

into mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma [J]. PLoS One, 2014, 9 (3): 93102.

- [14] Xv 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 ℃, 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

小鼠。从剑突下方沿胸骨中线向上剪开胸腔，取出肺组织将右下肺叶放置于 10% 中性福尔马林中固定。对照组（A 组）吸入相同容积生理盐水，并在第 28 天采用相同方法获取 A 组小鼠肺组织。造模后病理切片可见：肺泡结构紊乱，肺泡腔变形塌陷，肺间质见灶性单核细胞淋巴细胞浸润；肺泡间隔增厚，见胶原沉积，部分肺实质融合实变，上述病灶多位于胸膜下，表明造模成功。

**1.2.2 HE 染色及 Masson 染色：**将处理完毕的小鼠肺组织进行组织脱水、包埋、切片。根据 HE 染色及 Masson 染色试剂说明书进行操作，完成操作后。根据 HE 染色结果评估肺组织病理状况，Masson 染色结果使用 IPP 软件评胶原沉积情况。

**1.2.3 Western blot 法检测蛋白：**组织剪碎，加入组织裂解液（RIPA），使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测蛋白浓度。将检测蛋白使用分离胶分离，电转移到 PVDF 膜上。使用封闭专用脱脂奶粉，放置脱色摇床上，室温下封闭 30 min。根据说明书稀释 p62、Beclin1、Notch1、NLRP3、Caspase-

1 抗体浓度，PVDF 放入使用封闭液稀释好浓度的抗体溶液中，4℃ 孵育摇床过夜。完成一抗孵育的膜使用 TBST 洗脱，每次 5 min，洗 3 次。随后根据需要用 TBST 按照 1:5 000 的比例稀释二抗，膜在配置完成溶液，室温下孵育 30 min。用 TBST 涮洗 3 次，每次 5 min。在暗室使用 ECL 溶液曝光。结果使用 ImageJ 分析图形。

**1.3 统计学分析：**采用 SPSS 23.0 统计软件对实验数据进行处理。正态分布计量资料以均数±标准差表示，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 HE 染色结果：**A 组光镜下可见小鼠肺组织支气管及所属肺泡形态结构完整，肺泡腔轮廓正常，少许肺泡腔内有轻微炎症。实验组中 B 组小鼠肺组织肺泡结构出现变形破坏，肺间质可见炎性细胞浸润；C 组可见肺泡结构破坏，肺泡壁增厚，可见实变区胶原纤维沉积；D 组表现为肺泡结构严重破坏，支气管附近的肺泡组织间隔明显增厚，大量胶原纤维沉积，视野中可见纤维团块。

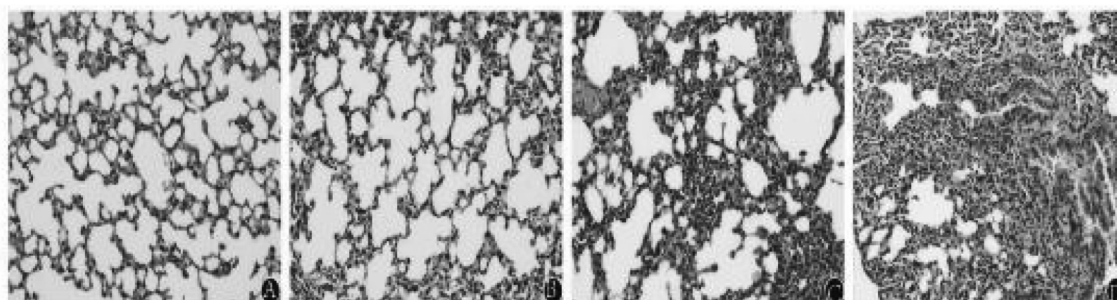


图 1 小鼠肺组织 HE 染色切片 (×200)

**2.2 小鼠肺组织 Masson 染色结果：**A 组肺泡结构基本完整，未见明显异常，染色面积  $(2.239 \pm 0.233) \text{ mm}^2$ ，染色区域主要集中在气管及血管周围，肺间质有少许蓝色染色区域。B 组可见少量胶原纤维组织沉积于气管及血管周围，染

色面积为  $(4.311 \pm 0.527) \text{ mm}^2$ ；C 组胶原纤维面积扩大，主要存在于肺泡壁周围，染色面积为  $(5.576 \pm 0.434) \text{ mm}^2$ ；D 组染色区域增加，肺间质可见大面积蓝色染色区域，染色面积为  $(7.245 \pm 0.402) \text{ mm}^2$ 。

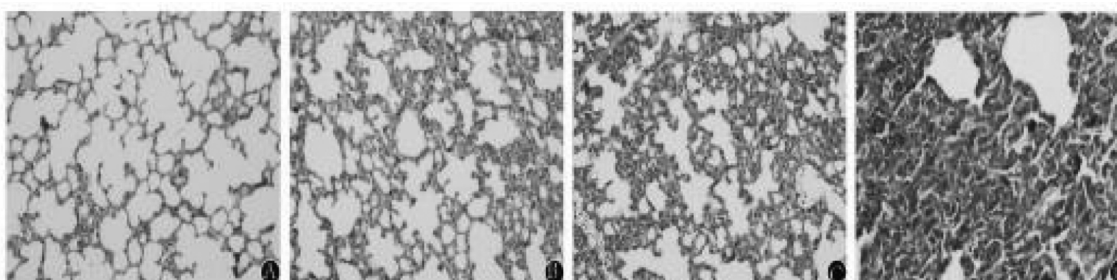


图 2 小鼠肺组织 Masson 染色切片 (×200)

**2.3 Western blot 蛋白相对表达量：**与 A 组比较，实验组 B、C、D 组蛋白 p62 表达量上升，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；与 A 组比较，实验组 B、C、D 组蛋白 Beclin1 表达量降低，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；与 A 组比较，实

验组 B、C、D 组中 NLRP3、Caspase-1、Notch1 表达上升，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；实验组 B、C、D 3 组间，NLRP3、Caspase-1、Notch1 的表达呈上升趋势，差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 蛋白相对表达量统计表 (n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	NLRP3	Caspase-1	Notch1	p62	Beclin1
A 组	0.17 $\pm$ 0.07	0.42 $\pm$ 0.18	0.29 $\pm$ 0.06	0.32 $\pm$ 0.15	1.32 $\pm$ 0.32
B 组	0.30 $\pm$ 0.09	0.65 $\pm$ 0.19	0.42 $\pm$ 0.08	0.55 $\pm$ 0.20	0.74 $\pm$ 0.25
C 组	0.36 $\pm$ 0.12	0.68 $\pm$ 0.08	0.54 $\pm$ 0.07	0.73 $\pm$ 0.09	0.47 $\pm$ 0.25
D 组	0.47 $\pm$ 0.12	0.85 $\pm$ 0.13	0.55 $\pm$ 0.14	0.83 $\pm$ 0.15	0.28 $\pm$ 0.23
F/H 值	12.399	11.062	13.395	17.325	23.0016
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

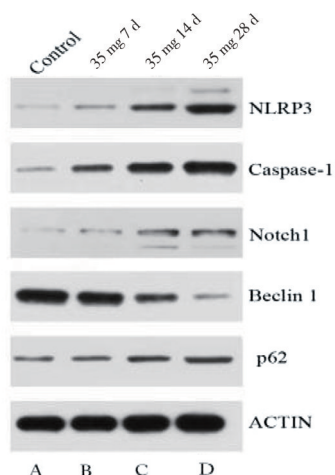


图 3 Western blot 检测电泳结果

### 3 讨论

自噬是细胞回收细胞质内大分子物质以及受损细胞器的重要途径<sup>[2]</sup>。既往研究中发现 IPF 患者肺组织成纤维细胞自噬活性较低<sup>[5-6]</sup>，自噬对在肺纤维化中保护作用，可能通过调节细胞外基质 (ECM) 的沉积实现。IPF 患者病理标本中可见肌成纤维细胞过度增殖，过度表达  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白促进 ECM 沉积。

p62 是选择性自噬的底物，在自噬的起始阶段，p62 蛋白可与胞浆中经过泛素化的异常折叠的蛋白质聚集物结合，通过受体识别后 p62 蛋白和其结合的泛素化蛋白聚集物通过自噬体-溶酶体相结合的形式被消化和清除<sup>[7]</sup>。此外 Beclin1 是主要的自噬调节基因<sup>[8]</sup>，自噬的启动与 Beclin1 表达水平升高密切相关，引导自噬体形成初始阶段相关蛋白定位<sup>[9]</sup>。本研究结果显示，雾化吸入博来霉素诱导建立小鼠肺纤维化模型后，小鼠肺组织纤维化程度加重，肺组织中 Beclin1 表达水平降低，p62 表达水平升高，表明小鼠肺组织在纤维化过程自噬能力下降。

IPF 患者肺组织切片显示，NLRP3 表达显著高于正常人体肺组织<sup>[10]</sup>。根据目前的报道，检测 IPF 患者肺泡灌洗液，发现 Caspase-1 和 IL-1 水平显著升高<sup>[11]</sup>。研究表明，激活后的 NLRP3 炎性小体，可以诱导肺驻留间充质干细胞 (LR-MSC) 的肌成纤维细胞分化<sup>[3]</sup>。小鼠实验发现，石蒜碱通过抑制 NLRP3 炎性小体的激活，改善博来霉素诱导的肺纤维化<sup>[12]</sup>，进一步证实 NLRP3 炎性小体在肺纤维化过程中，可能扮演重要的角色。

自噬可通过调节 NLRP3 炎性小体的水平，减缓组织纤

维化的发展。例如自噬减少肾组织中线粒体损伤和氧化应激，达到抑制 NLRP3 炎性小体的活化，从而改善肾纤维化<sup>[13]</sup>。本实验中自噬水平下降，NLRP3 蛋白表达升高，同时小鼠肺纤维化程度加重，进一步佐证上述观点。此外有实验显示雷帕霉素增强自噬活性后抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞中的 Notch1 信号通路和 NLRP3 炎性小体激活，减少肌成纤维细胞增殖分化，进而减轻瘢痕疙瘩纤维化，表明自噬可能通过 Notch1 信号通路调节 NLRP3 炎性小体的活性<sup>[4]</sup>。对于肺纤维化中自噬活性与 NLRP3 炎性小体相关调控机制未见明确的阐述。结合本文，小鼠肺纤维化组织中自噬活性下降的同时，Notch1 信号分子和 NLRP3 炎性小体中相关蛋白表达水平升高，为进一步研究肺纤维化机制提供了线索。

本研究采用剂量 35 mg/kg BLM 雾化吸入构建小鼠肺纤维化模型。实验结果显示，HE 染色及 Masson 染色后实验组小鼠肺间质出现胶原纤维沉积，表明本研究造模方案的可行性。另证实随着自噬能力的减弱，Notch1、NLRP3 以及 Caspase-1 表达升高，由此推断小鼠发生肺纤维化过程中，自噬抑制可能导致 Notch1 信号通路调节 NLRP3 炎性小体的激活相关。本研究未进行干预实验，在后续研究中应加入药物干预实验，观察药物干预情况下，Notch1 信号通路及 NLRP3 炎性小体活性变化情况，以期为 IPF 治疗提供新的治疗思路。

总之，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，Notch 信号通路活化后导致 NLRP3 炎性小体激活，可能是小鼠肺纤维化逐渐加重的机制之一。

### 参考文献

- [1] Thannickal V J. Mechanistic links between aging and lung fibrosis [J]. Biogerontology, 2013, 14 (6): 609-615.
- [2] Li X, Zhao F, Wang A, et al. Role and mechanisms of autophagy in lung metabolism and repair [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2021, 78 (12): 5051-5068.
- [3] Ji J, Hou J, Xia Y, et al. NLRP3 inflammasome activation in alveolar epithelial cells promotes myofibroblast differentiation of lung-resident mesenchymal stem cells during pulmonary fibrogenesis [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular Basis of Disease, 2021, 1867 (5): 166077.
- [4] Lee S, Kim S K, Park H, et al. Contribution of Autophagy-Notch1-Mediated NLRP3 inflammasome activation to chronic inflammation and fibrosis in keloid fibroblasts [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21 (21): 8050.
- [5] Romero Y, Bueno M, Ramirez R, et al. mTORC 1 activation decreases autophagy in aging and idiopathic pulmonary fibrosis and contributes to apoptosis resistance in IPF fibroblasts [J]. Aging Cell, 2016, 15 (6): 1103-1112.
- [6] Krempaska K, Barnowski S, Gavini J, et al. Azithromycin has enhanced effects on lung fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) patients compared to controls [J]. Respiratory Research, 2020, 21 (1): 25.

(下转第 136 页)



史、合并并发症的经历,加重这种担心,诱发不良心理应激的发生。高静和姜燕<sup>[10]</sup>对淮安市 2 000 例二胎孕妇的心理状况调查指出,既往有不良孕史、合并并发症的孕妇是不良心理应激高危人群。因此,在临床上面对这类的孕妇,在围生期间应该给予特别的关注和指导<sup>[11]</sup>。

此外,本次调查还发现,有没有参与孕妇学校的培训,也是孕妇不良心理应激的关键因素之一。孕妇在孕期间参与了孕妇学校的培训,不仅可以获得孕期相关的知识,还可以获取疫情防控及抗压、情绪管理等相关知识,能够正确面对突发公共事件,保持良好社会关系,这是消除负性情绪的关键<sup>[12]</sup>。因此,需要针对不同的人群和不同特征的孕妇开展孕产科心理咨询门诊,提高孕妇心理免疫力。

本次调查指出年龄、孕次、产次、文化程度不是突发公共事件背景下,影响孕妇心理应激状态的主要因素,和以往有些研究结果不一致,该结果可能是受到本研究样本量小、调查时期特殊等因素影响,本研究没有加入抑郁情绪筛查,未对经济状况等可能影响心理因素的项目进行调查,将在未来的研究中进行完善。

综上所述,突发公共卫生事件对孕妇心理健康状况造成一定的影响,医疗机构应该根据孕妇不同孕期、不同特征给予针对性的心理干预措施,以便改善孕妇心理状况。

#### 参考文献

- [1] 郭绒绒,王扬,高岩,等.突发公共卫生事件下孕妇产前心理健康状况调查[J].中国计划生育与妇产科,2020,12(8):67-70.
- [2] Ashour H M, Elkhatib W F, Rahman M, et al. Insights into the recent 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) in light of past human coronavirus outbreaks [J]. Pathogens, 2020, 9 (3): 186.
- [3] 赵更力,何燕玲.孕产期心理保健[M].北京:人民卫生出版社,2014:10-15.
- [4] Scazufca M, Faisal-Cury A, Mogadouro M, et al. Management of depression during pregnancy in primary care in Brazil: a cluster randomized trial [J]. Lancet, 2014 (384): S21.
- [5] Aasheim V, Waldenström U, Rasmussen S, et al. Satisfaction with life during pregnancy and early motherhood in first-time mothers of advanced age: a population-based longitudinal study [J]. BMC Pregnancy and Childbirth, 2014, 14 (1): 86.
- [6] 何筱衍,李春波,钱洁,等.广泛性焦虑量表在综合性医院的信度和效度研究[J].上海精神医学,2010,22(4):200-203.
- [7] 马宏艳.孕期健康教育对孕妇心理健康状况的影响[J].实用妇科学电子杂志,2019,6(18):138.
- [8] 林美苑,余佳佳.苍南县 599 例妊娠期妇女心理状态症状自评量表调查分析[J].中国妇幼保健,2015,30(31):5452-5454.
- [9] 陈延亭,孙贤华,李梦茹,等.新冠肺炎疫情下孕妇心理健康及应对状况调查[J].中国护理管理,2020,20(12):1827-1830.
- [10] 高静,姜燕.淮安市 2000 例二胎孕妇产前心理应激状况及其影响因素的调查研究[J].中国妇幼保健,2019,34(16):3787-3790.
- [11] Bayrampour H, McDonald S. Risk factors of transient and persistent anxiety during pregnancy [J]. Midwifery, 2015, 31 (6): 582-589.
- [12] 童萍,石元洪,杨扬,等.妊娠早期孕妇睡眠质量和人格特征、社会支持的相关性[J].中国妇幼保健研究,2016,27(12):1456-1458.
- [7] Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor [J]. FEBS Journal, 2015, 282 (24): 4672-4678.
- [8] Vishnupriya S, Priya Dharshini L C, Sakthivel K M, et al. Autophagy markers as mediators of lung injury-implication for therapeutic intervention [J]. Life Sciences, 2020 (260): 118308.
- [9] Huang Y, Liu H T, Yuan Y, et al. Exercise preconditioning increases beclin1 and induces autophagy to promote early myocardial protection via intermittent myocardial ischemia-hypoxia [J]. International Heart Journal, 2021, 62 (2): 407-415.
- [10] Meng Y, Pan M, Zheng B, et al. Autophagy attenuates angiotensin II-induced pulmonary fibrosis by inhibiting redox imbalance-mediated NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 inflammasome Activation [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2019, 30 (4): 520-541.
- [11] Lasithiotaki I, Giannarakis I, Tsitoura E, et al. NLRP3 inflammasome expression in idiopathic pulmonary fibrosis and rheumatoid lung [J]. European Respiratory Journal, 2016, 47 (3): 910-918.
- [12] Liang Q, Cai W, Zhao Y, et al. Lycorine ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibiting NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis [J]. Pharmacological Research, 2020 (158): 104884.
- [13] Ding Y, Fu X, Wang Q, et al. The complex interplay between autophagy and NLRP3 inflammasome in renal diseases [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22 (23): 12766.

(上接第 128 页)