

图 5 DHA 对 HepG2 细胞上皮间充质转化的影响

检测发现 DHA 能够将肿瘤细胞的生长阻碍在 G1 期, 进一步说明 DHA 通过影响 HepG2 细胞的凋亡和周期来抑制细胞增殖。在胰腺癌细胞系中, DHA 可降低 Cyclin E、CDK2、CDK4 和 CDK6 的表达, 在抑制 NF- $\kappa$ B 活性的同时上调 p27 表达水平, 从而阻滞细胞由 G0/G1 期进入 S 期<sup>[5]</sup>。这与本研究结果相符。本文进一步证实 DHA 可磷酸化 mTOR, 影响 p21、Bax 及 Bcl-2 表达, 从而激活下游基因发挥抗癌作用。这也说明了 DHA 对 Hep-G2 细胞的作用可能是通过影响 mTOR 信号通路来实现的, 但与其他抑制肝癌细胞活性的机制是否存在相互作用或联系仍有待进一步研究。同时 DHA 降低 MMP9、Snail、Slug 蛋白表达水平, 促进 E-cadherin 表达上调, 表明 DHA 具有促进间充质-上皮转化, 降低癌细胞侵袭转移能力。

目前恶性肿瘤的治疗需要综合序贯治疗或联合用药。现有研究表明<sup>[6]</sup>利用 DHA 处理神经胶质瘤细胞后, 发现其通过诱导细胞凋亡显示出抗肿瘤作用, DHA 联合使用替莫唑胺 (TMZ) 通过增强 TMZ 自噬效能, 诱导胶质瘤细胞自噬, 提高 TMZ 的抗胶质瘤活性。Lee DH 等也发现 DHA 与多西紫杉醇具有协同作用, 能提高人前列腺癌小鼠模型的总体生存率<sup>[7]</sup>。而在肝癌细胞中, 关于 DHA 联合用药相关的研究较少, 有待进一步研究。

近年研究发现, DHA 可通过抑制 mTOR 通路促进横纹肌肉瘤、尤因肉瘤细胞的凋亡, 而 mTOR 在癌症进程中具有重要调控作用<sup>[8]</sup>。mTOR 位于 PI3K/Akt 途径的下游, mTOR 在 HCC 中经常上调, 并且与预后不良, 分化差、及早期复发相关, 且 mTOR 的激活在 HCC 发病机制中起核心作用<sup>[9]</sup>, 因此阻断 mTOR 途径可能是 HCC 治疗的极具前景的治疗思路。本研究证实 DHA 通过抑制 mTOR 信号通路促进 HCC 凋亡, 这为 HCC 的治疗提供新的研究视角。

## 参考文献

- [1] 胡铭洋, 吴绮楠, 吴永忠. 肝癌的靶向和免疫治疗 [J]. 重庆医科大学学报, 2019, 44 (12): 1547-1552.
- [2] 马婧, 王霄, 宋争放, 等. 肝癌 AASLD、EASL、JSH 指南及中国诊疗规范的比较 [J]. 肿瘤的预防与治疗, 2019, 32 (11): 1031-1038.
- [3] Gory I, Fink M, Bell S, et al. Radiofrequency ablation versus resection for the treatment of early stage hepatocellular carcinoma: a multicenter Australian study [J]. Scand J Gastroenterol, 2015, 50 (5): 567-576.
- [4] Maucourt-Boulch D, de MC C, Franceschi S, et al. Fraction and incidence of liver cancer attributable to hepatitis B and C viruses worldwide [J]. Int J Cancer, 2018, 142 (12): 2471-2477.
- [5] Hua C, Bei S, Wang S, et al. Growth inhibitory effects of dihydroartemisinin on pancreatic cancer cells: involvement of cell cycle arrest and inactivation of nuclear factor- $\kappa$ B [J]. Journal of Cancer Research & Clinical Oncology, 2010, 136 (6): 897-903.
- [6] 严峻, 文静, 陈海南, 等. 二氢青蒿素联合替莫唑胺抑制胶质瘤细胞增殖和诱导凋亡 [J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36 (2): 274-276.
- [7] Lee D H, Hasanuzzaman M, Kwon D, et al. 10-phenyltriazolyl artemisinin is a novel p-glycoprotein inhibitor that suppresses the overexpression and function of P-glycoprotein [J]. Curr Pharm Des, 2018, 24: 5590-5597.
- [8] 曹鹏, 冷东瑾, 李滢, 等. 双氢青蒿素抗肿瘤分子生物学机制研究进展 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2016, 45 (5): 501-507.
- [9] 郑鹏生, 冀静. mTOR 信号通路与研究进展 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2010, 31 (1): 5-9.

## • 基础研究 •

# PI3K/AKT/mTOR 信号通路及细胞周期蛋白在头颈部 HPV 相关鳞癌中表达分析

浙江省宁波市临床病理诊断中心组织病理科 (宁波 315021) 高尤亮 甘咏莉 陈佳意 胡苏琴

**【摘要】目的** 研究 PI3K/AKT/mTOR 信号通路及细胞周期蛋白在头颈部人乳头瘤病毒 (HPV) 相关鳞癌中表达。**方法** 选择头颈部鳞癌组织 40 例, 其中 HPV 相关鳞癌 20 例, 非 HPV 相关鳞癌 20 例, 同时以 20 例正常鳞状上皮为对照组, 免疫组化检测癌组织与正常组织 PI3K、AKT、mTOR、细胞周期蛋白 cyclin D1、cyclin B1、cyclin E 表达。**结果** 20

例 HPV 相关鳞癌组织中 PI3K、AKT、mTOR、cyclin D1、cyclin B1、cyclin E 蛋白表达明显高于正常鳞状上皮组织 ( $P < 0.01$ )；与非 HPV 相关鳞癌相比，HPV 相关鳞癌组织中蛋白表达增加 ( $P < 0.01$ )。结论 头颈部 HPV 相关鳞癌中 PI3K/AKT/mTOR 信号通路激活，细胞周期蛋白 cyclin D1、cyclin B1、cyclin E 蛋白表达增加，表明 PI3K/AKT/mTOR 通路通过细胞周期蛋白参与鳞癌的发病过程，可能为治疗的靶点之一。

【关键词】HPV 相关鳞癌；信号通路；PI3K；AKT；mTOR；细胞周期蛋白

【中图分类号】R739.6；R365 【文献标识码】B 【文章编号】1002-2600(2022)04-0123-04

头颈部恶性肿瘤在全世界范围内为常见恶性肿瘤，发病部位包括整个头颈部区域，常见部位如鼻腔、口腔、咽和喉等，恶性肿瘤中最常见的病种是头颈鳞状细胞癌(HNSCC)。全世界约有 60 万例/年新发生头颈部鳞癌，死亡率为 40%~50%<sup>[1]</sup>。近年来研究数据显示，高危型人乳头瘤病毒 HPV (HPV16、18 等) 感染与头颈部鳞癌，尤其是口咽部位的鳞状细胞癌发病密切相关，口咽部鳞癌的 HPV 感染率约为 60%<sup>[2]</sup>。与非 HPV 相关鳞癌患者相比，HPV 相关鳞癌患者的预后较好，死亡风险降低 20%~80%<sup>[3]</sup>。本文通过观察头颈部 HPV 相关鳞癌与 PI3K/AKT/mTOR 信号通路及效应细胞周期蛋白表达改变，探讨 HPV 相关鳞癌的发病机制。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料：**选择 2018 年 3 月至 2020 年 8 月在我中心检查的确诊头颈部鳞癌患者 40 例，男 34 例，女 6 例，年龄 48~89 岁，同时以 20 例正常鳞状上皮为对照组，头颈部鳞癌诊断标准参照最新版《头颈部肿瘤 WHO 分类》<sup>[4]</sup>。其中 HPV 相关鳞癌 20 例，男 16 例，女 4 例，年龄 48~72 (59.20±7.02) 岁，发生部位为鼻腔、扁桃体、咽、喉、腮腺；病理类型分别为高分化鳞癌 3 例，中分化鳞癌 11 例，低分化或非角化鳞癌 6 例。非 HPV 相关鳞癌 20 例，男 18 例，女 2 例，年龄 53~89 (61.60±12.29) 岁，发生部位为喉、咽、唇、扁桃体、舌、下颌，病理类型分别为高分化鳞癌 5 例，中分化鳞癌 12 例，低分化或非角化鳞癌 3 例。

**1.2 方法：**选取肿瘤组织及附近正常鳞状上皮，以 4% 中性甲醛溶液固定 12 h 后脱水，石蜡包埋，4~5 μm 厚度切片，经过 HE 染色，切片在同一显微镜 (Olympus BX53)

下观察。免疫组化采用 Envision 两步法染色。一抗 PI3K P85/P55、AKT (C67E7)、mTOR、cyclin D1 (E3P5S)、cyclin B1 (D6C10)、cyclin E 抗体 (HE12) (效价 1:50) (cell signaling technology 有限公司)，二抗 (DAKO 公司)。免疫组化染色按试剂盒说明书中步骤进行操作，DAB 显色。mTOR、AKT、PI3K 阳性表达位于细胞浆内棕黄色颗粒。cyclin D1、cyclin B1、cyclin E 阳性表达在细胞核内棕黄色颗粒。切片在 20 倍物镜同一台显微镜固定在同一光强度条件下进行拍照，对图像应用计算机图像分析，测其光密度 (IOD) 及阳性数目。

**1.3 统计学分析：**实验结果采用 R 语言 (R version 4.0.0) 进行统计学分析。计量资料以均数±标准差进行列表，两组间计量资料比较采用独立样本 *t* 检验；多组间比较，正态分布者采用单因素方差分析，方差齐者用 LSD 法，方差不齐用 Tamhane's T3 法，非正态分布者采用多组样本的秩和检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

与正常鳞状上皮、非 HPV 相关鳞癌比较，HPV 相关鳞癌细胞中 PI3K、AKT、mTOR 蛋白表达增加 ( $P < 0.01$ )。与正常鳞状上皮、非 HPV 相关鳞癌比较，HPV 相关鳞癌细胞 cyclin B1 蛋白表达增加 ( $P < 0.01$ )。与正常鳞状上皮比较，非 HPV 相关鳞癌 cyclin D1 蛋白表达增加 ( $P < 0.01$ )，HPV 相关鳞癌细胞 cyclin B1、cyclin D1、cyclin E 蛋白表达增加 ( $P < 0.01$ )；与非 HPV 相关鳞癌比较，HPV 相关鳞癌细胞 cyclin D1、cyclin E 蛋白表达增加 ( $P < 0.05$ )。结果见表 1、图 1。

表 1 各组 PI3K、AKT、mTOR、cyclin B1、Cyclin D1、Cyclin E 表达比较 ( $n=20$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	PI3K/ (IOD×10 <sup>3</sup> )	AKT/ (IOD×10 <sup>5</sup> )	mTOR/ (IOD×10 <sup>3</sup> )	cyclin B1/ mm <sup>2</sup>	Cyclin D1/ mm <sup>2</sup>	Cyclin E/ mm <sup>2</sup>
鳞状上皮组	4.01±2.52	17.39±11.16	40.37±24.06	51.85±25.05	20.05±10.08	106.00±30.33
非 HPV 相关鳞癌组	5.47±3.99	23.52±10.73	44.713±29.50	65.65±25.99	33.20±9.85	120.50±38.99
HPV 相关鳞癌组	11.58±2.20	41.07±14.72	78.31±33.66	129.15±35.50	48.05±19.35	163.50±48.28

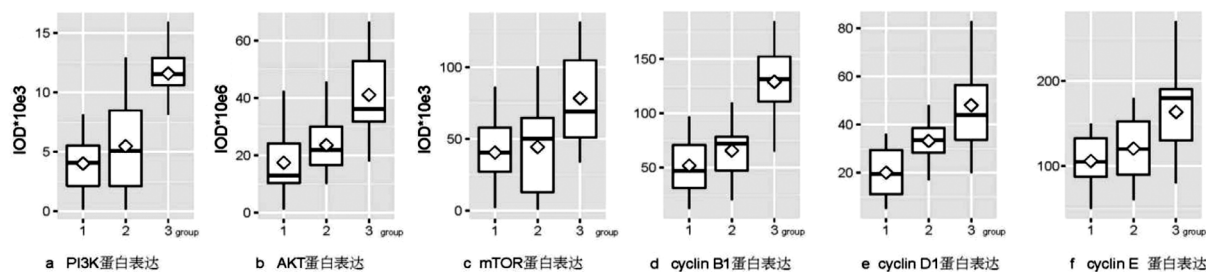


图 1 各组 PI3K、AKT、mTOR、cyclin B1、cyclin D1、cyclinE 蛋白表达比较

### 3 讨论

鳞癌在头颈部为常见恶性肿瘤,其中 HPV 相关鳞癌的发病率在过去的 10 年中升高<sup>[5]</sup>。HPV 相关鳞癌多由高危 HPV 感染引起的,类型多为 16、18 型。国内多家机构报道 HPV 相关的头颈部鳞癌,喉癌 HPV 阳性率可达 62.6%<sup>[6]</sup>。HPV 相关鳞癌好发于舌底和腭扁桃体,通常表现进展期鳞癌。本组 HPV 相关鳞癌发于部位喉、咽、鼻腔、扁桃体、腮腺,其中颈部淋巴结肿大是最常见的临床表现。病理学组织学呈腺鳞样、乳头状、类基底细胞、淋巴上皮瘤样、肉瘤样、小细胞特征的鳞状细胞癌。肿瘤细胞周可伴大量淋巴细胞反应。肿瘤细胞表现异型明显,核/浆比增高,分裂像多见。HPV 相关鳞癌强表达 P16,不同于正常鳞状上皮或非 HPV 相关鳞癌<sup>[2]</sup>。

细胞周期异常是癌症发生的重要原因。细胞周期活动受细胞周期蛋白复合物调控,其由细胞周期蛋白(cyclins)、细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶(CDK)及其抑制物(CDKIs)构成。研究表明,cyclin D1 与细胞周期素依赖性蛋白激酶 4/6(CDK4/CDK6)结合后,激活 CDK4、CDK6 使 pRb 磷酸化,从而释放出核转录因子 E2F,促进细胞由 G1 期向 S 期转换<sup>[7-8]</sup>。Cyclin B1 可与 CDK1 形成的复合物,启动有丝分裂<sup>[9]</sup>。Cyclin E 高表达,可结合 CDK2 并持续性地激活 CDK2,进而导致细胞异常增殖。且 Cyclin D1 和 Cyclin E 可协同作用,使细胞由 G0 期进入 S 期,促使细胞核内 DNA 合成加速<sup>[10]</sup>。在本组中,头颈部鳞癌 Cyclin E、Cyclin B1、Cyclin D1 蛋白表达增加,在 HPV 相关鳞癌细胞中异常高表达。Cyclin B1、Cyclin D1、Cyclin E 在 HPV 相关鳞癌的异常高表达与鳞癌细胞的恶性转化和恶性增生密切相关,有可能是临床肿瘤基因治疗的潜在靶点。磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)介导蛋白激酶 B(PKB,又称 Akt)一雷帕霉素靶蛋白(mTOR),是一条经典的信号转导通路。PI3K 是生长因子受体酪氨酸激酶下游主要的信号成分,具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性。PI3K 通过催化 PIP3,激活信号分子 Akt,进一步激活其下游的 mTOR,进行激活不同的效应分子,其中之一是激活细胞周期蛋白,调节细胞的增殖,其在鳞癌的发生、发展、转归中具有重要作用。本组在 HPV 相关鳞癌中发现 PI3K/Akt/mTOR 蛋白的异常高表达,表明其通路可能参与 HPV 相关鳞癌的发生发展过程。PI3K/Akt 信号通路的活化可通过多种途径调节细胞周期,如促进 4E-BP1 和 p70S6K 的高度磷酸化,促使细胞内细胞周期蛋白合成增加;磷酸化 Forkhead 家族转录因子 AFX,使 p27Kip1 转录降低;磷酸化 GSK-3,从而抑制 GSK-3 降解 Cyclin D1、Cyclin E 作用,抑制其在 G1 期至 S 期相转换中发挥作用。参与 PI3K/Akt 途径的调节因子有负调节因子,包括 R1、PTEN、CTMP、SHIP2 等<sup>[11-12]</sup>。PTEN 失活可促进 PI3K/Akt 通路活化,导致癌细胞的侵袭能力增强<sup>[13-14]</sup>。紫外线可过度激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,Akt、mTOR 表达水平增加;紫外线照射抑制 PTEN 表达;FRA1 可活化 Akt,进而影响 Cyclin B1 水平而作用于细胞周期 G2/M 期,促进鳞癌细胞增殖<sup>[15]</sup>。

结合本文,HPV 相关鳞癌组织中 PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达量明显高于正常皮肤组织,高于非 HPV 相关性鳞

癌,表明 HPV 相关鳞癌发病中 PI3K/Akt/mTOR 途径的激活可能与 HPV 相关鳞癌的发病过程。其下游效应分子细胞周期蛋白 Cyclin B1、Cyclin D1、Cyclin E 蛋白表达增加,提示 PI3K/Akt/mTOR 可能通过影响细胞周期蛋白发挥致癌作用。

因此,认为 PI3K/Akt/mTOR 信号通路通过促进细胞周期蛋白的表达,参与 HPV 相关鳞癌发病过程。本研究为进一步研究 HPV 相关鳞癌中 PI3K/Akt/mTOR 表达调控机制提供了重要基础,在 HPV 相关性鳞癌发病机制中,HPV 感染与 PI3K/AKT/mTOR 通路之间关联,可能是 HPV 相关鳞癌的发病机制之一,其有可能为 HPV 相关鳞癌的治疗提供新策略和新靶点。

### 参考文献

- [1] Siegel R, Ward E, Brawley O, et al. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61 (4): 212-236.
- [2] Leemans C R, Snijders P J F, Brakenhoff R H. Publisher correction: the molecular landscape of head and neck cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2018, 18 (10): 662.
- [3] Chaturvedi A K. Epidemiology and clinical aspects of HPV in head and neck cancers [J]. Head Neck Pathol, 2012, 6 (1): S16-24.
- [4] Adel K, El-Naggar, Chan J K, et al. WHO classification of head and neck tumor (4th) [M]. Lyon: IARC press, 2017, 136-138.
- [5] Dyne E A V, Henley S J, Saraiya M, et al. Trends in human papillomavirus-associated cancers - united states, 1999-2015 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2018, 67 (33): 918-924.
- [6] Tong F, Geng J, Yan B, et al. Prevalence and prognostic significance of HPV in laryngeal squamous cell carcinoma in north-east China [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 49 (1): 206-216.
- [7] Montalto F I, Amicis F D. Cyclin D1 in cancer: a molecular connection for cell cycle control, adhesion and invasion in tumor and stroma [J]. Cells, 2020, 9 (12): 2648.
- [8] Tchakarska G, Sola B. The double dealing of cyclin D1 [J]. Cell Cycle, 2020, 19 (2): 163-178.
- [9] Xie B, Wang S, Jiang N, et al. Cyclin B1/CDK1-regulated mitochondrial bioenergetics in cell cycle progression and tumor resistance [J]. Cancer Lett, 2019 (443): 56-66.
- [10] Hermosilla V E, Salgado G, Riffo E, et al. SALL2 represses cyclins D1 and E1 expression and restrains G1/S cell cycle transition and cancer-related phenotypes [J]. Mol Oncol, 2018, 12 (7): 1026-1046.
- [11] Ito T, Zimdahl B, Reya T. A SIRTing control over cancer stem cells [J]. Cancer Cell, 2012, 21 (2): 140-142.
- [12] Tang T, Xiao Z, Shan G, et al. Descending-SHIP2-mediated radiosensitivity enhancement through PI3K/Akt signaling pathway in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Biomed Pharmacother, 2019 (118): 109392.
- [13] Gaykalova D A, Mambo E, Choudhary A, et al. Novel insight



- into mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma [J]. PLoS One, 2014, 9 (3): 93102.
- [14] Xu C, Li X, Li T, et al. Effect of different PTEN status on PI3K/AKT pathway of endometrial cancer cell lines [J]. Journal of Sun Yat-sen University (Medical Sciences), 2011, 32 (6): 701-707.
- [15] Zhang X, Wu J, Luo S, et al. FRA1 promotes squamous cell carcinoma growth and metastasis through distinct AKT and c-Jun dependent mechanisms [J]. Oncotarget, 2016, 7 (23): 34371-34383.

## • 基础研究 •

# 自噬介导 NLRP3 活化对小鼠肺纤维化的影响

福建中医药大学 (福州 350122) 林 鑫 陈秀兰<sup>1</sup> 姚秀娟<sup>2</sup> 谢宝松<sup>2,3</sup>

**【摘要】目的** 探讨肺纤维化小鼠自噬活性改变对 NLRP3 炎性体活化的影响。**方法** 将 32 只雄性 SFP 级 C57BL/6 小鼠随机分为对照组 (A 组)、实验组 (B 组、C 组、D 组), 每组各 8 只小鼠。实验组 B 组、C 组、D 组雾化吸入剂量为 35 mg/kg 博来霉素 (BLM), 并分别在给药后第 7 天、第 14 天、第 28 天处死, A 组雾化吸入相同容积生理盐水, 并在给药后第 28 天处死。HE 染色观察小鼠肺组织病理改变; Masson 染色计算肺组织胶原纤维沉积; 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测肺组织 p62、Beclin1、NLRP3、Caspase-1、Notch1 的表达水平。**结果** HE 染色结果显示, A 组小鼠肺组织肺泡结构基本正常, 未见明显纤维化; B 组、C 组、D 组小鼠肺组织纤维化程度逐渐加重, 可见纤维化病灶逐渐扩大, 肺间质纤维组织增生。Masson 染色显示, 肺间质有少许蓝色染色区域。B 组、C 组、D 组, 蓝色染色区域依次增加, 肺间质蓝色染色区域面积差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。Western blot 结果显示, A 组 p62 相对表达量低于各实验组, 实验组 B、C、D 组之间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); A 组 Beclin1 表达量高于各实验组, 实验组 B、C、D 组之间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); A 组 NLRP3、Caspase-1、Notch1 表达量均低于实验组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。实验组 B、C、D 组中 NLRP3、Caspase-1、Notch1 之间的表达量差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** 自噬抑制和 NLRP3 炎性小体激活在小鼠肺纤维化中扮演重要角色; 自噬活性降低, Notch1 信号通路活化后导致 NLRP3 炎性小体激活, 其可能是小鼠肺纤维化逐渐加重的机制之一。

**【关键词】** 肺纤维化; 自噬; NLRP3; Notch1; 博来霉素

**【中图分类号】** R563 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2022)04-0126-04

特发性肺纤维化 (IPF) 是一种病因不明的间质性肺炎, 临床上表现为进行性呼吸困难, 最终多因呼吸衰竭而死亡。IPF 多见于老年男性, 发病年龄多大于 60 岁, 确诊后生存期仅 3~5 年<sup>[1]</sup>。吡非尼酮和尼达尼布作为治疗 IPF 的口服用药可减缓纤维化的发展, 无法逆转已发生的纤维化。既往研究显示 IPF 患者的肺组织中自噬功能下降, 主要表现为自噬体数量减少, 蛋白 p62 在细胞中堆积<sup>[2]</sup>。另有学者发现博来霉素诱导的肺纤维化小鼠模型中含 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3 (NLRP3) 表达上调, 并在 IPF 患者的肺组织中得到证实<sup>[3]</sup>。有研究显示自噬通过抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞中 Notch1 信号通路和 NLRP3 炎性小体的激活减轻瘢痕疙瘩纤维化<sup>[4]</sup>。本研究旨在观察小鼠肺纤维化发展过程中自噬和 NLRP3 炎性小体活性的变化, 初步探究肺纤维化的可能致病机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料:** 1) 实验动物: 32 只雄性 SFP 级 C57BL/6 小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 生产许可证号 SCXK (沪) 2017-0005, 质量合格证号 20170005015970, 体质量 (17.0~19.0) g, 6~8 周龄。动物饲养于福建医科大

学动物实验中心, 饲养室环境温度设置为 22~24 °C, 湿度 <60%。所有实验动物进行随机分组编号, 分笼饲养, 喂养方式、光线、温度、湿度均无差异, 在检疫室适应性饲养 1 周后开始实验。实验过程对动物的处置通过福建医科大学动物伦理委员会审核。2) 主要材料: 盐酸博来霉素溶液 (美国英杰生命技术有限公司), Masson 三色染色试剂盒 (福州迈新生物技术开发有限公司), 二氨基联苯胺显色试剂盒 (福州迈新生物技术开发有限公司), RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量检测试剂盒、ECL 发光液 (Servicebio 公司)、p62、Beclin1、Notch1、NLRP3、Caspase-1 抗体 (Servicebio), 光学显微镜 (日本尼康公司)。

## 1.2 方法:

**1.2.1 实验模型的建立:** 32 只雄性 SFP 级 C57BL/6 小鼠随机分为对照组 (A 组)、实验组 (B 组、C 组、D 组), 每组 8 只小鼠。根据预实验的结果, 将小鼠放入连接有连续雾化装置的自制透明亚克力盒子内, 每次 4 只小鼠, 雾化时间设定为 40 min。实验组 B、C、D 组使用剂量 35 mg/kg 博来霉素雾化吸入, 并在给药后分第 7 天、第 14 天、第 28 天使用 2% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 腹腔注射麻醉 B、C、D 组

1 福建省老年病医院; 2 福建医科大学省立临床医学院呼吸与危重学科; 3 通信作者