DOI: 10.14188/j.1671-8852.2024.0983
文章编号 1671-8852(2025)11-1394-05

PPIC敲减通过促进肺成纤维细胞凋亡缓解肺纤维化

彭梅婷 杨 帆 余 露 刘 媛 程真顺
武汉大学中南医院呼吸与危重症学科 湖北 武汉 430071

摘要 目的：观察肽酰脯氨基顺反异构酶C（PPIC）对肺纤维化小鼠模型及肺成纤维细胞凋亡、活化和细胞外基质（ECM）生成的影响。方法：在不同时期的博来霉素（BLM）肺纤维化小鼠模型中检测PPIC的表达水平，并通过免疫荧光进一步检测PPIC的细胞定位。构建PPIC敲减慢病毒，在BLM肺纤维化小鼠模型中降低PPIC的表达，通过免疫荧光检测肺成纤维细胞的凋亡相关蛋白表达，以及肺组织中胶原的含量。结果：BLM小鼠肺纤维化模型中PPIC含量增加，免疫荧光共染证实PPIC主要表达于肺成纤维细胞中。BLM肺纤维小鼠肺成纤维细胞凋亡较生理盐水组下降，而PPIC的敲减能够有效增加BLM肺纤维化小鼠成纤维细胞的凋亡数量，从而降低肺组织中胶原沉积和成纤维细胞的分化。结论：PPIC敲减促进肺成纤维细胞凋亡、抑制肺成纤维细胞活化及胶原产生从而改善小鼠肺纤维化。

关键词 细胞凋亡；成纤维细胞；肺纤维化；PPIC
中图分类号 R563.9
文献标识码 A
开放科学（资源服务）标识码（OSID）：

PPIC knockdown promotes lung fibroblasts apoptosis relieve pulmonary fibrosis

PENG Meiting, YANG Fan, YU Lu, LIU Yuan, CHENG Zhenshun
Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract

Objective: To investigate the effect of peptidyl-prolyl cis-trans isomerases C (PPIC) knockdown on pulmonary fibrosis of mice, fibroblast apoptosis, activation, and extracellular matrix (ECM) production. **Methods:** The expression level of PPIC was detected in Bleomycin(BLM) mouse models of pulmonary fibrosis at different times, and the cellular localization of PPIC was detected by immunofluorescence. PPIC knockdown was constructed with short hairpin RNA (shRNA), which can reduce the expression of PPIC in a mouse model of BLM-induced pulmonary fibrosis. Subsequently, lung fibroblast apoptosis and collagen expression in lung tissues were detected. **Results:** PPIC expression was increased in bleomycin (BLM)—induced mouse pulmonary fibrosis. Immunofluorescence co—staining showed that PPIC was mainly localized to lung fibroblasts. The number of apoptotic lung fibroblasts in BLM mice was lower than in the saline group, and PPIC knockdown significantly in-

课题来源：国家自然科学基金资助项目（编号：82370075）；武汉大学中南医院创新培育基金资助项目（编号：CXPY2023035）；武汉大学中南医院科技创新平台支撑基金资助项目（编号：PTXM2022001）；武汉大学中南医院领军人才-攀登计划基金资助项目（编号：PDJH202406）
作者简介：彭梅婷，女，1997—，医学硕士生，主要从事肺纤维化发病机制相关研究，E-mail：ppmttt@163.com
通信作者：刘媛，女，1991—，医学博士，主要从事肺纤维化发病机制相关研究，E-mail：liuyuanshi33@whu.edu.cn；程真顺，男，1970—，医学博士，教授，主要从事肺纤维化发病机制及急性肺损伤相关研究，E-mail：zhenshun_cheng@126.com

creased the number of apoptotic fibroblasts. More importantly, PPIC knockdown reduced collagen deposition and fibroblast differentiation in the lung tissue of BLM mice. **Conclusion:** PPIC knockdown inhibits the activation of lung fibroblasts and the production of ECM proteins, thereby ameliorating lung fibrosis in mice.

Key Words　Apoptosis; Fibroblast; Pulmonary Fibrosis; PPIC

肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)是一种慢性、进行性、不可逆转且通常致命的肺部疾病[1]。其最基本的特征是肺成纤维细胞异常活化所致的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积，损害肺功能，最终导致呼吸衰竭[2]。特别是，纤维化的肺组织滑膜中的肌成纤维细胞具有显著的增殖和存活潜力，有助于肺纤维化的进展[3]。但是成纤维细胞是如何实现抗凋亡、促存活作用的尚不明确。因此，了解成纤维抗凋亡特性，及恢复成纤维细胞对凋亡的敏感性是另一种肺纤维化的潜在的治疗方法。抵抗凋亡的肺成纤维细胞的清除能够减少病理性成纤维细胞表型并有利于肺纤维化消退[4]。

肽酰脯氨基顺反异构酶 C(peptidyl-prolyl cis-trans isomerases C，PPIC)编码亲环素 C，是亲环素家族的一种酶[5]。亲环素家族对各种疾病中凋亡过程及通路调控以及帮助蛋白质的折叠具有潜在功能，如：亲环素家族成员如 PPIB 可促进内质网应激诱导的细胞凋亡，从而杀伤肿瘤细胞[6]。并且研究[7]表明 PPIC 对 CCl4 诱导的肝纤维化有调节作用，PPIC 与 PPIB 是唯二定位于内质网内的肽基脯氨酰异构酶[8]，然而，PPIC 是否参与肺纤维化尚未完全阐明，还需进一步研究。因此，本研究旨在探讨 PPIC 对肺纤维的影响及其机制。

1　材料与方法

1.1　材料和试剂　博来霉素(Bleomycin, BLM)来自 HISUN(Hinz and Lagares)。PPIC 慢病毒由上海吉凯基因公司构建。Ⅰ型胶原蛋白(collagen type Ⅰα1，col1α1)、抗 β-actin 的抗体购自武汉 ABclonal 公司。α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin，α-SMA)、纤连蛋白(fibronectin，FN)的抗体购自英国 Abcam 公司。

1.2　动物模型　6～8 周雄性 C57BL/6J 小鼠(Gempharmatech 有限公司，南京)造模。BLM 诱导的肺纤维化模型：小鼠在戊巴比妥钠麻醉下接受气管内注射 50 μL BLM(2 mg•kg^{-1})或等量的生理盐水，分别于 BLM 刺激后的第 0、7、14、21 天取材。BLM＋scramble shRNA 组和 BLM＋PPIC shRNA(4.0×10^{7})组：于 BLM 刺激后的第 14 天腹腔注射等量 shRNA。记录小鼠体质量和死亡率直至第 21 天取材并进行组织学分析和分子实验。动物实验得到了武汉大学实验中心的批准(批准号：WP20230645)，并按照《实验动物护理和使用指南》进行。

1.3　肺组织免疫荧光　将小鼠肺组织切片固定在 4% PFA 中，然后用 0.2%Triton X-100 透化 10 min，并在 5% 牛血清白蛋白中封闭 60 min。将细胞或组织切片与一抗在 4 ℃下孵育过夜，随后与适当的二抗在室温下孵育 1 h。细胞核用 DAPI 染色 3 min，并使用荧光显微镜观察。

1.4　肺组织学染色分析　用苏木精-伊红(HE)和马松(Masson)对 4 μm 的肺组织切片染色，评估肺组织结构破坏情况。

1.5　实时定量 PCR(q-PCR)　根据制造商说明使用 TRIzol 分离细胞或组织 RNA。使用 ReverTra Ace qPCR RT 试剂盒(TOYOBO，日本)进行逆转录，使用 UltraSYBR 混合物(CWBIO，北京)进行 qPCR。

1.6　Western Blot　蛋白在 SDS-PAGE 凝胶系统中电泳分离，用 PVDF 膜转膜后脱脂牛奶封闭，分别经一抗和二抗孵育，用电化学发光(ECL)系统(Tanon，上海)观察条带。

1.7　数据分析　应用 Graphpad 8.0 软件处理数据并绘制柱状图。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组样本间均数比较采用单因素方差分析，两两比较采用 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　PPIC 在不同时期 BLM 诱导的肺纤维化小鼠肺组织中表达　为了探究 PPIC 是否参与影响肺纤组织纤维化发病过程，利用不同时期 BLM 诱导的肺纤维化小鼠的肺组织检测 PPIC mRNA 和蛋白质的表达水平。结果可见，PPIC mRNA 和蛋白质的表达水平与 FN、col1α1 一致增加。与第 0 天相比，

随着BLM作用时间的延长,肺组织中FN、col1α1、PPIC的表达量逐渐升高(图1A、1B)。

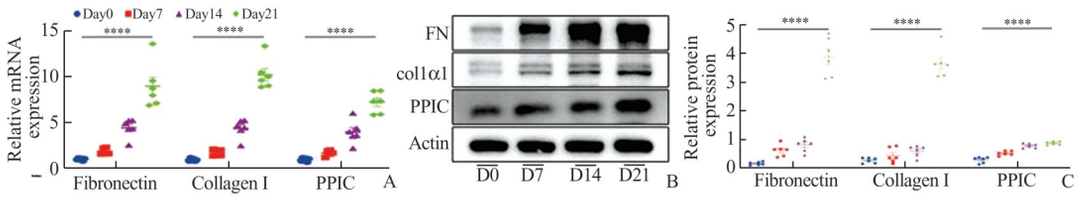


图1 4组小鼠肺组织中FN、col1α1、PPIC mRNA和蛋白表达

A. q-PCR检测4组小鼠肺组织中FN、col1α1、PPIC mRNA表达的比较;B. Western Blot检测4组小鼠肺组织中FN、col1α1、PPIC蛋白表达的比较;C. B图的定量统计;图中Day、D及数字代表对应天数。数据以$\bar{x}\pm s$表示,One way ANOVA用于多组比较;$^{****}P<0.000\ 1$。

2.2 PPIC的细胞定位 为了进一步探索PPIC在肺组织中的细胞定位,利用NS和BLM小鼠的肺组织切片做PPIC(红色)和α-SMA(绿色)免疫荧光共染,发现PPIC主要表达于肺成纤维细胞当中,并且相比于NS组,PPIC在BLM诱导的肺纤维化小鼠肺成纤维细胞中的表达明显增加(图2)。

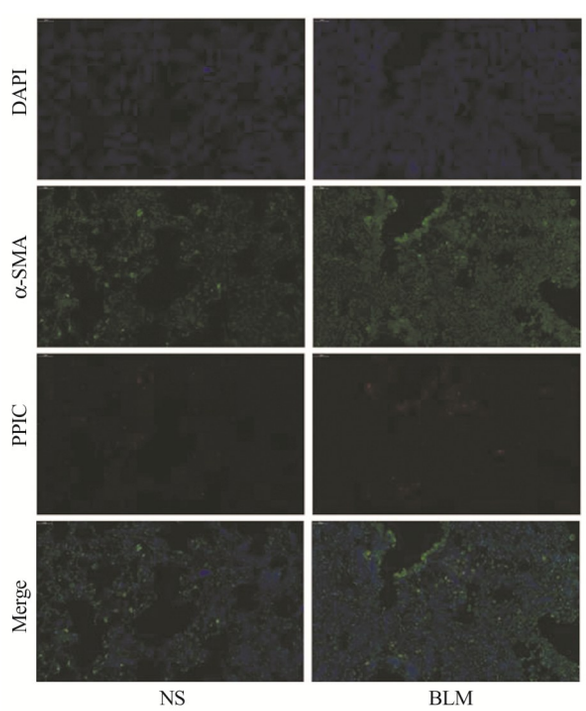


图2 小鼠的肺组织切片做PPIC(红色)和α-SMA(绿色)免疫荧光共染

2组小鼠肺组织α-SMA和PPIC免疫荧光双染(×400)。

2.3 PPIC敲减对成纤维细胞凋亡的影响 首先构建带有GFP的小鼠PPIC敲减慢病毒,并证实了慢病毒的作用及选择出敲减效率最高的慢病毒用于后续实验(图3A、3B)。利用实验方法中提及的造模方式如图3C所示构建PPIC敲减模型,并取小鼠的肺组织提取mRNA和蛋白,进行q-PCR和Western Blot检测,结果发现,BLM诱导的肺纤维小鼠的肺组织中PPIC表达较生理盐水组明显增加,而PPIC慢病毒敲减可降低PPIC的表达(图3D)。PPIC和PPIB同属于内质网亲环素家族成员,PPIB已经被证实参与细胞凋亡的调控。由上述结果可知PPIC主要在BLM小鼠的肺组织成纤维中表达增加。为了进一步验证BLM肺纤维小鼠模型肺组织中成纤维细胞的凋亡水平是否与NS组存在差异,以及PPIC敲减是否影响肺成纤维细胞的凋亡,利用4组小鼠的肺组织切片进行α-SMA(绿色)和cleaved-caspase3(红色)免疫荧光共染,结果显示,BLM组小鼠肺组织成纤维细胞表达cleaved-caspase3较生理盐水组明显降低,并且PPIC的敲减可以增加BLM诱导的肺纤维化小鼠肺组织中成纤维细胞的cleaved-caspase3表达(图3E)。

2.4 PPIC敲减减轻小鼠肺纤维化 为了探究PPIC敲减后是否影响肺组织病变,观察并测量BLM和BLM+shRNA PPIC组小鼠体质量和生存率、21 d后取材并分析组织病理(图4A)。结果可见与BLM组相比,PPIC敲减组14 d后的体质量下降有所改善,21 d生存率有所提高。HE和Masson染色显示,BLM引起明显肺结构破坏,PPIC治疗后肺纤维化病变减轻(图4C)。进行Western Blot和qPCR检测,结果显示,BLM干预导致肺组织表达col1α1、FN、α-SMA和增加,而PPIC敲减后使肺组织col1α1、FN、α-SMA表达量减少(图4B、4C)。

3 讨论

肺纤维化(PF)是一种慢性、进行性、不可逆转且通常致命的肺部疾病。关于肺纤维化发病机制的研究范式已经从认为慢性炎症是特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)的直接原因转变为认为氧化应激在IPF的发生和发展中起重要

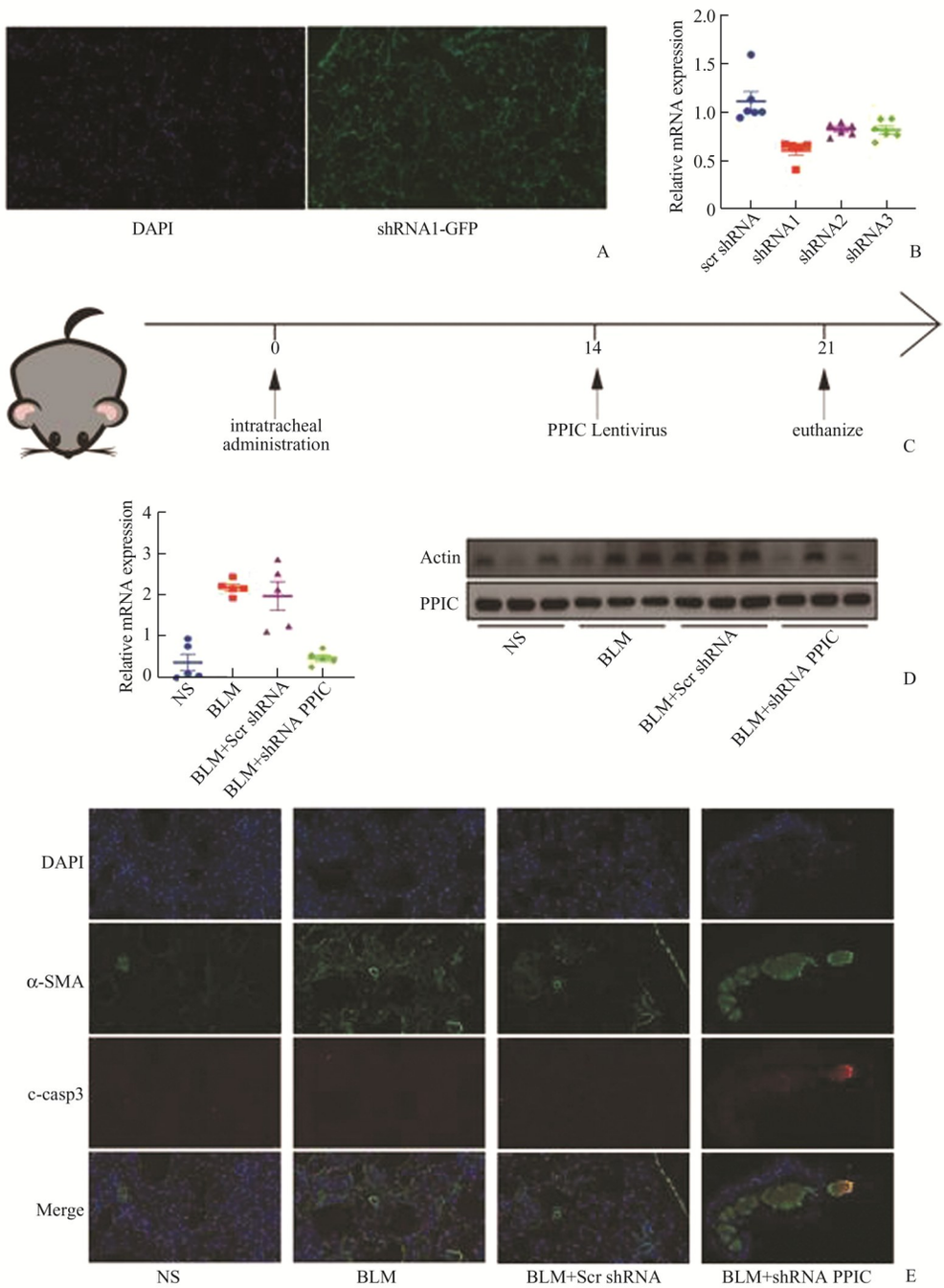


图 3　PPIC 敲减对成纤维细胞凋亡的影响

A. 气管内注射慢病毒小鼠肺组织冰冻切片（×400）；B. q-PCR 检测慢病毒敲减效率；C. 小鼠造模模式图（图中数据为时间/d）；D. q-PCR 检测 4 组小鼠肺组织中 PPIC mRNA 表达的比较；Western Bolt 检测 4 组小鼠肺组织中 PPIC 蛋白表达的比较；E. 4 组小鼠肺组织 α-SMA 和 cleaved caspase3 免疫荧光双染（×400）。

作用，到最近提出反复的微损伤和肺泡上皮细胞（alveolar epithelial cells，ACEs）损伤导致成纤维细胞的失控激活和增殖，并通过产生关键的促纤维化信号和介质而导致细胞外基质（ECM）的过度积聚[9]。PPIC 广泛分布于组织中，在胶原合成中起着关键作用[10]。PPIC 与肝纤维化相关，以及 ALQUDAH 等[11]证明了亲环素在纤维化发展中的重要性。目前，PPIC 在 PF 中还没有被研究过。我们通过实验发现 PPIC 在博来霉素小鼠肺组织中增加，并且主要表达于肺成纤维细胞当中。已有研究[12-13]表明，PPI 家族成员在细胞凋亡及通路调控中发挥重要作用，而成纤维细胞抗凋亡被认为是 IPF 患者肺实质中肌成纤维细胞持续存在的原因。因此，本文旨在探究 PPIC 在是否参与肺纤维化。

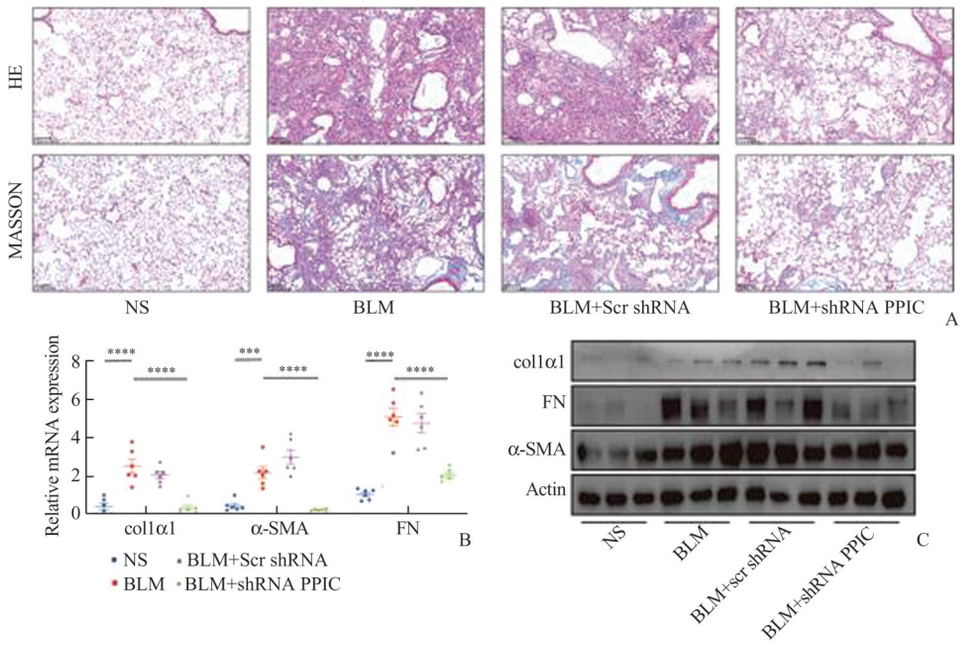


图4 PPIC敲减减轻小鼠肺纤维化的影响

A. 4组小鼠肺组织HE、MASSON染色(×400);B. q-PCR检测4组小鼠肺组织中col1α1、α-SMA、FN mRNA表达的比较;C. Western Blot检测4组小鼠肺组织中col1α1、α-SMA、FN蛋白表达的比较。数据以$\bar{x}\pm s$表示,One way ANOVA用于多组比较;$^{***}P<0.001$;$^{****}P<0.000\ 1$。

博来霉素(BLM)是一种用于治疗不同类型肿瘤的药物。博来霉素最严重的不良反应是肺毒性,可导致肺结构重塑和肺功能丧失[14]。因此,博来霉素是目前应用最广泛的治疗动物肺纤维化的药物之一,并基于博来霉素肺纤维小鼠模型的基本特点:第14天肺纤维化发展达到顶峰,后开始逐渐自行消退[15],我们选择在小鼠气管内给予博来霉素的第14天,在小鼠的气管内予以PPIC敲减慢病毒。在这里,我们观察到博来霉素诱导的PF的特征是PPIC表达增加,更重要的是,我们发现慢病毒介导的PPIC沉默可以减弱博来霉素诱导的小鼠肺细胞外基质的沉积和肺成纤维细胞的活化。因此,我们的结果为PPIC在PF中的促纤维化作用提供了证据。

与这些发现一致,我们发现IPF肺肌成纤维细胞在PPIC敲减后表现出抗凋亡的特性和肌成纤维细胞活化标记物的增加。更重要的是,我们发现PPIC沉默促进了小鼠肺成纤维细胞的凋亡,抑制了小鼠肺成纤维细胞的激活和肺组织中ECM的沉积。这与亲环素家族蛋白成员被敲除可诱导细胞凋亡、PPIC沉默可减少肝纤维化中胶原蛋白表达的研究结果一致。综上所述,这些发现表明PPIC是PF中成纤维细胞分化为肌成纤维细胞的关键调节因子。

综上所述,我们的研究表明PPIC在肺纤维化形成中发挥促纤维化调节作用,PPIC通过调节成纤维细胞的凋亡参与肺纤维化。

参考文献

[1] RICHELDI L, COLLARD H R, JONES M G. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Lancet, 2017, 389(10082): 1941-1952.

[2] BLOKLAND K E C, WATERS D W, SCHULIGA M, et al. Senescence of IPF lung fibroblasts disrupt alveolar epithelial cell proliferation and promote migration in wound healing[J]. Pharmaceutics, 2020, 12(4): E389.

[3] HABIEL D M, HOGABOAM C. Heterogeneity in fibroblast proliferation and survival in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Front Pharmacol, 2014, 5: 2.

[4] WANG Q, XIE Z L, WU Q, et al. Role of various imbalances centered on alveolar epithelial cell/fibroblast apoptosis imbalance in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134(3): 261-274.

[5] ZHOU B, SHA S, WANG Q, et al. The prognostic implications of cuproptosis-related gene signature and the potential of PPIC as a promising biomarker in cutaneous melanoma[J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2024, 37(6): 864-880.

(下转第1412页)