DOI: 10.14188/j.1671-8852.2024.1021　　**文章编号** 1671-8852(2025)12-1523-06

MFAP5通过激活TGF-β1/Smad信号通路加重博来霉素诱导的肺纤维化

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

摘要　**目的**：探讨微纤维相关蛋白5(MFAP5)在博来霉素(BLM)诱导的小鼠肺纤维化中的作用及分子机制。**方法**：建立BLM诱导的C57BL/6小鼠肺纤维化模型，使用重组鼠MFAP5蛋白(rmMFAP5)干预并评估其影响。分析MFAP5过表达(MFAP5-OE)的小鼠肺成纤维细胞，检测纤维化相关分子和TGF-β1/Smad信号通路的活性。**结果**：在体内实验中，rmMFAP5显著加重BLM诱导的小鼠体质量下降及肺纤维化，并增加细胞外基质蛋白的表达。在体外，MFAP5过表达显著上调成纤维细胞中α平滑肌肌动蛋白(α-SMA)及细胞外基质蛋白的表达，促进成纤维细胞活化和基质合成。机制研究发现，MFAP5通过上调TGF-β1、Smad2/3及磷酸化Smad2/3水平增强TGF-β信号活性，抑制TGF-β通路(SB525334)可显著减少Ⅰ型胶原表达。**结论**：MFAP5通过激活TGF-β1/Smad信号通路，促进肺成纤维细胞活化和基质合成，加重BLM诱导的肺纤维化。

关键词　MFAP5；肺纤维化；博来霉素；TGF-β1/Smad信号通路
中图分类号　Q563
文献标识码　A　　**开放科学(资源服务)标识码(OSID)：**

MFAP5 aggravates bleomycin-induced pulmonary fibrosis through activation of the TGF-β1/Smad signaling pathway

YANG Fan, PENG Meiting, YU Lu, HOU Qinhui, LIU Ying, 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 role and molecular mechanism of microfibril-associated protein 5 (MFAP5) in bleomycin (BLM)-induced pulmonary fibrosis in mice. **Methods:** A pulmonary fibrosis model was established in C57BL/6 mice using BLM, and the effects of recombinant MFAP5 protein (rmMFAP5) intervention were evaluated. Primary mouse lung fibroblasts with MFAP5 overexpression (MFAP5-OE) were analyzed to assess fibrosis-related molecules and TGF-β1/Smad signaling activity. **Results:** *In vivo*, rmMFAP5 significantly exacerbated BLM-induced weight loss and pulmonary fibrosis while increasing extracellular matrix proteins. *In vitro*, MFAP5 overexpression markedly upregulated α-SMA and extracellular matrix proteins, promoting fibroblast activation and matrix synthesis. Mechanistically, MFAP5 enhanced TGF-β1 signaling by upregulating TGF-β1, Smad2/3, and phosphorylated Smad2/3 levels. Pharmacological inhibition of TGF-β1 signaling (SB525334)

课题来源：国家自然科学基金面上项目(编号：82370075)；武汉大学中南医院领军人才-攀登计划(编号：PDJH202406)
作者简介：杨帆，女，1991—，医学硕士，主要从事肺纤维化的发生及机制研究，E-mail:2022203030024@whu.edu.cn
通信作者：程真顺，男，1970—，医学博士，教授，博士生导师，主要从事肺纤维化的发生及机制研究，E-mail:zhenshun_cheng@126.com

significantly reduced MFAP5-induced type I collagen expression. **Conclusion:** MFAP5 promotes fibroblast activation and extracellular matrix synthesis via the TGF-β1/Smad pathway, exacerbating BLM-induced pulmonary fibrosis.

Key Words MFAP5; Pulmonary Fibrosis; Bleomycin; TGF-β1/Smad Signaling Pathway

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种进行性、致命性且病因尚不明确的慢性间质性肺疾病[1-2]。IPF以不可逆的肺纤维化为特征,主要表现为进行性呼吸困难和肺功能受损,严重者可因呼吸衰竭而死亡[3]。流行病学数据[4]显示,IPF的年发病率为每10万人0.9至13.0例,诊断后中位生存期仅为3至5年。现有治疗手段包括抗纤维化药物和肺移植,但疗效有限且受制于供体稀缺和高昂费用[5-6]。因此,迫切需要开发新型治疗策略,以延缓疾病进展。

IPF的病理机制涉及肺成纤维细胞的激活及其向肌成纤维细胞的分化,伴随着细胞外基质的过度沉积,最终导致肺组织的结构重构和功能障碍[7-8]。近年来,研究[9-10]表明,诸多促纤维化因子及信号通路在成纤维细胞激活过程中发挥了重要作用。然而,这一复杂网络的具体机制仍未完全阐明。

微纤丝相关蛋白5(microfibril-associated protein 5,MFAP5)作为一种富含丝氨酸和苏氨酸的微纤丝相关蛋白,与纤维化和细胞外基质重塑密切相关[11]。在癌症、糖尿病等疾病模型中,MFAP5被发现参与成纤维细胞的激活和异常胶原沉积,抑制其表达可减轻纤维化程度[12-13]。然而,MFAP5在肺纤维化中的作用尚未得到深入研究。本研究旨在探索MFAP5在肺纤维化中的潜在作用及其可能涉及的分子机制,为理解肺纤维化的发病机制提供新的见解。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂 BLM来自HISUN(Hinz and Lagares,2020)。重组鼠MFAP5蛋白(rmMFAP5)购自R&D Systems(7345-MG-050)。MFAP5、Ⅰ型胶原蛋白(collagen type Ⅰ α1 chain,Col1a1)、Ⅲ型胶原蛋白(collagen type Ⅲ α chain,Col3a1)、α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)、纤连蛋白(fibronectin)、抗β-actin的抗体购自ABclonal(武汉,中国)。TGF-β受体Ⅰ抑制剂SB525334购自Selleck.cn(10 μmol•L^{-1})。

1.2 动物模型 6~8周龄雄性C57BL/6小鼠(Gempharmatech,江苏,中国),戊巴比妥麻醉小鼠后,通过气管内注射BLM(1.5 mg•kg^{-1})建立肺纤维化模型。对照组小鼠接受生理盐水注射。rmMFAP5组小鼠于BLM注射前3 d开始,每日气管内注射rmMFAP5(100 μg•kg^{-1})。记录小鼠体质量直至实验第21天取肺组织用于检测。动物实验得到了武汉大学动物实验中心实验动物管理与使用委员会的批准(批准号:WP20230654),并按照《实验动物护理和使用指南》进行。

1.3 细胞培养与质粒转染 原代肺成纤维细胞提取自野生型C57BL/6小鼠肺组织,培养于含10%胎牛血清(Gibco)、1%青霉素-链霉素的α-MEM培养基(Hyclone,SH30265)中。利用Lipofectamine 3000转染MFAP5表达质粒(或空载质粒)。转染48 h后进行后续实验。TGF-β受体抑制实验中,加入SB525334(10 μmol•L^{-1}),孵育24 h后检测。

1.4 肺组织学染色分析 肺组织固定于4%多聚甲醛24 h,梯度乙醇溶液脱水、二甲苯透明后石蜡包埋,切片厚度4 μm。切片经脱蜡水化后分别进行苏木精-伊红(HE)染色和马松(Masson)染色。显微镜下观察肺泡结构、炎症细胞浸润及胶原沉积面积,以评估纤维化程度。

1.5 免疫组化 石蜡切片经脱蜡、水化及Tris-EDTA抗原修复后,依次用过氧化物酶阻断剂和山羊血清封闭液封闭。切片分别加入α-SMA(Abcam)和Col1a1(Abcam)一抗,4 ℃孵育过夜,再用二抗室温孵育1 h。经DAB显色、苏木素复染后脱水封片,显微镜下观察。

1.6 qRT-PCR 提取的RNA采用FastKing cDNA第一链合成试剂盒(天根)逆转录为cDNA。使用SYBR GREEN mix试剂盒(康为世纪)检测MFAP5的表达水平。β-actin作为内参基因,相对表达量通过$\Delta\Delta Ct$法计算。

1.7 Western Blot 蛋白经10%SDS-PAGE电泳分离后转膜至PVDF膜。封闭后依次用一抗二抗孵育,用电化学发光(ECL)系统(Tanon,上海,中国)观察条带。

1.8 统计学分析 所有数据均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。统计分析使用GraphPad Prism 9.0软件

进行。组间差异采用单因素方差分析（ANOVA）。两组间比较采用独立样本 t 检验。$P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　MFAP5 在 BLM 诱导的小鼠肺纤维化中表达升高　利用 BLM 构建小鼠肺纤维化模型（图 1A）。检测发现在 BLM 处理后小鼠肺组织中 MFAP5 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高（图 1B，1C，1D）。同时，Col1a1 和 Fibronectin 的蛋白表达也明显升高（图 1C，1D）。

2.2　MFAP5 促进成纤维细胞活化及细胞外基质蛋白合成　为进一步探究 MFAP5 是否促进肺成纤维细胞的活化以及细胞外基质的表达，我们提取了野生型 C57BL/6 小鼠的肺成纤维细胞，并通过质粒转染成功实现 MFAP5 的过表达（图 2A，2B）。结果显示，MFAP5 过表达显著提高了小鼠肺成纤维细胞的 α-SMA（图 2C，2D）以及 Fibronectin、Col1a1 和 Col3a1 的蛋白表达水平（图 2E，2F）。

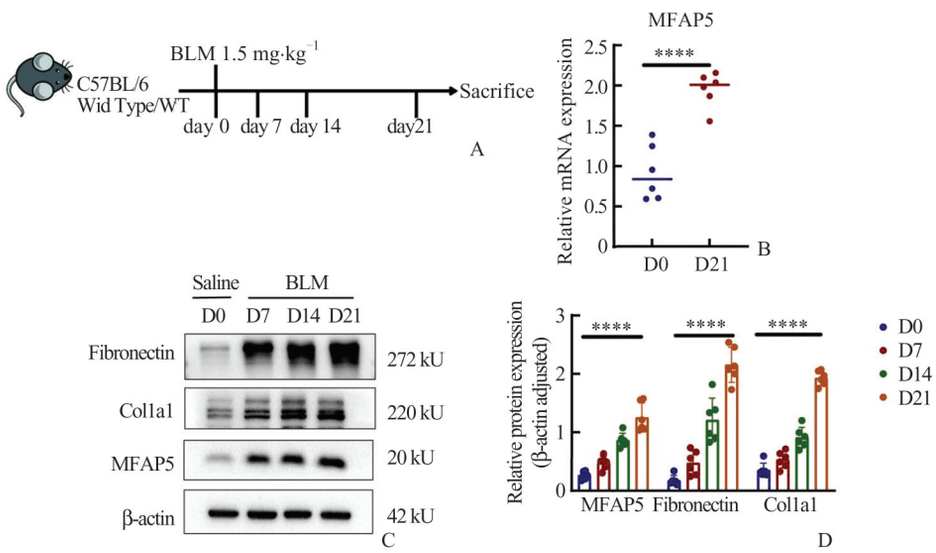


图 1　BLM 诱导造模对 MFAP5 表达及相关指标的影响

A. 动物实验流程图；B. BLM 造模后 MFAP5 mRNA 表达水平的变化；C. BLM 诱导造模后 MFAP5、Col1a1、Fibronectin 蛋白表达水平对比；D. C 中数据的统计分析。图中 day、D 均代表时间“天”；数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，$^{****}P<0.000\,1$。

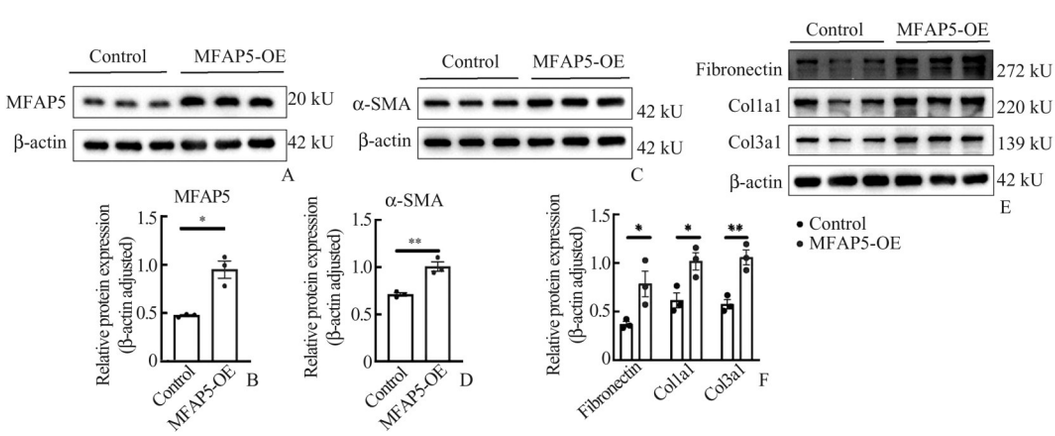


图 2　MFAP5 过表达对成纤维细胞活化和细胞外基质蛋白表达的影响

A. MFAP5 质粒转染后的蛋白表达水平；B. A 图的统计分析结果；C. 过表达 MFAP5 后 α-SMA 蛋白的表达水平；D. C 图的统计分析结果；E. 过表达 MFAP5 后 Fibronectin、Col1a1、Col3a1 表达水平；F. E 图的统计分析结果。数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

2.3　MFAP5 加重 BLM 诱导的小鼠肺纤维化　为了探究 MFAP5 是否能够促进肺纤维化的发展，我们在 BLM 诱导的小鼠肺纤维化模型中使用了 rmMFAP5 干预（图 3A）。结果显示，与 Saline＋BLM 组相比，rmMFAP5＋BLM 组的小鼠体质量下降更显著（图 3B）。Western Blot 检测结果表明，

rmMFAP5处理显著增强了Fibronectin和Col1a1的蛋白表达(图3C,3D)。

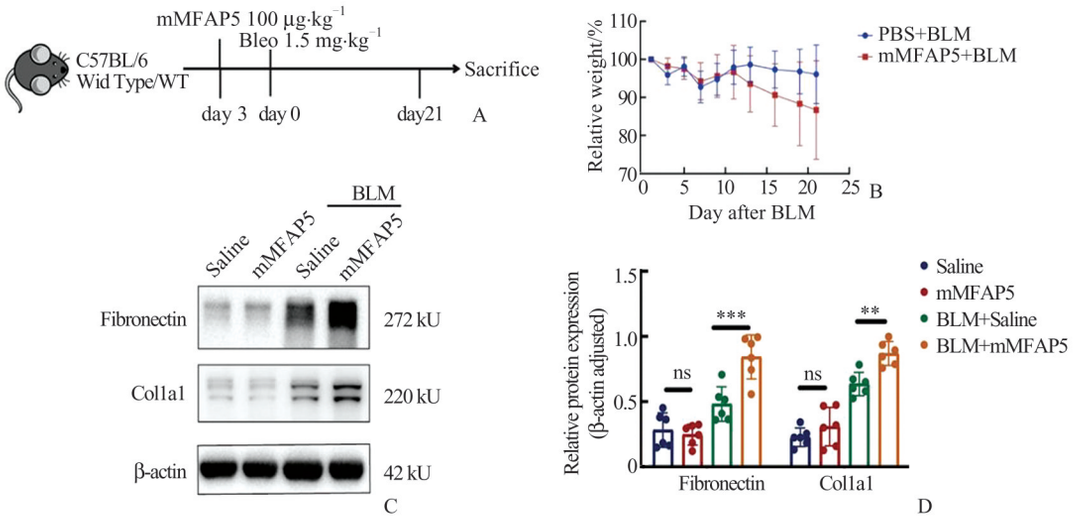


图3 rmMFAP5对BLM诱导的小鼠肺纤维化的影响

A. 实验流程图;B. 组间小鼠体质量的变化;C. Western Blot分析Fibronectin和Col1a1;D. C图结果的统计分析。图A中day代表时间"天";数据均以$\bar{x}\pm s$表示,ns:差异无统计学意义。$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$。

2.4 MFAP5加重BLM诱导纤维化小鼠肺组织的病理变化 为了探究MFAP5是否影响肺组织病变,我们进行了组织学和免疫组织化学分析。在生理状态下,单独给予rmMFAP5的小鼠肺组织结构正常(图4A)。然而,在BLM诱导的纤维化模型中,rmMFAP5+BLM组的小鼠表现出显著的肺泡结构破坏(图4A)。Masson染色结果显示,胶原沉积主要发生在纤维化组中,且rmMFAP5+BLM组更加显著(图4A)。免疫组织化学分析进一步表明,α-SMA的表达在纤维化条件下显著升高,且rmMFAP5+BLM组更加明显(图4B)。同时,Ⅰ型胶原的表达在rmMFAP5+BLM组显著增加(图4B)。

2.5 MFAP5通过激活TGF-β1/Smad信号通路调控细胞外基质蛋白的表达 TGF-β1/Smad信号通路在肺纤维化的发生发展中具有重要作用,因此我

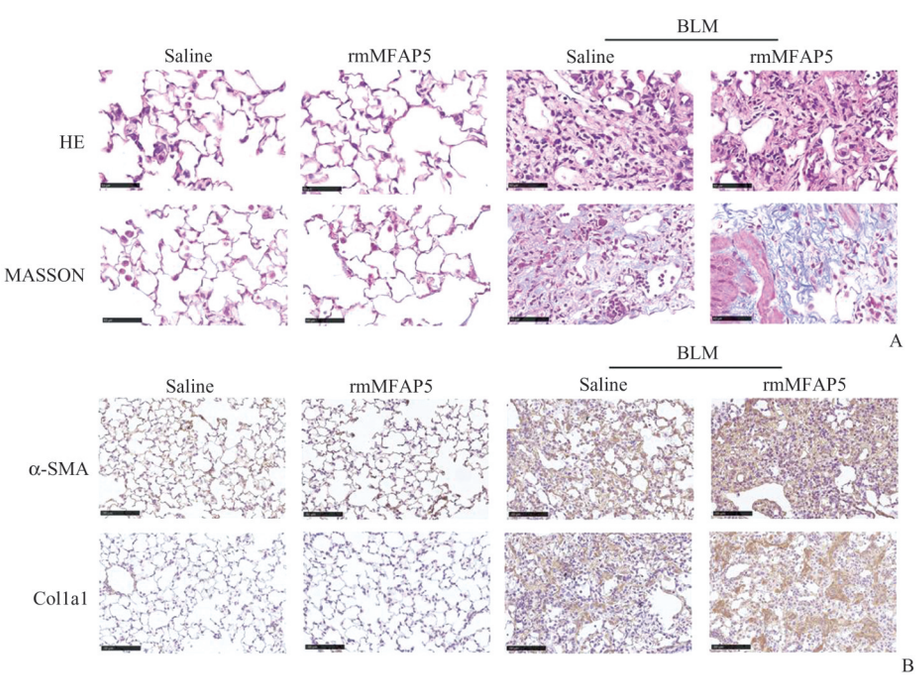


图4 组织学及免疫组织化学分析显示rmMFAP5加重了BLM诱导的小鼠肺纤维化

A. 不同组间肺组织的HE染色和Masson染色;B. 不同组间肺组织中α-SMA和Col1a1的免疫组化染色。标尺:100 μm(×200)。

们进一步探究 MFAP5 是否通过调控 TGF-β1/Smad 信号通路来发挥作用。在 MFAP5-OE 小鼠原代肺成纤维细胞中，检测 TGF-β1/Smad 信号通路相关蛋白的表达水平。结果显示，MFAP5 过表达显著提高了 TGF-β1 的蛋白表达水平，同时 Smad2/3 和磷酸化 Smad2/3 的表达也显著增加（图 5A）。

为了进一步验证 TGF-β1 信号通路在 MFAP5 调控细胞外基质蛋白表达中的作用，我们使用了选择性 TGF-β 受体Ⅰ抑制剂 SB525334 对过表达 MFAP5 的小鼠原代肺成纤维细胞进行处理，并检测 Col1a1 的表达水平。结果显示，MFAP5 过表达引起的 Col1a1 蛋白表达上调在 SB525334 处理后显著下降（图 5C，5D）。

3　讨论

肺纤维化是一种复杂且致命的间质性肺疾病，其特征是过度的细胞外基质沉积、肺组织结构的破坏以及功能丧失[1]。尽管肺纤维化的机制涉及多种分子和信号通路，但 MFAP5 在肺纤维化中的作用尚未被研究。本研究首次阐述了 MFAP5 在肺纤维化中的作用，并揭示其通过 TGF-β1/Smad 信号通路介导。

我们发现 BLM 诱导的小鼠肺纤维化模型中 MFAP5 表达显著上调，提示 MFAP5 可能在纤维化的发生发展中发挥重要作用。这一结果与之前关于 MFAP5 在其他组织纤维化中的研究[2-4,13]一致。本实验中，在小鼠肺成纤维细胞中过表达 MFAP5 显著上调了 α-SMA 和 Col1a1、Col3a1、Fibronecin 等纤维化标志物的表达。α-SMA 的表达表明成纤维细胞向肌成纤维细胞转化，这是纤维化发生的标志性事件，纤连蛋白和胶原作为细胞外基质的主要成分，其积累是纤维化的核心特征[6-7]。这些体外实验结果表明，MFAP5 可能通过促进成纤维细胞活化和细胞外基质蛋白合成加速纤维化的进程。体内实验进一步验证了 MFAP5 对纤维化的促进作用。rmMFAP5 处理显著加重 BLM 诱导的肺纤维化表现，包括胶原沉积和纤维化标志物的表达升高。

TGF-β1/Smad 信号通路是纤维化疾病中被广泛研究的机制之一，其激活能够促进细胞外基质的过度生成和成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化[14-17]。我们的研究进一步揭示了 MFAP5 通过激活 TGF-β1/Smad 信号通路来促进肺纤维化的作用机制。MFAP5 过表达显著增加了 TGF-β1 的表达，并促进了 Smad2/3 的磷酸化水平。更重要的是，TGF-β 受体Ⅰ抑制剂显著抑制了 MFAP5 诱导的Ⅰ型胶原表达上调，这进一步证明 TGF-β/Smad 信号通路在 MFAP5 介导的纤维化中的关键作用。

综上所述，本研究首次揭示了 MFAP5 在肺纤维化中的关键作用，并证明其通过激活 TGF-β1/Smad 信号通路促进纤维化标志物的表达。我们的研究为 MFAP5 作为肺纤维化治疗靶点提供了重要的理论依据。未来的研究应进一步探讨 MFAP5 的

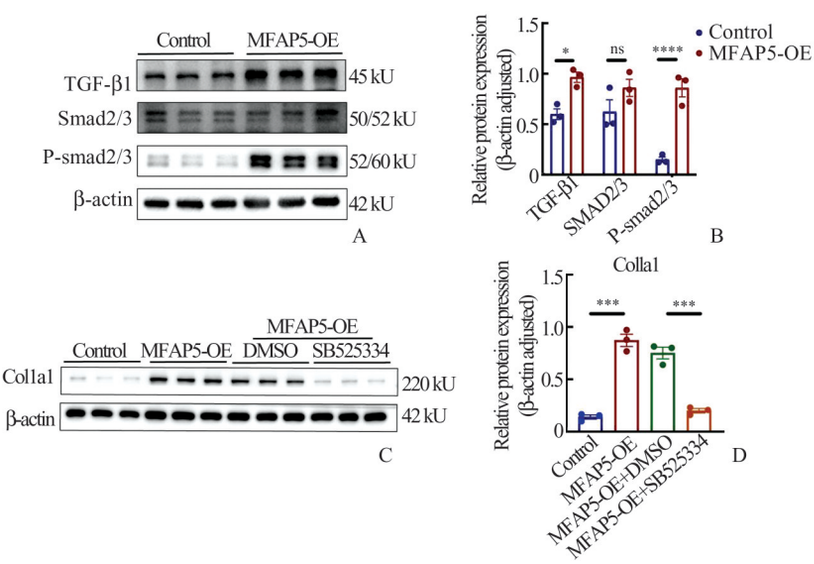


图 5　MFAP5 过表达对 TGF-β 信号通路及细胞外基质蛋白表达的影响

A. Western Blot 检测 C57BL/6 小鼠原代肺成纤维细胞过表达 MFAP5 后 TGF-β1、Smad2/3 及 P-Smad2/3 蛋白的表达水平；B. A 图的统计分析结果；C. Western Blot 检测 TGF-β 受体Ⅰ抑制剂处理后 Col1a1 蛋白的表达水平；D. C 图的统计分析结果。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，ns 为差异无统计学意义。$^{*}P<0.05$，$^{***}P<0.001$，$^{****}P<0.000\,1$。

上游调控机制及其在临床治疗中的应用潜力。

参考文献

[1] WYNN T A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis[J]. J Pathol, 2008, 214(2): 199-210.

[2] COLLARD H R. The age of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 181(8): 771-772.

[3] LEDERER D J, MARTINEZ F J. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. N Engl J Med, 2018, 378(19): 1811-1823.

[4] HUTCHINSON J, FOGARTY A, HUBBARD R, et al. Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review[J]. Eur Respir J, 2015, 46(3): 795-806.

[5] RICHELDI L, DU BOIS R M, RAGHU G, et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. N Engl J Med, 2014, 370(22): 2071-2082.

[6] NATHAN S D, SHLOBIN O A, WEIR N, et al. Lung transplantation in patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Chest, 2015, 147(5): 1178-1186.

[7] TZOUVELEKIS A, KAMINSKI N. Mechanisms and biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Front Med, 2015, 2: 57.

[8] HENDERSON N C, RIEDER F, WYNN T A. Targeting TGF-β in fibrosis: A contextual consideration for antifibrotic therapy[J]. Nat Rev Drug Discov, 2020, 19(12): 700-719.

[9] SAITO A, HORIE M, NAGASE T. Molecular mechanisms of TGF-β signaling in lung fibrosis[J]. Curr Pharm Des, 2008, 14(19): 2128-2136.

[10] GUO Y, XIAO L, SUN L, et al. Wnt/β-catenin signaling: A promising new target for fibrosis diseases[J]. Physiol Res, 2012, 61(4): 337-346.

[11] NGUYEN H T, DINH S, WENG R, et al. Role of MFAP5 in cardiac fibrosis[J]. Circ Res, 2019, 125(4): 456-469.

[12] ZHOU Z, JIANG R, YANG Z, et al. MFAP5 promotes fibrotic responses in fibroblasts via TGF-β signaling pathway[J]. Cell Biol Int, 2021, 45(4): 766-774.

[13] TAO J, CAI J, WU B, et al. MFAP5 regulates ECM remodeling and fibrosis in liver[J]. Hepatology, 2020, 72(3): 1033-1047.

[14] 张强, 李亮, 王晓. 肺纤维化中成纤维细胞激活的分子机制研究进展[J]. 武汉大学学报(医学版), 2019, 40(2): 256-260.
ZHANG Q, LI L, WANG X. Molecular mechanisms of fibroblast activation in pulmonary fibrosis [J]. Medical Journal of Wuhan University, 2019, 40(2): 256-260.

[15] REN L L, MIAO H, WANG Y N, et al. TGF-β as A master regulator of aging-associated tissue fibrosis[J]. Aging Dis, 2023, 14(5): 1633-1650.

[16] XIN X, CHENG X, ZENG F, et al. The role of TGF-β/SMAD signaling in hepatocellular carcinoma: From mechanism to therapy and prognosis[J]. Int J Biol Sci, 2024, 20(4): 1436-1451.

[17] ZHAO Z J, WU D J, LV D L, et al. Ellagic acid inhibits the formation of hypertrophic scars by suppressing TGF-β/Smad signaling pathway activity[J]. Chem Biol Drug Des, 2023, 102(4): 773-781.

(2024-12-26收稿)
编辑 沈建国