

文章编号 1006-8147(2019)05-0446-04

论著

FSTL1 促进间歇性低氧诱导的肺成纤维细胞活化

徐雷倩, 曹洁

(天津医科大学总医院呼吸科, 天津 300052)

摘要 目的:探究 FSTL1 与模拟睡眠呼吸暂停间歇低氧模式下氧化应激反应诱导肺成纤维细胞活化的关系。方法:将小鼠原代肺成纤维细胞分为 1、3、6、8 h 间歇低氧组,8 h 间歇低氧加抗氧化剂 Temple 组和常规对照组。提取细胞内蛋白,检测氧化应激指标 MDA、CAT。提取细胞内蛋白和培养上清中蛋白,做 Western blot 分析。沉默肺成纤维细胞中 FSTL1 的表达,重复上述低氧处理,再次检测氧化应激指标并做 Western blot 分析。结果:间歇低氧处理后,氧化应激指标 MDA 和 CAT 随时间增加而上升, Temple 可抑制氧化应激反应。Western blot 显示 α -SMA 和 FSTL1 的表达与氧化应激指标趋势一致。沉默 FSTL1 表达后,氧化应激指标呈下降趋势, Collagen 1 和 α -SMA 表达降低。结论:间歇低氧能够造成氧化应激反应,成纤维细胞的活化,这种影响可能与 FSTL1 的表达相关。

关键词 睡眠呼吸暂停综合征; 卵泡抑素样蛋白 1; 肺纤维化; 间歇低氧; 氧化应激

中图分类号 R563

文献标志码 A

FSTL1 promotes intermittent hypoxia-induced lung fibroblast activation

XU Lei-qian, CAO Jie

(Department of Respiratory, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

Abstract Objective: To investigate the relationship between FSTL1 and oxidative stress response induced by intermittent sleep hypoapnea in lung fibroblasts. **Methods:** (1) Mouse lung fibroblasts were divided into 1, 3, 6 and 8 hours intermittent hypoxia group, 8 hours intermittent hypoxia plus antioxidant Temple group and conventional control group. (2) Intracellular proteins and detect oxidative stress indicators MDA, CAT were extracted. (3) The protein in the intracellular protein and the culture supernatant were extracted and western blot analysis was performed. (4) We also did the following: Silencing the expression of FSTL1 in lung fibroblasts, repeating the above hypoxia treatment, re-detecting the oxidative stress index and performing western blot analysis. **Results:** After intermittent hypoxia treatment, oxidative stress indicators MDA and CAT increased with time, and Temple inhibited oxidative stress. Western blot showed that the expressions of α -SMA and FSTL1 were consistent with the trend of oxidative stress. After silencing FSTL1 expression, the oxidative stress index showed a downward trend, and Collagen 1 and α -SMA expression decreased. **Conclusion:** Intermittent hypoxia can cause oxidative stress and activation of fibroblasts, which may be related to the expression of FSTL1.

Key words sleep apnea syndrome; follistatin-like protein 1; pulmonary fibrosis; intermittent hypoxia; oxidative stress

阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(OSAS)是以睡眠过程中频繁的呼吸暂停、血氧饱和度下降和睡眠紊乱为主要特征的临床综合征^[1]。OSAS 对机体的危害是多系统的,除了呼吸系统外,还包括心脑血管、神经系统、泌尿系统以及内分泌系统等,严重者易出现夜间猝死的情况,这些并发症与 OSAS 的间歇性低氧密切相关。OSAS 与呼吸系统疾病密不可分,临床上将两者共患称为重叠综合征。肺心病是其中最为突出的一个疾病,患者往往有严重的肺动脉高压和右心衰竭^[2]。由于呼吸功能障碍,夜间长时间的呼吸暂停,使得急性呼吸衰竭的发生率升高,出现严重呼吸困难、发绀、抽搐等表现^[3]。另外肺纤维化的发生发展也与 OSAS 相关,可能原因是间歇性低氧

对肺成纤维细胞的活化作用。对于阻塞性睡眠呼吸暂停的治疗以呼吸机治疗为主,用于扩张气道,减少夜间呼吸事件的发生,防止过低的通气导致的夜间猝死和并发症^[4]。氧化应激在 OSAS 进程中具有十分重要的作用,它能与 TGF- β 、NF- κ B、AMPK 等多种信号通路相互联系,共同促进疾病的发生发展。Fstl1 最初是从 TGF- β 1 诱导的小鼠成骨细胞系 MC3T3 中克隆得到,其编码一个胞外分泌的小分子糖蛋白。最近的研究发现 FSTL1 在特发性肺纤维化以及矽肺等纤维化疾病中是一个新的促纤维化因子。Fstl1 能够通过增强 TGF- β 信号而促进肺成纤维细胞的活化,以及胶原和纤连蛋白等细胞外基质(ECM)的沉积,最终加剧肺纤维化的发展。利用 Fstl1 基因敲除小鼠或者 FSTL1 蛋白的中和性抗体阻断体内 FSTL1 的生物学功能则能够减缓肺纤维化的严重程度^[5],说明 Fstl1 可能是纤维化肺疾病的

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81670084,81600067)

作者简介 徐雷倩(1993-),女,硕士在读,研究方向:睡眠低氧性疾病和肺间质病;通信作者:曹洁, E-mail: tjcaojie@sina.com。

一个重要靶点。目前,Fstl1 与 OSAS 以及其并发症是否相关并没有相关研究。睡眠呼吸暂停的突出特征是夜间锯齿样的血氧波动,而间歇性低氧成为 OSAS 体外细胞模型的主要控制因素^[6],OSAS 所造成的间歇低氧可导致氧化应激反应,而肺纤维化的发生发展和肺成纤维细胞的活化也离不开氧化应激的作用^[7],所以 OSAS 的间歇低氧可能会引起肺成纤维细胞的活化,包括细胞外基质的沉积和氧化应激产物的表达^[8],而这种活化又与 FSTL1 相关。本研究主要探讨 OSAS 模式下的间歇低氧(IH)引起的氧化应激反应与 FSTL1 蛋白之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 小鼠原代肺成纤维细胞,胎牛血清(FBS),DMEM 培养基,胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),抗氧化剂 Temple(Sigma 公司),CAT 试剂盒(南京建成公司),MDA 试剂盒(南京建成公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基对小鼠原代肺成纤维细胞进行培养,并放在湿度合适、温度 37℃、5% CO₂ 的培养箱内。直至细胞在培养皿内生长到 80%~90% 且细胞状态良好,移除皿内培养基,用 PBS 小心清洗 2 遍,再加入 1 mL 的 0.25% 的胰蛋白酶消化,加入适量培养基,混匀吹打后,按 2 mL/孔的细胞量接种于 P₆₀ 细胞培养皿内,至成纤维细胞长到 80%~90%,PBS 冲洗,转移至撤去血清的培养基。

1.2.2 间歇低氧处理细胞 把分好盘的小鼠肺成纤维细胞放置于间歇低氧实验设备内,通过电路板和计算机程序(天津医科大学总医院呼吸科呼吸仿真系统)控制低氧/再氧合的循环(包括循环次数和循环时间)。间歇低氧的频率为:低氧 90 s,复氧 120 s,用测氧仪调整低氧时实验设备内的氧浓度最低限度为 5%,复氧时的氧浓度为 21%,间歇低氧组细胞分别给予 1、3、6、8 h 的低氧再氧合的循环操作,对照组细胞放置在适宜的培养箱中培养 8 h。

1.2.3 收集细胞分泌液,将上清液装入 EP 管中,再加入适当裂解液,用刮板轻刮培养皿,将细胞装入 EP 管中,均置于冰上待用。

1.2.4 提取胞内蛋白,用全光谱酶标仪分别在 450 nm、532 nm 处测过氧化氢酶(CAT),丙二醛(MDA)的吸光值,通过曲线换算,计算细胞内含量。

1.2.5 分别提取上清内蛋白和胞内蛋白,用 Western blot 方法,检测 FSTL1 和 α -SMA 表达的差异性以及趋势变化。

1.2.6 用 siRNA 转染的方法沉默成纤维细胞中 FSTL1 蛋白翻译,并同样间歇低氧处理 8 h 后,提取

上清内蛋白做 Western blot,验证是否沉默了 FSTL1,提取胞内蛋白,再次用全光谱酶标仪测 CAT、MDA 的吸光值,通过曲线换算,计算细胞内含量。用提取的胞内蛋白和上清蛋白,通过 Western blot 方法检测 Collagen 1 蛋白和 α -SMA 蛋白的表达。沉默 Fstl1 的 SiRNA 序列为 Sense:CCAUCAACAUCACCACUU-ATT, Anti-sense:UAAGUGGUGAUGUUGAUGGTT;对照组的 SiRNA 序列为 Sense:UUCUCCGAACGUGUCACGUTT, Anti-sense:ACGUGACACGUUCGGAGAATT。所有的序列都是 5' 端到 3' 端。

2 结果

2.1 间歇低氧模式诱导氧化应激反应 见图 1。间歇低氧模式是一种利用正常氧浓度和低氧浓度交替循环来模拟睡眠呼吸暂停综合征夜间低氧的方法,之前的研究表明,间歇低氧模式能够诱导氧化应激反应,检测的指标主要有丙二醛(MDA)含量,过氧化氢酶(CAT)活力等。为了检验间歇低氧模式下诱导的氧化应激反应,我们将小鼠肺成纤维细胞置于呼吸仿真系统仓内,模拟间歇性低氧,检测不同时间点细胞中过氧化氢酶活力以及丙二醛的含量。我们发现对照组的过氧化氢酶活力和丙二醛含量最低,而随着低氧处理时间的增加,过氧化氢酶活力和丙二醛含量都呈现明显上升趋势。当在细胞培养基中加入抗氧化剂 Temple 处理 8 h 后,过氧化氢酶活力和丙二醛含量都显著下降了。以上实验说明间歇低氧模式确实能诱导氧化应激反应,并且与间歇低氧的时间成正相关性。

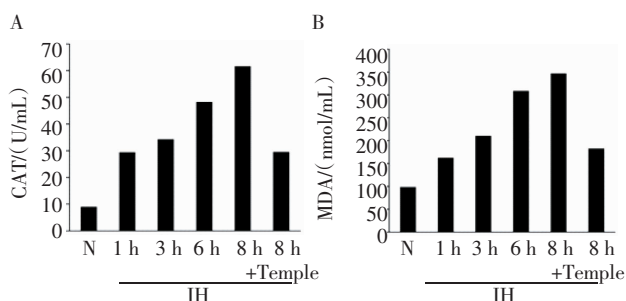


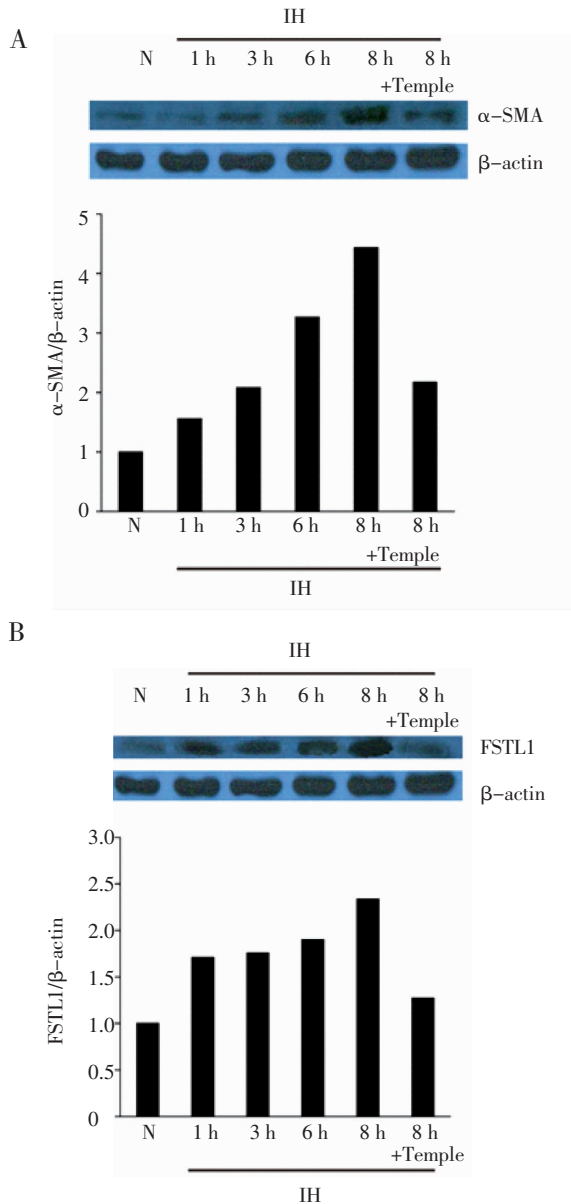
图1 小鼠肺成纤维细胞在正常及不同间歇低氧时间下 CAT 的表达量 (* $P<0.01$);B.小鼠肺成纤维细胞在正常及不同间歇低氧时间下 MDA 的表达量 (* $P<0.01$)

图1 小鼠肺成纤维细胞在低氧模式下氧化应激产物 CAT 和 MDA 的表达

Fig 1 Expression of oxidative stress products CAT and MDA in mouse lung fibroblasts in hypoxia mode

2.2 间歇低氧模式诱导肺成纤维细胞中 Fstl1 的表达 见图 2。利用 Western Blot 方法检测不同时间点经过间歇低氧处理的肺成纤维细胞中 α -SMA 和 FSTL1 的蛋白水平。结果显示, α -SMA 蛋白水平随

随着低氧处理时间增加而明显增加,同时 FSTL1 蛋白的表达量在对照组中最低,随着间歇低氧处理时间越长,其表达量越高,而经过抗氧化剂 temple 处理后, α -SMA 和 FSTL1 蛋白的表达量都有明显下降。以上数据说明间歇低氧能够诱导肺成纤维细胞活化以及 FSTL1 蛋白的表达,并且与氧化应激反应具有一定相关性。



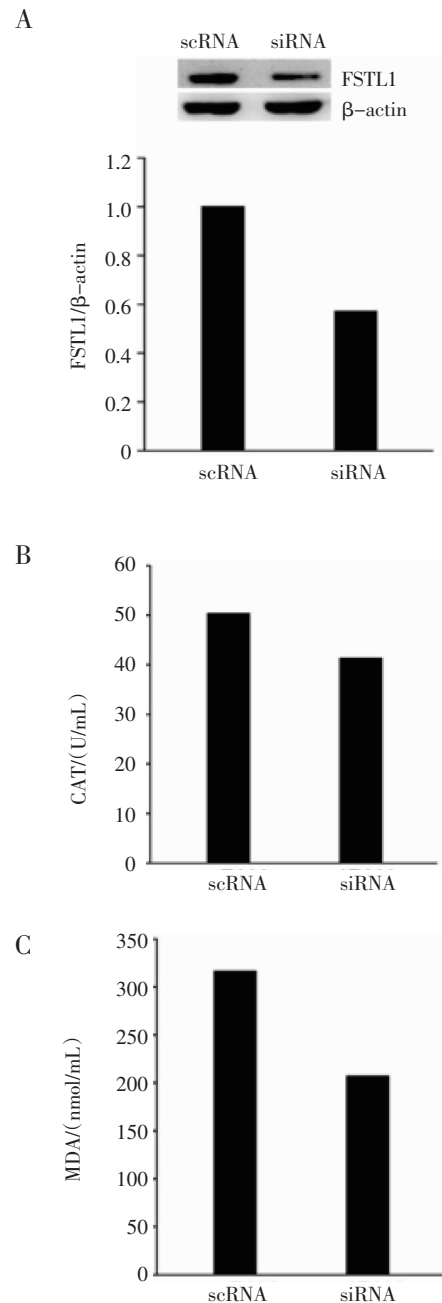
A. 小鼠肺成纤维细胞在正常及不同间歇低氧时间下 α -SMA 的表达量 (* P <0.01); B. 小鼠肺成纤维细胞在正常及不同间歇低氧时间下 FSTL1 的表达量 (* P <0.01)

图 2 小鼠肺成纤维细胞在低氧模式下 α -SMA 和 FSTL1 的表达

Fig 2 Expression of α -SMA and FSTL1 in mouse lung fibroblasts in hypoxic mode

2.3 敲低 Fstl1 减弱间歇低氧模式诱导的氧化应激反应 见图 3。我们利用 Fstl1 的 siRNA 敲低肺成纤维细胞中 FSTL1 的蛋白, Western blot 显示, siRNA

确实降低了 FSTL1 蛋白的水平。而间歇性低氧处理后, 细胞内丙二醛含量和过氧化氢酶活力都明显下降了。说明 Fstl1 参与调节间歇低氧模式的氧化应激过程。



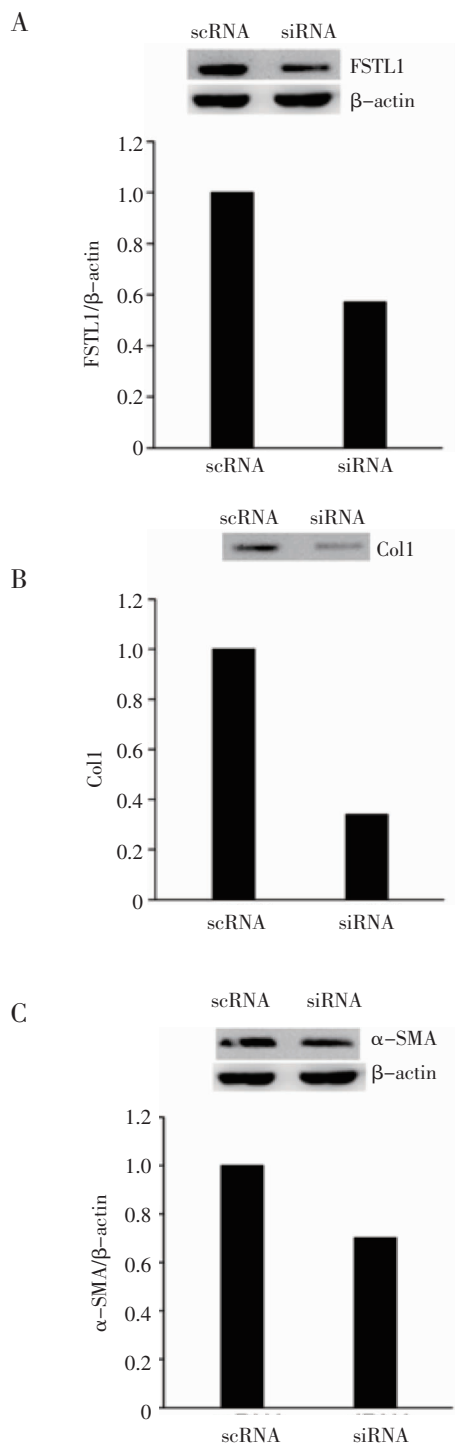
A. 正常组与转染后小鼠肺成纤维细胞的 FSTL1 表达 (* P <0.01); B. 正常组与转染后小鼠肺成纤维细胞 CAT 表达量 (* P <0.01); C. 正常组与转染后小鼠肺成纤维细胞 MDA 的表达量 (* P <0.01)

图 3 敲低 FSTL1 表达后小鼠肺成纤维氧化应激产物 CAT 和 MDA 的表达

Fig 3 Expression of CAT and MDA in lung fibroblastic stress products of mice after knockdown of FSTL1 expression

2.4 敲低 Fstl1 减弱间歇低氧模式诱导的肺成纤维细胞活化 见图 4。笔者进一步检测了在 Fstl1 表达下降的情况下, 间歇低氧处理后肺成纤维细胞中 α -

SMA 蛋白以及培养基中细胞外基质 college1 的表达量。结果显示, α -SMA 蛋白以及 collagen1 的含量都显著下降,表明敲低 Fstl1 减弱间歇低氧模式诱导的肺成纤维细胞活化以及细胞外基质的合成。



A.正常组与转染后小鼠肺成纤维细胞的 FSTL1 表达(* $P<0.01$);

B.正常组与转染后小鼠肺成纤维细胞 college1 表达量(* $P<0.01$);

C.正常组与转染后小鼠肺成纤维细胞 α -SMA 的表达量(* $P<0.01$)

图 4 敲低 FSTL1 表达后小鼠肺成纤维细胞活化程度

Fig 4 Activation of lung fibroblasts in mice after knockdown of FSTL1 expression

3 讨论

阻塞性睡眠呼吸暂停综合征是一种由多种原因引起的睡眠呼吸疾病,造成夜间的低通气和白天嗜睡现象,临床上常见的原因是上呼吸道的狭窄。长期的夜间呼吸暂停和低通气,使得机体缺氧,血液系统、神经系统、内分泌系统等全身各个系统都受到间歇性低氧的影响,这种危害是广泛而且不可逆的,甚至常发生夜间猝死现象。该疾病的治疗方法主要有手术和非手术两种^[9],非手术治疗中以经鼻持续正压通气(NCPAP)最为有效,手术治疗的目的是消除或减轻呼吸道的阻塞,但这种方法个体性较强,有时不能完全治愈,会出现病情复发。FSTL1 (Follistatin-like 1) 基因编码一种胞外分泌的糖蛋白,其几乎在所有的组织器官中均有表达^[10]。研究表明,FSTL1 通过增强 TGF- β 信号而促进肺纤维化的发展,是一个新的促纤维化因子。然而 FSTL1 是否参与氧化应激反应诱导的肺成纤维细胞活化并没有相关研究。有研究报道,Fstl1 在特发性肺纤维化以及矽肺的活化肺成纤维细胞中均有明显上调。在之前的研究中发现,间歇性低氧能够诱导小鼠肺成纤维细胞的活化。本实验发现,经过间歇低氧处理后的 FSTL1 和 α -SMA 表达都高于正常组,且与低氧处理时间呈正相关^[5, 11-15]。用 siRNA 转染沉默 FSTL1 蛋白的表达,间歇低氧处理 8 h 后, α -SMA 和 collagen 1 的表达量相较正常组都降低,氧化应激指标过氧化氢酶活力和丙二醛含量都下降,这在一定程度上表明 FSTL1 蛋白参与了此氧化应激的过程,与成纤维细胞的活化相关,有可能起到了促炎的作用。总的来说,睡眠呼吸暂停是一种全身性的疾病,对多个系统都有广泛影响,而这种影响体现在间歇低氧的这一机制对系统的损害,应该引起更多临床医生和科研工作者的重视。特别是 OSAS 患者是否有更高的发生肺纤维化的风险或者更严重的肺纤维化。接下来,应该完善从具体的氧化应激相关通路上做进一步的分析,尝试从信号分子上探索 FSTL1 蛋白和间歇低氧模式的关系,并搜集大量临床数据分析 OSAS 是否为肺纤维化的独立危险因素。

参考文献:

- [1] Arbeitsgruppe für pädiatrische Schlafmedizin und Schlafforschung der Österreichischen Gesellschaft für Kinder- und Jugendheilkunde (ÖGKJ). Schnarchen und obstruktives Schlafapnoesyndrom (OSAS)[J]. Monatsschrift Kinderheilkunde, 2011, 159 (7): 667

- [8] 彭晓波, 梁贵友.p38MAPK 与心肌缺血/再灌注损伤的研究进展[J]. 医学综述, 2017, 23(18): 3537
- [9] Lu Y Y, Chen Y C, Kao Y H, et al. Extracellular matrix of collagen modulates arrhythmogenic activity of pulmonary veins through p38 MAPK activation[J]. J Mol Cell Cardiol, 2013, 59(2013): 159
- [10] Zhang D L, Liu X, Chen X Q, et al. Role of the MAPKs/TGF- β 1/ TRAF6 Signaling Pathway in Atrial Fibrosis of Patients with Chronic Atrial Fibrillation and Rheumatic Mitral Valve Disease[J]. Cardiol, 2014, 129(4):216
- [11] Cheng W, Zhu Y, Wang H D. The MAPK pathway is involved in the regulation of rapid pacing-induced Ionic Channel remodeling in rat atrial myocytes[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(3): 2677
- [12] Sheng L, Shen Q L, Huang K, et al. Upregulation of beta 3-adrenergic receptors contributes to atrial structural remodeling in rapid pacing induced atrial fibrillation canines[J]. Cell Physiol Biochem, 2012, 30(2): 372
- [13] Mehta P K, Griendling K K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(1): C82
- [14] Grobe J L, Mecca A P, Lingis M, et al. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7)[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(2): H736
- [15] Simões E A, Silveira K D, Ferreira A J, et al. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis[J]. Br J Pharmacol, 2013, 169(3): 477
- [16] 杨胜荣. 依那普利、依贝沙坦及血管紧张素-(1-7)对慢性房颤犬模型心房重构的影响[D]. 天津: 天津医科大学, 2008
- [17] 李杨, 王学文, 李健, 等. 依那普利、厄贝沙坦及血管紧张素-(1-7)对快速心房起搏犬血管紧张素转换酶的影响[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2011, 25(1): 65
- [18] Liang B, Wang X, Zhang N, et al. Angiotensin-(1-7) attenuates angiotensin II-induced ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 expression via the MAS receptor through suppression of P38 and NF- κ B Pathways in HUVECs[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(6): 2472 (2018-12-21 收稿)

(上接第 449 页)

- [2] Nural S, Gunay E, Halici B, et al. Inflammatory processes and effects of continuous positive airway pressure (CPAP) in overlap syndrome[J]. Inflammation, 2013, 36(1): 66
- [3] Yamakawa H, Shiomi T, Sasanabe R, et al. Pulmonary hypertension in patients with severe obstructive sleep apnea[J]. Psych Clin Neurosciences, 2002, 56(3): 311
- [4] Mermigkis C, Bouloukaki I, Antoniou K M, et al. CPAP therapy in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and obstructive sleep apnea: does it offer a better quality of life and sleep[J]. Sleep Breath Schlaf Atmung, 2013, 17(4): 1137
- [5] Dong Y, Geng Y, Li L, et al. Blocking follistatin-like 1 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice[J]. J Exper Med, 2015, 212(2): 235
- [6] Li M, Krishnaveni M S, Li C, et al. Epithelium-specific deletion of TGF- β receptor type II protects mice from bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. Clin Invest, 2011, 121(1): 277
- [7] Nair D, Dayyat E A, Zhang S X, et al. Intermittent hypoxia-induced cognitive deficits are mediated by NADPH oxidase activity in a murine model of sleep apnea[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e19847
- [8] Passali D, Corallo G, Petti A, et al. A comparative study on oxidative stress role in nasal breathing impairment and obstructive sleep apnoea syndrome [J]. Acta otorinolaryngologica Italica : organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale, 2016, 36(6): 490
- [9] Franklin K A, Lindberg E. Obstructive sleep apnea is a common disorder in the population - a review on the epidemiology of sleep apnea[J]. J Thorac Dis, 2015, 7(8): 1311
- [10] Drager L F, Brunoni A R, Jenner R, et al. Effects of CPAP on body weight in patients with obstructive sleep apnoea: a meta-analysis of randomised trials[J]. Thorax, 2015, 70(3): 258
- [11] Hayakawa S, Ohashi K, Shibata R, et al. Association of Circulating Follistatin-Like 1 Levels with Inflammatory and Oxidative Stress Markers in Healthy Men[J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0153619
- [12] Sylva M, Li V S, Buffing A A, et al. The BMP antagonist follistatin-like 1 is required for skeletal and lung organogenesis[J]. PLoS one, 2011, 6(8): e22616
- [13] Liu X, Liu Y, Yang Z, et al. Cell type specific expression of Follistatin-like 1 (Fstl1) in mouse embryonic lung development[J]. J Mol Histol, 2018
- [14] Mattiotti A, Prakash S, Barnett P, et al. Follistatin-like 1 in development and human diseases[J]. CMLS, 2018, 75(13): 2339
- [15] Fang Y, Zhang S, Li X, et al. Follistatin like-1 aggravates silica-induced mouse lung injury[J]. Sci Reports, 2017, 7(1): 399 (2018-11-27 收稿)