

Role of fstatin like protein-1 and autophagy in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice

Wuriliga¹ Ying Liu^{2*}

1. Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou, Inner Mongolia, 014040, China

2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the Third Clinical College of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou, Inner Mongolia, 014030, China

Abstract

Objective: To explore how FSTL1 and autophagy affect the occurrence and development of pulmonary fibrosis (PF), and to provide a theoretical basis for the prevention and treatment of PF. **Methods:** The mice were randomly divided into four groups, the pulmonary fibrosis model was established by intratracheal infusion of bleomycin, and the changes of lung tissue were observed by different treatments. Groups A, B and C were given bleomycin and group E was given saline. HE and Masson staining were used to observe the changes of inflammation and pulmonary fibrosis, α -SMA and collagen1 protein were detected by IHC, serum FSTL1 and TGF- β contents were detected by Elisa, and LC3B and p62 protein expressions were detected by WB. **Results:** After 7 days of administration of bleomycin, the level of autophagy in lung tissue decreased and the level of FSTL1 increased. After autophagy inhibition treatment, pulmonary fibrosis was aggravated, the level of FSTL1 was increased, and the degree of inflammation was increased. There were differences in the severity of pulmonary fibrosis and the expression level of autophagy related proteins in mice compared with the early treatment of bleomycin alone and the simultaneous treatment of autophagy inhibition. **Conclusion:** Inhibition of autophagy leads to bleomycin-induced pulmonary fibrosis and increased FSTL1 expression in mice with pulmonary fibrosis, but no significant difference in FSTL1 expression was observed between the early stage of the disease and the autophagy inhibitor treatment.

Keywords

Follicle statin like protein 1; Autophagy; Pulmonary fibrosis; Idiopathic pulmonary fibrosis

卵泡抑素样蛋白 1 与细胞自噬在博来霉素诱导的小鼠肺纤维化中的作用

乌日力嘎¹ 刘颖^{2*}

1. 内蒙古科技大学包头医学院, 中国·内蒙古 包头 014040

2. 内蒙古科技大学包头医学院第三临床医学院呼吸与危重症医学科, 中国·内蒙古 包头 014030

摘要

目的: 探究FSTL1与自噬如何影响肺纤维化(PF)的发生发展, 为PF的预防与治疗提供理论基础。**方法:** 将小鼠随机分为四组, 采用气管内滴注博来霉素建立肺纤维化模型, 并通过不同处理观察小鼠肺组织变化。A、B、C组滴入博来霉素, E组滴入生理盐水。进行HE和Masson染色观察炎症及肺纤维化改变, 使用IHC检测 α -SMA、collagen1蛋白, Elisa检测血清FSTL1与TGF- β 含量, WB检测LC3B、p62蛋白表达。**结果:** 博来霉素给药7天后, 小鼠肺组织自噬水平下降, FSTL1水平升高。抑制自噬处理后, 肺纤维化加重, FSTL1水平升高, 炎症程度增加。对比单纯博来霉素给药初期与同时进行抑制自噬处理, 小鼠肺纤维化严重程度及自噬相关蛋白表达水平存在差异。**结论:** 在肺纤维化疾病中, 自噬的抑制会导致博来霉素诱导的小鼠肺纤维化加重及FSTL1表达增加, 但在疾病初期与自噬抑制剂处理后的FSTL1表达方面未见显著差异。

关键词

卵泡抑素样蛋白1; 细胞自噬; 肺纤维化; 特发性肺纤维化

1 引言

【作者简介】乌日力嘎(1999-), 女, 蒙古族, 中国内蒙古锡林郭勒盟人, 硕士, 主任医师, 从事呼吸内科研究。

【通讯作者】刘颖(1980-), 女, 蒙古族, 中国内蒙古呼伦贝尔人, 博士, 主任医师, 从事呼吸内科学研究。

肺纤维化(PF)是慢性、进行性、纤维化性间质性肺疾病, 主要特征是正常肺泡结构破坏, 成纤维细胞增殖与凋亡失衡, 细胞外基质沉积与降解失衡。好发于中老年人, 病因未明, 常见风险因素包括吸烟、微生物感染、生活习惯、环境影响和遗传。PF属于肺间质疾病(ILDs), 其中特发

性肺纤维化 (IPF) 最为常见, 表现为呼吸衰竭和肺功能进行性下降, 预后差、死亡率高。

近年来, 卵泡抑素样蛋白 1 (FSTL1) 在肺纤维化中的作用受到关注。FSTL1 是一种分泌性糖蛋白, 参与多种生物学活动, 包括细胞增殖、分化、凋亡等。在呼吸系统疾病中, FSTL1 具有促纤维化作用, 可能通过 TGF- β 1/mapk 非经典途径影响肺纤维化疾病, 进一步影响肺成纤维细胞的分化、增殖等, 从而加剧肺纤维化的发生、发展。

鉴于 FSTL1 和自噬在肺纤维化中的重要作用, 当前研究对于 FSTL1 与细胞自噬在 PF 疾病中的关系尚不充分。因此, 本研究旨在探究 FSTL1 与自噬如何影响 IPF 的发生发展, 为肺纤维化疾病的预防与治疗提供理论基础。通过深入研究 FSTL1 和自噬在肺纤维化中的作用机制, 有望为开发新的治疗方法和药物提供新的思路, 从而改善肺纤维化患者的预后和生活质量。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 实验动物

24 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 6-8 周龄, 体重 (20g \pm 2g), 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司【SCXK (京) 2019-0010】。饲养环境: 室内保持温度 25 $^{\circ}$ C, 动物自由摄食及饮用纯净水。本研究通过内蒙古科技大学包头医学院实验动物福利伦理委员会审查批准 (包医动伦审【2023】60)。

2.1.2 主要药物

博来霉素购自北京博奥拓达科技有限公司。氯喹购自河北品科研科技有限公司。

2.1.3 主要试剂

苏木素伊红 (HE) 染色试剂盒、Masson 三色染色试剂盒、小鼠卵泡抑素样蛋白 1 (FSTL-1) 酶联免疫吸附测定试剂盒、转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 酶联免疫吸附测定试剂盒、BCA 蛋白定量检测试剂盒、重组 Anti-SQQT1/p62 抗体、Anti-alpha smooth muscle Actin 抗体、collagen1 抗体、Anti-LC3B 抗体^[2]。

2.2 方法

2.2.1 分组与模型建立

将小鼠随机分为生理盐水组 (E 组)、博来霉素诱导 7 天组 (A 组)、博来霉素诱导 28 天组 (B 组)、博来霉素诱导 28 天 + 自噬抑制组 (C 组), 每组 6 只。采用气管内滴注博来霉素建立肺纤维化模型。腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉小鼠 (60mg/kg), 在咽喉部光源照射下经声门裂进行气管插管, A、B、C 组滴入 5mg/kg 博来霉素 (BLM), 生理盐水组滴入等量生理盐水, 滴入后轻轻晃动小鼠, 使药物均匀分布于肺内。造模当日记为 0 天, 正常饲养, 分别于第 7 天及第 28 天取材。B 组小鼠于博来霉素给药第 2 天腹腔注射氯喹 (50mg/Kg), 隔天一次, 28 天后取材。

2.2.2 组织学检查

小鼠肺组织经石蜡切片后进行 HE 和 Masson 染色, 采集图像分析。气道炎症细胞浸润评分参照 Szapiel 等人的方法, 采用盲法, 根据支气管、细支气管炎症浸润程度 (得分 0~4 分) 进行肺炎评分^[3]。应用 Image-pro plus6.0 图像分析软件, 计算气道周围胶原纤维阳性相对着色面积, 进行定量分析。

2.2.3 免疫组织化学 (IHC) 检测 α -SMA、collagen1 蛋白

小鼠肺组织石蜡切片常规脱蜡至水, 参照说明书进行操作, 蛋白阳性染色位于细胞质, 光学显微镜下观察阳性细胞可呈淡黄色、黄色、棕黄色, 应用 Fiji-ImageJ 图像分析软件, 计算相对阳性染色面积, 对数据进行定量分析。

2.2.4 ELISA 检测小鼠血清 FSTL1 与 TGF- β 含量

留取小鼠血液标本后, 离心分离血清。按照试剂盒说明书进行血清指标含量检测, 分别统计不同浓度标准品的 OD 值, 绘制出标准品的回归曲线等, 计算样本浓度, 进行定量分析。

2.2.5 Western blot 检测小鼠肺组织 LC3B、p62 蛋白的表达

将肺组织样本剪碎离心取上清, 弃掉沉淀。调整各组总蛋白浓度使每孔上样量一致, 凝胶垂直电泳分离后转膜。一抗反应、洗膜, 二抗反应、洗膜倒入曝光盒中, 扫描胶片, 用 Image J 软件分析灰度值。

2.3 统计学分析

采用 Spss20.0 软件进行统计学分析, 所有数据资料采用均数 \pm 标准差 (\pm s) 表示, 各组数据采用单因素方差分析法, 多重两两比较采用 Bonferroni 检验法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。作图采用 GraphPad Prims 9.5、Fiji-Image J、Image J Pro Plus 软件。

3 结果

实验小鼠一般情况: 小鼠造模后饲养过程中, E 组 (NS 组) 毛色光泽, 精神状态良好, 饮食饮水正常。A 组 (BLM7d)、B 组 (BLM28d)、C 组 (BLM28d+CQ) 组小鼠造模后可观察到毛色逐渐干枯, 精神萎靡, 饮食饮水减少, 下肢皮肤紫绀, 伴有抓鼻等。

E 组 (NS 组) 肺组织形态正常, 未见炎性细胞及纤维化病灶, 肺泡壁薄, 肺泡腔均一, 气道由单层上皮细胞构成。A 组 (BLM7d 组) 小鼠肺组织损伤明显, 肺泡壁增厚, 肺泡腔变小狭窄, 有少量炎细胞浸润。B 组 (BLM28d 组) 小鼠肺组织形态轻度损伤, 肺泡壁略有增厚, 部分肺泡腔融合变大, 有少量炎细胞浸润。C 组 (BLM28d+CQ 组) 小鼠肺组织损伤明显, 肺泡壁增厚, 肺泡腔融合变大, 有较多炎症细胞浸润及红细胞出现^[4]。

BLM 造模后, A 组及 C 组气道周围炎症评分显著高于 E 组, $P < 0.05$, B 组与 E 组无明显差异, $P > 0.05$ 。BLM

给药7天与28天后气道周围炎症评分无显著差异, $P > 0.05$, 但 BLM 给药 28 天后肺组织形态学改变较 7 天减轻, 提示炎症细胞浸润先上升后下降。A 组气道周围炎症评分与 B 组、C 组无统计学差异, $P > 0.05$, 但与 E 组有显著差异, $P < 0.05$ 。C 组气道周围炎症评分显著高于 B 组及 E 组, $P < 0.05$, 与 A 组相比无显著差异, $P > 0.05$ 。

综上所述, BLM 气道内给药后 7 天内可诱导气道周围炎症细胞浸润显著增加, 随时间延长, 炎症细胞浸润趋于正常但未完全恢复^[5]。给予自噬抑制剂可增加 BLM 诱导的肺泡及气道周围炎症。

IHC 检测显示, E 组 (NS 组) 小鼠肺组织中 α -SMA 及 Collagen 1 表达较低。BLM 造模后, A 组 (BLM7d 组)、B 组 (BLM28d 组) 及 C 组 (BLM28d+CQ 组) 肺组织 α -SMA 及 Collagen 1 表达显著增加, 且 C 组表达最高。与 E 组相比, A、B、C 组差异均有统计学意义, $P < 0.05$ 。BLM 给药 7 天后, A 组 α -SMA 及 Collagen 1 表达显著高于 B 组, $P < 0.05$ 。C 组表达显著高于 A、B 及 E 组, $P < 0.05$ 。结果提示, BLM 给药后 α -SMA、Collagen 1 表达持续上升, 随时间下降但仍高于正常。给予自噬抑制剂后, 两者表达显著升高, 肺纤维化严重程度加剧。

Elisa 检测显示, E 组 (NS 组) 血清 FSTL-1 及 TGF- β 含量显著低于 A 组 (BLM7d 组) 及 C 组 (BLM28d+CQ 组), $P < 0.05$, 与 B 组 (BLM28d 组) 无明显差异, $P > 0.05$ 。BLM 造模后 7 天血清 FSTL-1 及 TGF- β 含量明显高于 28 天, $P < 0.05$ 。BLM 给药 28 天后与生理盐水组无显著差异, $P > 0.05$ 。给予自噬抑制剂后, C 组血清 FSTL-1 及 TGF- β 含量显著升高, 与 B 组及 E 组差异显著, $P < 0.05$, 与 A 组无显著差异, $P > 0.05$ 。表明造模初期 FSTL-1 及 TGF- β 含量升高, 随时间下降, 自噬抑制可使其含量回升至造模初期水平^[6]。

Western blot 结果显示, E 组 (NS 组) 小鼠肺组织 LC3B 蛋白表达高于 BLM 给药组, p62 表达低于其他三组, 差异均有统计学意义, $P < 0.05$ 。BLM 给药 7 天与 28 天后自噬水平差异显著, A 组 (BLM7d 组) LC3B 表达高于 B 组 (BLM28d 组), p62 表达低于 B 组, 差异均有统计学意义, $P < 0.05$ 。C 组 (BLM28d+CQ 组) LC3B 表达低于 A 组, p62 表达高于 A 组, 差异均有统计学意义, $P < 0.05$ 。BLM 诱导肺纤维化模型中, LC3B 表达下降, p62 升高。自噬抑制剂氯喹使用后 LC3B 表达下降, p62 表达升高。

4 讨论

肺部疾病是全球主要死亡原因之一, 肺纤维化 (PF) 是其中严重的一种, 其发病机制尚未完全了解。FSTL1 在不同肺部疾病中作用各异, 在肺纤维化中可能起促进作用。本研究发现, 在博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型中, 随着肺纤维化加重或缓解, FSTL1 和 TGF- β 表达水平也呈上

升或下降趋势, 进一步证明了 FSTL1 在肺纤维化中的负性作用。

自噬在肺部疾病发病机制中扮演不同角色。在 PF 中, 自噬可能参与调节成纤维细胞激活和修复功能。前期研究发现 FSTL1 可调节自噬在 COPD 中的气道重塑与炎症中发挥作用。然而, 在肺纤维化中, FSTL1 并非起保护作用, 而是促进纤维化。本研究观察到, 随博来霉素作用时间增加, 小鼠肺组织自噬水平逐渐上升, FSTL1 水平下降。FSTL1 缺失可上调博来霉素诱导的肺纤维化后成纤维细胞自噬水平, 但自噬水平上调是否影响肺纤维化严重程度尚未明确。

本研究还发现, 抑制自噬处理可加重肺纤维化, 提高 FSTL1 表达水平, 增加炎症程度。对比单纯博来霉素给药初期与同时进行抑制自噬处理, 小鼠肺纤维化严重程度及自噬相关蛋白表达水平有所差异, 但 FSTL1 及 TGF- β 表达水平无显著统计学差异。这些发现有助于进一步了解 FSTL1 和自噬在肺纤维化中的作用机制。

5 结语

综上所述, FSTL1 与细胞自噬在肺部相关疾病的病理生理学中发挥着关键作用, FSTL1 作为新一种炎症介质以及促纤维化因子, 自噬是一种细胞代谢过程, 双方都与肺部疾病息息相关。然而, 当前对于 FSTL1 与自噬相关研究集中在炎症性疾病及肿瘤等, 在肺部疾病中的研究相对较少, 且以分别影响肺部疾病的研究为主, 关于二者是否互相关联, 以及如何影响肺部疾病的研究甚少。本研究观察到在肺纤维化疾病中, 自噬的抑制会导致博来霉素诱导的小鼠肺纤维化的加重以及 FSTL1 表达的增加, 但是在疾病初期与自噬抑制剂处理后的 FSTL1 表达方面没有观察到明显的差异, 这可能是由于本实验动物数量不足导致的误差, 以及小鼠血清 FSTL1 表达与肺泡灌洗液 FSTL1 表达是否也会具有差异值得我们进一步研究。以上结果对于揭示二者的关联性以及理解自噬在呼吸系统疾病中的作用机制提供了科学依据, 有助于开发新的治疗策略和靶向疾病的治疗手段。但还远远不够, 未来的研究应该进一步探索 FSTL1 与自噬的关系、并深入研究其在肺纤维化疾病中的功能和机制, 为该领域的临床应用提供更多有益信息。

参考文献

- [1] PARRA E R, TEODORO W R, VELOSA A P P, et al. Interstitial and Vascular Type V Collagen Morphologic Disorganization in Usual Interstitial Pneumonia [J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2006, 54(12): 1315-25.
- [2] KIM H-C, JI W, KIM M Y, et al. Interstitial Pneumonia Related to Undifferentiated Connective Tissue Disease: Pathologic Pattern and Prognosis [J]. *CHEST*, 2015, 147(1): 165-72.
- [3] American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias [J]. 2002, 165(2): 277-304.