

## • 基础研究 •

## 大鼠间质性肺炎Ⅱ型肺泡上皮细胞自噬活性的变化及其机制研究

福建中医药大学 (福州 350122) 谢丛意 姚秀娟<sup>1</sup> 兰玉珠<sup>2</sup> 谢宝松<sup>1,3</sup>

**【摘要】目的** 探讨大鼠间质性肺炎Ⅱ型肺泡上皮细胞自噬活性的变化及其机制。**方法** 将 16 只 Wistar 雄性大鼠随机数字分为对照组 (A 组) 和实验组 (B 组), 每组 8 只。实验组雾化吸入博来霉素, 对照组雾化吸入等量生理盐水。所有大鼠于 28 d 处死, 收集各组肺组织标本。苏木精-伊红染色 (HE) 观察肺组织病理改变; Masson 三色染色法观察肺组织胶原纤维生成情况; 采用免疫黏附法分离Ⅱ型肺泡上皮细胞后, 采用蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 检测平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA)、泛素结合蛋白 p62、自噬微管相关蛋白轻链 3 (LC3 I/II)、磷酸化的蛋白激酶 B (p-Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 及其磷酸化形式 p-mTOR 的表达变化。**结果** 1) HE 染色显示, A 组大鼠肺组织呈正常表现, 未见肺泡炎及纤维化改变; B 组肺实质呈大片融合实变, 其间有少量巨噬细胞、中性粒细胞等炎性细胞浸润, 成纤维细胞增多, 肺泡间隔明显增厚, 可见胶原沉积。2) Masson 染色显示, A 和 B 组蓝色区域面积分别为  $(12.12 \pm 1.61) \text{ mm}^2$ 、 $(23.73 \pm 4.20) \text{ mm}^2$ , B 组蓝色面积大于 A 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); A 组蓝色区域主要集中在气管或血管周围, 肺间质只有少量散在的点状着色, B 组蓝色区域除气管和血管周围外, 肺间质也可见大量蓝色着色区, 呈片絮状。3) Western blot 结果显示, B 组  $\alpha$ -SMA 蛋白相对表达量高于 A 组; B 组 p62 蛋白相对表达量高于 A 组; B 组 LC3 II/I 比值低于 A 组; B 组 p-Akt 和 p-mTOR 相对表达量均高于 A 组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); A 组和 B 组 mTOR 蛋白相对表达量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。**结论** 大鼠间质性肺炎Ⅱ型肺泡上皮细胞出现细胞自噬活性抑制, Akt/mTOR 信号通路激活是其可能的机制之一。

**【关键词】** 自噬; 间质性肺炎; 肺纤维化; 博来霉素**【中图分类号】** R563.1<sup>+</sup>3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2019)03-0116-05

**Changes of autophagy activity and its mechanism in type II alveolar epithelial cells of rats with interstitial pneumonia** XIE Congyi, YAO Xiujuan, LAN Yuzhu, XIE Baosong, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China

**【Abstract】Objective** To investigate the changes of autophagy activity and its mechanism in type II alveolar epithelial cells of rats with interstitial pneumonia. **Methods** Sixteen male rats were randomly and averagely assigned into control group (Group A) and experimental group (Group B). Experimental group received bleomycin inhalation, while the control group received saline inhalation. Rats were sacrificed on the 28h days and lung tissue were collected. Hematoxylin-eosin staining (HE) was used to observe the pathological changes of lung tissue. Collagen fibers were evaluated by Masson staining. Type II alveolar epithelia were obtained by immune adhesion, and the expression of  $\alpha$ -SMA and autophagy markers (p62 and LC3 I/II) as well as signaling pathway proteins (p-mTOR/mTOR and p-Akt) of type II alveolar cells were assessed with Western blot. **Results** 1) Lung tissue morphology of group A was normal. In group B, large consolidation of lung parenchyma with mild infiltration of inflammatory cells (macrophages and neutrophils) and fibroblasts were found, and the alveolar interval was thickened with collagen deposition. 2) Masson staining showed that the blue area of Group B was significantly larger than Group A [ $(23.73 \pm 4.20) \text{ mm}^2$  vs  $(12.12 \pm 1.61) \text{ mm}^2$ ,  $P < 0.05$ ]. The stained area of Group A was concentrated around trachea and vessels, while the stained area of Group B was further detected in the lung mesenchyme, presented as flake form. 3) Western blot showed that the expression of  $\alpha$ -SMA of experimental group was higher than control group ( $P < 0.05$ ). The p62 levels of Group B were significantly higher than Group A ( $P < 0.05$ ). LC3 II/I ratio of Group B was lower than Group A ( $P < 0.05$ ). The expression of p-Akt and p-mTOR of experimental group was higher than control group ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the expression of mTOR between the two groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Autophagy activity is inhibited in type II alveolar epithelial cells of rat with interstitial pneumonia, possibly due to the activation of Akt/mTOR signaling pathway.

**【Key words】** autophagy; interstitial pneumonia; pulmonary fibrosis; bleomycin

1 福建医科大学省立临床医学院呼吸与危重症医学科; 2 福建医科大学; 3 通信作者, Email: xbaosong@126.com

特发性肺纤维化 (IPF) 为一种病因不明, 慢性进行性纤维化性间质性肺炎, 好发于中老年男性人群, 主要表现为进行性加重的呼吸困难, 伴限制性通气功能障碍和气体交换障碍, 导致低氧血症、甚至呼吸衰竭, 预后差<sup>[1]</sup>。IPF 的发病机制至今尚未阐明, 近年已有研究表明自噬功能障碍加快肺纤维化的发生发展<sup>[2]</sup>。目前间质性肺炎中 II 型肺泡上皮细胞自噬水平变化及其作用机制研究甚少。因此, 本研究旨在观察间质性肺炎 II 型肺泡上皮细胞中自噬相关蛋白 (LC3 I/II 和 p62) 及 Akt/mTOR 通路的变化, 探讨间质性肺炎 II 型肺泡上皮细胞自噬水平及其可能机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料:** 1) 实验动物: 16 只健康 SPF 级 Wistar 大鼠, 雄性, 体质量 180~200 g, 购于常州卡文斯实验动物中心, 生产许可证号 SCXK (苏) 2016-0010, 质量合格证号 201810290。饲养室环境设置为温度 22~24 °C, 湿度 <60%, 采取分笼饲养, 自由饮水和摄食, 适应性饲养 1 周后开始实验。动物使用协议已由审查委员会批准, 实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。2) 主要材料: 博来霉素 (Invitrogen 公司), Masson 染色试剂盒 (南京建成生物工程研究所),  $\alpha$ -SMA、p62、LC3 I/II 抗体 (abcam 公司), p-mTOR、mTOR 和 p-Akt 抗体 (CST 公司), DMEM 培养基 (HyClone 公司)、硼酸盐缓冲液 (PBS)、二氨基联苯胺 (DAB) 显色试剂盒 (福州迈新技术有限公司), BCA 蛋白定量试剂盒 (ThermoFisher 公司), TBST 缓冲液、ECL 发光液、RIPA 裂解液 (Solarbio 公司), 光学显微镜 (德国莱卡公司)。

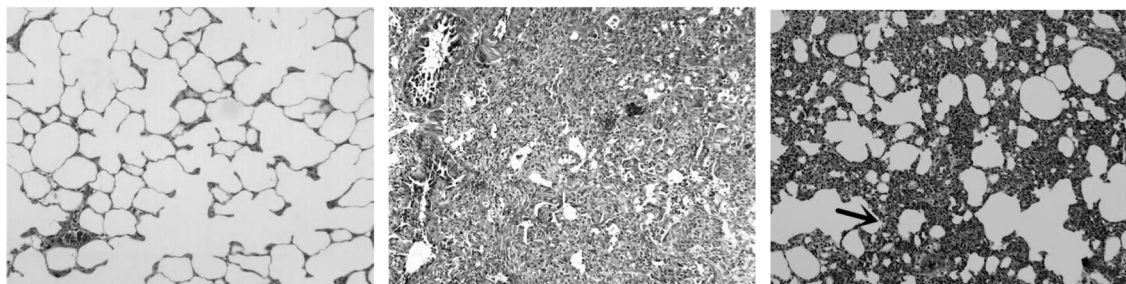
**1.2 方法:** 1) 实验设计及动物模型建立: 将健康 Wistar 雄性大鼠 16 只, 随机分为对照组 (A 组) 和实验组 (B 组), 每组 8 只。根据文献 [3] 报道的方法, 结合预实验结果将大鼠放入装有连续雾化器的自制透明亚克力盒内, 每次 4 只, 连续雾化 15 min 后将大鼠取出, 每天 1 次, 持续 3 d, 其中 B 组雾化吸入博来霉素 5 mg/kg, 溶于 3 mL 生理盐水中; A 组雾化吸入等量生理盐水。第 28 天用 2% 戊巴比妥钠 0.2 mL/100 g 腹腔注射麻醉大鼠, 处死大鼠, 沿胸骨旁软骨剪开胸腔, 取出肺组织, 切取大鼠左下肺组织块 (厚度 <0.5 cm) 投入 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后用于制作肺组织切片, 切取大鼠左上肺组织冻存于 -80 °C 冰箱备用。2) HE

染色和 Masson 染色检测: 将所有大鼠肺组织进行固定并常规石蜡包埋, 切片后, 分别常规脱蜡行 HE 染色和 Masson 染色。HE 染色和 Masson 染色按照试剂盒说明书操作, HE 染色用来评估肺组织的病理变化。Masson 染色后胶原呈蓝色, 在 200 倍光镜下随机选择 5 个视野, 应用 IPP 软件测量计算蓝色部分的面积并进行统计学分析, 评估胶原沉积情况。3) 免疫黏附法分离大鼠 II 型肺泡上皮细胞<sup>[4]</sup>: 取各组大鼠新鲜肺组织标本清洗后剪碎至糜状, 放入离心管, 加入 3 mL 胶原酶 IV 工作液充分吹匀, 在 37 °C 下消化 60 min。消化结束后 500 rpm 离心 1 min, 弃沉淀, 吸出上层细胞悬液, 3 000 rpm 离心 10 min, 弃上清, 用 DMEM 调节细胞浓度至  $3 \times 10^5$  /mL。加入 5 mL 细胞悬液至大鼠 IgG 包被皿中, 37 °C 培养箱培养 1 h 后轻轻摇晃, 移出未贴壁细胞至细胞培养瓶内, 于 37 °C 培养箱培养 20 min, 重复 3 次。移出未贴壁细胞, 1 000 rpm 离心 10 min 后弃上清, 用含 20% 胎牛血清的 DMEM 液重悬细胞并接种到细胞培养瓶内放入 37 °C 培养箱中, 用于后续实验。4) Western blot 法检测: 蛋白相对表达量, RIPA 裂解液裂解蛋白, 根据 BCA 蛋白定量试剂盒说明书检测蛋白浓度, 将待测蛋白质样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶分离后, 电转移至聚偏二氟乙烯膜上, 5% 脱脂奶粉室温摇床封闭 1 h。根据说明书稀释  $\alpha$ -SMA、p62、LC3 I/II、p-Akt、mTOR 和 p-mTOR 抗体, 抗体加入封闭液中稀释到所需浓度, 和膜室温孵育 2 h, 孵育一抗的膜用 TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。随后根据用量, 按照 1:1 000 稀释辣根过氧化物酶标记的二抗, 与膜 37 °C 孵育 1 h。用 TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。随后加入 ECL 化学发光液进行曝光, 图片扫描, 用 Image J 分析软件计算条带灰度值并进行统计学分析。

**1.3 统计学方法:** 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 正态分布计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用独立样本 *t* 检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 肺组织病理改变:** A 组大鼠肺组织 HE 染色未见肺炎及纤维化改变, 呈正常肺组织表现。B 组大鼠肺组织 HE 染色可见肺实质呈大片融合实变, 其间有少量巨噬细胞、中性粒细胞等炎性细胞浸润, 成纤维细胞增多, 肺泡间隔明显增厚, 可见胶原沉积 (图 1)。

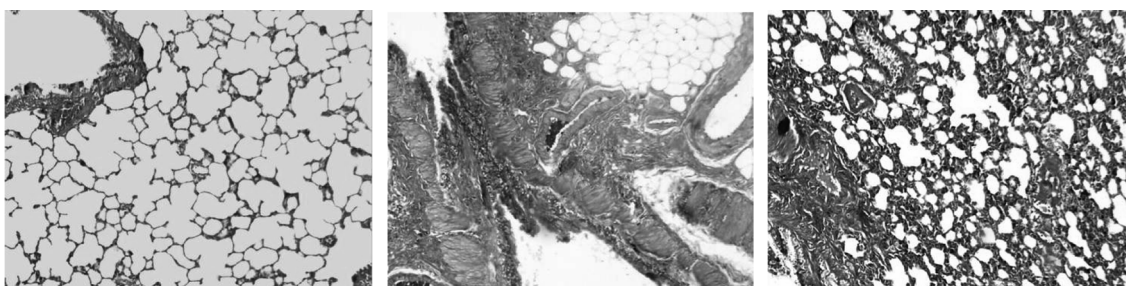


注：左图为 A 组正常肺组织；中图为 B 组肺组织呈大片融合实变；右图箭头示 B 组肺泡间隔明显增厚（HE×100）。

图 1 大鼠肺组织切片 HE 染色图

**2.2 Masson 染色检测结果：**Masson 染色后可将胶原纤维组织染为蓝色，通过观察并计算大鼠肺组织蓝色区域的面积可以间接反映肺组织纤维化的程度。A 组大鼠肺组织 Masson 染色可见蓝色区域主要集中在气管和血管周围，肺间质只有少量散在的点状着色。B 组大鼠肺组织 Masson 染色后可见蓝色区域除了气管和血管周围外，肺间质也可见大量

蓝色着色区，呈片絮状（图 2）。通过软件对 A 组与 B 组大鼠肺组织 Masson 染色后蓝色区域面积进行计算并做统计分析，结果显示，A 和 B 组蓝色区域面积分别为  $(12.12 \pm 1.61) \text{ mm}^2$  和  $(23.73 \pm 4.20) \text{ mm}^2$ ，B 组蓝色面积显著大于 A 组，差异有统计学意义 ( $F=0.295, P<0.05$ )。



注：左图为 A 组正常肺组织 Masson 染色；中图和右图为 B 组大鼠肺组织，可见蓝色区域颜色更深、着色区域更广（Masson×100）。

图 2 大鼠肺组织切片 Masson 染色图

**2.3 Western blot 检测蛋白相对表达量：**B 组  $\alpha$ -SMA 蛋白相对表达量显著高于 A 组，差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )；B 组 p62 蛋白相对表达量显著高于 A 组，差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )；B 组 LC3II/I 比值低于 A 组，差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )；B 组 p-Akt 和 p-mTOR 蛋白相对表达量均显著高于 A 组，差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )；A 组和 B 组 mTOR 蛋白相对表达量差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ，表 1，图 3)。

### 3 讨论

细胞自噬是一种细胞程序化死亡，可以将衰老细胞器或者受损物质转运至溶酶体，在自噬小体的作用下进一步降解靶物质，有助于维持细胞蛋白和细胞器合成、降解和再循环之间的稳态平衡<sup>[5]</sup>。自

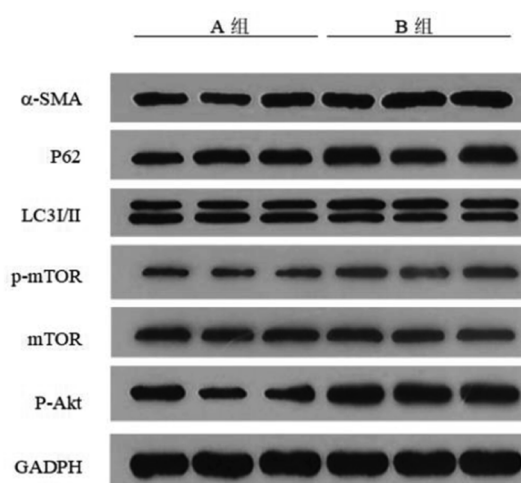


图 3 Western blot 检测结果电泳图

表 1 蛋白相对表达量统计表 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量/只	—SMA	p62	LC3 II / I	p-Akt	mTOR	p-mTOR
A 组	8	0.45±0.62	0.66±0.08	1.35±0.21	0.57±0.10	0.79±0.12	0.46±0.36
B 组	8	0.76±0.15	0.93±0.09	1.02±0.19	0.97±0.12	0.72±0.11	0.57±0.07
F 值		4.052	0.002	0.251	0.923	0.077	2.668
P 值		<0.001	<0.001	0.004	<0.001	0.231	0.001

噬功能障碍或自噬未被激活在间质性肺疾病中的重要作用越来越被人们所认识<sup>[6-7]</sup>，细胞自噬不足会加速成纤维细胞向肌成纤维细胞分化，而肌成纤维细胞高表达  $\alpha$ -SMA，是构成细胞外基质的重要物质，进而加重间质纤维化改变。通过诱导自噬后发现，肌成纤维细胞分化明显减缓，细胞外基质生成减少，降解增多，从而延缓间质纤维化的进展。

LC3 是自噬体形成的关键成分，具有膜融合、运输自噬小体、选择自噬底物等多种调控作用，LC3 可被 Atg7 激活断裂成 LC3 I，当自噬激活时，LC3 I 经泛素样加工修饰与自噬膜表面的磷脂酰乙醇胺结合形成 LC3 II，LC3 II 定位于自噬体膜上，其含量与自噬泡数量呈正比<sup>[8]</sup>。p62 蛋白可以结合泛素化蛋白和 LC3 蛋白，被证实是一种选择性自噬接头蛋白。p62 的 PB1 结构域通过自身寡聚化促进泛素化底物的包装，并将底物运送至自噬系统中参与自噬体的形成过程。p62 可以通过 LIR 结构域与 LC3 相互结合形成复合物，并作为自噬特异性底物不断被自噬—溶酶体系统降解。自噬功能不足或者缺失会导致 p62 蛋白在细胞质中不断累积<sup>[9]</sup>。因此，p62 蛋白的表达水平与 LC3 II / I 的比值常作为自噬活性的评价指标。PI3K/Akt/mTOR 信号通路是细胞发生自噬的主要作用机制之一，激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路，可抑制细胞自噬通路，促进细胞生长和增殖<sup>[10]</sup>。

文献报道，IPF 患者肺组织中 LC3 II 蛋白表达水平低于正常人的肺组织，而 p62 则较正常肺组织显著增加<sup>[11]</sup>。Chitra 等<sup>[12]</sup>的研究结果显示博来霉素诱导大鼠肺纤维化可以使肺组织中 LC3 II mRNA 和蛋白的表达水平均降低，电镜下观察肺纤维化组肺组织也只见少量甚至未见自噬小体形成。本研究参考博来霉素雾化吸入诱导大鼠肺纤维化的方法建立大鼠间质性肺炎模型。病理组织 HE 染色示 B 组大鼠肺组织成纤维细胞增多，肺泡间隔明显增厚，可见胶原沉积，Masson 染色显示胶原纤维形成增多以及 Western blot 检测  $\alpha$ -SMA 蛋白相对表达量比 A 组显著增多，证实雾化吸入博来霉素可使肺组织出现间质纤维化改变。通过对比对照

组和实验组大鼠 p62 以及 LC3 II / I 比值结果显示，B 组 p62 蛋白相对表达量高于 A 组，且 LC3 II / I 比值低于 A 组，提示大鼠间质性肺炎 II 型肺泡上皮细胞自噬活性被抑制。研究发现 p-Akt 和 p-mTOR 在间质性肺炎肺组织中的蛋白水平均明显高于正常对照组，而 mTOR 总体蛋白表达量无明显差异。因此推测，在间质性肺炎中，PI3K/Akt/mTOR 通路的过度激活可能介导了 II 型肺泡上皮细胞自噬的变化。本研究未做药物干预研究，在后期实验中可以给予药物干预，检测干预药物干预前后间质性肺炎 II 型肺泡上皮细胞自噬水平的变化情况，以期为间质性肺炎的治疗寻找新的靶标。

#### 参考文献

- [1] 中华医学会呼吸病学分会间质性肺疾病学组. 特发性肺纤维化诊断和治疗中国专家共识 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39 (6): 427-432.
- [2] MIZUMURA K, CLOONAN S, CHOI M E, et al. Autophagy: Friend or Foe in Lung Disease? [J]. Ann Am Thorac Soc, 2016, 13 Suppl 1: S40-S47.
- [3] 刘珊, 范桂香, 袁育康, 等. 两种小鼠肺纤维化造模方法的比较 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2004 (3): 244-246.
- [4] Chen J, Chen Z, Narasaraaju T, et al. Isolation of highly pure alveolar epithelial type I and type II cells from rat lungs [J]. Lab Invest, 2004, 84 (6): 727-735.
- [5] GE Y Y, SHI Q, ZHENG Z Y, et al. MicroRNA-100 promotes the autophagy of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the expression of mTOR and IGF-1R [J]. Oncotarget, 2014, 5 (15): 6218-6228.
- [6] Cabrera S, Maciel M, Herrera I, et al. Essential role for the ATG4B protease and autophagy in bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. Autophagy, 2015, 11 (4): 670-684.
- [7] 王妍妮, 王昌明. 细胞自噬在肺纤维化中作用的研究进展 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2016, 15 (4): 417-420.
- [8] Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism [J]. Oncogene, 2004, 23 (16): 2891-2906.
- [9] Kuwano K, Araya J, Hara H, et al. Cellular senescence and autophagy in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) [J]. Respir Investig, 2016, 54 (6): 397-406.
- [10] Gui Y S, Wang L, Tian X, et al. mTOR overactivation and

compromised autophagy in the pathogenesis of pulmonary fibrosis [J]. PLoS One, 2015, 10 (9): e138625.

- [11] Patel A S, Lin I, Geyer A, et al. Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. PLoS One, 2012, 7 (7): e41394.

- [12] Chitra P, Saiprasad G, Manikandan R, et al. Berberine inhibits Smad and non-Smad signaling cascades and enhances autophagy against pulmonary fibrosis [J]. J Mol Med (Berl), 2015, 93 (9): 1015-1031.
-