

表 1 抑制 CTGF 表达后,各组细胞 PI3K/Akt 及 RhoA/ROCK 信号分子 mRNA 相对表达情况

组别	CTGF	PI3K	Akt	RhoA	ROCK
对照组	1.01 ± 0.04	1.02 ± 0.02	1.02 ± 0.03	1.02 ± 0.03	1.00 ± 0.02
PQ 组	3.28 ± 0.11 ^①	5.26 ± 0.34 ^①	2.30 ± 0.17 ^①	2.77 ± 0.08 ^①	1.87 ± 0.08 ^①
无关质粒组	2.95 ± 0.17 ^①	4.96 ± 0.19 ^①	2.84 ± 0.19 ^{①②}	2.67 ± 0.03 ^①	1.94 ± 0.06 ^①
干扰质粒组	1.48 ± 0.08 ^{①②③}	1.75 ± 0.13 ^{②③}	1.45 ± 0.08 ^{②③}	1.33 ± 0.08 ^{①②③}	1.46 ± 0.09 ^{①②③}
F 值	303.64	339.89	112.42	706.45	125.86
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

注:①与对照组相比, $P < 0.05/6$;②与 PQ 组相比, $P < 0.05/6$;③与无关质粒组相比, $P < 0.05/6$ 。

表 2 抑制 CTGF 表达后,各组细胞 PI3K/Akt 和 RhoA/ROCK 通路蛋白表达情况

组别	CTGF	PI3K	Akt	RhoA	ROCK
对照组	0.39 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.56 ± 0.02	0.42 ± 0.03	0.24 ± 0.03
PQ 组	0.72 ± 0.03 ^①	0.28 ± 0.02 ^①	0.81 ± 0.03 ^①	0.77 ± 0.02 ^①	0.66 ± 0.03 ^①
无关质粒组	0.73 ± 0.02 ^①	0.33 ± 0.04 ^①	0.69 ± 0.02 ^{①②}	0.57 ± 0.03 ^{①②}	0.66 ± 0.03 ^①
干扰质粒组	0.39 ± 0.02 ^{②③}	0.23 ± 0.01 ^③	0.44 ± 0.03 ^{①②③}	0.30 ± 0.02 ^{①②③}	0.31 ± 0.03 ^{②③}
F 值	330.03	25.31	149.66	262.21	181.10
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

注:①与对照组相比, $P < 0.05/6$;②与 PQ 组相比, $P < 0.05/6$;③与无关质粒组相比, $P < 0.05/6$ 。

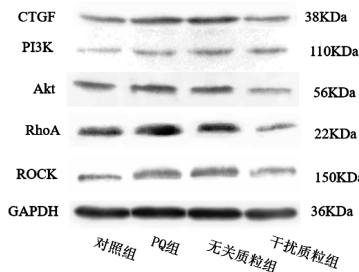


图 1 抑制 CTGF 表达后,各组细胞 PI3K/Akt 和 RhoA/ROCK 通路蛋白表达情况

计学意义($P < 0.01$);进一步两两比较,与 PQ 组和无关干扰质粒组相比,干扰质粒组细胞 E-cadherin mRNA 相对表达量升高,CTGF 和 α -SMA mRNA 相对表达量降低,且差异均有统计学意义($P < 0.05/6$)。见表 3。

表 3 抑制 CTGF 表达后,各组细胞 E-cadherin 及 α -SMA 分子 mRNA 相对表达情况

组别	CTGF	E-Cadherin	α -SMA
对照组	1.01 ± 0.04	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.02
PQ 组	3.28 ± 0.11 ^①	0.36 ± 0.05 ^①	4.62 ± 0.16 ^①
无关质粒组	2.95 ± 0.17 ^①	0.42 ± 0.06 ^①	4.10 ± 0.16 ^{①②}
干扰质粒组	1.48 ± 0.08 ^{①②③}	0.84 ± 0.06 ^{②③}	1.81 ± 0.06 ^{①②③}
F 值	303.64	122.17	649.29
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01

注:①与对照组相比, $P < 0.05/6$;②与 PQ 组相比, $P < 0.05/6$;③与无关质粒组相比, $P < 0.05/6$ 。

再检测各组细胞相关分子蛋白表达情况,结果显示,各组细胞 CTGF、E-Cadherin、 α -SMA 蛋白的相

对表达量差异均有统计学意义($P < 0.01$);进一步两两比较,干扰质粒组细胞的 E-cadherin 蛋白相对表达量均较 PQ 组和无关质粒组升高,而其 CTGF 和 α -SMA 蛋白相对表达量均较 PQ 组、无关质粒组降低,差异均有统计学意义($P < 0.05/6$)。见图 2 和表 4。

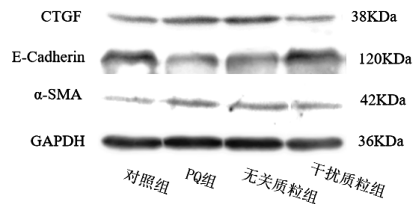


图 2 特异性抑制 CTGF 表达后各组细胞 E-cadherin 及 α -SMA 蛋白表达情况

表 4 特异性抑制 CTGF 表达后各组细胞 E-cadherin 及 α -SMA 蛋白表达情况

组别	CTGF	E-Cadherin	α -SMA
对照组	0.39 ± 0.02	1.17 ± 0.04	0.17 ± 0.02
PQ 组	0.72 ± 0.03 ^①	0.62 ± 0.03 ^①	0.38 ± 0.01 ^①
无关质粒组	0.73 ± 0.02 ^①	0.71 ± 0.03 ^①	0.42 ± 0.03 ^①
干扰质粒组	0.39 ± 0.02 ^{②③}	1.27 ± 0.03 ^{②③}	0.27 ± 0.02 ^{①②③}
F 值	330.03	307.92	75.99
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注:①与对照组相比, $P < 0.05/6$;②与 PQ 组相比, $P < 0.05/6$;③与无关质粒组相比, $P < 0.05/6$ 。

2.3 阻断信号通路后肺泡上皮细胞 EMT 相关分子表达情况

使用信号通路抑制剂分别阻断或联合阻断

PI3K/Akt 和 RhoA/ROCK 通路活性后, 各组细胞 PI3K、Akt、RhoA、ROCK、E-Cadherin、 α -SMA mRNA 相对表达量差异均有统计学意义($P < 0.01$); 进一步两两比较, 与 PQ 组相比, PI3K 抑制组的 PI3K、Akt、RhoA、 α -SMA mRNA 相对表达量均降低 ($P < 0.05/10$), 而 E-cadherin mRNA 相对表达量升高($P < 0.05/10$); RhoA 抑制组细胞 PI3K、RhoA、ROCK、 α -SMA mRNA 相对表达量均降低($P < 0.05/10$), 而 E-cadherin mRNA 相对表达量升高($P < 0.05/10$); 联合抑制组细胞的 PI3K、Akt、RhoA、ROCK、 α -SMA mRNA 相对表达量均降低 ($P < 0.05/10$), 而 E-cadherin mRNA 相对表达量升高 ($P < 0.05/10$)。与 PI3K 抑制相比, 联合抑制组的 E-cadherin mRNA 相对表达量升高, α -SMA mRNA 相对表达量呈降低趋势, 但差异无统计学意义($P > 0.05/10$); 与 RhoA 抑

制组相比, 联合抑制组细胞的 E-cadherin mRNA 相对表达量升高($P < 0.05/10$), 而 α -SMA mRNA 相对表达量降低($P < 0.05/10$)。见表 5。

再检测各组细胞 PI3K/Akt、RhoA/ROCK 通路活性及 EMT 相关分子蛋白表达情况, 结果显示, 各组细胞 PI3K、Akt、RhoA、ROCK、E-Cadherin、 α -SMA 蛋白的相对表达量差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 进一步两两比较, 与 PQ 组相比, PI3K 抑制组、RhoA 抑制组、联合抑制组细胞的 PI3K、Akt、RhoA、ROCK、 α -SMA 蛋白的表达量均降低 ($P < 0.05/10$), 而 E-cadherin 蛋白表达量均升高 ($P < 0.05/10$); 分别与 PI3K 抑制组和 RhoA 抑制组相比, 联合抑制组的 E-cadherin 蛋白表达量升高 ($P < 0.05/10$), 而 α -SMA 蛋白表达量降低 ($P < 0.05/10$)。见图 3 和表 6。

表 5 阻断信号通路活性后, 各组细胞通路及 EMT 相关分子 mRNA 相对表达情况

组别	PI3K	Akt	RhoA	ROCK	E-Cadherin	α -SMA
对照组	1.01 ± 0.02	1.00 ± 0.02	1.01 ± 0.01	1.01 ± 0.03	1.01 ± 0.03	1.01 ± 0.02
PQ 组	5.75 ± 0.38 ^①	2.11 ± 0.12 ^①	2.77 ± 0.08 ^①	2.00 ± 0.11 ^①	0.47 ± 0.06 ^①	5.76 ± 0.56 ^①
PI3K 抑制组	2.56 ± 0.12 ^{①②}	1.64 ± 0.12 ^{①②}	2.43 ± 0.04 ^{①②}	1.87 ± 0.07 ^①	0.87 ± 0.07 ^②	2.49 ± 0.11 ^{①②}
RhoA 抑制组	3.96 ± 0.16 ^{①②③}	2.06 ± 0.08 ^{①③}	1.75 ± 0.09 ^{①②③}	1.54 ± 0.12 ^{①②③}	0.73 ± 0.08 ^{①②}	3.05 ± 0.10 ^{①②}
联合抑制组	1.94 ± 0.08 ^{①②④}	1.15 ± 0.06 ^{②③④}	1.31 ± 0.05 ^{①②③④}	1.20 ± 0.03 ^{②③④}	0.99 ± 0.04 ^{②④}	1.84 ± 0.14 ^{②③④}
F 值	268.16	102.52	429.08	81.94	42.62	139.63
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

注: ①与对照组相比, $P < 0.05/10$; ②与 PQ 组相比, $P < 0.05/10$; ③与 PI3K 抑制组相比, $P < 0.05/10$; ④与 RhoA 抑制组相比, $P < 0.05/10$ 。

表 6 阻断信号通路后, 各组细胞信号通路及 EMT 相关分子蛋白表达情况

组别	PI3K	Akt	RhoA	ROCK	E-Cadherin	α -SMA
对照组	0.32 ± 0.02	0.64 ± 0.03	0.30 ± 0.02	0.31 ± 0.02	1.04 ± 0.05	0.26 ± 0.02
PQ 组	0.79 ± 0.05 ^①	0.97 ± 0.05 ^①	0.66 ± 0.02 ^①	0.56 ± 0.03 ^①	0.62 ± 0.04 ^①	0.52 ± 0.01 ^①
PI3K 抑制组	0.46 ± 0.04 ^{①②}	0.71 ± 0.03 ^②	0.47 ± 0.04 ^{①②}	0.44 ± 0.02 ^{①②}	0.83 ± 0.03 ^{①②}	0.36 ± 0.02 ^{①②}
RhoA 抑制组	0.38 ± 0.03 ^②	0.78 ± 0.03 ^{①②}	0.33 ± 0.02 ^{②③}	0.29 ± 0.02 ^{②③}	0.85 ± 0.03 ^{①②}	0.33 ± 0.01 ^{①②}
联合抑制组	0.24 ± 0.03 ^{②③④}	0.60 ± 0.02 ^{②④}	0.24 ± 0.02 ^{②③}	0.23 ± 0.02 ^{②③}	1.12 ± 0.05 ^{①②③④}	0.21 ± 0.02 ^{②③④}
F 值	142.30	68.64	164.68	127.03	73.82	164.01
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

注: ①与对照组相比, $P < 0.05/10$; ②与 PQ 组相比, $P < 0.05/10$; ③与 PI3K 抑制组相比, $P < 0.05/10$; ④与 RhoA 抑制组相比, $P < 0.05/10$ 。

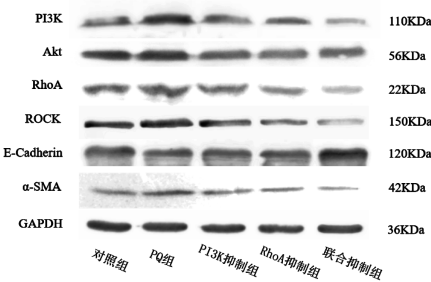


图 3 阻断信号通路后, 各组细胞信号通路及 EMT 相关分子蛋白表达情况

3 讨论

PQ 中毒是一种致死率极高的中毒性疾病, 也是发展中国家中毒死亡主要原因之一^[7-9]。随着科技水平的提高及医疗急救体系的成熟, 急性 PQ 中毒患者早期抢救存活率不断提高, 但后期出现进展性肺纤维化还是无法逆转^[10]。近年来, 随着对纤维化疾病机制研究的不断深入, 越来越多证据支持肺泡上皮细胞 EMT 改变是 PQ 致肺纤维化的重要过程^[7]。因此, 探讨急性 PQ 中毒致肺泡上皮细胞 EMT

机制,寻找逆转上皮细胞 EMT 的分子靶标,是高效治疗纤维化疾病,提升急性 PQ 中毒有效治疗率的关键。

EMT 是指上皮细胞进展性丢失上皮细胞表型,极性消失、黏附性减弱,细胞骨架重塑,逐渐表达间质细胞特征,获得迁移和分泌细胞外基质的能力,主要表现为低表达上皮细胞标志物 E-cadherin,高表达间质细胞标志物 α -SMA,即上皮细胞 EMT 程度越高,E-cadherin 表达量越低, α -SMA 表达量越高^[11]。本研究发现,在 PQ 致肺泡上皮细胞 EMT 模型中,细胞高表达 α -SMA 和 CTGF,低表达 E-cadherin。CTGF 具有介导细胞增殖、分化、黏附、迁移,促进细胞表型转化、调节细胞外基质合成等功能,被认为是肝纤维化的总开关,能直接促进肝细胞转分化为肌成纤维细胞,诱发肝纤维化^[12]。在 PQ 致大鼠肺纤维化模型中,PQ 组肺组织高表达 CTGF 及 α -SMA,低表达 E-cadherin,特异性抑制 CTGF 表达后,大鼠肺组织纤维化程度减轻,增加 E-cadherin 表达,降低 α -SMA 表达,CTGF 可促进 PQ 致肺泡上皮细胞 EMT 过程^[13]。该动物实验结果与本研究探讨 CTGF 在 PQ 致肺泡上皮细胞 EMT 作用的研究结果一致。其原因可能是 CTGF 是转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 的下游效应分子,而 TGF- β_1 被证实是体外较强的上皮细胞 EMT 诱导剂,可独立诱导上皮细胞 EMT 改变^[14]。本研究借助 CTGF-shRNA 特异性抑制 CTGF 表达,减轻了 PQ 致肺泡上皮细胞 EMT 程度。可见,CTGF 可能是上皮细胞 EMT 的关键分子靶标。

本研究发现,在 PQ 致肺泡上皮细胞 EMT 体外模型中,高表达 CTGF、PI3K、Akt、RhoA、ROCK 及间质细胞标志物 α -SMA,降低上皮细胞标志物 E-cadherin 的表达,表明在 PQ 致肺泡上皮细胞 EMT 过程中激活 PI3K/Akt 和 RhoA/ROCK 信号通路,信号通路的激活可能与 CTGF 表达有关。PI3K/Akt 信号通路的活化与细胞的增殖、存活、黏附、分化、细胞骨架重构等密切相关。有研究^[15-16]发现,CTGF 可通过 PI3K/Akt 信号通路,促进心肌细胞、肝星状细胞 EMT 改变,抑制 CTGF 表达,降低 PI3K/Akt 信号通路活性,能够逆转上皮细胞 EMT 改变,减轻纤维化程度。可见,CTGF 可激活 PI3K/Akt 通路,发挥促进上皮细胞 EMT 的作用。RhoA/ROCK 信号通路能够调控细胞增殖分化,参与组织修复再生,在组织器官纤维化过程中具有重要的作用。利用法舒地尔特异性抑制 RhoA/ROCK 信号通路活性,能够改善糖尿病大鼠肝肾纤维化程度,该机制与 CTGF 及肝

肾上皮细胞 EMT 改变密切相关,表明 CTGF 及 RhoA/ROCK 通路通过促进上皮细胞 EMT 改变,从而发挥促纤维化的作用^[17-18]。因此,CTGF 也可通过激活 RhoA/ROCK 通路,促进上皮细胞 EMT 改变。为进一步验证 CTGF 与两条信号通路在 PQ 致肺泡上皮细胞 EMT 中的关系,本研究使用 CTGF-shRNA 抑制 CTGF 表达,有效降低了 PI3K/Akt 及 RhoA/ROCK 信号通路活性,逆转肺泡上皮细胞 EMT 作用,表明 CTGF 介导的 PI3K/Akt 及 RhoA/ROCK 信号通路参与 PQ 所致肺泡上皮细胞 EMT 的过程。

本研究发现,PI3K/Akt 及 RhoA/ROCK 信号通路在 PQ 致肺泡上皮细胞 EMT 体外模型中高度激活,分别使用相应特异性信号通路抑制干预其活性,均能有效改善肺泡上皮细胞 EMT 程度;此外,使用两条信号通路抑制剂联合干预 PQ 染毒的肺泡上皮细胞,结果显示联合抑制组细胞 EMT 程度明显轻于 PI3K 抑制组和 RhoA 抑制组,表现为联合抑制组细胞 E-cadherin 表达量较 PI3K 抑制组和 RhoA 抑制组升高, α -SMA 表达量较 PI3K 抑制组和 RhoA 抑制组降低。可见,PI3K/Akt 及 RhoA/ROCK 信号通路参与 PQ 所致肺泡上皮细胞 EMT 过程,且存在协同作用关系。

综上所述,CTGF 可通过激活 PI3K/Akt、RhoA/ROCK 信号通路的活性,从而促进 PQ 致肺泡上皮细胞 EMT 过程,特异性抑制 CTGF 表达或 PI3K/Akt、RhoA/ROCK 信号通路活性,有效逆转 PQ 致肺泡上皮细胞 EMT 程度,且 PI3K/Akt、RhoA/ROCK 信号通路在 PQ 致肺泡上皮细胞 EMT 过程中具有协同作用关系。但本研究为体外干预实验,缺乏不同细胞、组织器官间整体调控机制探讨,研究结论可能存在一定偏倚。接下来将在 PQ 致大鼠肺纤维化模型中进一步明确 CTGF 及两条信号通路在 PQ 致肺泡上皮细胞 EMT 及纤维化过程中的作用机制,为有效逆转肺泡上皮细胞 EMT 程度及改善肺纤维化提供科学依据。

作者声明 本文无实际或潜在的利益冲突

参考文献

- [1] CHEN Y Q, LIN Y Q, JIANG W Z, et al. Alveolar-arterial partial pressure difference as an early predictor for patients with acute paraquat poisoning [J]. J Int Med Res, 2021, 49 (9): 3000605211043243.
- [2] JIN H H. Imrecoxib inhibits paraquat-induced pulmonary fibrosis through the NF-KB/Snail signaling pathway [J]. Comput Math Methods Med, 2020, 2020: 6374014.

- [3] LU S,GAO D,WANG Y,et al. Development and validation of a radiomics nomogram for prognosis prediction of patients with acute paraquat poisoning:a retrospective cohort study[J]. Biomed Res Int, 2021, 2021;6621894.
- [4] 冯恩民,刘丽君,谭植华,等. 百草枯可溶剂中毒并随访 1 例[J]. 中华急诊医学杂志, 2023, 32(3):411-412.
- [5] 康莹,刘玉环,王华丽. PaO₂、PaCO₂ 和 Lac 水平与急性百草枯中毒患者的预后的相关性[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(1):51-54.
- [6] 高利红,周满红. 百草枯中毒致肺纤维化信号通路研究进展[J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33(3):377-380.
- [7] KIM K K,KUGLER M C,WOLTERS P J,et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 103(35):13180-13185.
- [8] 朱晨笛,郭慕真,李颖颖,等. JNK/AP-1 信号通路在百草枯诱导肺泡上皮细胞间充质转变中的作用[J]. 环境与职业医学, 2019, 36(1):17-25.
- [9] LI S L,ZHAO D,LI Y,et al. Arterial lactate in predicting mortality after paraquat poisoning:a meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(34):e11751.
- [10] 杜艳征,吕春婷. 急性百草枯中毒患者预后情况及其影响因素分析[J]. 临床医学工程, 2022, 29(6):881-882.
- [11] ELENA O Z,JAIME S C,PAULA M,et al. Lung fibrosis and fibrosis in the lungs:is it all about myofibroblasts? [J]. Biomedicines, 2022, 10(6):1423.
- [12] 丁茂鹏,韦凌霄,王志旺. CTGF 激活肌成纤维细胞参与组织器官纤维化及中医药干预作用的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(11):2719-2731.
- [13] 苏艺伟,朱伟,韦拔雄,等. 慢病毒介导 shRNA 干扰结缔组织生长因子表达对百草枯致肺纤维化的影响 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2015, 33(5):359-362.
- [14] 张彦红,韩永明,陈泽斌,等. TRPC6 通过 GSK-3 β / β -catenin 通路调控 EMT 减轻 TGF- β 1 诱导的肾小管上皮细胞损伤 [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2022, 51(4):443-448.
- [15] ZHANG J X,SHEN Y Y,YANG Y,et al. Inhibition of PI3K/AKT signaling pathway by sesamin and vitamin E improves left ventricular fibrosis in spontaneously hypertensive rats[J]. Chin J Clin Pharm Therap, 2020, 15(11):1214-1222.
- [16] 甄茂川,刘平果,赵一麟,等. 结缔组织生长因子通过 ERK1/2 和 PI3K 信号通路促进大鼠肝星状细胞迁移和基质金属蛋白酶 2 表达[J]. 中华普通外科学文献(电子版), 2014, 8(5):353-357.
- [17] ZHOU H,FANG C X,ZHANG L H,et al. Fasudil hydrochloride hydrate, a Rho-kinase inhibitor, ameliorates hepatic fibrosis in rats with type 2 diabetes[J]. Chin Med J(Engl), 2014, 127(2):225-231.
- [18] 张敏,黄艳,罗嘉. 氯沙坦联合帕立骨化醇对糖尿病大鼠肾组织 CTGF 及 RhoA/ROCK1 表达的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(9):903-906.

收稿日期:2024-03-01

·信息动态·

我国已建 829 个尘肺病康复站

2024 年 4 月 25 日,国家卫生健康委召开新闻发布会,介绍“推进卫生健康事业高质量发展,护佑人民群众生命健康”有关情况。

国家卫生健康委职业健康司副司长、一级巡视员王建冬在发布会上介绍,尘肺病多年以来一直是我们国家报告数量最大的、最多的一种职业病,约占我们所有报告职业病的 90%。近年来,国家积极开展防止因病返贫监测,将尘肺病纳入 30 种监测大病专项救治病种,保持相关救治政策的连续性和稳定性。纳入监测范围的脱贫不稳定户、边缘易致贫户、突发严重困难户“三类户”的尘肺病救治率达 99% 以上。我国已经在 28 个省份依托乡镇卫生院或者社区卫生服务中心,建设了 829 个尘肺病康复站,为尘肺病患者提供就近、免费康复服务超过 120 万人次。

下一步,国家卫生健康委将会同有关部门推动地方制定出台更多的尘肺病患者的救助保障政策,在努力遏制尘肺病增量的同时,多措并举、分类救助,保障好尘肺病存量,维护好劳动者职业健康合法权益。

来源:国家卫生健康委职业健康司