

网络出版时间:2025-02-06 15:18:43 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250206.1137.008

BRD4 通过 HMGB1/TGF- β 1/Smad 通路参与调控肺泡上皮细胞间质转化

陈茹茹¹, 韩璐¹, 何海兰^{1,2}, 郝小惠^{1,2}, 刘和亮^{1,2}, 郭灵丽^{1,3}⁽¹⁾ 华北理工大学公共卫生学院, 唐山 063210;⁽²⁾ 河北省器官纤维化重点实验室, 唐山 063210; ⁽³⁾ 成都中医药大学医学技术学院, 成都 610075)

摘要 目的 探究溴结构域蛋白 4 (BRD4) 在转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 诱导的肺泡 II 型上皮细胞间质转化中的作用机制。方法 采用不同浓度 (5、10 ng/ml) 的 TGF- β 1 刺激 MLE-12 细胞 48 h 建立上皮间质转化 (EMT) 细胞模型, 并对细胞予以 50 nmol/L BRD4 抑制剂 JQ-1, 100 μ mol/L 高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 抑制剂甘草甜素 (GA) 和 3 μ g/ml 的重组高迁移率族蛋白 1 (rHMGB1) 预处理。实验分组为: 对照组、TGF- β 1 组、JQ-1 组、JQ-1 + TGF- β 1 组、GA 组、GA + TGF- β 1 组、JQ-1 + TGF- β 1 + rHMGB1 组。采用 CCK-8 法检测 JQ-1 对细胞活力的影响; 采用 Western blot 检测 CDH1、ZO-1、Vimentin、 α -SMA、BRD4、HMGB1、TGF- β 1 及 Smad2/3、p-Smad2/3 的蛋白表达水平; 通过划痕实验检测细胞迁移能力。结果 与对照组比较, TGF- β 1 组 Vimentin、 α -SMA 蛋白表达增加, CDH1 和 ZO-1 蛋白表达降低, 提示 EMT 模型构建成功。在该模型中, BRD4、HMGB1 的表达明显增加。不同浓度的 JQ-1 均可抑制 MLE-12 的细胞活力, 且呈浓度依赖性。JQ-1 和 GA 均可缓解 TGF- β 1 诱导的 EMT 的发生, 并抑制由 TGF- β 1 引起的 HMGB1 表达的增加和 TGF- β 1/Smad2/3 通路的激活, 而采用 rHMGB1 上调 HMGB1 的表达可以减少 JQ-1 对 EMT 和 TGF- β 1/Smad2/3 通路的影响。此外, JQ-1 和 GA 均可以有效降低 TGF- β 1 诱导的细胞迁移; 而 rHMGB1 可以缓解 JQ-1 对细胞迁移速率的抑制作用。结论 BRD4 可通过影响 HMGB1/TGF- β 1/Smad2/3 信号通路调控肺泡 II 型上皮细胞向间质转化过程, 且 BRD4 可能成为抑制肺纤维化的一个潜在靶点。

关键词 溴结构域蛋白 4; 高迁移率族蛋白 1; TGF- β 1/Smad2/3; 上皮间质转化; 纤维化; JQ-1

中图分类号 R 135.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)02-0247-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.02.009

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种慢性、进行性的肺间质疾病, 其预后差, 临床治疗难度大^[1]。因此, 寻找有效的治疗 IPF 的靶点十分必要。上皮间质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT) 是上皮细胞向间质细胞转化的过程, 在该过程中转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 是其重要诱导剂, TGF- β 1/Smad 信号通路在肺纤维化的 EMT 形成过程中起关键性作用^[2]。溴结构域蛋白 4 (bromodomain-containing protein 4, BRD4) 作为溴结构域和超末端结构域蛋白家族成员之一, 可通过诱导 EMT 的进程促进肾纤维化的发生发展^[3-4]。高迁移率族蛋白

1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1) 是一种核蛋白, 参与 DNA 的修复、重组等过程。有研究表明^[5], HMGB1 通过 TGF- β 1/Smad2/3 信号通路诱导 EMT 参与博来霉素诱导的肺纤维化。重要的是, BRD4 通过直接影响 HMGB1 启动子区域来调节其表达进而参与骨关节炎进程^[6]。BRD4 是否通过 HMGB1 影响 TGF- β 1/Smad 信号通路活性, 调控肺纤维化相关 EMT 过程鲜有报道。因此, 该研究通过建立 TGF- β 1 诱导的肺泡上皮细胞 EMT 模型, 探究 BRD4 是否通过 HMGB1/TGF- β 1/Smad2/3 通路调控该过程, 以期寻找治疗 IPF 的潜在靶点提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株 MLE-12 细胞是从 5 月龄雌性小鼠的肺部分离出来的上皮细胞, 呈上皮细胞样, 贴壁生长, 购自美国 ATCC 公司。

1.2 主要试剂与仪器 DMEM/F12 培养基、青霉素-链霉素 (货号: 8123490、2441876, 美国 Gibco 公司); 胰蛋白酶-EDTA 消化液、DMSO 培养基 (货

2024-09-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81602814); 河北省自然科学基金 (编号: H2017209154); 河北省高等学校科学技术研究项目 (编号: BJ2017006)

作者简介: 陈茹茹, 女, 硕士研究生;

郭灵丽, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: lisjane@126.com

号:T1300、D8371,北京索莱宝科技有限公司);特级胎牛血清(货号:FB25015,美国 CLARK Bioscience 公司);重组人 TGF- β 1 因子(货号:100-21C-2UG,美国 Peprotech 公司);RIPA 裂解液(货号:P0013B,上海碧云天生物技术有限公司);特超敏 ECL 化学发光底物(货号:BL40012,河北贝博实验用品有限公司);CCK-8 试剂(货号:CK04,上海东仁化学科技有限公司);BRD4 抑制剂 JQ-1、HMGB1 抑制剂甘草甜素(glycyrrhizin, GA)(货号:S7110、S2302,美国 Selleck 公司);rHMGB1(货号:H4652,美国 Sigma 公司);BRD4 抗体、HMGB1 抗体、ZO-1 抗体、TGF- β 1 抗体、Smad2/3 抗体、p-Smad2/3 抗体(货号:R381011、R380710、511417、250346、382472、251795,成都正能生物技术有限责任公司);CDH1 抗体、Vimentin 抗体、GAPDH 抗体(货号:20874-1-AP、R22775、60004-1-tg,美国 Proteintech 公司);山羊抗小鼠兔抗体(货号:S0001,美国 Affinity 公司);CO₂ 培养箱、酶标仪(美国 Thermo 公司);SDS-PAGE 电泳仪和电转仪(美国 Bio-Rad 公司);化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与 EMT 模型建立 MLE-12 细胞培育于含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 DMEM/F12 培养基中,将其置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,当培养皿中细胞密度达到 90%~95% 时进行细胞传代。取对数生长期 MLE-12 细胞常规培养至 60% 融合度后,分别用 5、10 ng/ml 的 TGF- β 1 刺激 48 h。

1.3.2 实验分组 将 MLE-12 细胞分为 7 组:正常培养的 MLE-12 细胞为对照组;用含 50 nmol/L JQ-1 的培养基孵育 MLE-12 细胞 48 h,记为 JQ-1 组;使用含 10 ng/ml TGF- β 1 培养基培养 MLE-12 细胞 48 h,记为 TGF- β 1 组;使用含 50 nmol/L JQ-1 和 10 ng/ml TGF- β 1 培养基培养 MLE-12 细胞 48 h,记为 TGF- β 1 + JQ-1 组;使用含 100 μ mol/L GA 培养基培养 MLE-12 细胞 48 h,记为 GA 组;使用含 10 ng/ml TGF- β 1 和 100 μ mol/L GA 培养基培养 MLE-12 细胞 48 h,记为 TGF- β 1 + GA 组;使用含 10 ng/ml TGF- β 1、50 nmol/L JQ-1 和 3 μ g/ml 的 rHMGB1 培养基培养 MLE-12 细胞 48 h,记为 JQ-1 + TGF- β 1 + rHMGB1 组。

1.3.3 CCK-8 法检测细胞活力 将细胞悬液接种于 96 孔板中(8 000 个细胞/孔),待细胞贴壁 16~24 h 后,采用不同浓度(50、100、200、400、800

nmol/L)的 JQ-1 处理,每组设 3 个平行实验孔。培养 48 h 后每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂,继续培养 2 h 后,以 450 nm 波长检测每孔吸光度值,并按照公式计算细胞活力百分比。

1.3.4 Western blot 法测定蛋白表达 使用 RIPA 裂解缓冲液在冰上裂解细胞后提取总蛋白,BCA 法测定蛋白质浓度。经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,转移蛋白至硝酸纤维素膜上。并将硝酸纤维素膜于 5% 的脱脂奶粉中常温封闭 2 h,并随后将膜置于一抗中 4 °C 过夜,Tris-HCl 缓冲盐溶液洗膜 3 次,每次 10 min。二抗稀释液常温孵育 2 h,Tris-HCl 缓冲盐溶液洗膜 3 次,每次 10 min。用 ECL 化学发光法显影,利用 Image J 软件对蛋白条带进行灰度值分析,以 GAPDH 作为内参,计算各目的蛋白与 GAPDH 灰度值的比值。

1.3.5 划痕实验检测细胞迁移能力 将 MLE-12 细胞接种于 6 孔板,细胞贴壁 16~24 h 后,用 200 μ l 枪头垂直于孔板进行划痕,注意力度均一,吸掉培养基后,使用磷酸缓冲盐溶液冲洗 3 次,之后每孔加入 2 ml 培养基,选取任意 3 个划痕视野进行拍照,培养 48 h 后再次进行拍照,使用 Image J 软件计算细胞迁移面积,将迁移面积比作为反映细胞迁移能力的指标,迁移面积比越大即细胞的迁移能力越强。迁移面积百分比 = (0 h 划痕区域面积 - 48 h 划痕区域面积) / 0 h 划痕区域面积 $\times$ 100%,实验重复 3 次。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 23.0 软件进行统计分析,所有实验结果数据均使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据间的比较采用独立样本 *t* 检验,多组间的比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EMT 模型的建立 分别用 5、10 ng/ml 的 TGF- β 1 刺激 MLE-12 细胞 48 h,Western blot 结果显示,与对照组比较,5 ng/ml TGF- β 1 组 ZO-1 明显降低,Vimentin、 α -SMA、BRD4 和 HMGB1 的表达增加;10 ng/ml TGF- β 1 组 CDH1、ZO-1 降低,Vimentin、 α -SMA、BRD4 和 HMGB1 的表达增加(图 1A、B),以上结果差异均有统计学意义($P < 0.05$)。后续实验选取 10 ng/ml TGF- β 1 构建 EMT 模型。

2.2 抑制 BRD4 对 EMT、TGF- β 1/Smad2/3 通路以及细胞迁移能力的影响 CCK-8 结果显示,不同浓度 JQ-1 处理 MLE-12 细胞 48 h 后,细胞活力随着

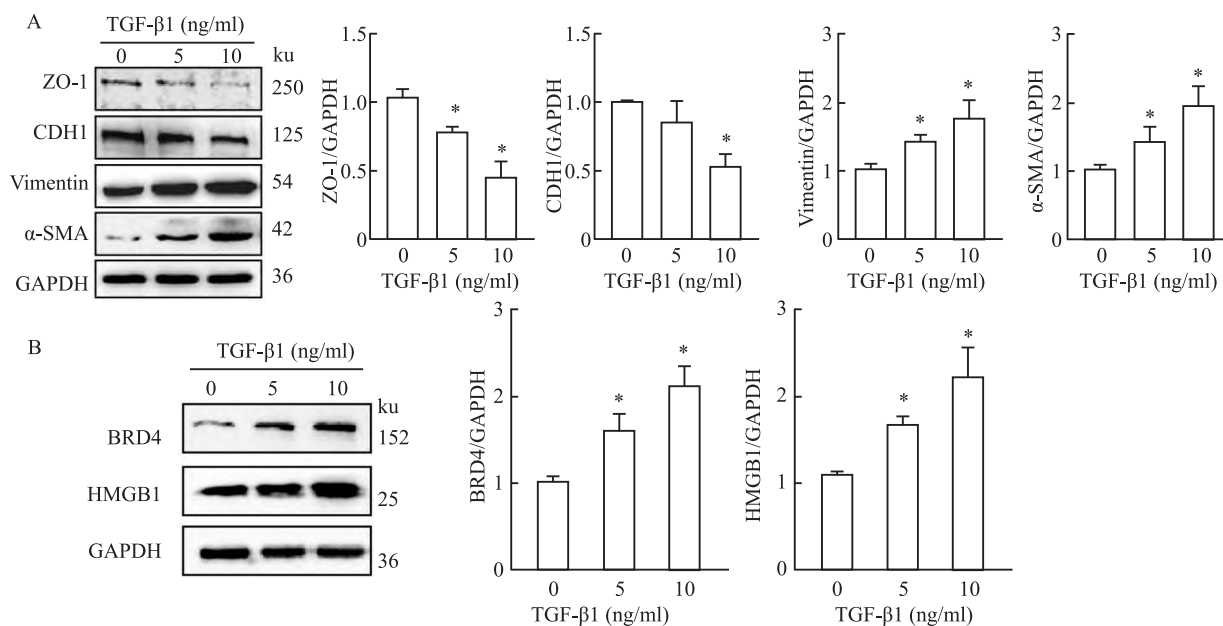


图1 细胞中 EMT 标志蛋白及 BRD4、HMGB1 的蛋白表达水平

Fig. 1 The protein levels of EMT markers, BRD4 and HMGB1 in cells

A: The expression of EMT markers in cells detected by Western blot; B: The expression of BRD4 and HMGB1 in cells detected by Western blot;

* $P < 0.05$ vs 0 ng/ml TGF- β 1 group.

JQ-1 浓度的增加而下降,其中,50 nmol/L 和 100 nmol/L 的 JQ-1 处理 MLE-12 细胞后的细胞活力百分比分别为 90% 和 69%,200、400、800 nmol/L JQ-1 组细胞活力均低于 60% (图 2A)。Western blot 结果显示,50 nmol/L 和 100 nmol/L 的 JQ-1 可降低 BRD4 的蛋白表达(图 2B)。因此选取 50 nmol/L JQ-1 进行后续实验。

采用 JQ-1 抑制 BRD4 的表达,明确 BRD4 在 TGF- β 1 诱导的 EMT 模型中的可能作用。如图 2C 所示,与对照组比较,TGF- β 1 处理组 CDH1 的表达降低, α -SMA 和 Vimentin 的表达增加;与 TGF- β 1 组比较,TGF- β 1 + JQ-1 组 CDH1 的表达增加, α -SMA 和 Vimentin 的表达下降;以上结果差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

如图 2D 所示,与对照组比较,JQ-1 组 BRD4、HMGB1 的表达有所降低($P < 0.05$),TGF- β 1 及 p-Smad2/3 无明显变化,TGF- β 1 组 BRD4、HMGB1、TGF- β 1 和 p-Smad2/3 表达均上升($P < 0.05$),但经 TGF- β 1 + JQ-1 联合处理后,与 TGF- β 1 组比较,以上蛋白表达均下降($P < 0.05$)。

划痕实验结果显示,与对照组比较,JQ-1 组细胞迁移能力无明显变化,TGF- β 1 组细胞迁移能力增加($P < 0.05$),但经 TGF- β 1 + JQ-1 联合处理后,与 TGF- β 1 组比较,其迁移能力下降($P < 0.05$),图

2E、F。

2.3 抑制 HMGB1 对 EMT、TGF- β 1/Smad2/3 通路以及细胞迁移能力的影响 如图 3A - C 所示,浓度为 100 μ mol/L 的 GA 可抑制 MLE-12 细胞中 HMGB1 的表达($P < 0.05$),因此,选取 100 μ mol/L 的 GA 进行后续实验。进一步研究发现,与对照组比较,TGF- β 1 处理可降低 CDH1 的表达,增加 α -SMA 和 Vimentin 的表达,诱导 EMT 的发生,并增加 BRD4、HMGB1、TGF- β 1 及 p-Smad2/3 的表达,而采用 GA 抑制 HMGB1 的表达后,可明显缓解 EMT 的发生以及减少以上蛋白的表达(均 $P < 0.05$)。

细胞划痕实验结果显示,与对照组比较,GA 组细胞迁移能力无明显变化,TGF- β 1 组细胞迁移能力增加($P < 0.05$),TGF- β 1 + GA 联合处理后,其细胞迁移能力下降($P < 0.05$),见图 3D、E。

2.4 HMGB1 过表达部分逆转 BRD4 抑制对 EMT、TGF- β 1/Smad2/3 通路及细胞迁移能力的影响 如图 4A 所示,浓度为 3 μ g/ml 的 rHMGB1 可增加 MLE-12 细胞中 HMGB1 的表达($P < 0.01$),因此,选取 3 μ g/ml 的 rHMGB1 进行后续试验。进一步研究发现(图 4B、C),与对照组比较,TGF- β 1 处理可降低 ZO-1 的表达,增加 α -SMA 和 Vimentin 的表达,诱导 EMT 产生,并增加 BRD4、HMGB1、TGF- β 1 及 p-Smad2/3 的表达,而采用 JQ-1 抑制 BRD4 的

表达后,可缓解 EMT 的发生并降低了 BRD4、HMGB1、TGF- β 1 及 p-Smad2/3 蛋白的表达水平,然而采用 rHMGB1 上调 HMGB1 的表达逆转了由 JQ-1 抑制 BRD4 表达而缓解的 TGF- β 1 诱导的 EMT 及

HMGB1、TGF- β 1 及 p-Smad2/3 的蛋白表达水平的降低(均 $P < 0.05$)。

细胞划痕实验结果显示,与对照组比较,TGF- β 1 组细胞迁移能力增加($P < 0.05$),JQ-1 抑制

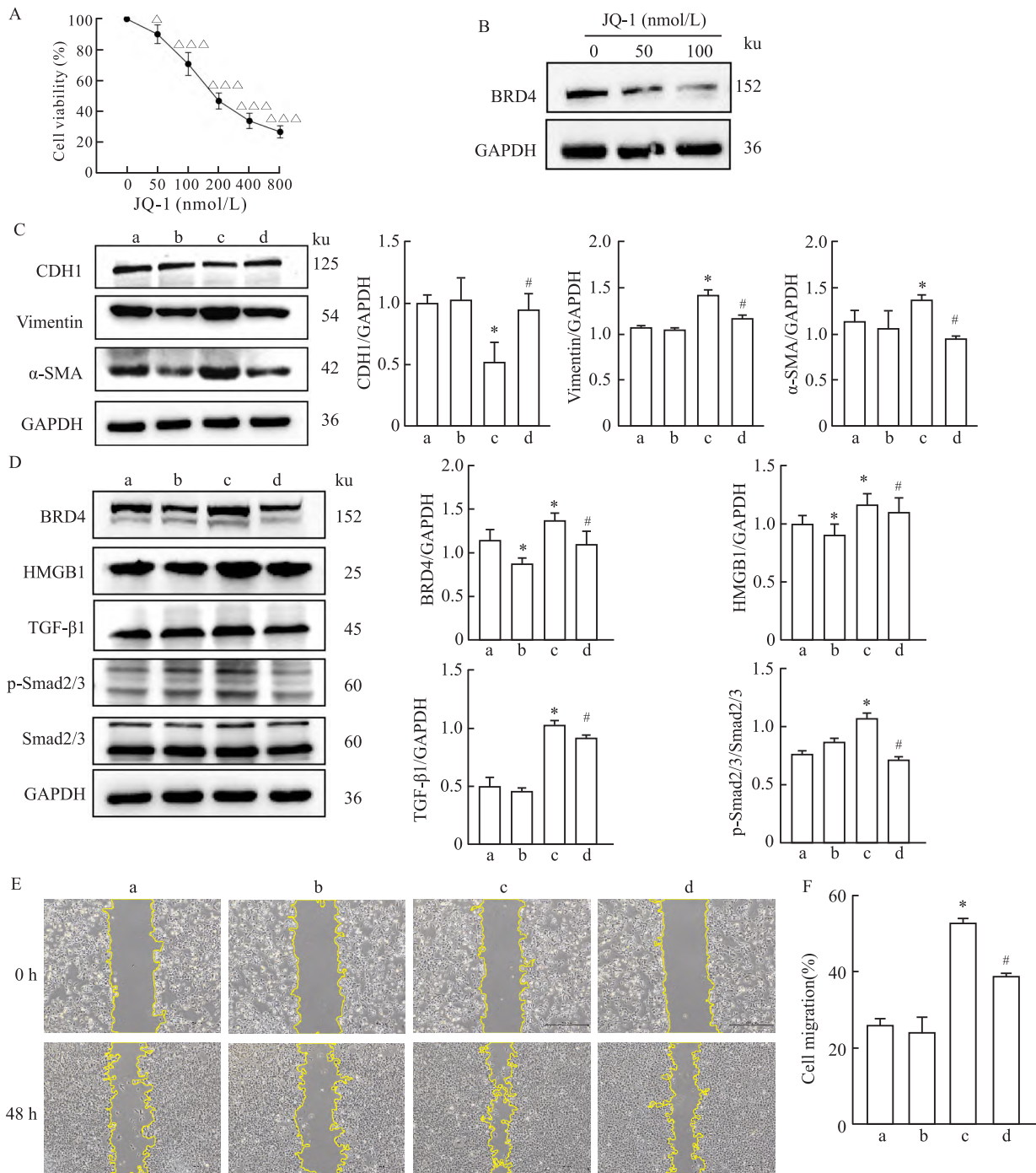
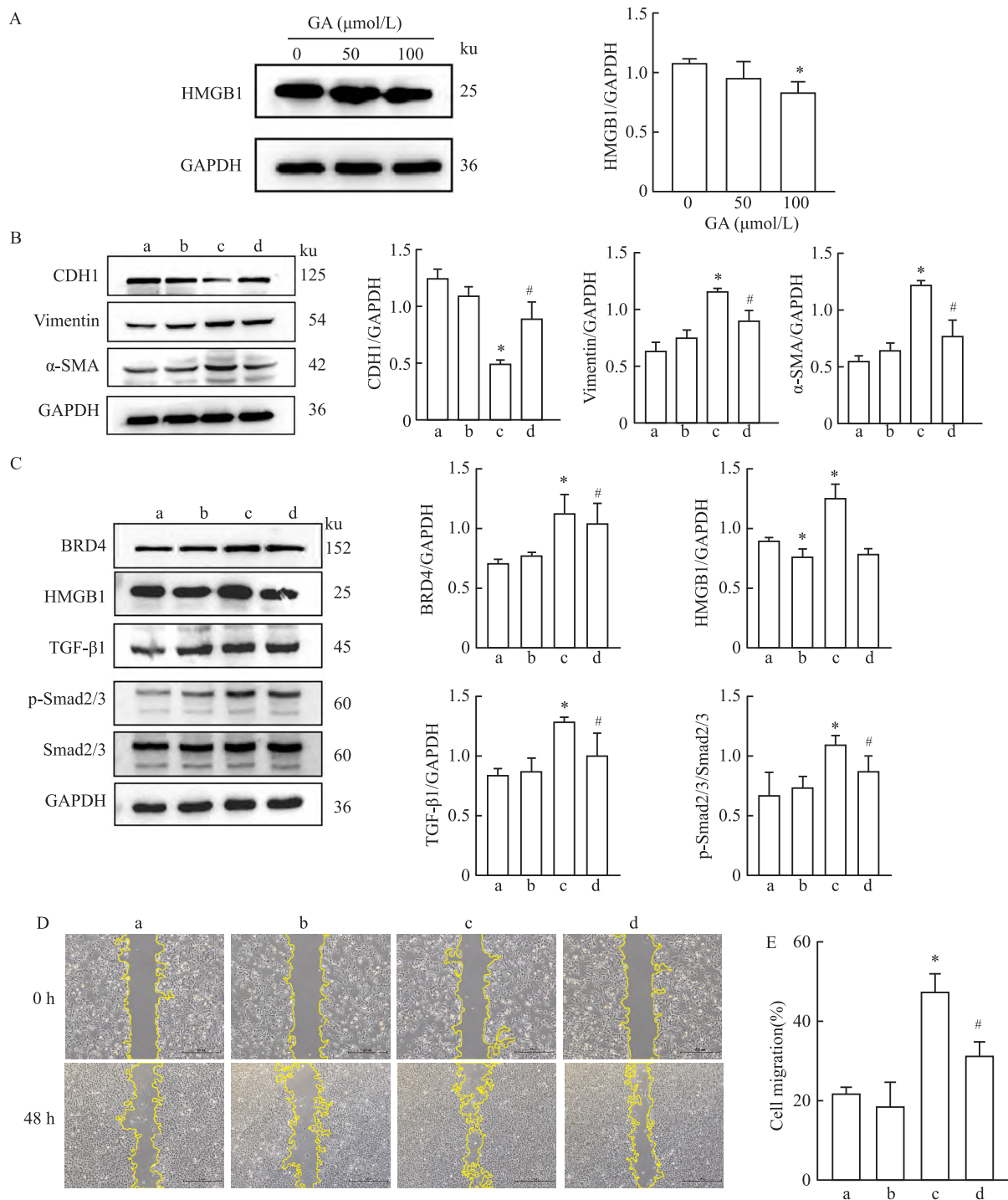


图2 抑制 BRD4 对 EMT、TGF- β 1/Smad2/3 通路以及细胞迁移能力的影响

Fig.2 The effect of BRD4 inhibition on EMT, TGF- β 1/Smad2/3 pathway, and cell migration

A: Cell viability detected by CCK-8; B: The expression of BRD4 detected by Western blot; C: The expression of EMT markers detected by Western blot; D: The expression of BRD4, HMGB1, TGF- β 1, Smad2/3 and p-Smad2/3 detected by Western blot; E, F: The migration ability of the cells detected by scratch assay and its statistical graph, bar = 500 μ m, $\times 40$; a: Control group; b: JQ-1 group; c: TGF- β 1 group; d: TGF- β 1 + JQ-1 group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs 0 nmol/L JQ-1 group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs TGF- β 1 group.

图3 抑制 HMGB1 对 EMT、TGF- β 1/Smad2/3 通路以及细胞迁移能力的影响Fig. 3 The effect of HMGB1 inhibition on EMT, TGF- β 1/Smad2/3 pathway, and cell migration

A: The expression of HMGB1 detected by Western blot; B: The expression of EMT markers detected by Western blot; C: The expression of BRD4, HMGB1, TGF- β 1, Smad2/3 and p-Smad2/3 detected by Western blot; D, E: The migration ability of the cells detected by scratch assay and its statistical graph, bar = 500 μm , $\times 40$; a: Control group; b: GA group; c: TGF- β 1 group; d: TGF- β 1 + GA group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs TGF- β 1 group.

BRD4 表达后,其细胞迁移能力下降 ($P < 0.05$), rH-MGB1 上调 HMGB1 表达增强了细胞迁移能力,见图 4D、E (均 $P < 0.05$)。

3 讨论

IPF 是一种进行性、致命的纤维化肺疾病。尽

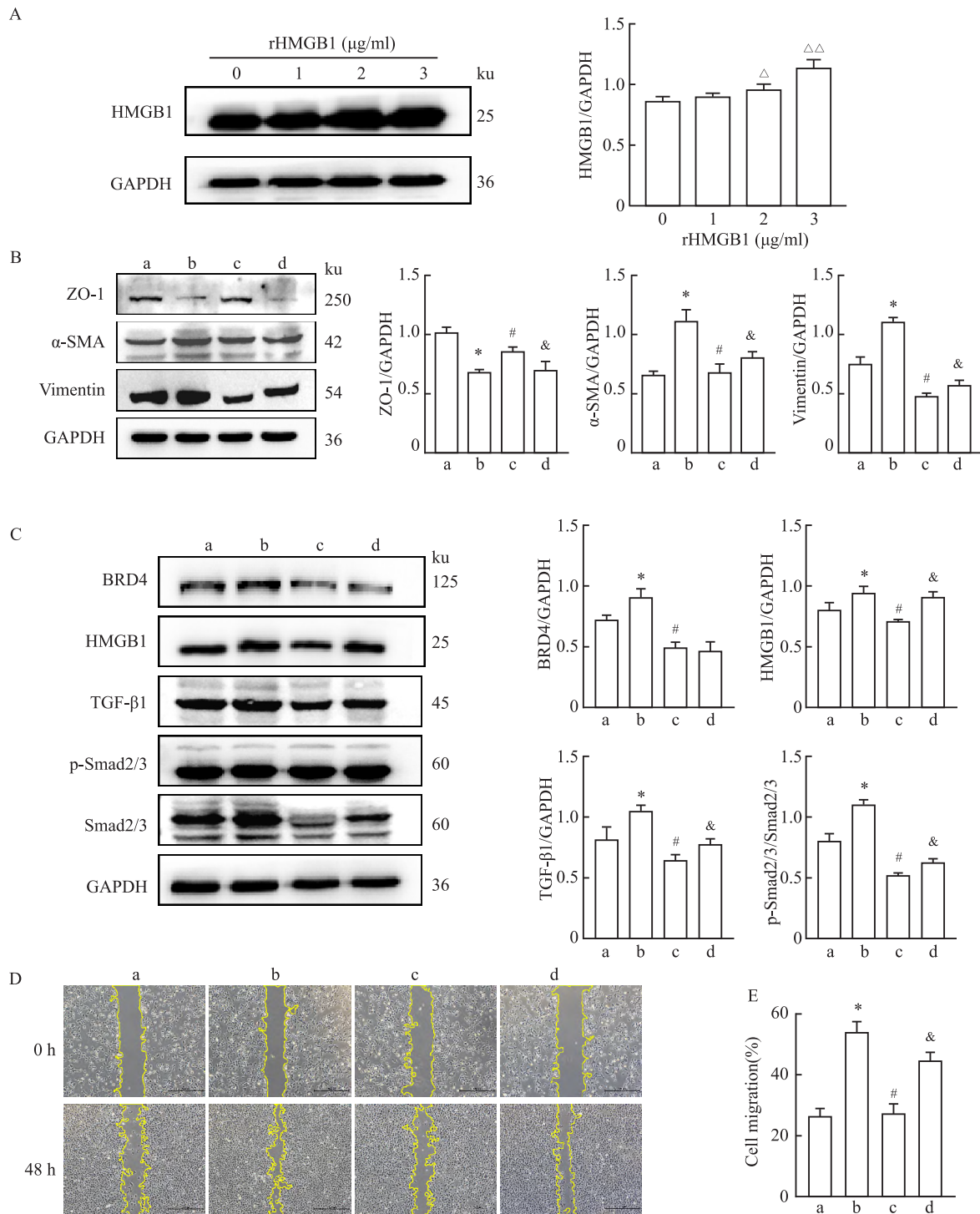


图4 HMGB1 过表达部分逆转 BRD4 抑制对 EMT、TGF-β1/Smad2/3 通路及细胞迁移能力的影响

Fig. 4 The effect of inhibition of BRD4 on EMT, TGF-β1/Smad2/3 pathway and cell migration reversed by HMGB1 overexpression

A: The expression of HMGB1 detected by Western blot; B: The expression of EMT markers detected by Western blot; C: The expression of BRD4, HMGB1, TGF-β1, Smad2/3 and p-Smad2/3 detected by Western blot; D, E: The migration ability of the cells detected by scratch assay and its statistical graph, bar = 500 μm, ×40; a: Control group; b: TGF-β1 group; c: JQ-1 + TGF-β1 group; d: JQ-1 + TGF-β1 + rHMGB1 group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs TGF-β1 group; & $P < 0.05$ vs JQ-1 + TGF-β1 group; $^{\Delta} P < 0.05$, $^{\Delta\Delta} P < 0.01$ vs 0 μg/ml rHMGB1.

管在过去十年中,对 IPF 的探索取得了重大进展,但 IPF 的确切发病机制尚未完全阐明。肺移植是 IPF 的主要治疗方法^[7],吡非尼酮和尼达尼布治疗可以

显著改善 IPF 患者的肺功能并减缓疾病进展^[8]。但由于供体器官的有限性,药物的副作用、耐受性等问题,寻找 IPF 新的治疗方法仍具有十分重要的现实

意义。EMT 是生成肌成纤维细胞的重要方式之一,由肌成纤维细胞产生过量的细胞外基质是导致肺内胶原沉积,最终引起肺纤维化的重要原因。因此,EMT 在肺纤维化中发挥着重要作用^[2]。

溴结构域和超末端结构域蛋白已成为癌症、肥胖、炎症和纤维化疾病的有前途的治疗靶点^[9]。BRD4 在肿瘤和纤维化疾病中的作用已被广泛研究,在血管紧张素 II 诱导的小鼠肾纤维化模型中,采用化学抑制剂 JQ1 抑制 BRD4 表达后,可通过减弱 EMT 进程来缓解肾纤维化^[10]。在博来霉素诱导的肺纤维化中,抑制 BRD4 的表达能够抑制肺成纤维细胞的促纤维化作用并改善肺纤维化^[11]。Tian et al^[12]研究发现,BRD4 参与调节 TGF- β 诱导的气道上皮细胞 EMT 转化过程,且抑制 BRD4 的表达可以改善 TGF- β 诱导的小鼠肺纤维化。本研究中,在 TGF- β 1 诱导的肺泡上皮细胞 EMT 模型中,BRD4 的表达增加,TGF- β 1/Smad 通路活化,降低 BRD4 表达后可有效减少 EMT 的发生并抑制 TGF- β 1/Smad 通路活化,同时,减少 BRD4 的表达还可以降低肺泡上皮细胞的迁移能力,这提示 BRD4 可能通过 TGF- β 1/Smad 信号转导参与调控肺泡上皮细胞 EMT 过程。HMGB1 是一种广泛存在于真核细胞核内的转录调节因子。先前的研究^[13]表明,在肺纤维化疾病中,增加或减弱 HMGB1 表达可增强或抑制 TGF- β 1 对 EMT 过程的促进作用。抑制 HMGB1 的表达能够减轻 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞 EMT 过程,并且 HMGB1 可通过调控 TGF- β 1/Smad 信号通路参与小鼠急性肺损伤后肺纤维化。本研究通过下调细胞中 HMGB1 的表达来探究 HMGB1 是否可以通过调节 TGF- β 1/Smad 信号通路参与 TGF- β 1 诱导的 MLE-12 细胞 EMT 过程,发现抑制 HMGB1 的表达同样抑制了 TGF- β 1/Smad 信号转导,减弱了 EMT 并逆转了上皮细胞的迁移能力。同时,本研究发现,在 TGF- β 1 诱导的肺泡上皮细胞 EMT 模型中,抑制 BRD4 的表达可以下调 HMGB1 的表达。有研究^[14]显示,BRD4 可调节 HMGB1 的表达来参与大鼠酒精性肝病模型的炎症反应,这为 BRD4 通过调控 HMGB1/TGF- β 1/Smad 参与肺纤维化的机制研究进一步提供了依据。接下来,为探究 BRD4 可通过调控 HMGB1 进而调控 TGF- β 1/Smad 信号转导参与调控肺泡上皮细胞 EMT 过程,本研究下调 BRD4 的同时激活 HMGB1 的表达后发现,HMGB1 的上调缓解了 BRD4 降低对 TGF- β 1 诱导的 EMT 及 TGF- β 1/Smad 信号通路活化和细胞迁移速率的抑制作用,这

证明了 BRD4 与 HMGB1 可能存在上下游调控关系,BRD4 可能参与调控下游 HMGB1 的表达,而 HMGB1 是否为 BRD4 的直接靶点还需要进一步实验探索。本研究仅在细胞层面上验证了 BRD4 对 HMGB1 的调控作用,BRD4 可通过调控 HMGB1/TGF- β 1/Smad 通路参与 IPF 的作用机制还需要进一步的探究。

综上所述,BRD4 可通过影响 HMGB1/TGF- β 1/Smad 信号通路的活性调节小鼠肺泡上皮细胞 EMT 过程,从而调控肺纤维化的进展。BRD4 可能成为抑制肺纤维化的一个潜在靶点。

参考文献

- [1] Della Latta V, Cecchetti A, Del Ry S, et al. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: from biological mechanisms to counteractions[J]. Pharmacol Res, 2015, 97: 122 - 30. doi: 10.1016/j.phrs.2015.04.012.
- [2] Andugulapati S B, Gourishetti K, Tirunavalli S K, et al. Biochanin-a ameliorates pulmonary fibrosis by suppressing the TGF- β mediated EMT, myofibroblasts differentiation and collagen deposition in *in vitro* and *in vivo* systems[J]. Phytomedicine, 2020, 78: 153298. doi: 10.1016/j.phymed.2020.153298.
- [3] Tan Y F, Wang M, Chen Z Y, et al. Inhibition of BRD4 prevents proliferation and epithelial - mesenchymal transition in renal cell carcinoma *via* NLRP3 inflammasome-induced pyroptosis[J]. Cell Death Dis, 2020, 11 (4): 239. doi: 10.1038/s41419 - 020 - 2431 - 2.
- [4] Wang X, Zhou Y, Peng Y, et al. Bromodomain-containing protein 4 contributes to renal fibrosis through the induction of epithelial-mesenchymal transition [J]. Exp Cell Res, 2019, 383 (2): 111507. doi: 10.1016/j.yexcr.2019.111507.
- [5] Li L C, Li D L, Xu L, et al. High-mobility group box 1 mediates epithelial-to-mesenchymal transition in pulmonary fibrosis involving transforming growth factor- β 1/Smad2/3 signaling[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2015, 354(3): 302 - 9. doi: 10.1124/jpet.114.222372.
- [6] Jiang Y, Zhu L, Zhang T, et al. BRD4 has dual effects on the HMGB1 and NF- κ B signalling pathways and is a potential therapeutic target for osteoarthritis[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863 (12): 3001 - 15. doi: 10.1016/j.bbadis.2017.08.009.
- [7] George P M, Patterson C M, Reed A K, et al. Lung transplantation for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Lancet Respir Med, 2019, 7(3): 271 - 82. doi: 10.1016/S2213 - 2600 (18)30502 - 2.
- [8] Vancheri C, Kreutere M, Richeldi L, et al. Nintedanib with add-on pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Randomized Controlled Trial, 2018, 197(3): 356 - 63. doi: 10.1164/rccm.201706 - 1301OC.
- [9] Archer S L, Marsboom G, Kim G H, et al. Epigenetic attenuation

- of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension: a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target[J]. *Circulation*, 2010, 121(24): 2661–71. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.916098.
- [10] Zhou B, Mu J, Gong Y, et al. BRD4 inhibition attenuates unilateral ureteral obstruction-induced fibrosis by blocking TGF- β -mediated NOX4 expression[J]. *Redox Biol*, 2017, 11: 390–402. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.031.
- [11] 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): 470–9. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.04.020.
- [12] Tian B, Zhao Y, Sun H, et al. BRD4 mediates NF- κ B-dependent epithelial-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis *via* transcriptional elongation[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 311(6): L1183–201. doi: 10.1152/ajplung.00224.2016.
- [13] Qu J, Zhang Z, Zhang P, et al. Downregulation of HMGB1 is required for the protective role of Nrf2 in EMT-mediated PF[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 8862–72. doi: 10.1002/jcp.27548.
- [14] Lan Y, Yan R, Shan W, et al. Salvianic acid A alleviates chronic alcoholic liver disease by inhibiting HMGB1 translocation *via* down-regulating BRD4[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(15): 8518–31. doi: 10.1111/jcmm.15473.

BRD4 regulates alveolar epithelial-mesenchymal transition through HMGB1/TGF- β 1/Smad pathway

Chen Ruru¹, Han Lu¹, He Hailan^{1,2}, Hao Xiaohui^{1,2}, Liu Heliang^{1,2}, Guo Lingli^{1,3}

(¹*School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210;*

²*Hebei Key Laboratory of Organ Fibrosis, Tangshan 063210;* ³*College of Medical Technology,*

Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075)

Abstract Objective To investigate the mechanisms of bromodomain-containing protein 4 (BRD4) in TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar type II epithelial cells. **Methods** MLE-12 cells were stimulated with different concentrations (5 ng/ml, 10 ng/ml) of TGF- β 1 for 48 h to establish an EMT cell model. The cells were pretreated with 50 nmol/L BRD4 inhibitor JQ-1, 100 μ mol/L high mobility group box 1 protein (HMGB1) inhibitor glycyrrhizin acid (GA), and 3 μ g/ml rHMGB1. The experimental groups were divided as follows: control group, TGF- β 1 group, JQ-1 group, JQ-1 + TGF- β 1 group, GA group, GA + TGF- β 1 group, and JQ-1 + TGF- β 1 + rHMGB1 group. The effect of JQ-1 on cell viability was examined using cell counting kit-8 (CCK-8). The protein expression levels of CDH1, ZO-1, Vimentin, α -SMA, BRD4, HMGB1, TGF- β 1, Smad2/3 and p-Smad2/3 were detected by Western blot. The cell migration ability was detected by a scratch test. **Results** Compared with the control group, the levels of Vimentin and α -SMA in the TGF- β 1 group increased, and the levels of CDH1 and ZO-1 protein decreased, suggesting that the EMT model was successfully established. In this model, the expression of BRD4 and HMGB1 significantly increased. Different concentrations of JQ-1 could inhibit the cell viability of MLE-12 in a concentration-dependent manner. Both JQ-1 and GA could effectively alleviate TGF- β 1-induced EMT, and reduce the increase in HMGB1 expression and the activation of TGF- β 1/Smad2/3 pathway caused by TGF- β 1. Moreover, rHMGB1 treatment could reduce the effects of JQ-1 on EMT and the TGF- β 1/Smad2/3 pathway. Additionally, both JQ-1 and glycyrrhizin could effectively decrease TGF- β 1-induced cell migration, whereas rHMGB1 could alleviate the inhibitory effect of JQ-1 on the rate of cell migration. **Conclusion** BRD4 can regulate epithelial-mesenchymal transition in alveolar type II epithelial cells via HMGB1/TGF- β 1/Smad2/3 signaling cascade, and BRD4 may be a potential target for inhibition of pulmonary fibrosis.

Key words BRD4; HMGB1; TGF- β 1/Smad2/3; EMT; fibrosis; JQ-1

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 81602814); Natural Science Foundation of Hebei Province (No. H2017209154); Scientific Research Projects of Higher Education Institutions in Hebei Province (No. BJ2017006)

Corresponding author Guo Lingli, E-mail: lisjane@126.com