

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.02.001  
文章编号: 1005-8982 (2018) 02-0001-07

基础研究 · 论著

## Ac-SDKP 通过调节 HDAC6 和 HSP90 抑制矽肺纤维化的机制研究 \*

李红垒<sup>1</sup>, 徐丁洁<sup>2</sup>, 郭地利<sup>1</sup>, 耿玉聪<sup>1</sup>, 高学敏<sup>1</sup>, 李世峰<sup>1</sup>, 徐洪<sup>1</sup>, 杨方<sup>1</sup>, 魏中秋<sup>3</sup>  
(华北理工大学 1. 医学实验研究中心, 2. 中医学院, 3. 病理学系, 河北 唐山 063210)

**摘要:** **目的** 探讨 Ac-SDKP 通过对组蛋白去乙酰化酶 6 (HDAC6)、热休克蛋白 90 (HSP90) 的调节, 抑制大鼠矽肺纤维化的作用机制。 **方法** 非暴露式支气管内灌注法复制大鼠矽肺模型, 分为对照 4 周组、矽肺模型 4 周组、对照 8 周组、矽肺模型 8 周组、Ac-SDKP 抗纤维化治疗组和 Ac-SDKP 预防治疗组。采用转化生长因子- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 诱导原代培养新生大鼠肺成纤维细胞向肌成纤维细胞分化, 并予以 Ac-SDKP 和 HDAC6 特异性抑制剂 TCS HDAC6 20b 预处理。采用苏木精-伊红染色法观察病理形态变化, 免疫组织化学法、Western blot 检测 I 型胶原、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA)、HDAC6 及 HSP90 的表达。 **结果** 免疫组织化学法结果显示, HDAC6 和 HSP90 阳性表达主要位于矽结节内, 给予 Ac-SDKP 抗纤维化治疗或预防治疗均能抑制 I 型胶原、 $\alpha$ -SMA、HDAC6 及 HSP90 蛋白表达的上调。而 TGF- $\beta_1$  能诱导大鼠成纤维细胞  $\alpha$ -SMA 阳性表达, 同时伴随 HDAC6 和 HSP90 蛋白表达上调, 而予以 TCS HDAC6 20b 或 Ac-SDKP 预处理均能抑制该变化。 **结论** Ac-SDKP 能够通过调节 HDAC6 和 HSP90 信号, 在体内外抑制矽肺大鼠肌成纤维细胞分化和胶原沉积, 从而发挥抗矽肺纤维化的作用。

**关键词:** Ac-SDKP; 肺纤维化; HDAC6; HSP90

**中图分类号:** R135.2

**文献标识码:** A

## Effect of Ac-SDKP on expressions of HDAC6 and HSP90 in lungs of rats with silicosis\*

Hong-lei Li<sup>1</sup>, Ding-jie Xu<sup>2</sup>, Di-li Guo<sup>1</sup>, Yu-cong Geng<sup>1</sup>, Xue-min Gao<sup>1</sup>, Shi-feng Li<sup>1</sup>, Hong Xu<sup>1</sup>,  
Fang Yang<sup>1</sup>, Zhong-qiu Wei<sup>3</sup>

(1. Medical Research Center, 2. Institute of Traditional Chinese Medicine, 3. Department of Pathology,  
North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063210, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (Ac-SDKP) on the expressions of histone deacetylase 6 (HDAC6) and heat shock protein 90 (HSP90) in the process of fibroblast differentiation. **Methods** Rats were instilled with silica through trachea to establish silicotic models. The rats were divided into 4-week control group, 4-week silicosis group, 8-week control group, 8-week silicosis group, Ac-SDKP treatment group and Ac-SDKP pre-treatment group. Myofibroblasts induced by TGF- $\beta_1$  were pre-treated with TCS HDAC6 20b, the specific inhibitor of Ac-SDKP and HDAC6. Routine HE staining was used to observe the pathomorphology. The expressions of  $\alpha$ -SMA, collagen I, HDAC6 and HSP90 were measured by immunohistochemistry and Western blot. **Results** The expressions of HDAC6 and HSP90 were increased in the

收稿日期: 2016-11-29

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81472953); 河北省自然科学基金 (No: H2016209107); 华北理工大学大学生创新项目 (No: X2016315)

[通信作者] 魏中秋, E-mail: wzq3725185@163.com

silicotic nodules of the rat lungs; upon the treatment or pre-treatment with Ac-SDKP, the expressions of collagen I,  $\alpha$ -SMA, HDAC6 and HSP90 were decreased. TGF- $\beta$ 1 induced the  $\alpha$ -SMA expression in rat fibroblasts and up-regulated the expressions of HDAC6 and HSP90; moreover, pre-treatment with Ac-SDKP or TCS HDAC6 20b inhibited the TGF- $\beta$ 1-induced expressions of these factors. **Conclusions** Ac-SDKP inhibits myofibroblast differentiation and collagen deposition, which is related with regulation of HDAC6 and HSP90.

**Keywords:** N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline; fibrosis; HDAC6; HSP90

矽肺病是我国最严重的职业病, 占职业病报告总例数的 90% 左右, 其主要病理特征为矽结节形成和间质纤维化<sup>[1]</sup>。本课题组前期采用蛋白质组学技术研究发现乙酰化微管蛋白  $\alpha$  (acetylated  $\alpha$ -tubulin,  $\alpha$ -Ac-Tub) 在矽肺模型组表达下调, 而 Ac-SDKP 抗纤维化治疗或预防治疗能够上调其表达, 提示  $\alpha$ -Ac-Tub 可能是 Ac-SDKP 抗矽肺纤维化作用的靶蛋白之一<sup>[2]</sup>。 $\alpha$ -Tub 乙酰化位点位于其第 40 位赖氨酸残基, 主要依赖组蛋白乙酰转移酶 (histone acetyltransferase, HAT) 和组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 的调节<sup>[3-4]</sup>。有关研究表明, HDAC6 具有非组蛋白底物的特异性, 主要作用于  $\alpha$ -Tub、热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP90) 和皮动蛋白的去乙酰化<sup>[5-7]</sup>。因此, 本研究拟通过支气管灌注二氧化硅 SiO<sub>2</sub> 复制矽肺大鼠模型, 结合体外转化生长因子- $\beta$ <sub>1</sub> (transforming growth factor- $\beta$ <sub>1</sub>, TGF- $\beta$ <sub>1</sub>) 诱导的肌成纤维细胞分化模型, 观察 Ac-SDKP 对 HDAC6 和 HSP90 信号的调节作用, 进一步完善其抗纤维化作用的可能机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

SiO<sub>2</sub> 粉尘购置于美国 Sigma 公司, 药物微量释放泵 (Alzet 2 ml) 购置于美国 Durect 公司, Ac-SDKP (H-1156) 购置于瑞士 Bachem AG 公司,  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 兔抗购置于美国 Eptomics 公司, HDAC6 兔抗、I 型胶原兔抗均购置于美国 Abcam 公司, HSP90 购置于美国 BD Transduction Laboratories 公司。

### 1.2 方 法

**1.2.1 实验动物及模型的复制** SPF 级成年雄性 Wistar 大鼠 60 只, 质量 (180 ± 10) g, 订购于北京维通利华实验动物技术有限公司 (动物许可证: SCXK 京 20090003), 在华北理工大学动物实验中心屏障实验室饲养。大鼠随机分成 6 组: ①对照 4 周组: 一

次性支气管灌注生理盐水 1 ml, 腹腔包埋含 2 ml 生理盐水的微量缓释泵, 饲养 4 周后处理; ②矽肺模型 4 周组: 一次性支气管灌注含 50 mg/ml SiO<sub>2</sub> 的生理盐水 1 ml, 腹腔包埋含 2 ml 生理盐水的微量缓释泵, 饲养 4 周后处理; ③对照 8 周组: 一次性支气管灌注生理盐水 1 ml, 腹腔包埋含 2 ml 生理盐水的微量缓释泵, 饲养 8 周后处理; ④矽肺模型 8 周组: 一次性支气管灌注含 50 mg/ml SiO<sub>2</sub> 的生理盐水 1 ml, 腹腔包埋含 2 ml 生理盐水的微量缓释泵, 饲养 8 周后处理; ⑤ Ac-SDKP 抗纤维化治疗组: 一次性支气管灌注含 50 mg/ml SiO<sub>2</sub> 的生理盐水 1 ml, 腹腔包埋含 2 ml 生理盐水的微量缓释泵, 4 周后更换为含 Ac-SDKP 800  $\mu$ g/(kg · d) 的微量缓释泵, 继续饲养至第 8 周处理; ⑥ Ac-SDKP 预防治疗组: 灌尘前 48 h 腹腔包埋含 Ac-SDKP 800  $\mu$ g/(kg · d) 的微量缓释泵, 一次性支气管灌注含 50 mg/ml SiO<sub>2</sub> 的生理盐水 1 ml, 饲养 8 周后处理。实验结束后, 右下肺固定、包埋切片; 其余组织 -80℃ 冷冻。

**1.2.2 肺成纤维细胞培养及分组** 原代培养大鼠肺成纤维细胞, 取 2 代细胞用于实验研究。实验分组: ①对照组: 空白培养基 (无胎牛血清的 DMEM 培养基) 孵育细胞; ② TGF- $\beta$ <sub>1</sub> 诱导组: 空白培养基 + TGF- $\beta$ <sub>1</sub> 5 ng/ml 诱导; ③ Ac-SDKP 预处理组: 空白培养基 + Ac-SDKP 10 ~ 8 mol/L 预处理 1 h 后, 给予 TGF- $\beta$ <sub>1</sub> 5 ng/ml 共孵育; ④ TCS HDAC6 20b 预处理组: 空白培养基 + HDAC6 特异性抑制剂 TCS HDAC6 20b 10 ~ 6 mol/L 预处理 1 h 后, 给予 TGF- $\beta$ <sub>1</sub> 5 ng/ml 共同孵育。

**1.2.3 苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, HE)** 石蜡切片二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, 苏木素染色 5 min, 流水冲洗, 0.117 mol/L 盐酸乙醇分化数秒, 流水冲洗返蓝, 伊红染色 1 min, 逐步梯度乙醇脱水、二甲苯透明, 中性树胶封片, 光学显微镜下观察肺组织病理形态。

**1.2.4 免疫组织化学染色法** 切片常规脱蜡至水, 高压修复, 0.3% 双氧水 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭内源性过氧化物酶,

HDAC6(1 : 100)和HSP90(1 : 100)4℃孵育过夜,二抗 37℃、30 min, DAB 显色,镜下控制,轻度复染,常规脱水透明封片,检测 HDAC6 和 HSP90 的表达。

**1.2.5 Western blot 检测** 提取肺组织或成纤维细胞蛋白,Brafford 法测定蛋白浓度,聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转至 PVDF 膜,5% 牛血清白蛋白封闭 1 h,一抗 I 型胶原(1 : 500)、 $\alpha$ -SMA(1 : 500)、HDAC6(1 : 500)、HSP90(1 : 500)、GAPDH(1 : 1 000)4℃孵育过夜,二抗(1 : 5 000)37℃孵育 30 min。ECL 发光试剂显色,采用 Image-Pro-plus 图像处理软件对条带进行分析,以目的蛋白光密度值与 GAPDH 内参蛋白光密度值的比值作为该蛋白的相对表达量,检测 I 型胶原、 $\alpha$ -SMA、HDAC6 及 HSP90 蛋白的表达

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用单因素方差分析,两

两比较用 LSD-*t* 法, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

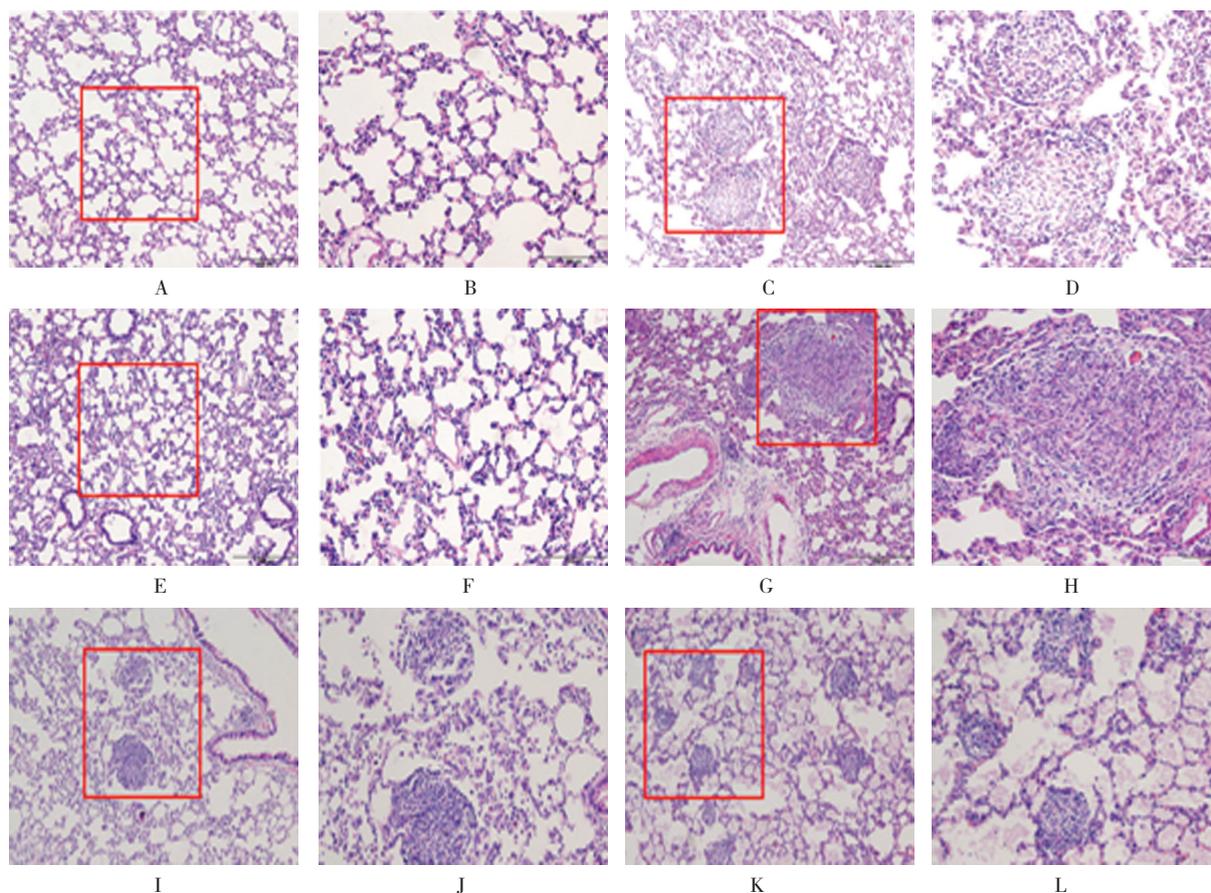
## 2 结果

### 2.1 大鼠矽肺模型病理形态学变化特点

HE 染色结果显示,对照组肺泡壁薄,结构清晰,间质无明显炎症细胞浸润。矽肺模型组肺组织内可见肺泡壁均呈不同程度增宽,且有明显的矽结节形成,多由巨噬细胞和增生的成纤维细胞构成。其中矽肺模型 4 周组以细胞性结节多见,而矽肺模型 8 周组可见多个矽结节融合,纤维细胞性结节多见。经 Ac-SDKP 抗纤维化治疗或预防治疗后,矽结节数量和面积较矽肺模型 8 周组减少,肺组织纤维化程度减轻。见图 1。

### 2.2 Ac-SDKP 对矽肺大鼠 I 型胶原、 $\alpha$ -SMA、HDAC6 及 HSP90 表达的调节作用

免疫组织化学染色结果显示,HDAC6 和 HSP90 在对照组中表达于支气管上皮细胞和部分肺泡 II 型上皮细胞,其中在支气管上皮细胞胞浆内阳性表达,偶



A:对照 4 周组( $\times 100$ );B:对照 4 周组( $\times 200$ );C:矽肺模型 4 周组( $\times 100$ );D:矽肺模型 4 周组( $\times 200$ );E:对照 8 周组( $\times 100$ );F:对照 8 周组( $\times 200$ );G:矽肺模型 8 周组( $\times 100$ );H:矽肺模型 8 周组( $\times 200$ );I:Ac-SDKP 抗纤维化治疗组( $\times 100$ );J:Ac-SDKP 抗纤维化治疗组( $\times 200$ );K:Ac-SDKP 预防治疗组( $\times 100$ );L:Ac-SDKP 预防治疗组( $\times 200$ )

图 1 矽肺大鼠肺组织病理形态学变化 (HE 染色)

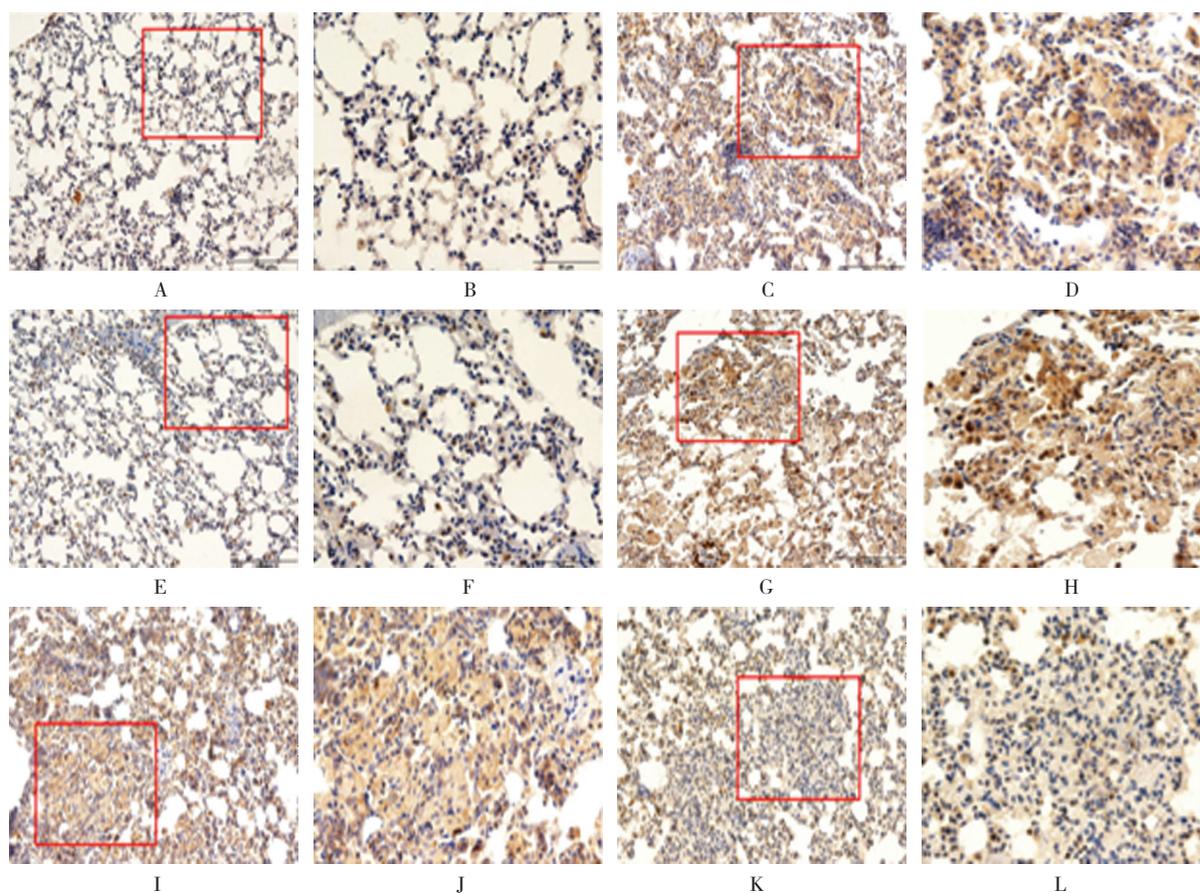
见胞核内表达,而在肺泡Ⅱ型上皮细胞中以胞核表达为主;在矽肺模型组中,除具有上述表达特点外,在巨噬细胞中阳性表达较为显著,多位于矽结节和间质纤维化区域,以胞浆显色为主。与矽肺模型 8 周组相比,Ac-SDKP 抗纤维化治疗和预防治疗组矽结节明显减小,HDAC6 和 HSP90 阳性表达减弱。见图 2、3。

Western blot 检测结果显示,HDAC6 和 HSP90 在矽肺模型组较相应时间点对照组表达增加,其中 HDAC6 上调至相应时间点对照组的 2.04 和 1.60 倍,HSP90 上调至 1.58 和 1.81 倍;Ac-SDKP 抗纤维化治疗和预防治疗后 HDAC6 和 HSP90 表达较矽肺模型 8 周组下降,其中 HDAC6 表达分别下调至矽肺模型 8 周组的 87.07% 和 75.57%,HSP90 分别下调至 76.09% 和 69.29%,对照 4 周组、矽肺模型 4 周组、对照 8 周组、矽肺模型 8 周组、Ac-SDKP 抗纤维化治疗组、Ac-SDKP 预防治疗组的 HDAC6、HSP90 蛋白比较,经方差分析,差异有统计学意义( $F=41.780$  和

$30.893$ , 均  $P=0.000$ )。 $\alpha$ -SMA 和 I 型胶原在矽肺模型组分别较相应时间点对照组表达增加,其中矽肺模型 4 周组  $\alpha$ -SMA 和 I 型胶原表达量是对照 4 周组的 1.73 和 1.95 倍,矽肺模型 8 周组  $\alpha$ -SMA 和 I 型胶原表达量是对照 8 周组的 2.15 和 1.84 倍;而 Ac-SDKP 抗纤维化治疗和预防治疗组  $\alpha$ -SMA 和 I 型胶原表达较矽肺 8 周组下降, $\alpha$ -SMA 分别下调至矽肺 8 周组的 65.31% 和 70.15%,I 型胶原分别下调至矽肺 8 周组的 77.67% 和 69.13%,对照 4 周组、矽肺模型 4 周组、对照 8 周组、矽肺模型 8 周组、Ac-SDKP 抗纤维化治疗组、Ac-SDKP 预防治疗组的  $\alpha$ -SMA、I 型胶原蛋白比较,经方差分析,差异有统计学意义( $F=23.517$  和  $37.349$ , 均  $P=0.000$ )。见表 1 和图 4。

### 2.3 Ac-SDKP 在 TGF- $\beta_1$ 诱导的肌成纤维细胞转分化过程中对 HDAC6、HSP90 的调节作用

Western blot 结果显示,I 型胶原、 $\alpha$ -SMA、HDAC6 和 HSP90 在 TGF- $\beta_1$  诱导组较对照组表达增

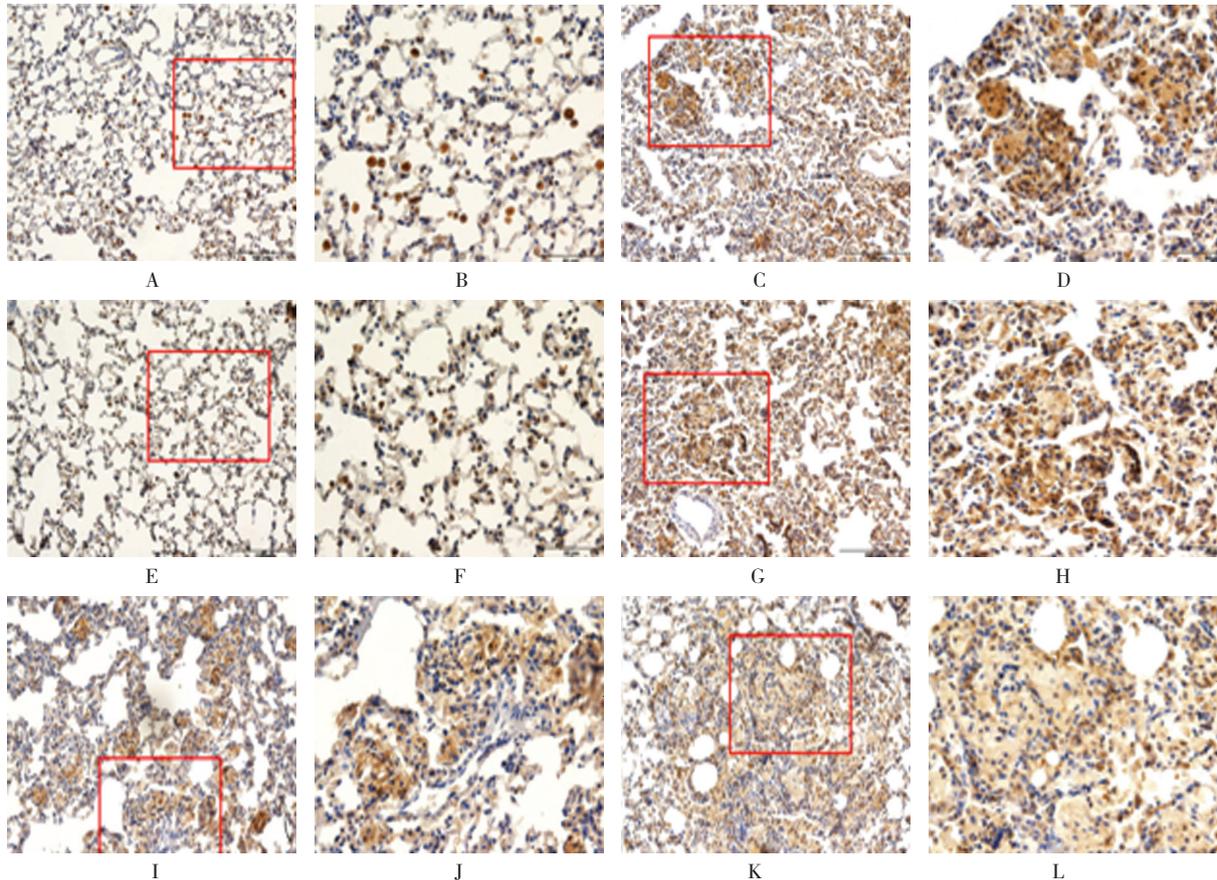


A: 对照 4 周组 ( $\times 200$ ); B: 对照 4 周组 ( $\times 400$ ); C: 矽肺模型 4 周组 ( $\times 200$ ); D: 矽肺模型 4 周组 ( $\times 400$ ); E: 对照 8 周组 ( $\times 200$ ); F: 对照 8 周组 ( $\times 400$ ); G: 矽肺模型 8 周组 ( $\times 200$ ); H: 矽肺模型 8 周组 ( $\times 400$ ); I: Ac-SDKP 抗纤维化治疗组 ( $\times 200$ ); J: Ac-SDKP 抗纤维化治疗组 ( $\times 400$ ); K: Ac-SDKP 预防治疗组 ( $\times 200$ ); L: Ac-SDKP 预防治疗组 ( $\times 400$ )

图 2 HDAC6 在矽肺大鼠肺组织中的定位和表达 (免疫组织化学染色)

加, 分别上调 1.68、1.76、1.70 和 1.85 倍; 分别给予 Ac-SDKP、TCS HDAC6 20b 预处理后, 与 TGF-β<sub>1</sub> 诱导组相比, I 型胶原、α-SMA、HDAC6 和 HSP90 表达下降, 其中 I 型胶原的表达分别是 TGF-β<sub>1</sub> 诱导组的 68.69% 和 60.59%, α-SMA 的表达分别是 TGF-β<sub>1</sub> 诱导组的 64.98% 和 56.10%, HDAC6 的表达分别是

TGF-β<sub>1</sub> 诱导组的 76.60% 和 61.81%, HSP90 的表达分别是 TGF-β<sub>1</sub> 诱导组的 56.16% 和 47.95%。对照组、TGF-β<sub>1</sub> 诱导组、Ac-SDKP 预处理组、TCS HDAC6 20b 预处理组的 I 型胶原、α-SMA、HDAC6、HSP90 蛋白比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=72.707$ 、 $55.804$ 、 $29.799$  和  $81.115$ , 均  $P=0.000$ )。见表 2 和图 5。



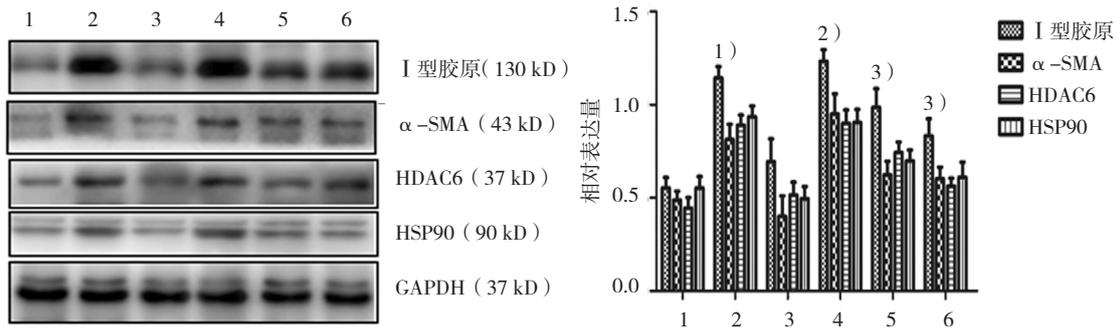
A: 对照 4 周组 (×200); B: 对照 4 周组 (×400); C: 矽肺模型 4 周组 (×200); D: 矽肺模型 4 周组 (×400); E: 对照 8 周组 (×200); F: 对照 8 周组 (×400); G: 矽肺模型 8 周组 (×200); H: 矽肺模型 8 周组 (×400); I: Ac-SDKP 抗纤维化治疗组 (×200); J: Ac-SDKP 抗纤维化治疗组 (×400); K: Ac-SDKP 预防治疗组 (×200); L: Ac-SDKP 预防治疗组 (×400)

图 3 HSP90 在矽肺大鼠肺组织中的定位和表达 (免疫组织化学染色)

表 1 Ac-SDKP 对矽肺大鼠肺内 I 型胶原、α-SMA、HDAC6 及 HSP90 蛋白表达的调节 (n=4,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	I 型胶原	α-SMA	HDAC6	HSP90
对照 4 周组	0.553 ± 0.056	0.488 ± 0.048	0.445 ± 0.057	0.553 ± 0.062
矽肺模型 4 周组	1.143 ± 0.061 <sup>1)</sup>	0.813 ± 0.083 <sup>1)</sup>	0.890 ± 0.055 <sup>1)</sup>	0.935 ± 0.058 <sup>1)</sup>
对照 8 周组	0.695 ± 0.122	0.400 ± 0.111	0.515 ± 0.069	0.495 ± 0.066
矽肺模型 8 周组	1.233 ± 0.062 <sup>2)</sup>	0.950 ± 0.108 <sup>2)</sup>	0.900 ± 0.072 <sup>2)</sup>	0.905 ± 0.069 <sup>2)</sup>
Ac-SDKP 抗纤维化治疗组	0.985 ± 0.101 <sup>3)</sup>	0.623 ± 0.074 <sup>3)</sup>	0.743 ± 0.057 <sup>3)</sup>	0.700 ± 0.057 <sup>3)</sup>
Ac-SDKP 预防治疗组	0.833 ± 0.091 <sup>3)</sup>	0.603 ± 0.062 <sup>3)</sup>	0.563 ± 0.042 <sup>3)</sup>	0.610 ± 0.082 <sup>3)</sup>
F 值	37.349	23.517	41.780	30.893
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与对照 4 周组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与对照 8 周组比较,  $P < 0.05$ ; 3) 与矽肺 8 周组比较,  $P < 0.05$



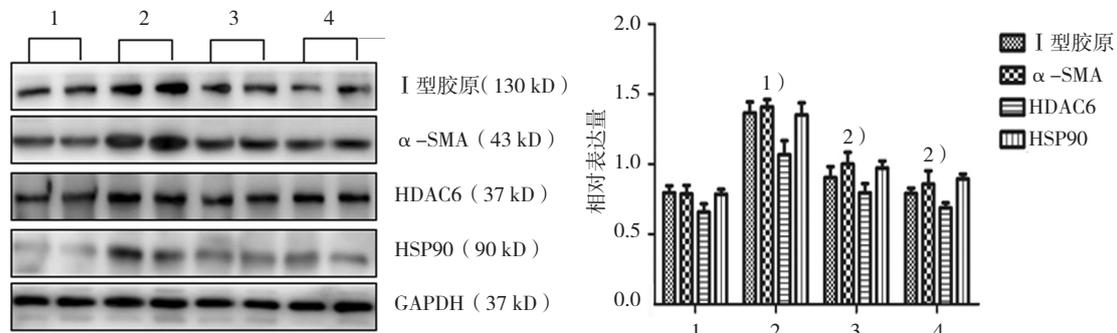
1: 对照 4 周组; 2: 矽肺模型 4 周组; 3: 对照 8 周组; 4: 矽肺模型 8 周组; 5: Ac-SDKP 抗纤维化治疗组; 6: Ac-SDKP 预防治疗组。  
1) 与对照 4 周组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与对照 8 周组比较,  $P < 0.05$ ; 3) 与矽肺模型 8 周组比较,  $P < 0.05$

图 4 I 型胶原、 $\alpha$ -SMA、HDAC6 及 HSP90 在肺组织中的表达

表 2 Ac-SDKP 对 TGF- $\beta_1$  诱导的肌成纤维细胞 I 型胶原、 $\alpha$ -SMA、HDAC6 及 HSP90 表达的调节作用 ( $n=4, \bar{x} \pm s$ )

组别	I 型胶原	$\alpha$ -SMA	HDAC6	HSP90
对照组	0.795 ± 0.051	0.788 ± 0.061	0.658 ± 0.059	0.785 ± 0.035
TGF- $\beta_1$ 诱导组	1.365 ± 0.079 <sup>1)</sup>	1.410 ± 0.051 <sup>1)</sup>	1.068 ± 0.099 <sup>1)</sup>	1.353 ± 0.084 <sup>1)</sup>
Ac-SDKP 预处理组	0.905 ± 0.077 <sup>2)</sup>	1.000 ± 0.084 <sup>2)</sup>	0.795 ± 0.065 <sup>2)</sup>	0.973 ± 0.050 <sup>2)</sup>
TCS HDAC6 20b 预处理组	0.790 ± 0.039 <sup>2)</sup>	0.858 ± 0.094 <sup>2)</sup>	0.688 ± 0.036 <sup>2)</sup>	0.895 ± 0.034 <sup>2)</sup>
F 值	72.707	55.804	29.799	81.115
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与 TGF- $\beta_1$  诱导组比较,  $P < 0.05$



1: 对照组; 2: TGF- $\beta_1$  诱导组; 3: Ac-SDKP 预处理组; 4: TCS HDAC6 20b 预处理组。1) 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与 TGF- $\beta_1$  诱导组比较,  $P < 0.05$

图 5 I 型胶原、 $\alpha$ -SMA、HDAC6 及 HSP90 在 TGF- $\beta_1$  诱导的成纤维细胞中的表达

### 3 讨论

Ac-SDKP 是一种生理性造血系统的生长抑制因子。近年来研究表明, Ac-SDKP 在诸多器官纤维化动物模型(心、肾、肺、肝)中, Ac-SDKP 均能够抑制靶器官胶原的沉积, 减轻致病因素导致的器官纤维化的程度<sup>[8-10]</sup>。本课题组前期研究发现, Ac-SDKP 能够调节  $\alpha$ -Ac-Tub 信号, 发挥抑制矽肺大鼠肌成纤维细胞分化和胶原沉积的作用<sup>[2]</sup>。作为调节  $\alpha$ -Tub 去乙酰化的主要蛋白, HDAC6 可被 TGF- $\beta_1$  诱导并促

进  $\alpha$ -Ac-Tub 的去乙酰化, 参与上皮-间质转化的调控, 而抑制 HDAC6 的表达, 能够阻断 TGF- $\beta_1$ /Smad3 信号的活化<sup>[11-12]</sup>。ROCK 信号活化能够磷酸化 TPPP1, 使其失去对 HDAC6 的抑制作用, 促进  $\alpha$ -Tub 的去乙酰化, 从而诱导细胞增殖、侵袭及迁移<sup>[13-14]</sup>。HDAC6 基因敲除或 HDAC6 选择性抑制剂 Tubastatin A, 能够改善 Ang II 诱导的心肌肥大和纤维化程度, 并维持心肌收缩能力和左心室功能, 起到一定的心血管保护作用<sup>[15]</sup>。提示针对 HDAC6 信号的阻断能够发挥拮抗器

官纤维化的作用。而 HSP90 是 HDAC6 的经典下游底物,可由 HDAC6 脱乙酰化而激活<sup>[16]</sup>。HSP90 抑制剂 17-AAG 能够抑制 TGF- $\beta_1$  信号的活化,从而减轻肾纤维化病变程度<sup>[17]</sup>,同时还能够抑制氧化应激损伤,改善硫代乙酰胺所致的肝损伤,降低星状细胞活性<sup>[18]</sup>。然而,Ac-SDKP 是否能够通过调节 HDAC6 及其特异底物 HSP90 信号,并发挥相应的抗纤维化作用,目前仍不清楚。

本实验免疫组织化学法结果显示,在  $\alpha$ -SMA 阳性表达的矽结节和间质纤维化区域,HDAC6 和 HSP90 表达增强。Western blot 检测结果也显示,与对照组相比,矽肺模型 4 和 8 周组的  $\alpha$ -SMA、I 型胶原、HDAC6、HSP90 的蛋白表达量增加。体外实验结果显示,TGF- $\beta_1$  诱导刺激成纤维细胞可增强 HDAC6 和 HSP90 蛋白的表达,同时伴随着肌成纤维细胞分化和 I 型胶原的合成,而 TCS HDAC6 20b 预处理组与 TGF- $\beta_1$  诱导组比较, $\alpha$ -SMA、I 型胶原、HDAC6 和 HSP90 表达均下调,阻断了肌成纤维细胞分化。提示,针对 HDAC6 信号的阻断,能够抑制肌成纤维细胞分化和胶原沉积,其可能是器官纤维化的一个新的靶向治疗方法。

进一步研究发现,给予 Ac-SDKP 抗纤维化治疗和预防后,能够逆转 HDAC6 和 HSP90 水平的升高,从而抑制 TGF- $\beta_1$  诱导的肌成纤维细胞分化和 I 型胶原蛋白的表达。提示 Ac-SDKP 能够通过调节 HDAC6 和 HSP90 蛋白信号的阻断,从而抑制肌成纤维细胞分化和胶原沉积,这可能是 Ac-SDKP 抗矽肺纤维化作用新的机制之一。

#### 参 考 文 献:

- [1] 王娟. 祛菲亚参胶囊辅助大容量全肺灌洗术治疗煤工尘肺的临床效果观察[J]. 现代医学, 2016, 44(2): 239-241.
- [2] 李世峰,高学敏,徐丁洁,等. A-SDKP 调节乙酰化微管蛋白  $\alpha$  抑制矽肺肌成纤维细胞转分化的研究[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2015, 33(11): 816-821.
- [3] MOBLEY R J, RAGHU D, DUKE L D, et al. MAP3K4 controls the chromatin modifier HDAC6 during trophoblast stem cell epithelial-to-mesenchymal transition [J]. Cell Rep, 2017, 18(10): 2387-2400.
- [4] DEMOS-DAVIES K M, FERGUSON B S, CAVASIN M A, et al. HDAC6 contributes to pathological responses of heart and skeletal muscle to chronic angiotensin-II signaling[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014, 307(2): H252-H258.
- [5] SKOGE R H, ZIEGLER M. SIRT2 inactivation reveals a subset of hyperacetylated perinuclear microtubules inaccessible to HDAC6[J]. J Cell Sci, 2016, 129(15): 2972-2982.
- [6] DESKIN B, LASKY J, ZHUANG Y, et al. Requirement of HDAC6 for activation of Notch1 by TGF- $\beta_1$ [J]. 2016, 8(6): 31086.
- [7] TAO H, YANG J J, SHI K H, et al. Epigenetic factors MeCP2 and HDAC6 control alpha-tubulin acetylation in cardiac fibroblast proliferation and fibrosis[J]. Inflamm Res, 2016, 65(5): 415-426.
- [8] GONZÁLEZ G E, RHALEB N E, NAKAGAWA P, et al. N-acetylseryl-aspartyl-lysyl-proline reduces cardiac collagen cross-linking and inflammation in angiotensin II-induced hypertensive rats[J]. Clin Sci (Lond), 2014, 126(1): 85-94.
- [9] ZUO Y, CHUN B, POTTHOFF S A, et al. Thymosin  $\beta_4$  and its degradation product, Ac-SDKP, are novel reparative factors in renal fibrosis[J]. Kidney Int, 2013, 84(6): 1166-1175.
- [10] ZHANG L, XU L M, CHEN Y W, et al. Antifibrotic effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline on bile duct ligation induced liver fibrosis in rats[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(37): 5283-5288.
- [11] WANG Z, CHEN C, FINGER S N, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid: a potential epigenetic therapeutic agent for lung fibrosis[J]. Eur Respir J, 2009, 34(1): 145-155.
- [12] HASHIMOTO-KOMATSU A, HIRASE T, ASAKA M, et al. Angiotensin II induces microtubule reorganization mediated by a deacetylase SIRT2 in endothelial cells[J]. Hypertens Res, 2011, 34(8): 949-956.
- [13] SCHOFIELD A V, STEEL R, BERNARD O. Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) protein controls microtubule dynamics in a novel signaling pathway that regulates cell migration[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(52): 43620-43629.
- [14] SCHOFIELD A V, GAMELL C, SURYADINATA R, et al. Tubulin polymerization promoting protein 1 (Tppp1) phosphorylation by Rho-associated coiled-coil kinase (rock) and cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) inhibits microtubule dynamics to increase cell proliferation[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(11): 7907-7917.
- [15] WILLIAMS K A, ZHANG M, XIANG S Y, et al. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylates histone deacetylase 6 (HDAC6) at serine 1035 to stimulate cell migration[J]. J Biol Chem, 2013, 288(46): DOI: 10.1074/jbc.M113.472506.
- [16] JOSHI A D, BARABUTIS N, BIRMPAS C, et al. Histone deacetylase inhibitors prevent pulmonary endothelial hyperpermeability and acute lung injury by regulating heat shock protein 90 function[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015, 309(12): L1410-1419.
- [17] NOH H, KIM H J, YU M R, et al. Heat shock protein 90 inhibitor attenuates renal fibrosis through degradation of transforming growth factor-beta type II receptor[J]. Laboratory Investigation, 2012, 92(11): 1583-1596.
- [18] ABU-ELSAAD N M, SERRYA M S, EL-KAREF A M, et al. The heat shock protein 90 inhibitor, 17-AAG, attenuates thioacetamide induced liver fibrosis in mice[J]. Pharmacological Reports, 2016, 68(2): 275-282.