

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.10.004

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220128.1518.012.html\(2022-01-29\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220128.1518.012.html(2022-01-29))

IGF-1 促进肺泡上皮细胞衰老致肺纤维化进展的分子机制研究*

赫 琪¹,肖伟利¹,曹银芳¹,刘佳谊²,梁子红^{1△}

(1. 内蒙古自治区人民医院医学检验科,呼和浩特 010017;2. 内蒙古医科大学附属医院血液科,呼和浩特 010017)

[摘要] **目的** 探讨胰岛素样生长因子-1(IGF-1)在肺泡上皮细胞衰老致肺纤维化中的作用。**方法** 用博来霉素(BLM)构建小鼠肺纤维化模型,免疫组织化学观察 IGF-1 的表达变化。利用 IGF-1 刺激 A549 细胞株(72 h)建立细胞衰老模型,β-半乳糖苷酶染色观察衰老阳性细胞数量。免疫荧光观察 IGF-1 对 A549 细胞衰老关键蛋白 P16、P21 表达的影响。ELISA 法观察 IGF-1 刺激 A549 细胞后转化生长因子-β1(TGF-β1)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达变化。免疫印迹检测 IGF-1 对 A549 细胞转分化的影响。RT-PCR 检测 IGF-1 对下游信号通路中磷酸酰肌醇 3 激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(AKT)的影响。**结果** 与正常小鼠肺脏相比,IGF-1 在肺纤维化小鼠肺脏中广泛表达。与对照组相比,IGF-1 刺激 A549 细胞 72 h 后的衰老阳性细胞数量明显增多($P<0.05$),细胞衰老关键蛋白 P16、P21 表达也明显上调($P<0.05$)。IGF-1 刺激 A549 细胞 72 h 后,培养基中细胞衰老表型(SASP)主要成分 TGF-β1、MMP-9 的表达量要高于对照组($P<0.05$)。与对照组相比,IGF-1 使 A549 细胞发生了转分化现象,α-SMA、Collagen I 的表达升高($P<0.05$)。与对照组相比,IGF-1 明显增加 A549 细胞中 PI3K、AKT 的表达($P<0.05$)。**结论** IGF-1 是促进肺泡上皮细胞衰老致肺纤维化进展的重要因素,并且与激活 IGF-1/PI3K/AKT 信号通路相关。

[关键词] 肺纤维化;肺泡上皮细胞;细胞衰老;胰岛素样生长因子-1

[中图分类号] R563 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)10-1638-05

Molecular mechanism of IGF-1 promoting alveolar epithelial cells senescence for participating in pulmonary fibrosis progress*

HE Qi¹,XIAO Weili¹,CAO Yinfang¹,LIU Jiayi²,LIANG Zihong^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot, Inner Mongolia, 010017, China; 2. Department of Hematology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010017, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on alveolar epithelial cells senescence caused pulmonary fibrosis. **Methods** Bleomycin (BLM) was used to establish the mice pulmonary fibrosis model, and the expression change of IGF-1 was observed by immunohistochemistry. IGF-1 was used to stimulate A549 cell line (72 h) to establish the cell senescence model. The number of senescent positive cells was observed by β-galactosidase staining. The effect of IGF-1 on the expression of P16 and P21 was observed by immunofluorescence. The expression changes of transforming growth factor-1 (TGF-1) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) after IGF-1 stimulating A549 cells was observed by ELISA. The effect of IGF-1 on transdifferentiation of A549 cells was detected by Western blot. The effects of IGF-1 on PI3K and p-AKT in the downstream signaling pathway were detected by RT-PCR. **Results** Compared with the normal mice lung, IGF-1 was widely expressed in the lungs of BLM mice. Compared with the control group, the number of senescence positive cells after 72 h of IGF-1 stimulating A549 cells was significantly increased ($P<0.05$), and the expressions of cell senescence key proteins P16 and P21 were also significantly up-regulated ($P<0.05$). After IGF-1 stimulating A549 cells for 72 h, the expression levels of main components TGF-β1 and MMP-9 in the medium were higher than those in the control group ($P<0.05$). Compared with the control group, IGF-1 made the transdifferentiation phenomenon occurrence of A549 cells (EMT), and increase the α-SMA and Collagen I expression ($P<0.05$). Compared with the control group, IGF-1 significantly increased the expressions

* 基金项目:内蒙古自治区人民医院院内基金项目(MS202003063)。 作者简介:赫琪(1978—),副主任检验技师,硕士,主要从事器官衰老方面的研究。 △ 通信作者,E-mail:liangzihong2011@163.com。

of PI3K and p-AKT in A549 cells ($P < 0.05$). **Conclusion** IGF-1 is an important factor in promoting the aging of alveolar epithelial cells and the progression of pulmonary fibrosis, moreover which is related to the activation of IGF-1/PI3K/AKT signaling pathway.

[Key words] pulmonary fibrosis; alveolar epithelial cells; cell senescence; insulin-like growth factor-1

特发性肺纤维化普遍发病年龄在 60 岁以上,属于难治性疾病,目前尚无有效的治疗手段阻止其进展^[1]。肺泡上皮细胞(alveolar epithelial cells, AECs)在持续微损伤环境下自身修复功能下降致肌成纤维细胞聚集是肺纤维化进展的核心事件^[2]。研究表明在肺纤维化中 AECs 修复功能下降与细胞衰老有关,然而目前 AECs 衰老的原因、机制不明^[3]。研究^[4-5]发现:胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)是一类自然生长激素,在促进机体生长、发育中发挥重要作用,通过激活下游磷酸酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)及蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB; 别名 AKT),最终引发细胞衰老^[4-5]。衰老后的 AECs 通过衰老相关分泌表型(senescence-associated secretory phenotype, SASP)释放转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)促进 AECs 向肌成纤维细胞转化及增加胶原的合成,最终加重肺纤维化^[6-7]。笔者推测:IGF-1 信号通路活化可能是 AECs 衰老致肺纤维化进展的重要机制,若能对 IGF-1 信号通路活性进行精准调控,有可能恢复 AECs 的修复功能及抑制肺纤维化进展。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57 小鼠,体重 18~25 g,6~8 周龄,购于内蒙古医科大学实验动物中心,动物合格证号 NMGYKDX(蒙)2020-0534。根据随机数字表法将小鼠分为 2 组,每组 6 只,分别为对照组(盐水组)、博来霉素(BLM)组。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

非小细胞肺癌(NSCLC)A549 细胞株购于 ATCC 细胞库;A549 细胞用含有 RPMI-1640 培养基、胎牛血清(FBS)、青霉素-链霉素混合溶液培养并置于 37℃ 孵箱中进行孵育。

1.2.2 主要实验试剂

BLM 购自海正辉瑞制药有限公司;IGF-1 购自北京索莱宝生物公司。HE 染色试剂盒和戊巴比妥钠购自上海碧云天生物技术有限公司;RNA 纯化试剂盒购自 QIAGEN;其他生化试剂均购自北京索莱宝生物公司。

1.2.3 肺纤维化小鼠模型建立

充分麻醉后,向小鼠气管内一次性滴入实验用量的 BLM(5 mg/kg)构建肺纤维化模型。向对照组小鼠气管内滴入等量的生理盐水,记为第 0 天,常规自

由饮食;第 21 天腹腔注射 1.5% 戊巴比妥钠过量麻醉处死小鼠,并分别收集两组小鼠的肺组织。取部分肺组织于 4% 多聚甲醛固定 24 h 后,制作石蜡切片,用于 HE 染色和 Masson 染色;剩余肺组织经液氮速冻后,保存于 -80℃ 冰箱。

1.2.4 小鼠肺组织免疫组织化学染色

石蜡切片用二甲苯 I、II 脱蜡,不同浓度乙醇(100%、95%、80%、70%)脱水后,用微波抗原修复法对石蜡切片进行抗原修复。修复完成后滴加工作封闭山羊血清对样本进行封闭(时间 30 min)。封闭结束后孵育一抗过夜。次日依据北京中杉金桥公司的过氧化物酶标记羊抗兔/鼠试剂盒说明书,分别滴加 SP 试剂(链霉亲和素-过氧化物酶),进行 DAB 显色、苏木素复染等操作,并在显微镜下观察评分。IGF-1 主要表达于腺体细胞的细胞质及细胞膜,以细胞质及细胞膜出现淡黄色、黄色、棕黄色为阳性,按阳性细胞比例计分: < 10% 为 0 分, 10%~30% 为 1 分, > 30%~60% 为 2 分, > 60% 为 3 分;按染色强度计分: 无色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 黄色为 2 分, 棕黄色为 3 分。将两项计分相乘, 0、1~3、4~6、7~9 分别记录为 -、+、++、+++。这些得分也可以表述为 ≤ 3 分为表达阴性(-), > 3 分为表达阳性(+)。切片均经 2 名有经验的病理科医师在双盲情况下分别阅片。

1.2.5 细胞免疫荧光

将正常培养的 A549 细胞株传代至 24 孔板爬片中。PBS 清洗 3 次后,4% 多聚甲醛固定、0.1% Triton 破膜后用山羊血清进行封闭,孵育一抗(4℃ 冰箱过夜)。次日孵育二抗,时间 2 h。DAPI 染核、封片,并于激光共聚焦显微镜下观察目的蛋白的表达情况。

1.2.6 IGF-1 检测

ELISA 法测定小鼠肺组织中 IGF-1 的水平。

1.2.7 mRNA 检测

根据实验分组将不同处理方法的 A549 细胞用细胞裂解液进行裂解并提取总 RNA,用紫外分光光度计测定各组 RNA 浓度;严格按照 TaKaRa 公司的反转录试剂盒操作步骤进行操作,以此获得反转录后的 cDNA;检测各组细胞样本中 PI3K、AKT 的 mRNA 的表达水平(PI3K: F-GAAAAGTTTGGCCGGTTC-CG、R-GCAGTCAACATCAGCGCAAA; AKT: F-CTTTCGGCAAGGTGATCCTG、R-GTACTTCAGGGCTGTGAGGA; GAPDH: F-TGACTTCAACAGCGACACCCA、R-CACCCTGTTGCTGTAGCCA AA)。

1.2.8 细胞免疫印迹

将上述所得的各组处理后的组织样本用 RIPA 细胞裂解液提取总蛋白并进行蛋白定量检测。选取各组蛋白 20 μg 进行上样,SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳和转膜。结束后根据蛋白相对分子质量准确裁剪目的蛋白条带,并用 0.4% 明胶进行封闭,时间 30 min。封闭结束后孵育一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日,PBST 缓冲液清洗 3 次,随后用 HRP 标记的抗人源 IgG 二抗室温孵育 1.5 h,再次用 PBST 缓冲液清洗,最后曝光并对其进行分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件分析数据。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 IGF-1 在 BLM 小鼠肺组织中广泛表达

HE、Masson 染色结果显示:与对照组的肺脏病理相比,BLM 小鼠肺脏间质中细胞数量增多、蓝染的胶原纤维增加。免疫组织化学结果显示:与对照组(一/+)相比,BLM 小鼠肺脏中 IGF-1 的表达(++)明显上调,见图 1。

2.2 IGF-1 可诱导肺泡上皮细胞发生衰老现象

IGF-1(10 ng/mL)刺激 A549 细胞 72 h 后, β -半乳糖染色(SA- β -gal)结果发现:与对照组相比,IGF-1 刺激组衰老阳性的细胞数量明显增多($P<0.05$)。免

疫荧光实验结果发现:与对照组相比,IGF-1 刺激组红色荧光表达的 P21、P16 明显上调($P<0.05$),见图 2。

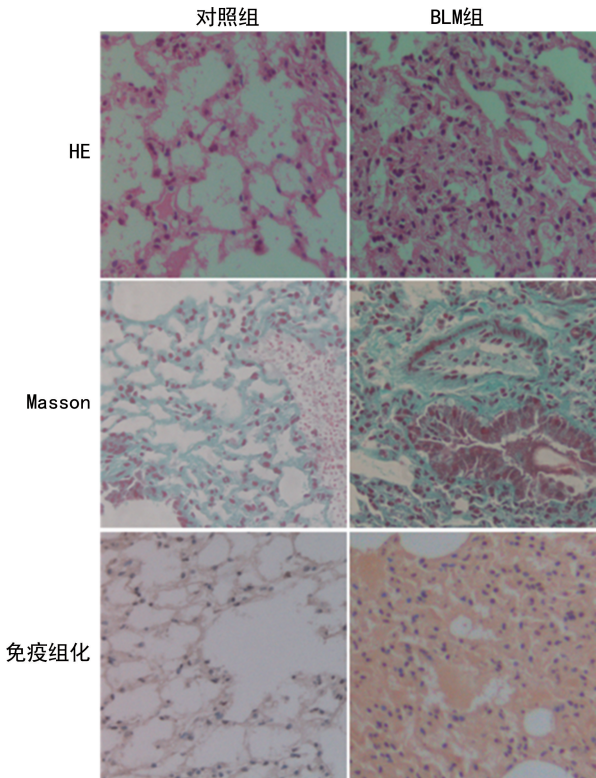
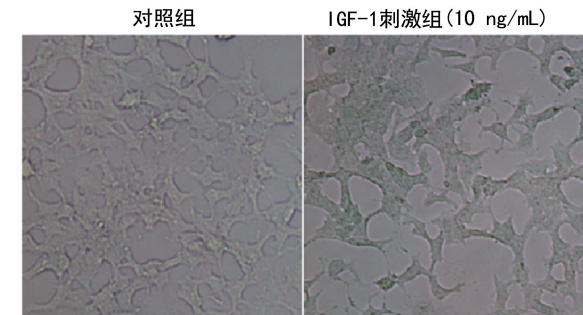
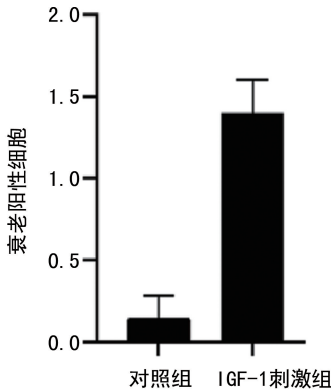
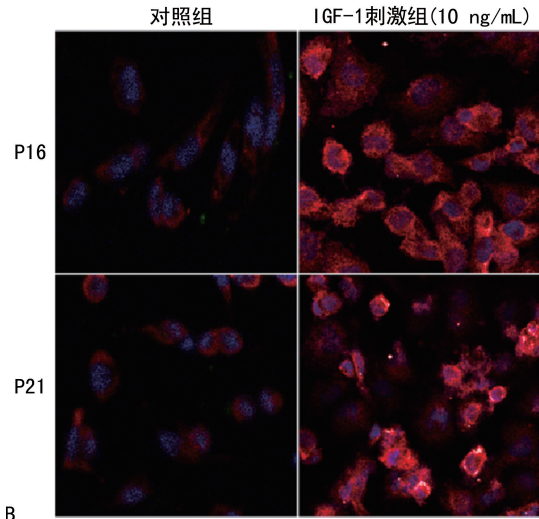


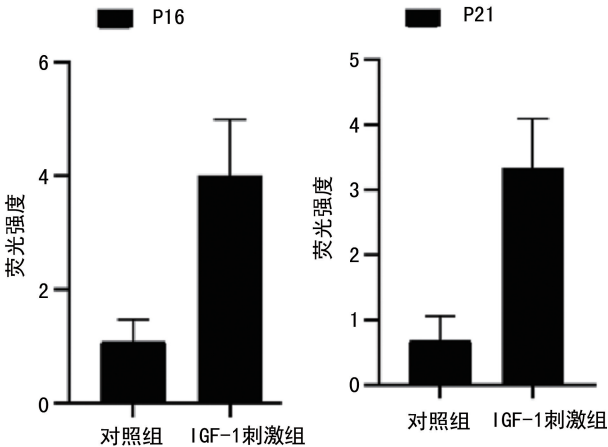
图 1 正常小鼠肺组织与 BLM 小鼠肺组织中 IGF-1 的表达($\times 200$)



A



B



A:SA- β -gal 染色检测各组衰老阳性细胞的数量;B:免疫荧光检测各组 P16、P21 表达变化。红色荧光代表 P16、P21。

图 2 SA- β -gal 染色与免疫荧光染色检测 IGF-1 对 A549 细胞衰老的影响($\times 200$)

2.3 IGF-1上调了细胞衰老表型中TGF-β1、MMP-9的表达

ELISA法对A549细胞培养基进行了检测,结果发现:与对照组相比,IGF-1刺激A549细胞72 h后的培养基中,TGF-β1、MMP-9的表达明显上调($P < 0.05$),见图3。

2.4 IGF-1致肺泡上皮细胞出现转分化(EMT)现象

免疫印迹实验结果发现:与对照组相比,IGF-1诱导A549细胞衰老72 h后,A549细胞蛋白中的N-Cadherin、α-SAM表达明显上调,见图4。

2.5 细胞衰老中出现了IGF-1/PI3K/AKT信号通路的活化

实时定量PCR结果发现:与对照组相比,IGF-1诱导A549细胞72 h后,PI3K、p-AKT的表达明显上

调,见图5。

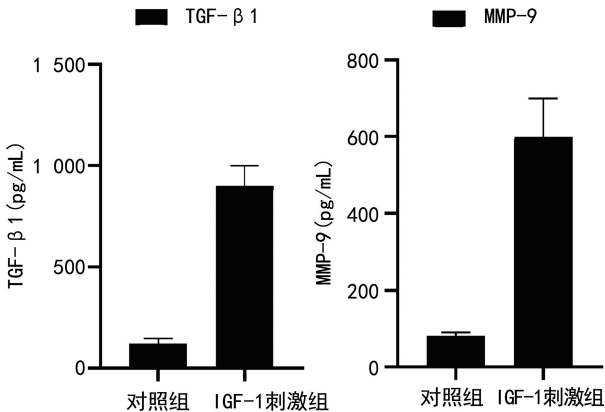


图3 ELISA法检测各组TGF-β1、MMP-9的表达

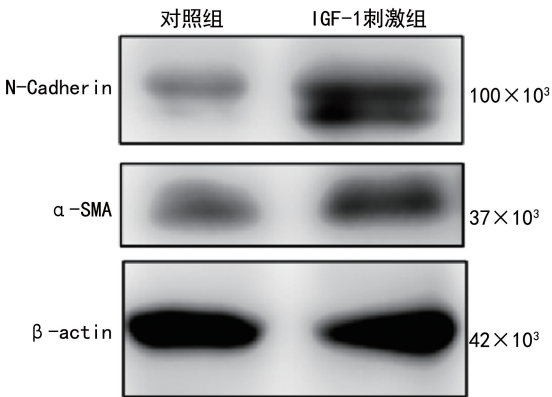


图4 免疫印迹检测各组A549细胞蛋白中的N-Cadherin、α-SAM的表达变化

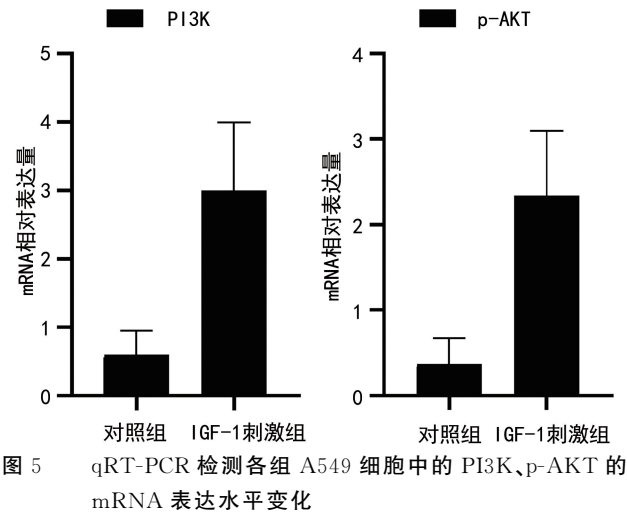
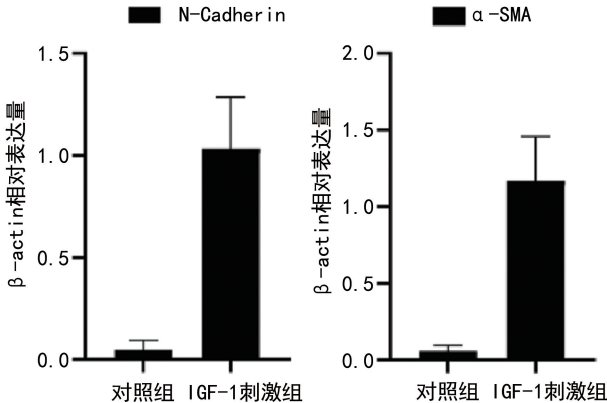


图5 qRT-PCR检测各组A549细胞中的PI3K、p-AKT的mRNA表达水平变化

3 讨论

临床资料的流行病特点显示,特发性肺纤维化的发病人群普遍以老年人为主,且与AECs衰老明显相关^[8]。但AECs发生衰老的原因及具体机制不明。所以本研究的创新点是发现了IGF-1信号通路的活化导致AECs衰老后发生IPF的重要原因。

AECs在慢性损伤等病理条件下具有很强的再生及修复能力,但IPF发生时AECs丧失了自身的修复功能并启动了后续致纤维化的生物学效应^[9]。细胞衰老理论认为随着年龄的增长,细胞会发生损伤,影

响了自身的修复功能,由此可见修复功能下降的AECs与细胞衰老明显相关^[10]。但细胞衰老不仅仅是年龄增加的结果,更多的是在慢性损伤等病理条件下共同作用的结果。基础研究发现:AECs遭遇慢性损伤时,会过度释放IGF-1,激活IGF-1/PI3K/AKT信号通路,一方面释放炎症因子,形成氧化应激反应;另一方面IGF-1会加速细胞生长速度,使细胞发生功能性改变,最终发生细胞衰老^[11]。虽然不少学者报道了IGF-1是致纤维化进展的关键细胞因子,但在肺纤维化中IGF-1是否是造成AECs衰老的重要原因,以及具体机制是什么并不清楚。所以在本研究中利用BLM小鼠模型观察IGF-1在肺纤维化的表达情况,同时利用IGF-1对AECs进行诱导,观察AECs衰老的现象。在本研究中发现了BLM小鼠肺组织中不仅存在IGF-1的广泛表达,还发现IGF-1诱导AECs72 h后,AECs发生了明显的细胞衰老现象。这些发现均说明了IGF-1是导致AECs衰老及肺纤维化发生的重要原因。

SASP是细胞衰老后发生纤维化生物学效用的重要标志^[12]。文献报道了IGF-1/PI3K/AKT信号通路活化后会释放TGF-β1、MMP-9,恰巧这些细胞因子均是IPF进展的重要蛋白^[13-14]。TGF-β1可促进成纤维细胞增殖活化及胶原合成,使未成熟的成纤维细胞演变成肌成纤维细胞^[15]。MMP-9则可以活化炎症

信号通路,促进炎症细胞在肺间质中的积聚^[16]。本研究 IGF-1 诱导小鼠 AECs 衰老后,除了引起细胞培养基中 TGF- β 1、MMP-9 表达增加外,AECs 还发生了 EMT 现象。这更加充分说明了 IGF-1 致 AECs 衰老后发生的 EMT 现象是肺纤维化进展的关键机制。

PI3K/AKT 信号通路活化依赖于上游细胞因子 IGF-1 的释放^[17]。PI3K/AKT 信号通路的活化不仅是纤维化发生的重要信号通路,也是细胞衰老的重要信号通路^[18]。所以本研究进一步利用 IGF-1 建立 AECs 衰老模型,检测下游信号通路关键蛋白 PI3K、AKT 的表达,结果发现 IGF-1 诱导 AECs 衰老 72 h 后,PI3K、AKT 的表达明显上调。

IPF 是多个蛋白介导的多条信号通路网络样活化过程,在 AECs 衰老中是否存在其他信号通路的活化及 IGF-1 信号通路的活化是否比其他信号通路活化更为重要,均需要进一步研究。本研究的发现有助于了解及预防衰老相关性疾病,为精准研发 IPF 药物提供了临床转化的理论基础。

参考文献

- [1] SAITO S, ALKHATIB A, KOLLS J K, et al. Pharmacotherapy and adjunctive treatment for idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)[J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(14):1740-1754.
- [2] PARIMON T, YAO C, STRIPP B R, et al. Alveolar epithelial type II cells as drivers of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7):2269.
- [3] MORA A L, BUENO M, ROJAS M. Mitochondria in the spotlight of aging and idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(2):405-414.
- [4] LI Z, CAI B, ABDALLA B A, et al. LncIRS1 controls muscle atrophy via sponging miR-15 family to activate IGF1-PI3K/AKT pathway[J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2019, 10(2):391-410.
- [5] ZHAO L D, BIE L Y, HU L, et al. IGF-1 induces cellular senescence in rat articular chondrocytes via AKT pathway activation[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(5):49.
- [6] PHAN T H G, PALIOGIANNIS P, NASRALAH G K, et al. Emerging cellular and molecular determinants of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020(5):2031-2057.
- [7] THOMAS R, WANG W, SU D M. Contributions of age-related thymic involution to immunosenescence and inflammaging[J]. *Immun Ageing*, 2020, 17:2.
- [8] ZHAO L D, BIE L Y, HU L, et al. IGF-1 induces cellular senescence in rat articular chondrocytes via Akt pathway activation[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(5):49.
- [9] TIAN Y, LI H, QIU T, et al. Loss of PTEN induces lung fibrosis via alveolar epithelial cell senescence depending on NF-kappaB activation[J]. *Aging Cell*, 2019, 18(1):e12858.
- [10] OMOTE N, SAULER M. Non-coding RNAs as regulators of cellular senescence in idiopathic pulmonary fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2020, 7:603047.
- [11] SAHAN O B, GUNEL-OZCAN A. Hepatocyte growth factor and insulin-like growth factor-1 based cellular therapies for oxidative stress injury[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2021, 16(7):771-791.
- [12] YAMAGUCHI M, HIRAI S, TANAKA Y, et al. Fibroblastic foci, covered with alveolar epithelia exhibiting epithelial-mesenchymal transition, destroy alveolar septa by disrupting blood flow in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Lab Invest*, 2017, 97(3):232-242.
- [13] BLAZQUEZ-PRIETO J, HUIDOBRO C, LOPEZ-ALONSO I, et al. Activation of p21 limits acute lung injury and induces early senescence after acid aspiration and mechanical ventilation[J]. *Transl Res*, 2021, 233:104-116.
- [14] ZHANG C, CUI T, CAI R, et al. Growth hormone-releasing hormone in lung physiology and pulmonary disease[J]. *Cells*, 2020, 9(10):2331.
- [15] TAN Q, WANG Q, KUANG L, et al. TGF-beta/Alk5 signaling prevents osteoarthritis initiation via regulating the senescence of articular cartilage stem cells[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(7):5278-5292.
- [16] AROS C J, VIJAYARAJ P, PANTOJA C J, et al. Distinct spatiotemporally dynamic wnt-secreting niches regulate proximal airway regeneration and aging[J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(3):413-429.
- [17] OMOTE N, SAULER M. Non-coding RNAs as regulators of cellular senescence in idiopathic pulmonary fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2020, 7:603047.
- [18] HAN S, WANG P F, CAI H Q, et al. Alterations in the RTK/Ras/PI3K/AKT pathway serve as potential biomarkers for immunotherapy outcome of diffuse gliomas[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 8:13.