

肺表面活性蛋白B在肺泡II型上皮细胞中的过表达 及其在特发性肺纤维化中的潜在作用

郑焱^{1,2} 王林芳¹ 王国艳¹ 王少兵² 刘一平² 胡雪峰^{1*}

¹福建师范大学生命科学学院, 福建省发育与神经生物学重点实验室, 福州 350117;

²福建师范大学体育科学学院, 运动与健康福建省高校重点实验室, 福州 350117)

摘要 特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种病因复杂且缺乏有效治疗手段的严重慢性肺部疾病。该研究通过构建转基因小鼠模型, 特异性地在肺泡II型上皮细胞中过表达肺表面活性蛋白B(surfactant protein B, SP-B), 探讨其在IPF中的功能及其作用机制。研究结果发现了SP-B的过表达会导致小鼠肺组织结构受损、细胞外基质异常沉积, 并引发肺部炎症反应, 揭示了SP-B在IPF病理进程中的重要作用。此外, SP-B可能通过调控TGF- β 信号通路影响细胞增殖和细胞外基质蛋白表达, 从而促进肺纤维化的发展。该研究为IPF的病因学研究提供了新的视角, 并为基于*Sftpb*基因的治疗策略提供了潜在的靶点。

关键词 肺表面活性蛋白B; 特发性肺纤维化; 肺泡II型上皮细胞; 基因过表达

Overexpression of Pulmonary Surfactant Protein B in Alveolar Type II Epithelial Cells and Its Potential Role in Idiopathic Pulmonary Fibrosis

ZHENG Xi^{1,2}, WANG Linfang¹, WANG Guoyan¹, WANG Shaobing², LIU Yiping², HU Xuefeng^{1*}

¹Fujian Key Laboratory of Developmental and Neural Biology, College of Life Sciences, Fujian Normal University,

Fuzhou 350117, China; ²Provincial University Key Laboratory of Sport and Health Science,

School of Physical Education and Sport Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China)

Abstract IPF (idiopathic pulmonary fibrosis) is a severe chronic lung disease with complex etiology and lacking effective treatment. This study aimed to investigate the function and mechanism of pulmonary SP-B (surfactant protein B) in IPF by constructing a transgenic mouse model that specifically overexpressed SP-B in alveolar type II epithelial cells. The overexpression of SP-B led to structural damage in lung tissue, abnormal extracellular matrix deposition, and pulmonary inflammation, highlighting its critical role in IPF pathogenesis. Furthermore, SP-B promoted pulmonary fibrosis by regulating the TGF- β signaling pathway to affect cell proliferation and extracellular matrix protein expression. These findings offer new insights into the etiology of IPF and potential targets for *Sftpb* gene-based therapeutic strategies.

Keywords pulmonary surfactant protein B; idiopathic pulmonary fibrosis; alveolar type II epithelial cells; gene overexpression

收稿日期: 2024-09-11

接受日期: 2024-09-19

福建省自然科学基金(批准号: 2023J01510)资助的课题

*通信作者。Tel: 13055734898, E-mail: bioxfh@fjnu.edu.cn

Received: September 11, 2024

Accepted: September 19, 2024

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (Grant No.2023J01510)

*Corresponding author. Tel: +86-13055734898, E-mail: bioxfh@fjnu.edu.cn

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种原因不明的慢性间质性肺疾病, 临床表现为进行性呼吸困难和咳嗽, 其病理特征为肺泡结构破坏和肺纤维化形成^[1-3]。IPF的发病机制尚未完全清楚, 目前研究表明遗传因素、环境暴露和年龄等多种因素均可能涉及其中^[4-7]。近年来的研究表明, 肺泡II型上皮细胞在维持肺泡结构和功能中起着关键作用, 其功能障碍被认为是IPF发生的重要原因之一^[8-10]。

肺表面活性蛋白B (surfactant protein B, SP-B) 由 *Sftpb* 基因编码, 在肺泡II型上皮细胞中合成并分泌, 其主要功能是降低肺泡表面张力, 防止肺泡塌陷^[11]。已有研究表明, *Sftpb* 基因的突变或表达异常与多种肺部疾病, 例如肺泡蛋白沉积症和急性呼吸窘迫综合征等的发生密切相关^[12-14]。然而, SP-B在IPF中的具体作用及其机制尚未得到充分研究。

肺纤维化的一个重要特征是细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的异常沉积, 这主要由成纤维细胞和肌成纤维细胞过度增殖和分泌ECM成分引起^[15-16]。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 信号通路在纤维化过程中起着关键作用, 它不仅能促进成纤维细胞的活化和ECM蛋白的合成, 还能通过自分泌和旁分泌途径调控多种细胞功能^[17-18]。有研究表明, TGF- β 信号通路可调控肺泡II型上皮细胞与成纤维细胞之间的上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 从而参与肺纤维化进程^[19]。

本研究利用 Tet-on 和 Cre/loxP 系统特异性地在成体小鼠肺泡II型上皮细胞中过表达 *Sftpb* 基因, 旨在探究 SP-B 对肺部稳态的影响及其在 IPF 中的功能与潜在机制, 以期对 IPF 的病因学研究提供新的见解, 也为开发基于 *Sftpb* 基因的治疗策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体 过表达载体 pMes-STOP-IRES-eGFP 由美国杜兰大学陈一平教授馈赠, 保存于福建省发育与神经生物学重点实验室。

1.1.2 实验动物 *SP-C-rtTA* 和 (*tetO*)₇-*Cre* 转基因小鼠购于南京大学模式动物中心; C57BL/6 小鼠购于上海斯莱克实验动物有限责任公司。以上实验小

鼠均在福建师范大学实验动物中心自行繁殖。本研究动物实验均遵循《中华人民共和国实验动物管理条例》的相关规定进行, 并已通过福建师范大学实验动物伦理委员会审查批准 (批准号: IA-CUC-20230013)。

1.1.3 主要试剂 Trans1-T1 感受态细胞、质粒提取试剂盒 EasyPure[®] EndoFree Pro Plasmid MaxiPrep Kit 购于北京全式金生物有限公司; 非连接酶依赖型单片段快速克隆试剂盒 ClonExpress II One Step Cloning Kit 购于南京诺唯赞生物科技有限公司; 核酸纯化试剂盒 Wizard DNA Clean-Up 购于 Promega 公司; 限制性内切酶、逆转录体系和 PCR 相关试剂购于 TaKaRa 公司; 强力霉素 (doxycycline hyclate, Dox) 购于 Sigma 公司; 兔抗鼠 TNF- α 多克隆抗体、兔抗鼠 pro-SP-C 多克隆抗体、兔抗鼠 Smad2 单克隆抗体、兔抗鼠 Smad2 (phospho S467) 多克隆抗体、兔抗鼠 PDGFR- α 单克隆抗体、兔抗人 Hopx 多克隆抗体、鸡来源 GFP 多克隆抗体购于 Abcam 公司; 兔抗人 I 型胶原蛋白 (collagen I) 多克隆抗体购于 Proteintech 公司; 鼠抗人 SP-B 单克隆抗体、鼠抗人 IL-18 单克隆抗体、羊抗人纤连蛋白 (fibronectin) 多克隆抗体购于 Santa Cruz Biotechnology 公司; 羊抗鼠 IL-13 多克隆抗体购于 R&D Systems 公司; 兔抗鼠 Ki-67 单克隆抗体购于 Spring Bioscience 公司; Alexa Fluor 488 标记驴抗兔 IgG、Alexa Fluor 594 标记驴抗小鼠 IgG、Alexa Fluor 680 标记驴抗小鼠 IgG、Alexa Fluor 790 标记驴抗兔 IgG 均购于 ThermoFisher Scientific 公司; Western blot 及蛋白提取相关试剂购于上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 克隆 *Sftpb* 基因 Trizol 法提取野生型小鼠肺组织的总 RNA, 取 2 μ g 用一步法逆转录成 cDNA。使用 NCBI 网站设计目的基因 *Sftpb* 的扩增引物 (引物序列见表 1), 通过 PCR 扩增 *Sftpb* 基因片段, 再使用核酸纯化试剂盒进行回收。

1.2.2 构建重组质粒 使用 *EcoR* I 酶线性化过表达载体 pMes-STOP-IRES-eGFP, 并对酶切产物进行回收。利用快速克隆试剂盒将目的基因片段与线性化载体进行体外重组。通过热激法将重组子转化入 Trans1-T1 感受态细胞中并进行培养; 吸取 1 μ L 菌液通过 PCR 初步鉴定出正确的单克隆, 再送往测序公司进行测序鉴定。最后使用微量质粒提取试剂盒对

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因/基因型 Gene/genotype	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
<i>Sftp</i>	Forward: ATG GCC AAG TCG CAC CTA CT Reverse: TCA GAG GTG TGG GGT TTG G
<i>pMes-Sftp</i>	Forward: CCC CCT GAA CCT GAA ACA TA Reverse: AGC TGC TTC CGA CTC ACA TC
<i>SP-C-rtTA</i>	Forward: GAC ACA TAT AAG ACC CTG GTC A Reverse: AAA ATC TTG CCA GCT TTC CCC
<i>(tetO)₇-Cre</i>	Forward: TGC CAC GAC CAA GTG ACA GCA ATG Reverse: AGA GAC GGA AAT CCA TCG CTC G

重组质粒进行提取,酶切线性化并纯化回收。

1.2.3 原核显微注射 先对供体雌鼠注射绒毛膜促性腺激素后再使之与正常雄鼠交配,随后获取处于原核期的受精卵。同时使正常雌鼠与结扎雄鼠进行交配产生假孕受体母鼠备用。利用显微操作技术将已纯化的线性重组质粒注射入受精卵的原核内,并放置于特殊培养基中培养,而后移植到假孕受体母鼠的输卵管或子宫内,使其正常发育。

1.2.4 转基因小鼠鉴定 剪取小鼠鼠尾5 mm左右放入EP管中,加入250 μ L 50 mmol/L氢氧化钠,于95 $^{\circ}$ C水浴锅中加热30 min。待鼠尾完全裂解后,加入25 μ L 1 mol/L Tris-HCl(pH=8.0),以13 000 r/min的转速离心5 min后,吸取上清进行PCR。用于基因型鉴定的引物序列见表1。

1.2.5 H&E染色 组织切片经60 $^{\circ}$ C预热后,置于二甲苯溶液中进行脱蜡处理,再使用梯度酒精(浓度由高到低,100%、95%、70%、50%)进行复水。而后组织切片先用苏木精染色3~5 min,水洗后用伊红染色1 min,再用梯度酒精(浓度由低到高,50%、70%、95%、100%)进行脱水。最后,经二甲苯透明化后,用中性树胶封片保存。

1.2.6 肺组织面积测量 采用Image Pro Plus软件对H&E染色的肺组织切片图像进行分析,通过手动沿肺组织边缘描绘轮廓,软件自动计算所选区域的面积,每个样本至少测量不同的三个区域,以评估肺组织占比。所得数据经GraphPad Prism软件进行统计分析。

1.2.7 AZAN染色 组织切片经脱蜡和复水后,先在60 $^{\circ}$ C下用偶氮卡红染色45 min,室温下继续染色10 min。随后,组织切片经蒸馏水清洗,在苯胺乙醇

中分化至细胞核显鲜红色。再经去苯胺处理和磷酸溶液染色2 h,最后用苯胺蓝橘黄G染色2 h。染色完成后,用95%乙醇处理至胶原纤维显深蓝色,最后按H&E染色方法进行脱水、透明化并封片保存。

1.2.8 免疫荧光染色 将石蜡组织切片按H&E染色方法进行脱蜡、复水后,置于1%柠檬酸钠缓冲液中高压高温加热5 min后,待其自然冷却。在切片上滴加5% BSA,于室温下封闭1 h;滴加相应一抗稀释液(1:200),并于4 $^{\circ}$ C条件下过夜孵育。次日滴加二抗稀释液(1:1 000),于室温下孵育1 h;滴加DAPI稀释液进行细胞核染色2 min;最后滴加防荧光猝灭剂进行封片,使用激光共聚焦显微镜观察并拍照。

1.2.9 免疫荧光细胞计数 采用ImageJ软件对免疫荧光的肺组织切片图像进行阳性细胞计数。先在ImageJ软件中调整免疫荧光图像的亮度和对比度,优化荧光信号的可视化效果。利用软件的阈值工具设定可区分阳性细胞与背景的阈值,使得阳性细胞在图像中被明确标记。通过软件的细胞计数插件,对标记的阳性细胞进行自动计数,并在每个样本的多个视域内重复计数以提高统计的可靠性。

1.2.10 Western blot 获取小鼠肺组织并提取总蛋白质,采用BCA法检测浓度;取40 μ g蛋白质经12%的SDS-PAGE分离,而后在200 mA恒流条件下进行湿转,将蛋白质转移至PVDF膜;加入5% BSA于室温下封闭1 h;再加入相应一抗稀释液(1:1 000),并于4 $^{\circ}$ C条件下过夜孵育。次日使用TBST洗去游离抗体,加入荧光标记的驴抗小鼠或兔IgG二抗(1:5 000),于室温下孵育1 h;之后使用Odyssey CLx红外双色激光成像系统进行扫描拍照,并计算其灰度值。蛋白质相对表达水平=目的蛋白质灰度值/ β -actin蛋白质灰度值。

1.2.11 统计学分析 各实验均独立重复3次, 使用 GraphPad Prism 9.0软件进行统计学分析。定量资料结果数据以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组间数据比较采用 *t*检验, 多组间数据采用方差分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *pMes-Sftpb*转基因小鼠的制备

通过PCR扩增技术克隆编码SP-B的 *Sftpb* 基因的全长 mRNA 序列(图 1A)。将该基因序列与线性化的 *pMes-STOP-IRES-eGFP* 质粒重组连接, 并进行酶切线性化处理(图 1B)。利用显微注射技术, 将重组质粒导入供体雌鼠受精卵的原核中, 并移植至代孕母鼠子宫。新生小鼠出生后, 通过鼠尾基因组 DNA 提取和特异性引物 PCR 鉴定, 成功获得两只转基因小鼠(图 1C), 将其基因型命名为 *pMes-Sftpb*。

2.2 肺泡II型上皮细胞过表达SP-B转基因小鼠的构建与有效性验证

将 *pMes-Sftpb* 转基因小鼠与 *SP-C-rtTA* 和 *(tetO)₇-Cre* 工具鼠交配, 成功构建三转基因小鼠模型 *SP-C-rtTA;(tetO)₇-Cre;pMes-Sftpb* (简称为 *SPC-Cre;Sftpb*)。该模型通过特异性的 *SP-C* 启动子激活 *rtTA* 转录, 借助 Dox 诱导实现 *Sftpb* 及 *GFP* 基因的条件性过表达(图 2A)。经 Dox 处理 7 天的成年小鼠, 在肺组织中可观察到强烈的绿色荧光, 表明 *GFP* 基因表达成功(图

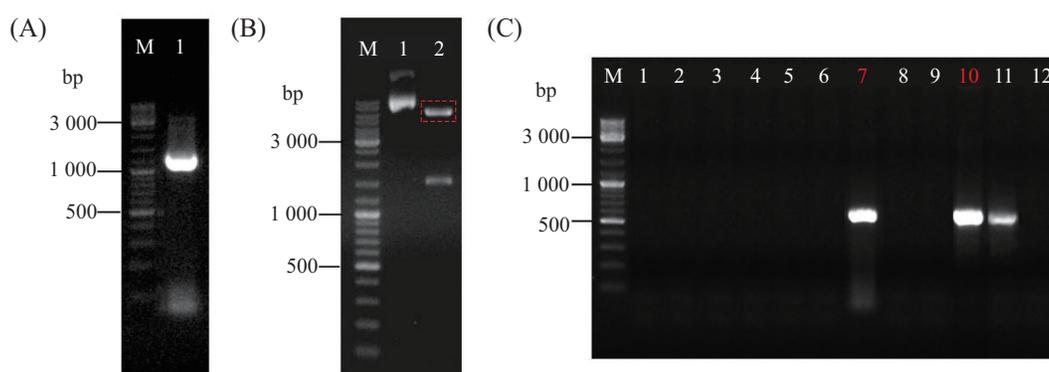
2B)。另外, Western blot 分析显示, 转基因小鼠肺组织中 SP-B 蛋白表达水平在 Dox 处理 7 天、1 个月和 2 个月后显著高于对照组(图 2C 和图 2D), 这也验证了 *Sftpb* 基因的过表达效果。

2.3 肺泡II型上皮细胞过表达SP-B导致特发性肺纤维化

在对 Dox 诱导的 *SPC-Cre;Sftpb* 转基因小鼠肺组织切片进行 H&E 染色后, 观察到肺组织结构破坏、肺泡壁明显增厚, 并伴有炎性细胞浸润(图 3A)。通过定量分析, 与对照组相比, 转基因小鼠的肺组织占比显著增加, 并且随着诱导时间的延长, 这种变化更为严重(图 3B)。AZAN 染色结果显示, 转基因小鼠肺组织中的胶原纤维含量明显增多(图 3C); 免疫荧光检测进一步证实, 与对照组相比, 转基因小鼠肺组织中的 I 型胶原蛋白(collagen I)和纤连蛋白(fibronectin) 表达水平显著提高(图 4A 和图 4B)。此外, 炎症因子 TNF- α 、IL-13 和 IL-18 在转基因小鼠肺部中异常大量表达(图 4C~图 4E)。以上结果表明在肺泡 II 型上皮细胞中过表达 SP-B 的小鼠模型中观察到的病理变化, 与 IPF 的临床特征表现出一定的相似性, 提示 SP-B 的过表达可能与 IPF 的病理过程有关。

2.4 过表达SP-B导致肺泡II型上皮细胞和成纤维细胞异常增殖

采用细胞增殖标记物 Ki67 对肺部细胞增殖进行检测。观察到经 Dox 处理的 *SPC-Cre;Sftpb* 转基因

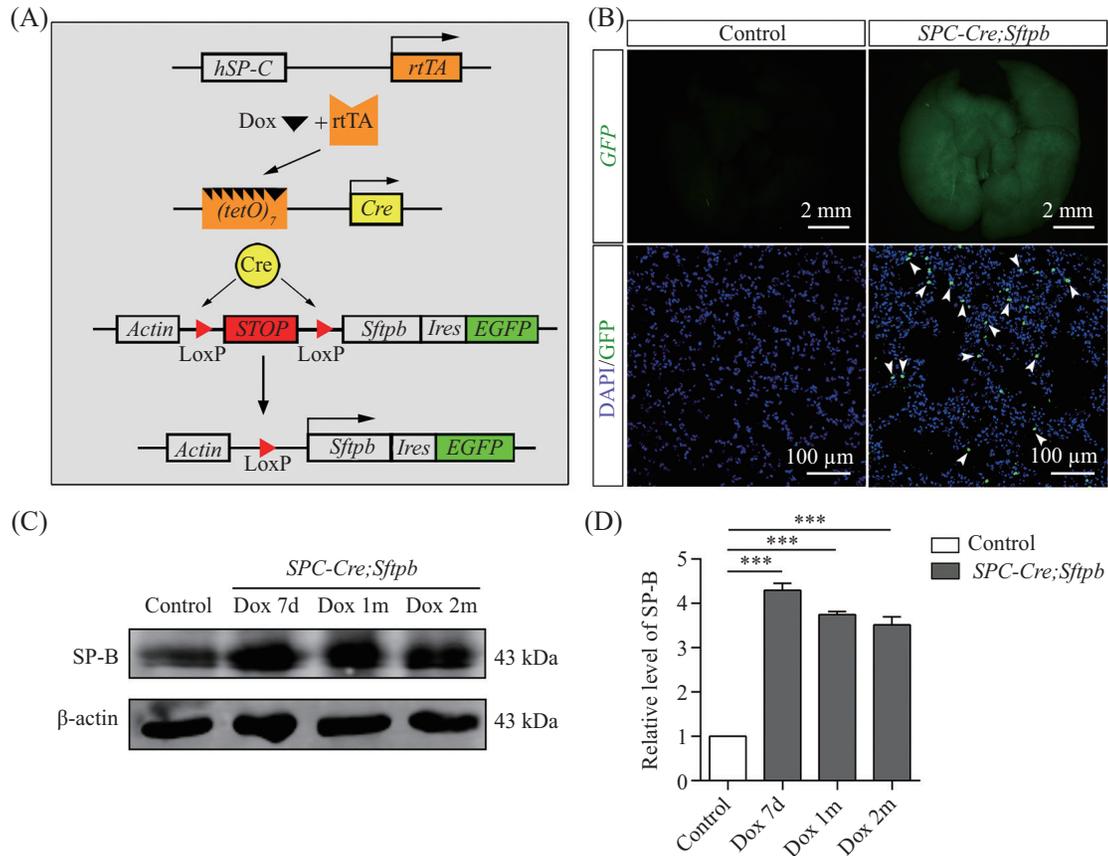


A: PCR 扩增小鼠 *Sftpb* 基因的琼脂糖凝胶电泳图; B: 重组质粒酶切线性化的琼脂糖凝胶电泳图; 泳道 1 为未酶切的原始重组质粒, 泳道 2 为酶切后重组质粒, 红色虚线方框所示为后续回收片段; C: 转基因小鼠基因型鉴定的琼脂糖凝胶电泳图; 泳道 1~10 为收获的 10 只小鼠编号, 其中编号 7 和 10 的为 *pMes-Sftpb* 转基因小鼠; 泳道 11 为以重组质粒为模板的阳性对照; 泳道 12 为以 dH_2O 为模板的阴性对照。M: DNA marker。

A: agarose gel electrophoresis image of PCR-amplified mouse *Sftpb* gene; B: agarose gel electrophoresis image of the linearized recombinant plasmid after enzymatic digestion; lane 1 represents the original recombinant plasmid before digestion, and lane 2 represents the recombinant plasmid after digestion, with the red dashed box indicating the fragment for subsequent recovery; C: agarose gel electrophoresis image for genotyping of transgenic mice; lanes 1-10 correspond to the IDs of the 10 harvested mice, among which numbers 7 and 10 are identified as *pMes-Sftpb* transgenic mice; lane 11 serves as a positive control using the recombinant plasmid as a template, and Lane 12 is a negative control using dH_2O as a template. M: DNA marker.

图 1 *pMes-Sftpb* 转基因小鼠的制备

Fig.1 Construction of *pMes-Sftpb* transgenic mice



A: *SPC-Cre;Sftpb*转基因小鼠的构建原理示意图; B: 报告基因*GFP*的检测; C: Western blot检测肺组织中SP-B的表达水平; D: 为C图的量化结果。*** $P < 0.001$ 。

A: schematic illustration of the construction principle of *SPC-Cre;Sftpb* transgenic mice; B: detection of the *GFP* reporter gene; C: Western blot analysis of SP-B expression levels in lung tissue; D: quantitative results of SP-B expression. *** $P < 0.001$.

图2 *SPC-Cre;Sftpb*转基因小鼠的构建与有效性验证

Fig.2 Construction and validation of *SPC-Cre;Sftpb* transgenic mice

小鼠肺组织中Ki67阳性细胞数量显著增多,反映出细胞增殖活动能力的增强(图5A)。定量分析结果表明,与对照组相比,转基因小鼠肺组织中Ki67阳性细胞比例显著升高(图5B)。此外,利用Hopx、pro-SP-C和Pdgfra作为特异性标记,通过免疫荧光技术对肺泡I型和II型上皮细胞及成纤维细胞进行了定量分析。结果显示,在*SPC-Cre;Sftpb*转基因小鼠肺组织中,pro-SP-C和Pdgfra阳性细胞数量显著增加,与对照组相比差异显著,而Hopx阳性细胞数量则未出现明显变化(图5C和图5D)。这些发现揭示了SP-B过表达条件下肺泡II型上皮细胞和成纤维细胞的异常增殖现象,暗示这一过程可能是IPF发病机制的关键环节之一。

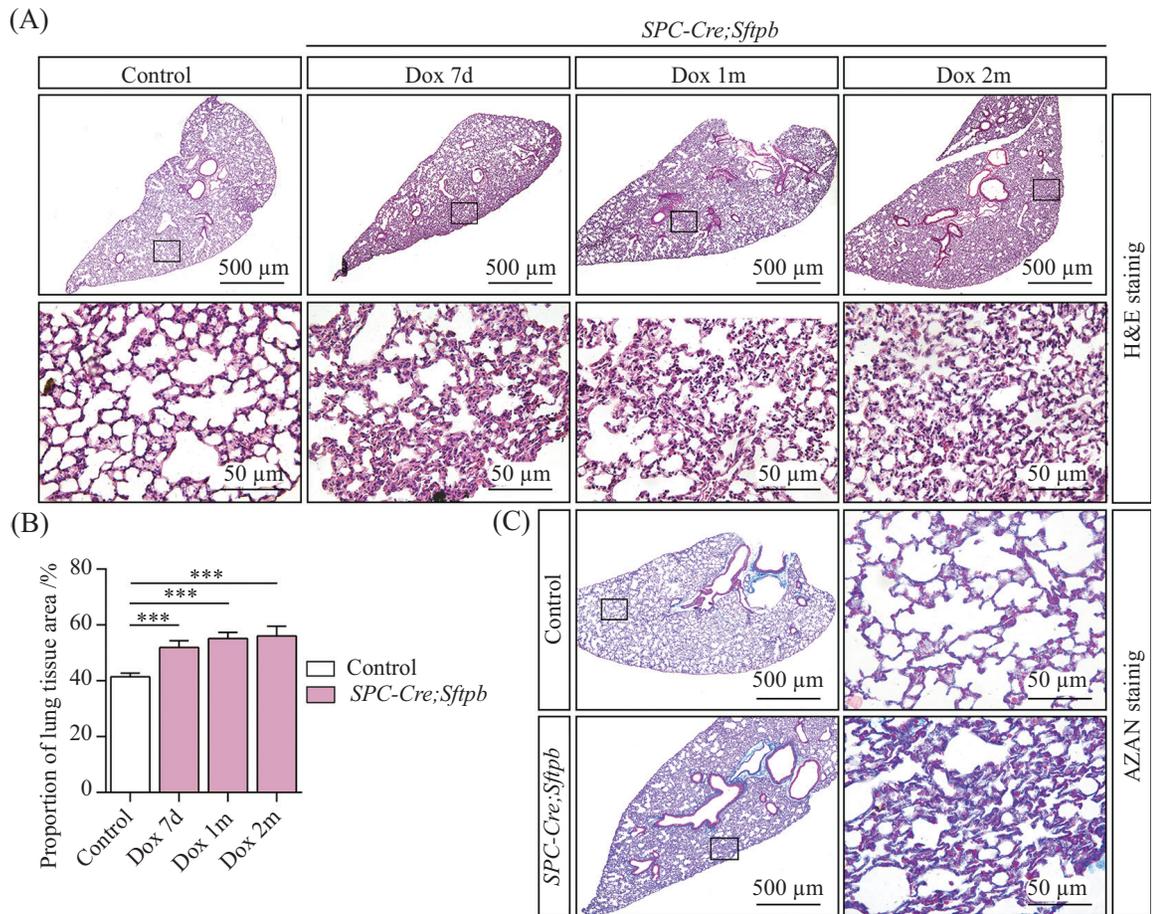
2.5 肺泡II型上皮细胞过表达SP-B激活肺部TGF-β信号通路

利用免疫荧光染色对TGF-β信号通路激活的关

键分子指标磷酸化Smad2(p-Smad2)进行检测。结果显示,经Dox处理7天的*SPC-Cre;Sftpb*转基因小鼠肺组织中,p-Smad2的阳性信号显著增多,表明TGF-β信号通路在转基因小鼠肺组织中被激活(图6A)。Western blot分析进一步证实了p-Smad2蛋白水平的显著提高,与免疫荧光结果相一致(图6B)。这些结果提示,SP-B过表达可能通过增强TGF-β信号通路相关蛋白的活性,促进成纤维细胞、上皮细胞的增殖和细胞外基质的沉积,从而推动肺纤维化过程的发展。未来的研究应包括对TGF-β信号通路的干预等,以更深入地探索SP-B过表达与TGF-β信号通路增强之间的因果关系以及其对肺纤维化过程中细胞行为的影响。

3 讨论

本研究通过构建在肺泡II型上皮细胞中过表达

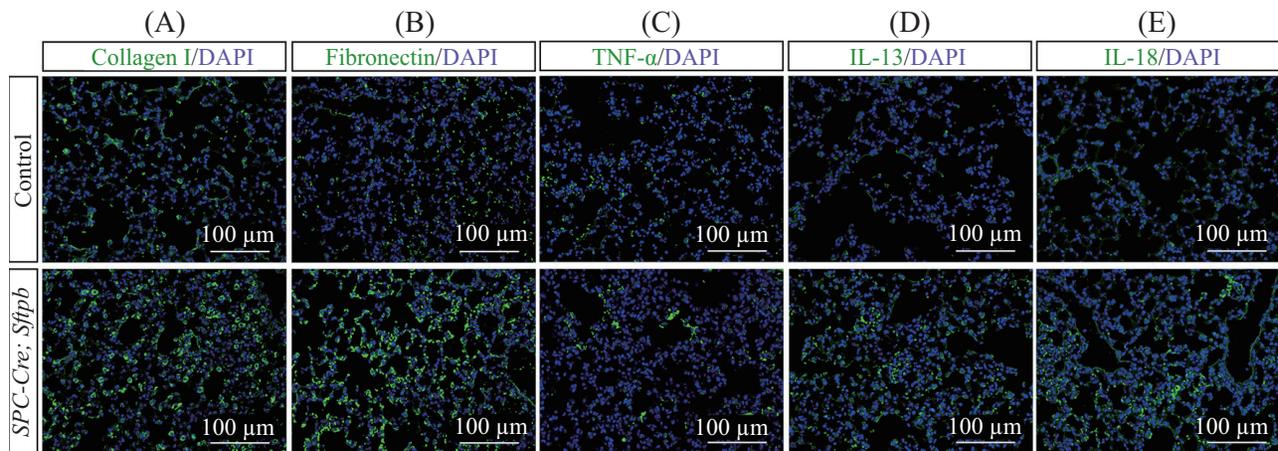


A: 经Dox诱导不同时间的*SPC-Cre;Sftpb*转基因小鼠肺组织切片H&E染色结果; B: 肺组织面积占比统计; C: 经Dox诱导7天后*SPC-Cre;Sftpb*转基因小鼠肺组织切片AZAN染色结果。*** $P<0.001$ 。

A: H&E staining of lung tissue sections from *SPC-Cre;Sftpb* transgenic mice induced with Dox for varying durations; B: quantitative analysis of lung tissue area proportion; C: AZAN staining of lung tissue sections from *SPC-Cre;Sftpb* transgenic mice 7 days after Dox induction. *** $P<0.001$.

图3 *SPC-Cre;Sftpb*转基因小鼠肺整体形态和组织切片观察

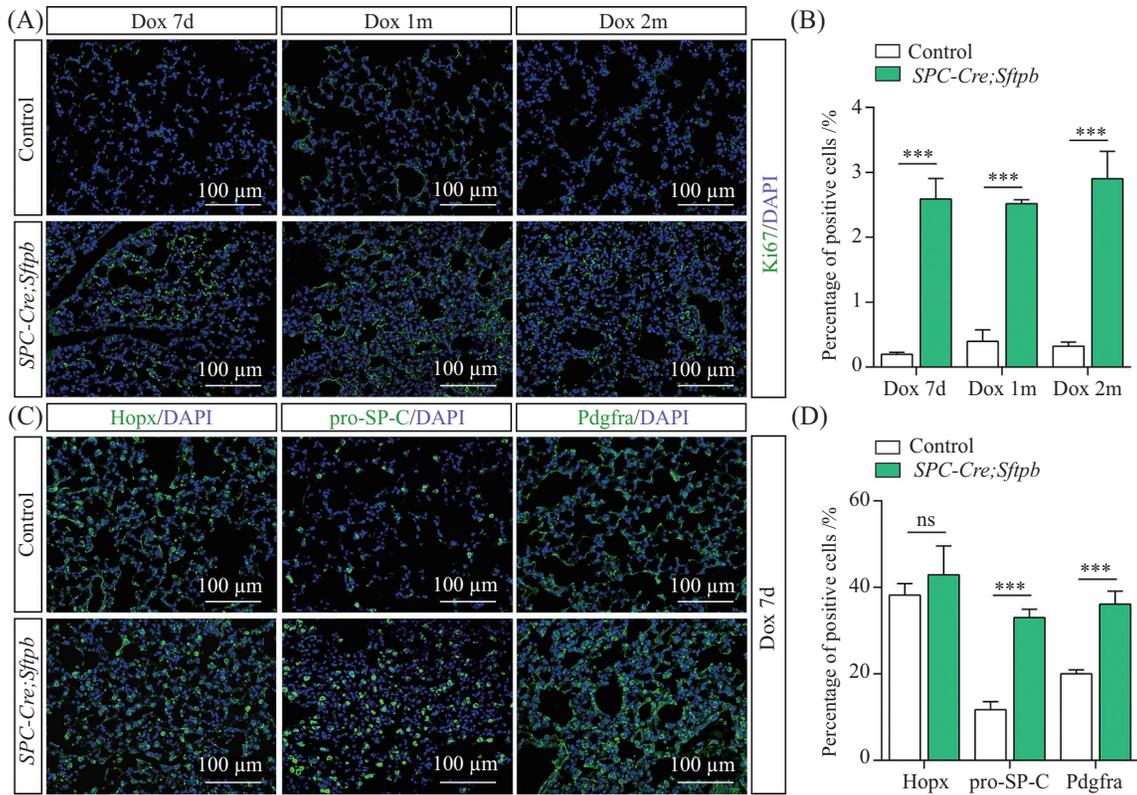
Fig.3 Observation of overall lung morphology and histological sections in *SPC-Cre;Sftpb* transgenic mice



A: I型胶原蛋白的免疫荧光检测; B: 纤连蛋白的免疫荧光检测; C: TNF- α 的免疫荧光检测; D: IL-13的免疫荧光检测; E: IL-18的免疫荧光检测。
A: immunofluorescence analysis of collagen I; B: immunofluorescence analysis of fibronectin; C: immunofluorescence analysis of TNF- α ; D: immunofluorescence analysis of IL-13; E: immunofluorescence analysis of IL-18.

图4 细胞外基质成分和炎症因子的检测

Fig.4 Assessment of extracellular matrix components and inflammatory cytokines

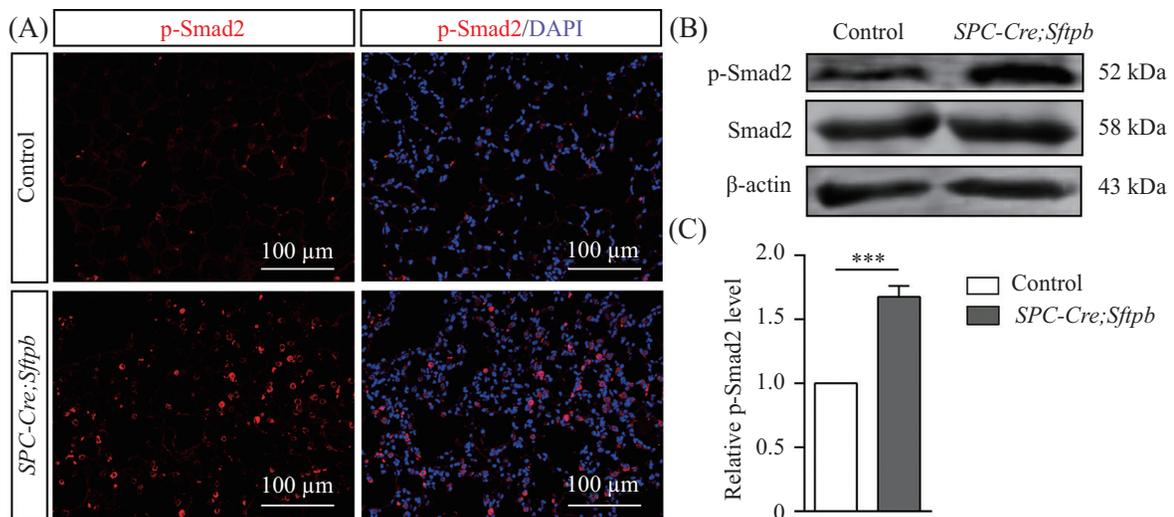


A: 细胞增殖标记物Ki67的免疫荧光检测; B: Ki67阳性细胞的定量分析; C: 肺泡上皮细胞和成纤维细胞的免疫荧光检测; D: 肺泡上皮细胞和成纤维细胞的定量分析。*** $P < 0.001$; ns: $P > 0.05$ 。

A: immunofluorescence staining for cell proliferation marker Ki67; B: quantitative analysis of Ki67-positive cell; C: immunofluorescence detection of alveolar epithelial cells and fibroblasts; D: quantitative assessment of alveolar epithelial cells and fibroblasts. *** $P < 0.001$; ns: $P > 0.05$.

图5 *SPC-Cre;Sftpb*转基因小鼠肺组织细胞增殖及细胞组成分析

Fig.5 Analysis of cellular proliferation and cellular composition in lung tissues of *SPC-Cre;Sftpb* transgenic mice



A: p-Smad2的免疫荧光检测; B: Western blot检测总Smad2和磷酸化Smad2蛋白的表达水平; C: 为B图磷酸化Smad2蛋白占比总Smad2蛋白的量化结果。*** $P < 0.001$ 。

A: immunofluorescence detection of p-Smad2; B: Western blot analysis of the expression levels of total Smad2 and p-Smad2; C: quantitative results of the ratio of p-Smad2 to total Smad2 are presented. *** $P < 0.001$.

图6 *SPC-Cre;Sftpb*转基因小鼠肺组织中TGF- β 信号通路活性检测

Fig.6 Assessment of TGF- β signaling activity in lung tissue of *SPC-Cre;Sftpb* transgenic mice

SP-B的转基因小鼠模型,探讨了肺SP-B在IPF中的作用及其分子机制。研究结果揭示了SP-B过表达将导致肺泡结构损伤、细胞外基质沉积增加以及炎症反应激活等一系列病理变化,这些变化与IPF的临床特征高度一致,为理解SP-B在肺纤维化进程中的作用提供了新的视角。

SP-B作为一种关键的肺表面活性蛋白,先前的研究表明其在降低肺泡表面张力和维持肺泡稳定性方面发挥着重要作用^[11]。然而,本研究发现SP-B过表达可能打破肺泡上皮细胞的稳态,导致肺泡结构的破坏和细胞外基质的异常沉积。这一发现与先前关于SP-B在肺疾病中作用的研究相呼应,提示SP-B的表达水平和功能可能存在一个精细的平衡^[20]。此外,本研究还观察到SP-B过表达的小鼠肺组织中细胞增殖明显增加,特别是肺泡II型上皮细胞和成纤维细胞,这可能与IPF中观察到的肺泡上皮细胞损伤和修复过程的持续激活有关^[21]。

在肺纤维化的发病机制中,TGF- β 信号通路起着核心作用。已有研究表明TGF- β 信号通路能够促进成纤维细胞的活化和细胞外基质的合成,从而促进器官纤维化的形成^[17-18,22]。在本研究中,我们检测到SP-B过表达的小鼠肺组织中Smad2的磷酸化水平显著提高,表明TGF- β 信号通路被激活,这与先前的研究结果一致,即TGF- β 信号通路的激活与肺纤维化的进展密切相关^[23-24]。因此,SP-B可能通过正反馈机制增强了TGF- β 信号通路的活性,从而在肺组织中促进了纤维化过程。

尽管本研究提供了SP-B在IPF中作用的新见解,但也存在一定局限性。例如,本研究主要关注了SP-B过表达的直接影响,而对于SP-B与其他肺泡表面活性蛋白的相互作用研究较少。此外,本研究未能全面探讨SP-B在不同IPF阶段的作用。未来的研究需要进一步阐明SP-B在肺泡上皮细胞和成纤维细胞功能中的具体影响,以及其在IPF不同阶段的表达变化。

综上所述,本研究结果强调了SP-B在IPF发病机制中的潜在作用,尤其是在肺泡II型上皮细胞中的过表达可能导致肺纤维化的进展。鉴于SP-B通过激活TGF- β 信号通路在肺纤维化中的关键作用,针对SP-B或其调控途径的干预可能成为治疗IPF的新途径。例如,开发能够抑制SP-B表达或阻断TGF- β 信号通路的小分子药物,可能有助于减轻肺组织的

纤维化程度。此外,我们的发现还提示了通过调节肺泡表面活性物质的平衡来维护肺泡稳定性的潜在治疗价值。未来的研究可以进一步探索这些潜在治疗策略的有效性和安全性,为IPF患者提供更多的治疗选择。

参考文献 (References)

- [1] RAGHU G, REMY-JARDIN M, RICHELDI L, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis (an update) and progressive pulmonary fibrosis in adults: an official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2022, 205(9): e18-e47.
- [2] KING T E J, PARDO A, SELMAN M. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Lancet*, 2021, 378(9807): 1949-61.
- [3] PODOLANCZUK A J, THOMSON C C, REMY-JARDIN M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: state of the art for 2023 [J]. *Eur Respir J*, 2023, 61 (4): 2200957.
- [4] MOSS B J, RYTER S W, ROSAS I O. Pathogenic mechanisms underlying idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2022, 17: 515-46.
- [5] MA H, WU X, LI Y, et al. Research progress in the molecular mechanisms, therapeutic targets, and drug development of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 963054.
- [6] WYNN T A. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis [J]. *J Exp Med*, 2011, 208(7): 1339-50.
- [7] NOBLE P W, BARKAUSKAS C E, JIANG D. Pulmonary fibrosis: patterns and perpetrators [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(8): 2756-62.
- [8] 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.
- [9] ZHU W, TAN C, ZHANG J. Alveolar epithelial type 2 cell dysfunction in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Lung*, 2022, 200(5): 539-47.
- [10] YAO C, GUAN X, CARRARO G, et al. Senescence of alveolar type 2 cells drives progressive pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2021, 203(6): 707-17.
- [11] COLE F S. Surfactant protein B: unambiguously necessary for adult pulmonary function [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 285(3): L540-2.
- [12] WERT S E, WHITSETT J A, NOGEE L M. Genetic disorders of surfactant dysfunction [J]. *Pediatr Dev Pathol*, 2009, 12(4): 253-74.
- [13] NOGEE L M. Surfactant protein-B deficiency [J]. *Chest*, 1997, 111(6 Suppl): 129S-35S.
- [14] THOMPSON M W. Surfactant protein B deficiency: insights into surfactant function through clinical surfactant protein deficiency [J]. *Am J Med Sci*, 2001, 321(1): 26-32.
- [15] KRISTENSEN J H, KARSDAL M A, GENOVESE F, et al. The role of extracellular matrix quality in pulmonary fibrosis [J]. *Respiration*, 2014, 88(6): 487-99.
- [16] UPAGUPTA C, SHIMBORI C, ALSILMI R, et al. Matrix abnormalities in pulmonary fibrosis [J]. *Eur Respir Rev*, 2018, 27(148): 180033.
- [17] MENG X M, NIKOLIC-PATERSON D J, LAN H Y. TGF- β : the

- master regulator of fibrosis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(6): 325-38.
- [18] FERNANDEZ I E, EICKELBERG O. The impact of TGF- β on lung fibrosis: from targeting to biomarkers [J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2012, 9(3): 111-6.
- [19] WILLIS B C, LIEBLER J M, LUBY-PHELPS K, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 2005, 166(5): 1321-32.
- [20] WHITSETT J A, WERT S E, WEAVER T E. Diseases of pulmonary surfactant homeostasis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2015, 10: 371-93.
- [21] SELMAN M, PARDO A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder [J]. *Respir Res*, 2002, 3(1): 3.
- [22] LEASK A, ABRAHAM D J. TGF-beta signaling and the fibrotic response [J]. *FASEB J*, 2004, 18(7): 816-27.
- [23] KHALIL N, GREENBERG A H. The role of TGF-beta in pulmonary fibrosis [J]. *Ciba Found Symp*, 1991, 157: 194-207.
- [24] INUI N, SAKAI S, KITAGAWA M. Molecular pathogenesis of pulmonary fibrosis, with focus on pathways related to TGF- β and the ubiquitin-proteasome pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 6107.