

· 基础研究 ·

双调蛋白对小鼠损伤肺组织的修复作用及机制研究

田书宁^{1,2} 蒙臣³ 罗向红³ 王贤裕³

¹ 锦州医科大学十堰市太和医院研究生培养基地(湖北医药学院附属医院), 十堰 442000; ² 江门市中心医院(中山大学附属江门医院)麻醉科, 江门 529099;

³ 十堰市太和医院麻醉科 湖北医药学院麻醉学研究所, 十堰 442000

通信作者: 王贤裕, Email: wxytj@126.com

【摘要】目的 探讨双调蛋白(amphiregulin, Areg)对急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)小鼠损伤肺组织的修复作用及机制。**方法** 使用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)气管滴注制作小鼠 ARDS 模型, 连续 7 d 提取支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)。将成年雄性 C57BL/6 小鼠用随机数字法分为 5 组($n=4$ /组):①空白组;② Areg 组(腹腔注射重组 Areg 蛋白);③ LPS+PBS 组;④ LPS+Areg 组;⑤ LPS+Anti-Areg 组(③④⑤组小鼠气管滴注 LPS, 30 min 后腹腔注射 PBS、重组 Areg 或 Areg 中和抗体)。于 ARDS 后 1、3、5、7 d 提取肺组织与 BALF, HE 染色评估肺组织病理变化, BCA 法检测 BALF 中总蛋白含量, ELISA 法检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6 (IL-6)、白介素-1 β (IL-1 β)与免疫球蛋白 M (IgM)浓度, Western Blot 检测表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、表面活性蛋白-C (surface proteins-C, SP-C)的表达情况, 免疫荧光检测肺组织 PCNA 与 SP-C 共表达情况。符合正态分布的计量资料多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用 LSD- t 检验。**结果** 与建模前相比 [(51.05 ± 2.47) pg/mL], ARDS 后小鼠肺组织中的 Areg 含量在第 1 天 [(71.97 ± 6.51) pg/mL, $P < 0.01$]与第 3 天 [(147.58 ± 7.56) pg/mL, $P < 0.01$]显著升高。在 ARDS 后第 1 天, LPS+PBS 组和 LPS+Areg 组出现明显肺组织间质水肿、中性粒细胞浸润和肺泡结构塌陷, 且损伤程度无明显差异。在第 3、5、7 天, 与 LPS+PBS 组相比, LPS+Areg 组的肺组织病理损伤情况均有明显好转, 而 LPS+Anti-Areg 组的损伤情况却更为严重。与空白组相比, LPS+PBS 组小鼠 BALF 中总蛋白、IgM、中性粒细胞数量、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 均有明显升高, Areg 处理显著降低了这些指标的水平。LPS+Areg 组 PCNA (1.34 ± 0.10)、SP-C (1.48 ± 0.10)、p-EGFR (0.92 ± 0.032)的表达水平较 LPS+PBS 组 [(0.88 ± 0.03)], (1.06 ± 0.15), (0.68 ± 0.03), $P < 0.05$]上调, 且 LPS+Areg 组 PCNA 及 SP-C 双阳性细胞较 LPS+PBS 组明显增多, 而 LPS+Anti-Areg 组则有所下降。**结论** Areg 可以通过激活 EGFR 通路增加肺泡 II 型上皮细胞的增殖, 从而促进 ARDS 损伤肺组织的修复。

【关键词】 急性呼吸窘迫综合征; 细菌脂多糖; 双调蛋白; 表皮生长因子; 肺损伤修复

基金项目: 国家重点研发项目(2018YFC2001903); 国家自然科学基金(81700082); 湖北省自然科学基金项目(2017CFB387)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2022.01.010

The repair effect and mechanism of amphiregulin on injured lung tissue in mice

Tian Shuning^{1,2}, Meng Chen³, Luo Xianghong³, Wang Xianyu³

¹ Postgraduate Training Basement of Jinzhou Medical University, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China; ² Department of Anesthesiology, Jiangmen Central Hospital Affiliated Jiangmen Hospital of Sun Yat-sen University, Jiangmen 529099, China; ³ Department of Anesthesiology, Taihe Hospital, Institute of Anesthesiology, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China

Corresponding author: Wang Xianyu, Email: wxytj@126.com

【 Abstract 】 Objective To investigate the repair effect of amphiregulin (Areg) on injured lung tissue in mice with acute respiratory distress syndrome (ARDS) and its underlying mechanism. **Methods** The ARDS mouse model was made by tracheal infusion of lipopolysaccharide (LPS), and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was extracted for 7 consecutive days. Adult male C57BL/6 mice were randomly (random number) divided into 5 groups ($n=4$ per group): (1) Control group; (2) Areg group: mice were treated intraperitoneally (i.p.) with recombinant Areg; (3) LPS+PBS group; (4) LPS+Areg group; and (5) LPS+Anti-Areg group; mice were instilled with LPS, then were injected i.p. with PBS, Areg or Areg neutralization antibody (Anti-Areg) 30 min later. Lung tissue and BALF were extracted at day 1, 3, 5 and 7 after ARDS. HE staining was used to evaluate the pathological changes of lung tissues. The total protein content in BALF was detected by BCA method, and the concentrations of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-1 β and immunoglobulin M (IgM) were determined by ELISA method. The phosphorylated levels of epidermal growth factor receptor (EGFR) and expressions of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and surface proteins-C (SP-C) were tested by Western blot. The immunofluorescence was used to detect the co-expression of PCNA and SP-C in lung tissues. One-way analysis of variance was used to compare the mean values of normally distributed measurement data between groups. Comparisons between groups were performed using the least significant difference t -test. **Results** Compared with that at before modeling [(51.05 \pm 2.47) pg/mL], Areg concentrations were increased significantly at day 1 [(71.97 \pm 6.51) pg/mL; $P<0.01$] and day 3 [(147.58 \pm 7.56) pg/mL, $P<0.01$] in the BALF after ARDS. At day 1 after ARDS, there were significant interstitial edema, neutrophil infiltration and alveolar collapse in the LPS+PBS group and LPS+Areg group. Compared with the LPS+PBS group at day 3, 5 and 7, the pathological changes of lung tissues were notably improved in the LPS+Areg group, while were more serious in the LPS+Anti-Areg group. Compared with the control group, the LPS+PBS group had higher levels of neutrophil number, total protein, IgM, TNF- α , IL-1 β , and IL-6. However, Areg treatment significantly reduced the levels of these indicators. Moreover, the expressions of PCNA (1.34 \pm 0.10), SP-C (1.48 \pm 0.10) and p-EGFR (0.92 \pm 0.032) in the LPS+Areg group were significantly up-regulated compared with those in the LPS+PBS group (0.88 \pm 0.03, 1.06 \pm 0.15, and 0.68 \pm 0.03, all $P<0.01$). And compared with the LPS+PBS group, PCNA and SP-C double positive cells were significantly increased in the LPS+Areg group, but decreased in the LPS+Anti-Areg group. **Conclusions** Areg enhances the proliferation of alveolar type II epithelial cells by activating EGFR pathway, therefore promotes the repair of lung tissues during ARDS development.

【 Keywords 】 Acute respiratory distress syndrome; Lipopolysaccharide; Amphiregulin; Epidermal growth factor; Lung injury repair

Fund program: National Key Research and Development Program of China (2018YFC2001903) ; National Natural Science Foundation of China (81700082) ; Natural Science Foundation of Hubei Province (2017CFB387)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2022.01.010

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是一种重症呼吸系统疾病, 病死率仍高达 40%^[1], 根据病情进展可划分为急性期与恢复期^[2]。除了对急性期损伤肺组织保护作用的研究^[3-8], 近年来对修复期肺组织的重构再生也越来越受到重视^[9-12]。研究表明, 促进肺组织再生是 ARDS 后肺功能恢复的先决条件^[13-14]。笔者之前的研究发现, 在小鼠 ARDS 模型中, 有一种表皮生长因子——双调蛋白 (amphiregulin, Areg) 在肺损伤急性期大量表达, 且能减少肺组织的损伤程度, 具

有显著的肺组织保护作用, 这主要是因为 Areg 能够抑制肺泡上皮细胞凋亡而减轻组织损伤^[15]。研究发现, 除了抗凋亡作用, Areg 还能促进细胞增殖分化, 加快多种组织在损伤后的修复速度^[16-22]。然而, 在 ARDS 恢复期, Areg 是否能够促进损伤肺组织的修复重建至今仍不清楚。本实验采用细菌内毒素诱发的小鼠 ARDS 模型, 观察 Areg 在恢复期是否能通过加速炎症反应消退、肺泡屏障恢复、肺泡结构重建而促进肺组织的修复, 以期为临床上 ARDS 的治疗提供新的理论依据和实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

成年雄性 C57BL/6 小鼠 [购于由北京维通利华实验动物有限公司, 实验动物许可证编号: SCXK (京) 2016-0006], 体重 20~25 g, 鼠龄 6~8 周, 实验在 SPF 环境下, 控制室温 (23 ± 1) °C, 湿度 (65 ± 5) %, 光照时间和黑暗时间各 12 h。本实验使用重组小鼠 Areg (美国 R&D systems 公司)、脂多糖 (美国 Sigma 公司)、BCA 试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司)、IgM、TNF- α 、IL-6、IL-1 β ELISA 检测试剂盒 (欣博盛有限公司)、Areg ELISA 检测试剂盒 (美国 R&D systems 公司)、SDE-PAGE 配胶试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司)、抗表皮生长因子 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 抗体 (英国 Abcam 公司)、抗磷酸化 - 表皮生长因子 (p-EGFR) 抗体 (美国 CST 公司)、抗 β -actin 抗体 (武汉安特捷生物技术有限公司)、山羊抗兔 IgG 抗体 (美国 Proteintech 公司)、抗增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 抗体 (美国 CST 公司)、抗表面活性蛋白 -C (surface proteins-C, SP-C) 抗体 (英国 Abcam 公司)、ECL 化学发光试剂盒 (康为世纪生物科技有限公司)。

1.2 实验分组与模型制备

相关实验操作程序已取得湖北医药学院实验动物使用与伦理管理委员会批准 [批准号: 湖北医药学院动 (福) 第 2020—实 022 号]。采用随机数字法将小鼠分为以下 5 组, 每组 4 只: ① 对照组 (Control 组), 在小鼠主支气管滴注 PBS (2 mL/kg); ② Areg 组, 在小鼠主支气管滴注 PBS (2 mL/kg), 30 min 后腹腔注射重组 Areg 蛋白 (recombinant amphiregulin protein, rmAreg) (5 μ g/只); ③ LPS+PBS 组, 在小鼠主支气管滴注 LPS (3 mg/kg), 30 min 后腹腔注射 PBS (2 mL/kg); ④ LPS+Areg 组, 在小鼠主支气管滴注 LPS (3 mg/kg), 30 min 后腹腔注射 rmAreg (5 μ g/只); ⑤ LPS+Anti-Areg 组, 在小鼠主支气管滴注 LPS (3 mg/kg), 30 min 后腹腔注射 Areg 中和抗体 (amphiregulin neutralizing antibody, Anti-Areg) (50 μ g/只)。每隔 24 h 经同一路径重复给予相同剂量的同种试剂, 分别于 ARDS 后 1、3、5、7 d 处死小鼠, 取肺组织及肺泡灌洗液 (bronchoalveolar

lavage fluid, BALF)。此外, 气管内插管且滴注 LPS 后不进行任何处理, 分别于 0~7 d 处死小鼠, 取 BALF 测 Areg 浓度变化。

1.3 损伤肺组织评分

取小鼠左肺, 经 4% 多聚甲醛固定、酒精脱水、石蜡包埋、切片、病理 HE 染色后观察各组小鼠肺组织病理学改变, 随机选择 20 个镜下视野, 然后进行肺损伤程度的评分, 评判方法见表 1。

表 1 肺损伤评分表
Table 1 Lung injury score

指标	每个视野的评分		
	0	1	2
A 肺泡中的中性粒细胞数	0	1~5	>5
B 肺间质的中性粒细胞数	0	1~5	>5
C 透明膜数	0	1	>1
D 肺泡中的蛋白碎片	0	1	>1
E 肺间隔厚度	<2 倍	2~4 倍	>4 倍

注: 肺损伤评分 = [(20 × A) + (14 × B) + (7 × C) + (7 × D) + (2 × E)] / (视野数目 × 100)

1.4 BCA 法检测

充分暴露小鼠肺组织, 用 1 mL PBS 反复冲洗肺组织 3 遍得到小鼠 BALF, 于 4 °C 下离心 5 min (800 g), 取上清液, 在酶标仪上 (562 nm) 测得吸光度, 根据标准品的浓度和 OD_{562} 制作标准曲线, 从而计算各个样本的蛋白浓度。

1.5 ELISA 法检测

取每组小鼠 BALF 离心得到上清液后, 严格遵循 ELISA 双抗夹心法检测 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IgM 含量。

1.6 Western 印记检测蛋白表达情况

取每组小鼠的右肺制得蛋白上样液, 将其加入 10% SDS-PAGE 凝胶中进行电泳; 在 PVDF 膜上进行转膜; 5% 脱脂牛奶进行封闭 2 h; 将封闭好的 PVDF 膜分别放入 p-EGFR 抗体 (1 : 1 000)、EGFR 抗体 (1 : 1 000)、 β -actin (1 : 1 000)、PCNA (1 : 1 000) 及 SP-C (1 : 1 000) 中, 置于 4 °C 冰箱 16 h 进行孵育; TBST 清洗后将条带用辣根过氧化物酶标记二抗 (1 : 10 000) 室温摇床上孵育 1 h; TBST 再次清洗后 ECL 进行显影。

1.7 免疫荧光检测蛋白表达情况

取每组小鼠肺组织石蜡切片, 60 °C 烘片 30 min; 二甲苯脱蜡; 降浓度梯度水化; 微波炉中进行抗原修复 (高火 5 min, 中火 5 min), 0.1% Triton-100 破膜 40 min, BSA 封闭 1 h, 在封闭

好的切片上滴加 PCNA(1 : 500)及 SP-C(1 : 500)中,置于 4 ℃ 冰箱 16 h 进行孵育;PBST 清洗后,分别滴加荧光二抗置于湿盒中避光孵育 1 h (1 : 1 000);PBST 清洗后 Dapi 避光 5 min;再次清洗后滴加抗荧光淬灭剂并进行封片,荧光显微镜下观察蛋白表达情况。

1.8 统计学方法

采用 Graphpad 7.04 软件对实验数据进行分析处理。符合正态分布的计量资料采用均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用方差分析,多组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

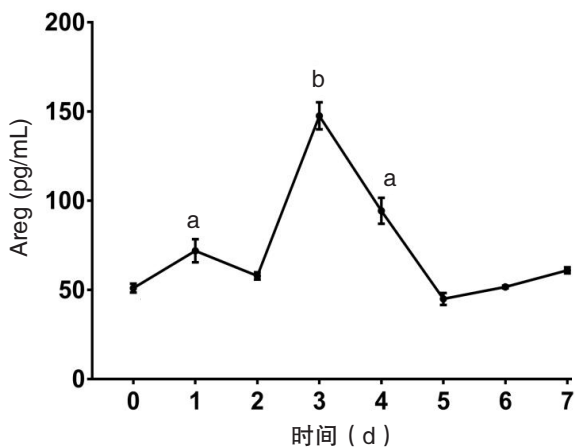
2 结果

2.1 ARDS 发生后 7 d Areg 在肺组织中的浓度变化

与正常小鼠相比,给予 LPS 后第 1 天,ARDS 小鼠 BALF 中 Areg 浓度显著增高 ($P < 0.05$),然后在第 2 天恢复正常。到第 3 天时,Areg 浓度再次显著升高 ($P < 0.01$),且比第 1 天升高更加明显,到第 5 天又降低至正常水平,见图 1。

2.2 Areg 对 ARDS 小鼠 7 d 内肺损伤病理学变化的影响

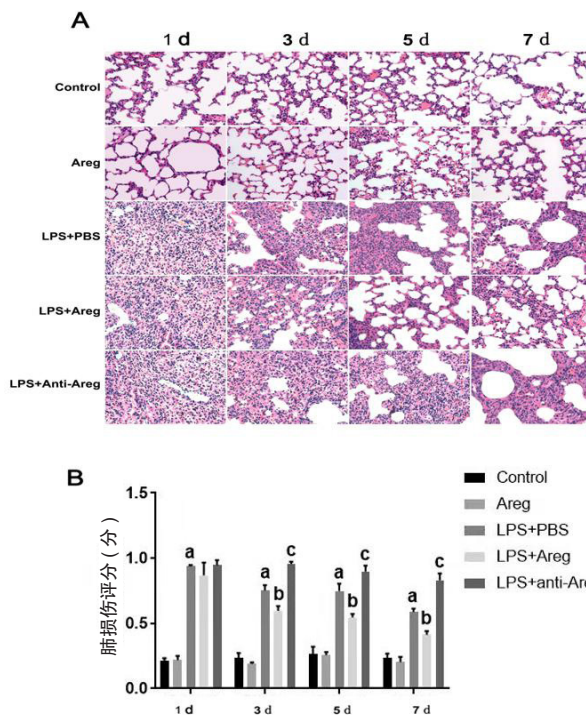
如图 2 所示,在 ARDS 第 1 天,对照组与 Areg 组小鼠肺组织结构正常;LPS+PBS 组的肺组织间隔显著增厚,中性粒细胞浸润明显,蛋白质碎片及透明膜形成增加,呈现严重肺损伤。与 LPS+PBS 组相比,LPS+Areg 组及 LPS+Anti-Areg 组的肺组织结构及损伤评分无差异。在第 3、5、7 天,与 LPS+PBS 组相比,LPS+Areg 组的肺损伤病理



Areg 为双调蛋白;与 0 d 比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

图 1 ARDS 后小鼠 BALF 中 Areg 的浓度变化

Fig 1 The changes of Areg concentration in BALF in ARDS mice



A 为 ARDS 各组小鼠肺组织 HE 染色 ($\times 400$), B 为各组 ARDS 后 1、3、5、7 d 肺损伤评分;与对照组相比, ^a $P < 0.05$;与 LPS+PBS 组相比, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.05$; $n = 4$ /组

图 2 Areg 对 ARDS 小鼠 7 d 内肺损伤病理学变化及评分的影响
Fig 2 The effect of Areg in lung injury and the associated score in mice at day 7 after ARDS

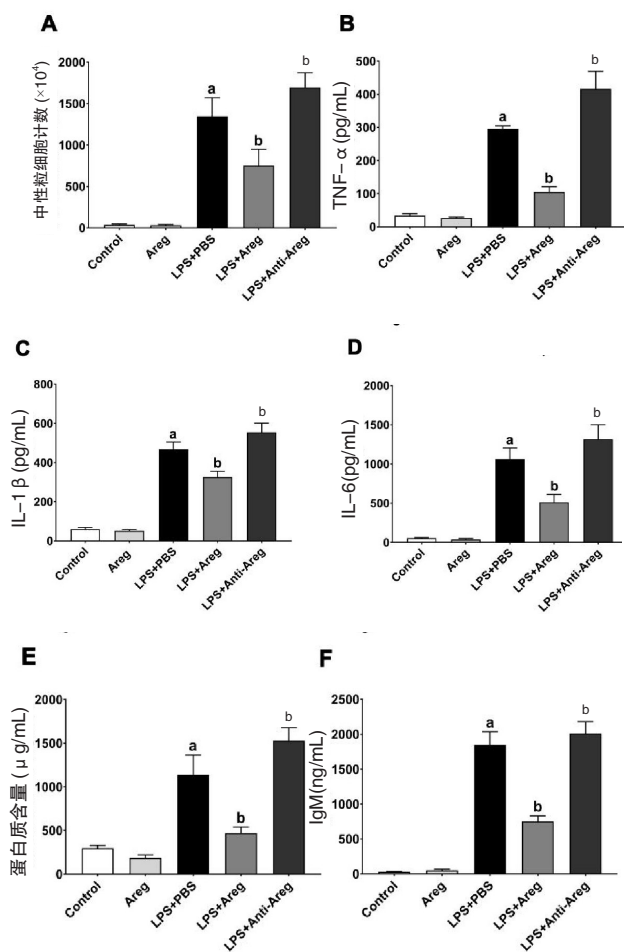
情况与评分均有明显好转 (均 $P < 0.05$),而 LPS+Anti-Areg 组的肺损伤却更为严重 (均 $P < 0.05$)。

2.3 Areg 对 ARDS 小鼠第 3 天肺组织炎症反应与渗透性的影响

与对照组相比,LPS+PBS 组的中性粒细胞数量增加,TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 浓度升高,BALF 中总蛋白与 IgM 含量增加。rmAreg 干预显著减少了中性粒细胞的数量 ($P < 0.01$),降低了 TNF- α ($P < 0.01$)、IL-1 β ($P < 0.01$)、IL-6 ($P < 0.001$)、总蛋白 ($P < 0.01$) 与 IgM ($P < 0.001$) 的水平;而使用中和抗体 (Anti-Areg) 可增加中性粒细胞数量、炎症因子与总蛋白含量,见图 3。

2.4 Areg 促进 ARDS 第 5 天肺组织中 SP-C 与 PCNA 的蛋白表达

ARDS 后第 5 天,与对照组相比,LPS+PBS 组的 PCNA 表达量明显升高 ($P < 0.01$)。与 LPS+PBS 组相比,Areg 使 PCNA 的表达量进一步升高 ($P < 0.05$),而 Anti-Areg 对之无明显影响。与之相似,与 LPS+PBS 组相比,LPS+Areg 组的 SP-C 表达量显著升高 ($P < 0.01$),LPS+Anti-Areg 组的 SP-C 表达差异无统计学意义,见图 4。



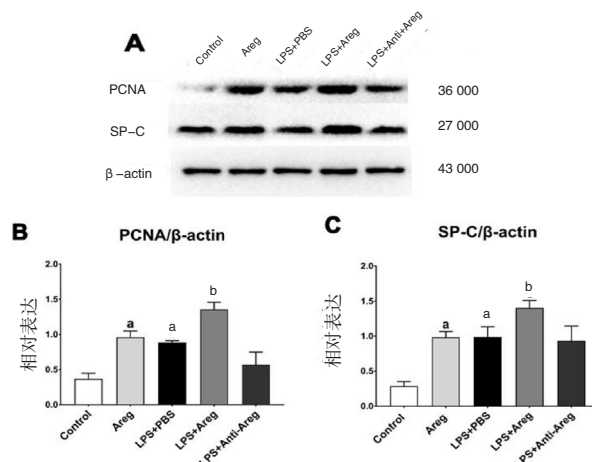
Areg 为双调蛋白, LPS 为脂多糖, PBS 为磷酸缓冲盐溶液, Anti-Areg 为双调蛋白中和抗体, IL 为白介素, IgM 为免疫球蛋白。A 为 BALF 中性粒细胞计数; B 为 BALF 中 TNF- α 含量; C 为 BALF 中 IL-1 β 含量; D 为 BALF 中 IL-6 含量; E 为 BALF 中总蛋白含量; F 为 BALF 中 IgM 含量; 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与 LPS+PBS 组相比, ^b $P < 0.05$; $n = 4/$ 组

图 3 Areg 对 ARDS 小鼠第 3 天肺组织炎症反应与渗透性的影响
Fig 3 The effect of Areg in inflammation and permeability of lung tissues in mice at day 3 after ARDS

ARDS 后第 5 天, 与对照组相比, LPS+PBS 组的 PCNA+SP-C 双表达细胞 ($P < 0.01$) 含量明显升高。与 LPS+PBS 组相比, Areg 使 PCNA 和 SP-C 双表达细胞的表达量进一步升高 ($P < 0.01$), 而 Anti-Areg 则有所下降 ($P < 0.01$), 见图 5。

2.5 Areg 增强 ARDS 小鼠肺组织中 EGFR 的活化水平

ARDS 第 3 天, 与对照组相比, Areg 组与 LPS+PBS 组肺组织中 EGFR 的磷酸化水平均有升高 ($P < 0.05$)。与 LPS+PBS 组相比, Areg 处理使 EGFR 磷酸化水平进一步升高 ($P < 0.01$), 而 Anti-Areg 则降低了 p-EGFR 的表达 ($P < 0.05$), 见图 6。



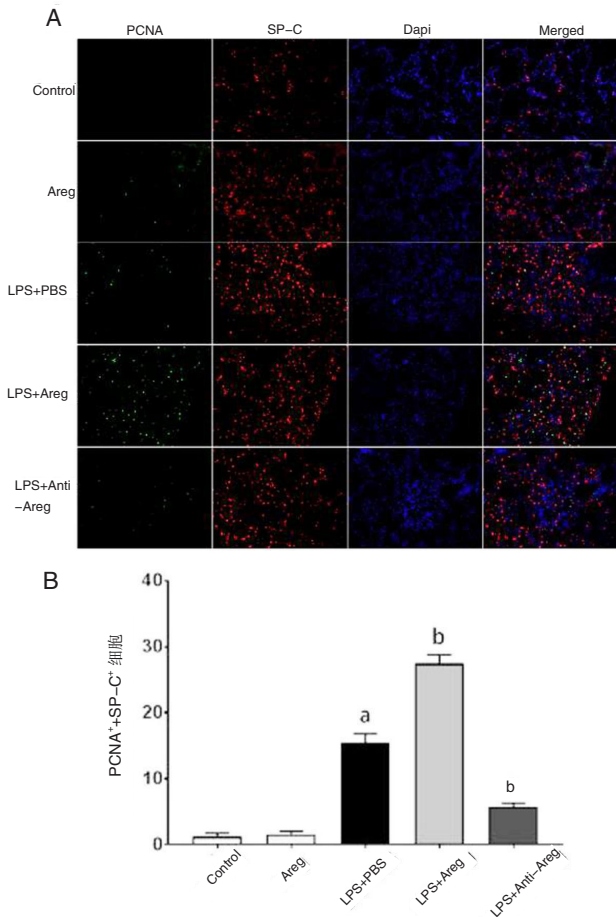
Areg 为双调蛋白, LPS 为脂多糖, PBS 为磷酸缓冲盐溶液, Anti-Areg 为双调蛋白中和抗体, PCNA 为增殖细胞核抗原, SP-C 为表面活性蛋白-C。A 为 ARDS 后第 5 天, 肺组织中蛋白表达情况; B 为 PCNA 的相对表达; C 为 SP-C 的相对表达; 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与 LPS+PBS 组相比, ^b $P < 0.05$; $n = 4/$ 组

图 4 Areg 促进 ARDS 第 5 天肺组织中 PCNA 及 SP-C 的表达
Fig 4 Areg promoted the expressions of PCNA and SP-C in lung tissues at day 5 after ARDS

3 讨论

本次研究采用了经典的 LPS-ARDS 模型, 主要通过细菌内毒素造成肺泡上皮细胞的凋亡, 肺泡-毛细血管屏障的破坏, 蛋白质、炎症因子等渗出。笔者之前的研究发现, 在小鼠 ARDS 急性期, Areg 在肺组织中有大量表达, 且可以显著减轻肺组织的损伤程度^[23]。然而, Areg 对急性肺损伤后的组织修复作用仍不清楚。此次研究发现, Areg 可以激活 EGFR 信号通路, 促进小鼠肺泡上皮细胞增殖, 加速损伤后的肺组织炎症反应消退与结构恢复。

ARDS 发生后, 肺组织会经历急性期与恢复期。Johnston 等^[24]的研究发现, 小鼠肺损伤发生后 2~3 d, ARDS 由急性期发展为恢复期。在未损伤小鼠肺泡灌洗液中存在 Areg, 即 Areg 在机体内存在基础分泌。笔者之前的实验已证实, 早在细菌内毒素诱发肺损伤 6 h 内, 肺泡中的 Areg 表达就有显著升高, 到 12 h 时其分泌水平达到高峰, 之后逐渐降低^[15]。但之前对 Areg 的表达检测只限定于 24 h 内。本研究对 Areg 的检测延长到 ARDS 发生后 7 d, 结果发现, 除第 1 天表达升高外, 肺组织中的 Areg 水平在肺损伤后第 3 天再次升高, 到第 5 天才降低至正常水平。由此可见, 在细菌内毒素引发 ARDS 后, 肺组织中的 Areg 表达出现两次高峰, 第一次出现



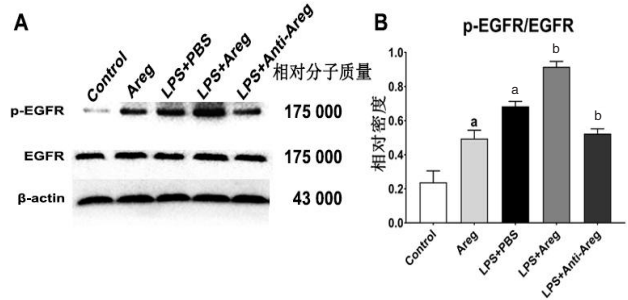
Areg 为双调蛋白, LPS 为脂多糖, PBS 为磷酸缓冲盐溶液, Anti-Areg 为双调蛋白中和抗体, PCNA 为增殖细胞核抗原 (绿色荧光), SP-C 为表面活性蛋白 -C (红色荧光), Dapi 为 4,6-二脒基-2-苯基吲哚 (蓝色荧光)。A 为 ARDS 后第 5 天, 肺组免疫荧光表达情况 (×400); B: PCNA⁺SP-C⁺ 细胞双表达情况; 与对照组相比, ^a*P*<0.05; 与 LPS+PBS 组相比, ^b*P*<0.05; *n*=4/ 组

图 5 Areg 促进 ARDS 第 5 天肺组织中 PCNA 及 SP-C 的表达 (免疫荧光检测)

Fig 5 Areg promoted the expressions of PCNA and SP-C in lung tissues at day 5 after ARDS by immunofluorescence

在肺损伤急性期, 第二次出现在 3 d 后的恢复期, 提示在恢复期 Areg 很可能也会对肺组织产生重要作用。

为研究 Areg 对肺损伤恢复的影响, 本实验于内毒素诱发小鼠肺损伤 30 min 后开始给予外源性 Areg。结果发现, ARDS 发生后给予 Areg (后处理) 并不能降低 1 d 时肺组织的病理损伤程度、炎症因子水平与肺水蛋白浓度, 说明 Areg 后处理不能减轻 ARDS 的急性期肺损伤。本研究结果与 Areg 减轻 ARDS 肺损伤的研究不同, 这可能是因为在之前的研究中, Areg 是在肺损伤发生前 30 min 就注入小鼠体内, 属于 Areg 预处理^[15], 而本研究采用



Areg 为双调蛋白, LPS 为脂多糖, PBS 为磷酸缓冲盐溶液, Anti-Areg 为双调蛋白中和抗体, EGFR 为表皮生长因子受体, p-EGFR 为磷酸化表皮生长因子受体。A 为 ARDS 后第 3 天, 肺组织中 EGFR 活化情况; B 为 p-EGFR 的相对密度; 与对照组相比, ^a*P*<0.05; 与 LPS+PBS 组相比, ^b*P*<0.05; *n*=4/ 组

图 6 Areg 增强 ARDS 第 3 天肺组织中 EGFR 磷酸化的表达
Fig 6 Areg enhanced the expression of phosphorylated EGFR in lung tissues at day 3 after ARDS

的是 Areg 后处理。由此可以推断, 只有 Areg 预处理可以通过激活 EGFR-Akt 信号通路抑制 TNF- α 死亡信号通路, 进而减轻急性肺损伤, 而 Areg 后处理不能抑制 ARDS 损伤后激活的 TNF- α 信号通路, 故对 ARDS 急性期的肺组织并没有明显的保护作用。因此, 本研究在内毒素诱导 ARDS 发生后将外源性 Areg 注入小鼠体内, 确保了各组 ARDS 小鼠在急性期的肺损伤程度一致。

ARDS 肺组织在急性损伤后的修复伴随着炎症反应消退、肺组织渗透性降低与病理结构改善^[24]。本实验结果显示, ARDS 发生后持续给予 Areg (1 次/d), 在第 3 天时, 肺泡中 TNF- α 、IL-6 与 IL-1 β 的表达量显著降低, 肺泡中 IgM 浓度与肺水含量减少; 在第 5 天时, 肺泡结构的再生与形成也更加明显。此外, 本研究还使用 Areg 的中和抗体 (Anti-Areg) 来抑制内源性 Areg 的作用, 结果显示 Anti-Areg 抑制了炎症因子降低、肺水蛋白减少与肺泡结构重建。因此, 这些实验结果说明 Areg 能够促进 ARDS 损伤肺组织的修复。之前已有研究报道了 Areg 能促进皮肤^[17-18]、角膜^[19]、肌肉^[16,20-21]、肾脏^[22] 的损伤愈合, 本研究进一步证实了 Areg 对受损的肺组织也有明显的修复功能。

研究已证实, 在肺泡的再生恢复过程中, 肺泡 II 型上皮细胞 (alveolar epithelium type II, AT II) 是主要的功能祖细胞, 不仅具有增殖能力, 还能分化为 AT I 来构建肺泡-毛细血管屏障, 维持肺组织功能, 因此 AT II 的增殖水平升高能明显促进肺泡结构再生与功能恢复^[25]。AT II 表面含有多种特异性活性蛋白, 其中 SP-C 的表达占比高达 65%,

故常用 SP-C 的表达情况来判断肺组织中 AT II 的数量^[26-27]。鉴于 Areg 处理后第 5 天, 损伤肺组织的修复有显著改善, 本实验检测了 ARDS 后第 5 天肺组织的 SP-C 含量, 同时检测增殖信号 PCNA 表达。结果显示, 外源性 Areg 显著提高了 SP-C 与 PCNA 的表达水平, 这提示 Areg 能明显促进 AT II 的增殖。同样通过对损伤后第 5 天各组肺组织免疫荧光学的检测, 发现 Areg 促进肺的 PCNA 及 SP-C 的双表达, 再次提示 Areg 可以促进 AT II 的增殖情况。之前有研究报道, Areg 可以通过调节支气管上皮细胞增殖分化, 减轻肺组织纤维化^[28-30]。本实验证明 Areg 能通过促进 AT II 细胞增殖, 促进 ARDS 肺泡结构的恢复。

EGFR 是 Areg 的唯一受体, 广泛存在于多种脏器组织(包括肺组织)中。其活化形式为磷酸化 EGFR (p-EGFR), 除抑制细胞凋亡外, 还能促进细胞的增殖和迁移, 从而加速损伤组织的修复^[31]。已有研究证实, EGFR 通路活化可以促进肠道上皮细胞、肾小管上皮细胞与心肌细胞的增殖修复^[32-34], 还可以通过促进皮肤血管的生成及角质细胞的增殖而促进皮肤的愈合^[35]。在本实验中, 由于肺组织内 Areg 的表达水平再次升高出现于 ARDS 后第 3 天, 且 Areg 处理后第 3 天损伤肺组织有了明显的好转, 因此本实验检测损伤第 3 天肺组织的 EGFR 活化情况。结果显示, 给予外源性 Areg 显著增加了肺组织内 EGFR 的磷酸化水平, 而 Anti-Areg 则对 EGFR 的活化有明显的抑制作用。结合之前的实验结果, 可以得出 EGFR 通路的活化介导 Areg 促进 ARDS 肺组织修复的作用。

综上所述, Areg 在 ARDS 恢复期通过激活 EGFR 通路, 促进 AT II 细胞增殖, 从而促进肺组织内炎症反应消退、肺泡屏障功能恢复与肺泡结构重建。因此, 本实验证明在急性肺损伤中, Areg 后处理具有明显的组织修复功能, 为临床上 ARDS 恢复期的治疗提供了理论依据。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 田书宁: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据、起草文章; 蒙臣: 酝酿和设计实验、分析/解释数据、对文章的知识性内容作批评性审阅、工作支持; 罗向红、王贤裕: 对文章的知识性内容作批评性审阅, 行政、技术或材料支持

参 考 文 献

- [1] Fan E, Brodie D, Slutsky AS. Acute respiratory distress syndrome[J]. JAMA, 2018, 319(7): 698. DOI:10.1001/jama.2017.21907.
- [2] Huang XF, Xiu HQ, Zhang SF, et al. The role of macrophages in the pathogenesis of ALI/ARDS[J]. Mediators Inflamm, 2018, 2018: 1264913. DOI:10.1155/2018/1264913.
- [3] 郑君刚, 侯金超, 张凯, 等. 苏拉明对脂多糖致小鼠急性肺损伤的防治作用[J]. 中华急诊医学杂志, 2015, 24(12): 1412-1416. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2015.12.019.
- [4] 徐道剑, 张琳, 黎俊, 等. Wnt/ β -Catenin 信号通路在骨髓间充质干细胞治疗内毒素致急性肺损伤中的作用[J]. 中华急诊医学杂志, 2015, 24(9): 994-999. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2015.09.016.
- [5] 王娜, 朱哲, 赵敏. 不规则趋化因子在百草枯致大鼠急性肺损伤过程中的表达[J]. 中华急诊医学杂志, 2016, 25(3): 288-293. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2016.03.006
- [6] 蒋云飞, 孙昊, 张劲松, 等. TLR3/NF- κ B 信号通路在百草枯致急性肺损伤的研究[J]. 中华急诊医学杂志, 2018, 27(6): 631-637. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2018.06.013.
- [7] 宋佳, 王春霞, 熊熙, 等. 甲基强的松龙抑制 STAT3-ERK1/2 通路改善脂多糖诱导急性肺损伤[J]. 中华急诊医学杂志, 2019, 28(10): 1266-1271. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2019.10.017.
- [8] 郑来赞, 陈隆望, 胡系意, 等. 姜黄素上调线粒体融合蛋白 2 减轻脓毒症小鼠急性肺损伤[J]. 中华急诊医学杂志, 2020, 29(1): 58-64. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2020.01.009.
- [9] Kotton DN, Morrisey EE. Lung regeneration: mechanisms, applications and emerging stem cell populations[J]. Nat Med, 2014, 20(8): 822-832. DOI:10.1038/nm.3642.
- [10] Chen F, Fine A. Stem cells in lung injury and repair[J]. Am J Pathol, 2016, 186(10): 2544-2550. DOI:10.1016/j.ajpath.2016.05.023.
- [11] Puttur F, Gregory LG, Lloyd CM. Airway macrophages as the guardians of tissue repair in the lung[J]. Immunol Cell Biol, 2019, 97(3): 246-257. DOI:10.1111/imcb.12235.
- [12] 董亮, 李朗, 陈意喆, 等. 调控 Hippo 信号通路促进间充质干细胞修复急性呼吸窘迫综合征肺损伤[J]. 中华急诊医学杂志, 2019, 28(7): 855-862. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2019.07.011.
- [13] Quantius J, Schmoldt C, Vazquez-Armendariz AI, et al. Influenza virus infects epithelial stem/progenitor cells of the distal lung: impact on Fgfr2b-driven epithelial repair[J]. PLoS Pathog, 2016, 12(6): e1005544. DOI:10.1371/journal.ppat.1005544.
- [14] Vaughan AE, Brumwell AN, Xi Y, et al. Lineage-negative progenitors mobilize to regenerate lung epithelium after major injury[J]. Nature, 2015, 517(7536): 621-625. DOI:10.1038/nature14112.
- [15] Meng C, Wang SL, Wang X, et al. Amphiregulin inhibits TNF- α -induced alveolar epithelial cell death through EGFR signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 125: 109995.

- DOI:10.1016/j.biopha.2020.109995.
- [16] Schiaffino S, Pereira MG, Ciciliot S, et al. Regulatory T cells and skeletal muscle regeneration[J]. FEBS J, 2017, 284(4): 517-524. DOI:10.1111/febs.13827.
- [17] Zaiss DM, Minutti CM, Knipper JA. Immune- and non-immune-mediated roles of regulatory T-cells during wound healing[J]. Immunology, 2019, 157(3): 190-197. DOI:10.1111/imm.13057.
- [18] Minutti CM, Modak RV, Macdonald F, et al. A macrophage-pericyte axis directs tissue restoration via amphiregulin-induced transforming growth factor beta activation[J]. Immunity, 2019, 50(3): 645-654.e6. DOI:10.1016/j.immuni.2019.01.008.
- [19] Shu DY, Hutcheon AEK, Zieske JD, et al. Epidermal growth factor stimulates transforming growth factor-beta receptor type II expression in corneal epithelial cells[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 8079. DOI:10.1038/s41598-019-42969-2.
- [20] Jin RM, Warunek J, Wohlfert EA. Therapeutic administration of IL-10 and amphiregulin alleviates chronic skeletal muscle inflammation and damage induced by infection[J]. Immunohorizons, 2018, 2(5): 142-154. DOI:10.4049/imunohorizons.1800024.
- [21] Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D, et al. A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair[J]. Cell, 2013, 155(6): 1282-1295. DOI:10.1016/j.cell.2013.10.054.
- [22] Sakai R, Ito M, Komai K, et al. Kidney GATA3+ regulatory T cells play roles in the convalescence stage after antibody-mediated renal injury[J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(5): 1249-1261. DOI:10.1038/s41423-020-00547-x.
- [23] Xu Y, Meng C, Liu G, et al. Classically activated macrophages protect against lipopolysaccharide-induced acute lung injury by expressing amphiregulin in mice[J]. Anesthesiology, 2016, 124(5): 1086-1099. DOI:10.1097/aln.0000000000001026.
- [24] Johnston LK, Rims CR, Gill SE, et al. Pulmonary macrophage subpopulations in the induction and resolution of acute lung injury[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012, 47(4): 417-426. DOI:10.1165/rmb.2012-0090OC.
- [25] Ding BS, Nolan DJ, Guo PP, et al. Endothelial-derived angiocrine signals induce and sustain regenerative lung alveolarization[J]. Cell, 2011, 147(3): 539-553. DOI:10.1016/j.cell.2011.10.003.
- [26] Desai TJ, Brownfield DG, Krasnow MA. Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer[J]. Nature, 2014, 507(7491): 190-194. DOI:10.1038/nature12930.
- [27] Zuo W, Zhang T, Wu DZ, et al. p63(+)/Krt5(+) distal airway stem cells are essential for lung regeneration[J]. Nature, 2015, 517(7536): 616-620. DOI:10.1038/nature13903.
- [28] Todd JL, Kelly FL, Nagler A, et al. Amphiregulin contributes to airway remodeling in chronic allograft dysfunction after lung transplantation[J]. Am J Transplant, 2020, 20(3): 825-833. DOI:10.1111/ajt.15667.
- [29] Poole JA, Nordgren TM, Heires AJ, et al. Amphiregulin modulates murine lung recovery and fibroblast function following exposure to agriculture organic dust[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2020, 318(1): L180-L191. DOI:10.1152/ajplung.00039.2019.
- [30] Nordgren TM, Heires AJ, Bailey KL, et al. Docosahexaenoic acid enhances amphiregulin-mediated bronchial epithelial cell repair processes following organic dust exposure[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2018, 314(3): L421-L431. DOI:10.1152/ajplung.00273.2017.
- [31] Kovacs E, Zorn JA, Huang YJ, et al. A structural perspective on the regulation of the epidermal growth factor receptor[J]. Annu Rev Biochem, 2015, 84: 739-764. DOI:10.1146/annurev-biochem-060614-034402.
- [32] Belle NM, Ji YB, Herbine K, et al. TFF3 interacts with LINGO2 to regulate EGFR activation for protection against colitis and gastrointestinal helminths[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 4408. DOI:10.1038/s41467-019-12315-1.
- [33] Rayego-Mateos S, Rodrigues-Diez R, Morgado-Pascual JL, et al. Role of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its ligands in kidney inflammation and damage[J]. Mediators Inflamm, 2018, 2018: 8739473. DOI:10.1155/2018/8739473.
- [34] Kirabo A, Ryzhov S, Gupte M, et al. Neuregulin-1 β induces proliferation, survival and paracrine signaling in normal human cardiac ventricular fibroblasts[J]. J Mol Cell Cardiol, 2017, 105: 59-69. DOI:10.1016/j.yjmcc.2017.03.001.
- [35] Uchiyama A, Nayak S, Graf R, et al. SOX2 epidermal overexpression promotes cutaneous wound healing via activation of EGFR/MEK/ERK signaling mediated by EGFR ligands[J]. J Invest Dermatol, 2019, 139(8): 1809-1820.e8. DOI:10.1016/j.jid.2019.02.004.

(收稿日期: 2021-05-25)

(本文编辑: 姜宇婷)