

TGF- β /Smad 信号通路中关键基因在肺纤维化进程中的功能

杨慧楠^a, 吕达^a, 王乐^a, 刘春城^{a,b}, 姜志艳^{a,b}, 赵宏宇^{a,b}, 蔡禄^{a,b}

内蒙古科技大学 a. 生命科学与技术学院 b. 内蒙古自治区功能基因组生物信息学重点实验室, 内蒙古包头 014010



DOI 10.11836/JEOM21599

摘要:

[背景] 转化生长因子- β (TGF- β)/Smad 信号通路是调控肺纤维化发生发展的一条重要信号通路, 对其调控分子机制的理解仍然有限。

[目的] 探究纤维化标志物以及 TGF- β /Smad 信号通路中相关基因在肺纤维化进程中的变化及功能。

[方法] 建立 TGF- β 1 诱导 NIH-3T3 成纤维细胞模型, 实验分为对照组、TGF- β 1 处理组。对照组采用生理盐水代替 TGF- β 1 进行同样的培养和处理, TGF- β 1 处理组用 10 ng·mL⁻¹ TGF- β 1 诱导 12 h 后收集细胞。提取两组细胞 RNA, 进行转录组测序, 经生物信息学分析, 筛选获得 TGF- β 通路中 *Dcn*、*Smad3*、*Smad7*、*Fbn1*、*Thbs1*、*TGF- β 1*、*TGF- β 3* 七种关键基因。采用实时荧光定量 PCR 法检测 I 型胶原 α 1(*Collagen1 α 1*)、I 型胶原 α 2(*Collagen1 α 2*)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、*TGF- β 1*、*TGF- β 3* 五种标志基因和七种通路关键基因 mRNA 的表达情况。提取两组细胞蛋白, 采用 Western blotting 检测 Smad3、磷酸化的 Smad3(P-Smad3)、 α -SMA 三种重要标志蛋白的表达。随后, 选取 30 只 SPF 级 C57 BL/6 健康雄性小鼠, 随机分成对照组、SiO₂ 染尘 28 d 组和 SiO₂ 染尘 56 d 组, 每组 10 只。染尘组小鼠每天在 SiO₂ 粉尘环境中暴露 4 h, 隔 2 h 取出呼吸 10 min 新鲜空气, 分别染尘 28、56 d。在两个时间点各处死 10 只小鼠取肺组织, 通过 Masson 染色检测肺组织纤维化程度变化, 提取 RNA 和蛋白检测上述关键基因和蛋白的表达。

[结果] 与对照组相比: TGF- β 1 诱导的 NIH-3T3 成纤维细胞中, *Collagen1 α 1*、*Collagen1 α 2*、 α -SMA、*TGF- β 1*、*TGF- β 3* 五种标志物的基因表达水平平均升高($P < 0.01$); P-Smad3 和 α -SMA 蛋白的表达水平平均增加($P < 0.01$); *Dcn* 和 *Smad3* 表达下调($P < 0.01$), *Smad7*、*Fbn1*、*Thbs1*、*TGF- β 1*、*TGF- β 3* 表达上调($P < 0.01$), 与转录组测序的基因表达量变化趋势一致。染尘小鼠肺组织的 Masson 染色结果显示, 随着染尘时间增加, SiO₂ 染尘组小鼠肺组织内的胶原纤维含量也随之增加。与对照组相比, SiO₂ 染尘组小鼠肺组织内五种标志基因的表达水平平均上调($P < 0.01$); Smad3 蛋白表达无明显变化, P-Smad3 和 α -SMA 表达水平较对照组明显升高($P < 0.01$); *Dcn*、*Smad3* 表达下调($P < 0.01$), *Smad7*、*Fbn1*、*Thbs1*、*TGF- β 1*、*TGF- β 3* 表达上调($P < 0.01$), 且都呈现随染尘天数的增加而下降或升高的趋势。上述五种标志基因、三种重要标志蛋白以及七种通路关键基因的表达均与 TGF- β 1 诱导的 NIH-3T3 成纤维细胞中的表达趋势一致。

[结论] TGF- β 1 诱导成纤维细胞中肺纤维化相关标志基因和蛋白表达水平变化有统计学意义, 染尘小鼠肺纤维化特征明显。*Dcn*、*Smad3*、*Smad7*、*Fbn1*、*Thbs1*、*TGF- β 1*、*TGF- β 3* 七种基因可能参与了 TGF- β /Smad 信号通路对肺纤维化的调控。

关键词: 肺纤维化; 转化生长因子- β ; TGF- β /Smad 信号通路; NIH-3 T3 细胞; 转录组测序

Functions of key genes involved in TGF- β /Smad signaling pathway in progression of pulmonary fibrosis YANG Huinan^a, LYU Da^a, WANG Le^a, LIU Chuncheng^{a,b}, JIANG Zhiyan^{a,b}, ZHAO Hongyu^{a,b}, CAI Lu^{a,b} (a. School of Life Science and Technology b. Inner Mongolia Autonomous Region Key Laboratory of Functional Genome Bioinformatics, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou, Inner Mongolia 014010, China)

Abstract:

[Background] Although transforming growth factor- β (TGF- β)/Smad signaling pathway is

基金项目

国家自然科学基金(62071259, 31760247); 内蒙古自然科学基金(2021MS03007, 2019MS08175)

作者简介

杨慧楠(1997—), 女, 硕士生;
E-mail: 2226508225@qq.com

通信作者

赵宏宇, E-mail: zhaohongyu2000@163.com
蔡禄, E-mail: nmcailu@163.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-12-19

录用日期 2022-04-12

文章编号 2095-9982(2022)07-0745-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

杨慧楠, 吕达, 王乐, 等. TGF- β /Smad 信号通路中关键基因在肺纤维化进程中的功能 [J]. 环境与职业医学, 2022, 39(7): 745-751.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21599

Funding

This study was funded.

Correspondence to

ZHAO Hongyu, E-mail: zhaohongyu2000@163.com

CAI Lu, E-mail: nmcailu@163.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2021-12-19

Accepted 2022-04-12

► To cite

YANG Huinan, LYU Da, WANG Le, et al. Functions of key genes involved in TGF- β /Smad signaling pathway in progression of pulmonary fibrosis[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(7): 745-751.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21599

important in regulating the occurrence and development of pulmonary fibrosis, the pathogenesis of pulmonary fibrosis remains elusive.

[Objective] To explore the functions of genes associated with TGF- β /Smad signaling pathway in the progression of pulmonary fibrosis.

[Methods] A NIH-3T3 fibroblast model induced by TGF- β 1 was established. The experiment samples were divided into a control group and a TGF- β 1 treatment group. The control group was exposed to normal saline, while the TGF- β 1 treatment group was exposed to 10 ng·mL⁻¹ TGF- β 1 for 12 h. The RNAs of the two groups were extracted, sequenced, and analyzed by bioinformatics methods to identify seven key genes in TGF- β pathway, including *Dcn*, *Smad3*, *Smad7*, *Fbn1*, *Thbs1*, *TGF- β 1*, and *TGF- β 3*. The gene expression levels of five markers [*Collagen1 α 1*, *Collagen1 α 2*, α -smooth muscle actin (α -SMA), *TGF- β 1*, and *TGF- β 3*] and the seven key genes were detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The proteins of the two groups were extracted. The important marker protein expression levels of Smad3, the phosphorylation of Smad3 (P-Smad3), and α -SMA were detected by Western blotting. At the same time, 30 healthy SPF-grade C57BL/6 mice were randomly divided into three groups, with 10 mice in each group: a control group, a SiO₂ inhalation exposure group for 28 d (10 mice), and a SiO₂ inhalation exposure group for 56 d (10 mice). The mice in the two treatment groups were exposed to a natural SiO₂ environment for 4 h per day with a 10-min pause for breathing fresh air at 2 h intervals. The lung tissues of the mice were taken after execution. The changes of pulmonary fibrosis were detected by Masson staining, and mRNAs and proteins were extracted to detect the expression of the above key genes and proteins.

[Results] The expression levels of the five marker genes *Collagen1 α 1*, *Collagen1 α 2*, α -SMA, *TGF- β 1*, and *TGF- β 3* were significantly increased in the TGF- β 1-induced NIH-3T3 fibroblasts than those in the control group ($P < 0.01$); the expression levels of P-Smad3 and α -SMA proteins increased significantly ($P < 0.01$); the expression results of the seven key genes screened in the TGF pathway were that *Dcn* and *Smad3* were obviously down-regulated ($P < 0.01$), and *Smad7*, *Fbn1*, *Thbs1*, *TGF- β 1*, and *TGF- β 3* were obviously up-regulated ($P < 0.01$). The changes in gene expression levels of the transcriptome sequencing showed the same trend. The results of Masson staining showed that the content of collagen fibers in the lung tissues also increased in the SiO₂ inhalation exposure groups over time. In the mouse experiment, five marker genes were obviously up-regulated compared with the control group ($P < 0.01$); no obvious change was found in the expression of Smad3 protein, and the expression levels of P-Smad3 and α -SMA were obviously higher in the SiO₂ exposure groups than those in the control group ($P < 0.01$); the expression levels of *Dcn* and *Smad3* showed a down-regulated trend, while the expression levels of *Smad7*, *Fbn1*, *Thbs1*, *TGF- β 1*, and *TGF- β 3* showed an up-regulated trend with the increase of SiO₂ inhalation exposure days ($P < 0.01$). The expression levels of the above five marker genes, three important marker proteins, and seven key genes were consistent with the expression trends of TGF- β 1-induced NIH-3T3 fibroblasts.

[Conclusion] The expression levels of pulmonary fibrosis-related marker genes and proteins change significantly in TGF- β 1-induced fibroblast cells, and the lung tissues of mice under natural SiO₂ inhalation exposure has obvious fibrosis characteristics. Seven genes (*Dcn*, *Smad3*, *Smad7*, *Fbn1*, *Thbs1*, *TGF- β 1*, and *TGF- β 3*) may be involved in the regulation of pulmonary fibrosis by the TGF- β /Smad signaling pathway.

Keywords: pulmonary fibrosis; transforming growth factor- β ; TGF- β /Smad signaling pathway; NIH-3T3 cells; transcriptome sequencing.

肺纤维化是一种病因复杂且不可逆的病理过程, 数种疾病都会引起肺纤维化, 例如职业病中占比最大的尘肺病的典型病理特征就是慢性炎症和进展性肺纤维化^[1-2], 在部分新型冠状病毒肺炎痊愈患者中发现肺部有纤维化病症^[3], 常见的肺源性和心源性疾病、肺炎/支气管哮喘等慢性呼吸道疾病均会引起肺部纤维化^[4]。肺纤维化发病者会部分丧失劳动力, 诊断后的生存时间仅为 2~3 年, 较许多癌症的预后都要差^[5]。

肺组织受到损伤后, 若伤口不能完全愈合, 则可能会促进肺纤维化的发展。损伤以及伤口愈合过程包含四个不同的阶段: 损伤、炎症、成纤维细胞增殖迁移和损伤修复^[6-7]。例如, 在尘肺病的发生发展过程中, 粉尘颗粒进入肺部持续刺激, 肺部受到损伤, 巨噬细胞会分泌大量诸如转化生长因子- β (transforming growth factor β , TGF- β)、成纤维细胞生长因子、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β 、白细胞介素-6 等细胞或趋化因子。此时已经进入炎症期, 成纤维细胞会增殖分化为肌成纤维细胞,

激活的肌成纤维细胞会大量释放诸如胶原、 α -平滑肌肌动蛋白 (alpha-smooth muscle actin, α -SMA) 等细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 成分, 导致纤维结缔组织的过度沉积^[8]。最后在损伤修复阶段, 激活的肌成纤维细胞可以促进伤口修复, 导致伤口收缩和血管恢复。但当修复过程失调或肺损伤刺激持续存在时, 通常会导致肺纤维化。

TGF- β 是目前最受关注且临床研究较多的细胞因子。该因子被认为是纤维化的核心因子, 也是一种标志性的促纤维化调节因子, 在多个纤维化器官的表达均显著上调^[9-11], 如肾纤维化组织^[12]、肝纤维化组织^[13]、肺泡灌洗液^[14]。TGF- β 与细胞表面受体结合并启动典型或非典型细胞内信号传导, 通过激活细胞内复杂的信号通路以及调控通路内的相关分子机制, 促进纤维化并调节免疫反应和炎症。典型的 TGF- β 信号传导途径主要通过 Smad 依赖性途径。配体结合并激活 TGF- β 受体, 导致 Smad2/3 磷酸化, 活化后与 Smad4 形成三元复合物, 并转移到细胞核中, 调节

基因转录^[15]。

肺纤维化过程涉及肺组织内部多种细胞间交互作用、细胞内多种通路中众多分子相互影响等复杂因素。为了筛选出在此条通路中起主要作用的关键基因,探究纤维化标志以及相关基因在肺纤维化进程中的变化及功能,结合上述肺纤维化致病机制,本研究拟建立 TGF- β 1 诱导 NIH-3T3 小鼠成纤维细胞模型,处理后进行转录组测序和生物信息学分析,筛选出 TGF- β 通路中的七种关键基因,并利用动式染尘法建立动物模型,分别在 NIH-3T3 成纤维细胞和染尘小鼠肺组织中检测五种标志基因、三种标志蛋白和通路中七种关键基因的表达情况。

1 对象与方法

1.1 试剂与仪器

无特定病原体(SPF)级 C57BL/6 小鼠,雄性,8~10 周龄,体重 20~25 g(北京斯贝福生物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2019-0010); SiO₂ 颗粒,直径 0.5~10 μ m(美国 Sigma 试剂);小鼠成纤维细胞 NIH-3T3,无微生物、支原体污染等(中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库);杜尔贝科改良伊格尔培养基(DMEM)高糖培养基、Trypsin-乙二胺四乙酸(EDTA, 2.5 mL·L⁻¹)胰蛋白酶(美国 Gibco 试剂);胎牛血清(美国 Hyclone 试剂);TGF- β 1 细胞因子(美国 Biolenged 试剂);基因引物序列合成(中国苏州金唯智);Smad3、磷酸化的 Smad3(P-Smad3)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国 Cell Signaling Technology 试剂); α -SMA 抗体、放射免疫沉淀法(RIPA)裂解缓冲液、聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(增强型)(中国上海碧云天试剂);总 RNA 提取试剂 RNAiso Plus、反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser、实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)试剂盒 TB Green® Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus,其中包括荧光定量 PCR 参比染料 Rox Reference Dye;日本 TaKaRa 试剂);增强型化学发光试剂(ECL)高灵敏显色液(美国 Thermo Scientific 试剂);Masson 三色染色试剂盒(北京索莱宝试剂);紫外分光光度计(Nanodrop 2000,美国 Thermo Fisher);荧光倒置显微镜(Eclipse Ti-U,日本尼康株式会社);多功能酶标仪(Synergy HT,美国伯腾);qRT-PCR 仪(ABI 7500,美国 ABI);化学发光成像系统成像(Tanon-4800 Mui,中国上海天能)。

1.2 TGF- β 1 诱导成纤维细胞的培养及处理

将细胞置于 DMEM 高糖培养基中培养,胎牛血清

含量为 10%,培养条件为 37 °C、5%CO₂。采用荧光倒置显微镜观察细胞形态。待细胞汇合度生长至 70%~80%,使用胰蛋白酶进行消化,取对数生长期的细胞接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后,分别进行不同处理。样品分为对照组和 TGF- β 1 处理组,TGF- β 1 处理组采用含有 10 ng·mL⁻¹ TGF- β 1 的培养基进行培养,对照组采用生理盐水代替 TGF- β 1 进行同样的培养,12 h 后收集细胞。使用 RNAiso Plus 抽提细胞中总 RNA 后按照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 说明书合成 cDNA 模板。按照试剂盒说明书在冰上配制反应体系,终体系为 20 μ L。混匀后,放入 PCR 仪中 37 °C 15 min,85 °C 5 s。所得各组 cDNA 样本于 -80 °C 保存。使用 RIPA 裂解液提取细胞中总蛋白置于 -80 °C 保存。将 TGF- β 1 诱导的 NIH-3T3 成纤维细胞中提取总 RNA 进行转录组测序,转录组测序分析工作由上海美吉生物医药科技有限公司完成。通过差异表达基因分析、京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析发现显著富集通路为“TGF- β 信号通路”,在被富集到该信号通路差异表达的基因中 *Dcn*、*Smad3*、*Smad7*、*Fbn1*、*Thbs1*、TGF- β 1、TGF- β 3 七种基因可能与肺纤维化相关。

1.3 动式染尘法处理小鼠及分组

将 C57BL/6 小鼠正常饲养一周后,随机分为对照组、SiO₂ 染尘 28 d 组和 SiO₂ 染尘 56 d 组,每组 10 只。在染尘之前观察小鼠状况,用天平称量小鼠体重,体重严格控制在(22 $\pm$ 2)g。对照组小鼠常规饲养,不做任何处理。每天将染尘组小鼠放于染尘舱内染尘 4 h,每隔 2 h 取出小鼠呼吸 10 min 新鲜空气,在第 28 天和第 56 天时各处死 10 只取肺组织,将每只染尘小鼠肺组织分为三部分:一部分进行 Masson 染色处理,经过 Masson 染色后肌纤维呈红色,胶原纤维呈蓝色,便于观察胶原纤维含量变化程度;收集另外两部分肺组织经液氮研磨后分别加入 RNAiso Plus 和 RIPA 提取总 RNA 和总蛋白,置于 -80 °C 备用。染尘舱参数设置:粉尘发生器速度设定为 0.2 r·min⁻¹(离心半径 11 mm)离心 4 h,空气流量为(17 $\pm$ 1)L·min⁻¹,染尘 4 h 进入染尘舱的粉尘重量控制在 35 g。通过环境监测系统检测染尘舱内温度为 22.0 °C,含水量为 14.0 g·L⁻¹,氧气含量为 20.4 mL·L⁻¹,CO₂ 含量为 0.04 mL·L⁻¹。动物实验经内蒙古科技大学实验动物管理委员会审查批准,审批号为 NMGKJDX-2019-10。

1.4 Western blotting 法测定标志蛋白的表达

检测细胞中蛋白表达情况时,用 RIPA 裂解液提取

细胞总蛋白,使用BCA试剂盒检测蛋白浓度后蛋白定量,确定上样量后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,5%脱脂奶粉封闭,加入Smad3、P-Smad3、 α -SMA或GAPDH抗体,4℃过夜孵育;第2天洗涤后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,孵育1h;去除膜上多余液体,将发光底物ECL均匀覆盖在PVDF膜上,避光反应3~5 min。Tanon-4800 Multi化学发光成像系统成像,用Image J软件对蛋白条带进行灰度分析,检测Smad3、P-Smad3、 α -SMA蛋白的表达情况。检测肺组织中标志蛋白表达情况时,首先将肺组织匀浆,用RIPA裂解液提取细胞总蛋白,其他步骤与上述一致。

1.5 qRT-PCR 法检测标志基因与关键基因的表达水平

在细胞培养箱中取出处理好的细胞,弃去6孔板内培养液,加入1×磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗一遍后,每个孔内加入1 mL RNAiso Plus进行RNA提取实验,使用反转录试剂盒反转录成cDNA进行后续实验。设计肺纤维化相关基因的特异引物(表1)进行qRT-PCR分析。将反转录产物cDNA稀释10倍,使用TB Green™ Premix Ex Taq™ II实时定量PCR试剂盒,ABI7500 PCR仪进行扩增。20 μ L反应体系:TB Green Premix Ex Taq II 10 μ L,上下游引物各0.8 μ L,双蒸水(ddH₂O)6 μ L,荧光定量PCR参比染料Rox Reference Dye 0.4 μ L,cDNA模板2 μ L。扩增反应程序:95℃预变性30 s,95℃变性5 s,60℃Tm 34 s,共40个循环。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算五种标志基因、七种通路关键基因的相对表达量。取20 mg染尘小鼠肺组织迅速转移到已经预冷过的研钵中,加入液氮研磨,加入RNAiso Plus进行RNA提取,其他步骤与上述一致。基因引物序列如表1所示。

表1 本实验所用引物序列

Table 1 The primer sequences in this experiment

基因名称 Gene name	正向(5'-3') Forward (5'-3')	反向(5'-3') Reverse (5'-3')
GAPDH	GCA GTGGCAAAGTGGAGATT	GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT
Dcn	AACTGTGCTATGGGAGTAGAAGCA	ATCTCATGTATTTTCACGACCTTTT
Smad3	GGAGGGGAGGCTTTTGCG	GCTCGGGGAACCCATCTG
Smad7	TTTTCTCAAACCACTGCAGGC	GGGCTCTTGGACACAGTAGAG
Fbn1	CACGGTTTCCCATACGC	CCCTGCCGATCCCACT
TGF- β 1	CTGCTGACCCCACTGATAC	GGGGCTGATCCCGTTGATT
Thbs1	AGCATCCGAAAAGTGACGGAA	GGGACAGGACACCTTTTTCG
TGF- β 3	CAATTACTGCTCCGCAACCT	GCTCCTCTAGGGGCCACT
Collagen1 α 1	ACCGTGCTATGGGTTGTGTC	CCACGTCTACCATTTGGGG
Collagen1 α 2	ACGCGTCTCTGGATGAGAAA	ACGTCGTAGTTGAGGCTGCT
α -SMA	ACTACTGCCGAGCGTGAGAT	CCAATGAAAGATGGCTGGA

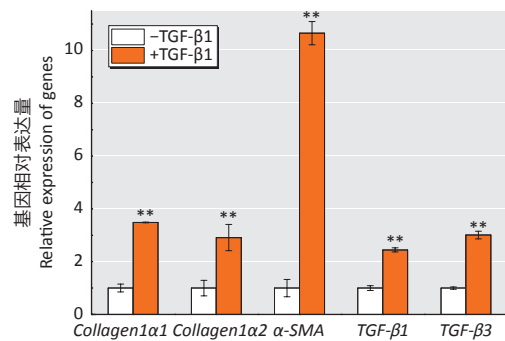
1.6 统计学分析

各组数据采用SPSS 19.0进行统计学分析。组间差异使用单因素方差分析(ANOVA)和LSD-t检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞实验

2.1.1 成纤维细胞中标志基因水平的变化 TGF- β 1诱导的成纤维细胞中标志基因表达变化结果如图1所示。与对照组相比,处理组基因表达均明显上调,差异具有统计学意义($P<0.01$)。



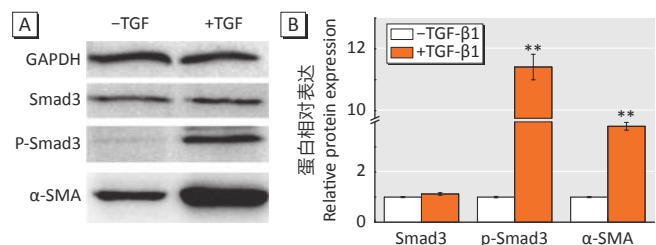
[注] -TGF- β 1: 生理盐水诱导12 h; +TGF- β 1: TGF- β 1(10 ng·mL⁻¹)诱导12 h。**: 与-TGF- β 1组相比, $P<0.01$ 。

[Note] -TGF- β 1: Normal saline exposure for 12 h; +TGF- β 1: TGF- β 1 (10 ng·mL⁻¹) exposure for 12 h. **: Compared with the -TGF- β 1 group, $P<0.01$.

图1 不同条件下成纤维细胞中标志基因表达

Figure 1 Relative expression levels of marker genes in fibroblasts under different conditions

2.1.2 成纤维细胞中重要标志蛋白水平的变化 与正常对照组相比,处理组中GAPDH与Smad3蛋白条带灰度无明显差异,P-Smad3和 α -SMA蛋白的表达均有明显上调,且差异有统计学意义($P<0.01$),见图2。



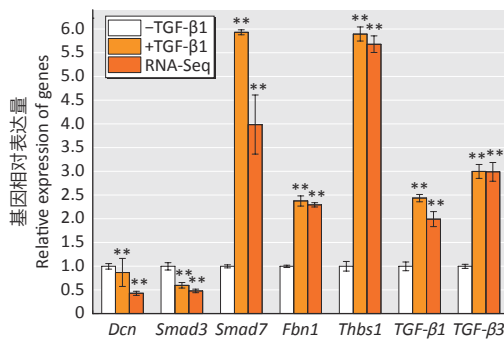
[注] A: Western blotting 蛋白条带; B: 蛋白水平的定量分析。-TGF- β 1: 生理盐水诱导12 h; +TGF- β 1: TGF- β 1(10 ng·mL⁻¹)诱导12 h。**: 与-TGF- β 1组相比, $P<0.01$ 。

[Note] A: Western blotting protein bands; B: Quantitative analysis of protein levels. -TGF- β 1: Normal saline exposure for 12 h; +TGF- β 1: TGF- β 1 (10 ng·mL⁻¹) exposure for 12 h. **: Compared with the -TGF- β 1 group, $P<0.01$.

图2 不同条件下成纤维细胞中重要标志蛋白表达

Figure 2 Expression of important marker proteins in fibroblasts under different conditions

2.1.3 成纤维细胞中 TGF- β 通路相关基因表达水平的变化 TGF- β 1 诱导成纤维细胞中 TGF- β 通路中相关基因表达水平结果如图 3 所示, 与对照组(1.0)相比, 处理组 *Dcn* 相对表达量下调至 0.8, *Smad3* 下调至 0.5, *Smad7* 上调至 6 倍, *Fbn1* 上调至 2.3 倍, *Thbs1* 上调至 5.7 倍, *TGF- β 1* 上调至 2.5 倍, *TGF- β 3* 上调至 3 倍, 差异均有统计学意义($P < 0.01$), 与转录组测序的基因表达量变化趋势一致。



[注] -TGF- β 1: 生理盐水诱导 12 h; +TGF- β 1: TGF- β 1(10 ng·mL⁻¹)诱导 12 h; RNA-Seq: 转录组测序结果。**: 与-TGF- β 1 组相比, $P < 0.01$ 。

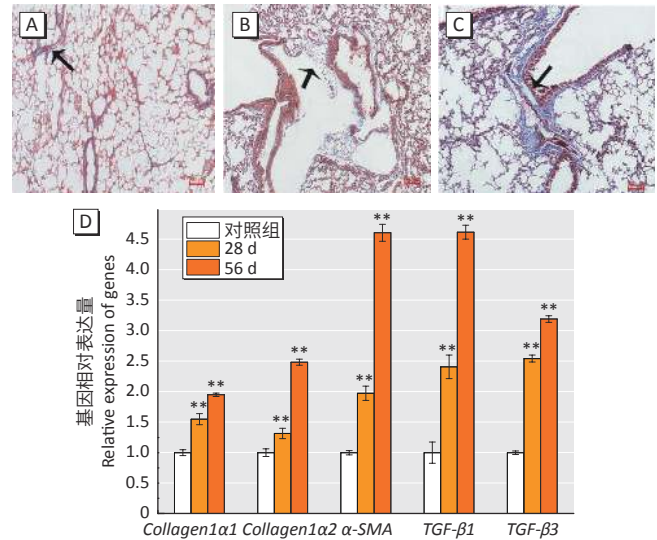
[Note] -TGF- β 1: Normal saline exposure for 12 h; +TGF- β 1: TGF- β 1 (10 ng·mL⁻¹) exposure for 12 h; RNA-Seq: Transcriptome sequencing results. **: Compared with the -TGF- β 1 group, $P < 0.01$.

图 3 不同条件下成纤维细胞中 TGF- β 通路相关基因表达
Figure 3 Relative expression levels of genes involved in TGF- β pathway in fibroblasts under different conditions

2.2 动物实验

2.2.1 小鼠肺组织形态学变化及标志基因表达水平的变化 不同染尘天数下的小鼠肺组织中的胶原含量变化如图 4A、4B、4C 所示。图片中胶原纤维呈蓝色, 对照组有少量蓝色, SiO₂ 染尘 56 d 组明显比 SiO₂ 染尘 28 d 组蓝色范围更加广阔, 说明小鼠肺组织随着染尘天数的增加, 胶原纤维含量也随之增加。如图 4D 所示, 实验检测了染尘小鼠肺组织中 α -SMA、Collagen1 α 1、Collagen1 α 2、TGF- β 3、TGF- β 1 五种肺纤维化相关基因的表达变化情况, 与对照组相比, 处理组均明显上调($P < 0.01$)。

2.2.2 小鼠肺纤维化组织中重要标志蛋白水平的变化 不同染尘天数下小鼠肺纤维化组织中重要标志蛋白水平变化结果如下图 5 所示, 不同组别的内参蛋白 GAPDH 和 Smad3 的灰度几乎保持一致, SiO₂ 染尘 28 d 和 56 d 组中 Smad3 蛋白的磷酸化水平(P-Smad3)分别增加 1.82 和 2.52 倍。同时, 实验检测了肺纤维化标志性蛋白 α -SMA 的表达水平, 结果发现 SiO₂ 染尘 28 d 组中 α -SMA 蛋白的表达也略有上升, 染尘 56 d 组中升高, 均高于对照组($P < 0.05$)。

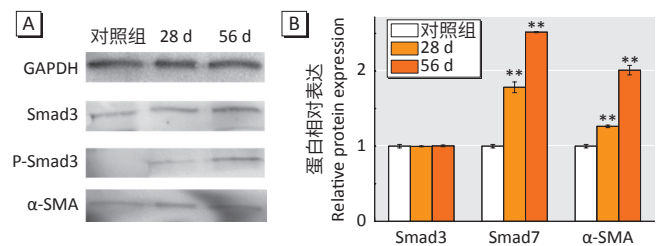


[注] 胶原纤维为蓝色。对照组(图 A)有少量蓝色, SiO₂ 染尘 56 d 组(图 C)明显比 SiO₂ 染尘 28 d 组(图 B)蓝色范围更加广阔。图 D 表示对照组、SiO₂ 染尘 28 d 和 56 d 时肺组织中标志基因表达变化, **: 与对照组相比, $P < 0.01$ 。

[Note] Masson staining can dye collagen fibers blue. The control group (Figure A) shows a small amount of blue, and the SiO₂ inhalation exposure group for 28 d (Figure B) shows less blue than the SiO₂ inhalation exposure group for 56 d (Figure C). Figure D shows the expression changes of marker genes in lung tissues of the control group and the SiO₂ inhalation exposure groups for 28 d and 56 d, **: Compared with the control group, $P < 0.01$.

图 4 不同 SiO₂ 染尘天数下小鼠肺组织中生物标志的
Masson 染色以及基因表达

Figure 4 Masson staining results and relative expression levels of biomarker genes in lung tissues of mice after different exposure time of SiO₂ inhalation



[注] A: Western blotting 蛋白条带。B: 蛋白水平的定量分析; **: 与对照组相比, $P < 0.01$ 。

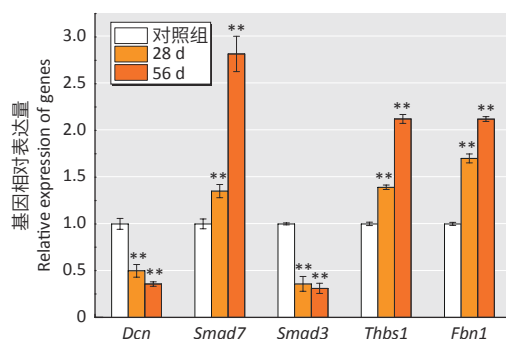
[Note] A: Western blotting protein bands. B: Quantitative analysis of protein levels; **: Compared with the control group, $P < 0.01$.

图 5 不同 SiO₂ 染尘天数下小鼠肺纤维化组织中
重要标志蛋白表达

Figure 5 Expression of important marker proteins in lung fibrosis tissues of mice after different exposure time of SiO₂ inhalation

2.2.3 小鼠肺组织中 TGF- β 通路的关键基因表达水平验证 不同染尘天数下小鼠肺组织中 TGF- β 通路的关键基因 TGF- β 1 和 TGF- β 3 的表达水平见图 4, 其他五种基因表达水平的检测结果见图 6 所示。与对照组相比, 在小鼠染尘 28 d 和 56 d 时, *Dcn* 和 *Smad3* 表达下调, 而 *Smad7*、*Thbs1* 和 *Fbn1* 表达水平上调($P < 0.01$)。

这些基因在染尘小鼠肺组织中的表达模式与 TGF- β 1 诱导成纤维细胞中的结果一致。



[注] **: 与对照组相比, $P < 0.01$ 。

[Note] **: Compared with the control group, $P < 0.01$.

图6 不同 SiO₂ 染尘天数下小鼠肺组织中 TGF- β 通路相关基因表达

Figure 6 Relative expression levels of genes involved in TGF- β pathway in lung tissues of mice after different exposure time of SiO₂ inhalation

3 讨论

由于肺纤维化是一种不可逆的病变,而且死亡率非常高,所以分析肺纤维化的致病机制以及筛选分子标志十分重要。TGF- β /Smad 信号通路与纤维化密切相关,纤维化通常是由各种刺激(例如慢性感染、局部缺血、变态反应和自身免疫反应、化学损伤或放射损伤)引起的慢性持续性炎症导致的^[16]。在纤维化过程中,TGF- β 1 作为主要的促纤维化细胞因子,促进间质型细胞标志物胶原蛋白、肌成纤维细胞特征性分泌 α -SMA 表达,使 ECM 过度沉积,纤维母细胞/肌纤维母细胞异常增殖,肺泡组织结构破坏, α -SMA 的过度表达会导致胶原沉积,并诱发多种纤维化疾病^[17]。在纤维化阶段,TGF- β 1 是启动肺纤维化进程的关键因子,本研究的实验结果也证实了在 TGF- β 1 诱导的成纤维细胞中 TGF- β 1 和 TGF- β 3 基因表达水平都上调。在动式染尘法处理小鼠实验中,在对照组小鼠肺组织中正常表达,在 SiO₂ 染尘组小鼠肺组织中表达同样升高,且 Smad3 磷酸化水平增加,提示 Smad3 信号通路可能参与了纤维化过程。上述两个实验中均通过 qRT-PCR 法检测发现 Collagen1 α 1、Collagen1 α 2、TGF- β 1、TGF- β 3 以及 α -SMA 基因表达量都上调,Western blotting 检测磷酸化 Smad3 蛋白和 α -SMA 蛋白含量也上调。这一发现也说明了 TGF- β 1 的上调诱发 Smad3 磷酸化水平增加,促进了小鼠肺组织的纤维化,表明动物和细胞中均表现出显著的纤维化特征。

TGF- β 1 和 TGF- β 3 基因的高表达可能触发了 TGF- β 信号通路,进一步增强 TGF- β 的 I 型受体与 Smad2、3

蛋白的结合,使其磷酸化从而导致活化,活化后与 Smad4 蛋白结合成复合物,转移至细胞核中参与靶基因调节。Smad7 具有刺激成纤维细胞增生,促进组织器官纤维化形成等作用,Smad7 基因在 TGF- β 信号通路中作为负调控因子,与活化的 TGF- β 的 I 型受体结合,在 TGF- β 信号传导中构成反馈抑制,因此 Smad7 基因的表达出现上调。Smad3 基因受到反馈抑制后,自身产生阻遏效应,导致其表达下调^[18]。并且在炎症期间,Fbn1 作为一种原纤维蛋白会随着胶原蛋白的产生大量增加,因此表达量上调;核心蛋白聚糖 Dcn 与胶原纤维相关,在 ECM 调节中起关键作用,抗增殖活性能够直接影响纤维化的形成,因此在纤维化过程中,Dcn 表达呈现下调趋势^[19]。在正常生理状态下,当炎症反应缓解后上皮间质转化过程(epithelial-mesenchymal transition, EMT)会自行停止;而在炎症反应持续活化的情况下,EMT 过程也将持续存在,最终造成组织器官纤维化,因此 Thbs1 作为 EMT 过程中发挥作用的关键基因,表达量也会随之上调^[20]。

目前最受关注且临床研究较多的是 TGF- β 因子,该因子被认为是纤维化的核心因子,也是一种标志性的促纤维化调节因子。TGF- β 主要是通过 TGF- β /Smad 信号通路参与下游基因调控和蛋白合成,在纤维化过程中起重要调控作用,因此 TGF- β /Smad 信号通路是纤维化过程中的重要通路之一。本实验通过单一细胞因子 TGF- β 1 诱导 NIH-3T3 成纤维细胞,经转录组学测序以及生物信息学分析和相关实验验证,筛选出 TGF- β 通路中对肺纤维化起调控作用的七种关键基因。这一工作可为从分子生物学角度认识尘肺病提供信息。

本研究发现,在肺纤维化过程中,随着肺纤维化程度加深,炎症反应也更加剧烈,TGF- β 的含量也随着增加,这些变化均促进了肺纤维化进程,Dcn、Smad3、Smad7、Fbn1、Thbs1、TGF- β 1、TGF- β 3 是 TGF- β 通路重要的差异表达基因。尽管这些基因调控肺纤维化的精确分子机制仍需要进一步研究,但是这些基因的确定对理解 TGF- β 调控肺纤维化的致病因子关键标志和药物作用靶点以及分子标志物筛查具有参考价值。

参考文献

- [1] 国家卫生健康委发布2020年全国职业病报告[J]. 职业卫生与应急救援, 2021, 39(4): 381.
The National Health commission released the 2020 national occupational disease report[J]. Occup Health Emerg Rescue, 2021, 39(4): 381.
- [2] HUTCHINSON J, FOGARTY A, HUBBARD R, et al. Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review[J]. Eur

- Respir J, 2015, 46(3): 795-806.
- [3] LI J. Rehabilitation management of patients with COVID-19: lessons learned from the first experience in China[J]. Eur J Phys Rehabil Med, 2020, 56(3): 335-338.
- [4] 李伟. Gas6/Mer通路在石英致小鼠肺部炎症及纤维化中的作用及机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2020.
- LI W. Study on the role of Gas6/Mer signaling pathway in silica-induced lung inflammation and fibrosis in mice[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2020.
- [5] HEUKELS P, MOOR CC, VON DER THUSEN JH, et al. Inflammation and immunity in IPF pathogenesis and treatment[J]. Respir Med, 2019, 147: 79-91.
- [6] WYNN TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis[J]. J Exp Med, 2011, 208(7): 1339-1350.
- [7] HENDERSON NV, RIEDER F, WYNN TA. Fibrosis: from mechanisms to medicines[J]. Nature, 2020, 587(7835): 555-566.
- [8] UPAGUPTA C, SHIMBORI C, ALSILMI R, et al. Matrix abnormalities in pulmonary fibrosis[J]. Eur Respir Rev, 2018, 27(148): 180033.
- [9] DENG X, DENG L, WANG P, et al. Post-translational modification of CREB-1 decreases collagen I expression by inhibiting the TGF- β 1 signaling pathway in rat hepatic stellate cells[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(6): 5751-5759.
- [10] GYÖRFI AH, MATEI AE, DISTLER JH W. Targeting TGF- β signaling for the treatment of fibrosis[J]. Matrix Biol, 2018, 68-69: 8-27.
- [11] 杨萍芬, 牛艳芬. TGF- β 1/Smad信号通路在组织纤维化中的研究进展[J]. 国际药理学杂志, 2019, 46(10): 738-744.
- YANG PF, NIU YF. TGF- β 1/Smad signaling pathway in tissue fibrosis: research advances[J]. J Int Pharm Res, 2019, 46(10): 738-744.
- [12] 郭帅, 方敬, 陈志强. TGF- β 1介导的Smad和ERK信号通路在肾纤维化中的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(6): 766-770.
- GUO S, FANG J, CHEN ZQ. Research progress of Smad and ERK signaling pathway mediated by TGF- β 1 in renal fibrosis[J]. Chin J Immunol, 2022, 38(6): 766-770.
- [13] 郑洋, 卢能源, 黄永贤, 等. 基于TGF- β 1/Smad信号通路探讨莪术醇对肝纤维化小鼠作用的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(11): 149-152.
- ZHENG Y, LU NY, HUANG YX, et al. Experimental study on effect of Curcumin on hepatic fibrosis in mice based on TGF- β 1/Smad signaling pathway[J]. Chin Arch Trad Chin Med, 2021, 39(11): 149-152.
- [14] 罗立, 熊沿, 王慧, 等. 支气管肺泡灌洗液和血清中TGF- β IFN- γ 水平与特发性肺纤维化的关系[J]. 河北医学, 2021, 27(5): 762-767.
- LUO L, XIONG Y, WANG H, et al. Relationship between levels of TGF- β and IFN- γ in bronchoalveolar lavage fluid and serum and idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Hebei Med, 2021, 27(5): 762-767.
- [15] CHAIKUAD A, BULLOCK AN. Structural basis of intracellular TGF- β signaling: receptors and Smads[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016, 8(11): a022111.
- [16] POHLERS D, BRENNMOEHL J, LÖFFLER I, et al. TGF- β and fibrosis in different organs-molecular pathway imprints[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1792(8): 746-756.
- [17] 李雅群, 杨勇, 王旭, 等. 金银花石油醚部位抗肺纤维化药效作用及其成分分析[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(9): 1268-1275.
- LI YQ, YANG Y, WANG X, et al. Anti-pulmonary fibrosis effect of petroleum ether part of *Lonicera japonica* and its potential active components[J]. Trad Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2021, 32(9): 1268-1275.
- [18] 徐文文. 沙参麦冬汤含药血清联合顺铂对人肺腺癌A549细胞Smad3、Smad7及TGF- β 1蛋白表达的影响[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2020.
- XU W W. The effect of Shashen Maidong Decoction drug-containing serum combined with cisplatin on proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cells and expression of Smad3, Smad7 and TGF- β 1 protein[D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2020.
- [19] 董晓峰, 赵静, 王献华, 等. 转化生长因子 β 1相关基因在肺纤维化中的作用[J]. 现代预防医学, 2012, 39(6): 1548-1552.
- DONG XF, ZHAO J, WANG XH, et al. Effect of Transforming growth factor-beta1 related genes on the pulmonary fibrosis[J]. Mod Prev Med, 2012, 39(6): 1548-1552.
- [20] CUI Y, JI J, HOU J, et al. Identification of key candidate genes involved in the progression of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Molecules, 2021, 26(4): 1123.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 王晓宇)

· 告知栏 ·

《环境与职业医学》出版伦理声明

《环境与职业医学》遵循出版道德委员会 (Committee on Publication Ethics, COPE) 的指导方针调查和处理不当行为的指控或怀疑。

对于作者: ①所投稿件必须是作者的原创作品, 之前不得以印刷或在线形式发表, 或同时投给其他出版物, 如文中使用先前发表的资料(如图、表格)需要提供相关的归属权和许可证明; ②作者应保证所投稿件不存在任何学术不端行为, 学术不端行为定义见 CY/T 174—2019《学术出版规范—期刊学术不端行为界定》; ③所有作者在投稿时需签署“利益冲突声明”, 声明是否存在实际或潜在的利益冲突。

对于编辑与审稿人: 编辑和审稿人必须公开任何实际或潜在的竞争性利益, 包括所有被合理视为与审稿有关的经济利益或非经济利益; 有关竞争性利益和其他道德问题的更详细信息, 请参阅 COPE 指导方针。

《环境与职业医学》编辑部

2022年7月25日