

· 论著 ·

脂多糖抑制小鼠肺成纤维细胞自噬的观察性研究

谢婷婷 徐侨翌 邢顺鹏 万晗曦 皋源 何征宇

上海交通大学医学院附属仁济医院重症医学科 200127

通信作者:何征宇, Email: hzyyy@163.com

【摘要】 目的 观察体外原代培养的小鼠肺成纤维细胞在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)作用下,自噬微管相关蛋白轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP1LC3)(以下简称 LC3)和 Beclin-1 的表达情况,以明确 LPS 对肺成纤维细胞自噬的调控作用。**方法** 将培养至 4~7 代的小鼠肺成纤维细胞接种于 6 孔培养板,密度 1×10^4 个/ml。待细胞贴壁后,更换无血清培养基饥饿过夜,采用随机数字表法将其分为 4 组(每组 3 孔):PBS 对照组(Con 组)、250 $\mu\text{g/L}$ LPS 组(LPS₂₅₀ 组)、500 $\mu\text{g/L}$ LPS 组(LPS₅₀₀ 组)、1 000 $\mu\text{g/L}$ LPS 组(LPS₁₀₀₀ 组),除 Con 组外,其余组分别加入以上终浓度 LPS,各组在加入 PBS 或 LPS 后 30 h 裂解细胞并提取总蛋白,通过 Western blot 法比较小鼠肺成纤维细胞经不同浓度 LPS 刺激后 LC3 和 Beclin-1 蛋白的表达情况;同时,采用随机数字表法将传代细胞分为 2 组(每组 3 孔):IF-Con 组(加入 PBS 作为对照)和 IF-LPS 组(加入 1 000 $\mu\text{g/L}$ 的 LPS),采用免疫荧光技术比较 IF-Con 组和 IF-LPS 组中小鼠肺成纤维细胞内自噬小体的表达情况。**结果** 随着 LPS 刺激浓度的增高,LC3 蛋白表达量下调,而 LC3-II/LC3-I 在 Con 组最高,随 LPS 刺激浓度的升高逐渐降低,LPS₁₀₀₀ 组中,LC3-II/LC3-I 较 Con 组降低($P < 0.05$);Beclin-1 蛋白的表达量在 Con 组、LPS₂₅₀ 组和 LPS₅₀₀ 组间差异无统计学意义($P > 0.05$),而在 LPS₁₀₀₀ 组中,Beclin-1 蛋白表达较 Con 组明显下调($P < 0.05$)。同时,免疫荧光实验结果显示 IF-LPS 组中小鼠肺成纤维细胞内自噬小体的表达量较 IF-Con 组明显降低。**结论** 在体外培养的小鼠肺成纤维细胞中应用 1 000 $\mu\text{g/L}$ 的 LPS 可以下调 LC3 和 Beclin-1 的蛋白表达,并抑制自噬小体的形成,表明 LPS 可以抑制肺成纤维细胞的自噬。提示 LPS 抑制肺成纤维细胞的自噬可能是肺纤维化发生的机制之一。

【关键词】 脂多糖; 成纤维细胞; 肺纤维化; 自噬**基金项目:** 国家自然科学基金(81670057)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2019.02.002

An observational study on autophagy in mouse lung fibroblasts inhibited by lipopolysaccharide

Xie Tingting, Xu Qiaoyi, Xing Shunpeng, Wan Hanxi, Gao Yuan, He Zhengyu

Department of Critical Care Medicine, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127, China

Corresponding author: He Zhengyu, Email: hzyyy@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the effects of lipopolysaccharide (LPS) on the expression of autophagy-associated proteins, Beclin-1 and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) in primary mouse lung fibroblasts in vitro. **Methods** Primary cultured mouse lung fibroblasts were seeded in 6-well plates at a density of 1×10^4 /ml. After adherence, the cells were starved by free-serum culture media overnight and then divided into four groups according to random number table ($n=3$): a phosphate buffer saline (PBS) control group (group Con), a 250 $\mu\text{g/L}$ LPS group (group LPS₂₅₀), a 500 $\mu\text{g/L}$ LPS group (group LPS₅₀₀) and a 1 000 $\mu\text{g/L}$ LPS group (group LPS₁₀₀₀). The cells were exposed to PBS and the corresponding concentrations of LPS for 30 h before total protein extraction. The expression of Beclin-1 and LC3 were determined by Western blot. Meanwhile, the cells were divided into two groups according to random number table ($n=3$): group IF-Con and group IF-LPS. The formation of autophagosomes was observed by immunofluorescence. **Results** The amount of LC3 protein was down-regulated as the increase of LPS concentrations. The ratio of LC3-II/LC3-I was apparently higher in group Con than that in other groups, which was gradually decreased as the concentrations of LPS increased. A lower ratio of LC3-II/LC3-I was found in group LPS₁₀₀₀ than that in group Con ($P < 0.05$). There was no obvious difference in Beclin-1 expression among groups Con, LPS₂₅₀ and LPS₅₀₀. However, a remarkably decreased amount of Beclin-1 was found in group LPS₁₀₀₀ than that in group Con ($P < 0.05$). Furthermore, the fibroblasts showed a marked weaker fluorescence expression of autophagosomes in group IF-LPS compared to those in group IF-Con. **Conclusions** The expression of LC3 and Beclin-1 can be down-regulated by 1 000 $\mu\text{g/L}$ LPS, and the formation of autophagosomes were inhibited by LPS at a concentration of 1 000 $\mu\text{g/L}$. The findings indicates that LPS inhibits autophagy in mouse lung fibroblasts, which could be part of the internal mechanism of pulmonary fibrosis.

[Key words] Lipopolysaccharide; Fibroblast; Pulmonary fibrosis; Autophagy

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81670057)

DOI:10.3760/ema.j.issn.1673-4378.2019.02.002

肺纤维化是急性呼吸窘迫综合征发展的重要病理阶段,以肺成纤维细胞在肺组织异常积聚、活化并引起肺组织的过度修复和胶原沉积为特征,最终导致难治性呼吸衰竭^[1]。革兰阴性杆菌细胞壁的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是急性呼吸窘迫综合征和肺纤维化的重要致病因素^[24]。肺纤维化的形成可严重影响患者预后,明确内毒素血症引起肺纤维化的机制对于该病的有效防治有着重要的意义。

本课题组的前期研究已经发现,LPS 可以通过活化磷脂酰肌醇 3 激酶-蛋白激酶 B(phosphatidylinositol 3-kinase-Akt, PI3K-Akt) 通路引起肺成纤维细胞增殖^[5-6],而其他研究提示特发性肺纤维化患者的肺成纤维细胞中存在自噬抑制现象^[7],该过程与 PI3K-Akt 通路及其下游的雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR) 的活化相关。本研究拟通过检测 LPS 刺激后小鼠肺成纤维细胞自噬微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP1LC3)(以下简称 LC3) 和 Beclin-1 的表达情况评价 LPS 对肺成纤维细胞自噬过程的影响,以明确肺成纤维细胞自噬状态在急性呼吸窘迫综合征早期肺纤维化发展过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 小鼠肺成纤维细胞的原代培养

雄性野生型 C57BL/6 小鼠 6 只(上海交通大学医学院附属仁济医院动物实验室提供),室温(20±2)℃饲养,昼夜节律,自然饮水、进食。小鼠的使用和喂养严格遵照上海交通大学医学院附属仁济医院实验动物保护和使用委员会所规定的所有条款。动物 8 周龄,体重(20.1±1.3) g,在无菌状态下迅速取肺,以 PBS (生产批号:AC11223329, Hyclone 公司,美国)漂洗 3 次后,剪成 1 mm×1 mm×1 mm 组织块,均匀平铺于 10 cm 培养皿底部,加入含 10%胎牛血清(生产批号:42F3575K, Gibco 公司,美国)的高糖培养基(生产批号:1929914, Gibco 公司,美国),培养基中加入 1×10⁵ U/L 青霉素和 1×10⁵ U/L 链霉素,置于含 5% CO₂、充分湿化的 37℃恒温孵育箱(型号:BB15, Thermo Scientific 公司,美国)中培养,

2~3 d 换液 1 次。细胞达到 90%融合时加入 1 ml 0.25%胰酶(生产批号:2530054, Gibco 公司,美国)消化 1~2 min,按 1:3 比例传代。细胞经 4 代培养后呈典型梭形,经免疫细胞化学鉴定胞质中波形蛋白强阳性,证实为成纤维细胞,可用于实验。

1.2 Western blot 法检测 Beclin-1、LC3 的蛋白表达

采用 Western blot 法检测经 LPS 刺激后自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3 在肺成纤维细胞中的表达情况。LC3 有 LC3-I 和 LC3-II 两种存在形式,在自噬发生过程中 LC3-I 会转变为 LC3-II。LC3-I 存在于胞质,而 LC3-II 结合于自噬小体的表面,因此检测到 LC3 即提示检测到自噬小体。应用免疫荧光技术可直观地检测肺成纤维细胞予 LPS 刺激后,LC3 在细胞内的表达及分布情况,即自噬小体的表达及分布情况。以 Cy3 染 LC3 蛋白,在荧光显微镜的激发下呈红色荧光,DAPI 染细胞核作为定位,在荧光显微镜的激发下呈蓝色荧光。

1.2.1 实验分组及处理

将传代细胞以 1×10⁴ 个/ml 的密度接种于 2 个 6 孔培养板,2.5 ml/孔,培养 6 h,待细胞贴壁并达到 60%融合后,更换培养基为无血清培养基饥饿过夜,采用随机数字表法将其分为 4 组:PBS 对照组(Con 组)、250 μg/L LPS 组(LPS₂₅₀ 组)、500 μg/L LPS 组(LPS₅₀₀ 组)、1 000 μg/L LPS 组(LPS_{1 000} 组)。Con 组加入 PBS 作为对照,LPS₂₅₀ 组、LPS₅₀₀ 组和 LPS_{1 000} 组分别加入终浓度为 250、500、1 000 μg/L 的 LPS (生产批号:Lot#018M4049V, Sigma 公司,美国)。经 LPS 或 PBS 处理后 30 h,取各组 3 孔收集细胞,用于下述指标的测定。

1.2.2 肺成纤维细胞中 Beclin-1、LC3 蛋白表达检测

从培养箱取出细胞,弃去细胞培养基,以 PBS 洗去细胞碎片,将细胞置于冰上,每孔加入 100 μl 含有 PMSF 溶剂、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液(生产批号:P0013B, 上海碧云天生物技术有限公司),用预冷的细胞刮将细胞刮下,冰上裂解细胞 10~15 min 后,将样品转移至 EP 管中,4℃、15 000 g 离心 10 min 后取上清,以 2,2-联喹啉-4,4-二甲酸二钠法测定蛋白浓度,根据样本体积加入相应体积的 5×loading buffer 上样缓冲液(生产批号:

P0015, 上海碧云天生物技术有限公司), 振荡器混匀后, 100 ℃煮沸 10 min。根据所测蛋白浓度计算 30 μg 样品的上样体积, 选用 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳, 使用转移电泳装置(型号: Power Pac HC, Bio-Rad 公司, 美国)在 4 ℃、恒流 300 mA 条件下电转移 65 min, 将蛋白样品转移到 PVDF 膜(型号: IPVH00010, Milipore 公司, 德国)上。用吐温 20 Tris 盐酸缓冲液 (Tris-buffered Saline with Tween 20, TBST)(TBS+0.1% Tween 20)加 5% 脱脂奶粉配成的封闭液室温封闭 PVDF 膜 1 h, TBST 冲洗后加入用含 5% 牛血清蛋白(生产批号: ST023, 上海碧云天生物技术有限公司)的 TBST 稀释的目的蛋白或内参 β -actin 的一抗 [Anti-Beclin-1 (1:1 000 稀释, 生产批号: D40C5, Cell Signal Technology 公司, 美国)、Anti-LC3 (1:1 000 稀释, 生产批号: 095M4815V, Sigma 公司, 美国)、Anti- β -actin (1:1 000 稀释, 生产批号: D6A8, Cell Signal Technology 公司, 美国)] 4 ℃孵育过夜, TBST 冲洗 PVDF 膜后加入用含 5% 牛血清蛋白的 TBST 稀释的与一抗相应的辣根过氧化物酶山羊抗兔二抗 (1:100 稀释, 生产批号: A0208, 上海碧云天生物技术有限公司), 室温孵育 1 h, TBST 冲洗 PVDF 膜后, 在显影仪 (型号: Universal Hood II, Bio-Rad 公司, 美国)上进行显色反应。显色后, 使用 Image Lab (Bio-Rad 公司, 美国)和 Image J (v 1.46r, National Institute of Mental Health, Bethesda, 美国)软件对蛋白条带的灰度值进行定量分析。以目标蛋白灰度值与 β -actin 灰度值的比值表示目标蛋白的表达水平。

1.3 免疫荧光技术检测 LC3 蛋白的表达

采用免疫荧光技术检测经 LPS 刺激后肺成纤维细胞中 LC3 蛋白的表达情况。

1.3.1 实验分组及处理

将原代培养的肺成纤维细胞在传代培养时接种到预先放置有无菌盖玻片的 12 孔培养板中, 接种密度 1×10^4 个/ml, 1 ml/孔, 待细胞贴壁并达到 60% 融合时(注意保证细胞在盖玻片上呈单层生长), 更换培养基为无血清培养基饥饿过夜。次日将细胞按照随机数字表法分为两组(每组 3 孔): IF-Con 组(加入 PBS 作为对照)和 IF-LPS 组(加入 1 000 μg/L 的 LPS), 经 PBS 或 LPS 处理 30 h 后, 从细胞培养箱中取出细胞, 进行免疫荧光染色步骤。

1.3.2 肺成纤维细胞 LC3 蛋白表达的检测

予 PBS 清洗盖玻片后, 以 4% 多聚甲醛(生产批号: 171221, 上海潜亿生物科技有限公司)固定细胞

10 min, 再以 0.5% Triton X-100 (生产批号: 0694, Biosharp 生物科技有限公司)穿膜 10 min, 其后予 1% 牛血清蛋白封闭 1 h, 加入 LC3 一抗(1:200 稀释, 生产批号: 095M4815V, Sigma 公司, 美国), 4 ℃孵育过夜, 次日以 PBS 漂洗去盖玻片上的一抗, 予 Cy3 标记的山羊抗兔二抗(1:200 稀释, 生产批号: A0516, 上海碧云天生物技术有限公司)避光室温孵育 1 h, 然后用含有 4,6-二脒基-2-苯基吲哚 (4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 核染料的封片剂 (Santa Cruz 公司, 美国)进行封片。以上固定、穿膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育、封片步骤之间, 都应用 PBS 漂洗盖玻片 3 次, 每次 10 min。封片后将倒扣在载玻片上的盖玻片置于荧光显微镜(型号: DMi8, Leica Microsystems 公司, 德国)下观察、拍照, 此过程注意避光。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计学软件进行数据分析, 正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用非配对 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blot 技术检测 LC3 和 Beclin-1 的蛋白表达情况

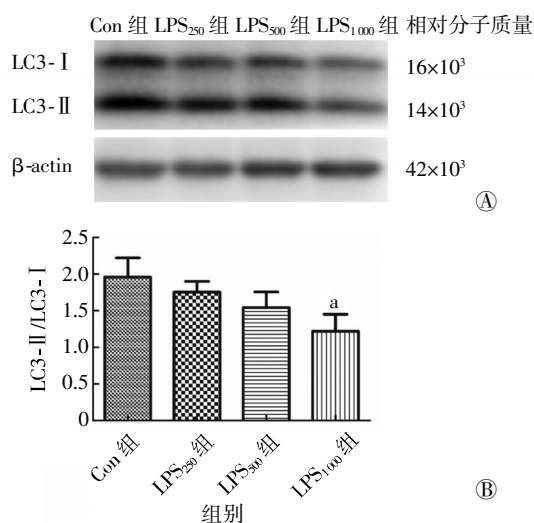
实验结果显示: 随着 LPS 浓度的增高, LC3 蛋白表达量下调, LC3-II/LC3-I 在 Con 组最高, 随 LPS 浓度的升高逐渐降低, LPS_{1 000} 组 LC3-II/LC3-I 较 Con 组明显降低 ($P < 0.05$, 图 1); Beclin-1 蛋白的表达量在 Con 组、LPS₂₅₀ 组和 LPS₅₀₀ 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), LPS_{1 000} 组中 Beclin-1 蛋白表达较 Con 组明显下调 ($P < 0.05$, 图 2)。LC3-II/LC3-I 与 Beclin-1 蛋白的灰度值比较见表 1。

2.2 免疫荧光技术检测自噬小体的表达及分布情况

实验结果表明, 在肺成纤维细胞个数相近的视野中, IF-LPS 组红色荧光的强度较 IF-Con 组低 (图 3)。

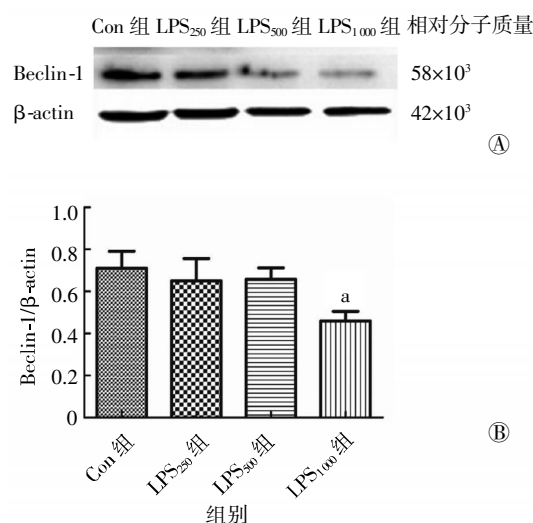
3 讨论

革兰阴性杆菌细胞壁的 LPS 是内毒素的主要成分, 也是急性呼吸窘迫综合征和肺纤维化的重要致病因素^[8-11]。作为直接合成和分泌胶原蛋白的效应细胞, 对于肺成纤维细胞在 LPS 作用下在组织损伤修复与炎症微环境调控等方面作用机制的深入



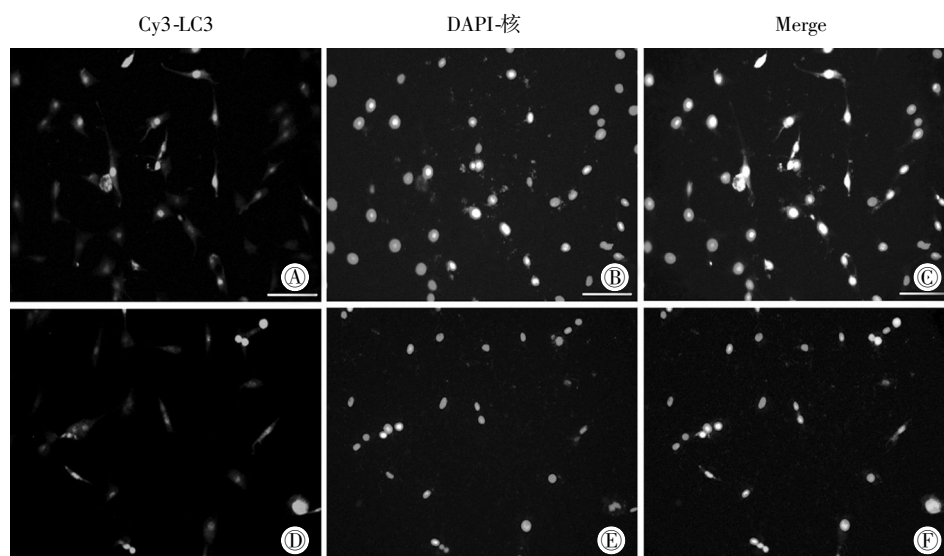
注:与 Con 组比较,* $P<0.05$;Con 组:PBS 对照组;LPS₂₅₀组:250 $\mu\text{g/L}$ LPS 刺激组;LPS₅₀₀组:500 $\mu\text{g/L}$ LPS 刺激组;LPS₁₀₀₀组:1 000 $\mu\text{g/L}$ LPS 刺激组;LC3:自噬微管相关蛋白轻链 3;LPS:脂多糖

图 1 LPS 刺激小鼠肺成纤维细胞 30 h 后 LC3-II/LC3-I 蛋白的相对表达水平比较 A:Western blot 结果;B:LC3-II 比 LC3-I 的相对表达量



注:与 Con 组比较,* $P<0.05$;Con 组:PBS 对照组;LPS₂₅₀组:250 $\mu\text{g/L}$ LPS 刺激组;LPS₅₀₀组:500 $\mu\text{g/L}$ LPS 刺激组;LPS₁₀₀₀组:1 000 $\mu\text{g/L}$ LPS 刺激组;LPS:脂多糖

图 2 LPS 刺激小鼠肺成纤维细胞 30 h 后 Beclin-1 蛋白的相对表达水平比较 A:Western blot 结果;B:Beclin-1 蛋白的相对表达量



注:IF-Con 组:加入 PBS 作为对照;IF-LPS 组:加入 1 000 $\mu\text{g/L}$ 的 LPS;LC3:自噬微管相关蛋白轻链 3

图 3 LPS 以 1 000 $\mu\text{g/L}$ 刺激小鼠肺成纤维细胞 30 h 后 LC3 蛋白的免疫荧光表达(免疫荧光染色 ×200) A:IF-Con 组 LC3 荧光蛋白表达;B:IF-Con 组细胞核定位;C:IF-Con 组(A)与(B)整合后结果;D:IF-LPS 组 LC3 荧光蛋白表达;E:IF-LPS 组细胞核定位;F:IF-LPS 组(D)与(E)整合后结果

表 1 4 组小鼠肺成纤维细胞 LC3-I、LC3-II 和 Beclin-1 的蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞孔数(孔)	LC3-II/LC3-I	Beclin-1/β-actin
Con 组	3	1.96±0.26	0.71±0.80
LPS ₂₅₀ 组	3	1.75±0.15	0.65±0.11
LPS ₅₀₀ 组	3	1.54±0.21	0.66±0.55
LPS ₁₀₀₀ 组	3	1.22±0.23 ^a	0.45±0.05 ^a

注:与 Con 组比较,* $P<0.05$;LC3:自噬微管相关蛋白轻链 3;Con 组:PBS 对照组;LPS₂₅₀组:250 $\mu\text{g/L}$ LPS 刺激组;LPS₅₀₀组:500 $\mu\text{g/L}$ LPS 刺激组;LPS₁₀₀₀组:1 000 $\mu\text{g/L}$ LPS 刺激组;LPS:脂多糖

探讨始终是该领域研究的重要方向。本研究在细胞学水平证实,LPS 可下调肺成纤维细胞中自噬相关蛋白 Beclin-1 的表达,并抑制 LC3-I 向 LC3-II 的转化,抑制自噬小体的形成,表明 LPS 可以抑制肺成纤维细胞的自噬,提示 LPS 抑制肺成纤维细胞的自噬可能是肺成纤维细胞异常聚集及肺纤维化形成的机制之一。

自噬是在各种生理或病理因素诱导下,细胞内大分子物质和细胞器聚集包裹形成自噬体,并与溶酶

体融合形成自噬溶酶体而被降解的生物学过程^[12]。Beclin-1 是自噬体形成过程中的一个必需分子,它能够介导其他自噬蛋白定位于吞噬泡,调控哺乳动物自噬体的形成与成熟。在自噬过程中,Beclin-1 的表达水平往往会上升,因此常被用作检测自噬发生的指标。LC3 是目前明确贯穿整个自噬过程并能出现在晚期自噬溶酶体中的自噬相关蛋白,自噬形成时,LC3-I 会酶解掉一小段多肽,转变为 LC3-II,因此,LC3-II/LC3-I 的大小可估计自噬水平的高低^[13],以往也有大量研究通过检测 LC3-II/LC3-I 变化来反映自噬水平的变化^[14-17]。而 LC3-II 结合于自噬小体的表面,因此检测到 LC3 即提示检测到自噬小体。故本研究选用 Beclin-1 和 LC3 两个经典的自噬相关蛋白作为检测指标。

我们的实验结果表明,在体外培养的小鼠肺成纤维细胞中,应用 1 000 $\mu\text{g/L}$ 的 LPS 可以下调自噬相关蛋白 LC3 和 Beclin-1 的表达,表明一定浓度的 LPS 可以抑制肺成纤维细胞的自噬。本课题组的前期研究表明:以 1 000 $\mu\text{g/L}$ LPS 刺激肺成纤维细胞 48~72 h,可见细胞增殖速率显著增加^[18]。提示 LPS 可能通过抑制肺成纤维细胞自噬参与肺纤维化过程。有研究表明,特发性肺纤维化患者的肺组织及肺成纤维细胞均存在自噬水平低下的现象^[19],能使肺成纤维细胞抵抗基质胶原蛋白诱导的凋亡过程,由此在肺组织中异常增殖积聚并形成肺成纤维细胞灶,与肺纤维化的发生密切相关^[7]。本课题组的前期研究已经发现 LPS 可活化其特异性受体 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)抑制肺成纤维细胞胸腺细胞分化抗原-1(thymocyte differentiation antigen 1, Thy-1)基因的表达而发生表型转变,形成 Thy-1(-)的肺成纤维细胞并引起细胞异常增殖^[18]。Thy-1 是成纤维细胞表面由糖磷脂酰肌醇锚定的糖蛋白。正常肺组织中肺成纤维细胞存在 Thy-1 的适度表达,而肺纤维化组织中存在大量 Thy-1 表达缺失并异常增殖的肺成纤维细胞^[20]。Schmidt 等^[21]在正常皮肤真皮细胞中发现 Thy-1 能与整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 结合而抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,而 Thy-1 基因表达缺失能引起细胞的异常增殖。目前已证实在 Thy-1(+)的正常肺成纤维细胞中,Thy-1 能与整合素 $\alpha\text{v}\beta 5$ 相互作用而抑制胶原蛋白诱导的细胞活化过程^[22]。Zhu 等^[23]发现整合素 $\beta 3$ 的活化能通过 Akt 抑制心肌细胞的自噬过程,提示整合素的活化状态可能影响细胞的自噬过程。本课题组前期研究也已经证实,LPS

可以通过活化 PI3K-Akt 通路引起肺成纤维细胞异常增殖^[5-6]。mTOR 蛋白是 PI3K-Akt 通路的下游产物,已经有大量研究证实 PI3K-Akt-mTOR 通路的活化可抑制肺成纤维细胞的自噬并促进肺纤维化进程^[7,24]。结合上述研究结果,我们推测 LPS 可能通过作用于肺成纤维细胞膜表面的 TLR4 受体,抑制了其表面 Thy-1 基因的表达,促使整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 分子构象改变而活化,从而促进了 PI3K-Akt-mTOR 信号通路的活化,抑制了 mTOR 信号通路下游的自噬的发生。

自噬是一种在外界压力、饥饿或应激等情况下发生的一种自我保护性的对细胞内受损细胞器或蛋白的降解^[25]。李少莹^[26]的研究发现,LPS 能使人肺泡上皮细胞株 A549 细胞自噬水平增加,最小细胞毒剂量的 LPS 可能通过内质网应激诱导肺泡上皮细胞自噬性死亡;Rah 等^[27]的研究也发现,LPS 可以诱导肝细胞自噬的发生。可见,前人已有大量研究证实低浓度的 LPS 可以诱导自噬的发生,而我们的课题发现在小鼠肺成纤维细胞中,高浓度的 LPS 可以抑制肺成纤维细胞的自噬。对此我们推测,低浓度的 LPS 对于细胞本身的刺激可以看作是一种应激,且这种自噬的发生作为一种细胞的自我保护机制对维持细胞的稳态和自身平衡起到积极作用;而高浓度的 LPS 刺激可能会破坏细胞的这种自身平衡,从而使细胞的自噬受到抑制,促进了肺成纤维细胞的增殖。

本次课题仅观察性探究了 LPS 对肺成纤维细胞的自噬结果的影响,而没有深入探究其内在可能的机制,也未能在动物体内对这一结果进行验证;同时研究方法较为单一,还存在很多不足。在今后的研究中,有必要运用包括电镜、双荧光体系等多种实验技术对 LPS 是否通过 PI3K-Akt-mTOR 通路抑制肺成纤维细胞的自噬进行深入探讨,并在组织学水平对这一假说进行验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Meduri GU, Eltorky MA. Understanding ARDS-associated fibroproliferation[J]. Intensive Care Med, 2015, 41(3): 517-520. DOI: 10.1007/s00134-014-3613-0.
- [2] He Z, Zhu Y, Jiang H. Toll-like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced collagen secretion by phosphoinositide3-kinase-Akt pathway in fibroblasts during acute lung injury [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2009, 29 (2): 119-125. DOI:10.1080/

- 10799890902845690.
- [3] Li H, Du S, Yang L, et al. Rapid pulmonary fibrosis induced by acute lung injury via a lipopolysaccharide three-hit regimen[J]. *Innate Immun*, 2009, 15(3): 143-154. DOI:10.1177/1753425908101509.
 - [4] He Z, Zhu Y, Jiang H. Inhibiting toll-like receptor 4 signaling ameliorates pulmonary fibrosis during acute lung injury induced by lipopolysaccharide: an experimental study [J/OL]. *Respir Res*, 2009, 10: 126. DOI:10.1186/1465-9921-10-126.
 - [5] He Z, Gao Y, Deng Y, et al. Lipopolysaccharide induces lung fibroblast proliferation through Toll-like receptor 4 signaling and the phosphoinositide3-kinase-Akt pathway [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35926. DOI:10.1371/journal.pone.0035926.
 - [6] He Z, Deng Y, Li W, et al. Overexpression of PTEN suppresses lipopolysaccharide-induced lung fibroblast proliferation, differentiation and collagen secretion through inhibition of the PI3-K-Akt-GSK3 β pathway[J/OL]. *Cell Biosci*, 2014, 4(1): 2. DOI:10.1186/2045-3701-4-2.
 - [7] Nho RS, Hergert P. IPF fibroblasts are desensitized to type I collagen matrix-induced cell death by suppressing low autophagy via aberrant Akt/mTOR kinases [J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94616. DOI:10.1371/journal.pone.0094616.
 - [8] 何征宇, 朱也森, 姜虹. 间断腹腔注射脂多糖制作内毒素诱导的小鼠急性肺损伤肺纤维化动物模型 [J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2010, 9(1): 76-80. DOI:10.3969/j.issn.1671-6205.2010.01.021.
 - [9] Xing S, Nie F, Xu Q, et al. HDAC is essential for epigenetic regulation of Thy-1 gene expression during LPS/TLR4-mediated proliferation of lung fibroblasts [J]. *Lab Invest*, 2015, 95(10): 1105-1116. DOI:10.1038/labinvest.2015.97.
 - [10] Li W, Xu Q, Deng Y, et al. High-mobility group box 1 accelerates lipopolysaccharide-induced lung fibroblast proliferation in vitro: involvement of the NF- κ B signaling pathway [J]. *Lab Invest*, 2015, 95(6): 635-647. DOI:10.1038/labinvest.2015.44.
 - [11] Du S, Li H, Cui Y, et al. *Houttuynia cordata* inhibits lipopolysaccharide-induced rapid pulmonary fibrosis by up-regulating IFN- γ and inhibiting the TGF- β 1/Smad pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 13 (3): 331-340. DOI:10.1016/j.intimp.2012.03.011.
 - [12] Qian M, Fang X, Wang X. Autophagy and inflammation[J/OL]. *Clin Transl Med*, 2017, 6 (1): 24. DOI:10.1186/s40169-017-0154-5.
 - [13] 吕晓希, 胡卓伟. 自噬流的检测方法 [J]. *药学报*, 2016, 51(1): 45-51. DOI:10.16438/j.0513-4870.2015-0877.
 - [14] 王振宇. 机械损伤诱导脊髓神经元细胞自噬与凋亡之间作用的实验研究[D]. 福州: 福建医科大学, 2013.
 - [15] 王雪晶, 丁雪冰, 马明明, 等. 原发性帕金森病患者皮肤活检术检测自噬功能研究[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2014, (23): 10-12. DOI:10.3969/j.issn.1673-5110.2014.23.004.
 - [16] 马晓雯, 常芸, 王世强. 长期耐力训练对大鼠心肌细胞自噬相关因子 Beclin1 和 LC3 的影响[J]. *体育科学*, 2016, 36(2): 66-71. DOI:10.16469/j.css.201602008.
 - [17] 刘斌, 唐静, 袁敏, 等. 自噬在血管性痴呆发病中的作用研究[J]. *临床神经病学杂志*, 2013, 26(6): 424-429.
 - [18] He Z, Wang X, Deng Y, et al. Epigenetic regulation of Thy-1 gene expression by histone modification is involved in lipopolysaccharide-induced lung fibroblast proliferation[J]. *J Cell Mol Med*, 2013, 17(1): 160-167. DOI:10.1111/j.1582-4934.2012.01659.x.
 - [19] Im J, Hergert P, Nho RS. Reduced FoxO3a expression causes low autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts on collagen matrices[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 309(6): L552-L561. DOI:10.1152/ajplung.00079.2015.
 - [20] Tian B, Lessan K, Kahm J, et al. β_1 integrin regulates fibroblast viability during collagen matrix contraction through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/protein kinase B signaling pathway [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(27): 24667-24675. DOI:10.1074/jbc.M203565200.
 - [21] Schmidt M, Gutknecht D, Simon JC, et al. Controlling the balance of fibroblast proliferation and differentiation: impact of Thy-1[J]. *J Invest Dermatol*, 2015, 135(7): 1893-1902. DOI:10.1038/jid.2015.86.
 - [22] Zhou Y, Hagood JS, Lu B, et al. Thy-1-integrin $\alpha_5\beta_5$ interactions inhibit lung fibroblast contraction-induced latent transforming growth factor- β 1 activation and myofibroblast differentiation[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (29): 22382-22393. DOI:10.1074/jbc.M110.126227.
 - [23] Zhu Y, Li L, Gong S, et al. β_3 -integrin inhibits lipopolysaccharide-induced autophagy in cardiomyocytes via the Akt signaling pathway [J]. *Cardiology*, 2015, 130 (4): 249-259. DOI:10.1159/000371489.
 - [24] Gui YS, Wang L, Tian X, et al. mTOR overactivation and compromised autophagy in the pathogenesis of pulmonary fibrosis[J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138625. DOI:10.1371/journal.pone.0138625.
 - [25] Jin Y, Hong Y, Park CY, et al. Molecular interactions of autophagy with the immune system and cancer [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(8): E1694. DOI:10.3390/ijms18081694.
 - [26] 李少莹. 自噬在 LPS 诱导的肺泡上皮细胞死亡中的作用及机制研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2015.
 - [27] Rah SY, Lee YH, Kim UH. NAADP-mediated Ca^{2+} signaling promotes autophagy and protects against LPS-induced liver injury[J]. *FASEB J*, 2017, 31(7): 3126-3137. DOI:10.1096/fj.201601290R.

(本文编辑: 祁寒)