

## 早发性脊柱侧凸合并胸廓发育不良综合征幼猪模型的肺发育相关分子分析

代兴飞<sup>1)</sup>, 李啟堂<sup>1)</sup>, 严荣爽<sup>1)</sup>, 张清东<sup>2)</sup>, 潘 呈<sup>1)</sup>, 费德锐<sup>1)</sup>, 马裕俭<sup>1)</sup>, 徐世鑫<sup>1)</sup>, 张 颖<sup>1)</sup>

(1)昆明医科大学第二附属医院骨科, 云南 昆明 650101; 2)昆明理工大学附属玉溪医院/玉溪市第二人民医院骨科, 云南 玉溪 653100)

**[摘要]** **目的** 基于已建立的早发性脊柱侧凸合并胸廓发育不良综合征(EOS+TIS)幼猪模型及治疗模型获取组织标本, 进行转录组测序, 生物信息学分析。筛选出影响肺发育相关的部分 HUB 基因。**方法** 建立 EOS+TIS 及治疗动物模型, 进行 HE 及 Masson 染色观察肺组织形态及纤维化程度, 并对 3 组(对照组、模型组、治疗组)肺组织测序。利用 R 软件的 DESeq2 进行差异分析, 运用 DAVID 数据库进行差异基因的 GO/KEGG 富集分析, 筛选核心基因, 预测相关通路, 并通过 PCR 和免疫印迹实验进行验证。**结果** (1)HE 染色结果: 模型组肺组织体现了显著的支气管肺发育不良, 治疗组获得明显改善; Masson 染色结果: 模型组肺纤维化程度较重, 治疗组减轻; (2)DESeq2 分析表明, 正常组与模型组有 170 个上调和 262 个下调基因, 而模型组与治疗组有 323 个上调和 467 个下调基因; (3)GO 功能注释显示差异基因主要富集在细胞外基质、质膜组成、免疫应答、炎症反应、钙离子结合、细胞因子活性等功能。KEGG 显示差异基因主要富集在神经活性配体-受体相互作用、细胞因子-细胞因子受体相互作用等通路; (4)筛选出共同基因 THBS1; (5)PCR 和 Western Blot 实验验证, THBS1 在模型组中下调, 治疗后上调( $P < 0.05$ ), 使用 Western Blot 实验检测 TGF- $\beta$  在 3 组中的表达量, 模型组下降, 治疗后上升( $P < 0.05$ )。**结论** THBS1 与 TGF- $\beta$  参与了早发性脊柱侧凸合并胸廓发育不良综合征幼猪模型的肺发育变化过程。

**[关键词]** 早发性脊柱侧凸; 胸廓发育不良综合征; 生物信息分析; THBS1; TGF- $\beta$

**[中图分类号]** R682.1+3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)05-0049-11

## Molecular Analysis on the Molecular Mechanism of Lung Development in the Piglet Model of Early Onset Scoliosis Complicated with Thoracic Insufficiency Syndrome

DAI Xingfei<sup>1)</sup>, LI Qitang<sup>1)</sup>, YAN Rongshuang<sup>1)</sup>, ZHANG Qingdong<sup>2)</sup>, PAN Cheng<sup>1)</sup>,

FEI Derui<sup>1)</sup>, MA Yujian<sup>1)</sup>, XU Shixin<sup>1)</sup>, ZHANG Ying<sup>1)</sup>

(1) Dept. of Orthopedics, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101; 2) Dept. of Orthopedics, Yuxi Hospital Affiliated to Kunming University of Science and Technology/The 2nd People's Hospital of Yuxi, Yuxi Yunnan 653100, China)

**[Abstract]** **Objective** To identify key HUB genes involved in lung development through transcriptomic sequencing and bioinformatics analysis using tissue samples collected from an established piglet model of early-onset scoliosis with thoracic insufficiency syndrome (EOS+TIS) and its treatment model. **Methods** EOS+TIS and treatment animal models were established, followed by histological analysis using HE and Masson staining to

**[收稿日期]** 2024-01-16

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(82060414); 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目(02101AY070001-150); 云南省“兴滇英才支持计划”基金资助项目(XDYC-MY-2022-0026)

**[作者简介]** 代兴飞(1998~), 男, 云南曲靖人, 在读硕士研究生, 主要从事脊柱外科临床工作。

**[通信作者]** 张颖, E-mail: zhangyingYNKM@126.com

observe lung tissue morphology and fibrosis severity. Lung tissue samples from three groups (control, model, treatment) were sequenced. Differential analysis was performed using the DESeq2 package in R, and differential gene GO/KEGG enrichment analysis was conducted using the DAVID database. Core genes were identified, relevant pathways were predicted, and validation was done via PCR and Western blot experiments. **Results** (1) HE staining results: The model group displayed significant bronchopulmonary dysplasia, which was notably improved in the treatment group. (2) Masson staining results: The model group showed severe lung fibrosis, which was alleviated in the treatment group. (3) DESeq2 analysis: The normal vs. model group comparison identified 170 upregulated and 262 downregulated genes, while the model vs. treatment group comparison identified 323 upregulated and 467 downregulated genes. (4) GO functional annotation: Differential genes were mainly enriched in functions like extracellular matrix, plasma membrane composition, immune response, inflammatory response, calcium ion binding, and cytokine activity. KEGG enrichment: Differential genes were primarily enriched in pathways like neuroactive ligand-receptor interaction and cytokine-cytokine receptor interaction. (5) Common gene identification: THBS1 was identified as a common gene. (6) PCR and Western Blot validation: THBS1 was downregulated in the model group and upregulated post-treatment ( $P < 0.05$ ). Western Blot analysis revealed that TGF- $\beta$  expression was reduced in the model group and increased post-treatment ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** THBS1 and TGF- $\beta$  are involved in the process of lung development in the early onset scoliosis with thoracic insufficiency syndrome pig models.

[**Key words**] Early-onset scoliosis; Thoracic insufficiency syndrome; Bioinformatics analysis; THBS1; TGF- $\beta$

脊柱侧凸研究协会(scoliosis research society, SRS)对早发型脊柱侧凸(early onset scoliosis, EOS)的定义为:10岁前因各种病因导致的脊柱侧凸。EOS患儿易快速发展为严重僵硬的侧凸,由于胸廓的发育受限,导致肺和体格发育不匹配,使病情严重,甚至早夭。Campbell<sup>[1]</sup>首先提出描述了这一现象,将其命为胸廓发育不良综合征(thoracic insufficiency syndrome, TIS),即畸形胸腔无法保证肺生长发育或呼吸功能。TIS代表一种新形式的产后肺发育不全和限制性呼吸系统疾病。更容易发生在脊柱侧弯合并肋骨-胸壁异常的患者中,这些异常引起对肺部生长的长期机械性抑制。迄今为止,对EOS合并TIS的病理机制认识尚不完整,对于EOS+TIS支气管肺发育不良及肺纤维化的机制尚不明了,亟需基于大型动物模型的相关机制研究。

由于幼猪的生长发育周期短,3个月的生长速度相当10岁左右儿童,且猪的脊柱结构与人类相似,因此前期课题组采用单侧后路脊柱不对称柔性栓系技术及同侧肋骨栓系技术构建了大型EOS+TIS动物模型。该模型在大体形态学及组织学方面较好地体现了EOS+TIS的特征,具备可重复性。并采用自主研发的生长系统对模型进行治疗,对3组肺组织的切片进行HE及Masson染色,发现模型组肺组织肺泡数量减少、纤维化程度重,治疗后得到改善,为探索这种病理机制,课题组

对3组肺组织mRNAs测序,尝试通过生信分析找到引起幼猪EOS+TIS病理变化及治疗后肺组织改善的关键靶点,为后续探究EOS+TIS的病理机制及治疗提供新的基础和方向。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 实验动物** 实验选用15只6周龄左右的猪,对照组5只,模型组5只,治疗组5只;均由专业饲养员饲养。

本研究通过昆明医科大学伦理专业委员会批准(审批号:KMMU2020135),实验动物均在合适麻醉剂量下进行手术,术后采取合适措施最大限度地减轻其疼痛。

**1.1.2 实验试剂和仪器** 试剂:引物设计:Beacon Designer 7.90,引物合成:广州 invitrogen, THBS1抗体(Bioss公司,货号:bs-2715R,免疫印迹稀释比例:1:2000)、TGF $\beta$ 1抗体(Bioss公司,货号:bs-0086R,免疫印迹稀释比例:1:2000), Goat Anti Mouse IgG-HRP、Goat Anti Rabbit IgG-HRP (Abmart公司,货号:M21001L,免疫印迹稀释比例:1:4000);仪器:定量PCR仪:ABI 7500 Real Time PCR System、紫外分光光度计:BLUE-RAY EzDrop1000。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 构建模型** EOS+TIS 模型组: 在幼猪 6 周龄时采用脊柱行后路单侧不对称柔性栓系并同侧肋骨栓系技术建模, 14 周龄时解除脊柱及肋骨栓系; 治疗组: 在成功造模的幼猪中随机分组治疗, 在 14 周龄时解除其脊柱、肋骨栓系并同时矫治。对照组: 仅在 6 周龄和 14 周龄时, 在同样的切口位置, 行单纯组织剥离暴露关节突的假手术。

**1.2.2 肺组织切片 HE 及 Masson 染色** 在幼猪 18 周龄时将 3 组实验动物处死后制作肺组织切片并进行常规脱蜡、水化, 使用蒸馏水洗涤后, 置入苏木素染液, 用自来水洗去浮色后, 再用苏木素分化液分化, 继续使用流水冲洗, 冲洗多余的苏木素液, 随后放入伊红染液中染 1~2 min; 最后脱水封片后用显微镜观察。Masson 染色在肺组织脱蜡后进行 Masson 三色染色试剂盒 (Solarbio) 进行染色观察。

**1.2.3 测序** 处死实验动物后取材肺组织, 由上海欧易生物医学科技有限公司对样本进行转录组测序。

**1.2.4 差异基因筛选** 使用 R 软件的 DESeq2 软件包对 15 例样本的数据进行分析, 筛选出校正后  $P < 0.05$  和  $|\log FC| > 1$  的基因作为差异表达基因, 并构建火山图。通过 R 软件 pheatmap 包构建热图。

**1.2.5 差异基因的 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析** GO 富集分析包含 3 个模块, 为生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF)。KEGG 可以从分子通路水平研究特定的生物学进程。使用 DAVID 在线数据库 (<https://david.ncicfcrf.gov/>) 进行 GO 富集分析及 KEGG 通路分析。R 包进行可视化。

**1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测** 3 组的幼猪肺组织各取 40 mg, 用裂解液行总 RNA 提取。取 1  $\mu$ L 总 RNA 样品在分光光度计中测其浓度。按照合成 20  $\mu$ L cDNA 需要总 RNA 样品为 2  $\mu$ g 计算所需总 RNA 的体积计算, 用 FastKing RT Kit (gDNase) Kit 将 2  $\mu$ g 总 RNA 逆转录为 cDNA。后检测相关基因的表达。以 GAPDH 作为内参照物, 用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法进行归一化。mRNAs 的引物, 见表 1。

**1.2.7 WB 实验** 从 3 组中各取 100 mg 肺组织加入裂解液, 研磨后收集上清液, 测量各组样本蛋白浓度, 保证蛋白上样量一致, 随后分离胶在下、浓缩胶在上, 倒入电泳缓冲液, 加样后进行电泳,

表 1 THBS1 及内参的引物序列

Tab. 1 Primer sequences of THBS1 and internal reference

序列	名称	长度(bp)
CATCCAAAGCATCTTCAC	THBS1(pig)-F	77
GTGAGAAGGACATTGGTA	THBS1(pig)-R	
GTTCCAGTATGATTCCAC	GAPDH(pig)-F	56
GACTCCACAACATACGTA	GAPDH(pig)-R	

结束后切去浓缩胶, 并将分离胶置于湿转缓冲液中, 按照负极、海绵垫、滤纸、凝胶、PVDF 膜、滤纸、海绵垫、正极的顺序, 转膜 1 h。取出 PVDF 膜, 将 PVDF 膜置于脱脂奶粉中, 室温封闭 1 h, 加入一抗, 孵育后去除一抗液体, 加入 TBST 缓冲液洗膜 3 次后加入酶标二抗, 室温孵育 2 h, 室温下使用 ECL 发光液孵育, 曝光机曝光, 用 Image J 对条带的灰度值进行定量分析。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 26.0 统计软件对数据进行统计学分析, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用单因素 (ANOVA) 方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肺组织 HE 及 Masson 染色结果

(1) HE 染色结果: 与对照组相比较, 模型组肺泡腔增厚和扩大, 肺泡数量减少; 治疗后改善 (图 1), 在光镜下每组各取 5 张切片, 在 10 $\times$  倍镜下每张切片选取 4 个视野, 测量放射状肺泡计数及肺泡壁厚度<sup>[2]</sup>。结果提示, 与对照组比较, 模型组的放射状肺泡计数明显减少, 治疗后增多; 肺泡壁厚度扩大, 治疗后减小 (图 2, 表 2); (2) Masson 染色结果: 对照组在肺泡间隔区域及血管周围可见少量胶原纤维。模型组中在增厚肺泡间隔区和肺间质可见大量的胶原纤维沉积; 与模型组比较, 治疗组肺泡间隔区和肺间质区胶原纤维减少 (图 1)。与对照组比较, 模型组平均胶原纤维含量显著增加, 治疗后减少 (图 2, 表 2) ( $P < 0.05$ ), 上述结果提示: EOS+TIS 模型体现了支气管肺发育不良。(放射状肺泡计数: 呼吸性细支气管到胸膜的垂线, 通过该线穿过的肺泡数; 肺泡壁厚度: 测量每个视野内相邻 2 肺泡之间最短距离, 最后取平均值。上述测量均使用 Image Pro Plus 6.0 进行计算。)

### 2.2 差异基因表达情况

使用 R 软件的 DESeq2 软件包对 3 组肺组织

进行差异基因筛选，模型组与对照组比较，其中上调基因 170 个，下调基因 262 个；治疗组与模型组比较，上调基因 323 个，下调基因 467 个。并使用 R 包(v4.1.3) 绘制了差异基因的火山图及热图(图3)。

### 2.3 对照组与模型组差异基因的 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析

使用 DAVID 数据库进行 GO 富集分析及 KEGG 通路分析，差异基因主要富集在免疫应答、炎症反应、脂多糖反应等(生物过程)；细胞外基

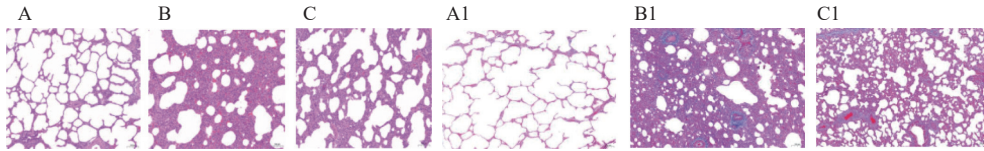


图 1 HE 及 Masson 染色结果(标尺: 100 μm)

Fig. 1 Results of HE and Masson staining ( scale bar 100 μm )

A: 对照组肺组织 HE 染色; B: 模型组肺组织 HE 染色; C: 治疗组肺组织 HE 染色; A1: 对照组肺组织 Masson 染色; B1: 模型组肺组织 Masson 染色; C1: 治疗组肺组织 Masson 染色; 红色代表肌纤维, 蓝色为胶原纤维。

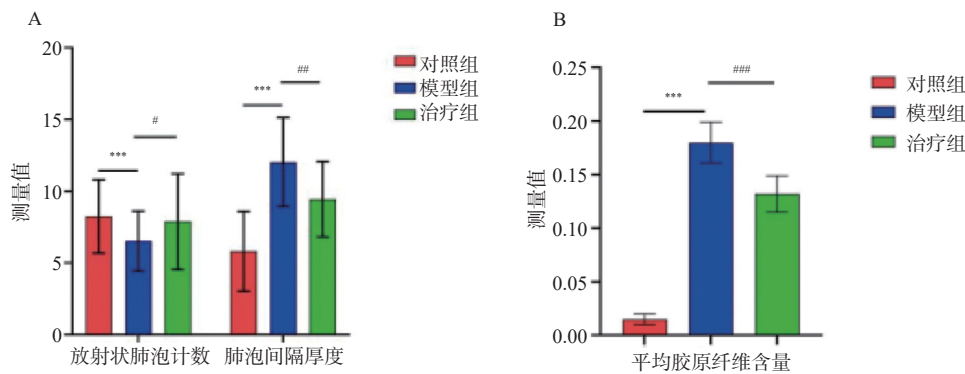


图 2 3 组肺泡计数、肺泡间隔厚度、平均胶原纤维含量测量结果

Fig. 2 Measurement results of three groups of alveolar count, alveolar septal thickness, and average collagen fiber content

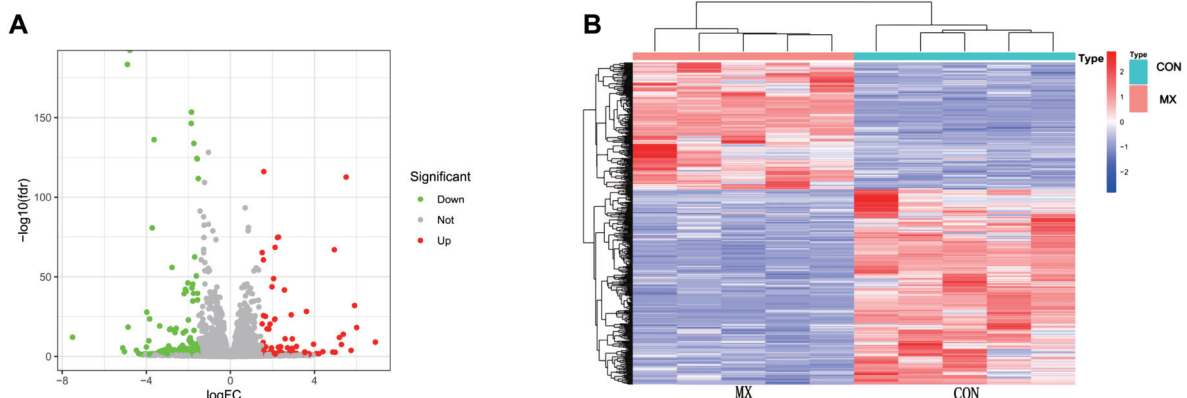
A: 3 组放射状肺泡计数、肺泡间隔厚度; B: 3 组平均胶原纤维含量。

表 2 3 组幼猪肺组织 HE 和 Masson 染色的测量结果( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Results of HE and Masson staining in lung tissue of three groups of piglets ( $\bar{x} \pm s$ )

参数	对照组	模型组	治疗组	F	P
放射状肺泡计数(个)	9.24±2.56	6.53±2.08***	7.88±3.34#	19.25	<0.001**
肺泡壁厚度(μm)	5.81±2.78	12.04±3.10***	9.44±2.63##	88.37	<0.001**
平均胶原纤维量	0.02±0.01	0.18±0.02***	0.13±0.02###	1834.28	<0.001**

与对照组比较,\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ ,### $P < 0.001$ ;\*\* $P < 0.001$ 。



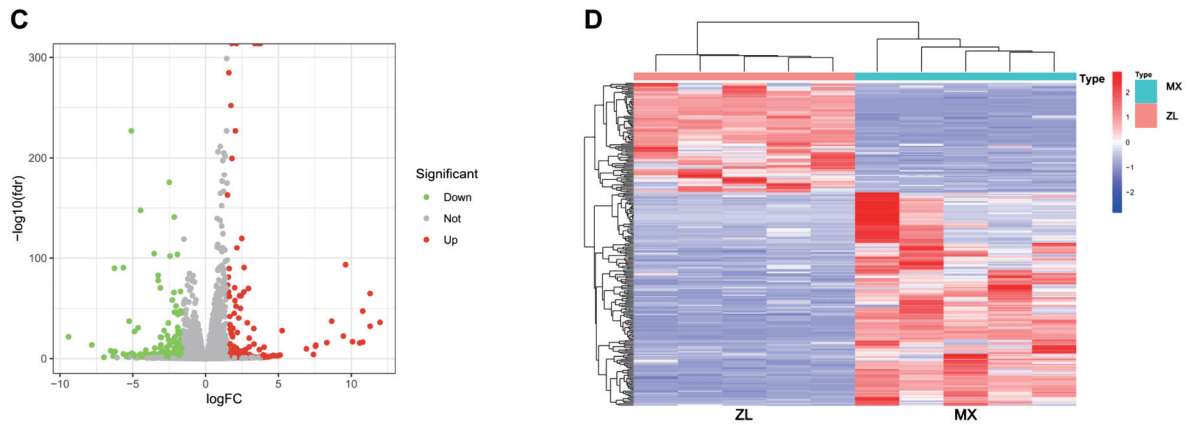


图 3 差异基因的火山图和热图

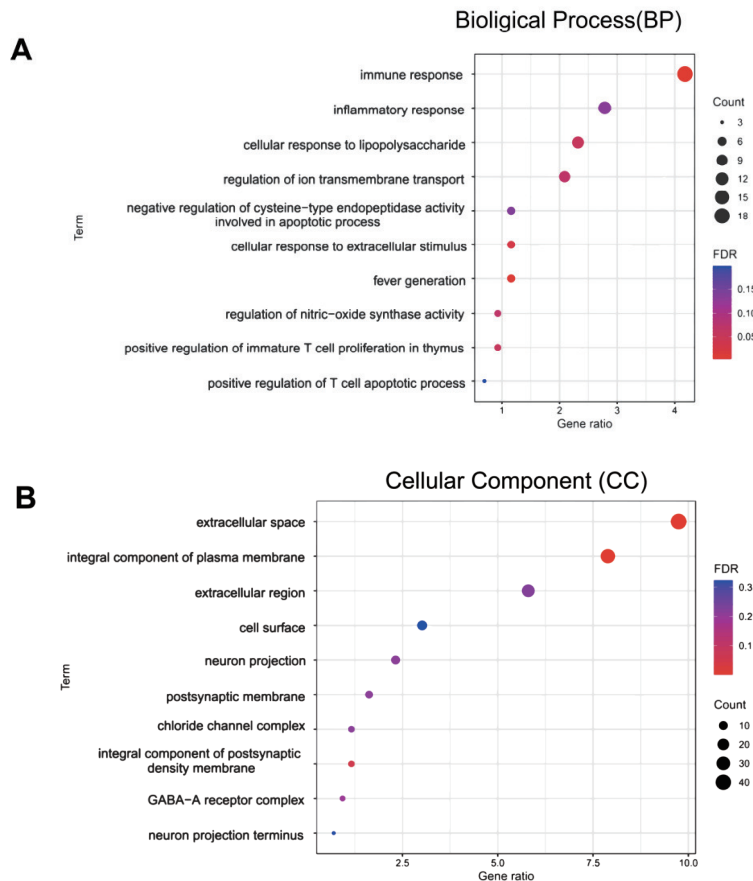
Fig. 3 Volcanic map and heat map of differentially expressed genes

A: 模型组与对照组差异基因的火山图, 绿色代表下调基因, 红色代表上调基因; B: 差异基因在模型组与对照组中的热图, 蓝色为对照组(CON), 红色为模型组(MX); C: 治疗组与模型组差异基因的火山图; D: 差异基因在治疗组与模型组中的热图, 蓝色为模型组(MX), 红色为治疗组(ZL)。

质、质膜组成等(细胞组分); 钙离子结合、RNA 聚合酶 II 转录、细胞因子活性等(分子功能)。上述功能主要与免疫功能、微环境相关, KEGG 信号通路主要为神经活性配体-受体相互作用、细胞因子-细胞因子受体相互作用、细胞黏附分子等。使用 R 包可视化展示了排名前 10 的 GO 富集结果和排名前 20 的 KEGG 结果(图4)。

### 2.4 关键基因的筛选结果

通过对照组与模型组差异基因 GO 功能富集分析, 发现这些差异基因主要集中在免疫应答、钙离子结合和细胞外基质功能。进一步筛选了与这些功能相关的基因, 通过 Venn 图, 确定 THBS1 为这 3 者的共同基因(表3~表5、图5)。这表明 THBS1 可能在 EOS+TIS 幼猪模型中的肺



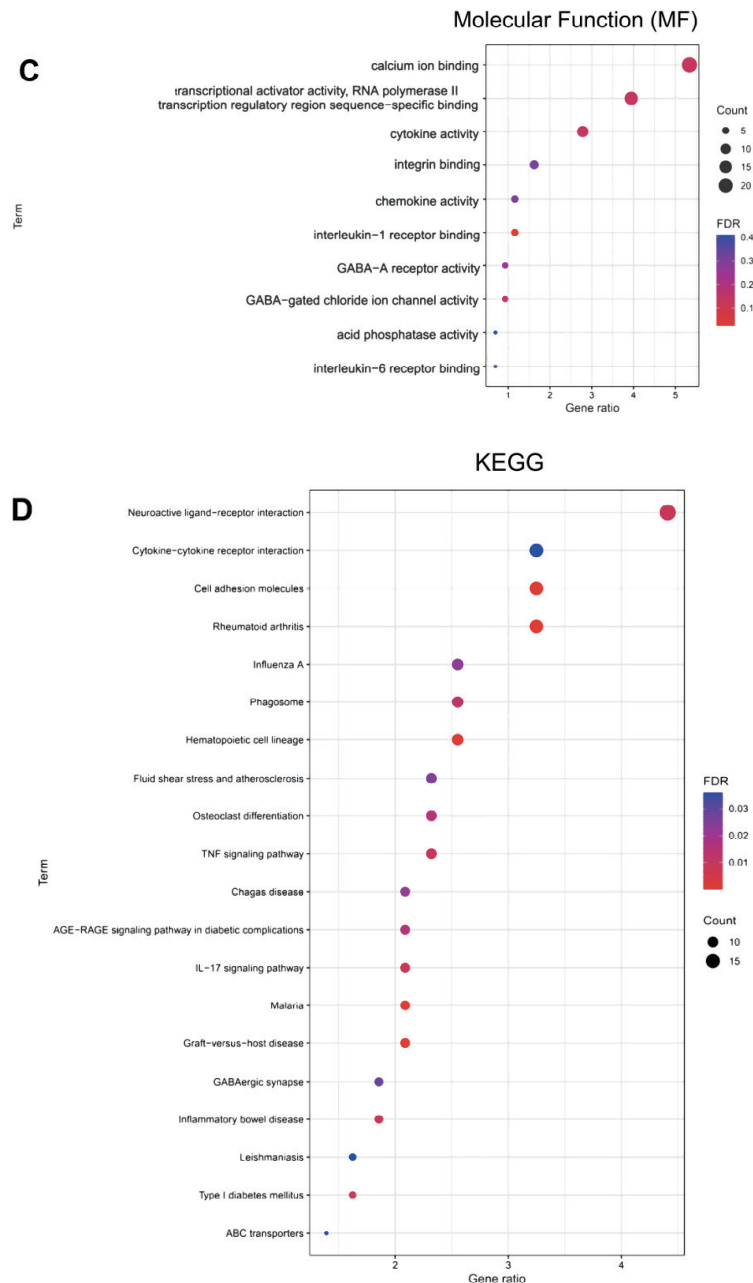


图 4 模型组与对照组差异基因的 GO 和 KEGG 情况

Fig. 4 GO and KEGG enrichment analysis of differential genes between the model group and the control group

A: 生物学过程(BP); B: 细胞组分(CC); C: 分子功能(MF); D: KEGG 富集结果。

发育病机制中发挥重要作用。

### 2.5 实时荧光定量 PCR 检测结果

实时荧光定量 PCR 结果表明(表6、图6),与对照组相比,模型组 THBS1 的相对表达量显著下降,治疗后 THBS1 的相对表达量显著上升,差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。这提示 THBS1 不仅与模型组的肺组织变化有关,还参与了治疗后的肺组织发育过程。

### 2.6 蛋白免疫印迹实验结果

使用免疫印迹技术对 3 组肺组织 THBS1、TGF- $\beta$  表达情况进行分析(表7~表8,图7~

图10)。与正常组比较,模型组 THBS1、TGF- $\beta$  显著下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),治疗后 THBS1、TGF- $\beta$  含量上升,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果提示:证实 THBS1、TGF- $\beta$  均参与了本研究肺变化的过程。

## 3 讨论

早发性脊柱侧凸患儿易迅速演变为严重僵硬的侧凸,且因胸廓发育停滞导致患者的肺发育与躯体的发育不匹配。尤其是合并胸廓发育不良综

表 3 钙离子相关基因  
Tab. 3 Calcium ion-related genes

基因名称	LogFC	<i>P</i>	校正后 <i>P</i>
FBN2	1.976806186	5.53E-47	1.71E-44
RCVRN	-1.699843423	7.65E-10	1.89E-08
TENM2	-2.236357095	2.22E-07	3.50E-06
CLSTN2	-1.324235347	0.01174761	0.04453978
TNFAIP6	1.061241719	0.000194661	0.001447986
ACTN2	1.683023897	5.87E-08	1.04E-06
DGKB	-2.383519856	1.67E-07	2.70E-06
PON1	2.571409628	6.39E-45	1.74E-42
VWDE	3.543226537	0.000610734	0.003897322
TUBB4A	1.433642182	0.007848305	0.032416471
THBS1	-1.256610433	6.47E-86	4.87E-83
THBS4	-3.280684277	0.000147676	0.001142492
MYL4	-4.865802484	6.08E-21	4.71E-19
SCGN	3.150720501	0.00280126	0.014003149
EGFLAM	-1.048561742	0.000400331	0.002700883
VSNL1	1.482799905	6.29E-09	1.33E-07
SYT10	-3.851326165	0.006301379	0.027241397
EFHD1	-1.084242649	1.75E-05	0.000178469
ANXA9	-1.111630395	2.47E-12	8.42E-11
ASTN2	-1.202867655	6.21E-05	0.000542506
LOC100522787	1.087678946	0.009057674	0.036435259
PPEF2	1.557961567	0.003120276	0.015314764
UMODL1	1.277593564	0.006711926	0.028675953

综合征的患儿, 更容易引起肺部生长抑制。迄今, 对于 EOS 合并 TIS 的病理机制的认知尚不全面, 分子水平的研究甚少。

课题组通过构建 EOS+TIS 幼猪模型, 并使用自主研发的脊柱矫形装置构建治疗模型, 通过 3 组幼猪的肺组织切片 HE 及 Masson 染色观察后发现, 与对照组相比, 幼猪的肺发育得到明显抑制, 治疗后肺组织得到明显改善, 主要集中在肺泡数量及纤维化程度的改变。为了探索这种病理机制, 课题组对样本肺组织测序后, 利用生物信息分析方法, 筛选出关键基因 THBS1, 并通过 PCR、WB 等实验技术对其进行表达量验证, 与正常组对比, 模型组 THBS1 均呈下降趋势, 治疗

后 THBS1 含量上升 ( $P < 0.05$ ), 这提示 THBS1 在 EOS+TIS 模型及治疗后参与了肺发育的过程。

研究表明, 在某些细胞系中, TGF- $\beta$  的稳态水平可使 THBS1 增加约 2 倍。而在肿瘤内皮细胞中, 没有稳态 THBS1 表达, TGF- $\beta$  只低水平增加 THBS1。此外, THBS1 的增加依赖 TGF- $\beta$  信号, 在对 TGF- $\beta$  信号无响应的细胞中, 只观察到小幅增长的 THBS1 信号<sup>[3]</sup>。这些结果表明, TGF- $\beta$  可能对 THBS1 的表达具有调节作用; 还有证据表明 THBS1 在肿瘤微环境中激活 TGF $\beta$ , Harpel 及其同事报道了 TGF $\beta$  激活依赖于 THBS1、整合素、整合素相关的 CD47 蛋白<sup>[4]</sup>。这些结果均提示 THBS1 和 TGF- $\beta$  之间的确存在相当复杂

表 4 细胞外基质相关基因  
Tab. 4 Genes related to extracellular matrix

基因名称	LogFC	<i>P</i>	校正后 <i>P</i>
ASAH2	-1.681 188 858	0.010202271	0.039995696
TNFAIP6	1.061 241 719	0.000194661	0.001447986
PON1	2.571 409 628	6.39E-45	1.74E-42
WFIKKN2	1.000982 632	6.38E-10	1.60E-08
KLK5	3.198981 333	0.011602127	0.04414435
CD1E	1.412 361 441	1.11E-07	1.86E-06
CXCL14	-1.021 217 549	2.23E-09	5.16E-08
THBS1	-1.256 610 433	5.47E-86	4.87E-83
AREG	-2.393 896 705	1.88E-06	2.43E-05
CXCL2	-1.789 799 638	1.19E-37	2.27E-35
THBS4	-3.280 684 277	0.000147676	0.001142492
ADAMTS4	-1.020 844 602	9.62E-09	1.97E-07
CCL8	-1.300 951 991	4.26E-26	4.32E-24
CTSL	-2.367 477 476	5.27E-05	0.000470351
FLRT1	3.028 606 366	0.001234795	0.007069199
OTOG	1.419 656 249	0.001549784	0.008528336
CCL2	-1.003 309 962	1.86E-06	2.40E-05
NDP	1.297 577 098	0.001027728	0.006056795
APOB	-1.670 375 21	0.000425658	0.002851356
XDH	4.945 718 658	2.01E-70	1.11E-67
COL22A1	-3.012 702 444	0.001677249	0.009126374
BMP8A	-1.131 393 016	1.58E-09	3.74E-08
DKK1	-1.384 146 7	2.94E-10	7.75E-09
IL1A	-1.242 147 858	2.09E-21	1.64E-19
IL6	-1.828 458 638	6.10E-07	8.74E-06
SFRP2	-2.214 720 482	0.012270295	0.046204564
TG	2.389 166 701	0.000128918	0.001023048
CILP	-1.030 855 274	2.52E-12	8.58E-11
IL1B	-1.733 900 902	8.48E-19	5.37E-17
IFNE	-1.147 986 534	0.002583079	0.013078573
UPTI	1.310 012 634	0.00120919	0.006944936
DPEP1	-1.726 138 591	0.002018831	0.01068401
LOC100521998	-4.045 174 213	0.006775299	0.028877436
ACPP	1.016 963 504	0.00127865	0.007273515
UMODL1	1.277 593 564	0.006711926	0.028675953
CXCL8	-1.561 364 145	2.25E-38	4.50E-36

的互动关系。为了探究本研究中 TGF- $\beta$  是否也协同参与调节肺发育过程。课题组使用 Western Blot 实验对 TGF- $\beta$  的相对表达量进行分析, 结果提示, 与对照组比较, 模型组 TGF- $\beta$  表达量

下降, 治疗后表达量上升, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。说明 TGF- $\beta$  也参与了本研究实验动物的肺发育过程。

THBS1 是第 1 个被发现的 THBS 成员, 被认

表 5 免疫应答相关基因  
Tab. 5 Genes related to immune response

基因名称	LogFC	P	校正后P
CD274	-1.171 256 037	2.60E-17	1.49E-15
SLA-DRB1	1.337 022 797	3.35E-38	6.62E-36
JUN	-1.850 222 012	6.44E-158	3.44E-154
CXCL8	-1.561 364 145	2.25E-38	4.50E-36
OSM	-1.138 466 837	1.79E-05	0.000182168
CXCL14	-1.021 217 549	2.23E-09	5.16E-08
CXCL2	-1.789 799 638	1.19E-37	2.27E-35
THBS1	-1.256 610 433	5.47E-86	4.87E-83
IL1A	-1.242 147 858	2.09E-21	1.64E-19
CCL8	-1.300 951 991	4.26E-26	4.32E-24
CTSL	-2.367 477 476	5.27E-05	0.000470351
IL1B	-1.733 900 902	8.48E-19	5.37E-17
SLA-2	1.181 319 808	3.31E-28	3.87E-26

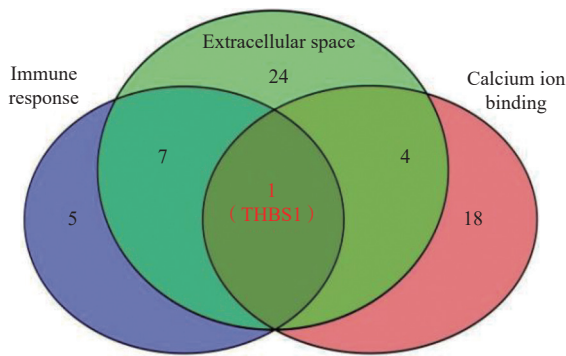


图 5 粉色为钙离子相关基因、紫色区域代表免疫相关基因、绿色区域代表细胞外基质相关基因

Fig. 5 Pink represents calcium-related genes, purple area represents immune-related genes, and green area represents extracellular matrix-related genes

为是血小板在凝血酶的刺激下产生的糖蛋白, 但后续的研究证明 THBS1 可由多种细胞合成分泌。THBS1 可与纤维蛋白原、整合素等结合, 以介导细胞与细胞之间、细胞与基质之间的相互作用<sup>[5]</sup>; 有研究发现 THBS1 与细胞增殖、凋亡及细胞周期有关<sup>[6]</sup>, 当 THBS1 下调时可加速细胞凋亡, 而细胞凋亡率上升也是导致肺纤维化的原因之一, 因此在本研究中, 模型组肺泡数量减少及肺纤维程度较重的原因可能是 THBS1 下调后增加了肺组织细胞的凋亡率, 最终导致了肺纤维化和肺泡数量减少, 其具体机制后续还需进行细胞周期及细胞凋亡率的检测加以确定。此外 THBS1 还参与创伤修复, 组织再生<sup>[7-8]</sup>, 这也能解释治疗组的幼猪肺组织在 THBS1 表达量上调后得到改善的现象。

表 6 THBS1 基因相对表达量( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 6 Relative gene expression levels of THBS1 ( $\bar{x} \pm s$ )

基因	对照组	模型组	治疗组	F	P
THBS1	1.04±0.07	0.53±0.06***	2.08±0.07###	755.75	P < 0.001***

与对照组比较, \*\*\*P < 0.001; 与模型组比较, ###P < 0.001; \*\*\*P < 0.001。

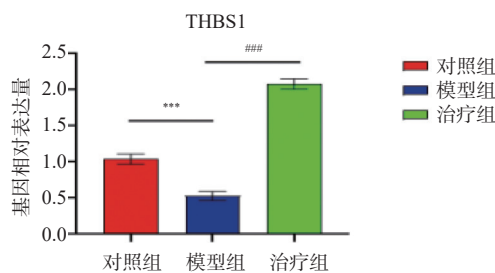


图 6 THBS1 在 3 组中的基因相对表达量情况

Fig. 6 Relative gene expression levels of THBS1 among the three groups

TGF-β 蛋白主要有 3 种亚型: TGF-β 1、TGF-β 2、TGF-β 3, 其中 TGF-β 1 对肺组织的发育及维持肺的呼吸功能起着非常重要的作用<sup>[9]</sup>。大量研究已经证明 TGF-β 是引起肺纤维化的主要原因<sup>[10-11]</sup>, 这些研究中都证实了 TGF-β 上调是导致肺纤维化的关键因素; 此外, 有研究发现在某些细胞中, THBS1 和 TGF β 之间可能存在 1 个正向的反馈通路, 通过该通路活性的 TGF β 诱发 THBS1 表达, 即 THBS1 的表达可能依赖于 TGF-

表 7 THBS1 蛋白相对表达量( $\bar{x} \pm s$ )Tab. 7 Relative protein expression levels of THBS1 ( $\bar{x} \pm s$ )

归一值	对照组	模型组	治疗组	F	P
THBS1	1.00±0.08	0.62±0.08**	0.77±0.10 <sup>#</sup>	15.02	0.005***

与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.01$ 。

表 8 TGF- $\beta$  蛋白相对表达量( $\bar{x} \pm s$ )Tab. 8 Relative protein expression levels of TGF- $\beta$  ( $\bar{x} \pm s$ )

归一值	对照组	模型组	治疗组	F	P
TGF $\beta$ 归一值	1.00±0.24	0.55±0.14*	0.91±0.05 <sup>#</sup>	6.07	0.036**

与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.05$ 。

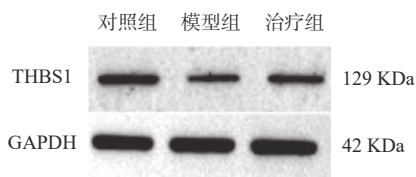


图 7 THBS1 WB 结果示意图

Fig. 7 Schematic representation of THBS1 western blot results

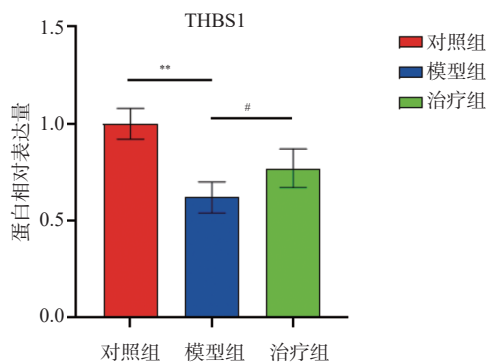
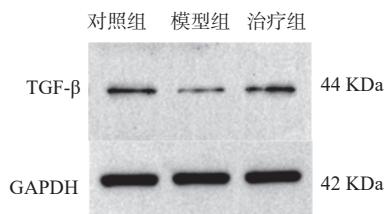


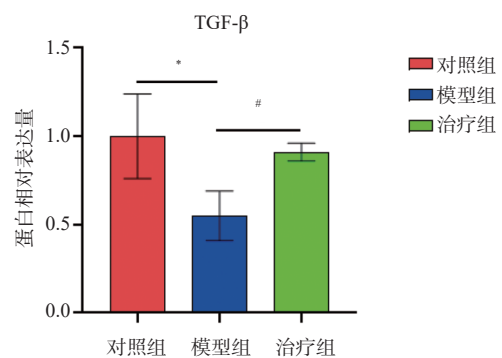
图 8 THBS1 在 3 组中的蛋白相对表达量情况

Fig. 8 Relative protein expression levels of THBS1 among the three groups

图 9 TGF- $\beta$  WB 结果示意图Fig. 9 Schematic representation of TGF- $\beta$  western blot results.

$\beta$  [12-14]。本研究 TGF- $\beta$  的 WB 的结果呈下调趋势, 可能是因为在在本研究中 TGF- $\beta$  仅作为 THBS1 表达的“诱发剂”, 并不作为肺纤维化的主要参与者。

本研究筛选出关键基因“THBS1”, 并对其

图 10 TGF- $\beta$  在 3 组中的蛋白相对表达量情况Fig. 10 Relative protein expression levels of TGF- $\beta$  among the three groups

进行了 PCR、WB 检测, 提示 THBS1 参与了本研究幼猪肺发育的变化过程, 并结合 THBS1 及 TGF- $\beta$  的文献调研和实验验证, 也证明 TGF- $\beta$  也参与了该过程, 并且多篇文章也已经证实 THBS1 与 TGF- $\beta$  相互作用在肺不张、肺动脉高压、肺癌等肺部疾病中发挥关键作用 [15-17]。但关于 THBS1 和 TGF- $\beta$  之间的确切关系及其调控肺发育的具体机制还需要进一步的研究来确定。

## [参考文献]

- [1] Campbell R M Jr, Smith M D, Mayes T C, et al. The characteristics of thoracic insufficiency syndrome associated with fused ribs and congenital scoliosis[J]. J Bone Joint Surg Am, 2003, 85(3): 399-408.
- [2] Cooney T P, W M Thurlbeck. The radial alveolar count method of emery and mithal: A reappraisal 2-intrauterine and early postnatal lung growth[J]. Thorax, 1982, 37(8): 580-583.
- [3] Dogar A M, Semplicio G, Guennewig B, et al. Multiple microRNAs derived from chemically synthesized precursors

- regulate thrombospondin 1 expression[J]. *Nucleic Acid Ther*, 2014, 24(2): 149–159.
- [4] Harpel J G, Schultz–Cherry S, Murphy–Ullrich J E, et al. Tamoxifen and estrogen effects on TGF–beta formation: Role of thrombospondin–1, alphavbeta3, and integrin–associated protein[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 284(1): 11–14.
- [5] Bissinger R, Petkova–Kirova P, Mykhailova O, et al. Thrombospondin–1/CD47 signaling modulates transmembrane cation conductance, survival, and deformability of human red blood cells[J]. *Cell Commun Signal*, 2020, 18(1): 155.
- [6] Grosser J A, Maes M E, Nickells R W. Characteristics of intracellular propagation of mitochondrial BAX recruitment during apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2021, 26(1–2): 132–145.
- [7] Jiang D, Guo B, Lin F, et al. Effect of THBS1 on the biological function of hypertrophic scar fibroblasts[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020(1): 8605407.
- [8] Lai Y H, Lee P Y, Lu C Y, et al. Thrombospondin 1–induced exosomal proteins attenuate hypoxia–induced paraptosis in corneal epithelial cells and promote wound healing[J]. *FASEB J*, 2021, 35(1): e21200.
- [9] 陈冲, 封志纯. 支气管肺发育不良分子遗传学研究进展 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2012, 27(16): 1282–1284.
- [10] Inui N, Sakai S, Kitagawa M. Molecular pathogenesis of pulmonary fibrosis, with focus on pathways related to TGF– $\beta$  and the ubiquitin–proteasome pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 6107.
- [11] Chanda D, Otoupalova E, Smith S R, et al. Developmental pathways in the pathogenesis of lung fibrosis[J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65(1): 56–69.
- [12] Lawler J, Miao W M, Duquette M, et al. Thrombospondin–1 gene expression affects survival and tumor spectrum of p53–deficient mice[J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(5): 1949–1956.
- [13] Zippel N, Malik R A, Fromel T, et al. Transforming growth factor–beta–activated kinase 1 regulates angiogenesis via AMP–activated protein kinase–alpha1 and redox balance in endothelial cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(12): 2792–2799.
- [14] Xu S, Yang S, Sun G, et al. Transforming growth factor–beta polymorphisms and serum level in the development of osteosarcoma[J]. *DNA Cell Biol*, 2014, 33(1): 802–806.
- [15] Rashid A, Zeng C, Motta–Ribeiro G, et al. Proteomics of lung tissue reveals differences in inflammation and alveolar–capillary barrier response between atelectasis and aerated regions[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 7065.
- [16] Kaneshita S, Kida T, Yoshioka M, et al. CG223, a novel BET inhibitor, exerts TGF– $\beta$  1–mediated antifibrotic effects in a murine model of bleomycin–induced pulmonary fibrosis[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2021, 70(2): 102057.
- [17] Wang I M, Stepaniants S, Boie Y, et al. Gene expression profiling in patients with chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 177(4): 402–411.