

# TNF- $\alpha$ 通过调控肺成纤维细胞旁分泌光蛋白聚糖诱导小气道上皮细胞向间充质细胞转化

王可<sup>1,2</sup>, 吴羽<sup>1</sup>, 王浩<sup>1</sup>, 陈俊<sup>1</sup>, 文富强<sup>1</sup>, 汪涛<sup>1</sup>

1. 四川大学华西临床医学院/华西医院 呼吸病学研究室(成都 610041); 2. 陆军军医大学第二附属医院 呼吸与危重症医学科(重庆 400037)

**【摘要】目的** 探索炎症介质肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 诱导肺成纤维细胞旁分泌光蛋白聚糖(lumican)对小气道上皮细胞间充质转化的影响与调控机制。**方法** 体外培养人原代肺成纤维细胞(human primary lung fibroblasts; HLF)与人原代小气道上皮细胞(human primary small airway epithelial cells; HSAE), 通过转录组测序与RT-qPCR检测lumican在两种细胞内的表达情况。利用lumican siRNA靶向沉默HLF lumican表达后, 将HLF与HSAE进行共培养, 检测TNF- $\alpha$ 刺激下HSAE中上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition; EMT)相关指标的变化。采用ERK磷酸化特异性抑制剂预处理HSAE后, 检测lumican刺激下ERK/Slug通路的活性变化。**结果** RNA测序与RT-qPCR结果显示lumican在HSAE中几乎不表达, 而在HLF中表达量较高。TNF- $\alpha$ 可以显著增加HLF中lumican的合成和分泌。TNF- $\alpha$ 作用于HLF与HSAE共培养体系后可诱导HSAE中 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白(alpha smooth muscle actin;  $\alpha$ -SMA)和III型胶原蛋白 $\alpha$ 1链(collagen type III, alpha 1 chain; COL3A1)的表达, 下调E-钙黏蛋白(E-cadherin)的表达。Lumican siRNA预处理HLF后可以抑制上述改变。利用重组蛋白lumican处理HSAE后, 发现HSAE中ERK磷酸化和Slug蛋白水平增加,  $\alpha$ -SMA表达上调的同时E-cadherin表达下调, 而ERK磷酸化抑制剂预处理可以显著抑制该变化。**结论** 炎症介质TNF- $\alpha$ 可能通过促进肺成纤维细胞旁分泌lumican, 作用于小气道上皮细胞, 激活ERK/Slug信号通路, 引起小气道上皮细胞向间充质细胞转化, 进而促进炎症损伤后的纤维化进程。

**【关键词】** 肿瘤坏死因子; 光蛋白聚糖; 小气道上皮细胞; 上皮细胞间充质转化

【中图分类号】R364.5

文献标志码 A

DOI: 10.3969/j.issn.2096-3351.2024.05.005

## TNF- $\alpha$ induces the mesenchymal transition of small airway epithelial cells by regulating the paracrine secretion of lumican by lung fibroblasts

WANG Ke<sup>1,2</sup>, WU Yu<sup>1</sup>, WANG Hao<sup>1</sup>, CHEN Jun<sup>1</sup>, WEN Fuqiang<sup>1</sup>, WANG Tao<sup>1</sup>

1. Laboratory of Pulmonary Diseases, West China School of Medicine, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400037, China

**【Abstract】 Objective** To explore the effect and regulatory mechanism of the inflammatory mediator tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) on the paracrine secretion of lumican by lung fibroblasts and its impact on the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of small airway epithelial cells. **Methods** Primary human lung fibroblasts (HLF) and human small airway epithelial cells (HSAE) were cultured in vitro. The expression of the proteoglycan lumican in HLF and HSAE was detected using transcriptome sequencing and RT-qPCR. After silencing lumican expression in HLF using lumican siRNA, HLF and HSAE were co-cultured, and the changes in EMT-related markers in HSAE under TNF- $\alpha$  stimulation were detected. Following the pretreatment of HSAE with a specific ERK phosphorylation inhibitor, the changes in ERK/Slug pathway activity under lumican stimulation were measured. **Results** RNA sequencing and RT-qPCR results showed that lumican was barely detectable in HSAE but highly expressed in HLF. TNF- $\alpha$  significantly induced the synthesis and secretion of lumican in HLF. In a co-culture system of HLF and HSAE, TNF- $\alpha$  treatment increased the expression of  $\alpha$ -SMA (alpha smooth muscle actin) and COL3A1 (collagen type III, alpha 1 chain) while decreasing the expression of E-cadherin in HSAE. These changes were reversed when HLF was treated with lumican siRNA. Furthermore, treating HSAE with recombinant lumican led to an increase in ERK phosphorylation and Slug protein levels, upregulation of  $\alpha$ -SMA, and downregulation of E-cadherin. These effects were significantly reduced when an inhibitor of ERK phosphorylation was used. **Conclusion** The inflammatory factor TNF- $\alpha$  may promote fibrosis following inflammatory injury by stimulating lung fibroblasts to secrete lumican, which then acts on small airway epithelial cells to activate the ERK/Slug signaling pathway, thereby inducing EMT in these cells.

**【Key words】** Tumor necrosis factor; Lumican; Small airway epithelial cells; Epithelial-mesenchymal transition

基金项目: 四川省自然科学基金青年基金(2024NSFSC1525)

通信作者: 汪涛, E-mail: tao.wang@scu.edu.cn; 王浩, E-mail: haowang@scu.edu.cn

引用本文: 王可, 吴羽, 王浩, 等. TNF- $\alpha$ 通过调控肺成纤维细胞旁分泌光蛋白聚糖诱导小气道上皮细胞向间充质细胞转化[J]. 西南医科大学学报, 2024, 47(5): 389-394. DOI: 10.3969/j.issn.2096-3351.2024.05.005.

肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )是一种强促炎细胞因子<sup>[1]</sup>,在许多肺部炎症性疾病中扮演了重要角色,且与组织重塑和纤维化等病理过程密切相关<sup>[2]</sup>。我们最新研究发现,TNF- $\alpha$ 可刺激肺成纤维细胞分泌光蛋白聚糖(lumican)并与急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)早期肺纤维化过程有关<sup>[3]</sup>。

Lumican是肺组织细胞外基质(ECM)成分之一,参与气道多种细胞的功能调控,对维持气道结构的平衡至关重要<sup>[4-6]</sup>。在轻度哮喘患者气道上皮网状基底膜内<sup>[7-8]</sup>以及小鼠肺纤维化模型中<sup>[9]</sup>均发现了lumican的表达上调。此外,lumican还参与调节机械通气导致的小鼠肺损伤中上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)<sup>[10]</sup>。

EMT是一种使上皮细胞获得部分间充质特征的细胞程序,可参与炎症反应响应、过度修复、器官纤维化等疾病发展进程<sup>[11-12]</sup>。EMT过程中, $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白(alpha smooth muscle actin;  $\alpha$ -SMA)和Ⅲ型胶原蛋白 $\alpha$ 1链(collagen type Ⅲ, alpha 1 chain; COL3A1)等间充质细胞及ECM标志物合成增加<sup>[13]</sup>,但上皮细胞标志物E-钙黏蛋白(E-cadherin)等表达下降<sup>[14]</sup>,并受Snail/Slug等转录因子的调控<sup>[11]</sup>。气道上皮EMT在慢性阻塞性肺疾病、过敏性哮喘等疾病进展中扮演了重要的角色<sup>[15-16]</sup>。我们近期研究发现lumican可诱导人小气道上皮细胞发生EMT<sup>[3]</sup>,本研究旨在进一步探索lumican的细胞来源、作用方式与具体分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试验材料

人原代肺成纤维细胞(human primary lung fibroblasts; HLF)与人原代小气道上皮细胞(human primary small airway epithelial cells, HSAE)及配套的FibroLife培养基和BronchiaLife培养基,均购置于Lifeline Cell Technology公司(美国)。Lumican ELISA试剂盒购置于R&D Systems公司(美国)。ERK磷酸化抑制剂PD0325901购置于MCE公司(中国)。Western Blot实验中E-cadherin一抗购自Abcam公司(美国); $\beta$ -actin、 $\alpha$ -SMA、Snail蛋白一抗均购自CST公司(美国);COL3A1一抗购自Abconal公司(美国);GAPDH一抗购自Proteintech公司(中国)。

### 1.2 细胞培养

分别采用FibroLife和BronchiaLife原代细胞专用完全培养基,在5%CO<sub>2</sub>、37℃无菌环境下培养HLF和HSAE,每2d更换一次培养基。细胞生长至培养皿底面积的80%时进行传代处理。待细胞传代至3~4代时可将细胞接种在于6孔板或12孔板内等待进一步处理。

### 1.3 细胞活性检测

为探索适宜的TNF- $\alpha$ 浓度用于后续实验,分别使用不同浓度的TNF- $\alpha$ 刺激HLF 24 h。采用CCK8试剂盒(同仁化学,日本),分析细胞活力,选择适宜的刺激浓度。

### 1.4 细胞共培养及lumican siRNA转染

Lumican siRNA以及阴性对照siRNA购自Sigma公司,两条siRNA碱基序列如表1。将HLF接种于Transwell的上室内,密度为 $2 \times 10^5$ 个/mL;将HSAE接种于Transwell的下室内,密度为 $5 \times 10^5$ 个/mL。上下室于37℃,5%CO<sub>2</sub>分开培养24 h。依次加入培养基、助转染试剂(Mirus,法国)、siRNA混匀,使siRNA的终浓度为25 nm。静置20 min后滴加入细胞孔内。培养24 h后更换培养基,然后分为两组,一组为对照,另一组加入重组蛋白TNF- $\alpha$ ,将Transwell的上室插入下室内,放入孵箱中培养24 h。培养结束后收集RNA和蛋白质待后一步的检测。HLF和HSAE共培养体系,见图1示意图。

表1 siRNA碱基序列

Table 1 siRNA base sequence

名称	序列
Lumican-si1	F: 5' GUUGC UAACGAAGUCACUCUUTT 3' R: 5' AAGAGUGACU UCGUUAGCAACTT 3'
Lumican-si2	F: 5' GGGCAAUCAUCACCAAACUTT 3' R: 5' GCUAUGAUGACCUGGAUUA 3'

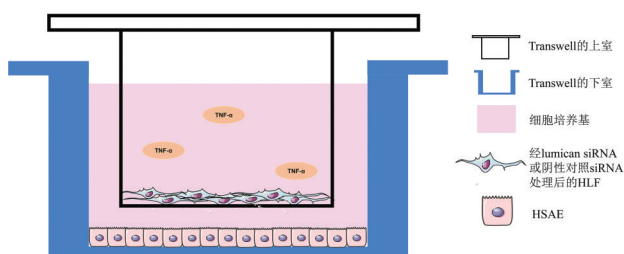


图1 HLF和HSAE共培养体系示意图

Figure 1 Schematic representation of the co-culture system of HLF and HSAE

### 1.5 ERK磷酸化抑制剂处理HLF和HSAE

利用10 nm的PD0325901抑制剂预处理HSAE,然后用50 ng/mL重组蛋白lumican刺激细胞。24 h后更换新鲜培养基和新的重组蛋白lumican及抑制剂,再培养24 h。提取细胞蛋白备用。

### 1.6 qPCR法检测 $\alpha$ -SMA, COL3A1, E-cadherin表达

用福际生物的RNA提取试剂盒提取HLF和HSAE的总RNA,使用Nanodrop 2000测量RNA浓度和纯度。使用Takara公司的逆转录试剂盒进行逆转录,合成cDNA,用于PCR检测。qPCR反应均使用Roche的PCR试剂盒进行检测,其总反应体系为10  $\mu$ L,预变性温度为95℃,600 s;循环条件:变性温度为95℃,10 s,退火温度为60℃,10 s,延伸温度为72℃,15 s,共35~40个循环。引物信息如表2所示。

表 2 PCR 引物信息  
Table 2 PCR primer information

名称	引物序列
Human -GAPDH	F: 5' GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA 3' R: 5' TCTCTTCCTCTTGTGCTCTTGCT 3'
Human -LUMICAN	F: 5' TCATCCATCTCCAGCACAATCG 3' R: 5' ATTCCACTATCAGCCAGTTCGTT 3'
Human -COL3A1	F: 5' GCTACGGCAATCCTGAACTTCC 3' R: 5' GCAACCATCTCCAGAACTGTG 3'
Human - $\alpha$ -SMA	F: 5' TTACTACTGCTGAGCGTGAGATT 3' R: 5' CGATGAAGGATGGCTGGAACA 3'
Human -E-cadherin	F: 5' TACGCCTGGGACTCCACCTA 3' R: 5' CCAGAAACGGAGGCCTGAT 3'

### 1.7 Western blot法检测EMT相关蛋白表达

提取目标蛋白后用BCA法进行蛋白定量。然后按比例加入5×SDS上样缓冲液(雅酶),98℃变性15 min。使用10%的下层胶进行SDS-PAGE凝胶电泳。湿法转印到PVDF膜上,采用快速封闭液(雅酶)进行封闭。分别将COL3A1(1:500)、 $\alpha$ -SMA(1:10 000)、E-cadherin(1:1 000)、lumican(1:1000)、Slug(1:1 000)、ERK(1:1 000)和p-ERK(1:1 000)稀释成工作浓度的一抗溶液,4℃孵育过夜。二抗孵育1.5 h后运用增强型化学发光试剂(enhanced chemiluminescence, ECL)显色及成像。

### 1.8 HLF和HSAE的转录组测序

准备总RNA样本,用带有Oligo(dT)的磁珠富集mRNA,片段化后合成cDNA,经过试剂盒纯化,EB缓冲液洗脱后再进行末端修复,加碱基A,加测序接头处理,电泳回收目的段并进行PCR扩增,从而完成整个文库制备工作。构建好的文库用Illumina HiSeq Xten进行测序,测序策略为PE150,通过成都拜斯贝尔公司提供的RNA文库试剂盒及建库服务,获得两种细胞的转录组信息。

### 1.9 统计学分析

用GraphPad Prism版本8.0进行统计学分析。实验数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间差异(两组)比较采用t检验,多样本均数间比较采用One-Way ANOVA检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Lumican在HSAE和HLF细胞中的表达情况

通过转录组测序确定lumican在两种类型细胞中的表达,结果显示HSAE中TPM值接近0,几乎不表达lumican,而HLF中TMP值相对较高,见图2A。进一步运用RT-qPCR进行验证,在两种细胞GAPDH的Cq值差距不大时,lumican在HLF中较HSAE中的相差大于10个Cq值,见图2B。表明HLF中lumican的表达水平显著高于HSAE。

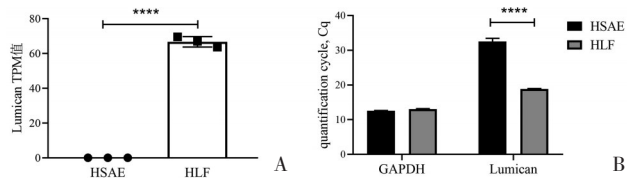


图 2 HSAE 和 HLF 中 lumican 的表达水平差异

Figure 2 Differences in lumican expression levels between HSAE and HLF

注:\*\*\*\* $P < 0.0001$ ;TPM: transcripts per million,每百万转录本中某转录本的占比;Cq:quantification cycle,定量循环数。

### 2.2 TNF- $\alpha$ 对HLF活力的影响

为了探索炎症因子TNF- $\alpha$ 对HLF细胞活性的影响,选用不同浓度的TNF- $\alpha$ 刺激HLF 24 h后,通过CCK8实验检测细胞活力,得到最适刺激浓度。结果显示:从0到20 ng/ml浓度逐渐递增的TNF- $\alpha$ 刺激下,HLF的活力没有明显下降,但高于40 ng/mL后细胞活力出现显著降低(图3)。因此,我们选用20 ng/mL浓度的TNF- $\alpha$ 进行后续实验。

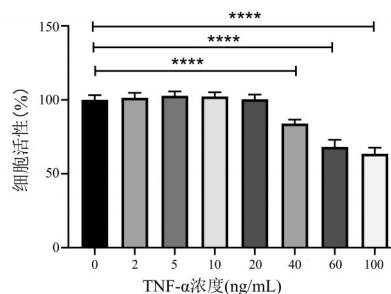


图 3 不同浓度 TNF- $\alpha$  刺激下 HLF 的细胞活力变化

Figure 3 Cell viability of HLF stimulated with different concentrations of TNF- $\alpha$

注:\*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

### 2.3 TNF- $\alpha$ 刺激与靶向沉默lumican对HLF中lumican表达的影响

在TNF- $\alpha$ 刺激下,通过qPCR与Western blot实验发现HLF的lumican mRNA与蛋白表达量显著升高,见图4A-C。同时ELISA实验证实细胞培养上清中,HLF分泌到胞外的lumican浓度显著升高,见图4D。表明TNF- $\alpha$ 可诱导HLF表达和分泌lumican蛋白。采用siRNA靶向沉默HLF中lumican的表达后,RT-qPCR结果表明,两条lumican siRNA处理的HLF相较于阴性对照处理组,lumican mRNA的表达水平均显著降低(见图5)。

### 2.4 HLF与HSAE共培养体系中, COL3A1、 $\alpha$ -SMA及E-cadherin在HSAE中mRNA表达水平变化

为了进一步明确TNF- $\alpha$ 刺激HLF分泌释放的lumican对HSEA细胞状态和功能的影响,我们采用lumican siRNA沉默HLF中lumican的表达后,构建了HLF和HSAE的共培养体系。RT-qPCR结果表明,其培养体系中添加TNF- $\alpha$ 可以显著增加HASE中 $\alpha$ -SMA与COL3A1的mRNA表达;同时显著抑制HSAE中E-

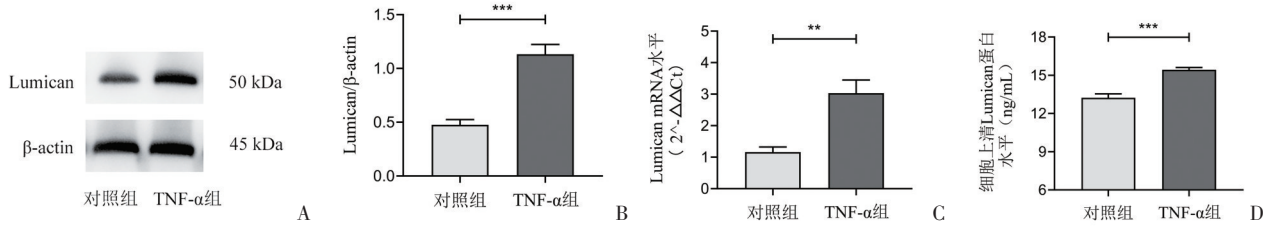


图4 TNF-α刺激后HLF中lumican表达和分泌水平的变化

Figure 4 Changes in lumican expression and secretion levels in HLF after TNF-α stimulation

注:图4结果包括三次独立重复实验。数值用平均值和标准差来表示,\*\*\* $P < 0.001$ ;\*\* $P < 0.01$ 。

cadherin mRNA 的表达水平,而沉默HLF中lumican的表达后可以有效逆转上述变化,见图6A-C。

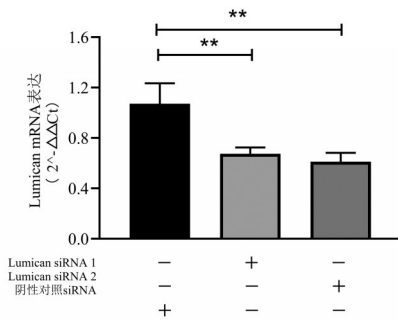


图5 Lumican siRNA处理后HLF中lumican mRNA的表达变化

Figure 5 Changes in lumican mRNA expression in HLF after lumican siRNA treatment

注:结果包括三次独立重复实验。数值用平均值和标准差来表示,\*\* $P < 0.01$ ;Ct:cycle threshold, 阈值循环数。

## 2.5 共培养体系中, COL3A1与α-SMA在HSAE中蛋白水平的变化

Western blot 实验结果表明,共培养体系中, COL3A1与α-SMA蛋白水平在HSEA中的变化趋势与mRNA的变化趋势相似,沉默HLF lumican的表达可显著抑制TNF-α诱导的共培养体系中HSAE的COL3A1与α-SMA表达升高。见图7A-C。

## 2.6 Lumican对HSAE活性的影响

为了进一步探索lumican对气道上皮细胞的作用机制,选用了不同浓度的lumican重组蛋白刺激HSAE。结果显示lumican浓度在50 ng/ml以内时,细胞活力没有显著变化,浓度增加到100 ng/ml以后细胞活力显著下降。因此,我们选用50 ng/ml重组蛋白lumican进行后续试验。见图8。

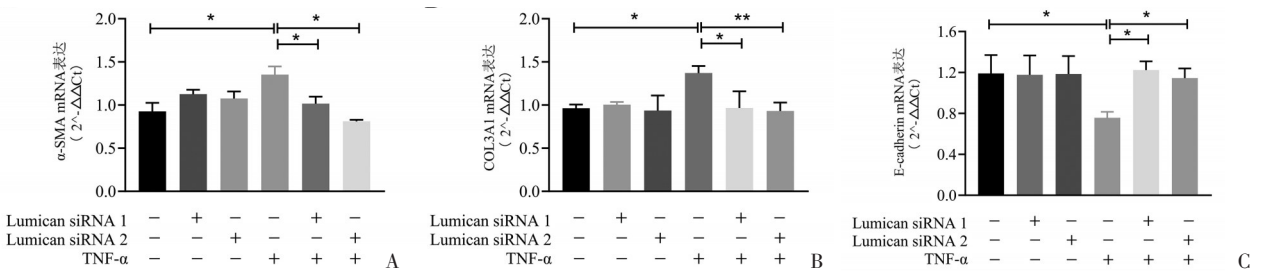


图6 在HLF与HSAE共培养体系中,沉默HLF的lumican表达后,TNF-α刺激下HSAE中α-SMA、COL3A1及E-cadherin mRNA水平的变化  
Figure 6 Changes of α-SMA、COL3A1 and E-cadherin mRNA levels in HSAE in the co-culture system of HLF and HSAE stimulated by TNF-α after silencing lumican expression of HLF

注:结果包括三次独立重复实验。数值用平均值和标准差来表示。\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

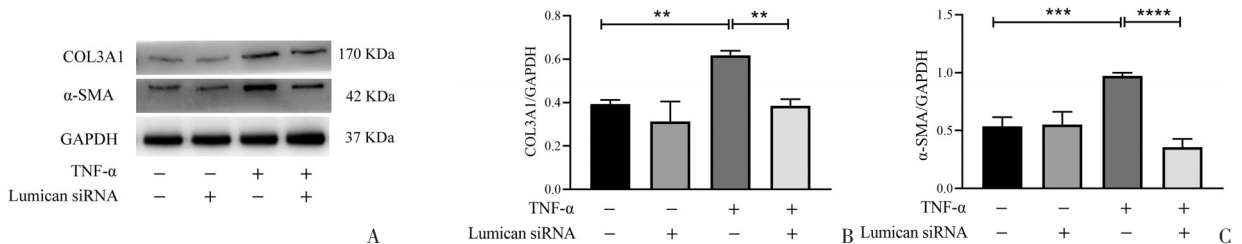


图7 在HLF与HSAE共培养体系中,沉默HLF的lumican表达后,TNF-α刺激下HSAE中COL3A1、α-SMA的蛋白水平变化

Figure 7 Changes of α-SMA、COL3A1.levels in HSAE in the co-culture system of HLF and HSAE stimulated by TNF-α after silencing lumican expression of HLF

注:结果包括三次独立重复实验。数值用平均值和标准差来表示。\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ,\*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

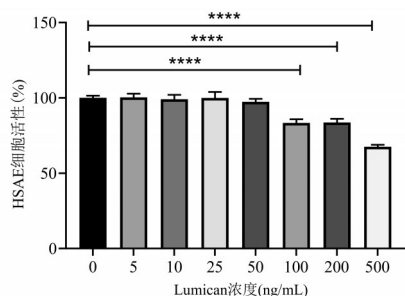


图8 不同浓度lumican刺激下HSAE的细胞活力

Figure 8 Cell viability of HSAE stimulated with different concentrations of lumican

注:\*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

### 2.7 Lumican调控HSAE发生EMT的机制探索

有研究发现ERK/MAPK信号通路参与了EMT的激活,同时ERK通路的磷酸化也是诱导纤维化反应的关键信号<sup>[17]</sup>。我们的Western blot实验结果表明使用ERK的磷酸化抑制剂PD0325901预处理HSAE,能有效抑制lumican诱导的ERK磷酸化水平的增加,E-cadherin蛋白水平的降低,以及 $\alpha$ -SMA和Slug蛋白水平的升高(图9A-E)。由此,我们推测lumican可能通过激活ERK/Slug通路促进HSAE发生EMT。

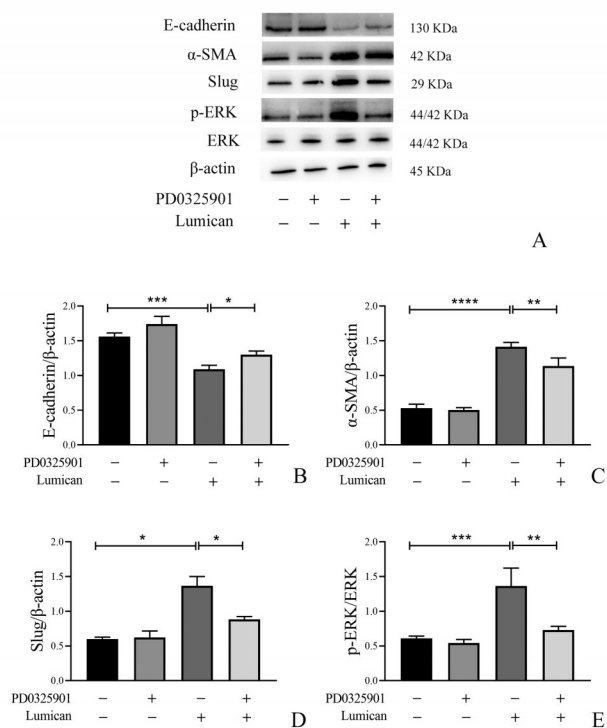


图9 ERK磷酸化抑制剂PD0325901预处理对TNF- $\alpha$ 刺激下HSAE中E-cadherin、 $\alpha$ -SMA和Slug蛋白水平的影响

Figure 9 ERK phosphorylation inhibitor PD0325901 pretreatment of TNF alpha stimuli in HSAE E-cadherin,  $\alpha$ -SMA and Slug protein levels

注:结果包括三次独立重复实验。数值用平均值和标准差来表示。 $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ,  $****P < 0.0001$ 。

### 3 讨论

本研究利用细胞共培养的方法,探索了在促炎因

子TNF- $\alpha$ 刺激下,lumican参与肺成纤维细胞与小气道上皮细胞间通信的过程,以及诱导EMT发生的具体作用机制。本研究首先探索了lumican在HSAE与HLF中的表达情况,发现lumican在HLF中表达较高,而在HSAE中几乎不表达,且TNF- $\alpha$ 可显著刺激HLF中lumican的表达和分泌。为明确HLF分泌的lumican对气道上皮的影响,我们将原代细胞HLF与HSAE共培养的方式,利用TNF- $\alpha$ 刺激建立气道炎症损伤后修复的体外模型,并采用靶向lumican的siRNA沉默HLF中lumican的表达后探索HSAE发生EMT的情况。结果提示TNF- $\alpha$ 可能通过促进HLF lumican的表达和旁分泌诱导HSAE发生EMT。我们通过ERK磷酸化抑制剂处理HSAE进行机制探究,发现ERK/Slug信号通路在lumican诱导HSAE发生EMT的过程中可能发挥了重要作用。

TNF- $\alpha$ 与许多肺部疾病的发病机制有关,例如:由肺巨噬细胞表达和释放的TNF- $\alpha$ 可通过促进多种促炎介质的表达在慢性阻塞性肺疾病的气道重塑、气道炎症中发挥关键作用<sup>[18]</sup>。哮喘气道中表达的TNF- $\alpha$ ,可能通过激活NF- $\kappa$ B、AP-1等转录因子放大哮喘炎症反应<sup>[19]</sup>。TNF- $\alpha$ 还与肺纤维化中慢性炎症启动有关<sup>[20]</sup>。已有研究证实TNF- $\alpha$ 会导致肿瘤环境下内皮发生EMT,在宫颈癌细胞中,TNF- $\alpha$ 可以直接激活NF- $\kappa$ B和Smad通路诱导EMT<sup>[21-22]</sup>;TNF- $\alpha$ 还能通过直接激活Wnt/ $\beta$ -catenin通路促进肝癌细胞发生EMT<sup>[23]</sup>。但在非肿瘤环境下,TNF- $\alpha$ 如何调控炎症损伤后的修复过程还不清楚。我们近期研究发现在LPS诱导的急性肺损伤小鼠模型的肺组织中有大量lumican沉积,可能参与了ARDS发展早期促纤维化反应的调控<sup>[3]</sup>。本研究中,我们进一步通过测序和RT-qPCR检测结果明确了lumican在不同类型肺结构细胞中的表达情况,发现HLF能高表达lumican,但HSAE自身几乎不表达lumican,提示HSAE发生纤维化相关的病理改变可能是由其他来源的lumican所导致。

既往有研究报道在人髓核细胞(hNPC)中,TNF- $\alpha$ 可刺激hNPC中lumican表达上调,并通过自分泌的方式调控ASK1/p38信号通路促进炎症反应<sup>[24]</sup>,提示TNF- $\alpha$ 诱导的lumican可能通过自分泌或旁分泌作用于自身或其他细胞。本研究中,我们验证了TNF- $\alpha$ 可以诱导HLF中lumican的表达上调,我们进一步将HLF和HSAE进行共培养构建气道炎症损伤修复的体外模型。研究结果显示:TNF- $\alpha$ 刺激下,与阴性对照siRNA处理后的HLF共培养的HSAE表现出间充质标志物 $\alpha$ -SMA和细胞外基质成分COL3A1的显著上调以及上皮标志物E-cadherin的显著下调,而与lumican siRNA处理后的HLF共培养的HSAE却能有效抑制上述改变。因此我们推测,TNF- $\alpha$ 可能通过诱导HLF表达和旁分

泌 lumican, 作用于 HSAE, 促进 EMT 的发生。

EMT 可以由多种转录因子调控, 其中 Snail 家族转录抑制因子 SNAI1 (SNAIL) 和 SNAI2 (Slug) 在促进启动 EMT 程序中发挥了重要作用, 是重要的 EMT 诱导转录因子, 能抑制上皮状态相关的基因并激活与间充质状态相关的基因, 使细胞上皮特征进行性丧失, 并获得部分间充质特征<sup>[14-15]</sup>。转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 可通过激活 RAS-RAF-MEK-ERK 信号转导轴, 促进 Slug 等 EMT 诱导转录因子的上调, 诱导 EMT 的发生<sup>[25-26]</sup>。另有报道表明, 蛋白激酶 B 也可以激活 ERK 通路介导肾上皮细胞 EMT<sup>[17]</sup>。本研究中, 我们检测了 lumican 刺激下 HSAE 中 ERK 和 Slug 等相关通路信号分子的表达和活性, 发现 lumican 可以上调 HSAE 细胞中 ERK 磷酸化以及 Slug、 $\alpha$ -SMA 蛋白的表达, 同时下调 E-cadherin 的表达, 而 PD0325901 ERK 磷酸化抑制剂预处理可以显著抑制上述改变, 表明 lumican 可能通过激活 ERK/Slug 信号通路诱导 HSAE 发生 EMT。

目前发现 Lumican 可以与细胞表面多种类型的膜蛋白相互作用。例如, lumican 可与巨噬细胞 CD14 相互作用并激活 toll 样受体-4 (TLR-4) 模式识别受体, 参与炎症与免疫反应<sup>[27]</sup>。此外, Lumican 还可以通过 Fas/FasI 以及整合素  $\beta$ 1-FAK 等通路促进胃癌细胞增殖、迁移和侵袭<sup>[24]</sup>。本研究发现 lumican 可能通过激活 ERK/Slug 信号通路诱导 HSAE 发生 EMT, 但 lumican 是通过何种膜表面受体作用 HSAE, 其上游通路仍需要更深入地研究。另外, 本研究仅在细胞水平探讨了 lumican 与 HLF 与 HSAE 的作用关系, 肺部组织中环境复杂, 受到各种体内外因素影响与调控, 若进行进一步的探索, 还需通过 lumican 成纤维细胞条件敲除等体内研究方式进行更深入的研究。

## 4 结论

本实验结果发现, HLF 中 lumican 表达水平较高, 而 HSAE 几乎不表达 lumican。通过 HSAE 与 HLF 共培养发现炎症介质 TNF- $\alpha$  可促进 HLF 合成分泌 lumican, 通过旁分泌的方式作用于 HSAE, 并可能通过激活 ERK/Slug 信号通路诱导 EMT 的发生。

## 5 参考文献

- BAUD V, KARIN M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives[J]. Trends Cell Biol, 2001, 11(9): 372-377.
- MALAVIYA R, LASKIN JD, LASKIN DL. Anti-TNF $\alpha$  therapy in inflammatory lung diseases[J]. Pharmacol Ther, 2017, 180: 90-98.
- WANG K, WANG YY, CAO YF, et al. Lumican is elevated in the lung in human and experimental acute respiratory distress syndrome and promotes early fibrotic responses to lung injury[J]. J Transl Med, 2022, 20(1): 392.
- IOZZO RV, SCHAEFER L. Proteoglycans in health and disease: novel regulatory signaling mechanisms evoked by the small leucine-rich proteoglycans[J]. FEBS J, 2010, 277(19): 3864-3875.
- HILL LJ, MEAD B, BLANCH RJ, et al. Decorin reduces intra-

- ocular pressure and retinal ganglion cell loss in rodents through fibrolysis of the scarred trabecular meshwork[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(6): 3743-3757.
- SCHAEFER L, IOZZO RV. Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction[J]. J Biol Chem, 2008, 283(31): 21305-21309.
- FLOOD-PAGE P, MENZIES-GOW A, PHIPPS S, et al. Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics[J]. J Clin Invest, 2003, 112(7): 1029-1036.
- HUANG J, OLIVENSTEIN R, TAHA R, et al. Enhanced proteoglycan deposition in the airway wall of atopic asthmatics[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999, 160(2): 725-729.
- PILLING D, VAKIL V, COX N, et al. TNF- $\alpha$ -stimulated fibroblasts secrete lumican to promote fibrocyte differentiation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(38): 11929-11934.
- LUDWIG MS, FTOUHI-PAQUIN N, HUANG W, et al. Mechanical strain enhances proteoglycan message in fibroblasts from asthmatic subjects[J]. Clin Exp Allergy, 2004, 34(6): 926-930.
- DONGRE A, WEINBERG RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(2): 69-84.
- SINGH M, YELLE N, VENUGOPAL C, et al. EMT: mechanisms and therapeutic implications[J]. Pharmacol Ther, 2018, 182: 80-94.
- MACKINNON AC, GIBBONS MA, FARNWORTH SL, et al. Regulation of transforming growth factor- $\beta$ 1-driven lung fibrosis by galectin-3[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 185(5): 537-546.
- ROUT-PITT N, FARROW N, PARSONS D, et al. Epithelial mesenchymal transition (EMT): a universal process in lung diseases with implications for cystic fibrosis pathophysiology[J]. Respir Res, 2018, 19(1): 136.
- NASRI A, FOISSET F, AHMED E, et al. Roles of mesenchymal cells in the lung: from lung development to chronic obstructive pulmonary disease[J]. Cells, 2021, 10(12): 3467.
- TIAN B, HOSOKI K, LIU ZQ, et al. Mucosal bromodomain-containing protein 4 mediates aeroallergen-induced inflammation and remodeling[J]. J Allergy Clin Immunol, 2019, 143(4): 1380-1394.e9.
- ZHOU JQ, JIANG H, JIANG HK, et al. The ILEI/LIFR complex induces EMT via the Akt and ERK pathways in renal interstitial fibrosis[J]. J Transl Med, 2022, 20(1): 54.
- TANAKA G, SANDFORD AJ, BURKETT K, et al. Tumour necrosis factor and lymphotoxin A polymorphisms and lung function in smokers[J]. Eur Respir J, 2007, 29(1): 34-41.
- MATERA MG, CALZETTA L, CAZZOLA M. TNF- $\alpha$  inhibitors in asthma and COPD: we must not throw the baby out with the bath water[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2010, 23(2): 121-128.
- SUAREZ JS, NOVELLI F, GOTO K, et al. HMGB1 released by mesothelial cells drives the development of asbestos-induced mesothelioma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2023, 120(39): e2307999120.
- PALAFOX-MARISCAL LA, ORTIZ-LAZARENO PC, JAVE-SUAREZ LF, et al. Pentoxifylline inhibits TNF- $\alpha$ /TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition via suppressing the NF- $\kappa$ B pathway and SERPINE1 expression in CaSKi cells[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(13): 10592.
- YOSHIMATSU Y, WAKABAYASHI I, KIMURO S, et al. TNF- $\alpha$  enhances TGF- $\beta$ -induced endothelial-to-mesenchymal transition via TGF- $\beta$  signal augmentation[J]. Cancer Sci, 2020, 111(7): 2385-2399.
- CHEN YX, WEN HH, ZHOU C, et al. TNF- $\alpha$  derived from M2 tumor-associated macrophages promotes epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness through the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in SMMC-7721 hepatocellular carcinoma cells[J]. Exp Cell Res, 2019, 378(1): 41-50.
- LI ZQ, SUN CF, CHEN MS, et al. Lumican silencing alleviates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced nucleus pulposus cell inflammation and senescence by inhibiting apoptosis signal regulating Kinase 1/p38 signaling pathway via inactivating Fas ligand expression[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 6891-6901.
- LAMOUILLE S, XU J, DERYNCK R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(3): 178-196.
- DERYNCK R, MUTHUSAMY BP, SAETEURN KY. Signaling pathway cooperation in TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition[J]. Curr Opin Cell Biol, 2014, 31: 56-66.
- FREY H, SCHROEDER N, MANON-JENSEN T, et al. Biological interplay between proteoglycans and their innate immune receptors in inflammation[J]. FEBS J, 2013, 280(10): 2165-2179.

(利益冲突: 无)

(收稿日期: 2024-06-01; 修回日期: 2024-06-20)