·基础研究·

FSTL3 在不同诱因所致的小鼠急性肺损伤中的表达

黄丽丹[1],王博[2*]
(武汉大学人民医院:[1] 麻醉科,[2] 胸外科,武汉 430060)

【摘 要】 **目的** 探讨人卵泡抑素样蛋白 3(FSTL3)在不同诱因所致的小鼠急性肺损伤中的表达及其意义。**方法** 采用腹腔注射脂多糖(LPS)构建脓毒血症肺损伤模型,采用左肺门夹闭后开放的方式构建缺血再灌注(IR)损伤模型。检测肺损伤不同时间点小鼠血清中 FSTL3 的蛋白表达水平,肺组织中 FSTL3 的蛋白及 mRNA 表达水平。使用 FSTL3 中和抗体(FSTL3-NA)或 FSTL3 基因敲除小鼠评估 FSTL3 抑制对两种诱因所致的小鼠肺损伤的影响。使用免疫印记法检测小鼠肺组织中肿瘤坏死因子-α(TNF-α),单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1),超氧化物歧化酶(SOD)1 和 SOD2 的蛋白表达水平。应用 GraphPad Prism 9.2 统计软件对数据进行分析。计量资料多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验。**结果** 小鼠血清中 FSTL3 的蛋白表达水平于 LPS 腹腔注射后 12 h 显著升高,18 h 达到峰值,后趋于稳定,均显著高于 0 h($P<0.05$);缺血 2 h,再灌注 2 h 后小鼠血清中 FSTL3 蛋白表达水平显著升高,再灌注 6 h 达到峰值,8 h 后蛋白表达水平仍显著高于 0 h($P<0.05$)。Western blotting 和转录实时定量聚合酶链反应显示,LPS 刺激 18 h 后小鼠肺组织中 FSTL3 的蛋白和 mRNA 表达水平达到峰值($P<0.05$);缺血 2 h,再灌注 2 h 后,小鼠肺组织中 FSTL3 的蛋白和 mRNA 表达水平显著升高($P<0.05$),再灌注 4 h 后,FSTL3 的蛋白和 mRNA 表达水平均达到峰值($P<0.05$)。FSTL3-NA 处理可明显减轻脓毒血症小鼠肺病理损伤,下调肺组织 TNF-α[(1.23±0.11)和(2.45±0.27)]和 MCP-1[(0.34±0.02)和(2.23±0.04)]的蛋白表达水平,上调 SOD1[(3.05±0.16)和(1.87±0.32)]和 SOD2[(2.45±0.19)和(1.61±0.24)]的蛋白表达水平(均 $P<0.05$)。FSTL3 基因敲除可明显减轻 IR 小鼠肺病理损伤,下调肺组织 TNF-α[(1.22±0.19)和(4.13±0.21)]和 MCP-1[(0.88±0.03)和(3.10±0.15)]的蛋白表达水平,上调 SOD1[(2.27±0.16)和(0.41±0.06)]和 SOD2[(2.04±0.13)和(0.19±0.05)]的蛋白表达水平(均 $P<0.05$)。**结论** LPS 或 IR 刺激后,小鼠血清及肺组织中的 FSTL3 明显升高,FSTL3 抑制或 FSTL3 基因敲除可明显减轻小鼠肺组织炎症和氧化应激。

【关键词】 卵泡抑素样蛋白 3;脓毒血症;缺血再灌注;炎症;氧化应激
【中图分类号】 R592 【文献标志码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2024.01.011

Expression of FSTL3 in acute lung injury in mice caused by different inducements

Huang Lidan[1], Wang Bo[2*]
([1]Department of Anesthesiology, [2]Department of Thoracic Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the expression of human follistatin-like protein 3 (FSTL3) in acute lung injury caused by different inducement in mice and its significance. **Methods** Mouse model of septic lung injury was established by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS), and the model of ischemia-reperfusion (IR) injury was established by clamping the left pulmonary hilum followed by opening. The protein expression level of FSTL3 in serum and the protein and mRNA expression level of FSTL3 in lung tissue were detected at different time points of lung injury. FSTL3 neutralizing antibodies (FSTL3-NA) or FSTL3 gene knockout mice were employed to evaluate the effect of FSTL3 inhibition on lung injury in mice inflicted by 2 types of injuries. Western blotting was applied to detect the protein levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), superoxide dismutase (SOD) 1 and SOD2 in the lung tissues. Statistical software GraphPad Prism 9.2 was used to analyze the data. One-way AVOVA was used to compare the measurement data between groups, and student's t test was performed for intergroup comparison. **Results** The serum protein level of FSTL3 was increased significantly in the mice at 12 h after intraperitoneal injection of LPS, reached a peak at 18 h, and then stabilized, both of which were significantly higher than 0 h ($P<0.05$). After 2 h ischemia and 2 h reperfusion, the serum protein level of FSTL3 was elevated significantly, summited at 6 h of reperfusion, and the protein level after 8 h reperfusion was still notably higher than that at 0 h ($P<0.05$). Western blotting and RT-PCR showed that the protein and mRNA levels of FSTL3 in the lung tissues reached the peaks after 18 h of LPS stimulation ($P<0.05$); after 2 h of ischemia and 2 h of reperfusion, its protein and mRNA levels in lung tissue

收稿日期: 2023-03-20; **接受日期**: 2023-06-06
基金项目: 湖北省自然科学基金指导性计划(2022CFC021)
通信作者: 王博, E-mail: rmh_wb@whu.edu.cn

were increased significantly ($P<0.05$), and reached the peaks after 4 h reperfusion ($P<0.05$). FSTL3-NA treatment obviously alleviated the lung pathological injury in sepsis mice, and down-regulated the protein levels of TNF-α[(1.23±0.11) *vs* (2.45±0.27)]and MCP-1 [(0.34±0.02)] *vs* (2.23±0.04)] in the lung tissue, while up-regulated the protein levels of SOD1 [(3.05±0.16) *vs* (1.87±0.32)] and SOD2 [(2.45±0.19) *vs* (1.61±0.24)] (all $P<0.05$). FSTL3 gene knockout also obviously alleviated the lung pathological injury in IR injured mice, and down-regulated the protein levels of TNF-α [(1.22±0.19) *vs* (4.13±0.21)] and MCP-1 [(0.88±0.03) *vs* (3.10±0.15)] in the lung tissue and up-regulated those of SOD1 [(2.27±0.16) *vs* (0.41±0.06)] and SOD2 [(2.04±0.13) *vs* (0.19±0.05)] (all $P<0.05$). **Conclusion** After LPS or IR stimulation, FSTL3 level is significantly increased in both mouse lung tissue and serum, while its inhibition or knockout could significantly reduce inflammation and oxidative stress in murine lung tissue.

【Key words】 follistatin-like protein 3; sepsis; ischemia reperfusion; inflammation; oxidative stress

This work was supported by the Project of Natural Science Foundation Guiding Plan of Hubei Province (2022CFC021).

Corresponding author: *Wang Bo*, *E-mail*: *rmh_wb@whu.edu.cn*

急性肺损伤是一种常见的危重症,病死率极高[1]。临床上,急性肺损伤患者主要表现为呼吸急促、紫绀、肺顺应性降低及肺水肿,病理特征主要以大量炎症细胞浸润,肺泡上皮和血管内皮屏障损伤为主[2]。根据病理进展,急性肺损伤被分为 4 个时期,包括早期渗出期、晚期渗出或增殖期、扁平上皮化生期以及晚期增殖期[3]。引起急性肺损伤常见原因包括肺炎、肺栓塞以及肺移植后缺血再灌注或肺叶切除,间接原因为脓毒血症和创伤[4]。目前临床针对急性肺损伤的治疗除对症支持外,尚无特殊治疗及预防手段[5]。此外,不同病因所致的急性肺损伤,分子作用机制也有所差异。因此,进一步加深对不同病因所致急性肺损伤发病机制的认识,解析其发生发展过程中的关键靶点,对急性肺损伤的干预具有重要意义。

人卵泡抑素样蛋白 3(follistatin-like protein 3, FSTL3)是 Hayette 等[6]于 1998 年在慢性淋巴细胞白血病患者 B 细胞中发现的一种新型分泌蛋白。近年来,越来越多的研究发现 FSTL3 参与调节多种生物过程,包括细胞分化、衰老、炎症、氧化应激、代谢、免疫、动脉硬化和肿瘤进展[7-9]。有研究发现,FSTL3 可通过诱导脂质沉积和巨噬细胞炎症反应加速动脉粥样硬化发生发展[10]。此外,FSTL3 在超重或肥胖个体的脂肪组织中高表达,并与机体炎症反应呈正相关[11]。哮喘患者支气管上皮细胞中 FSTL3 的低表达水平与肺成纤维细胞的活力降低存在显著相关性[12]。上述研究均提示,FSTL3 在炎症疾病中发挥重要作用,但 FSTL3 在急性肺损伤中的表达及作用目前尚未有研究报道。本研究通过构建脓毒血症肺损伤及肺缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)损伤两种急性肺损伤模型,观察 FSTL3 在肺损伤发生发展过程中的表达,同时使用 FSTL3 中和抗体(follistatin-like protein 3-neutralizing antibody, FSTL3-NA)或 FSTL3 基因敲除小鼠评估 FSTL3 抑制对急性肺损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)纯度为 97.53%,购自上海源叶生物科技有限公司;肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、FSTL3、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)1、SOD2、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH),均购自美国 Abcam 公司;FSTL3 中和抗体(follistatin-like 3-neutralizing antibody, FSTL3-NA),购自北京热景生物技术有限公司。

1.2 实验小鼠及急性肺损伤模型的构建

SPF 级野生型(wild type, WT)雄性 C57 BL/6 小鼠体质量 20~24 g,周龄 8~10 周,购自于湖北省实验动物研究中心。FSTL3 基因敲除雄性小鼠体质量 20~24 g,周龄 8~10 周,购自于赛业生物科技有限公司。

根据随机数表法,将 30 只 SPF 级 WT 雄性 C57 BL/6 小鼠随机分为 5 组,依次为 LPS 注射 0 h 组、6 h 组、12 h 组、18 h 组和 24 h 组,每组各 6 只,进行脓毒血症肺损伤造模。脓毒血症肺损伤模型具体构建过程:参考既往文献[6]报道的方式,小鼠腹腔单次注射 LPS 10 mg/kg,分别在 LPS 注射 0、6、12、18 及 24 h 后,腹腔注射 50 mg/kg 的 2%戊巴比妥钠溶液对小鼠进行麻醉。随后,使用眼科剪逐层剪开小鼠胸部皮肤并剪断肋骨,打开胸膜充分暴露肺及心脏。使用 1 ml 注射器,于心脏中抽取血液 0.6~0.8 ml。同时留取小鼠左肺组织,将左上肺组织置于 10%中性福尔马林溶液,左下肺组织剪碎后置于冻存管中,放置于-80℃冰箱。为进一步探讨 FSTL3-NA 干预对脓毒血症肺损伤的作用,另选取 18 只 SPF 级 WT 雄性 C57 BL/6 小鼠,根据随机数

表法,依次将其分为对照组、LPS组及治疗组(LPS+FSTL3-NA组),每组各6只。LPS组及LPS+FSTL3-NA组小鼠接受腹腔单次注射LPS10 mg/kg。LPS+FSTL3-NA组小鼠在LPS腹腔注射前2 d给予尾静脉注射FSTL3-NA 80 μg/d,其余步骤同上。

根据随机数表法,另将30只SPF级WT雄性C57 BL/6小鼠随机分为5组,依次为再灌注0 h组、2 h组、4 h组、6 h组、8 h组,每组各6只,进行肺IR造模。肺IR模型具体构建过程:参考既往文献[7]报道的方式,腹腔注射50 mg/kg的2%戊巴比妥钠溶液对小鼠进行麻醉。随后,将小鼠仰卧位固定于保温板上,左侧进胸后使用显微血管钳夹闭左肺门2 h,松夹后分别再灌注0、2、4、6及8 h。再灌注结束后使用1 ml注射器,于心脏中抽取血液0.6~0.8 ml。同时留取小鼠左肺组织,将左上肺组织置于10%中性福尔马林溶液,左下肺组织剪碎后置于冻存管中,放置于-80℃冰箱。

根据随机数表法,另将12只SPF级WT雄性C57 BL/6小鼠随机分为假手术(Sham)-WT组6只和IR-WT组6只,将12只FSTL3基因敲除(FSTL3 KO)小鼠随机分为Sham-FSTL3 KO组6只和IR-FSTL3 KO组6只,进行肺IR造模,IR组造模方法同上。

1.3 小鼠血清中FSTL3及TNF-α水平的检测

将各组小鼠全血样品在室温放置2 h后于4℃下以3 000转/min的速度进行离心20 min,上清液即为血清层。使用FSTL3酶联免疫吸附检测(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(批号:CT66668,上海初态生物科技有限公司)和TNF-α ELISA试剂盒(批号:CT66709,上海初态生物科技有限公司)对各组血清样本中的FSTL3和TNF-α含量进行检测,在450 nm波长下对各孔的吸光度进行读取并计算FSTL3和TNF-α的相对含量。

1.4 免疫印迹

用于4℃温度保存的磷酸盐缓冲液对小鼠肺组织充分洗涤后提取肺组织中总蛋白。通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳检测各组小鼠肺组织中相关蛋白的表达水平。一抗稀释倍数如下:TNF-α(1∶1 000)、FSTL3(1∶500)、MCP-1(1∶1 000)、SOD1(1∶1 000)、SOD2(1∶500)、GAPDH(1∶2 000)。

1.5 转录实时定量聚合酶链反应

使用Trizol试剂盒(批号:abs60154,上海爱必信生物科技有限公司)对各组小鼠肺组织中的总RNA进行抽提。使用紫外分光光度计对RNA纯度和浓度进行测定,样本在260 nm和280 nm的吸光度比值为1.9~2.1时则认为其质量合格。随后,使用互补DNA逆转录试剂盒将RNA逆转录为互补DNA。使用实时荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪进行PCR扩增,检测相应目的基因的循环阈值(cycle threshold, Ct)。最后,以$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算本研究中各目的基因的相对信使RNA(message RNA, mRNA)表达水平。

1.6 HE染色

将各组小鼠的左上肺组织固定并包埋后切成4 μm的组织切片。使用苏木素和伊红对肺组织切片进行HE染色。光镜下观察染色结果并对各组小鼠肺损伤程度进行评分。评分指标包括炎症细胞浸润、组织水肿和肺泡间隔增厚的程度[5]。各指标评分细则如下:肺组织正常为0分;损伤程度<25%为1分;25%≤损伤程度<50%为2分;50%≤损伤程度<75%为3分;75%≤损伤程度为4分。3项指标评分总和即为最终的肺损伤评分。

1.7 统计学处理

应用GraphPad Prism 9.2统计软件对数据进行分析。计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析(One-way ANOVA),两组间比较采用t检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 FSTL3在两种急性肺损伤小鼠血清中的表达

在LPS诱导的脓毒血症肺损伤模型中,LPS腹腔注射6 h后,血清中TNF-α的蛋白表达水平显著升高,12 h后达到峰值,24 h后水平仍显著高于0 h($P<0.05$;图1A);血清中FSTL3的蛋白表达水平在12 h显著升高,18 h达到峰值,后趋于稳定,均显著高于0 h($P<0.05$;图1A)。在IR诱导的急性肺损伤模型中,缺血2 h,再灌注2 h后,小鼠血清中TNF-α和FSTL3的蛋白表达水平均显著升高,6 h后达到峰值,8 h后水平仍显著高于0 h($P<0.05$;图1B)。

2.2 FSTL3在脓毒血症肺损伤小鼠肺组织中的表达

在LPS诱导的脓毒血症肺损伤模型中,LPS腹腔注射6 h后,小鼠肺组织中TNF-α的蛋白和mRNA表达水平显著升高;12 h后,TNF-α的mRNA表达水平达到峰值;18 h后,TNF-α的蛋白表达水平达到峰值(均$P<0.05$)。LPS腹腔注射6 h后,小鼠肺组织中FSTL3的mRNA表达水平显著升高;12 h后,FSTL3的蛋白表达水平著升高;18 h后,FSTL3的蛋白和mRNA表达水平均达到峰值(均$P<0.05$;表1,图2)。

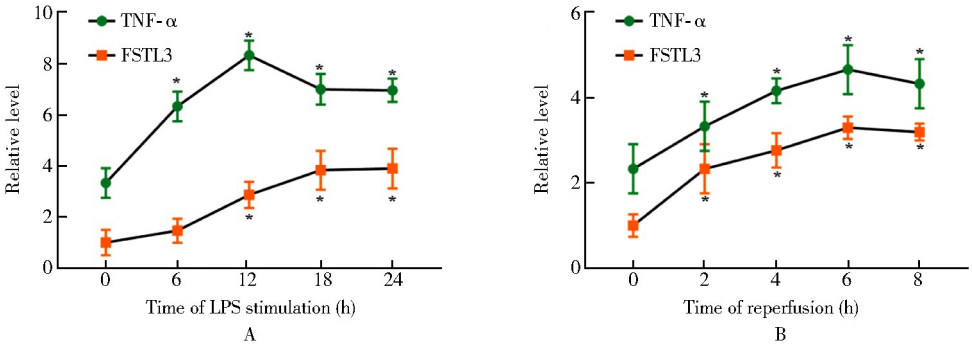


图 1 FSTL3 和 TNF-α 在两种急性肺损伤小鼠模型血清中的表达

Figure 1 Expression of FSTL3 and TNF-α in serum of two acute lung injury mice models ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

A: changes of serum TNF-α and FSTL3 protein levels in mice after intraperitoneal injection of LPS; B: changes of serum TNF-α and FSTL3 protein levels in reperfusion mice after 2 hours of ischemia. FSTL3: follistatin-like protein 3; TNF-α: tumor necrosis factor-α; LPS: lipopolysaccharide. Compared with 0 h, $^*P<0.05$.

表 1 LPS 腹腔注射后不同时间小鼠肺组织中 TNF-α 和 FSTL3 的蛋白及 mRNA 的相对表达量

Table 1 Relative expression of TNF-α and FSTL3 in mice lung tissue at different time points after intraperitoneal injection of LPS ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Time point	TNF-α		FSTL3	
	Protein	mRNA	Protein	mRNA
0 h	1.03±0.11	1.00±0.23	2.42±0.19	1.00±0.15
6 h	1.31±0.13*	4.03±0.31*	2.35±0.14	2.45±0.41*
12 h	3.13±0.31*	7.23±0.46*	4.63±0.41*	4.52±0.36*
18 h	5.02±0.41*	6.76±0.34*	6.91±0.12*	6.53±0.11*
24 h	4.10±0.26*	5.67±0.32*	2.02±0.04	4.92±0.45*

LPS: lipopolysaccharide; TNF-α: tumor necrosis factor-α; FSTL3: follistatin-like protein 3. Compared with 0 h, $^*P<0.05$.

表 2 缺血再灌注不同时间小鼠肺组织 TNF-α 和 FSTL3 的蛋白及 mRNA 的相对表达量

Table 2 Relative expression of TNF-α and FSTL3 in lung tissue of mice at different time points of ischemia-reperfusion ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Time point	TNF-α		FSTL3	
	Protein	mRNA	Protein	mRNA
0 h	4.12±0.29	1.00±0.21	0.82±0.14	1.00±0.19
2 h	5.24±0.45*	2.11±0.05*	2.14±0.31*	3.21±0.23*
4 h	7.11±0.66*	4.11±0.41*	4.51±0.29*	8.20±0.26*
6 h	5.26±0.62*	5.21±0.45*	3.03±0.16*	5.01±0.33*
8 h	4.11±0.38	4.05±0.33*	2.54±0.25*	3.45±0.41*

TNF-α: tumor necrosis factor-α; FSTL3: follistatin-like protein 3. Compared with 0 h, $^*P<0.05$.

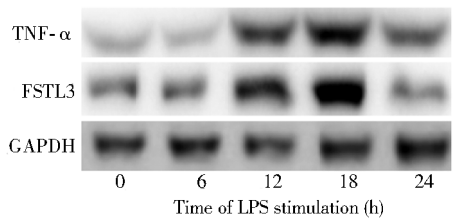


图 2 LPS 腹腔注射后不同时间小鼠肺组织中 TNF-α 和 FSTL3 蛋白表达的 Western blotting 检测

Figure 2 Western blotting of TNF-α and FSTL3 protein expression in lung tissue of mice at different time points after intraperitoneal injection of LPS ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

LPS: lipopolysaccharide; TNF-α: tumor necrosis factor-α; FSTL3: follistatin-like protein 3; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

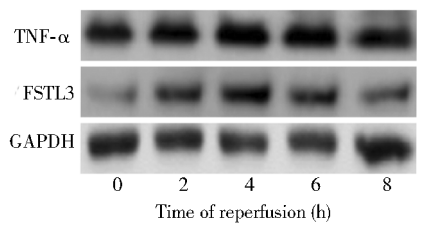


图 3 缺血再灌注不同时间小鼠肺组织中 TNF-α 和 FSTL3 蛋白表达的 Western blotting 检测

Figure 3 Western blotting of TNF-α and FSTL3 protein expression in lung tissue of mice at different time points of ischemia-reperfusion ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

TNF-α: tumor necrosis factor-α; FSTL3: follistatin-like protein 3; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

2.3 FSTL3 在肺 IR 损伤小鼠肺组织中的表达

在肺 IR 损伤小鼠模型中，缺血 2 h，再灌注 2 h 后，小鼠肺组织中 TNF-α 的蛋白和 mRNA 表达水平显著升高；再灌注 4 h 后，TNF-α 的蛋白表达水平达到峰值；再灌注 6 h 后，mRNA 表达水平均达到峰值（均 $P<0.05$）。缺血 2 h，再灌注 2 h 后，小鼠肺组织中 FSTL3 的蛋白和 mRNA 表达水平显著升高；再灌注 4 h 后，FSTL3 的蛋白和 mRNA 表达水平均达到峰值（均 $P<0.05$；表 2，图 3）。

2.4 FSTL3-NA 对脓毒血症小鼠肺病理损伤的影响

HE 染色结果表明，LPS 刺激 12h 后，与对照组相比，LPS 组小鼠肺组织出现了明显的炎症细胞浸润、组织水肿和肺泡间隔增厚，肺损伤评分明显增加［（8.15±2.54）和（1.04±0.15）分；$P<0.05$］。与 LPS 组相比，LPS+FSTL3-NA 组小鼠肺炎症细胞浸润、组织水肿和肺泡间隔增厚均明显减轻，肺损伤评分明显降低［（4.14±1.32）和（8.15±2.54）分；$P<0.05$；图 4）］。

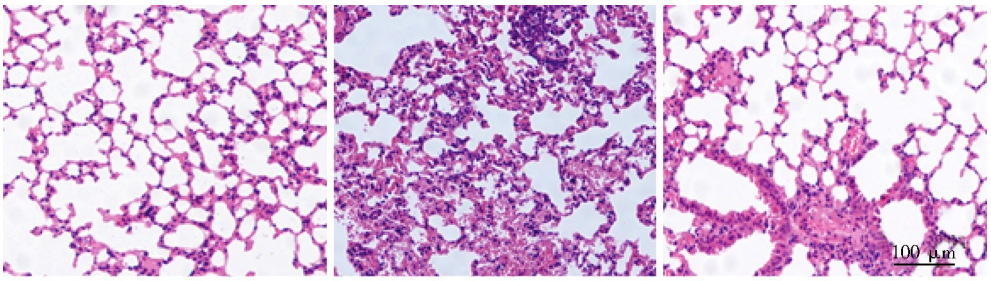


图 4 FSTL3-NA 对脓毒血症小鼠肺病理损伤的影响

Figure 4 Effects of FSTL3-NA on lung pathological injury in septic mice

FSTL3-NA: follistatin-like protein 3-neutralizing antibody; LPS: lipopolysaccharide.

Western blotting 结果表明,与对照组相比,LPS 刺激可明显上调小鼠肺组织中 TNF-α 和 MCP-1 的蛋白表达水平($P<0.05$),同时下调 SOD1 和 SOD2 的蛋白表达水平($P<0.05$)。与 LPS 组相比,FSTL3-NA 预处理可明显下调脓毒血症小鼠肺组织中 TNF-α 和 MCP-1 的蛋白表达水平($P<0.05$),同时上调 SOD1 和 SOD2 的蛋白表达水平($P<0.05$;表 3,图 5)。

表 3 FSTL3-NA 对脓毒血症小鼠肺组织中 TNF-α, MCP-1, SOD1 和 SOD2 蛋白表达的影响

Table 3 Effects of FSTL3-NA on expression of TNF-α, MCP-1, SOD1 and SOD2 proteins in lung tissue of septic mice ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Item	Control group	LPS group	LPS+FSTL3-NA group
TNF-α	0.34±0.04	2.45±0.27*	1.23±0.11#
MCP-1	0.41±0.03	2.23±0.04*	0.34±0.02#
SOD1	4.23±0.41	1.87±0.32*	3.05±0.16#
SOD2	4.52±0.25	1.61±0.24*	2.45±0.19#

FSTL3-NA: follistatin-like protein 3-neutralizing antibody; TNF-α: tumor necrosis factor-α; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; SOD1: superoxide dimutase 1; SOD2: superoxide dimutase 2; LPS: lipopolysaccharide. Compared with control group, *$P<0.05$; compared with LPS group, #$P<0.05$.

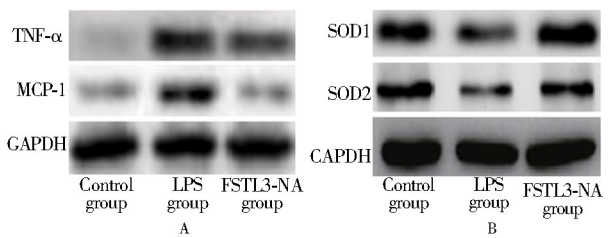


图 5 FSTL3-NA 对脓毒血症小鼠肺组织炎症及氧化应激的影响

Figure 5 Effects of FSTL3-NA on lung inflammation and oxidative stress in septic mice

A: protein expression of TNF-α and MCP-1 by western blotting; B: protein expression of SOD1 and SOD2 by western blotting. FSTL3-NA: follistatin-like protein 3-neutralizing antibody; TNF-α: tumor necrosis factor-α; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; SOD1: superoxide dimutase 1; SOD2: superoxide dimutase 2; LPS: lipopolysaccharide.

2.5 FSTL3 敲除对 IR 小鼠肺病理损伤的影响

HE 染色结果表明,与 Sham-WT 组相比,IR-WT 组小鼠肺损伤评分明显增加[(7.66±1.43)分和(1.21±0.31)分;$P<0.05$]。与 IR-WT 组相比,IR-FSTL3 KO 组小鼠肺病理损伤明显减轻,且肺损伤评分明显降低[(2.34±0.23)和(7.66±1.43)]分;$P<0.05$;图 6]。

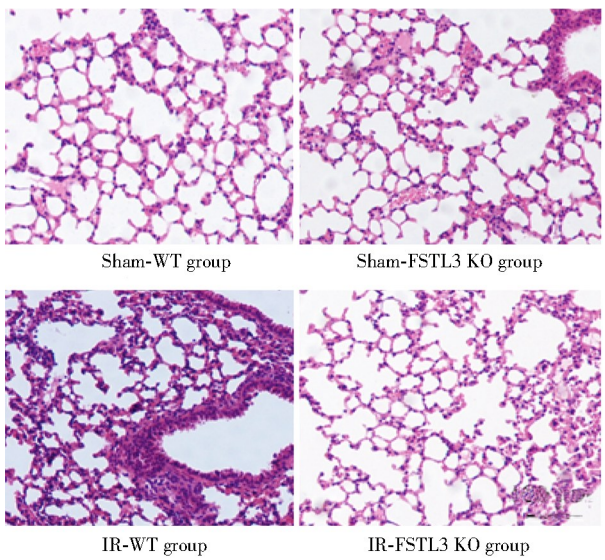


图 6 FSTL3 基因敲除对 IR 小鼠肺病理损伤的影响

Figure 6 Effects of FSTL3 gene knockout on lung pathological injury in IR mice

FSTL3: follistatin-like 3; IR: ischemia reperfusion; WT: wild type; KO: knockout.

Western blotting 结果表明,与 Sham-WT 组相比,缺血 2 h 再灌注 4 h 可明显上调野生型小鼠肺组织中 TNF-α 和 MCP-1 的蛋白表达水平($P<0.05$),同时下调 SOD1 和 SOD2 的蛋白表达水平($P<0.05$)。与 IR-WT 组相比,FSTL3 敲除可明显下调 IR 小鼠肺组织中 TNF-α 和 MCP-1 的蛋白表达水平($P<0.05$),同时上调 SOD1 和 SOD2 的蛋白表达水平($P<0.05$;表 4,图 7)。

表 4 FSTL3 基因敲除对 IR 小鼠肺组织中 TNF-α, MCP-1, SOD1 和 SOD2 蛋白表达的影响

Table 4 Effects of FSTL3 gene knockout on expression of TNF-α, MCP-1, SOD1 and SOD2 proteins in lung tissue of IR mice

($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Item	Sham-WT group	Sham-FSTL3 KO group	IR-WT group	IR-FSTL3 KO group
TNF-α	0.79±0.11	0.82±0.14	4.13±0.21*	1.22±0.19#
MCP-1	1.24±0.22	1.11±0.19	3.10±0.15*	0.88±0.03#
SOD1	4.04±0.24	4.26±0.21	0.41±0.06*	2.27±0.16#
SOD2	2.13±0.12	2.44±0.08	0.19±0.05*	2.04±0.13#

FSTL3: follistatin-like protein 3; IR: ischemia reperfusion; TNF-α: tumor necrosis factor-α; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; SOD1: superoxide dimutase 1; SOD2: superoxide dimutase 2; WT: wild type; KO: knockout. Compared with Sham-WT group, * $P<0.05$; compared with IR-WT group, # $P<0.05$.

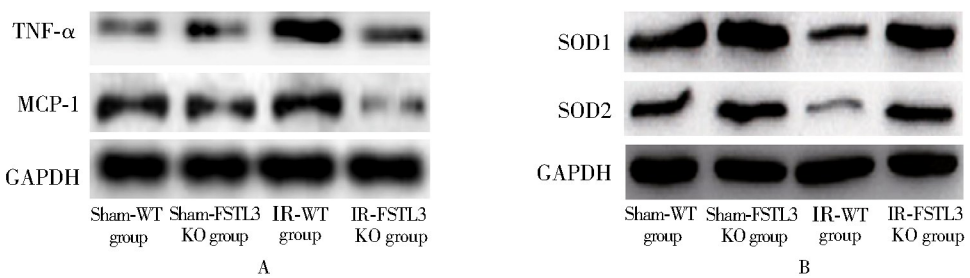


图 7 FSTL3 基因敲除对 IR 小鼠肺组织炎症及氧化应激的影响

Figure 7 Effects of FSTL3 gene knockout on lung inflammation and oxidative stress in IR mice

A: protein expression of TNF-α and MCP-1 by western blotting; B: protein expression of SOD1 and SOD2 by western blotting. FSTL3: follistatin-like 3; IR: ischemia reperfusion; TNF-α: tumor necrosis factor-α; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; SOD1: superoxide dimutase 1; SOD2: superoxide dimutase 2; WT: wild type; KO: knockout.

3 讨 论

急性肺损伤是一种由多种致病因素引起的临床综合征,包括急性肺炎、脓毒血症、外伤、肺 IR、严重外伤及急性胰腺炎等[1,3,4]。急性肺损伤以肺部剧烈炎症反应和肺上皮及血管内皮屏障受损为主要特征,若不及时控制,最终可发展为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)甚至引起死亡[13]。尽管机械通气可显著改善 ARDS 的症状,但 ARDS 所致的死亡率仍然高达 35%~55%[14]。LPS 是革兰氏阴性细菌细胞壁的主要成分,进入血液循环后可被天然免疫细胞识别并启动炎性介质的大量分泌,该过程会导致肺泡上皮和内皮屏障的破坏,损害宿主的正常呼吸功能,最终诱发急性肺损伤甚至 ARDS[15]。IR 损伤通常是由器官或组织床血流中断一段时间后血供突然恢复所诱发。在肺中,IR 损伤既可单独发生也可与其他损伤过程伴随发生,包括感染、缺氧、肺不张、机械通气损伤钝性(非穿透性)肺挫伤[16]。既往研究表明,不论是 LPS 诱导的脓毒血症肺损伤还是 IR 诱导的肺损伤,肺组织中均出现了过度激活的炎症反应和氧化应激[17,18]。因此,进一步探寻可减轻肺损伤期间炎症及氧化应激的药物或分子靶点,对于临床急性肺损伤的防治具有重要意义。

FSTL3 是一种富含酸性半胱氨酸的分泌糖蛋白,广泛分布于哺乳动物睾丸、肾上腺、脂肪、肺、胎儿心脏以及胎盘。FSTL3 基因定位于人类染色体 19p13[19]。FSTL3 与转化生长因子-β 家族配体(如激活素、骨形态发生蛋白和肌肉生长抑制素)通过不可逆地结合,使其生物活性降低。其中,FSTL3 对激活素的抑制作用最强,其次是肌肉生长抑制素,对骨形态发生蛋白的抑制作用最弱。同时,FSTL3 与上述配体结合后也易被细胞内吞降解[8]。既往研究显示,FSTL3 在能量代谢、骨骼形成与强化、造血细胞黏附与造血、多能干细胞分化、生殖发育等生理过程中发挥关键作用。例如,啮齿动物中 FSTL3 的抑制可导致内脏脂肪量减少,并增加小鼠胰岛素敏感性[20]。此外,FSTL3 敲除可明显改善主动脉缩窄术诱发的小鼠心脏功能与心室肥厚,其机制可能与 FSTL3 敲低后激活素 A 上调介导的抗凋亡蛋白 Bcl-2 过表达有关[21]。然而 FSTL3 是否在脓毒血症肺损伤及肺 IR 损伤中发挥作用,目前尚不清楚。本研究结果显示,FSTL3 蛋白在 LPS 诱导的脓毒血症肺损伤模型和 IR 诱导的肺损伤模型小鼠血清中表达均明显升高,且 FSTL3 蛋白表达水平与炎症标志物 TNF-α 的蛋白变化趋势一致,表明 FSTL3 可能与两种诱因所致的小鼠急性肺损伤存在潜在相关性。特

别地,我们发现在 LPS 刺激 12 h 后,血清中 TNF-α 的蛋白水平到达峰值,18 h 后,肺组织中 TNF-α 的蛋白水平达到峰值,表明 LPS 刺激 12 h 后全身炎症反应最激烈,18 h 后肺内炎症最激烈。有趣的是,肺组织中 FSTL3 和 TNF-α 的蛋白变化水平趋势基本一致,提示 LPS 刺激后,肺组织中 FSTL3 与炎症存在明显的交互作用。在 IR 模型中,血清中 TNF-α 和 FSTL3 的变化水平趋势基本完全一致,但肺组织中,FSTL3 蛋白较 TNF-α 蛋白水平提前达到峰值。我们推测这种差异可能与两种模型中炎症类型差异有关。LPS 诱导的是一种有菌性的全身性炎症[22],而 IR 诱导的损伤则为一种局部的无菌性炎症[23]。全身性炎症可能对炎症具有放大效应,而 IR 诱导炎症则对肺组织的局部效应更为明显。

此外,本研究还发现,使用中和抗体抑制小鼠体内 FSLT3 后可明显减轻脓毒血症小鼠肺病理损伤,炎症反应及氧化应激。在小鼠 IR 损伤模型中,FSLT3 基因敲除也可明显减轻脓毒血症小鼠肺病理损伤、炎症反应及氧化应激。结合两种肺损伤模型,抑制 FSLT3 水平均可发挥明显的肺保护作用。尽管如此,本研究仍旧存在以下不足之处:(1)本研究只在动物层面探索了 FSLT3 对肺损伤表型的影响,未在细胞层面对 FSLT3 的作用加以验证;(2)本研究未对 FSLT3 通过何种靶点调控炎症和氧化应激进行探索。

综上,FSLT3 在不同病因诱导的肺损伤模型中表达均发生改变,且在肺损伤发生发展中呈现动态改变,提示 FSLT3 参与急性肺损伤的病理发展。此外,靶向抑制 FSTL3 可显著减轻脓毒血症或 IR 所致的急性肺损伤,基于 FSTL3 的分子靶点可能为今后急性肺损伤的防治提供新方向。

【参考文献】

[1] Butt Y, Kurdowska A, Allen TC. Acute lung injury: a clinical and molecular review[J]. Arch Pathol Lab Med, 2016, 140(4): 345-350. DOI: 10.5858/arpa.2015-0519-RA.

[2] Beasley MB. Acute lung injury — from cannabis to COVID[J]. Mod Pathol, 2022, 5(Suppl 1): 1-7. DOI: 10.1038/s41379-021-00915-6.

[3] Cheng P, Li S, Chen H. Macrophages in lung injury, repair, and fibrosis[J]. Cells, 2021, 10(2): 436. DOI: 10.3390/cells10020436.

[4] Mokrá D. Acute lung injury — from pathophysiology to treatment[J]. Physiol Res, 2020, 69(Suppl 3): S353-S366. DOI: 10.33549/physiolres.934602.

[5] Ning L, Rui X, Guorui L, *et al*. A novel mechanism for the protection against acute lung injury by melatonin: mitochondrial quality control of lung epithelial cells is preserved through SIRT3-dependent deacetylation of SOD2[J]. Cell Mol Life Sci, 2022, 79(12): 610. DOI: 10.1007/s00018-022-04628-0. PMID: 36449070.

[6] Hayette S, Gadoux M, Martel S, *et al*. FLRG (follistatin-related gene), a new target of chromosomal rearrangement in malignant blood disorders[J]. Oncogene, 1998, 16(22): 2949-2954. DOI: 10.1038/sj.onc.1201807.

[7] Schneyer A, Sidis Y, Xia Y, *et al*. Differential actions of follistatin and follistatin-like 3[J]. Mol Cell Endocrinol, 2004, 225(1-2): 25-28. DOI: 10.1016/j.mce.2004.02.009.

[8] Tian S, Xu X, Yang X, *et al*. Roles of follistatin-like protein 3 in human non-tumor pathophysiologies and cancers[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 953551. DOI: 10.3389/fcell.2022.953551.

[9] Liu Y, Li J, Zeng S, *et al*. Bioinformatic analyses and experimental verification reveal that high FSTL3 expression promotes EMT *via* fibronectin-1/α5β1 interaction in colorectal cancer[J]. Front Mol Biosci, 2021, 8: 762924. DOI: 10.3389/fmolb.2021.762924.

[10] Runhua M, Qiang J, Yunqing S, *et al*. FSTL3 induces lipid accumulation and inflammatory response in macrophages and associates with atherosclerosis[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2019, 74(6): 566-573. DOI: 10.1097/FJC.0000000000000742.

[11] Li X, Zhang H, Ma X, *et al*. FSTL3 is highly expressed in adipose tissue of individuals with overweight or obesity and is associated with inflammation[J]. Obesity (Silver Spring), 2023, 31(1): 171-183. DOI: 10.1002/oby.23598.

[12] James RG, Reeves SR, Barrow KA, *et al*. Deficient follistatin-like 3 secretion by asthmatic airway epithelium impairs fibroblast regulation and fibroblast-to-myofibroblast transition[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2018, 59(1): 104-113. DOI: 10.1165/rcmb.2017-0025OC.

[13] Ju M, Liu B, He H, *et al*. MicroRNA-27a alleviates LPS-induced acute lung injury in mice *via* inhibiting inflammation and apoptosis through modulating TLR4/MyD88/NF-κB pathway[J]. Cell Cycle, 2018, 17(16): 2001-2018. DOI: 10.1080/15384101.2018.1509635.

[14] Long ME, Mallampalli RK, Horowitz JC. Pathogenesis of pneumonia and acute lung injury[J]. Clin Sci (Lond), 2022, 136(10): 747-769. DOI: 10.1042/CS20210879.

[15] Chen H, Bai C, Wang X. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine[J]. Expert Rev Respir Med, 2010, (6): 773-783. DOI: 10.1586/ers.10.71. PMID: 21128752.

[16] Capuzzimati M, Hough O, Liu M. Cell death and ischemia-reperfusion injury in lung transplantation[J]. J Heart Lung Transplant, 2022, 41(8): 1003-1013. DOI: 10.1016/j.healun.2022.05.013.

[17] Li W, Terada Y, Tyurina YY, *et al*. Necroptosis triggers spatially restricted neutrophil-mediated vascular damage during lung ischemia reperfusion injury[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022, 119(10): e2111537119. DOI: 10.1073/pnas.2111537119.

[18] Xu Q, Ye Y, Wang Z, *et al*. NLRP3 knockout protects against lung injury induced by cerebral ischemia-reperfusion[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 6260102. DOI: 10.1155/2022/6260102.

[19] Maguer-Satta V, Rimokh R. FLRG, member of the follistatin family, a new player in hematopoiesis[J]. Mol Cell Endocrinol, 2004, 225(1-2): 109-118. DOI: 10.1016/j.mce.2004.07.009.

[20] Mukherjee A, Sidis Y, Mahan A, *et al*. FSTL3 deletion reveals roles for TGF-beta family ligands in glucose and fat homeostasis in adults[J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007, 104(4): 1348-1353. DOI: 10.1073/pnas.0607966104.

[21] Oshima Y, Ouchi N, Shimano M, *et al*. Activin a and follistatin-like 3 determine the susceptibility of heart to ischemic injury[J]. Circulation, 2009, 120(16): 1606-1615. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.872200.

[22] Kumar V. Pulmonary innate immune response determines the outcome of inflammation during pneumonia and sepsis-associated acute lung injury[J]. Front Immunol, 2020, 11: 1722. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01722.

[23] Capuzzimati M, Hough O, Liu M. Cell death and ischemia-reperfusion injury in lung transplantation[J]. J Heart Lung Transplant, 2022, 41(8): 1003-1013. DOI: 10.1016/j.healun.2022.05.013.

(编辑:和雨璇)