

论著·实验研究

## 低浓度紫杉醇对大鼠肺动脉平滑肌细胞外胶原沉积的作用及其机制研究

罗燕<sup>1</sup> 谢亮<sup>2</sup> 刘翰旻<sup>2</sup> 刘斌<sup>1</sup>

(1. 西南医科大学附属医院儿科, 四川 泸州 646000;  
2. 四川大学华西第二医院/西部妇幼研究院/肺血管重构与发育缺陷实验室, 四川 成都 610041)

**【摘要】** **目的** 探讨低浓度紫杉醇 (PTX) 对转化生长因子 $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 促进大鼠肺动脉平滑肌细胞 (PASMCs) 外胶原沉积的作用及其机制。**方法** 原代培养大鼠 PASMCs 并分为空白对照组、模型组和干预组 ( $n=3$ )。空白对照组不做任何处理, 模型组施加终浓度为 10 ng/mL 的 TGF- $\beta$ 1, 干预组在模型组基础上施加终浓度为 100 nmol/L 的 PTX。MTT 比色法检测细胞增殖能力; 实时荧光定量 PCR 法检测 I 型胶原 (COL I)、III 型胶原 (COL III) mRNA 相对表达量; ELISA 法检测 COL I、COL III 蛋白的 OD 值; Western blot 法检测 COL I、COL III 蛋白, 以及 TGF- $\beta$ 1/Smad3 信号通路关键蛋白 Smad3、p-Smad3 的相对表达水平。**结果** 与空白对照组比较, 模型组细胞增殖能力、COL I、COL III mRNA 及其蛋白、p-Smad3 蛋白相对表达水平均明显增高 ( $P<0.05$ ); 干预组上述指标较模型组均有所下降, 但仍高于空白对照组 ( $P<0.05$ ); 各组 Smad3 蛋白相对表达水平比较差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。**结论** 低浓度 PTX 对 TGF- $\beta$ 1 促进 PASMCs 外胶原合成具有明显抑制作用, 该作用可能是通过调控 Smad3 蛋白的磷酸化来实现。 [中国当代儿科杂志, 2019, 21(9): 924-929]

**【关键词】** 胶原沉积; 肺动脉平滑肌细胞; 紫杉醇; 转化生长因子 $\beta$ 1; 大鼠

### Effect of low-concentration paclitaxel on collagen deposition outside rat pulmonary artery smooth muscle cells and related mechanism

LUO Yan, XIE Liang, LIU Han-Min, LIU Bin. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China (Liu B, Email: lblyfy@126.com)

**Abstract: Objective** To study the effect of low-concentration paclitaxel (PTX) on transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)-induced collagen deposition outside rat pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) and related mechanism. **Methods** Primary rat PASMCs were divided into a blank control group ( $n=3$ ), a model group ( $n=3$ ), and a drug intervention group ( $n=3$ ). No treatment was given for the blank control group. The model group was treated with TGF- $\beta$ 1 with a final concentration of 10 ng/mL. The drug intervention group was treated with PTX with a final concentration of 100 nmol/L in addition to the treatment in the model group. MTT colorimetry was used to measure cell proliferation. Quantitative real-time PCR was used to measure the relative mRNA expression of collagen type I (COL-I) and collagen type III (COL-III). ELISA was used to measure the OD value of COL-I and COL-III proteins. Western blot was used to measure the relative protein expression of COL-I, COL-III, and the key proteins of the TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling pathway (Smad3 and p-Smad3). **Results** Compared with the blank control group, the model group had significant increases in proliferation ability, relative mRNA and protein expression of COL-I and COL-III, and relative protein expression of p-Smad3 ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the drug intervention group had significant reductions in the above indicators, but which were still higher than those in the blank control group ( $P<0.05$ ). There was no significant difference in the relative protein expression of Smad3 among the three groups ( $P>0.05$ ). **Conclusions** Low-concentration PTX exerts a marked inhibitory effect on TGF- $\beta$ 1-induced collagen deposition outside PASMCs, possibly by regulating the phosphorylation of Smad3 protein. [Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(9): 924-929]

**Key words:** Collagen deposition; Pulmonary artery smooth muscle cell; Paclitaxel; Transforming growth factor- $\beta$ 1; Rats

[收稿日期] 2019-04-02; [接受日期] 2019-08-05

[作者简介] 罗燕, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 刘斌, 男, 教授, 主任医师。Email: lblyfy@126.com。

近年来,大量研究显示,肺血管重构是肺动脉高压(pulmonary artery hypertension, PAH)不可逆发展的基本病理特征,其中位于肺血管中膜层的平滑肌细胞外胶原的过度沉积起着重要作用<sup>[1]</sup>。因此,如何逆转肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PSMCs)外胶原沉积成为治疗PAH的关键靶点之一。转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ )是目前发现的促纤维化作用最强的生长因子,其可刺激PSMCs发生表型转换并过度分泌细胞外基质,主要成分为I、III型胶原蛋白(COL I、COL III),引起肺动脉中膜层增厚,从而导致了肺血管重构<sup>[2]</sup>。Smad3蛋白是TGF- $\beta 1$ 下游重要的信号分子之一,当TGF- $\beta 1$ 与其配体结合后可介导Smad3蛋白磷酸化,调控相关基因的转录和翻译,促进胶原蛋白合成<sup>[3]</sup>。紫杉醇(paclitaxel, PTX)是一种传统化疗药物,由红豆杉树皮提取而成,能够通过促进微管聚集并抑制其解聚从而达到抗肿瘤细胞增殖作用,目前广泛用于乳腺癌、淋巴瘤、肠癌等多种恶性肿瘤的化学治疗<sup>[4]</sup>。低浓度PTX即非细胞毒性剂量的PTX<sup>[5-6]</sup>。近年来有学者将低浓度PTX用于胶原沉积性疾病(如肝纤维化、肾间质纤维化、肺纤维化等)的研究中,结果表明低浓度PTX能够通过抑制胶原合成来逆转纤维化进程<sup>[7-8]</sup>。本实验拟研究低浓度PTX对TGF- $\beta 1$ 诱导的体外大鼠PSMCs胶原沉积模型的作用及具体机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

胰酶、青/链霉素、DMEM高糖培养基、胎牛血清(FBS,美国Hyclone公司);TGF- $\beta 1$ (美国Pepro Tech公司);PTX(深圳信立泰药业股份有限公司);大鼠COL I及COL III  $\alpha 1$ 链ELISA试剂盒(武汉华美生物工程有限公司);COL I、COL III及 $\beta$ -actin引物合成(上海生工生物工程股份有限公司);iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix试剂盒(美国Bio-Rad公司);兔抗大鼠 $\beta$ -actin、COL III单克隆抗体,小鼠抗大鼠COL I单克隆抗体(美国Abcam公司);兔抗大鼠Smad3、p-Smad3单克隆抗体(美国CST公司);山羊抗兔IgG、山羊抗小

鼠IgG辣根过氧化物酶(美国KPL公司)。荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司);CO<sub>2</sub>细胞培养箱、全自动酶标仪(美国Thermo公司)。

### 1.2 原代大鼠PSMCs的培养、鉴定及分组

健康雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠,体重150~180 g,由成都达硕实验动物有限公司提供。大鼠PSMCs原代培养与鉴定方法参照文献<sup>[9]</sup>,颈椎脱臼方式处死健康大鼠,无菌环境中剥离出大鼠肺动脉中膜层,在预冷PBS中漂洗后,剪碎为1 mm<sup>2</sup>左右的组织块,展平铺种于培养瓶中,倒放晾干2 h后加入含20%FBS的培养基,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中,传代后换用含10%FBS的培养基。参照文献<sup>[9-10]</sup>采用免疫组化法,通过检测平滑肌特异性标志物 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)对第二代细胞进行鉴定。鉴定合格后取3~6代细胞进行实验。实验分为空白对照组(不做处理)、模型组(加入TGF- $\beta 1$ ,终浓度为10 ng/mL)、干预组(加入TGF- $\beta 1$ 和PTX,TGF- $\beta 1$ 终浓度为10 ng/mL,PTX终浓度为100 nmol/L)。造模方法及TGF- $\beta 1$ 剂量参考文献<sup>[11]</sup>,PTX剂量参考前期预实验结果及文献<sup>[5]</sup>。细胞孵育24 h后用于以下实验检测,时间截点的选择参考前期预实验结果及文献<sup>[5]</sup>。

### 1.3 MTT法检测PSMCs增殖水平

调整PSMCs密度为 $3 \times 10^4$ /mL接种于96孔板,每孔100  $\mu$ L,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中培养,每组设置5个复孔。待细胞密度长到70%时则进行分组处理。24 h后参考MTT法操作说明,在酶标仪上检测490 nm处各样本孔的吸光度(OD)值。实验独立重复5次。

### 1.4 ELISA法检测COL I及COL III的含量

如上法接种、培养、分组处理PSMCs 24 h后,收集各组细胞培养液,于4℃、4000 r/min离心15 min,取其上清液进行实验。参照大鼠COL I及COL III ELISA试剂盒使用操作说明,并将酶标仪调至450 nm处检测各个样本孔的OD值,所测得的OD值可间接代表培养液中胶原蛋白含量。实验独立重复3次。

### 1.5 采用实时荧光定量PCR法检测PSMCs中COL I、COL III mRNA相对表达量

运用NCBI基因数据库设计大鼠COL I、COL III、 $\beta$ -actin引物(表1)。调整PSMCs密度,接种细胞于6孔板,培养、分组处理24 h后,收

集各组细胞，采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA 后使用逆转录试剂盒合成 cDNA。取 cDNA 进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 反应，反应体系 (20  $\mu$ L)：荧光 MIX 体系 (2 $\times$ ，荧光 MIX 含有 Taq 酶、dNTP、Mg<sup>2+</sup> 的 buffer 缓冲液) 10  $\mu$ L，上、下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.8  $\mu$ L，ddH<sub>2</sub>O 6.4  $\mu$ L，cDNA (稀释 3 倍) 2  $\mu$ L。反应条件：95 $^{\circ}$ C 3 min；95 $^{\circ}$ C 10 s，58 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 30 s，循环 40 次。以管家基因  $\beta$ -actin 作为参照，COL I、COL III mRNA 的相对表达量依照 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法进行分析。实验独立重复 3 次。

表 1 引物序列

基因	引物 (5' $\rightarrow$ 3')	片段长度 (bp)
COL I	上游: GGATCGACCCTAACCAAGGC	210
	下游: GATCGGAACCTTCGCTTCCA	
COL III	上游: CGGAGGAATGGGTGGCTATC	268
	下游: ACCAGCTGGGCCCTTTGATAC	
$\beta$ -actin	上游: GTAGCCATCCAGGCTGTGTT	236
	下游: ATGTCACGCACGATTCCCT	

### 1.6 Western blot 法检测 PSMCs 中 COL I、COL III、Smad3、p-Smad3 蛋白相对表达

调整 PSMCs 密度，接种细胞于 6 孔板，培养、分组处理 24 h 后，提取细胞总蛋白。利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测各组蛋白浓度。根据各组蛋白浓度确定上样量，将样品加入上样孔进行电泳。电泳结束后转膜、封闭，加入相应蛋白一抗 ( $\beta$ -actin 1:1000 稀释，COL I 1:500 稀释，COL III 1:500 稀释，Smad3 1:1000 稀释，p-Smad3 1:500 稀释)，并在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中孵育过夜，洗膜后在摇床上孵育二抗 (均 1:10000 稀释) 2 h，洗膜，用吸水纸吸干后曝光扫描。应用 Quantity One 软件对结果条带进行分析，结果以各目的蛋白与  $\beta$ -actin 的灰度值比值表示。实验独立重复 3 次。

### 1.7 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计学分析。计量资料用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较使用 SNK-*q* 法，*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 原代 PSMCs 形态学观察及鉴定

原代培养第 4 天，倒置相差显微镜下可见贴壁的组织块边缘有细胞爬出，逐渐由卵圆形伸展为长梭形，在第 6 天呈现典型的“峰-谷状”生长。取第二代细胞采用免疫组化法检测  $\alpha$ -SMA 的表达，显微镜下可见细胞胞质呈现棕黄色 (即  $\alpha$ -SMA 阳性表达)，且有大量与细胞长轴相平行排列的丝状物 (细胞骨架)，计数阳性表达细胞，若阳性率在 95% 以上，则提示其为 PSMCs。见图 1。

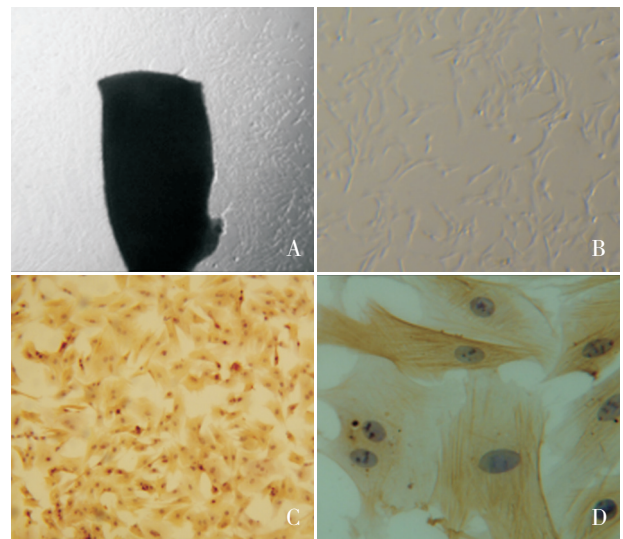


图 1 大鼠 PSMCs 原代培养 A: 原代培养第 4 天大鼠肺动脉组织块 ( $\times 40$ )，贴壁的组织块周围有细胞萌出；B: 传代培养的细胞 ( $\times 100$ )，呈长梭形生长；C:  $\alpha$ -SMA 免疫组化染色鉴定 ( $\times 200$ )，显微镜下可见 PSMCs 胞质有大量  $\alpha$ -SMA 阳性表达 (阳性表达呈棕黄色)；D:  $\alpha$ -SMA 免疫组化染色鉴定 ( $\times 400$ )，显微镜下可见大量与 PSMCs 长轴相平行排列的丝状物 (细胞骨架)。

### 2.2 MTT 法检测各组 PSMCs 增殖情况

空白对照组、模型组和干预组 OD 值比较差异有统计学意义 ( $F=65.340$ ,  $P < 0.001$ )。与空白对照组 OD 值 ( $0.444 \pm 0.033$ ) 相比，模型组 OD 值 ( $0.642 \pm 0.031$ ) 和干预组 OD 值 ( $0.516 \pm 0.017$ ) 均明显增高 ( $P < 0.05$ )；与模型组相比，干预组 OD 值明显降低 ( $P < 0.05$ )。提示 TGF- $\beta$ 1 能显著促进 PSMCs 增殖，而 PTX 能抑制 TGF- $\beta$ 1 的促增殖作用。

### 2.3 ELISA 法检测各组 PSMCs 中 COL I、COL III 的蛋白含量

与空白对照组比较，模型组和干预组 COL I、COL III 蛋白含量明显增多 ( $P < 0.05$ )；与模型组比较，干预组 COL I、COL III 含量有所下降 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组 COL I、COL III 蛋白含量比较  
( $\bar{x} \pm s$ , ng/mL,  $n=3$ )

组别	COL I	COL III
空白对照组	1.59 ± 0.11	1.46 ± 0.06
模型组	3.60 ± 0.10 <sup>a</sup>	3.27 ± 0.12 <sup>a</sup>
干预组	2.56 ± 0.13 <sup>ab</sup>	2.44 ± 0.14 <sup>ab</sup>
<i>F</i> 值	216.751	206.328
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

注：a 示与空白对照组相比， $P < 0.05$ ；b 示与模型组相比， $P < 0.05$ 。

### 2.4 qRT-PCR 法检测各组 PSMCs 中 COL I、COL III mRNA 相对表达

与空白对照组比较，模型组和干预组 PSMCs 中 COL I、COL III mRNA 表达水平明显增高 ( $P < 0.05$ )；与模型组相比，干预组 PSMCs 中 COL I、COL III mRNA 表达水平明显降低

( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 各组 COL I、COL III mRNA 相对表达水平比较  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

组别	COL I mRNA	COL III mRNA
空白对照组	0.93 ± 0.06	1.000 ± 0.024
模型组	1.98 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.801 ± 0.082 <sup>a</sup>
干预组	1.14 ± 0.04 <sup>ab</sup>	1.217 ± 0.052 <sup>ab</sup>
<i>F</i> 值	255.740	154.154
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

注：a 示与空白对照组相比， $P < 0.05$ ；b 示与模型组相比， $P < 0.05$ 。

### 2.5 Western blot 法检测各组 PSMCs 中 COL I、COL III、Smad3、p-Smad3 蛋白相对表达水平

与空白对照组比较，模型组和干预组 PSMCs 中 COL I、COL III、p-Smad3 蛋白相对表达水平均明显增高 ( $P < 0.05$ )；与模型组比较，干预组 PSMCs 中 COL I、COL III、p-Smad3 蛋白相对表达水平均显著降低 ( $P < 0.05$ )。各组间 Smad3 蛋白表达水平比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 4，图 2。

表 4 各组 COL I、COL III、Smad3、p-Smad3 蛋白相对表达水平比较  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

组别	COL I	COL III	Smad3	p-Smad3
空白对照组	0.125 ± 0.070	0.11 ± 0.03	0.43 ± 0.03	0.051 ± 0.015
模型组	0.598 ± 0.010 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.04	0.336 ± 0.054 <sup>a</sup>
干预组	0.356 ± 0.052 <sup>ab</sup>	0.27 ± 0.06 <sup>ab</sup>	0.43 ± 0.03	0.185 ± 0.021 <sup>ab</sup>
<i>F</i> 值	65.677	55.149	0.057	51.981
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	0.945	<0.001

注：a 示与空白对照组相比， $P < 0.05$ ；b 示与模型组相比， $P < 0.05$ 。

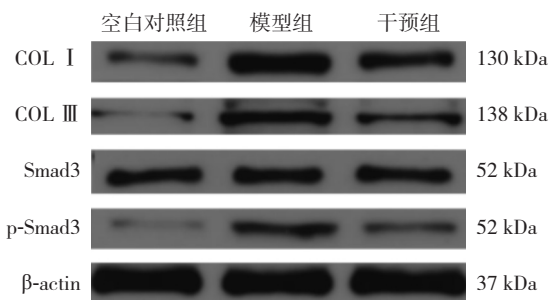


图 2 Western blot 法检测各组 COL I、COL III、Smad3、p-Smad3 蛋白相对表达条带图

## 3 讨论

肺血管重构的重要病理改变是肺小动脉管壁中膜层厚度异常增加，血管壁伸展性受限，血流动力学阻力增加，肺动脉压力持续性升高。其中血管中膜层厚度增加是由平滑肌细胞异常增殖、细胞外基质过度沉积共同导致<sup>[12]</sup>。细胞外基质作为 PSMCs 的支持物及细胞间的连接物，对 PSMCs 的生物学特性有重要作用，但细胞外基质过度合

成则会刺激 PSMCs 增殖失控, 进一步加重血管结构重建<sup>[9]</sup>。因此细胞外基质异常沉积在 PAH 的发生、发展过程中扮演着极其重要的角色, 抑制细胞外基质沉积已经成为缓解甚至逆转 PAH 持续性进展的重要靶点。众所周知, 细胞外基质的主要成分是 COL I、COL III, 其中 COL I 参与维持肺动脉管壁的韧性及抗张力, COL III 参与维持肺动脉管壁的弹性, 它们在血管管壁完整性的构成及正常生理功能维持方面起着主要作用, 但是 COL I、COL III 合成失控时胶原大量堆积而造成血管壁纤维化, 导致血管硬化、管壁增厚、管腔狭窄、顺应性下降<sup>[13]</sup>, 引起血流动力学改变, 形成 PAH。因此, 减少 COL I、COL III 的产生成为抑制细胞外基质过度沉积、防治 PAH 的关键所在。

TGF- $\beta$ 1 是促进细胞增殖并合成胶原蛋白等细胞外基质的细胞因子, 具有很强的促纤维化作用<sup>[14]</sup>。当 TGF- $\beta$ 1 与其相应受体结合, 位于下游的 Smads 蛋白则发生磷酸化后将信息传入核内, 转录并翻译产生过多胶原, 引发众多胶原沉积性疾病<sup>[15]</sup>。研究表明 PAH 的形成亦与血管壁胶原沉积密切相关<sup>[16]</sup>。郑常龙等<sup>[17]</sup>用野百合碱诱导的大鼠 PAH 模型, 结果提示大鼠模型组较空白对照组 TGF- $\beta$ 1、p-Smads 蛋白表达量上调, 提示 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路可能参与了胶原等细胞外基质的沉积。其中 Smad2、3 蛋白在 TGF- $\beta$ 1/Smads 通路中尤为关键, 是 TGF- $\beta$ 1 信号传递到 Smads 通路的第一步。与 Smad2 相比, 对胶原等细胞外基质的调控主要依赖 Smad3。本研究采用 10 ng/mL TGF- $\beta$ 1 处理大鼠 PSMCs 24 h 发现, PSMCs 增殖及 COL I、COL III 在 mRNA 和蛋白表达水平均明显增高, p-Smad3 蛋白表达上调, 该结果不仅表明本实验已成功构建大鼠 PSMCs 外胶原沉积模型, 而且也从细胞水平证实 TGF- $\beta$ 1/Smad3 信号通路在胶原沉积中的重要作用。通过以上研究结果可以推测, TGF- $\beta$ 1/Smad3 通路可能在肺血管重塑过程中起了主导作用, 因此通过干预 TGF- $\beta$ 1/Smad3 信号通路减少胶原沉积, 对于治疗 PAH 具有潜在的临床应用价值。

PTX 能与靶细胞内微管特异性结合, 促进微管蛋白聚合并阻碍其解聚, 干扰细胞有丝分裂, 从而抑制细胞增殖<sup>[18]</sup>, 目前广泛应用于抗肿瘤治

疗<sup>[4]</sup>和一些非肿瘤性疾病的研究<sup>[19]</sup>。近年来越来越多文献报道, 低浓度 PTX 能够阻断 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路, 降低胶原 mRNA 和蛋白的表达, 从而对多种胶原沉积性疾病起到很好的疗效<sup>[20]</sup>。众所周知, 细胞骨架微丝和微管有助于各类信号通路传导和调控, 其中微管结构在 TGF- $\beta$ 1 信号通路的下传中也起着重要作用, Smads 蛋白则是介导 TGF- $\beta$ 1 信号传导至微管的细胞内部中间蛋白。小剂量 PTX 干预 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路的具体机制可能是: PTX 促进微管蛋白的聚集并稳定微管, 更多的 Smads 蛋白绑定到微管上, 则使 Smads 蛋白与 TGF- $\beta$ 1 受体隔离, 阻断了 TGF- $\beta$ 1 信号通路的传导<sup>[21-22]</sup>。王红岗等<sup>[23]</sup>用 PTX 干预博来霉素诱导的大鼠肺纤维化模型, 结果显示大鼠肺组织 COL I、COL III 表达量减少, 表明 PTX 能通过减少胶原沉积而阻止肺纤维化形成。虽然 PTX 改善胶原沉积、抗纤维化作用已在胶原性关节炎<sup>[24]</sup>、输尿管梗阻<sup>[20]</sup>、青光眼滤过术后瘢痕形成<sup>[25]</sup>、肾间质纤维化<sup>[26]</sup>、肝纤维化<sup>[27]</sup>等疾病模型中得到证实, 但其在 PAH 时血管管壁胶原过度沉积的作用未见报道。本研究用小剂量 PTX (100 nmol/L) 干预 TGF- $\beta$ 1 诱导的大鼠 PSMCs 外胶原沉积模型, 结果显示, 模型组中 PSMCs 增殖水平, COL I、COL III mRNA 及其蛋白相对表达水平, p-Smad3 蛋白表达量均较空白对照组明显上调, 而 Smad3 蛋白表达量无明显改变。由此推测 TGF- $\beta$ 1 激活了 TGF- $\beta$ 1/Smad3 信号通路, 上调了 Smad3 蛋白磷酸化水平, 传入胞核信号相对增多, 促进细胞增殖及 COL I、COL III mRNA 及其蛋白表达。PTX 干预组中 PSMCs 增殖水平, COL I、COL III mRNA 及其蛋白表达水平, p-Smad3 蛋白表达量均较模型组显著下调, 而 Smad3 蛋白表达量亦无明显改变。由此推测低浓度 PTX 可以抑制 TGF- $\beta$ 1/Smad3 信号通路, 下调 Smad3 蛋白磷酸化水平, 传入胞核信号相对减少, 抑制细胞增殖及 COL I、COL III mRNA 及其蛋白表达。

综上, 本研究结果提示低浓度 PTX 可对 TGF- $\beta$ 1 促进 PSMCs 外胶原过度沉积具有显著的抑制作用, 该作用可能是通过调控 Smad3 蛋白的磷酸化来实现。

[参 考 文 献]

- [1] 庞璐璐, 齐建光, 高扬, 等. 中介素抑制高肺血性肺动脉高压大鼠肺组织胶原生成 [J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(12): 2185-2189.
- [2] 王丹姝, 方莲花, 杜冠华. 转化生长因子  $\beta 1$  在肺动脉高压中作用的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(6): 741-744.
- [3] 郝淑玲, 王卫平, 于忠和, 等. 肾上腺髓质素通过 Smad2/3 信号途径抑制 TGF- $\beta 1$  刺激的肺成纤维细胞前胶原蛋白的合成 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30 (11): 1125-1128.
- [4] Bernabeu E, Cagel M, Lagomarsino E, et al. Paclitaxel: what has been done and the challenges remain ahead [J]. Int J Pharm, 2017, 526(1-2): 474-495.
- [5] 吴珊珊. 低浓度紫杉醇对大鼠肺动脉平滑肌细胞生物学行为的影响及机制研究 [D]. 泸州: 西南医科大学, 2018.
- [6] Zhang D, Yang R, Wang S, et al. Paclitaxel: new uses for an old drug [J]. Drug Des Devel Ther, 2014, 8: 279-284.
- [7] Zhou J, Zhong DW, Wang QW, et al. Paclitaxel ameliorates fibrosis in hepatic stellate cells via inhibition of TGF-beta/Smad activity [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(26): 3330-3334.
- [8] Zhang D, Sun L, Xian W, et al. Low-dose paclitaxel ameliorates renal fibrosis in rat UUO model by inhibition of TGF-beta/Smad activity [J]. Lab Invest, 2010, 90(3): 436-447.
- [9] 胡煜, 李刚, 贾鹏, 等. ERK1/2 和 PI3K/PKB 信号通路在调节大鼠肺动脉平滑肌细胞外基质基因表达中的作用 [J]. 临床儿科杂志, 2013, 31(12): 1154-1158.
- [10] 王静, 戴爱国. 原代大鼠肺动脉平滑肌细胞的提取和鉴定以及缺氧对其增殖的影响 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2012, 11(2): 147-152.
- [11] Jung ES, Lee J, Heo NJ, et al. Low-dose paclitaxel ameliorates renal fibrosis by suppressing transforming growth factor- $\beta 1$ -induced plasminogen activator inhibitor-1 signaling [J]. Nephrology (Carlton), 2016, 21(7): 574-582.
- [12] 桑葵, 周英, 李明霞. 缺氧性肺动脉高压新生大鼠肺血管重塑的研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2012, 14(3): 210-214.
- [13] González JM, Briones AM, Starcher B, et al. Influence of elastin on rat small artery mechanical properties [J]. Exp Physiol, 2005, 90(4): 463-468.
- [14] Dong J, Ma Q. Myofibroblasts and lung fibrosis induced by carbon nanotube exposure [J]. Part Fibre Toxicol, 2016, 13(1): 60.
- [15] Ni J, Shi Y, Li L, et al. Cardioprotection against heart failure by Shenfu injection via TGF- $\beta$ /Smads signaling pathway [J]. Evid Based Complement Altern Med, 2017, 2017: 7083016.
- [16] 梁晨, 金红芳, 杜淑旭, 等. 野百合碱诱导肺动脉高压大鼠肺动脉 I 型胶原的变化 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2010, 25(1): 18-20.
- [17] 郑常龙, 刘旭辉, 冯亚群, 等. 野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠 TGF- $\beta 1$ /Smad2 信号通路表达的研究 [J]. 心脑血管病杂志, 2014, 33(3): 442-444.
- [18] Turner E, Erwin M, Atigh M, et al. *In vitro* and *in vivo* assessment of keratose as a novel excipient of paclitaxel coated balloons [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 808.
- [19] 吴珊珊, 刘平先, 刘斌. 紫杉醇在非肿瘤性疾病中应用的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(9): 1796-1800.
- [20] Zhang D, Sun L, Xian W, et al. Low-dose paclitaxel ameliorates renal fibrosis in rat UUO model by inhibition of TGF-beta/Smad activity [J]. Lab Invest, 2010, 90(3): 436-447.
- [21] Gong K, Xing D, Li P, et al. cGMP inhibits TGF-beta signaling by sequestering Smad3 with cytosolic beta2-tubulin in pulmonary artery smooth muscle cells [J]. Mol Endocrinol, 2011, 25(10): 1794-1803.
- [22] Dong C, Li Z, Alvarez R Jr, et al. Microtubule binding to Smads may regulate TGF beta activity [J]. Mol Cell, 2000, 5(1): 27-34.
- [23] 王红岗, 鲁明霞. 红豆杉提取物紫杉醇对博来霉素致大鼠肺纤维化的影响 [J]. 浙江中医杂志, 2014, 49(4): 275-276.
- [24] 徐娟. 紫杉醇对胶原诱导性关节炎小鼠血管新生抑制作用的研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2017.
- [25] 李俊英. 紫杉醇在青光眼滤过术后的抗增殖作用 [J]. 眼科新进展, 2015, 35(11): 1080-1082.
- [26] Lei Z, Xuan X, Yang R, et al. Paclitaxel attenuates renal interstitial fibroblast activation and interstitial fibrosis by inhibiting STAT3 signaling [J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 2139-2148.
- [27] Zhou J, Zhong DW, Wang QW, et al. Paclitaxel ameliorates fibrosis in hepatic stellate cells via inhibition of TGF-beta/Smad activity [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(26): 3330-3334.

( 本文编辑: 万静 )