DOI:10.16016/j.1000-5404.201908160

敲除 Brg1 基因对小鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞数量和功能的影响及其机制研究

阮玲瑛[1,2],薛坤娇[1,2],应林燕[1,2],符 州[1,2],邹文静[1,2] 400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,国家儿童健康与疾病临床医学研究中心,儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地[1];儿科学重庆市重点实验室[2]

[**摘要**] **目的** 研究染色质重构复合物核心催化亚基(Brahma-related gene 1,Brg1)对 C57BL/6 小鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞数量和功能的影响及其可能的机制。**方法** 取 6~8 周龄雌性野生型 C57BL/6 小鼠(Wild type, WT)及Ⅱ型肺泡上皮细胞(alveolar epithelial cell Ⅱ, AECⅡs)上特异性敲除 Brg1 的 C57BL/6 小鼠($Brg1^{fl/fl}$)作为实验对象,每组选取 8 只小鼠,收取标本,利用免疫组化及免疫荧光分析肺组织中表面活性物质相关蛋白 C(surfactant-associated protein C, SFTPC)阳性的细胞率,流式细胞术分析小鼠肺组织中表面活性物质蛋白 C 前体蛋白(prosurfactant protein C, pro SP-C)阳性的细胞(即 AECⅡs)数量。Western blot 检测各组小鼠肺组织中 pro SP-C、SFTPC、表面活性物质相关蛋白 A(surfactant-associated protein A, SFTPA)、表面活性物质相关蛋白 D(surfactant-associated protein D, SFTPD)的表达水平。Western blot 检测细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)表达及增殖相关信号转导途径中关键蛋白 EGFR、p-EGFR、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 及 NF-κB p65 的活化水平。**结果** 抗 SFTPC 免疫组化、免疫荧光显示其在肺泡上皮表达较 WT 小鼠增多($P<0.05$);流式细胞术显示 $Brg1^{fl/fl}$ 组小鼠肺组织中 pro $SP\text{-}C^{+}$的细胞百分比较 WT 小鼠明显增高($P<0.05$),Western blot 检测结果显示 AECⅡs 的功能性蛋白 pro SP-C、SFTPC、SFTPA 及 SFTPD 在 $Brg1^{fl/fl}$ 小鼠中明显增多;$Brg1^{fl/fl}$ 组小鼠肺组织中 NF-κB p65 及周期蛋白 CyclinD1 的表达增加,且 p-EGFR/EGFR、p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 百分比显著提高,且差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 特异性敲除 C57BL/6 小鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞中的 Brg1 可促使 AECⅡs 数量和分泌功能的增加,其可能机制与敲除 Brg1 促进 EGFR/PI3K/AKT/NF-κB 信号通路的激活,且与增殖周期蛋白 CyclinD1 表达的增加有关。

[**关键词**] Brg1;AECⅡ;EGFR/PI3K/AKT 信号通路;NF-κB p65;细胞周期蛋白 1

[**中图法分类号**] R322.35; R329.28; R394.3 [**文献标志码**] A

Effect of Brahma-related gene 1 knockout on number and function of type Ⅱ alveolar epithelial cells in mice

RUAN Lingying[1,2], XUE Kunjiao[1,2], YING Linyan[1,2], FU Zhou[1,2], ZOU Wenjing[1,2] [1]Institute of Pediatrics, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders; [2]Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China

[**Abstract**] Objective To investigate the effect of brahma-related gene 1 (Brg1) knockout on the number and function of type Ⅱ alveolar epithelial cells (AECⅡs) in C57BL/6 mice and explore the possible

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81670018)

[**通信作者**] 邹文静,E-mail:lucky_121212@163.com

mechanisms. **Methods** Eight female wild-type (WT) C57BL/6 mice (6 to 8 weeks old) and 8 C57BL/6 mice with Brg1 gene knockout in type Ⅱ alveolar epithelial cells ($Brg1^{fl/fl}$ mice) were examined with immunohistochemistry and immunofluorescence assay for the number of surfactant-associated protein C (SFTPC)-positive cells in the pulmonary alveoli. The percentage of prosurfactant protein C (pro SP-C) positive cells in the lung tissues of the mice was analyzed with flow cytometry. Western blotting was used to detect the expression levels of pro SP-C, SFTPC, SFTPA and SFTPD in the lung tissues. The expression levels of cyclin D1 and the key proteins EGFR, p-EGFR, PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT, and NF-κB p65 in the proliferation-related signaling pathway were also detected with Western blotting. **Results** The results of immunohistochemistry and immunofluorescence assay revealed a significantly greater number of SFTPC-positive cells in $Brg1^{fl/fl}$ mice than in the WT mice ($P<0.05$). Flow cytometry showed that the percentage of pro SP-C positive cells increased significantly in the lung tissues of $Brg1^{fl/fl}$ mice ($P<0.05$). The expression levels of the functional proteins in AECⅡs, including proSP-C, SFTPC, SFTPA and SFTPD, were all significantly increased in $Brg1^{fl/fl}$ mice ($P<0.05$); Brg1 knockout significantly promoted the expression of NF-κB p65 and CyclinD1 ($P<0.05$) and increased the ratios of p-EGFR/EGFR, p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT in the lung tissue of the mice ($P<0.05$). **Conclusion** Specific knockout of Brg1 in AECⅡs of C57BL/6 mice increases the number and enhances the functionality of AECⅡs possibly due to the activation of EGFR/PI3K/AKT/NF-κB signaling pathways and an increased protein expression of CyclinD1.

[**Key words**] brahma-related gene 1; type Ⅱ alveolar epithelial cells; EGFR/PI3K/AKT signaling pathway; nuclear factor-κB p65; CyclinD1

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81670018). Corresponding author: ZOU Wenjing, E-mail: lucky_121212@163.com

Ⅱ型肺泡上皮细胞(alveolar epithelium cell Ⅱ, AECⅡs)是肺泡上皮的重要组成部分,与Ⅰ型肺泡上皮细胞(alveolar epithelial cell Ⅰ, AECⅠs)一同构成肺泡,占肺泡上皮细胞总数的14%~16%[1]。肺表面活性物质(pulmonary surfactant, PS)是存在于肺泡表面被覆的气液分子层表面的一种脂蛋白,由Ⅱ型细胞分泌,有降低肺泡的表面张力、保证肺泡的顺应性等作用,包含4种蛋白:表面活性物质相关蛋白A(surfactant-associated protein A, SFTPA)、表面活性物质相关蛋白B(surfactant-associated protein B, SFTPB)、表面活性物质相关蛋白C(surfactant-associated protein C, SFTPC)和表面活性物质相关蛋白D(surfactant-associated protein D, SFTPD)。其中,SFTPC是仅在AECⅡs表达的活性蛋白[2],首先在AECⅡs胞质内的板层小体中合成肺表面活性物质蛋白C前体蛋白(prosurfactant protein C, pro SP-C),pro SP-C经过多次酶解成为具有生理活性的SFTPC[3-4]。因此pro SP-C和SFTPC通常被认为是AECⅡs的标志物,pro SP-C和SFTPC的表达水平在一定程度上反映AECⅡs的数量及功能。AECⅡs可以促进肺泡巨噬细胞趋化、T淋巴细胞分化及表达Toll样受体,参与机体免疫调节[2-3]。在慢性阻塞性肺病、急性呼吸窘迫综合征、肺水肿等肺疾病中,支气管肺泡灌洗液中SFTPC水平减少,由此可见,AECⅡs与许多肺部疾病的发病和病理过程息息相关,研究AECⅡs在肺内的数量及功能的改变对于许多相关肺疾病的预防与治疗都具有重要的意义。

染色质重构复合物核心催化亚基(Brahma-related gene 1, Brg1)是定位于人类19p13.2染色体,在小鼠体内位于9A3,是表观遗传学ATP依赖的多亚基组成的染色质重塑复合物(chromatin-remodeling complex, SWI/SNF)的核心成分之一,其主要作用是利用ATP水解产生能量从而实现染色体重组[4]。有研究表明,Brg1可以明显降低MCF7细胞系的DNA合成和CyclinD1的表达水平[5],而本课题组前期研究发现在16HBE细胞系中敲低Brg1可以增加该细胞的增殖迁移能力,同时在哮喘小鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞上特异性敲除Brg1可对上皮细胞的增殖和分化起着十分重要的作用[6-7]。但目前仍没有Brg1对AECⅡs影响的相关研究,因此本研究旨在探讨Brg1对AECⅡs数量和功能的影响及可能机制,为治疗某些肺部疾病如支气

管哮喘、肺纤维化、急性肺损伤等提供新的思路和方向。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠,6~8 周龄,购自重庆医科大学实验动物中心。$Brg1^{fl/fl}$ 小鼠为在 C57BL/6 小鼠背景上条件性敲除Ⅱ型肺泡上皮细胞上 Brg1 基因的纯合子小鼠。敲除鼠获得和基因型鉴定方法:将两种转基因小鼠 $Brg1^{fl/fl}$ 和 SP-C-rtTA/(tetO)7-Cre 在 SPF 级饲养环境中进行交配,于生后大约 7 d 剪指甲提取 DNA,qPCR 及 PCR 检测小鼠基因型。将得到的纯合子小鼠喂养母乳至 3 周后给予 2%多西环素水 7 d,诱导(tetO)7-Cre 重组酶活性从而靶向剪切 AECⅡs 上 Brg1 基因,Western blot 检测 Brg1 表达水平。

1.2 主要试剂

小鼠 DNA 提取试剂配制方法如下。①缓冲液 A:0.5 moL/L EDTA(pH 8.0) 100 μL 加 10 moL/L NaOH 625 μL,加双蒸水定容至 250 mL,混匀后室温储存;②缓冲液 B:40 mmoL/L Tribase 100 mL(pH 3.0)。其余试剂:pro SP-C 兔抗小鼠单克隆抗体(Abcam,ab40879),SFTPC 兔抗小鼠单克隆抗体(Abcam,ab211326),兔抗人 Brg1 单克隆抗体(Santa cruz),SFTPA 兔抗小鼠多克隆抗体(Bioss,bs-10265R),SFTPD 兔抗小鼠多克隆抗体(Bioss,bs-21617R),兔抗小鼠 CyclinD1 多克隆抗体(bioss,bs-20597R),兔抗 PI3K(Proteintech),兔抗 p-PI3K(CST),兔抗 AKT(Proteintech),兔抗 p-AKT(CST),山羊抗兔 Alexa-Fluor 488 荧光二抗,PE 标记的山羊抗兔 IgG 流式抗体,Ⅰ型胶原酶 COLLAGENASEⅠ(Sigma c0130),兔超敏二步法免疫组化检测试剂盒(中杉金桥生物技术);全蛋白试剂提取盒(南京凯基生物科技),BCA 法蛋白定量试剂盒(百泰克生物技术);DNA Marker、SYBR Premix *ExTaq*™(TaKaRa 公司)。PCR 引物由上海生工生物工程合成:序列如下 Brg1L5 5′-TCTCATGCACAGAGGTCCTG-3′,Brg1R276 5′-TAGCCCCTTGAAAGTGATCC-3′,oIMR1084 5′-GCGGTCTGGCAGTAAAAACTATC-3′,oIMR1085 5′-GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT-3′,oIMR7338 5′-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3′,oIMR7339 5′-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-3′,oIMR8744 5′-CAAATGTTGCTTGTCTGGTG-3′,oIMR8745 5′-GTCAGTCGAGTGCACAGTTT-3′,oIMR8746 5′-CGCTGTGGGGCATTTTACTTTAG-3′,oIMR8747 5′-CATGTCCAGATCGAAATCGTC-3′。

1.3 肺组织中 SFTPC 免疫组化染色

肺组织脱水石蜡包埋块制作成 4 μm 组织切片,脱蜡入水,一抗(兔抗小鼠 SFTPC 的单克隆抗体 1∶500)4 ℃ 孵育过夜,采用组化试剂盒孵育山羊抗兔二抗,DAB 染色,苏木精复染,中性树脂封片,每只小鼠肺组织选取 5 个肺泡区(×400),计数 SFTPC 阳性的细胞数,应用 GraphPad Prism 5.0 软件分析各组阳性细胞数。

1.4 肺组织中 SFTPC 免疫荧光染色

肺组织脱水石蜡包埋块,制作 4 μm 组织切片,脱蜡入水,一抗(兔抗小鼠 SFTPC 的单克隆抗体 1∶200)4 ℃ 孵育过夜,将二抗以 1∶500 稀释并于室温避光孵育 60 min。将 DAPI 染色液常温避光孵育 30 min 进行细胞核染色,清洗后,封片,干燥后采集成像。

1.5 流式细胞术检测肺组织中 pro SP-C 阳性细胞数

取小鼠肺组织,用 0.2% Ⅰ型胶原酶(1640 配置)1~2 mL 37 ℃消化 15 min,于 200 目筛网上反复剪碎,1640 培养基冲洗,制成单细胞悬液,2 500 r/min 4 ℃ 离心 5 min,1 mL PBS 洗涤 2 遍,4%多聚甲醛室温固定 15 min,直接加入 1 mL PBS 终止固定,2 500 r/min 4 ℃离心 5 min,0.5%Triton X-100 室温破膜 20 min 后直接加入 1 mL PBS 终止后离心。弃上清加入 50 μL 大鼠血清封闭 20 min,再加入 1 μL pro SP-C 抗体每管,室温孵育 1.5 h,1 mL PBS 洗涤后离心,弃上清,加入 2 μL PE 标记的山羊抗兔 IgG 流式抗体(二抗)。室温避光孵育 30 min,1 mL PBS 洗涤 2 遍,离心后 200 μL PBS 重悬上机。

1.6 Western blot 检测各组小鼠肺组织中 EGFR、p-EGFR、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、NF-κB p65 及 CyclinD1 蛋白的表达

用全蛋白试剂提取盒提取 40 mg 各组小鼠肺组织的总蛋白,按 BCA 蛋白定量试剂盒说明书测定蛋白浓度。取 100 μg 总蛋白上样,10% SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜(美国 Millipore 公司),封闭后分别加入相应一抗(Brg1 1∶200,SFTPC 1∶1 000,pro SP-C 1∶1 000,SFTPA 1∶1 000,SFTPD 1∶1 000,CyclinD1 1∶1 000,EGFR 1∶1 000,p-EGFR 1∶1 000,PI3K 1∶1 000,p-PI3K 1∶1 000,AKT 1∶500,p-AKT 1∶500,NF-κB 1∶500,内参:兔抗小鼠 β-actin 单克隆抗体 1∶1 000),4 ℃ 孵育过夜,漂洗后分别加入相应二抗(辣根过化物酶标记的山羊抗兔 1∶5 000 稀释),室温孵育 1 h,TBST 洗膜后滴加 ECL 显色剂用荧光化学发光凝胶成像系统进行化学发光、照相,用 Image J 软件对条带进行定量分析。

1.7　统计学分析

采用 GraphPad Prism 5.0 软件和 SPSS 11.5 软件进行分析。各组比较采用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$。

2　结果

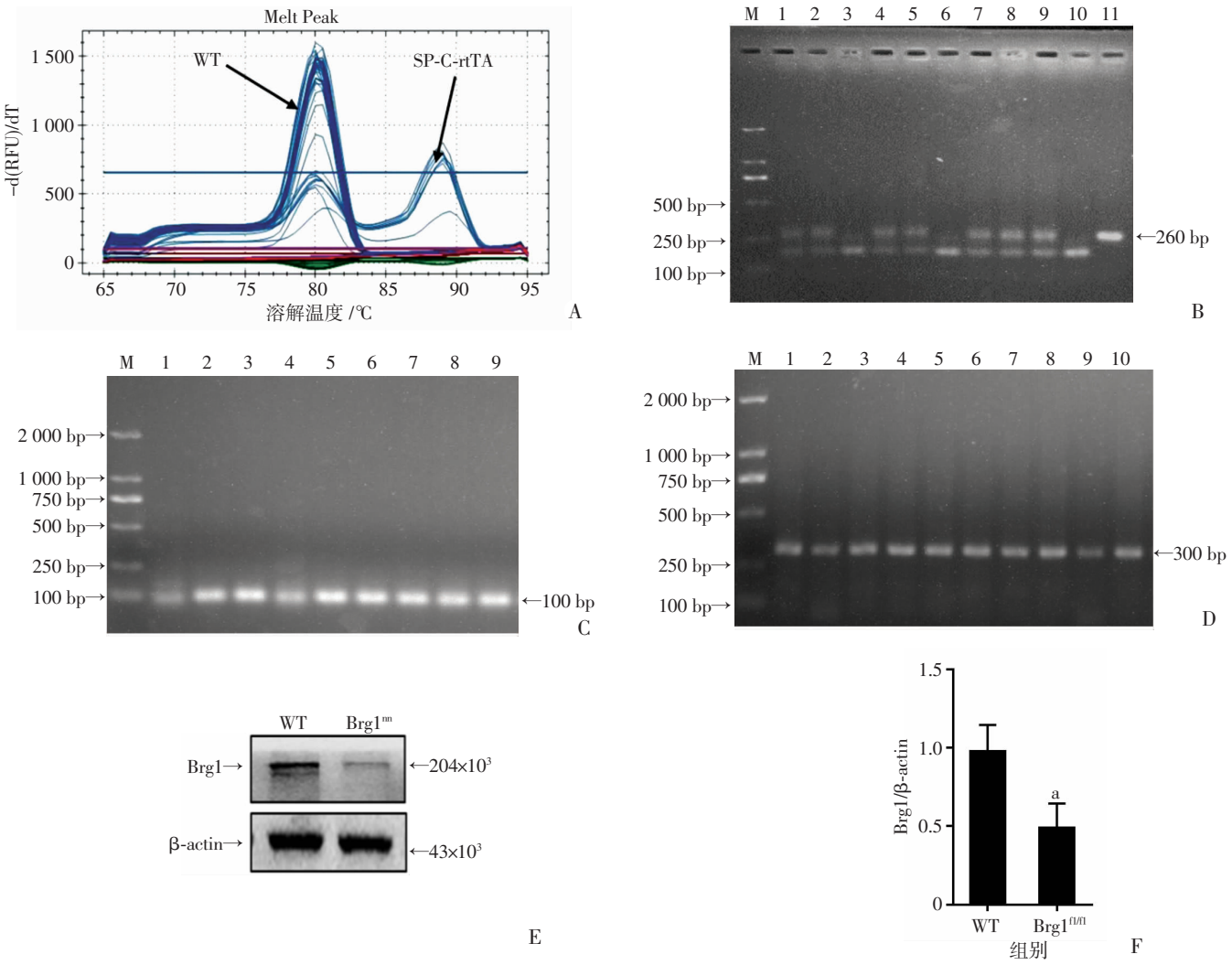
2.1　Brg1$^{fl/fl}$ 小鼠的鉴定

为鉴定合笼小鼠子代的基因型,运用了 qPCR、PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳同时鉴定了 SPC-rt TA、Brg1 和 (tetO)7-Cre 基因。SPC-rt TA 判断方式为:阴性溶解峰在(80±1)℃,阳性小鼠溶解峰(90±1)℃ (图 1A);Brg1 基因型判定方式为:Brg1$^{fl/fl}$ 纯合扩增条带在 260 bp, Brg1$^{fl/-}$杂合扩增条带同时有 260 bp 和 160 bp 两个条带 (图 1B);Cre 判断方式(图 1C、D):引物 (tetO)7-Cre7338/7339 是内参,鉴定所提 DNA 是否可用,条带为 300 bp 且亮的为可用;引物 (tetO)7-Cre1084/1085 用于鉴定 Cre 是否为阳性,阳性扩增带在 100 bp,条带亮,无杂带。只有同时满足 Brg1 为纯合、(tetO)7-Cre 和 SPC-rtTA 同时阳性的小鼠才为纯合子,即为 Brg1$^{fl/fl}$ 小鼠。Western blot 检测结果显示 Brg1 在 Brg1$^{fl/fl}$ 小鼠肺组织匀浆中的表达明显低于 WT 小鼠(图 1E、F, $P<0.01$),提示已成功构建在肺组织中条件性敲低 Brg1 的小鼠模型。

2.2　敲除 Brg1 对小鼠 AEC Ⅱs 数量的影响

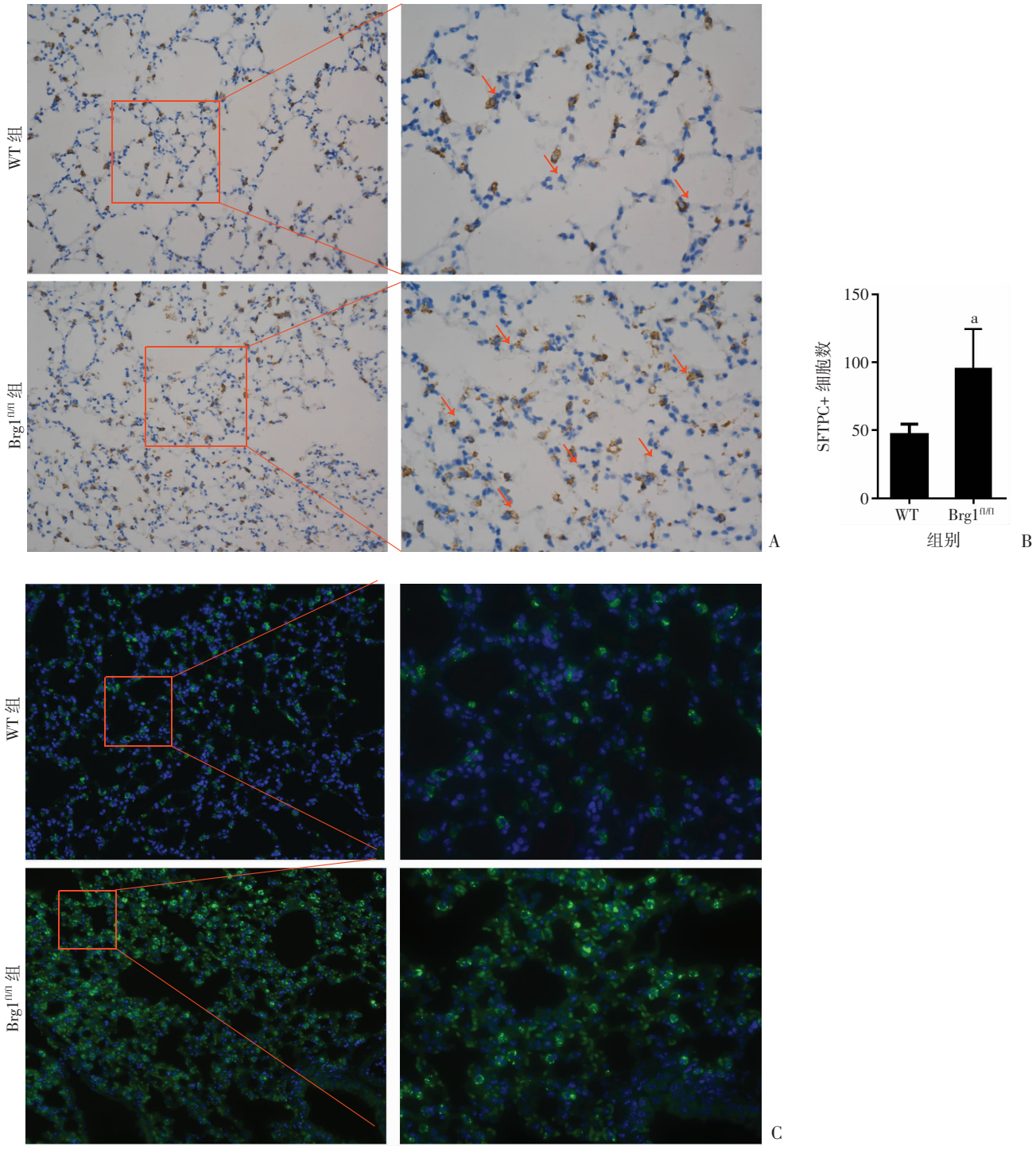
2.2.1　免疫组化和免疫荧光测定肺组织中 SFTPC 阳性的细胞数量

肺组织石蜡切片抗 SFTPC 免疫组化(图 2A、B)及免疫荧光(图 2C)检测肺泡 SFTPC 阳性细胞数。结果显示 Brg1$^{fl/fl}$ 组小鼠肺泡 SFTPC 阳性(箭头所指细胞)细胞数明显高于 WT 组($P<0.01$,图 2)。



A:qPCR 示 SP-C-rtTA 鉴定结果;B:PCR 示 Brg1$^{fl/fl}$ 基因鉴定结果;C、D:(tetO)7-Cre 鉴定结果;E、F:Western blot 检测 WT 组和 Brg1$^{fl/fl}$ 组中 Brg1 蛋白质表达水平　M:标准;1~11:分别代表小鼠编号;a:$P<0.01$,与 WT 组相比

图 1　Brg1 转基因小鼠子代基因型鉴定结果



A:抗 SFTPC 免疫组化检测 WT 组和 $Brg1^{fl/fl}$ 组小鼠肺组织中 SFTPC 阳性的细胞数; B:免疫组化 SFTPC 阳性细胞统计分析 a: $P<0.01$,与 WT 组相比;C: 抗 SFTPC 免疫荧光检测 WT 组和 $Brg1^{fl/fl}$ 组肺组织中 SFTPC 阳性的细胞数

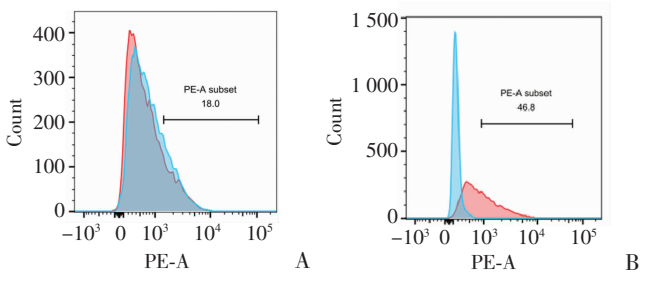
图 2 WT 组和 $Brg1^{fl/fl}$ 组小鼠肺组织 SFTPC 免疫组化及免疫荧光

2.2.2 流式细胞术测定 pro SP-C 阳性的细胞数量

与 WT 组比较, $Brg1^{fl/fl}$ 组小鼠肺组织中 pro SP-C 阳性的细胞比例显著升高($P<0.05$,图 3)。

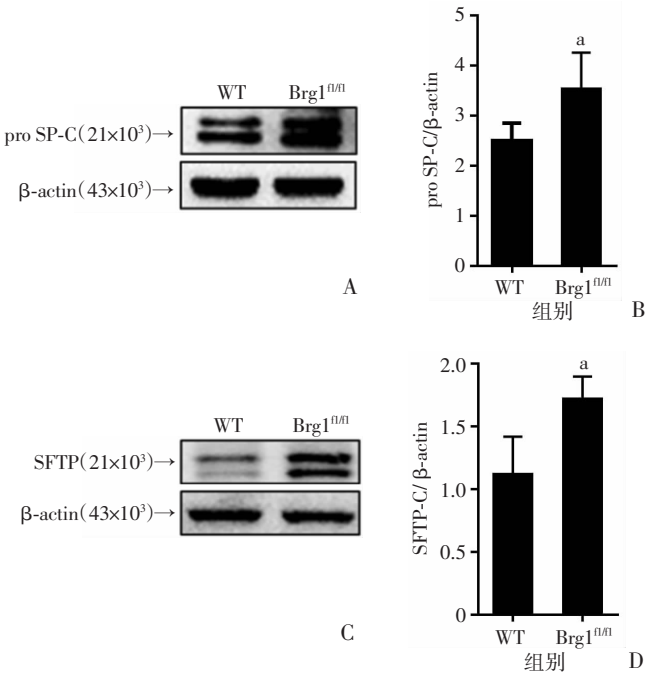
2.3 敲除 Brg1 对小鼠 AEC Ⅱ s 分泌的功能的影响

2.3.1 敲除 Brg1 促进肺组织匀浆中 SFTPC 和 pro SP-C 的表达 Western blot 检测结果显示, $Brg1^{fl/fl}$ 组小鼠肺组织匀浆中 AEC Ⅱ s 标记性分子 pro SP-C、SFTPC 的表达显著高于 WT 组($P<0.05$,图 4)。



A:WT 组;B:$Brg1^{fl/fl}$ 组

图 3　两组小鼠肺组织中 pro SP-C 阳性细胞水平



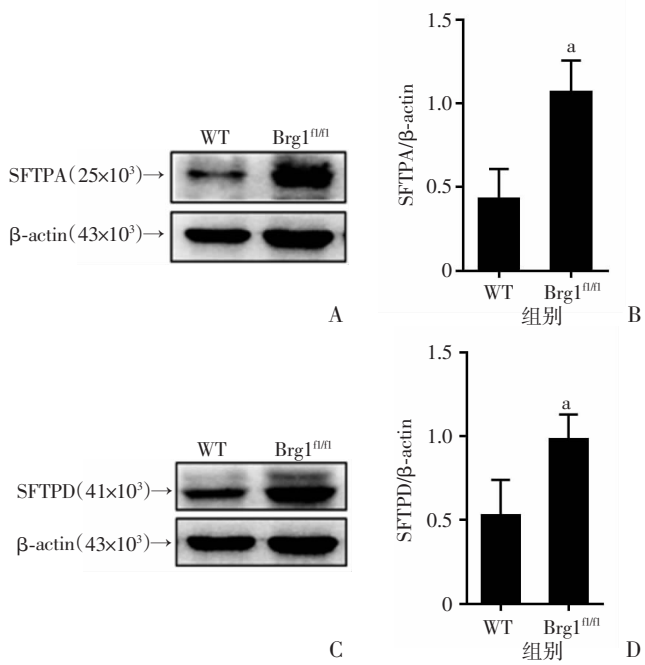
A-D:Western blot 检测 WT 组和 $Brg1^{fl/fl}$ 组肺组织中 pro SP-C 与 SFTPC 的表达水平及其统计分析　a:$P<0.05$,与 WT 相比

图 4　Western blot 检测两组 pro SP-C 和 SFTPC 蛋白表达水平

2.3.2　敲除 Brg1 促进 AECⅡs 功能性蛋白 SFTPA 和 SFTPD 的分泌　　进一步研究表明,$Brg1^{fl/fl}$ 组小鼠肺组织匀浆中 AECⅡs 分泌的其他功能性蛋白 SFTPA、SFTPD 的表达水平也显著高于 WT 组($P<0.01$,图 5),表明特异性敲除 AECⅡs 中的 Brg1 可以显著促进小鼠 AECⅡs 功能性蛋白 SFTPA 和 SFTPD 分泌增加。

2.4　敲除 Brg1 促进 EGFR/PI3K/AKT 信号通路的激活及相关蛋白的表达

与对照组相比,$Brg1^{fl/fl}$ 组 p-EGFR/EGFR、p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 的表达明显上调,差异均有统计学意义($P<0.05$,图 6A、B)。同时其下游分子 NF-κB p65 及 CyclinD1 的表达也显著升高($P<0.01$,图 6C、D)。

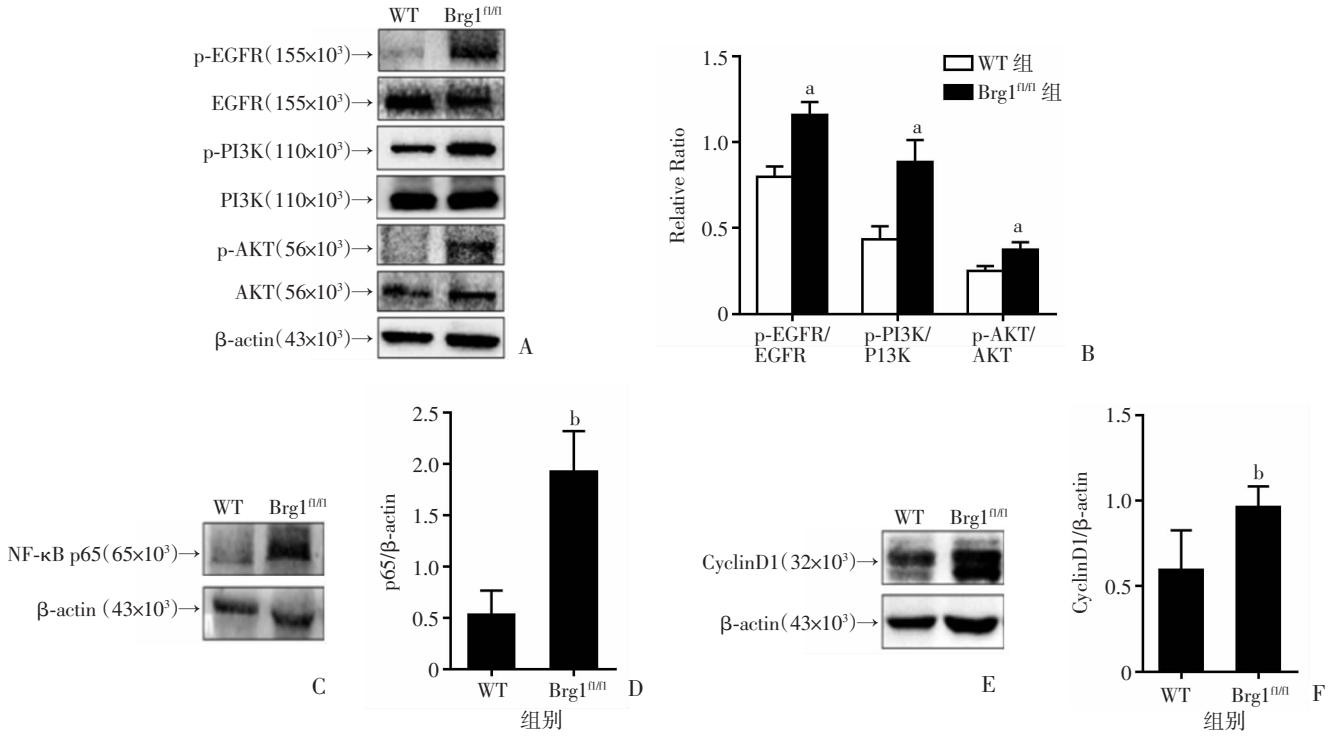


A~D:Western blot 检测 WT 组和 $Brg1^{fl/fl}$ 组肺组织中 SFTPA 和 SFTPD 的表达水平及其统计分析　a:$P<0.01$,与 WT 相比

图 5　WT 组和 $Brg1^{fl/fl}$ 组小鼠肺组织中 SFTPA 及 SFTPD 蛋白质水平

3　讨论

染色质重塑复合物核心催化亚基 Brg1 是一种磷酸化核蛋白,其主要的作用是通过 ATP 水解产生能量重排核小体位置和组蛋白-DNA 相互作用调节基因转录,从而促进靶基因的转录激活或抑制。在人非小细胞肺癌的细胞中,Brg1 缺失会改变其细胞的形态,增加其成瘤潜能[8]。研究表明,Brg1 结合磷酸化的视网膜母细胞瘤蛋白(phosphorylated retinoblastoma protein,pRB 蛋白)形成复合物抑制 E2F 转录因子的释放,下调细胞周期蛋白 E、细胞周期蛋白 A 的表达,从而干扰成纤维细胞的增殖[9-10]。提示 Brg1 在促进细胞增殖、调控细胞周期中发挥重要作用[11-12]。本实验结果显示特异性敲除 AECⅡs 的 Brg1 可以促使 AECⅡs 数量的增加,可能与 Brg1 参与 AECⅡs 的增殖有关。除此之外,文献[5]报道 Brg1 可以占据内源性细胞周期蛋白 D1 的 AP-1 位点,通过向 CyclinD1 启动子区募集辅阻遏物(HDAC1、HP1、Suv39h1)来抑制 CyclinD1 的表达,这与本实验中敲除 Brg1 发现 CyclinD1 的表达增多一致。



A、B:Western blot 检测 WT 组和 $Brg1^{fl/fl}$ 组肺组织中 EGFR、p-EGFR、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 的表达水平及 p-EGFR/EGFR、p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 比值的其统计分析;C-F:WT 组和 $Brg1^{fl/fl}$ 组中肺组织中 NF-κB p65、CyclinD1 的表达水平及其统计分析 a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与 WT 组相比

图 6 Western blot 检测 WT 组和 $Brg1^{fl/fl}$ 组中 EGFR、p-EGFR、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、NF-κB p65 及 CyclinD1 蛋白质表达水平

多种信号通路参与细胞的增殖调控,其中 EGFR/PI3K/AKT 信号通路是哺乳动物中广泛存在的经典信号通路,在介导细胞分化、增殖、自噬、凋亡中发挥重要作用[13]。研究表明,表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)在表皮细胞、成纤维细胞和上皮细胞等细胞的增殖中起着重要的作用[14],表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是一种酪氨酸激酶受体,是由胞内、胞外、跨膜结构域组成的糖蛋白,EGF 与 EGFR 结合后通过其胞内结构域的自磷酸化促进受体二聚体激活,进而启动磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/AKT 信号通路[15]。AKT,也称为蛋白激酶 B(PKB),是一种丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶,在大脑、心脏、肺和皮肤等多种人体组织中细胞生长和增殖的正常调节中起着关键作用。文献[16]报道,在胰腺癌细胞中,Brg1 可参与调控 PI3K/AKT 信号通路的磷酸化调控 PI3K/AKT 信号通路的激活,从而影响胰腺癌细胞的生长;同时,AKT 通过 Ser473 位点的磷酸化被证实可以通过激活转录因子核因子 NF-κB,促进其表达增多并从胞质转移至细胞核,上调 CyclinD1 的表达来促进细胞增殖[17-18]。另外,Brg1 也可以调控 AKT 上 Ser473 位点的磷酸化直接促进 CyclinD1 的表达,从而促进前列腺癌细胞的生长[19]。CyclinD1 是调控细胞周期 G_1 期到 S 期关卡点最关键的蛋白,可通过结合并激活细胞周期相关激酶(如 CDK4、CDK6),促进细胞周期运行,其过度表达可缩短 G_1 期加快细胞周期进程,促进细胞增殖[20]。这与本研究实验结果相符,说明敲除 Brg1 可以激活 EGFR/PI3K/AKT 信号通路,引起下游 NF-κB p65 增多,从而促进 CyclinD1 蛋白的表达,促进 AEC Ⅱs 的增殖,但是 Brg1 的具体作用机制暂不清楚,需进一步探讨。

综上,特异性敲除 C57BL/6 小鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞中的 Brg1 可促使 AEC Ⅱs 数量和分泌功能的增加,其可能机制是与敲除 Brg1 促进 EGFR/PI3K/AKT/NF-κB 信号通路激活,且促进增殖相关的周期蛋白 CyclinD1 表达相关。肺组织中 AEC Ⅱs 数量和功能的

增加,可以使肺部能够及时修复损伤,防止外界病原侵入,同时,其分泌的 SFTPC、SFTPA、SFTPD 蛋白明显增多可以改善肺部的顺应性及发挥免疫调节作用,为研究和治疗肺纤维化、哮喘、急性肺损伤等呼吸系统的疾病提供了新的靶点和方向,但其具体机制还有待进一步的研究。

参考文献:

[1] LIANG J R, ZHANG Y L, XIE T, *et al*. Hyaluronan and TLR4 promote surfactant-protein-C-positive alveolar progenitor cell renewal and prevent severe pulmonary fibrosis in mice [J]. Nat Med, 2016, 22(11): 1285-1293. DOI: 10.1038/nm.4192.

[2] XIA Y, FENG S, LIU Z, *et al*. Rhodium (Ⅰ) - catalyzed sequential C(sp) C(sp3) and C(sp3)C(sp3) bond formation through migratory carbene insertion[J]. Angew Chem Int Edit, 2015, 54(27): 7891-7894.

[3] ROLDAN N, NYHOLM T K M, SLOTTE J P, *et al*. Effect of lung surfactant protein SP-C and SP-C-promoted membrane fragmentation on cholesterol dynamics[J]. Biophys J, 2016, 111(8): 1703-1713. DOI: 10.1016/j.bpj.2016.09.016.

[4] CHIGNALIA A Z, VOGEL S M, REYNOLDS A B, *et al*. P120-catenin expressed in alveolar type Ⅱ cells is essential for the regulation of lung innate immune response[J]. Am J Pathol, 2015, 185(5): 1251-1263. DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.01.022.

[5] RAO M, CASIMIRO M C, LISANTI M P, *et al*. Inhibition of cyclin D1 gene transcription by Brg-1[J]. Cell Cycle, 2008, 7(5): 647-655. DOI: 10.4161/cc.7.5.5446.

[6] WANG T, ZOU W, NIU C, *et al*. Brg1 inhibits E-cadherin expression in lung epithelial cells and disrupts epithelial integrity[J]. J Mol Med (Berl). 2017;95(10): 1117-1126.

[7] 蔡霜, 邹文静, 王婷, 等. Brg1 通过 STAT6 促进哮喘气道黏液高分泌[J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(1): 42-47.
CAI S, ZOU W J, WANG T, *et al*. Brahma-related gene 1 promotes airway mucus hypersecretion via STAT6 in asthmatic mice[J]. J South Med Univ, 2018, 38(1): 42-47.

[8] ORVIS T, HEPPERLA A, WALTER V, *et al*. BRG1/SMARCA4 inactivation promotes non-small cell lung cancer aggressiveness by altering chromatin organization[J]. Cancer Res, 2014, 74(22): 6486-6498. DOI: 10.1158/0008-5472.can-14-0061.

[9] DUNAIEF J L, STROBER B E, GUHA S, *et al*. The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest[J]. Cell, 1994, 79(1): 119-130. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90405-7.

[10] STROBECK M W, KNUDSEN K E, FRIBOURG A F, *et al*. BRG-1 is required for RB-mediated cell cycle arrest [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(14): 7748-7753. DOI: 10.1073/pnas.97.14.7748.

[11] WONG A K, SHANAHAN F, CHEN Y, *et al*. BRG1, a component of the SWI-SNF complex, is mutated in multiple human tumor cell lines[J]. Cancer Res. 2000, 60(21): 6171-6177 .

[12] HARGREAVES D C, CRABTREE G R. ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms [J]. Cell Res, 2011, 21(3): 396-420. DOI: 10.1038/cr.2011.32.

[13] MAYER I A, ARTEAGA C L. The PI_3K/AKT pathway as a target for cancer treatment[J]. Annu Rev Med, 2016, 67: 11-28. DOI: 10.1146/annurev-med-062913-051343.

[14] MCGRATH M H. Peptide growth factors and wound healing. Clin Plast Surg, 1990, 17(3): 421-432.

[15] BAZLEY L A, GULLICK W J. The epidermal growth factor receptor family[J]. Endocr-Relat Cancer, 2005, 12(Suppl 1): S17-S27. DOI: 10.1677/erc.1.01032.

[16] JUBIERRE L, SORIANO A, PLANELLS-FERRER L, *et al*. BRG1/SMARCA4 is essential for neuroblastoma cell viability through modulation of cell death and survival pathways[J]. Oncogene, 2016, 35(39): 5179-5190. DOI: 10.1038/onc.2016.50.

[17] SONG G, OUYANG G L, BAO S D. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival[J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(1): 59-71. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00337.x.

[18] SCHENCK A, GOTO-SILVA L, COLLINET C, *et al*. The endosomal protein Appl1 mediates akt substrate specificity and cell survival in vertebrate development [J]. Cell, 2008, 133(3): 486-497. DOI: 10.1016/j.cell.2008.02.044.

[19] LV D J, SONG X L, HUANG B, *et al*. HMGB1 promotes prostate cancer development and metastasis by interacting with brahma-related gene 1 and activating the Akt signaling pathway[J]. Theranostics, 2019, 9(18): 5166.

[20] SANTO L, SIU K T, RAJE N. Targeting cyclin-dependent kinases and cell cycle progression in human cancers[J]. Semin Oncol, 2015, 42(6): 788-800. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2015.09.024.

(**收稿**:2019-08-21;**修回**:2019-10-16)

(编辑 黄 超)