

• 研究论文 •

细胞周期抑制因子 p21 活化巨噬细胞促进小鼠肺纤维化发生发展

魏旭鹏¹, 王婉玉², 李云炫², 刘畅², 吕晓希², 赵燕燕^{1*}, 刘姗姗^{2*}

(1. 河北大学药学院, 河北 保定 071000; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: 探讨博来霉素 (bleomycin, BLM) 损伤所致小鼠肺纤维化发病过程中肺泡巨噬细胞的细胞周期抑制因子 p21 (cell cycle inhibitor p21, p21) 蛋白表达及其对巨噬细胞活化的调节作用。免疫荧光染色法检测肺纤维化组织中肺泡巨噬细胞中 CD206 的表达; RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 法检测巨噬细胞活化标志蛋白的表达; 巨噬细胞/成纤维细胞共培养法检测巨噬细胞对成纤维细胞活化及胶原收缩能力的影响; 采用免疫荧光和免疫印迹法检测巨噬细胞中 p21 蛋白表达的变化; 采用 p21 敲低和过表达病毒感染肺泡巨噬细胞, RT-PCR 和巨噬细胞/成纤维细胞共培养法检测改变 p21 表达对肺泡巨噬细胞促纤维化表型的调节作用。动物实验操作过程依照中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所实验动物管理与动物福利委员会的要求执行。结果显示: 与对照组比较, 模型组肺泡巨噬细胞 CD206 的表达增加、巨噬细胞活化标志蛋白表达增加、模型组肺泡巨噬细胞促进成纤维细胞的活化并增强其胶原收缩能力。模型组小鼠肺泡巨噬细胞中 p21 蛋白表达增加。敲低 p21 可显著抑制巨噬细胞促纤维化表型, 而过表达对照小鼠肺泡巨噬细胞中 p21 则促进其促纤维化表型的转化。以上研究结果表明, 肺纤维化小鼠肺泡巨噬细胞中 p21 表达增加, p21 可通过促进巨噬细胞活化参与肺纤维化发病。

关键词: 肺纤维化; 巨噬细胞; p21; 成纤维细胞活化; 博来霉素损伤

中图分类号: R967 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)08-1792-09

The cell cycle inhibitor p21 promote mouse lung fibrosis by activating alveolar macrophages

WEI Xu-peng¹, WANG Wan-yu², LI Yun-xuan², LIU Chang², LÜ Xiao-xi²,
ZHAO Yan-yan^{1*}, LIU Shan-shan^{2*}

(1. Pharmacy College, Hebei University, Baoding 071000, China; 2. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: This study was to determine the expression of the cell cycle inhibitor p21 in alveolar macrophages (AMs) and the role of p21 in activation of AMs in bleomycin (BLM) injury-induced lung fibrosis. The expression of CD206 in AMs was measured by immunofluorescence staining. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay was used to detect the expression of macrophage activation markers. The coculture assay for macrophage and fibroblast was employed to explore the effect of macrophage on fibroblast activation. Immunofluorescence staining and western blotting assay were adopted to detect the expression of p21 in fibrotic tissues. AMs were treated with p21 knockdown or overexpression virus, RT-PCR and the co-culture system were used to explore the effect of p21 expression on macrophage activation. The Experimental Animal Welfare Ethics Committee of the

收稿日期: 2019-12-03; 修回日期: 2020-01-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81803604).

*通讯作者 Tel: 86-312-5971108, E-mail: zhaoyany606@126.com;

Tel: 86-10-83165034, E-mail: shanshan@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0965

Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College approved all of the protocols for this research. Our results showed that the expression of CD206 and macrophage activation markers was increased in AMs from fibrotic mice, indicating that AMs from fibrotic mice were associated with a profibrotic phenotype. Moreover, the expression of p21 was upregulated in AMs after BLM treatment. Depletion of p21 suppressed macrophage activation, while overexpression of p21 promoted the profibrotic phenotype of AMs from healthy mice. In summary, BLM injury causes the progressive accumulation of p21 in AMs, which induces the production of a number of profibrotic factors promoting the development of pulmonary fibrosis.

Key words: lung fibrosis; macrophage; p21; fibroblast activation; bleomycin injury

肺纤维化既是独立的疾病也是多种慢性纤维增生性肺病的基本病理改变, 是许多慢性肺病致残和致死的重要原因^[1]。近年来特发性肺纤维化发病率和致死率呈不断上升趋势。特发性肺纤维化临床诊断明确后的3年生生存率不足50%, 5年死亡率达65%^[2]。但是, 肺纤维化的发病机制尚未完全阐明, 更重要的是, 至今也没有公认的、真正能够逆转肺纤维化的药物^[3]。

巨噬细胞作为机体中重要的非特异性免疫细胞, 在不同的环境刺激下向不同的方向分化。目前根据其活化状态和发挥功能的不同, 将其分为2类, 即经典活化的巨噬细胞和替代性活化的巨噬细胞。经典活化的巨噬细胞的主要特点是分泌大量的促炎性细胞因子, 如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL1 β) 和白细胞介素6 (interleukin-6, IL6) 等, 主要参与起始组织损伤后的炎症反应。而替代性活化的巨噬细胞的主要特点是分泌大量的抗炎因子, 例如白细胞介素10 (interleukin-10, IL10) 和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β), 主要参与组织的修复和愈合^[4]。大量研究证实, 替代性活化的巨噬细胞大量存在于纤维化组织中, 表现为促纤维化的表型^[5-8], 其主要通过分泌大量的促纤维化因子来维持组织局部的促纤维化微环境, 进而促进成纤维细胞的增殖、迁移和向肌成纤维细胞的转化^[9], 提示替代性活化的巨噬细胞在纤维化的发生发展中发挥了重要的作用。因此, 研究巨噬细胞分化和活化的调节机制是深入了解组织纤维化包括肺纤维化发病机制的关键, 也可能是开发抗纤维化药物的新途径。细胞周期抑制因子p21不仅是一种已知的细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子^[10], 也被证实参与了机体先天免疫和适应性免疫的调控^[11-15]。p21可通过调节T细胞功能抑制自身免疫^[16,17]。近年来, 大量研究证实p21在巨噬细胞活化方面发挥了重要的调节作用。p21缺失可增强脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的巨噬细胞活化, 增加促炎因子的产生, 增强机体感染性休克的敏感性^[18,19]。p21通过调节巨噬细胞活化参与风湿性关节炎的转归^[20]。p21通过调节p50-p50 NF- κ B

和干扰素 β (interferon- β , IFN- β) 介导巨噬细胞的重编程^[21]。基于以上研究结果, 作者推测p21可能参与调节巨噬细胞所介导的免疫反应, 在肺纤维化的发生发展中发挥重要的调节作用。本研究观察了博来霉素 (bleomycin, BLM) 所致肺纤维化小鼠肺泡巨噬细胞中p21表达的改变, 并使用p21过表达病毒和敲低病毒探究了p21对肺泡巨噬细胞活化的调节作用。本研究的发现可能有助于深入理解肺纤维化的发病机制, 并为开发治疗肺纤维化的药物提供新的药靶和理论依据。

材料与方法

主要实验仪器 冷冻高速离心机 (美国 Beckman 公司); 电泳仪 (北京六一仪器厂); PCR 仪和荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); ImageQuant LAS 4000 mini 成像系统 (美国通用电气公司); 激光共聚焦显微镜 (日本奥林巴斯公司); 流式细胞分析仪 (美国 BD 公司); 细胞培养孵箱 (日本 Panasonic 公司)。

动物 C57BL/6J 小鼠 (雄性, 6周龄) 购自斯贝福 (北京) 实验动物科技有限公司。所有动物饲养在中国医学科学院药物研究所 SPF 级实验动物屏障设施系统。所有动物实验均满足中国医学科学院药物研究所实验动物福利和动物伦理要求。

材料和试剂 细胞培养基 DMEM、RPMI-1640、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 及青链霉素混合液 (Gibco 公司); 硫酸博来霉素 (上海赢瑞生物医药科技有限公司); 小鼠 p21 单克隆抗体 (Santa Cruz Biotechnology 公司); 小鼠 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体 (博士德生物公司); 鬼笔环肽 (Cell Signaling 公司); F4/80 (Abcam 公司); CD206 (BioLegend 公司); I 型鼠尾胶原 (Corning 公司); 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) (北京细工生物科技有限公司); TransZolUp 和 EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix (北京全式金生物技术有限公司); RIPA (radio immunoprecipitation assay) 裂解液和 BCA (bicinchoninic acid) 蛋白质测定试剂盒 (碧云天技术有限公司); KAPA SYBR 快速

定量试剂盒 (KAPA 技术有限公司); p21 过表达和敲低病毒 (汉恒生物技术有限公司)。

动物模型 通过气管内重复给予 BLM 刺激诱导小鼠发生不可逆肺纤维化。用 $400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 三溴乙醇腹腔注射麻醉小鼠。使用微量进样针将 $50 \mu\text{L}$ 的 BLM ($1 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$) 喷雾到气管中, 重复 6 次, 每次喷雾间隔 14 天。

Western blot 实验 取新鲜细胞及组织, 加入一定体积含有蛋白酶抑制剂 [4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟酸盐、抑肽酶、抑氨肽酶、亮肽素、胃酶抑素 A、*N*-反式-环氧琥珀酰-*L*-亮氨酸-4-胍基丁酰胺, Selleck 公司] 和苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 的 RIPA 裂解液, 冰上裂解, 30 min 后, $12\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min。收集上清液, 测定其蛋白浓度并进行定量, 加入 $5\times$ loading buffer, 于 98°C 变性 10 min, 取 $10 \mu\text{L}$ 上样, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳并转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 30 min 后, 一抗 4°C 孵育过夜, 次日用 TBST (Tris-buffered saline and tween 20) 溶液洗膜 3 次 (10 min/次), 加入二抗, 室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次 (10 min/次), 进行 ECL (electro-chemi-luminescence) 显影并拍照。

免疫荧光染色实验 取冰冻组织切片或接种细胞的盖玻片, 用 PBS 清洗, 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min, PBS 洗 3 次, 0.5% Triton X-100 透化 20 min, PBS 清洗 3 次, 3% 牛血清白蛋白 (albumin from bovine serum, BSA) 室温封闭 30 min, 加入 α -SMA 一抗和异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的鬼笔环肽 (1:100), 4°C 孵育过夜, PBS 清洗 3 次 (5 min/次), 加入对应的二抗 (1:200), 室温避光孵育 2 h, PBS 清洗 3 次 (5 min/次), 用含有 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 的封片剂进行封片, 荧光显微镜观察并拍照。

胶原收缩实验 (三维胶原蛋白凝胶) 将每 mL 细胞数为 2×10^5 个的原代小鼠肺成纤维细胞悬液与 I 型鼠尾胶原蛋白 ($3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 以 2:1 的比例混合后, 接种于 24 孔板中, 使胶原在 37°C 下凝固 1 h, 使凝胶边缘与孔壁分离, 加入 $500 \mu\text{L}$ 含 5% FBS 的 DMEM 培养基和 $500 \mu\text{L}$ 原代肺泡巨噬细胞的培养上清, 于 37°C 、5% CO_2 条件下共培养, 48 h 后拍摄凝胶图像, 并使用 Image J 软件测量凝胶面积。

流式细胞术分析 用刮子轻柔的将细胞刮下, 于 $400\times g$ 离心 5 min; 加入固定液, 室温避光孵育 20 min, $400\times g$ 离心 5 min, 弃上清; PBS 清洗 3 次, 用 $100 \mu\text{L}$ PBS 重悬细胞, 加入小鼠 F4/80-PE 和小鼠 CD206-FITC 抗体, 冰上避光染色 45 min; PBS 清洗 3 次并重悬细胞, 用流式细胞仪检测。

原代肺成纤维细胞分离 将野生小鼠处死, 打开

胸腔, 剥取完整肺组织, 去除气管和结缔组织, 将肺组织放入 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL DMEM 培养基, 用剪刀将肺剪碎, 于 $300\times g$ 离心 15 min, 弃上清, 沉淀重悬后, 铺于 10% FBS 的 DMEM 培养基中, 37°C 、5% CO_2 培养 5 天后, 细胞进行传代。

肺泡巨噬细胞分离 将野生小鼠处死, 用镊子剥离肌肉, 暴露气管, 并进行气管插管。吸取 1 mL 生理盐水, 反复冲洗肺泡 3 次, 将肺泡灌洗液收集于离心管中, 重复此操作 1 次。将收集的肺泡灌洗液于 $300\times g$ 离心 15 min, 弃上清, 沉淀重悬后, 铺于含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中, 37°C 、5% CO_2 培养 1 h, 待细胞贴壁后换液。

RNA 提取和实时 PCR ① 细胞总 RNA 提取: 用 PBS 清洗细胞后, 将 TransZolUp 溶液加入到细胞中, 收集细胞并涡旋使细胞充分裂解后, 加入氯仿涡旋混匀, 静置 5 min, 于 4°C 、 $10\,000\times g$ 离心 15 min, 取上清液至新的离心管中, 并加入一定比例的异丙醇, 颠倒混匀, 静置 10 min, 4°C 、 $10\,000\times g$ 离心 10 min, 弃上清, 加入等体积的 75% 乙醇, 4°C 、 $7\,500\times g$ 离心 10 min, 弃上清, 室温晾干后, 加 RNase-free 水, 静置 5 min, $10\,000\times g$ 离心 5 min 后, 测定 RNA 浓度; ② RNA 逆转录成 cDNA: 按照全式金逆转录试剂盒说明书进行; ③ 定量 PCR (quantitative-PCR, q-PCR) 反应: 反应体系 ($20 \mu\text{L}$) 如下: SYBR Premix ExTaq TM $10 \mu\text{L}$, 去离子水 $6 \mu\text{L}$, 上下游引物各 $1 \mu\text{L}$, 模板 cDNA $2 \mu\text{L}$ 。引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成, 序列如下: *Tgf- β 1* forward (F): 5'-GACATTCGGGAAGCAG-3'; *Tgf- β 1* reverse (R): 5'-CCACTCAGGCGTATCAG-3'; 发现于炎症区域分子 1 (found in inflammatory zone 1, *Fizz1*) F: 5'-GAACTTCTTGCCAATCC-3'; *Fizz1* R: 5'-GAACTTCTTGCCAATCC-3'; 几丁质酶样蛋白 3 (chitinase-like protein 3, *Chil3*) F: 5'-TCCTCAGAACCGTCAG-3'; *Chil3* R: 5'-GAGTAGCAGCCTTGGA-3'; *Il10* F: 5'-GGGGCCAGTACAGCCGGGAA-3'; *Il10* R: 5'-CTGGCTGAAGCATCCGCA-3'; 信号传导及转录激活蛋白 6 (signal transducer and activator of transcription 6, *Stat6*) F: 5'-ACGACAACAGCCTCAGTGTGGA-3'; *Stat6* R: 5'-CAGGACACCATCAAACCACTGC-3'; 信号传导及转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, *Stat3*) F: 5'-AGGAGTCTAACAACGGCAGCCT-3'; *Stat3* R: 5'-GTGGTACACCTCAGTCTCGAAG-3'; 干扰素调控因子 4 (interferon regulatory factor 4, *Irf-4*) F: 5'-GAACGAGGAGAAGAGCGTCTTC-3'; *Irf-4* R: 5'-GTAGGAGGATCTGGCTTGTCGA-3'; 转录因子 CCAAT 增强子结合蛋白 β (CCAAT/enhancer binding

protein β , *C/ebp- β*) F: 5'-CAACCTGGAGACGCAGCA CAAG-3'; *C/ebp- β* R: 5'-GCTTGAACAAGTTCCGCA GGGT-3'。两步法反应过程如下: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火和延伸 30 s, 循环次数 40 次。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Gapdh*) 作为内参, 将 Ct 值按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法进行处理。

统计学分析 使用 Graphpad Prism 5 统计分析软件进行数据统计和计算, 3 次以上重复实验获得的数据用 mean \pm standard error of mean (SEM) 表示, 用 Student's *t* 检验两组间数据的显著性差异, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 检验多组间的显著性差异, 显著性结果以 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$ 表示。

结果

1 肺纤维化小鼠肺泡巨噬细胞呈现促纤维化表型

肺泡巨噬细胞参与肺纤维化的发病, 替代性活化的巨噬细胞呈现促纤维化表型, 大量存在于肺纤维化组织中。同样, 在博来霉素所致小鼠肺纤维化模型中, 可观察到替代性活化的巨噬细胞的标志蛋白 CD206 的表达显著增加 (图 1A), 以及抑制性免疫因子 *Fizz1*、

Chil3、*Il10* 和 *Tgf- β 1* 的 mRNA 水平显著提高 (图 1B)。并且, 作者建立了模型组巨噬细胞与正常小鼠成纤维细胞共培养体系, 结果显示, 与模型组巨噬细胞共培养后, α -SMA 阳性的肌成纤维细胞数目显著增加 (图 1C), 胶原收缩能力增强 (图 1D)。以上结果进一步证实博来霉素损伤导致小鼠肺泡巨噬细胞呈现促纤维化表型。

2 肺纤维化小鼠肺泡巨噬细胞中 p21 表达增加

已有文献^[21]报道 p21 参与巨噬细胞活性的调节。为研究 p21 在肺纤维化中的作用, 首先检测了 p21 蛋白在肺泡巨噬细胞中的表达变化。免疫荧光结果显示, 与对照组相比, 模型组小鼠肺泡巨噬细胞表达显著增加 (图 2A)。Western blot 实验也得出了一致的结果 (图 2B)。以上结果表明, 博来霉素损伤导致肺泡巨噬细胞中 p21 蛋白表达增加。

3 敲低 p21 逆转肺泡巨噬细胞的促纤维化表型

为探究 p21 是否参与肺纤维化发病过程中巨噬细胞促纤维化表型的转化, 使用 p21 敲低腺病毒处理肺纤维化小鼠的肺泡巨噬细胞进行检测。流式和 RT-PCR 结果分别显示, 敲低 p21 可抑制巨噬细胞活化标志蛋白 CD206 的表达 (图 3A), 以及 *Fizz1*、*Chil3*、*Il10*

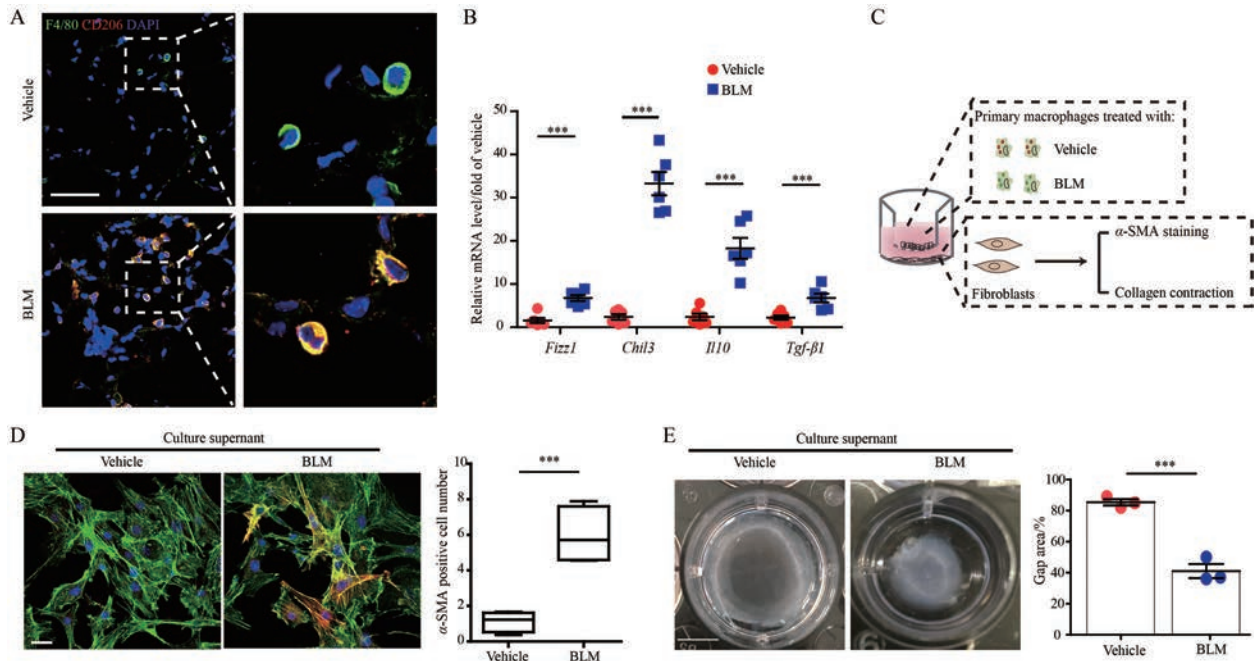


Figure 1 Alveolar macrophages (AMs) associate with a profibrotic phenotype in pulmonary fibrosis (PF). A: Confocal images showing the expression of F4/80 and CD206 in lung tissues from fibrotic mice. Scale bar, 50 μ m; B: Quantitative analyses of mRNA levels of found in inflammatory zone 1 (*Fizz1*), chitinase-like protein 3 (*Chil3*), interleukin-10 (*Il10*), and transforming growth factor- β 1 (*Tgf- β 1*) in alveolar macrophages from wild type (WT) mice and multiple bleomycin (mBLM)-challenged mice; C: The experimental scheme for detecting the communication of alveolar macrophages from PF mice and primary lung fibroblasts; D and E: The activation of lung fibroblasts was evaluated by the expression α -smooth muscle actin (α -SMA) (D) in primary fibroblasts and the fibroblast contractility in 3-dimensional collagen matrices (E). Scale bars, 25 μ m (D) and 5 mm (E). $n = 3$, mean \pm standard error of mean (SEM). *** $P < 0.001$ vs vehicle

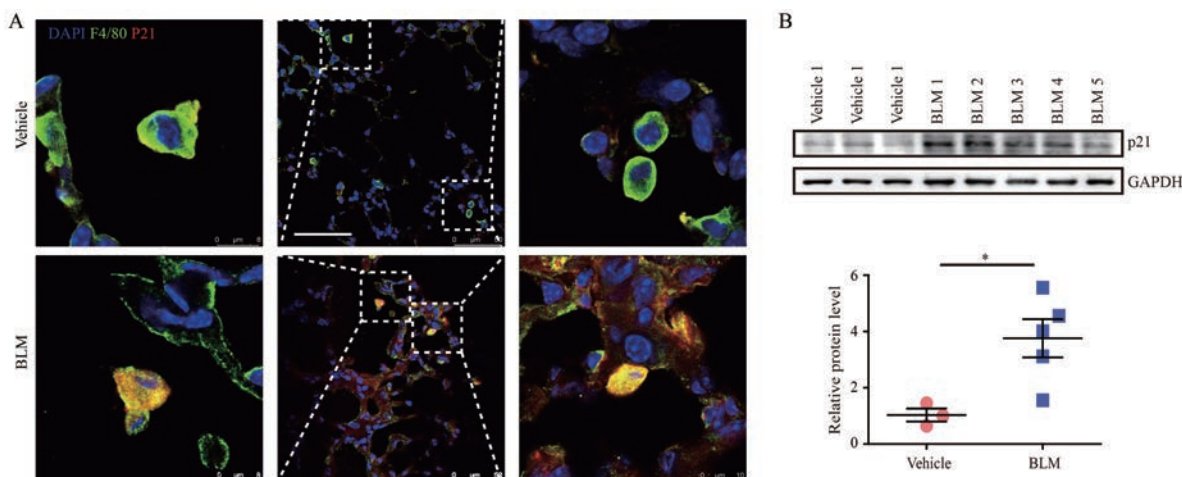


Figure 2 The expression of p21 increases in AMs during PF. A: Confocal images showing the expression of F4/80 and p21 in lung tissues from BLM challenged mice. Scale bars, 50 μ m; B: Quantitative analyses of p21 expression in AMs from mouse lung tissues after mBLM injury. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a loading control. $n = 3$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs vehicle

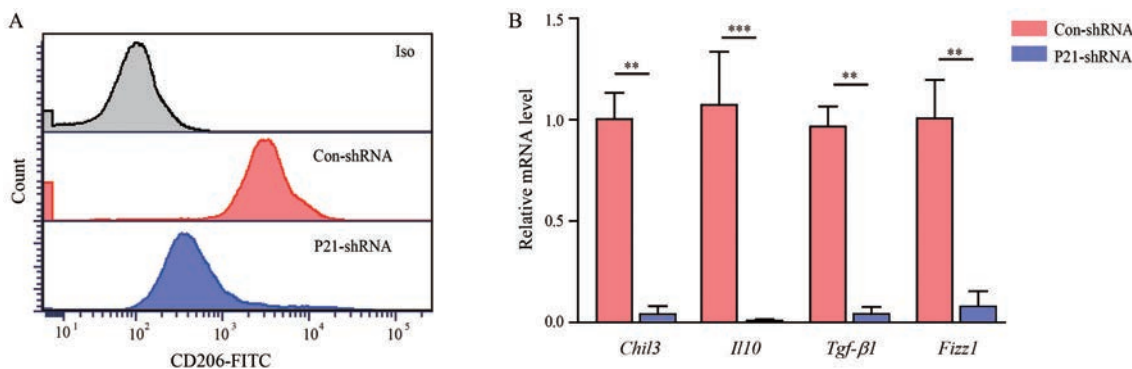


Figure 3 Depletion of *p21* suppresses macrophage activation. A: The expression of CD206 in alveolar macrophages from mice with PF was evaluated with flow cytometry after *p21* knockout adenovirus treatment; B: Quantitative analyses of mRNA levels of *Fizz1*, *Chil3*, *Il10*, and *Tgf- β 1* in alveolar macrophages from BLM-challenged mice after *p21* depletion. $n = 3$, mean \pm SEM. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Con-shRNA. Iso: Isotype antibody; FITC: Fluorescein isothiocyanate; Con-shRNA: Control short hairpin RNA; P21-shRNA: p21 short hairpin RNA

和 *Tgf- β 1* 的 mRNA 水平 (图 3B), 提示 *p21* 参与调节肺泡巨噬细胞的活化。此外, 将敲低 *p21* 的肺泡巨噬细胞与成纤维细胞共培养的结果显示 (图 4A), 与对照病毒处理的巨噬细胞相比, 敲低 *p21* 的巨噬细胞可显著降低 α -SMA 阳性的肌成纤维细胞细胞数目 (图 4B), 抑制成纤维细胞的胶原收缩能力 (图 4C)。以上结果表明, 敲低 *p21* 可逆转肺纤维化小鼠肺泡巨噬细胞的促纤维化表型。

4 过表达 p21 促进肺泡巨噬细胞活化

为进一步确认 *p21* 对肺泡巨噬细胞活化的调节作用, 分离了正常小鼠的肺泡巨噬细胞, 使用 *p21* 过表达病毒预处理。结果显示, 过表达 *p21* 可显著增加巨噬细胞活化标志因子 *Fizz1*、*Chil3*、*Il10* 和 *Tgf- β 1* 的 mRNA 水平 (图 5A)。此外, 将该细胞与正常小鼠的肺成纤维

细胞共培养 (图 5B), 结果显示, 与对照肺泡巨噬细胞相比, 过表达 *p21* 的肺泡巨噬细胞显著促进成纤维细胞的活化, 体现在 α -SMA 阳性的肌成纤维细胞细胞数目增加 (图 5C), 成纤维细胞的胶原收缩能力增强 (图 5D)。以上结果提示, 过表达 *p21* 可促进肺泡巨噬细胞促纤维化表型的转化。

5 p21 调控诱导巨噬细胞活化的转录因子的表达

为探究 *p21* 如何调控巨噬细胞的活化, 分析了改变 *p21* 的表达对多种已知的调控巨噬细胞活化的转录因子表达的影响。结果显示, 过表达 *p21* 可增加促巨噬细胞活化转录因子 *Irf-4*、*Stat6*、*C/ebp- β* 和 *Stat3* 的 mRNA 水平 (图 6A); 相反, 敲低 *p21* 可显著降低上述因子基因的 mRNA 水平 (图 6B)。结果提示, *p21* 通过增加多种转录因子的表达诱导巨噬细胞的促纤维化表型。

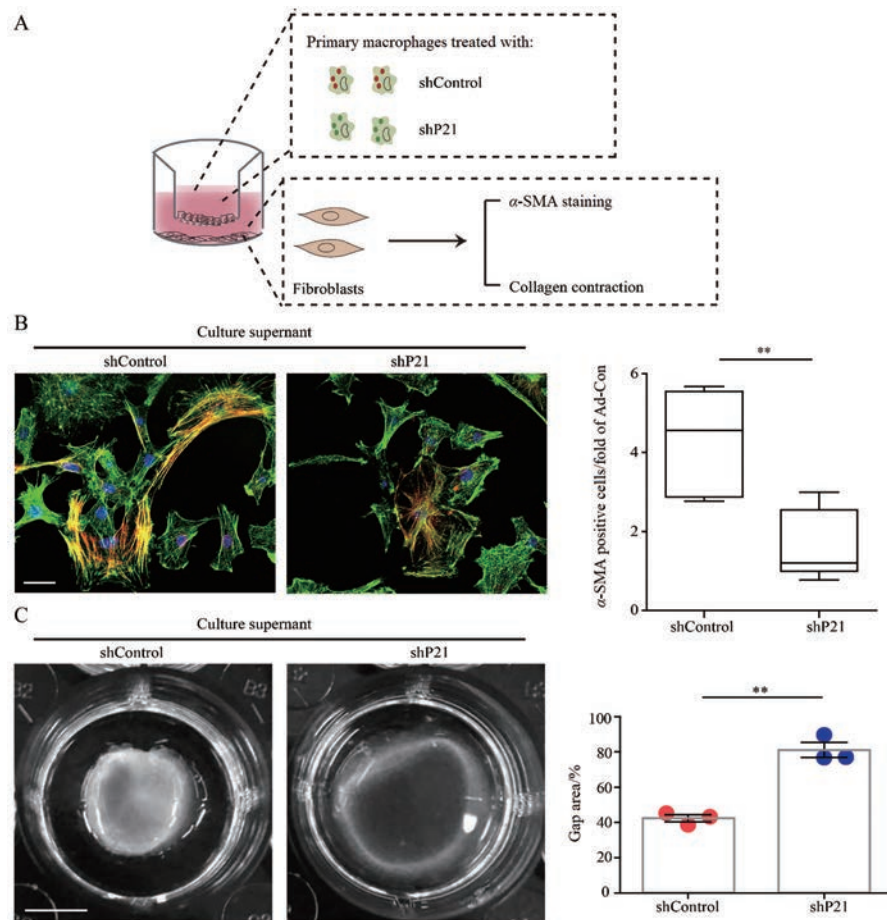


Figure 4 *p21* knockdown in AMs suppresses fibroblast activation. A: The schematics of the co-culture approach. Mouse AMs isolated from BLM-exposed WT mice were first treated with *p21* knockout adenovirus, and then co-cultured with primary mouse fibroblasts for the indicated time; B and C: The activation of lung fibroblasts was evaluated by the expression of α -SMA (B) in primary fibroblasts and the fibroblast contractility in 3-dimensional collagen matrices (C). Scale bars, 25 μ m (B) and 5 mm (C). $n = 3$, mean \pm SEM. ** $P < 0.01$ vs shControl (control short hairpin RNA). shP21: *p21* short hairpin RNA

讨论

博来霉素所致的小鼠肺纤维化模型是最常用的肺纤维化模型^[22]。博来霉素损伤引起炎症反应,由自由基的过量产生触发,诱导促炎性细胞因子以及巨噬细胞和嗜中性粒细胞的活化。目前存在单次高剂量和多次低剂量2种诱导模型。单次博来霉素损伤导致的肺纤维化模型,通常在最初7天引起炎症反应和上皮细胞凋亡增加,与急性肺损伤非常相似。随后是过渡期3天,在该过渡期之后,炎症消退并出现纤维化的病理改变。纤维化阶段持续至博来霉素损伤后3~4周。然而,研究发现该模型所致的纤维化在损伤45天后已经自发性消退和恢复。而多次博来霉素损伤所致的肺纤维化模型,在最后一次博来霉素滴注后10周,纤维化仍持续,这表明其处于慢性纤维化状态。此外,该模型炎症较少,更符合纤维化患者的病理特点^[23]。这种新模型可以使人们深入了解肺纤维化的慢性纤维化阶

段,是迄今为止其他肺纤维模型所缺乏的,因此,本研究使用了更符合患者病理特征的多次博来霉素刺激模型。

近年来,肺纤维化的发病率和致死率呈不断上升趋势,尽管尼达尼布和吡非尼酮已被美国食品药品监督管理局 (Food and drug administration, FDA) 批准用于肺纤维化的治疗,但这2种药物也仅能延缓肺纤维化的发病,并不能逆转纤维化的病理改变^[24]。大量研究证实,由浸润肺组织的免疫细胞和受损肺上皮细胞分泌的多种促纤维化的细胞因子和生长因子是促进原位成纤维细胞或周围细胞转变成肌成纤维细胞的重要信号,因此也是促进纤维化的重要原因^[25]。在肺纤维化组织中,巨噬细胞被证实存在于活化的肌成纤维细胞的周围,是肺组织慢性炎症的诱因。肺纤维化组织中肺泡巨噬细胞主要为替代活化型,其可通过释放大量的促纤维化因子促进肺纤维化效应器细胞肌成纤维

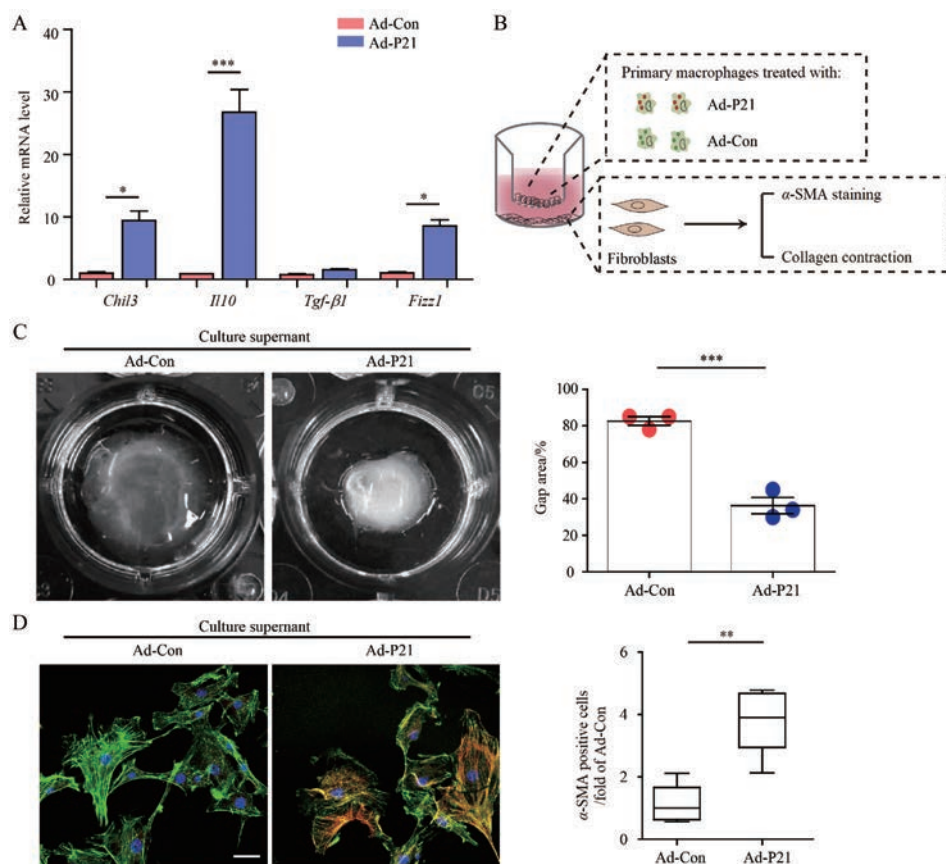


Figure 5 p21 overexpression in AMs promotes fibroblast activation. A: Quantitative analyses of mRNA levels of *Fizz1*, *Chil3*, *Il10*, and *Tgf-β1* in alveolar macrophages from mBLM-challenged mice after p21 overexpression; B: The schematics of the co-culture approach. Mouse alveolar macrophages isolated from phosphate buffer saline (PBS)-exposed WT mice were first infected with p21 overexpressing adenovirus, and then co-cultured with primary mouse fibroblasts for the indicated time; C and D: The activation of lung fibroblasts was evaluated by the fibroblast contractility in 3-dimensional collagen matrices (C) and the expression of α -SMA (D) in primary fibroblasts. Scale bars, 25 μ m (C) and 5 mm (D). $n = 3$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Ad-Con (control adenovirus). Ad-P21: p21 overexpression adenovirus

细胞的活化^[9, 10]。因此, 靶向抑制肺部巨噬细胞的活化有望扭转抑制性的免疫微环境, 促进肺纤维化的转归。基于此, 本研究初步阐明了肺泡巨噬细胞活化的调控机制, 为肺纤维化的靶向治疗提供了理论依据。

p21 蛋白是一种重要的细胞周期依赖性蛋白酶的抑制因子^[10]。近年来, 大量研究证实 p21 在纤维化发病过程中发挥了重要的作用, 包括肝纤维化、肺纤维化以及肾纤维化等^[26, 27]。其中报道最多的是 p21 在肺纤维化中的作用^[24-26]。已有研究发现, 肺组织内过表达 p21 能够增加细胞的抗凋亡能力, 从而抑制博来霉素所致小鼠肺纤维化, 该研究提示, 诱导 p21 表达可能是纤维化治疗的一个有效策略^[28]。然而, 也有研究证实 p21 在肺纤维化组织中表达增加, 降低 II 型上皮细胞内 p21 的表达抑制博来霉素所致的上皮细胞老化, 进而逆转肺纤维化^[29]。以上结果提示, p21 可能在肺纤维化发病过程中, 尤其是肺组织的不同细胞类型中发挥

了完全不同的作用。本研究发现, 博来霉素损伤导致肺泡巨噬细胞中 p21 表达增加。敲低模型组小鼠肺泡巨噬细胞中 p21 的表达抑制了肺泡巨噬细胞活化标志蛋白的表达, 并逆转巨噬细胞的促纤维化表型。此外, 过表达正常肺泡巨噬细胞中的 p21 可促进巨噬细胞促纤维化表型的转化。结果提示, 靶向降低肺泡巨噬细胞中的 p21 可能是肺纤维化治疗的一个有效策略。然而本研究并未阐明肺泡巨噬细胞 p21 上调的分子机制, 后续将从 mRNA 水平和蛋白稳定性水平探究调控 p21 表达上调的分子机制。同时, 还需在整体动物水平证实 p21 在肺纤维化发生发展中的作用。

大量研究证实 p21 参与巨噬细胞活性的调控。Trakala 等^[18]发现 p21 缺失可增强 LPS 诱导的 NF- κ B 信号通路, 促进巨噬细胞转化为经典活化的巨噬细胞。该结果提示增加 p21 的表达能够抑制巨噬细胞活化为经典活化的巨噬细胞, 可能是炎症相关疾病的有效治

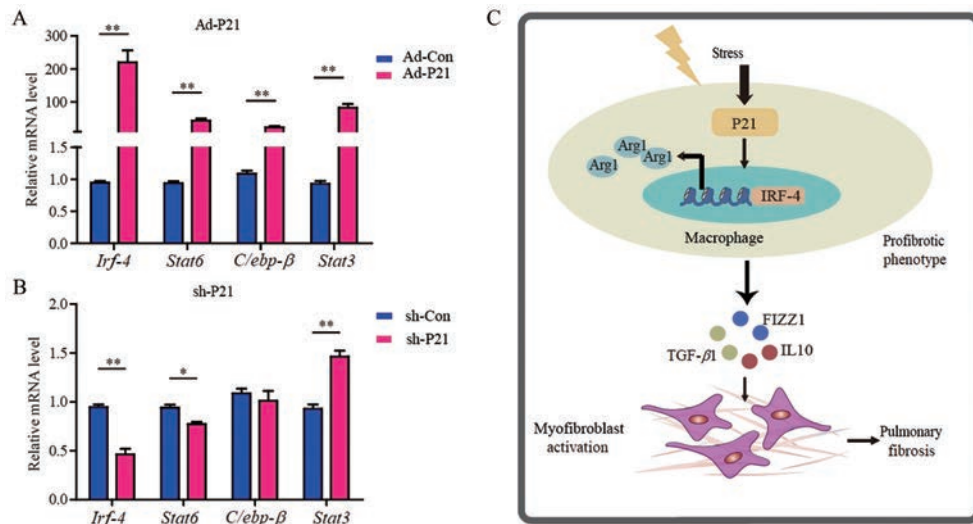


Figure 6 p21 regulates the expression of transcriptional factors inducing macrophage activation. A: Quantitative analyses of mRNA levels of *Irf-4* (interferon regulatory factor 4), *Stat6* (signal transducer and activator of transcription 6), *C/ebp-β* (CCAAT/enhancer binding protein β), and *Stat3* (signal transducer and activator of transcription 3) in alveolar macrophages after p21 overexpression; B: Quantitative analyses of mRNA levels of *Irf-4*, *Stat6*, *C/ebp-β*, and *Stat3* in alveolar macrophages after p21 knockdown; C: The graphic abstract of this study. $n = 3$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ad-Con. Arg1: Arginase 1

疗策略。然而, Rackov 等^[21]发现 p21 通过改变活化型 p65-p50 和抑制型 p50-p50 NF- κ B 之间的平衡调控巨噬细胞的重编程。p21 缺失可降低 p50-p50 同源二聚体的 DNA 结合能力, 增加 IFN- β 产生, 进而抑制巨噬细胞转化为替代活化的巨噬细胞。这项研究证实 p21 过表达促进巨噬细胞向替代活化的巨噬细胞的转化。本研究结果进一步证实了该结论。巨噬细胞的活化受多种转录因子的调控, 本研究发现 p21 调控多种转录因子的表达, 提示 p21 可能通过诱导转录因子的表达促进巨噬细胞的促纤维化表型, 但在肺纤维化发展过程中, p21 如何诱导转录因子的表达促进肺泡巨噬细胞促纤维化表型的转化有待进一步研究。

综上所述, 本研究结果表明, 肺纤维化组织中肺泡巨噬细胞表现为促纤维化表型, 博来霉素损伤诱导肺泡巨噬细胞中 p21 表达上调, 过表达的 p21 促进肺泡巨噬细胞促纤维化表型的转化 (图 6C)。本研究将有助于深入理解肺纤维化的发病机制, 并为临床治疗肺纤维化提供新的理论依据。

作者贡献: 魏旭鹏负责原代细胞分离培养及表型分析实验; 王婉玉、李云炫和刘畅参与了部分细胞实验; 吕晓希参与了数据分析及文献整理; 刘姗姗和赵燕燕是文章框架的构思者及负责人。

利益冲突: 所有作者均不存在利益冲突。

References

[1] Noble PW, Barkauskas CE, Jiang D. Pulmonary fibrosis: pat-

terns and perpetrators [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122: 2756-2762.

[2] Meneghin A, Hogaboam CM. Infectious disease, the innate immune response, and fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117: 530-538.

[3] King TE Jr, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Lancet*, 2011, 378: 1949-1961.

[4] Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions [J]. *Immunity*. 2010, 32: 593-604.

[5] He C, Ryan AJ, Murthy S, et al. Accelerated development of pulmonary fibrosis via Cu, Zn-superoxide dismutase-induced alternative activation of macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288: 20745-20757.

[6] Larson-Casey JL, Deshane JS, Ryan AJ, et al. Macrophage Akt1 kinase-mediated mitophagy modulates apoptosis resistance and pulmonary fibrosis [J]. *Immunity*, 2016, 44: 582-596.

[7] Pechkovsky DV, Prasse A, Kollert F, et al. Alternatively activated alveolar macrophages in pulmonary fibrosis-mediator production and intracellular signal transduction [J]. *Clin Immunol*, 2010, 137: 89-101.

[8] Redente EF, Keith RC, Janssen W, et al. Tumor necrosis factor- α accelerates the resolution of established pulmonary fibrosis in mice by targeting profibrotic lung macrophages [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014, 50: 825-837.

[9] Byrne AJ, Maher TM, Lloyd CM. Pulmonary macrophages: a new therapeutic pathway in fibrosing lung disease? [J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22: 303-316.

[10] Harper JW, Adami GR, Wei N, et al. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases [J]. *Cell*, 1993, 75: 805-816.

- [11] Allouch A, David A, Amie SM, et al. p21-mediated RNR2 repression restricts HIV-1 replication in macrophages by inhibiting dNTP biosynthesis pathway [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110: E3997-E4006.
- [12] Van den Broeke C, Radu M, Chernoff J, et al. An emerging role for p21-activated kinases (Paks) in viral infections [J]. Trends Cell Biol, 2010, 20: 160-169.
- [13] Zhu B, Symonds AL, Martin JE, et al. Early growth response gene 2 (*Egr-2*) controls the self-tolerance of T cells and prevents the development of lupuslike autoimmune disease [J]. J Exp Med, 2008, 205: 2295-2307.
- [14] Chen H, Li C, Huang J, et al. CD4⁺ T cells from elite controllers resist HIV-1 infection by selective upregulation of p21 [J]. J Clin Invest, 2011, 121: 1549-1560.
- [15] Lloberas J, Celada A. p21(waf1/CIP1), a CDK inhibitor and a negative feedback system that controls macrophage activation [J]. Eur J Immunol, 2009, 39: 691-694.
- [16] Arias CF, Ballesteros-Tato A, García MI, et al. p21CIP1/WAF1 controls proliferation of activated/memory T cells and affects homeostasis and memory T cell responses [J]. J Immunol, 2007, 178: 2296-2306.
- [17] Daszkiewicz L, Vázquez-Mateo C, Rackov G, et al. Distinct p21 requirements for regulating normal and self-reactive T cells through IFN- γ production [J]. Sci Rep, 2015, 5: 7691.
- [18] Trakala M, Arias CF, García MI, et al. Regulation of macrophage activation and septic shock susceptibility *via* p21(WAF1/CIP1) [J]. Eur J Immunol, 2009, 39: 810-819.
- [19] Scatizzi JC, Mavers M, Hutcheson J, et al. The CDK domain of p21 is a suppressor of IL-1 β -mediated inflammation in activated macrophages [J]. Eur J Immunol, 2009, 39: 820-825.
- [20] Mavers M, Cuda CM, Misharin AV, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21, *via* its C-terminal domain, is essential for resolution of murine inflammatory arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2012, 64: 141-152.
- [21] Rackov G, Hernández-Jiménez E, Shokri R, et al. p21 mediates macrophage reprogramming through regulation of p50-p50 NF- κ B and IFN- β [J]. J Clin Invest, 2016, 126: 3089-3103.
- [22] Mouratis MA, Aidinis V. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin [J]. Curr Opin Pulm Med, 2011, 17: 355-361.
- [23] Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, et al. Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010, 299: L442-L452.
- [24] Richeldi L, Collard HR, Jones MG. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Lancet, 2017, 389: 1941-1952.
- [25] Mi S, Li Z, Liu H, et al. Blocking IL-17A protects against lung injury-induced pulmonary fibrosis through promoting the activation of p50NF- κ B [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2012, 47: 739-744.
- [26] Zheng J, Dong P, Mao Y, et al. LincRNA-p21 inhibits hepatic stellate cells activation and liver fibrogenesis *via* p21 [J]. FEBS J, 2015, 282: 4810-4821.
- [27] Inoshima I, Kuwano K, Hamada N, et al. Induction of CDK inhibitor *p21* gene as a new therapeutic strategy against pulmonary fibrosis [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 286: L727-L733.
- [28] Blundell R, Kaminski N, Harrison D, et al. Increase in p21 expression independent of the p53 pathway in bleomycin-induced lung fibrosis [J]. Exp Mol Pathol, 2004, 77: 231-237.
- [29] Jiang C, Liu G, Luckhardt T, et al. Serpine 1 induces alveolar type II cell senescence through activating p53-p21-Rb pathway in fibrotic lung disease [J]. Aging Cell, 2017, 16: 1114-1124.