DOI:10.16016/j.2097-0927.202212009

血小板反应蛋白-1敲除对放射性肺纤维化的影响及其机制

焦 露,李 杰,张 静,陈用来,郝玉徽 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系复合伤研究所

[摘要] **目的** 探讨血小板反应蛋白-1(thrombospondin-1, TSP-1)对放射性肺纤维化的影响及其可能机制。**方法** 选取6~8周龄雄性野生型C57BL/6小鼠(wild type,WT)和全身性敲除TSP-1小鼠($TSP\text{-}1^{-/-}$),将小鼠分为野生辐照组(WT+IR)和TSP-1敲除辐照组($TSP\text{-}1^{-/-}$+IR),每组各6只。采用^{60}Co γ射线全肺照射16 Gy建立放射性肺纤维化小鼠模型。照射后第16周,HE染色观察小鼠肺组织形态变化,天狼猩红染色观察肺组织胶原表达水平,qRT-PCR法检测小鼠肺组织中TGF-β1和Collagen Ⅰ的mRNA表达水平,micro-CT评价肺损伤和肺实变情况,FlexiVent系统评价小鼠肺功能水平,免疫荧光染色检测肺组织LC-3和p62的蛋白表达,透射电镜观察肺组织细胞自噬体。**结果** 与野生辐照组相比,TSP-1敲除辐照组小鼠肺损伤减轻,肺组织胶原沉积减少,TGF-β1和Collagen Ⅰ的mRNA表达水平显著降低($P<0.01$),肺功能水平有所改善。免疫荧光和透射电镜结果显示TSP-1敲除辐照组小鼠肺组织出现细胞自噬。**结论** TSP-1敲除能够减轻放射性肺纤维化,其机制可能与细胞自噬激活有关。

[关键词] 血小板反应蛋白-1;放射性肺纤维化;自噬;TGF-β1;FlexiVent
[中图法分类号] R341; R563.9; R818.023 [文献标志码] A

Effect and underlying mechanism of thrombospondin-1 knockout on radiation-induced pulmonary fibrosis in mice

QIAO Lu, LI Jie, ZHANG Jing, CHEN Yonglai, HAO Yuhui Institute of Combined Injury, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of thrombospondin-1 (TSP-1) knockout on radiation-induced pulmonary fibrosis and explore its underlying mechanism. **Methods** Male wild type C57BL/6 mice (6~8 weeks old, WT mice) and TSP-1 knockout mice ($TSP\text{-}1^{-/-}$ mice) were subjected and received 16 Gy ^{60}Co γ-ray whole lung irradiation (IR) to induce radiation pulmonary fibrosis, and then, the mice were assigned into WT+IR group and $TSP\text{-}1^{-/-}$+IR group, respectively, with 6 mice in each group. In 16 weeks after irradiation, HE staining was performed to observe the morphological changes in lung tissues, and Sirius red staining was used to observe the collagen expression in lung tissues. qRT-PCR was employed to detect the mRNA expression of TGF-β1 and Collagen Ⅰ in lung tissues. Micro-CT scanning was adopted to evaluate lung injury and substantial lung changes. FlexiVent system was employed to assess pulmonary function. Immunofluorescence staining was conducted to measure the protein levels of LC-3 and p62 in lung tissues. Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the cellular autophagic vesicles in lung tissues. **Results** Compared with the WT+IR group, the $TSP\text{-}1^{-/-}$+IR group had reduced lung injury and collagen deposition in lung tissue, significantly lower mRNA levels of TGF-β1 and Collagen Ⅰ in lung tissue ($P<0.01$), and improved pulmonary function. Immunofluorescence assay and TEM showed that autophagy was observed in the mice of $TSP\text{-}1^{-/-}$+IR group. **Conclusion** TSP-1 knockout can alleviate radiation-induced

[基金项目] 重庆市自然科学基金面上项目(2022NSCQ-MSX4675)
[通信作者] 郝玉徽,E-mail: yuhui_hao@126.com

2097-0927/Copyright © 2023, 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/)

pulmonary fibrosis, which may be related to activation of autophagy.

[**Key words**] thrombospondin-1; radiation-induced pulmonary fibrosis; autophagy; TGF-β1; FlexiVent

Supported by the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (2022NSCQ-MSX4675). Corresponding author: HAO Yuhui, E-mail: yuhui_hao@126.com

放射性肺纤维化(radiation-induced pulmonary fibrosis, RIPF)是胸部放疗后的常见并发症。近年来,放射性肺纤维化的发病率逐年增加,严重影响患者肺功能水平和生活质量[1]。目前,放射性肺纤维化的发病机制仍不清楚,临床上也缺乏有效的治疗药物[2]。因此,阐明肺纤维化的发病机制对于放射性肺纤维化的治疗具有重要意义。

血小板反应蛋白-1(thrombospondin-1, TSP-1)是一种细胞外基质糖蛋白,具有促进伤口愈合、促衰老和调节血管生成等生物学作用[3-4]。大量研究证实 TSP-1 参与多种器官纤维化致病过程,如肾纤维化[5]、肺纤维化[6]、肝纤维化[7]。然而 TSP-1 在放射性肺纤维化中的机制尚不清楚。因此,本研究使用^{60}Co γ 射线构建辐射诱导的肺纤维化小鼠模型,探讨 TSP-1 基因敲除对肺纤维化的影响及可能机制,为放射性肺纤维化治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6~8 周龄的 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。TSP-1 基因敲除鼠购自 Cyagen Biosciences Inc.(美国)。所有动物均饲养在陆军军医大学实验动物中心,饲养环境温度维持在 22~28 ℃,相对湿度控制在 45%~65%。本研究经陆军军医大学伦理委员会批准(AMUWEC20210489),并根据《中国实验动物福利和伦理指南》进行。

1.1.2 主要试剂 鼠尾直接 PCR 试剂盒(货号:B40015,上海毕傲图生物科技有限公司),4%多聚甲醛(货号:P0099,上海碧云天生物技术有限公司),苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(货号:C0105S,上海碧云天生物技术有限公司),天狼猩红染色液试剂盒(货号:SJ1203-kit,上海双简生物科技有限公司),免疫组化抗原修复缓冲液(货号:ZLI-9064,北京中杉金桥生物技术有限公司),封闭用正常羊血清(货号:ZLI-9021,北京中杉金桥生物技术有限公司),LC-3 多克隆抗体(货号:14600-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司),PBS 缓冲液(货号:HY-K1023,Medchemexpress 公司),p62-SQSTM1 单克隆抗体(货号:66184-1-Ig,武汉三鹰生物技术有限公司),Anti-rabbit IgG (H+L)(货号:4412S,Cell Signaling Technology 公司),Alexa Fluor 647 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)(货号:A0473,上海碧云天生物技术有限公司),反转录试剂盒(货号:RR036A,宝生物工程有限公司),实时荧光定量试剂盒(货号:RR820A,宝生物工程有限公司)。

1.1.3 主要仪器 Flexivent system(型号:Flexivent FV-FX4,SCIREQ 公司,加拿大),荧光显微镜(型号:DM2500, Leica 公司, 德国), micro-CT (型号:CLS149276,PerkinElmer 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及模型建立 将小鼠分为野生辐照组(WT+IR 组)和 TSP-1 敲除辐照组(TSP-1$^{-/-}$+IR 组),每组各 6 只。小鼠腹腔注射 1%戊巴比妥 0.15 mL,待到小鼠麻醉后,用胶带将小鼠固定在纸板上,铅砖遮挡住除小鼠肺部以外的部位,采用^{60}Co γ 射线以单剂量率 0.59 Gy/min 和总剂量 16 Gy 照射全肺。照射后第 16 周处死小鼠,取肺组织开展后续实验。

1.2.2 鼠尾基因型鉴定 根据试剂说明书,使用鼠尾直接 PCR 试剂盒鉴定 TSP-1 基因型敲除鼠。向含有鼠尾的 EP 管中加入 100 μL 组织消化液,55 ℃金属浴消化 15 min,95 ℃金属浴灭活 5 min;在低温环境下根据试剂说明书配置 PCR 反应体系,使用 Bio-Rad PCR 仪扩增;将 PCR 扩增样品进行 DNA 琼脂糖凝胶电泳,使用凝胶成像仪拍照。

1.2.3 苏木精-伊红(HE)染色 取左肺组织用 4%多聚甲醛固定 48 h,经脱水、包埋、切片、烤片、水化;苏木精染色 5 min,自来水冲洗 5 min,盐酸乙醇分化 30 s,自来水冲洗 2 min,温水返蓝 5 min;伊红染色 1 min,95%乙醇 2 min,无水乙醇 2 min,二甲苯透明 10 min,中性树脂封片,光学显微镜下观察小鼠肺组织形态变化。

1.2.4 天狼猩红染色 左肺组织用 4%多聚甲醛固定 48 h 后,常规脱水包埋,切片,常规脱蜡至水;Weigert's 铁苏木精染色液染色 10 min,自来水冲洗 5 min,去离子水洗 1 次;天狼猩红染色液染色 1 h;0.2%醋酸水溶液洗 2 次,去除多余水分,100%酒精脱水 3 次,二甲苯透明 10 min,中性树胶封片,偏振光显微镜拍照。

1.2.5 Micro-CT 扫描 将待测小鼠放入麻醉舱中,使用异氟烷和氧气混合气体麻醉小鼠,将麻醉的小鼠

放置于 micro-CT 配套的动物床板上,异氟烷持续麻醉,利用 micro-CT 扫描舱口处红外线对小鼠胸部进行定位和扫描。用软件对小鼠肺部扫描结果进行分析和三维重建。

1.2.6 qRT-PCR 检测 用 TRIzol 法提取小鼠肺组织的 RNA,测定 RNA 浓度,用试剂盒反转录为 cDNA,配置 qRT-PCR 反应体系,包括 0.4 μL 正反向引物、1 μL cDNA 模板、10 μL SYBR Green 和 8.2 μL 去离子水。所有引物由上海生物工程股份有限公司设计并合成。引物序列见表 1,反应条件为 97 ℃预热 8 min、95 ℃变性 5 s、60 ℃退火 31 s,共 40 个循环。采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 方法分析结果。

表 1 各基因引物信息

基因	引物序列
TGF-β1	上游:5′-CTCCCGTGGCTTCTAGTGC-3′
	下游:5′-GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG-3′
Collagen Ⅰ	上游:5′-GCTCCTCTTAGGGGCCACT-3′
	下游:5′-CCACGTCTCACCATTGGGG-3′
GAPDH	上游:5′-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3′
	下游:5′-RTGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3′

1.2.7 FlexiVent 肺功能检测 照射后第 16 周使用 FlexiVent 仪检测小鼠肺功能状态。首先对小鼠进行称量并记录数据,然后腹腔注射 1%戊巴比妥 0.2 mL,等到小鼠自主呼吸减弱后,使用手术剪暴露颈部皮肤,手术镊子钝性分离气管周围的结缔组织,用手术剪在暴露的气管位置剪开一个约 1 mm 的切口,将气管插入剪开的切口中,棉线固定气管插管,将带有气管插管的小鼠与 FlexiVent 肺功能仪连接,测定小鼠的气道阻力(Rrs)、气道弹性阻力(Ers)、中央气道阻力(Rn)等肺功能相关指标。

1.2.8 免疫荧光染色 左肺组织经固定,脱水,石蜡包埋,切成 4 μm 的石蜡切片;脱蜡至水,用柠檬酸盐在高压下修复 30 min,羊血清封闭 2 h;一抗 LC-3(1∶200)、p62(1∶300)4 ℃ 过夜;PBS 洗涤 3 次,荧光二抗(1∶1 000)37 ℃避光孵育 1 h;PBS 洗涤 3 次,DAPI 染色 10 min,PBS 洗涤 1 次,抗荧光淬灭剂封片。荧光显微镜拍照。

1.2.9 透射电镜观察 取小鼠新鲜肺组织,制成约 1 mm^3 大小的组织块,4%戊二醛和 1% 四氧化锇双重固定,丙酮逐级脱水, 树脂包埋,用切片机制成厚度为 50 nm 的超薄切片,枸橼酸铅染色,透射电镜观察组织中细胞自噬小体的形成情况。

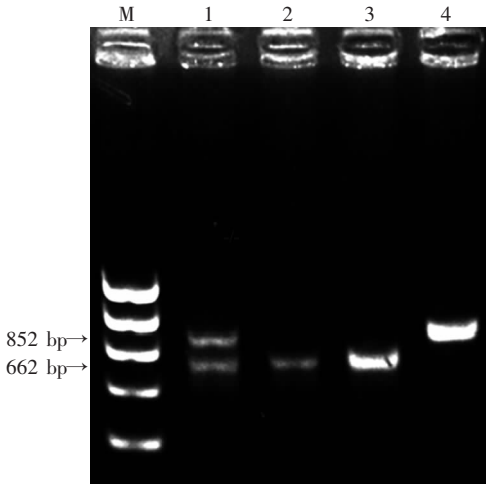
1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9.0 进行统计分析和作图,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,$P<0.05$ 则认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TSP-1 基因敲除鼠鉴定

为了鉴定合笼繁殖小鼠的子代基因型,使用鼠尾直接 PCR 试剂结合 DNA 琼脂凝胶电泳鉴定野生型小鼠、TSP-1 杂合小鼠和 TSP-1 纯合小鼠。鼠尾鉴定结果显示:野生型小鼠的扩增条带在 852 bp,TSP-1 杂合小鼠有 2 条扩增条带,分别位于 662 bp 和 852 bp;TSP-1 纯合子的扩增条带在 662 bp(图 1)。因此,选用野生型小鼠和 TSP-1 纯合子小鼠开展后续实验。



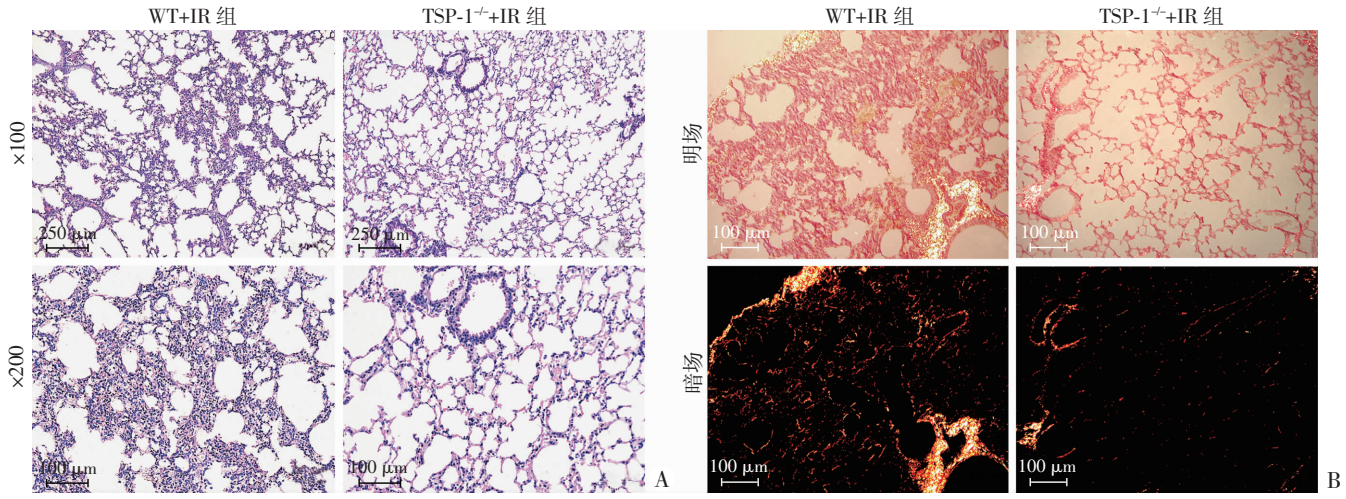
M:标准; 1:野生型;2、3:TSP-1 纯合子;4:TSP-1 杂合子

图 1 TSP-1 基因敲除鼠鉴定电泳图

2.2 TSP-1 敲除对放射性肺纤维化的影响

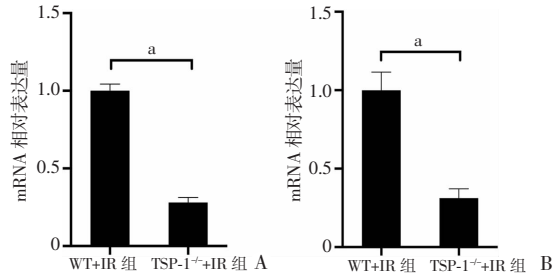
2.2.1 各组小鼠肺组织病理学观察 HE 染色结果显示:WT+IR 组小鼠肺组织结构破坏严重,肺泡间隔增厚,细胞浸润增多;TSP-$1^{-/-}$+IR 组小鼠肺泡结构相对清晰,肺泡间隔无明显增厚,肺纤维化程度较 WT+IR 组明显减轻(图 2A)。天狼猩红染色结果显示:在明场下观察到 WT+IR 组小鼠的肺泡壁和气管周围可见大量红色胶原纤维和黄色肌纤维沉积,TSP-$1^{-/-}$+IR 组肺组织胶原纤维沉积明显减少;在暗场下观察到 WT+IR 组小鼠气管和肺泡壁可见较多强橙黄色和亮红色的Ⅰ型胶原纤维,TSP-$1^{-/-}$+IR 组肺组织的Ⅰ型胶原纤维表达减少(图 2B)。

2.2.2 各组小鼠肺纤维化指标表达差异 TGF-β1 和 Collagen Ⅰ是肺纤维化的重要指标,采用 qRT-PCR 检测各组小鼠肺组织中的 TGF-β1 和 Collagen Ⅰ的 mRNA 表达差异。qRT-PCR 结果显示:TSP-$1^{-/-}$+IR 组肺组织中 TGF-β1 和 Collagen Ⅰ的 mRNA 显著低于 WT+IR 组($P<0.01$,图 3)。这提示 TSP-1 敲除能下调小鼠肺组织中纤维化指标的表达水平。



A:肺组织 HE 染色;B:肺组织天狼猩红染色

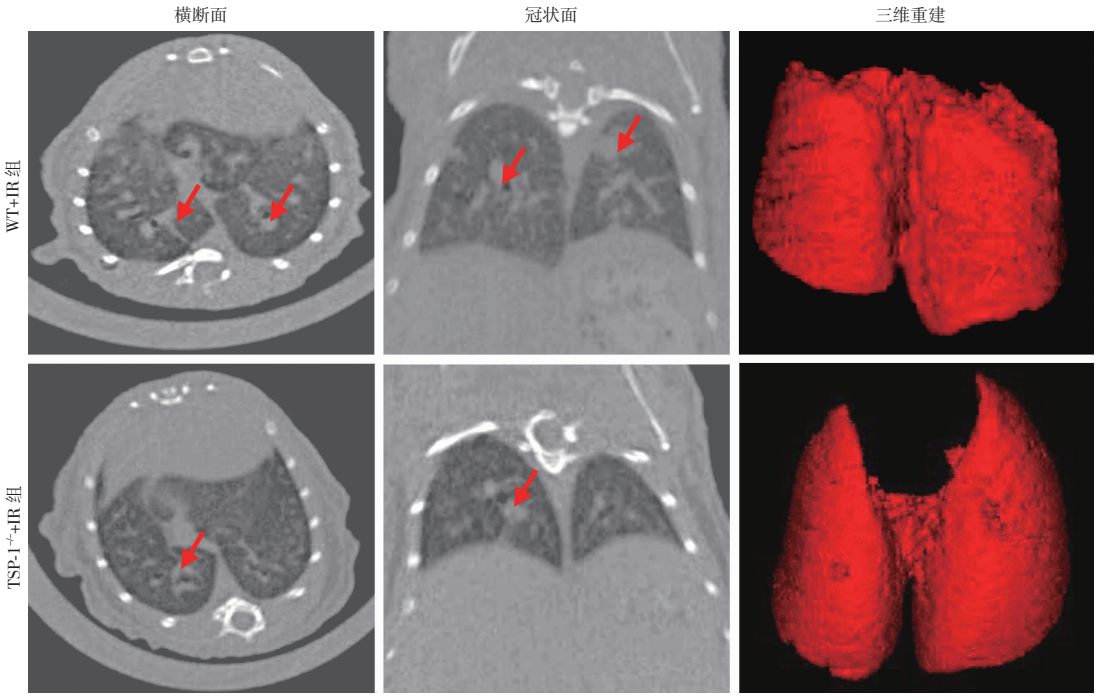
图 2 HE 染色和天狼猩红染色观察各组小鼠肺组织病理学变化



a:$P<0.01$

图 3 各组小鼠肺组织 TGF-β1(A)和 Collagen Ⅰ(B)的 mRNA 表达差异($n=6$)

2.2.3 各组小鼠肺部影像学差异 Micro-CT 显示:照射后第 16 周,WT+IR 组的肺组织可见较多的高密度影(红色箭头所指处),三维重建结果显示 WT+IR 组小鼠的肺损伤严重;与 WT+IR 组相比,TSP-1$^{-/-}$+IR 组的肺组织高密度影面积减少,三维重建结果显示 TSP-1$^{-/-}$+IR 组小鼠的肺损伤较 WT+IR 组明显减轻。见图 4。



红色箭头示高密度影

图 4 各组小鼠肺部影像学表现

2.2.4　各组小鼠肺功能差异　　FlexiVent 肺功能仪检测结果显示:与 WT+IR 组相比,TSP-$1^{-/-}$+IR 组小鼠的气道阻力(Rrs)、气道弹性阻力(Ers)、中央气道阻力(Rn)显著降低($P<0.01$),提示 TSP-$1^{-/-}$纤维化小鼠肺组织的气道阻力降低,呼吸系统阻力减小;静态顺应性(Cst)增加($P<0.01$),组织损伤(G)减少($P<0.01$),深吸气量(IC)增加($P<0.01$),提示敲除 TSP-1 可减少辐照后小鼠的肺组织损伤,提高呼吸系统的吸气量和静态顺应性,减轻呼吸系统损伤。具体见图 5。

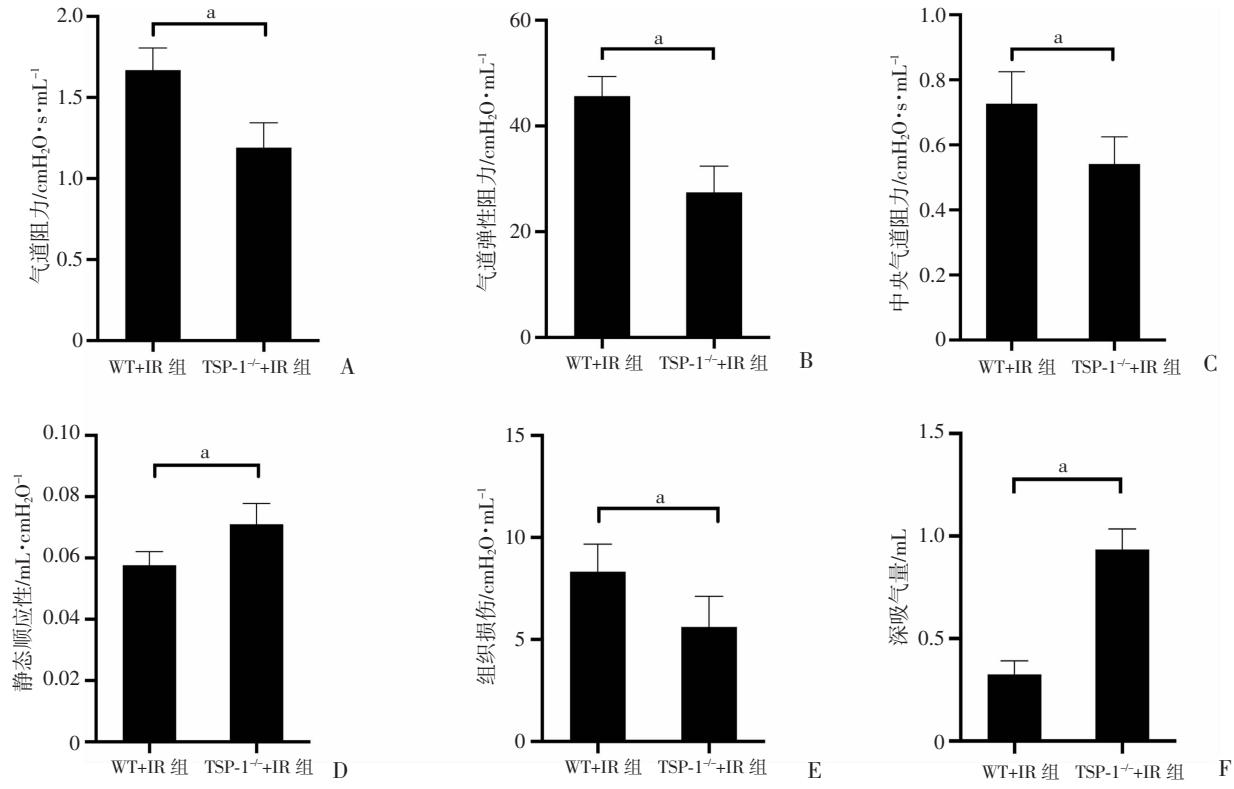
2.3　TSP-1 敲除对自噬的影响

为了进一步研究 TSP-1 敲除在放射性肺纤维化中的作用机制,使用免疫荧光检测自噬标志物 LC-3 和自噬底物 p62 的蛋白表达水平,透射电镜观察各组小鼠肺组织细胞自噬小体。免疫荧光结果显示:WT+IR 组肺组织的自噬标志物 LC-3 的蛋白几乎不表达,自噬底物 p62 蛋白表达较多;TSP-$1^{-/-}$+IR 组肺组织的 LC-3 较 WT+IR 组蛋白表达增加,p62 蛋白表达减少(图 6A)。透射电镜结果显示:WT+IR 组肺组织无细胞自噬小体形成,TSP-$1^{-/-}$+IR 组出现细胞自噬小体(图 6B)。

3　讨论

既往研究表明,TSP-1 参与百草枯或博莱霉素诱导的肺纤维化发病机制[8-10]。然而,TSP-1 是否参与电离辐射诱导的肺纤维化尚不清楚。本研究使用 TSP-1 基因敲除小鼠,通过^{60}Co γ 射线单次 16 Gy 照射建立肺纤维化小鼠模型,比较野生小鼠和 TSP-1 基因敲除小鼠在组织病理学、生物分子学、影像学、肺功能方面的变化,证实了 TSP-1 在放射性肺纤维化中的作用,并初步阐明其机制是 TSP-1 缺失通过激活自噬减轻放射性肺纤维化。

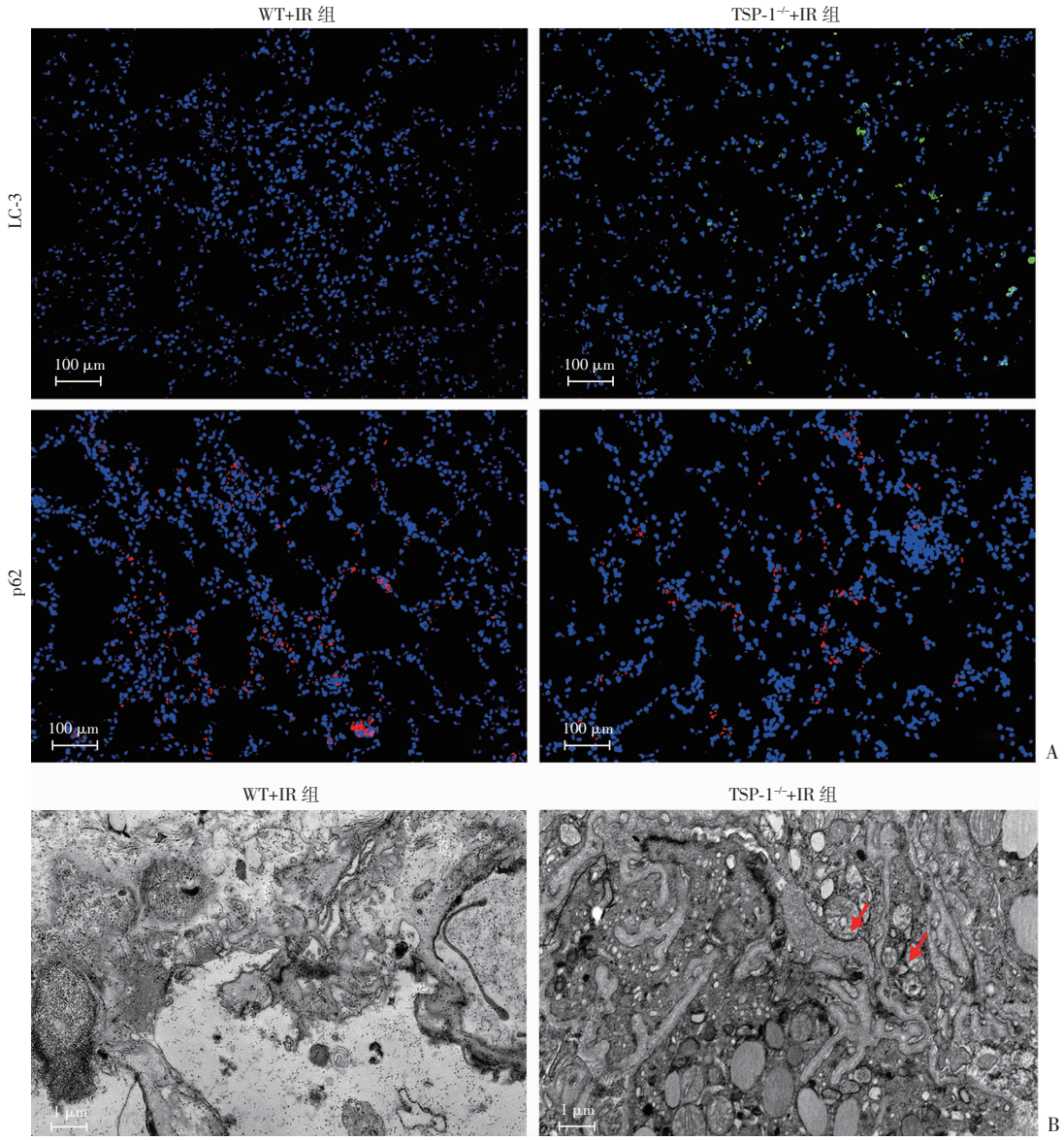
本研究结果发现,与野生辐照组相比,TSP-$1^{-/-}$辐照小鼠肺组织破坏程度减轻,胶原沉积减少,纤维化指标 TGF-β1 和 Collagen Ⅰ的 mRNA 表达降低,肺损伤减轻,肺功能水平有所好转。这提示 TSP-1 基因敲除能减轻辐照后小鼠的肺纤维化。为了进一步探讨 TSP-1 敲除在肺纤维化中的发病机制,本研究使用免疫荧光和透射电镜观察两组小鼠肺组织的自噬水平。结果发现,野生辐照小鼠肺组织中的 LC-3 蛋白几乎不表达,自噬底物 p62 蛋白表达较多,透射电镜下未见细胞自噬小体。这提示肺纤维化中自噬不足,与文献[11-12]报道一致。值得注意的是,在 TSP-$1^{-/-}$辐照小鼠肺组织中的 LC-3 蛋白表达增加,p62 蛋白表达减少,透射电镜下观察到细胞自噬小体出现。这说明 TSP-1 敲除在放射性肺纤维化中的作用可能是通过激活细胞自噬实现的。



a:$P<0.01$

A:气道阻力;B:气道弹性阻力;C:中央气道阻力;D:静态顺应性;E:组织损伤;F:深吸气量

图 5　FlexiVent 检测各组小鼠肺功能指标变化($n=6$)



A:免疫荧光染色检测肺组织 LC-3 和 p62 的蛋白表达;B:透射电镜检测肺组织自噬体 红色箭头示自噬体

图 6 TSP-1 敲除对小鼠肺组织自噬的影响

研究表明自噬在肺纤维化中发挥重要作用[13-15]。自噬是一个吞噬自身细胞质蛋白或细胞器并使其包被进入囊泡,并与溶酶体融合形成自噬溶酶体,降解其所包裹的内容物的过程,这个过程在维持蛋白质代谢平衡和细胞内环境稳态等方面发挥重要作用。自噬受多种信号通路的调控,其中 mTOR(雷帕霉素靶蛋白)信号通路是调节自噬的主要通路。在自噬初期,mTOR 能够抑制自噬溶酶体膜的形成,从而抑制自噬的发生[16]。大部分证据表明 mTOR 的异常活化和自噬不足都会加速肺纤维化的发展[17-18]。本研究证实放射性肺纤维化中存在自噬不足,TSP-1 敲除能够激活肺纤维化组织中的自噬,但是 TSP-1 和自噬在放射性肺纤维化中的作用仍不清楚。研究表明,TSP-1 可以通过 mTOR 信号通路参与肿瘤发生[19]、皮肤损伤[20]、血管生成[21]、癌症迁移[22]等多种疾病表型的调节过程。因此,mTOR 可能是 TSP-1 在放射性肺纤维化中调控自噬的重要通路,这还需要在未来的研究中进一步探索。

本研究结果表明 TSP-1 敲除能减轻放射性肺纤维化,其机制可能是 TSP-1 缺失激活细胞自噬实现的。这一发现为进一步阐明放射性肺纤维化机制提供了新的方向。

参考文献:

[1] MAHER T M, BENDSTRUP E, DRON L, *et al*. Global incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Respir Res, 2021, 22(1): 197. DOI: 10.1186/s12931-

021-01791-z.

[2] ARROYO-HERNÁNDEZ M, MALDONADO F, LOZANO-RUIZ F, *et al*. Radiation-induced lung injury: current evidence[J]. BMC Pulm Med, 2021, 21(1): 9. DOI: 10.1186/s12890-020-01376-4.

[3] ISENBERG J S, ROBERTS D D. Thrombospondin-1 in maladaptive aging responses: a concept whose time has come [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2020, 319(1): C45-C63. DOI: 10.1152/ajpcell.00089.2020.

[4] CHEN H, HERNDON M E, LAWLER J. The cell biology of thrombospondin-1[J]. Matrix Biol, 2000, 19(7): 597-614. DOI: 10.1016/S0945-053X(00)00107-4.

[5] HUGO C. The thrombospondin 1-TGF-β axis in fibrotic renal disease[J]. Nephrol Dial Transplant, 2003, 18(7): 1241-1245. DOI: 10.1093/ndt/gfg159.

[6] DI GUGLIELMO G M. TSP-1 in lung fibrosis[J]. J Cell Commun Signal, 2010, 4(4): 185-186. DOI: 10.1007/s12079-010-0097-8.

[7] LI Y, TURPIN C P, WANG S. Role of thrombospondin 1 in liver diseases[J]. Hepatol Res, 2017, 47(2): 186-193. DOI: 10.1111/hepr.12787.

[8] 高薇, 谢席胜. TSP-1-CD47 在 ROS 介导百草枯致肺纤维化中的作用[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2018, 36(9): 653-661. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9391.2018.09.003.
GAO W, XIE X S. The role of TSP-1-CD47 in ROS-mediated pulmonary fibrosis induced by paraquat[J]. Chin J Ind Hyg Occup Dis, 2018, 36(9): 653-661. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9391.2018.09.003.

[9] YEHUALAESHET T, O'CONNOR R, BEGLEITER A, *et al*. A CD36 synthetic peptide inhibits bleomycin-induced pulmonary inflammation and connective tissue synthesis in the rat[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000, 23(2): 204-212. DOI: 10.1165/ajrcmb.23.2.4089.

[10] CHEN Y, WANG X, WENG D, *et al*. A TSP-1 synthetic peptide inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in mice[J]. Exp Toxicol Pathol, 2009, 61(1): 59-65. DOI: 10.1016/j.etp.2008.04.010.

[11] ARAYA J, KOJIMA J, TAKASAKA N, *et al*. Insufficient autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013, 304(1): L56-L69. DOI: 10.1152/ajplung.00213.2012.

[12] LI X, ZHAO F, WANG A, *et al*. Role and mechanisms of autophagy in lung metabolism and repair[J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(12): 5051-5068. DOI: 10.1007/s00018-021-03841-7.

[13] ZHANG J J, WANG H X, CHEN H B, *et al*. ATF3-activated accelerating effect of LINC00941/lncIAPF on fibroblast-to-myofibroblast differentiation by blocking autophagy depending on ELAVL1/HuR in pulmonary fibrosis [J]. Autophagy, 2022, 18(11): 2636-2655. DOI: 10.1080/15548627.2022.2046448.

[14] ZHAO H, WANG Y, QIU T, *et al*. Autophagy, an important therapeutic target for pulmonary fibrosis diseases [J]. Clin Chim Acta, 2020, 502: 139-147. DOI: 10.1016/j.cca.2019.12.016.

[15] ANNANGI B, LU Z Y, BRUNIAUX J, *et al*. Macrophage autophagy protects mice from cerium oxide nanoparticle-induced lung fibrosis[J]. Part Fibre Toxicol, 2021, 18(1): 6. DOI: 10.1186/s12989-021-00398-y.

[16] KIM Y C, GUAN K L. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation[J]. J Clin Invest, 2015, 125(1): 25-32. DOI: 10.1172/JCI73939.

[17] LAWRENCE J, NHO R. The role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in pulmonary fibrosis[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(3): 778. DOI: 10.3390/ijms19030778.

[18] HILL C, WANG Y H. Autophagy in pulmonary fibrosis: friend or foe? [J]. Genes Dis, 2022, 9(6): 1594-1607. DOI: 10.1016/j.gendis.2021.09.008.

[19] BUSSOLATI B, ASSENZIO B, DEREGIBUS M C, *et al*. The proangiogenic phenotype of human tumor-derived endothelial cells depends on thrombospondin-1 downregulation *via* phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway[J]. J Mol Med, 2006, 84(10): 852-863. DOI: 10.1007/s00109-006-0075-z.

[20] SEO J E, KIM S, SHIN M H, *et al*. Ultraviolet irradiation induces thrombospondin-1 which attenuates type Ⅰ procollagen downregulation in human dermal fibroblasts[J]. J Dermatol Sci, 2010, 59(1): 16-24. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2010.04.010.

[21] TORRES A, GUBBIOTTI M A, IOZZO R V. Decorin-inducible Peg3 evokes beclin 1-mediated autophagy and thrombospondin 1-mediated angiostasis[J]. J Biol Chem, 2017, 292(12): 5055-5069. DOI: 10.1074/jbc.M116.753632.

[22] HUANG T T, WANG L, LIU D, *et al*. FGF7/FGFR2 signal promotes invasion and migration in human gastric cancer through upregulation of thrombospondin-1[J]. Int J Oncol, 2017, 50(5): 1501-1512. DOI: 10.3892/ijo.2017.3927.

(收稿:2022-12-01;修回:2023-01-12)
(编辑 邓强庭)