DOI:10.16016/j.1000-5404.202102051

Chromofungin 调控自噬流改善脓毒症小鼠肺组织炎症损伤

亢胜男[1],刘疏柯[2],刘 贤[1],王凤林[1],周梧霜[1],陈晓迎[1],张 丹[1] 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院急诊 & 重症医学科[1];400030 重庆,重庆市肿瘤医院[2]

[**摘要**] **目的** 探讨嗜铬粒蛋白 A 衍生多肽 CGA_{47-66}(chromofungin,CHR)在脓毒症小鼠肺组织中对自噬流的调控作用,及其对肺组织炎症损伤的影响。**方法** 以 C57BL/6 小鼠为研究对象,通过腹腔注射脂多糖 LPS(10 mg/kg)建立脓毒症小鼠急性肺损伤模型。为研究 CHR 对自噬的影响,在予以 LPS 30 min 前,先分别用 CHR、自噬诱导剂雷帕霉素(Rapa)预处理小鼠,观察小鼠肺组织病理改变,进行肺泡灌洗检测炎症因子水平,Western blot 和免疫荧光检测肺组织自噬标志物 LC3、P62、Agt7 蛋白表达,透射电镜观察自噬小体形成情况。**结果** 与 LPS 组相比,CHR 预处理可以使 LPS 引起的小鼠肺组织病理损伤明显减轻,同时 CHR 预处理可以降低小鼠肺泡灌洗液中促炎因子表达水平,增高抗炎因子表达水平($P<0.05$)。Western blot 和免疫荧光检测都提示经 CHR 预处理后,自噬标志蛋白表达量升高,自噬底物蛋白表达量降低($P<0.05$)。电镜检查结果显示 CHR 预处理组中发现自噬小体及自噬溶酶体的形成,与 Rapa 预处理组中自噬流变化、炎症介质水平改变及肺组织病理情况等结果基本一致。**结论** CHR 可能通过调控 LPS 刺激后肺组织中自噬流增加和炎症反应降低,对脓毒症小鼠起到肺保护作用。

[**关键词**] Chromofungin;脓毒症;急性肺损伤;自噬流;炎症

[**中图法分类号**] R341; R563; R631.06 [**文献标志码**] A

Chromofungin regulates autophagy flux to improve lung tissue inflammation in septic mice

KANG Shengnan[1], LIU Shuke[2], LIU Xian[1], WANG Fenglin[1], ZHOU Wushuang[1], CHEN Xiaoying[1], ZHANG Dan[1]

[1]Department of Emergency and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Chongqing Cancer Hospital, Chongqing, 400030, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the regulative role of chromogranin A derived polypeptide CGA_{47-66}(chromofungin, CHR) on autophagy flux and determine its effect on inflammatory injury in the lung tissue of septic mice. **Methods** C57BL/6 mice were inflicted by intraperitoneal administration of 10 mg/kg lipopolysaccharide to establish a mouse septic model of acute lung injury. To determine the effect of CHR on autophagy, the mice were pretreated with CHR and autophagy inducer rapamycin (Rapa) respectively in 30 min before LPS administration. The pathological changes of lung tissue in mice were observed, contents of inflammatory factors in alveolar lavage were measured, expression of autophagy-related markers LC3, P62 and Agt7 in lung tissues were determined by Western blotting and immunofluorescence assay, and formation of autophagosomes was observed by transmission electron microscopy. **Results** Compare with the LPS group, CHR pretreatment significantly attenuated LPS-induced lung pathological damages, and inhibited the expression of pro-inflammatory factors and enhanced the expression of anti-inflammatory factors in

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81372102);重庆市自然科学基金面上项目(cstc2020jcyj-msxmX0922)

[**通信作者**] 张 丹,E-mail:doctor_zhangdan@126.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

bronchoalveolar lavage fluid of mice ($P<0.05$). The results of Western blotting and immunofluorescence assay showed that the expression of autophagy marker proteins were up-regulated and the expression of autophagy substrate protein was down-regulated in the lung tissues after CHR pretreatmnet ($P<0.05$). Transmission electron microscopy displayed autophagosomes and autophagosolysosomes were formed in the CHR pretreatment group. The changes of autophagy flux, inflammatory mediators and lung pathology were consistent with the results in the Rapa group. **Conclusion** CHR may attenuate the inflammatory response by regulating the increase of autophagy flux in lung tissue after LPS stimulation and play a protective role in the lung of septic mice.

[**Key words**] chromofungin; sepsis; acute lung injury; autophagy flux; inflammation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81372102) and the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2020jcyj-msxmX0922). Corresponding author: ZHANG Dan, E-mail: doctor_zhangdan@126.com

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)作为脓毒症的严重并发症,主要表现为肺泡上皮屏障功能障碍、弥漫性肺间质及肺泡水肿、大量炎症因子释放以及细胞凋亡[1]。脓毒症 ALI 时机体难以控制的炎症反应及免疫功能抑制是脓毒症患者死亡的一个主要原因。自噬(autophagy)是一种细胞自我保护过程,由一系列相关信号分子调控形成自噬泡,将受损的蛋白质转运至溶酶体进行降解和循环,以维持细胞内环境的稳定。评估自噬水平最准确的方法是检测自噬流水平[2],即包括从自噬小体形成到与溶酶体融合的整个动态过程的检测。研究表明[3-6],自噬与多种病因所致的肺损伤病理过程相关。目前研究发现,自噬可参与调控脓毒症 ALI 时炎症反应,在脓毒症 ALI 小鼠模型中,激活并促进自噬可调节炎症反应,减少细胞凋亡及继发性组织损伤[7-8]。

嗜铬粒蛋白 A(chromogranin A,CGA)[9]是一种广泛分布于神经内分泌细胞和神经元内的可溶性糖蛋白,可调节激素和神经肽的储存和分泌,参与机体内环境稳定的调控,是多种生物活性肽的前体,在不同组织中可分解为不同片段。其衍生多肽 CGA_{47-66}(chromofungin, CHR)是一个具有多种生物活性的小分子多肽,参与先天免疫调节。EISSA 等[10]的研究发现 CHR 可降低结肠炎小鼠局部炎症反应及组织学损伤。本课题组前期研究[11-12]提示,在 TNF-α 所致炎症状态下,CHR 可改善血管内皮细胞的高通透性。在脓毒症 ALI 时,CHR 可激活自噬改善肺损伤。然而 CHR 对自噬动态过程的具体影响如何,及其调控自噬后如何改善肺损伤的机制,尚未完全阐明。

本研究通过 LPS 刺激建立脓毒症小鼠模型,明确 CHR 促进肺组织中自噬流水平增高,发挥抗炎保护作用,预防性保护脓毒症所致急性肺损伤,为进一步探讨脓毒症 ALI 的神经内分泌自身保护机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,体质量(20±5)g,购自重庆医科大学实验动物中心,饲养于 SPF 级动物房内,本实验遵循《实验动物保护条例》。64 只小鼠按随机数字表法分为 4 组($n=16$),分别为:①模型组(LPS),腹腔注射相应剂量的 LPS(10 mg/kg);②对照组,腹腔注射等量生理盐水;③CHR 预处理组(CHR+LPS),LPS 处理前腹腔注射低浓度 CHR(77.5 μg/kg)预处理 30 min;④Rapa 组(Rapa+LPS),LPS 处理前腹腔注射 Rapa (10 mg/kg)预处理 30 min。观察小鼠一般情况及 5 d 生存率。各组小鼠于 LPS 作用 6 h 后采集标本进行后续实验。

1.2 主要试剂

LPS 粉剂购于美国 Sigma 公司,溶于注射用水,配制成 1 mg/mL 的母液,4 ℃冰箱储存备用。胎牛血清、RPMI1640 培养基购于 HyClone 公司。兔多抗 LC3B、兔多抗 Atg7、兔多抗 P62 均购自武汉三鹰生物技术有限公司。辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔/小鼠 IgG、山羊抗鼠 Dylight488、山羊抗兔 Dylight549 等购自亚科因(武汉)生物技术有限公司。苏木精伊红染色试剂盒、苯甲基磺酰氟(PMSF)、RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、Western blot 试剂盒、DAPI、抗荧光淬灭封片液等购自上海碧云天生物技术有限公司。多肽购自上海科肽生物科技有限公司。嗜铬粒蛋白(CGA)衍生多肽 CGA_{47-66}(CHR: RILSILRHQNLLKELQDLAL)由上海科肽生物科技有限公司合成。

1.3 肺组织病理学改变

各组小鼠予以相应处理 6 h 后,处死小鼠,充分暴露胸腔,取右肺组织于 1.5 mL EP 管中,加入 4%多聚甲醛外固定 24 h,脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋、切片、

HE 染色,显微镜下观察肺组织病理变化。

1.4　ELISA 检测肺泡灌洗液中炎症相关细胞因子改变

各组小鼠接受相应处理 6 h 后,处死小鼠,仰卧位固定,充分暴露颈前及胸腔,用组织剪在气管上端做一切口,置入气管导管,注入 0.3 mL 生理盐水反复灌洗,灌洗 5 次,收集约 1.5 mL 肺泡灌洗液于 EP 管中,4 ℃,1 500 r/min 离心 10 min,提取上清液,根据 ELISA 试剂盒说明操作,检测肺泡灌洗液中促炎因子 IL-6、TNF-α、抗炎因子 IL-10 的浓度。实验重复 3 次。

1.5　Western blot 检测自噬标志蛋白表达

各个实验组处理同前述,提取左肺组织处理成组织匀浆,冰上裂解,4 ℃,12 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,对等量组织蛋白进行 SDS-PAGE 分离,电泳后转移到 PVDF 膜上后,封闭液封闭,自噬标志蛋白 LC3 和底物蛋白 P62 抗体 4 ℃孵育过夜,二抗常温下孵育 2 h,ECL 显影液处理,X 线片曝光,Image J 软件分析目的蛋白/相应内参灰度值比值。实验重复 3 次。

1.6　免疫荧光检测自噬表达

各实验组处理方法如前述,LPS 作用 6 h 后,提取各组小鼠右肺组织,置于 4%多聚甲醛中固定,4 ℃过夜,脱水、晾干、OCT 冰冻包埋,切片、通透、封闭,一抗孵育 4 ℃过夜,二抗室温下孵育 1 h,滴加含 DAPI 的抗荧光淬灭封片液封片,荧光显微镜下观察各组肺组织荧光强度。实验重复 3 次。

1.7　透射电镜观察自噬小体超微结构

实验动物处理方法如前述,处死小鼠后,取左肺切成 1 mm^3 大小组织块,用 4%戊二醛电镜固定液固定,4 ℃保存,送至重庆医科大学电子显微镜室进行透射电镜观察。

1.8　统计学分析

采用 Graphpad Prism 8 统计软件分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$。

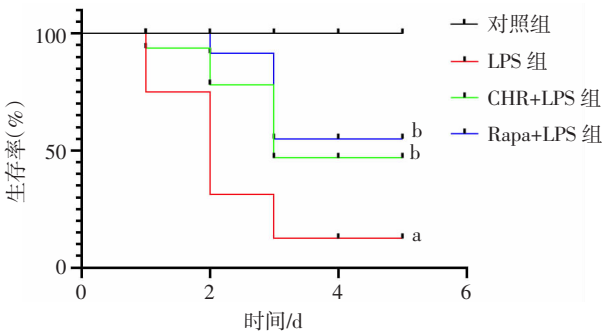
2　结果

2.1　CHR 对脓毒症小鼠生存率的影响

CHR 与 Rapa 预处理 30 min 后,用 LPS 腹腔注射处理小鼠,观察各组小鼠进食、活动度等一般情况,统计并分析 5 d 生存率的差异。结果显示,对照组小鼠无死亡,与对照组相比,LPS 组小鼠 5 d 生存率显著降低为 12.5%($P<0.05$);与 LPS 组相比,CHR 与 Rapa 预处理后小鼠生存率均增高,其中 CHR 组小鼠 5 d 生存率为 68.75%($P<0.05$),而 Rapa 预处理后小鼠 5 d 生存率为 81.25%($P<0.05$),差异均具有统计学意义,见图 1。

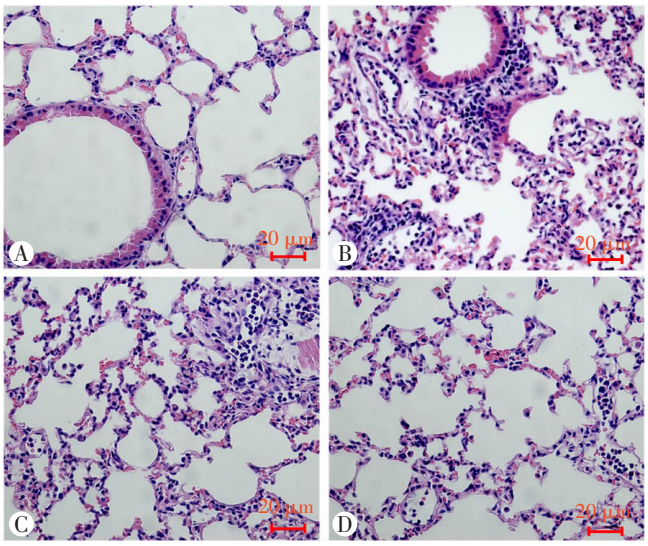
2.2　CHR 对 LPS 刺激后小鼠肺组织病理损伤的影响

倒置显微镜观察结果显示,LPS 组小鼠肺间质水肿增厚,肺泡腔明显萎陷,完整性破坏,大量炎性细胞浸润,呈明显的急性炎症反应表现。同时,与 LPS 组相比,CHR 组炎性渗出、肺实变及肺水肿等组织学损伤相对较轻;自噬诱导剂 Rapa 作用后同样减轻了肺组织炎性渗出、组织水肿、结构破坏等病理学改变,见图 2。



a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组比较

图 1　小鼠 5 d 生存率分析



A:对照组;B:LPS 组;C:CHR+LPS 组;D:Rapa+LPS 组

图 2　小鼠肺组织病理形态学变化　(HE)

2.3　CHR 对脓毒症小鼠肺组织中自噬水平的影响

通过 Western blot 检测小鼠肺组织中自噬相关蛋白表达变化,观察 CHR 对脓毒症时肺组织中自噬的影响,结果显示,与对照组相比,LPS 组小鼠肺组织 LC3 Ⅱ、P62 蛋白水平明显增加($P<0.05$)。与 LPS 组相比,CHR 组与 Rapa 组中 LC3 Ⅱ蛋白表达量均增加($P<0.05$),P62 蛋白表达则均显著减少($P<0.05$,图 3A、B)。

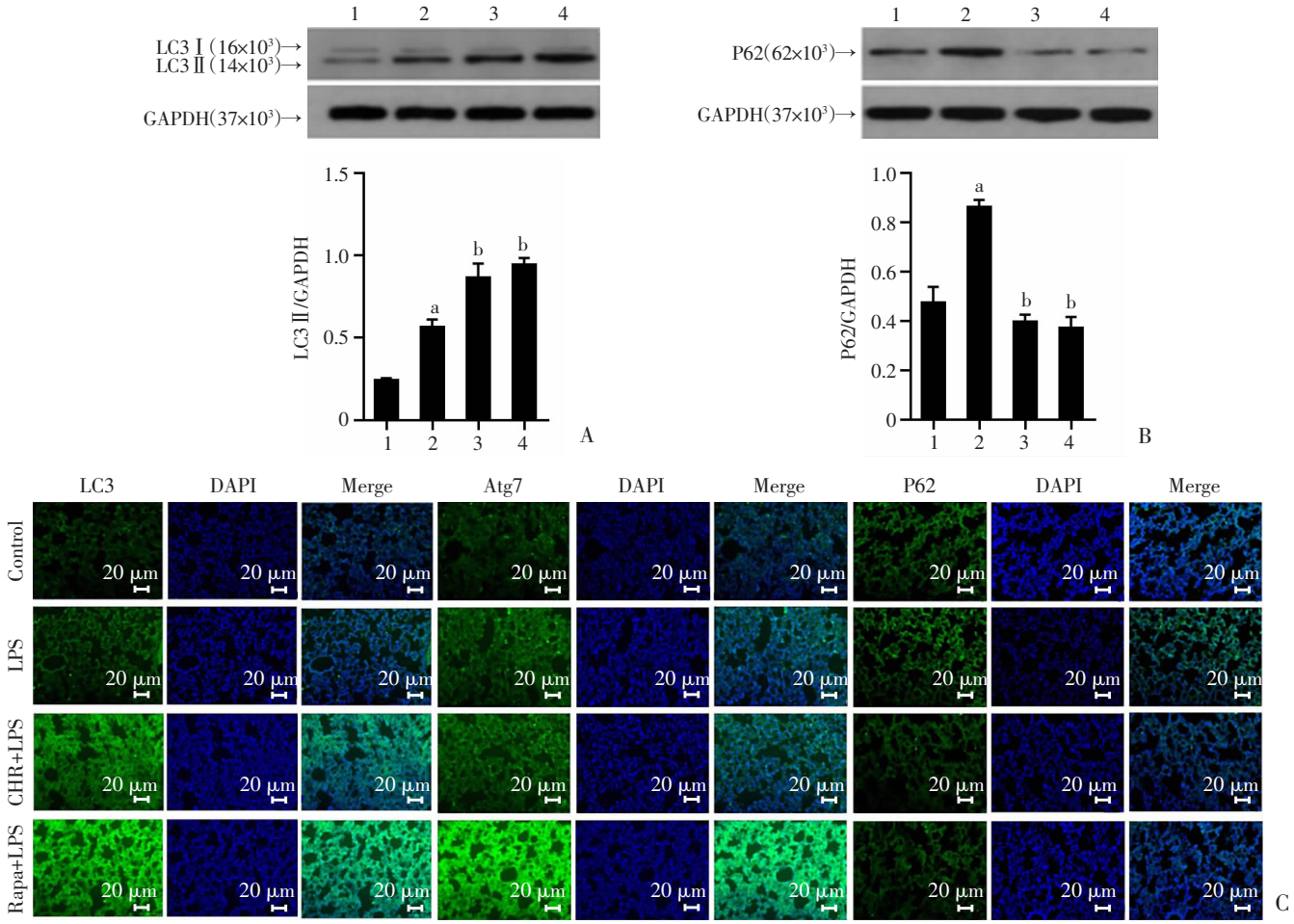
应用免疫荧光方法进一步观察各组小鼠肺组织中自噬标志物的荧光表达变化,发现与对照组相比,LPS 组中 LC3B 与 Atg7 的荧光表达强度增强,CHR 与 Rapa 预处理后较 LPS 组均有明显增强;LPS 组与对照组相比,P62 的荧光强度未有明显差异,而 CHR 组与 Rapa 组中 P62 荧光强度明显降低(图 3C)。

2.4 CHR 对脓毒症小鼠肺组织自噬流的影响

为了进一步观察 CHR 对各组小鼠肺组织中自噬过程的影响,通过透射电子显微镜观察肺组织超微结构,结果显示,与对照组(图 4A)相比,LPS 组中部分细胞结构水肿,出现空泡,胞内发现板层小体(图 4B);CHR 及 Rapa 预处理后肺组织肿胀明显改善,CHR 预处理后可观察到成熟自噬小体与自噬溶酶体(图 4C);Rapa 组中观察到大量自噬溶酶体形成(图 4D)。

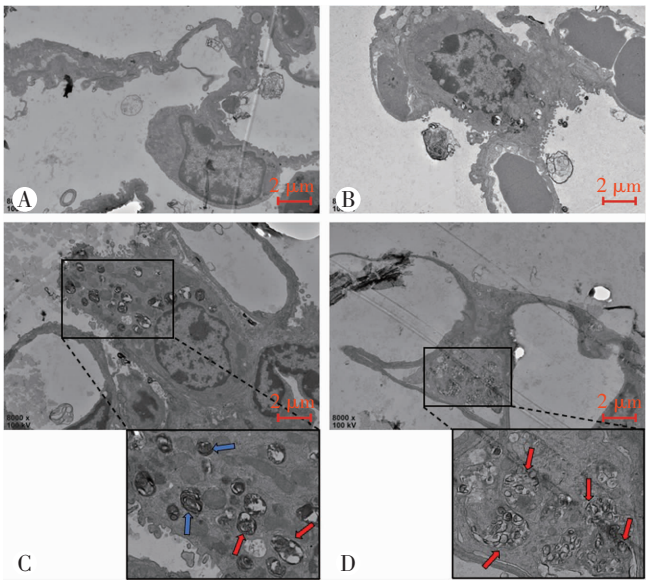
2.5 CHR 对脓毒症小鼠肺炎症反应的影响

为了验证 CHR 对肺组织炎症因子水平的影响,进一步提取小鼠肺泡灌洗液(BALF),ELISA 检测 BALF 中促炎因子 TNF-α、IL-6 以及抗炎因子 IL-10 的表达,结果显示:与对照组相比,LPS 组中 TNF-α、IL-6 浓度显著增加,同时 IL-10 表达降低($P<0.05$)。与 LPS 组相比,CHR 预处理后 TNF-α、IL-6 相对水平降低,IL-10 水平升高($P<0.05$)。此时,Rapa 组中炎症因子 TNF-α、IL-6 水平降低,抗炎因子 IL-10 表达增加($P<0.05$),差异均具有统计学意义,见图 5。



A:Western blot 检测自噬标志蛋白 LC3 表达水平;B:Western blot 检测自噬底物蛋白 P62 表达水平;C:免疫荧光检测自噬相关蛋白 LC3、Atg7、P62 荧光表达强度 1:对照组;2:LPS 组;3:CHR+LPS 组;4:Rapa+LPS 组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组比较

图 3 小鼠肺组织自噬相关蛋白表达水平



A:对照组;B:LPS 组;C:CHR+LPS 组;D:Rapa+LPS 组;蓝色箭头示自噬小体;红色箭头示自噬溶酶体

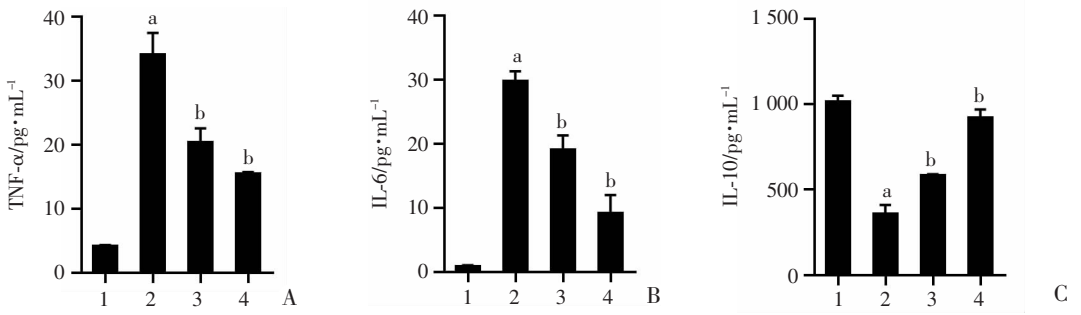
图 4 透射电镜观察 CHR 对脓毒症小鼠肺组织自噬流的影响

3 讨论

急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征[13-14]作为脓毒症诱发的常见肺部严重并发症,发展迅速,发生率及病死率高,至今仍无特异性治疗[4]。ALI 的病理生理学特征复杂,过度炎症反应和免疫损伤是 ALI 的核心特征,而在不同病因所致 ALI 中,因病原体及受影响细胞类型不同可引起不同水平自噬的激活,进而发挥对肺损伤的保护作用[15-16],但其具体机制尚不清楚。自噬是细胞膜包裹细胞质上可溶性大分子、受损细胞器或其他微生物形成双层膜结构的自噬小体,然后运送至溶酶体,形成自噬溶酶体再降解自噬小体内容物的高度动态、多步骤的生理过程[17-18]。本研究发现:①通过腹腔注射 LPS 建立脓毒症肺损伤小鼠模型,CHR 预处理后显著提高小鼠生存率,改善肺组织病理损伤,提示 CHR 对 LPS 诱导的 ALI 具有保护作用。②LPS 诱导的脓毒症 ALI 小鼠中,自噬处于不完全激活状态,予以 CHR 干预后,显著促进自噬水平,改善 ALI。③CHR 促进脓毒症 ALI 时肺组织上自噬小体的形成,及其与自噬溶酶体的融合,明确了 CHR 可通畅自噬流整个动态过程。④CHR 促进自噬流通畅,可抑制脓毒症时肺组织中炎症反应,进而改善了 ALI。总之,这些结果显示,CHR 通过调控自噬流改善了脓毒症中肺组织所受炎性损害。CHR 对自噬流的调控,为关于 CGA 及其衍生多肽的研究提供了新认识,可能促进脓毒症所致 ALI 治疗方法的新发展。

本研究结果提示 LPS 刺激后,脓毒症 ALI 时自噬发生不完全激活。本研究通过 Western blot 及免疫荧光检测发现,LPS 刺激后自噬标志蛋白表达上调,同时自噬底物蛋白积累,提示此时可能自噬激活但尚未形成自噬小体。为准确评估自噬水平,通过透射电镜直观地观察自噬流过程,结果在透射电镜下未观察到 LPS 处理后自噬小体也无自噬溶酶体的积累,进一步明确了脓毒症时肺组织中自噬激活时,尚未形成自噬小体,提示在脓毒症 ALI 时自噬可能呈现不完全激活状态。与既往 LIN 等[19]发现脓毒症肝损伤时自噬处于不完全激活状态的结果相似。

为明确 CHR 对 LPS 刺激后所致 ALI 时自噬水平的影响,本研究采用 Western blot 检测自噬相关蛋白的表达,结果发现,与 LPS 组相比,予以 CHR 预处理后,自噬标志蛋白表达水平显著升高,自噬底物蛋白水平降低。Rapa 是自噬诱导剂,能直接激活自噬,在本研究中 Rapa 预处理后自噬相关蛋白水平变化与 CHR 预处理后基本一致。进一步通过透射电镜检测,明确观察到 CHR 处理后自噬小体形成,且自噬溶酶体出现,提示 CHR 调控自噬流全过程通畅,上调自噬水平。与之一致的是,自噬诱导剂 Rapa 预处理后出现溶酶体吞噬自噬小体,降解内容物的表现,提示自噬流通畅,自噬水平增高。已有研究证实[20-21],在脓毒症时上调自噬相关蛋白能发挥肺保护性作用。本课题组前期研究



A:TNF-α 水平;B:IL-6 水平;C:IL-10 水平;1:对照组;2:LPS 组;3:CHR+LPS 组;4:Rapa+LPS 组; a:$P<0.05$,与对照组比较; b:$P<0.05$,与 LPS 组比较

图 5 CHR 对小鼠肺部炎症反应的影响

表明 CHR 可通畅自噬流改善脓毒症所致 ALI[11]。本研究结果进一步明确了脓毒症 ALI 时自噬发生不完全激活,予以 CHR 预处理可能与自噬诱导剂 Rapa 一样,可通畅肺组织上自噬流,提高自噬水平,对脓毒症肺损伤起到保护作用。

炎症的过度激活是脓毒症 ALI 发生的重要基础,本研究提取小鼠肺泡灌洗液,通过 ELISA 检测炎症因子水平,发现 CHR 预处理后,促炎因子水平显著降低,抗炎因子水平显著增高,提示 CHR 可下调脓毒症 ALI 的过度炎症反应,与 Rapa 影响炎症相关细胞因子水平的改变基本一致。因此,我们认为 CHR 减轻脓毒症所致 ALI 不仅取决于自身对炎症反应抑制,还取决于其具有自噬增强特性,可以通过提高肺组织自噬流的通畅,减少炎症相关细胞因子水平,改善脓毒症所致肺损伤。

嗜铬粒蛋白 A(CGA)是人体神经内分泌系统参与调节机体代谢、先天免疫、组织修复等不同生物学功能的重要激素前蛋白[6],研究表明血浆 CGA 水平与炎症反应评估指标之间存在相关性,且血浆 CGA 水平与脓毒症患者的预后及死亡率相关[22],是脓毒症患者临床不良预后的独立预测指标。CHR 作为 CGA 水解后短肽,课题组前期研究发现,CHR 可改善炎性状态下血管内皮细胞的高通透性所致损伤[12]。此外,在溃疡性结肠炎中 CHR 通过影响相关炎症介质及巨噬细胞的极化,发挥调控炎症反应及先天免疫的作用,以此改善肠道炎症[8]。本研究结果显示 CGA 及其衍生蛋白的重要全身炎症反应调节机制和脏器保护作用,在脓毒症肺损伤目前治疗遭遇瓶颈的现状下,CHR 作为 CGA 的重要功能片段,在机体应激反应中起到重要稳态调节作用,本研究着眼于应激调节和自噬激活这两个重要稳态调节机制,寻找脓毒症时脏器保护的新靶点。本研究也存在一定局限性,尚未深入探讨脓毒症 ALI 时,CHR 促进自噬调控炎症反应的具体自噬细胞及分子机制,后续将进一步从细胞水平和具体机制出发,为脓毒症肺损伤的预防和免疫调节治疗提供实验证据和新思路。

综上所述,在前期研究的基础上,本研究明确 LPS 诱导的脓毒症 ALI 时自噬不完全激活,CHR 通过促进脓毒症时小鼠肺组织中自噬溶酶体的融合形成,转运降解,维护自噬流通畅,促进自噬增强,进而减轻 LPS 刺激后肺部炎症反应,改善肺组织病理损伤程度,发挥对脓毒症所致 ALI 的预防性保护作用。

参考文献:

[1] GOTTS J E, MATTHAY M A. Sepsis: pathophysiology and clinical management[J]. BMJ, 2016,353: i1585. DOI: 10.1136/bmj.i1585.

[2] MO Y, LOU Y Y, ZHANG A Q, *et al*. PICK1 deficiency induces autophagy dysfunction *via* lysosomal impairment and amplifies sepsis-induced acute lung injury[J]. Mediat Inflamm, 2018, 2018: 6757368. DOI: 10.1155/2018/6757368. eCollection 2018.

[3] ZHAO H Y, CHEN H G, MENG X Y, *et al*. Autophagy activation improves lung injury and inflammation in sepsis[J]. Inflammation, 2019, 42(2): 426-439. DOI: 10.1007/s10753-018-00952-5.

[4] QIN L, LI M, TAN H L, *et al*. Mechanistic target of rapamycin-mediated autophagy is involved in the alleviation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 78: 105790. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105790.

[5] BODAS M, PEHOTE G, SILVERBERG D, *et al*. Autophagy augmentation alleviates cigarette smoke-induced CFTR-dysfunction, ceramide-accumulation and COPD-emphysema pathogenesis[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 131: 81-97. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.023.

[6] KESIREDDY V S, CHILLAPPAGARI S, AHUJA S, *et al*. Susceptibility of microtubule-associated protein 1 light chain 3β (MAP1LC3B/LC3B) knockout mice to lung injury and fibrosis[J]. Faseb J, 2019, 33(11): 12392-12408. DOI: 10.1096/fj.201900854R.

[7] WANG Z X, LI Y, YANG X W, *et al*. Protective effects of rapamycin induced autophagy on CLP septic mice[J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2019, 64: 47-52. DOI: 10.1016/j.cimid.2019.01.009.

[8] YEN Y T, YANG H R, LO H C, *et al*. Enhancing autophagy with activated protein C and rapamycin protects against sepsis-induced acute lung injury[J]. Surg U S, 2013, 153(5): 689-698.

[9] ZHANG D, SHOOSHTARIZADEH P, LAVENTIE B J, *et al*. Two chromogranin a-derived peptides induce calcium entry in human neutrophils by calmodulin-regulated calcium independent phospholipase A2[J]. PLoS ONE, 2009, 4(2): e4501. DOI: 10.1371/journal.pone.0004501.

[10] EISSA N, HUSSEIN H, KERMARREC L, *et al*. Chromofungin ameliorates the progression of colitis by regulating alternatively activated macrophages[J]. Front Immunol, 2017, 8: 1131. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01131.

[11] 刘疏柯, 姜丽萍, 刘贤, 等. CGA 衍生多肽 CHR 通过调控自噬流减轻脂多糖诱导的小鼠肺损伤[J]. 重庆医科大学学报. 2020, 45(6): 731-736. DOI: 10.13406/j.cnki.cyxb.002203.
LIU S K, JIANG L P, LIU X, *et al*. Chromogranin a-derived polypeptide CHR alleviates lipopolysaccharide induced lung injury in mice by regulating autophagy flux

[J]. J Chongqing Med Univ, 2020, 45(6): 731-736. DOI: 10.13406/j.cnki.cyxb.002203.

[12] LUO L, LIU S Y, ZHANG D, *et al*. Chromogranin A (CGA)-derived polypeptide (CGA 47-66) inhibits TNF-α-induced vascular endothelial hyper-permeability through SOC-related Ca^{2+} signaling[J]. Peptides, 2020, 131: 170297. DOI: 10.1016/j.peptides.2020.170297.

[13] PASSMORE M R, BYRNE L, OBONYO N G, *et al*. Inflammation and lung injury in an ovine model of fluid resuscitated endotoxemic shock[J]. Respir Res, 2018, 19(1): 231. DOI: 10.1186/s12931-018-0935-4.

[14] TAKAHASHI W, WATANABE E, FUJIMURA L, *et al*. Kinetics and protective role of autophagy in a mouse cecal ligation and puncture-induced sepsis[J]. Crit Care Lond Engl, 2013, 17(4): R160. DOI: 10.1186/cc12839.

[15] HU Y, LOU J, MAO Y Y, *et al*. Activation of MTOR in pulmonary epithelium promotes LPS-induced acute lung injury[J]. Autophagy, 2016, 12(12): 2286-2299. DOI: 10.1080/15548627.2016.1230584.

[16] ZHANG Y, LIU G J, DULL R O, *et al*. Autophagy in pulmonary macrophages mediates lung inflammatory injury *via* NLRP3 inflammasome activation during mechanical ventilation[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014, 307(2): L173-L185. DOI: 10.1152/ajplung.00083.2014.

[17] LIN L, ZHANG L J, YU L Z, *et al*. Time-dependent changes of autophagy and apoptosis in lipopolysaccharide-induced rat acute lung injury[J]. Iran J Basic Med Sci, 2016, 19(6): 632-637.

[18] LEI M, WANG C J, YU F, *et al*. Different intensity of autophagy regulate interleukin-33 to control the uncontrolled inflammation of acute lung injury[J]. Inflamm Res, 2019, 68(8): 665-675. DOI: 10.1007/s00011-019-01250-y.

[19] LIN C W, LO S, PERNG D S, *et al*. Complete activation of autophagic process attenuates liver injury and improves survival in septic mice[J]. Shock, 2014, 41(3): 241-249. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000111.

[20] ZENG M C, SANG W H, CHEN S, *et al*. 4-PBA inhibits LPS-induced inflammation through regulating ER stress and autophagy in acute lung injury models[J]. Toxicol Lett, 2017, 271: 26-37. DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.02.023.

[21] GAO Y, WANG N, LI R H, *et al*. The role of autophagy and the chemokine (C-X-C motif) ligand 16 during acute lung injury in mice[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 2404-2412. DOI: 10.12659/msm.906016.

[22] HSU C H, REYES L F, ORIHUELA C J, *et al*. Chromogranin A levels and mortality in patients with severe sepsis[J]. Biomarkers, 2015, 20(3): 171-176. DOI: 10.3109/1354750X.2015.1046932.

(收稿:2021-02-08;修回:2021-03-31)

(编辑 王 红)