



肺纤维化微环境中肺泡巨噬细胞的蛋白质组学分析*

伍霞艳^{1,2)} 柳迪²⁾ 刘禹辰²⁾ 汲淑慧²⁾ 付斌²⁾ 刘莹²⁾ 唐丽^{1,2)**}

⁽¹⁾ 安徽医科大学基础医学院免疫学教研室, 合肥 230032;

⁽²⁾ 军事医学研究院生命组学研究所, 国家蛋白质科学中心(北京), 北京蛋白质组研究中心, 医学蛋白质组全国重点实验室, 北京 102206)

摘要 **目的** 肺泡巨噬细胞 (alveolar macrophages, AMs) 能够处理表面活性物质来维持肺泡膨胀开放, 并充当防御病原体入侵的第一道免疫防线, 对肺部微环境稳态的维持至关重要。已有研究表明, 肺纤维化过程中, 单核来源的 AMs 持续释放促炎因子和趋化因子, 招募更多免疫细胞到受损区域, 维持并加剧炎症, 从而发挥负面作用。目前, 大多数研究聚焦于肺纤维化微环境 AMs 的基因表达水平, 而在蛋白质功能和调控方面的报道较少。本研究旨在探讨正常生理条件下与肺纤维化后 AMs 的差异表达蛋白 (differentially expressed proteins, DEPs), 以便更全面地理解 AMs 在肺纤维化发展过程中的作用。**方法** 本研究建立博来霉素诱导肺纤维化小鼠模型, 利用流式细胞分选技术收集来自生理盐水对照组和肺纤维化模型的 AMs (每个样本 2.5×10^5 个细胞), 通过无标记蛋白质组学方法获得蛋白质表达谱。**结果** 通过将生理盐水组与已公开的生理 AMs 蛋白质组数据比对发现, 本研究产出的蛋白质组数据质量较高, 能够满足研究需求。综合分析结果显示, 与对照组相比, 博来霉素组 AMs 有 778 种蛋白质表达上调。此外, 上调的 DEPs 中富集通路包括 I- κ B/NF- κ B 通路、炎症反应调节通路、吞噬调节通路、TGF- β 通路和 HIF-1 通路, 表明肺纤维化微环境中的 AMs 具有促炎和促纤维化功能。对 DEPs 的蛋白质-蛋白质相互作用网络分析表明, Tlr2 和 Pycard 之间的相互作用是 AMs 促炎表型的控制节点, 从而导致肺纤维化进展。**结论** 本研究探讨了 AMs 在肺纤维化微环境中蛋白质表达谱的变化。结果发现, AMs 显著上调多条与炎症和纤维化关联的通路蛋白, 并提示 Tlr2 和 Pycard 的相互作用是 AMs 表现出高度促炎活性的控制节点。

关键词 蛋白质组学, 肺泡巨噬细胞, 博来霉素诱导肺纤维化

中图分类号 R3, R392.12

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0138

肺纤维化 (pulmonary fibrosis) 是一种慢性且不可逆的肺间质性疾病, 被认为是微生物呼吸道感染和化学药物等多种肺损伤的主要远后效应, 通常发展为纤维化瘢痕组织逐渐取代肺泡正常结构, 从而导致进行性呼吸衰竭, 甚至是死亡^[1-4]。患者的平均生存期限仅为 3~5 年, 发病率随着患者年龄增长而升高, 男性的发病率高于女性^[3, 5-6]。虽然导致肺纤维化的触发因素仍存在争议^[4, 7], 但已有文献报道肺纤维化是新型冠状病毒感染 (COVID-19) 的并发症之一^[7-8], 鉴于 2019 年疫情爆发以来, 全球各国累计已有数亿的 COVID-19 确诊病例, 可预测未来几年可能是肺纤维化的高发期。相对于肺纤维化的潜在重大威胁, 针对肺纤维化致病机理的研究仍处于初级阶段, 其诱因至今没有明确定论。更

为重要的是, 目前仅有尼达尼布和吡啡尼酮两种治疗肺纤维化的药物, 但其疗效有限, 无法逆转纤维化进程^[9-13]。鉴于肺纤维化的严重危害及其不可治愈, 研究该疾病的致病机制并挖掘新的干预策略十分重要。

肺泡巨噬细胞 (alveolar macrophages, AMs) 约占肺泡细胞的 90%~95%^[14], 是肺组织的主要巨噬细胞亚群, 具有较强的自我更新能力, 稳态下不依赖于募集的单核细胞补充^[15]。AMs 在维持肺部微环境稳态平衡中发挥重要作用。首先, AMs 能

* 国家自然科学基金 (32200736) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-61777091, E-mail: tangli731@163.com

收稿日期: 2024-04-03, 接受日期: 2024-07-16

够处理和回收磷脂类表面活性物质,使肺泡保持开放的膨胀状态,在气体交换中发挥重要作用^[16]。其次,AMs是第一个接触空气来源病原体的免疫细胞,充当防御病原体入侵的第一道防线,能够持续捕捉、吞噬、中和病原体^[17-18]。但是,急性炎症发生时,AMs会发生消失反应,即自我更新能力减弱而导致数量大幅减少^[19-20],由此产生的空缺生态位会由单核细胞分化的过渡性AMs(CX3CR1⁺ Siglec-F⁺)紧急填补^[20-24]。然而,与稳态下AMs发挥正面作用不同,单核细胞来源的AMs在肺纤维化过程发挥负面作用^[25]。Misharin等^[26]发现,单核来源的过渡性AMs可在肺脏中持续存在长达1年,并表达出一套不同于组织定居AMs的促纤维化基因。Aran等^[24]利用单细胞RNA测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)技术发现,博来霉素诱导肺纤维化小鼠模型中单核来源的AMs能够持续释放促炎因子和趋化因子,从而招募更多免疫细胞到受损区域,维持及放大慢性炎症过程^[24-25]。由此可见,肺纤维化过程中单核细胞来源AMs的出现与持续存在是慢性炎症和纤维化产生的重要原因。与既往研究利用转录组揭示肺纤维化微环境AMs特征不同,本文采用蛋白质组技术,分析比较博来霉素诱导肺纤维化小鼠模型与生理盐水对照组AMs的蛋白质表达差异,以拓展对肺纤维化微环境AMs在蛋白质表达水平上的认识,有助于更全面地理解AMs在该疾病发展过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂

博来霉素购自美国MCE公司;生理盐水购自石家庄四药公司;PBS粉剂购自北京酷来搏科技有限公司;三溴乙醇、三(2-羧乙基)膦盐酸盐(tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride, TCEP)、2-氯乙酰胺(2-chloroacetamide, CAA)购自美国Sigma-Aldrich公司;叔戊醇购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;红细胞裂解液、CD11b BUV395、Siglec-F BV421购自美国BD公司;RPMI-1640购自北京中生奥邦生物科技有限公司;胎牛血清购自美国Gibco公司;多聚甲醛购自上海麦克林生化科技有限公司;Liberase TM购自瑞士Roche公司;苏木素染液、伊红染液购自北京中杉金桥生物技术有限公司;改良Masson三色染色试剂盒、吐温-20购自北京索莱宝科技有限公司;Fc封闭抗体购自美国Tonbo公司;CD11c AF700、

CD11b AF700购自美国Thermo Fisher Scientific公司;CD64 PE、CD45 FITC、TLR2 AF647购自美国Biolegend公司;兔抗小鼠ASC多克隆抗体购自美国Adipogen公司;兔抗小鼠 β -actin抗体购自美国CST公司;山羊抗兔HRP抗体购自北京博奥龙免疫技术有限公司;脱氧胆酸钠(sodium deoxycholate, SDC)购自德国Vetec公司;1 mol/L Tris缓冲液购自上海捷瑞生物工程有限公司;甲酸购自美国Fluka公司;乙腈购自美国J.T. Baker公司。

1.2 仪器设备

低温离心机购自德国Eppendorf公司;电子天平购自瑞士Mettler Toledo公司;FACS Aria III流式细胞分选仪、LSRFortessa SORP流式细胞分析仪购自美国BD公司;组织病理脱水机、石蜡包埋机、石蜡切片机及晾片机购自德国Leica公司;电泳仪购自美国Bio-Rad公司;全自动组织处理器购自德国Miltényi公司;超声波细胞粉碎机购自宁波新芝生物科技有限公司;EASY-nLC 1200纳升级液相系统、Q Exactive HF质谱仪购自美国Thermo Fisher Scientific公司。

1.3 实验动物

C57BL/6J雌性小鼠(SPF级、8周龄、18~20 g)购自北京维通利华(北京)生物技术有限公司。所有动物实验均经国家蛋白质科学中心·北京动物伦理委员会批准(批号20221021-69MO),实验动物在该研究所实验动物房屏障环境内按标准条件饲养。

1.4 博来霉素诱导肺纤维化小鼠模型的建立

购买的小鼠适应动物房2 d后,称重并记为Day 0的体重,然后腹腔注射0.2~0.3 ml 20 g/L三溴乙醇进行麻醉。将小鼠悬挂在60°倾斜的小鼠固定架上,左手持镊子将小鼠舌头轻轻拽出,右手持移液枪吸取30 μ l博来霉素溶液(35 μ g/只)或生理盐水并将其滴加到小鼠口腔。随后右手放下移液枪后,轻轻捏住小鼠鼻腔,使药剂通过小鼠经口呼吸而由气管进入肺脏,待听到湿啰音后,持续当前操作1 min,其后让小鼠正常呼吸并松开小鼠舌头。建模后的小鼠正常饲养于实验动物房的屏障环境并隔天进行体重记录,Day 21为实验终点。

1.5 肺脏干湿重的称取

小鼠肺脏摘取后获得湿重,置于56°C烘干24 h后获得干重。肺系数%=(肺湿重/mg) $\div$ (小鼠体重/g) $\times$ 100;肺湿干重比=(肺湿重/mg) $\div$ (肺干重/mg)。

1.6 苏木精-伊红 (H&E) 染色

肺组织切片 (厚度为 8 μm) 置于 56°C 烘箱中 1 h, 然后进行梯度脱蜡 (二甲苯 A 5 min、二甲苯 B 5 min、无水乙醇 A 3 min、无水乙醇 B 3 min、95% 乙醇 3 min、70% 乙醇 3 min 和纯水 5 min)。苏木精染液染色 30 s, 1% 盐酸乙醇分化数秒, 伊红染液染色数秒, 然后进行脱水 (95% 乙醇 3 min、无水乙醇 2 min、二甲苯 A 5 min 和二甲苯 B 5 min) 和中性树胶封片。

1.7 Masson 染色

染色步骤按改良 Masson 三色染色试剂盒说明书进行。

1.8 肺组织细胞的分离及流式分选

小鼠经腹腔注射三溴乙醇麻醉后, 开腹部并剪断下腔静脉; 暴露肺脏及心脏, PBS 经右心室持续灌注, 清除肺脏内部血液, 使其从粉红色变为白色。摘取小鼠肺脏置于含 0.2 g/L Liberase TM 消化液中, 用剪刀剪成小块后置于 37°C 温箱中消化 40 min。

上述细胞悬液经 70 μm 筛网过滤至 50 ml 离心管, 加入 10% 1640 培养基终止消化, 离心 (500g, 4°C, 5 min) 去上清。加入适量 1 $\times$ 红细胞裂解液重悬, 混匀, 裂解 5 min 后, 加入等量 10% 1640 培养基终止裂解, 离心去上清, 加入 PBS 重悬。再次离心去上清, 加入 PBS 重悬, 获得单细胞悬液。

向单细胞悬液加入适量 Fc 封闭抗体 (1:100), 冰上作用 5 min。然后加入 CD45 FITC (1:100)、CD64 PE (1:200)、Siglec-F BV421 (1:200) 和 CD11b AF700 (1:200) 抗体, 混合后置于 4°C 避光作用 30 min。离心去上清, 加入适量 1640 培养基重悬后, 继续离心去上清。加入适量 1640 培养基重悬后, 进行流式分选, AMs 用低吸附性 EP 管 (德国 Eppendorf 公司) 接收。

1.9 AMs 蛋白质的提取和质谱检测分析

蛋白质提取和质谱检测方法同已发表文献 [27]。具体方法如下:

1.9.1 蛋白质的提取与酶解

细胞样本加入裂解液 (1% SDC, 100 mmol/L Tris pH 8.8, 10 mmol/L TCEP, 40 mmol/L CAA), 震荡混匀后 95°C 加热 5 min, 置于冰上冷却。冰浴条件下对细胞进行超声破碎 2 min, 待溶液澄清后进行离心 (16 000g, 4°C, 5 min), 取上清测定蛋白质浓度。按胰酶质量: 蛋白质质量=1:60 加入胰酶, 震荡混匀后 37°C 孵育 4~6 h, 孵育结束后按

胰酶质量: 蛋白质质量终比例=1:80 补加胰酶, 37°C 过夜酶解。加入终浓度为 1% 甲酸后进行离心 (14 000g, 5 min), 取上清进行脱盐, 60°C 真空抽干备用。样品溶于含 0.1% 甲酸的水溶液, 然后进行离心 (16 000g, 10 min), 取上清进行质谱检测, 质谱上机的酶切后肽段总质量及上样量见表 S1。

1.9.2 质谱检测

使用液相色谱与质谱联用 (LC-MS/MS) 方法进行检测。利用 EASY-nLC 1200 纳升级液相系统多肽进行分离, 液相色谱的流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水溶液, 流动相 B 为含 0.1% 甲酸的 80% 乙腈溶液。多肽被富集到 150 μm $\times$ 10 mm 的预柱 (C18 填料: 1.9 μm 粒径, 120 Å 孔径) 中, 并通过不同比例的流动相 A 和 B 洗脱, 然后经过 150 μm $\times$ 150 mm 的分析柱 (C18 填料: 1.9 μm 粒径, 120 Å 孔径) 进一步分离进入质谱仪。整个液相色谱流程采用非线性梯度分离方法。流速为 600 nl/min。梯度设置为: 4%~7% B, 0~1 min; 7%~13% B, 1~7 min; 13%~25% B, 7~45 min; 25%~45% B, 45~67 min; 45%~95% B, 67~68 min; 95% B, 68~75 min。Q Exactive HF 质谱仪采用数据依赖采集模式 (data dependent acquisition, DDA), 质谱参数设置为: 一级检测器为轨道离子阱 (Orbitrap), 喷雾电压为 2.1 kV, 扫描范围为 300~1 400 m/z , 分辨率为 120 000, 自动增益控制 (automatic gain control, AGC) 为 3×10^6 , 最大注入时间为 80 ms; 二级检测器也为 Orbitrap, 选取丰度排名前 25 的离子进行二级碎裂分析, 离子碎裂模式为高能碰撞诱导碎裂 (higher-energy collision-induced dissociation, HCD), 碰撞能量 (normalized collision energy, NCE) 为 27%, 分辨率为 15 000, AGC 为 5×10^4 , 最大注入时间为 20 ms。

1.9.3 分析方法

质谱产生的原始数据 Raw 文件通过 Proteome Discoverer 2.4 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 上的 Sequest HT 对 Uniprot Mouse 蛋白质数据库 (更新日期为 2021-08-29, 17 059 个蛋白质条目) 进行数据检索。参数设置: 母离子质量允许误差为 10 ppm, 子离子质量允许误差为 0.02 u, 最多允许两个漏切位点; 可变修饰为氧化修饰 (M)、氨基甲酰修饰 (C)、乙酰修饰 (蛋白质 N 端); 在肽水平上应用 1% 的假阳性率 (false discovery rate, FDR)。

1.10 蛋白质组学数据分析

用Proteome Discoverer 2.4软件的蛋白质定量结果使用肽谱图匹配数 (peptide spectrum matches, PSM) 计算皮尔森相关系数 (Pearson correlation coefficient)。相关系数大于0.9证明数据质量良好。使用定量数据中的蛋白质丰度 (Abundance) 进一步分析。对两处理组的两次生物学重复降序排列通过R包ggplot2绘制散点图。通过R包UpsetR绘制两组处理分别两次生物学重复的Upset图。通过R包Prostar^[28]进行差异基因分析。缺失值差补1%分位数, 之后进行Welch *t* 检验, 所得的*P*-value通过多重假设检验校正计算FDR。丰度倍数变化2倍以上且*FDR*<0.05的蛋白质定义为差异蛋白。使用R包ggplot2绘制火山图、pheatmap绘制热图。差异蛋白通过R包Clusterprofiler^[29]进行基因本体 (gene ontology, GO) 和京都基因和基因组数据库 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析。超几何检验的*q*-value<0.05的条目或通路被定义为显著富集条目或通路。显著变化蛋白质的相互作用网络使用STRING^[30]数据库获取, 将蛋白质列表提交数据库检索小鼠来源的相互作用网络, 生成网络后在设置中选择只保留文献挖掘 (Textmining)、实验 (Experiments) 和数据库 (Databases) 分类来源的相互作用, 可信度打分 (confidence score) 选择0.4。生成的网络导出后使用Cytoscape^[31]绘制网络。

数据整合分析: 用方法1.9及上述同样的搜库定量流程分析巨噬细胞常规蛋白质组学数据 (PXD021583^[32]), 使用定量结果的蛋白质丰度进一步分析。将PXD021583^[32]与本文数据整合成数据矩阵, 其中蛋白质种类、缺失值、相关性图和蛋白质丰度均使用原始蛋白质丰度结果。之后使用上述的差补、均一化策略, 对两组数据进行均一化, AMs标志物使用均一化后的蛋白质丰度。upset图使用R包upsetR绘制, 相关性图使用R包corrplot绘制, 其余图如非特殊说明均使用R包ggplot2绘制。

1.11 蛋白质印迹

细胞裂解变性后, 吸取10 μ l 样本进行SDS-PAGE电泳, 电泳结束后进行电转操作。转膜完成后, 将膜裁成实验所需的大小, 加入5%脱脂牛奶在摇床上封闭30 min。将膜取出并分别加入Pycard (PYD and CARD domain containing protein, 也称为apoptosis-associated speck-like protein containing a

card, ASC) 抗体 (1 : 1 000) 和 β -actin抗体 (1 : 1 000), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜。TBST洗涤10 min/次, 共3次。然后向膜滴加山羊抗兔HRP抗体 (1 : 5 000) 室温孵育1 h, TBST洗涤10 min/次, 共3次。显色底物A与B用1 : 1的比例混合后, 滴加到膜上显色, 然后置于显影仪成像。

1.12 流式分析

小鼠肺脏组织细胞的分离方法同1.8, 向单细胞悬液加入适量Fc封闭抗体 (1 : 100), 冰上作用5 min。然后加入Ghost Dye UV450 (1 : 1 000, 可以标记死细胞), 冰上孵育30 min。然后加入CD45 FITC (1 : 100)、CD64 PE (1 : 200)、Siglec-F BV421 (1 : 200)、CD11c AF700 (1 : 200)、CD11b BUV395 (1 : 200)、TLR2 AF647 (1 : 100) 和Ly6C PE-Cy7 (1 : 200) 抗体, 混合后置于4 $^{\circ}$ C避光作用30 min。离心去上清, 加入1 ml PBS重悬, 继续离心去上清, 加入适量0.2% PFA固定后上机检测。

1.13 统计学方法

本文无其他特殊说明的实验数据均使用GraphPad Prism 9软件进行统计分析, 统计学方法为两样本*t*检验, 数据表示为mean $\pm$ SEM, *P*<0.05为有统计学意义。

2 结 果

2.1 博来霉素诱导肺纤维化小鼠模型的建立

本研究利用博来霉素经口气管吸入的方式建立肺纤维化小鼠模型 (图1a), 由小鼠平均体重随时间变化的曲线结果可见, 博来霉素组平均体重低于生理盐水组 (图1b), 此结果符合博来霉素诱导小鼠发生肺纤维化后体重下降的现象^[33-35]。第21天, 对小鼠模型进行肺水肿及肺炎评估发现, 与生理盐水组相比, 博来霉素组肺系数 (肺湿重/体重比) 和肺湿重/干重比均显著增加 (图1c), 说明博来霉素组肺脏出现严重的肺水肿和炎症。肺组织H&E结果进一步确证, 博来霉素组肺脏组织呈现大量炎性细胞浸润、肺间隔不均匀且明显增厚以及肺泡腔模糊或消失等病理特征, 与既往报道博来霉素诱导肺纤维化的病理特征相符^[36-38]。采用Szapiel评分^[39]方法对肺部炎症进行评分, 博来霉素组显著高于生理盐水组 (*P*<0.000 1, 图1d)。Masson染色是经典的纤维化染色方法之一, 结果显示, 生理盐水组肺脏胶原仅出现在维管束周围或间隔壁区域, 而博来霉素组胶原纤维呈现出明显增厚并广泛分

布。Ashcroft 纤维化评分^[40]结果显示, 博来霉素组明显高于生理盐水组 ($P<0.0001$, 图1d)。上述结果表明, 本文利用博来霉素成功诱导小鼠肺脏发

生纤维化, 为后续肺纤维化微环境中 AMs 的蛋白质组学研究提供模型基础。

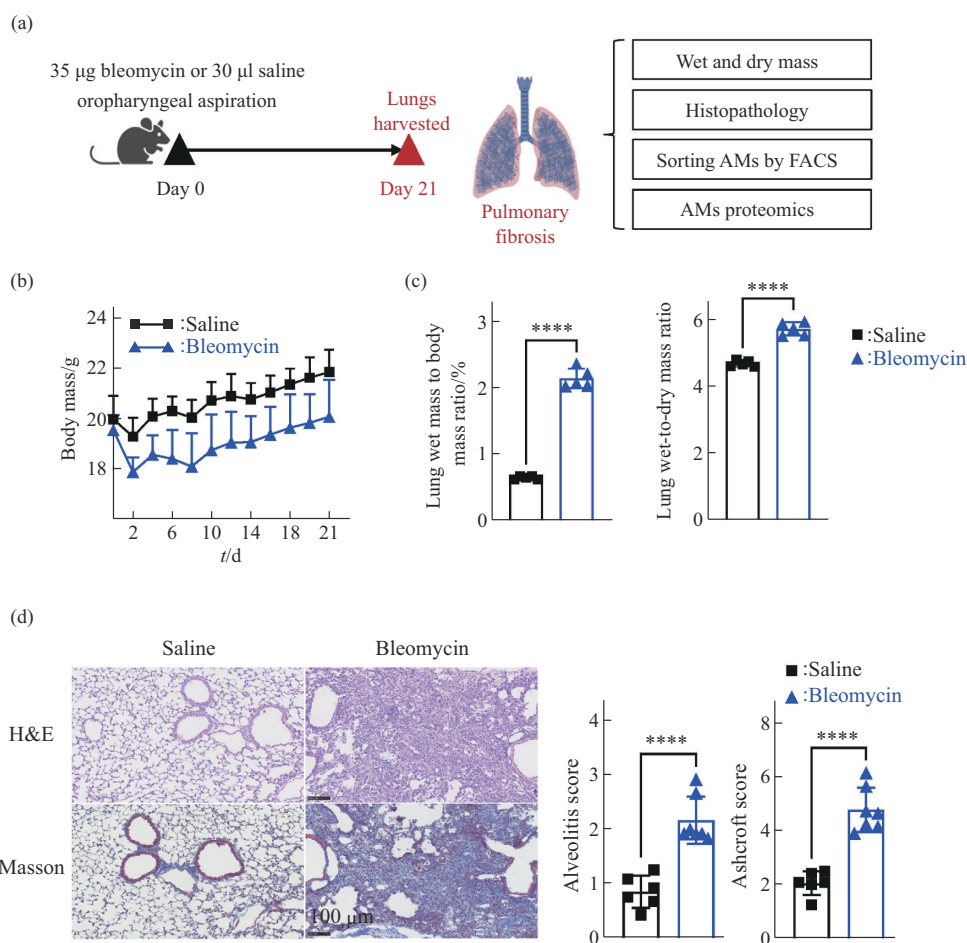


Fig. 1 The bleomycin induced pulmonary fibrosis mouse models

(a) The scheme of experimental design. (b) The body mass loss in pulmonary fibrosis mouse models ($n=12$ animals for saline group and $n=16$ for bleomycin group). (c) Lung wet mass to body mass ratio and lung wet-to-dry mass ratio were measured. $n=5$. (d) Representative images of lung tissue stained with H&E and Masson's trichrome. Quantification of lung inflammation and fibrosis respectively using the Alveolitis score and Ashcroft score. $n=6$ for saline group and $n=7$ for bleomycin group. Data were presented as mean $\pm$ SEM. Statistical significance was determined using unpaired t test. **** $P<0.0001$.

2.2 AMs蛋白质组数据对比分析

我们对小鼠模型 AMs 进行蛋白质组学研究, 首先是对本研究蛋白质组数据进行质控分析。为了分析本研究 AMs 蛋白的覆盖度, 将本研究生理盐水组数据 (细胞量为 2.5×10^5) 与已发表的生理 AMs (细胞量为 1.5×10^6) 蛋白质组数据^[32]进行对比分析。在已发表的蛋白质组研究中, 流式分选所获得的 AMs 被分为 6 个馏分, 最大化增加了 AMs 蛋白质组的鉴定深度^[32]。该研究共鉴定 (谱图数大于 1) 8 201 个蛋白质, 约为本研究鉴定到蛋白质

数的 1.5 倍 (5 601 个) (图 2a)。韦恩图分析结果显示, 我们的数据与其有 5 320 个蛋白质重合, 占比为 95.0%, 无法鉴定到的蛋白质有 2 881 个, 特有的蛋白质有 281 个 (图 2a)。将这两组 AMs 可定量蛋白质进行对比分析, 发现在所有生物学重复中均能鉴定到的蛋白质有 4 566 个, 超过总鉴定蛋白质的 50%, 说明两研究得到的蛋白质整体种类相差不大 (图 2b)。对具有缺失值的蛋白质进行分析, 发现本研究缺失值比例较低, 而已发表数据缺失值比例较高, 且含缺失值的蛋白质都位于该研究的独有

蛋白质中 (图2b, c)。两研究的组间皮尔森相关系数约0.5 (图2d), 说明两研究可定量蛋白质虽然在种类上比较一致, 但在丰度上还是具有差异。进一步分析结果显示, 本研究生理盐水组 AMs 蛋白表达平均丰度与已发表生理 AMs 的结果仅相差1个数量级左右 (图2e), 考虑到二者的初始细胞量差异, 蛋白质平均丰度的差异是合理的。我们进一步

关注了小鼠 AMs 特征标志物, 发现两组数据均能够检测到 Adgre1(F4/80)、Itgax(CD11c)、Siglec5 (Siglec-F)、Mertk(MerTK)、Fcgr1(CD64)、Alox15 (图2f, g)^[41-42]。上述结果表明, 本研究所产出的 AMs 蛋白质组数据质量可以满足后续数据分析的需要。

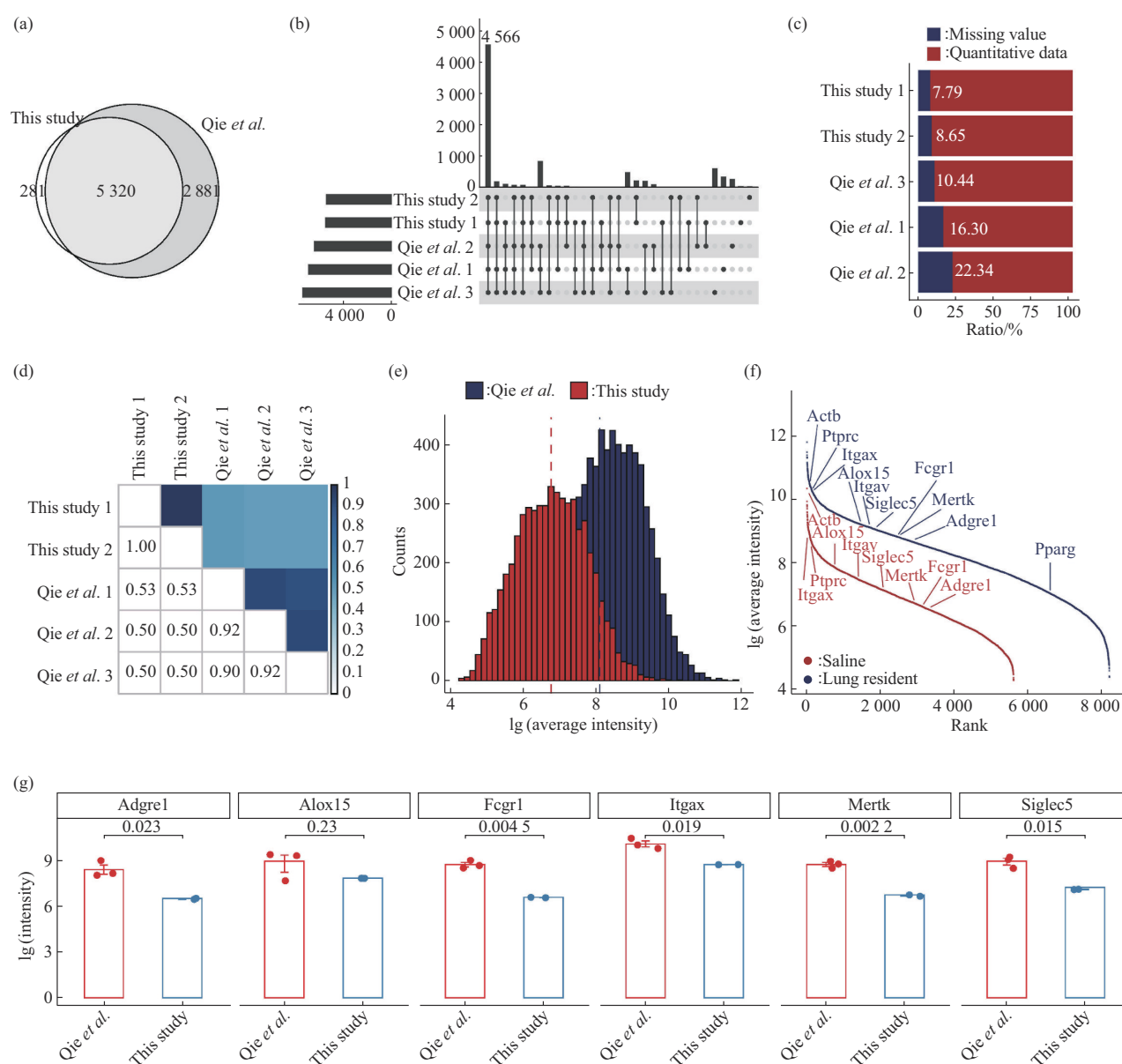


Fig. 2 The proteome data comparison of normal AMs from saline group in this study and from published data

(a) Venn diagram. (b) Upset diagram. (c) Bar diagram showing missing value for each biological replicate. (d) Correlation plot of Pearson correlation coefficients. (e) Histogram. (f) Dynamic ranges of the proteins. The markers of AMs were labeled. (g) Bar plot showing AMs markers intensity.

2.3 肺纤维化后AMs蛋白丰度增加

根据蛋白质组学分析结果, 生理盐水组蛋白质

鉴定数分别为5 445和5 394个, 博来霉素组蛋白质鉴定数分别为5 592和5 564个 (文件S1)。我们观

察到博来霉素组 AMs 蛋白丰度显著上升, 且大部分蛋白质都具有更高的丰度 (图 3a 和图 S1)。为了进一步确定这种蛋白质变化是在蛋白质种类还是蛋白质丰度层面上, 对模型两组各自两次生物学重复进行分析, 两组生物学重复所鉴定到的共蛋白质为 5 019 种 (占 84%), 说明博来霉素组 AMs 蛋白水平变化更多表现为蛋白质丰度变化而非蛋白质种类变化 (图 3b)。对蛋白质组的定量结果使用 R 包 Prostar 进行差异蛋白分析, 将丰度倍数变化 2 倍以上且 $FDR < 0.05$ 的蛋白质定义为差异蛋白 (differential expression proteins, DEPs)。火山图结果显示, 共有 778 个显著上调 DEPs 和 23 个显著下调 DEPs (图 3c), 且组内生物学重复间的差异小于组间差异 (图 3d)。已有文献表明, 肺纤维化微环境中, 巨噬细胞可通过增强吞噬功能和免疫调节放大局部炎症反应, 过度吞噬和清除死亡细胞和外来颗粒时, 释放大量炎症因子 (如 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 等) 招募更多免疫细胞如中性粒细胞进入病灶, 从而加剧肺纤维化^[15, 42-43]。另外, 巨噬细胞还可通过 TLR7/IRAK4/NF- κ B 信号通路分泌更多的促纤维化因子^[44], 分泌的 TGF- β 是重要促纤维化因子, 可激活成纤维细胞产生大量的胶原和其他细胞外基质^[45-47]。富集分析显示, 肺纤维化后 AMs 显著上调 I- κ B/NF- κ B 信号通路、免疫反应调节、吞噬调节和 TGF- β 信号通路等已知炎症及纤维化关联通路蛋白 (图 3e, f)。上述结果表明, 本研究所产出的蛋白质组数据能够体现肺纤维化微环境中 AMs 表型。

2.4 肺纤维化微环境中 AMs 呈现高度促炎表型

我们进一步使用 R 包 Clusterprofiler^[29] 对显著上调 DEPs 进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 功能富集结果显示, 在生物过程方面, 肺纤维化后 AMs 显著上调 DEPs 涉及多个关键路径, 包括高尔基体囊泡运输、自噬、凋亡信号通路调节、免疫效应器过程的调节、细胞呼吸和蛋白质折叠等 (图 4a)。细胞组分包括关键细胞结构, 如线粒体、核糖体、内质网、过氧化物酶体、吞噬囊泡和蛋白酶体 (图 4b)。在分子功能方面, 与泛素样蛋白连接酶结合、小 GTP 酶结合、核糖体的结构组成、泛素蛋白连接酶结合、ATP 水解活性和磷酸酶活性等功能相关 (图 4c)。KEGG 通路富集分析结果显示, 博来霉素组 AMs 显著上调 DEPs 主要富集于氧化磷酸化、内吞作用、吞噬体、低氧诱导因子 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) 通路、蛋白酶体和过氧

化物酶体等通路 (图 4d)。其中, HIF-1 调节巨噬细胞分泌促炎细胞因子和趋化因子, 包括 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 和 CXCL8, 以及促血管生成因子 VEGF^[48-50]。对 HIF-1 信号通路蛋白进一步分析发现, 通路上游的重要激酶 Mapk3 (ERK) 蛋白水平显著上调 (图 4e, f), 该激酶可直接调节 HIF-1 α 的 mRNA 转录水平。同时低氧应激相关激酶 Nox1 蛋白水平显著上调 (图 4f), 该蛋白质通过活性氧类 (reactive oxygen species, ROS) 调控 HIF-1 α 激活因子蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 和脯氨酰羟化酶 (prolyl hydroxylase, Phd) 的表达。另外, Vhl 和 Cul2 等 E3 泛素连接酶蛋白水平也有所上调 (图 4e, f)。在 HIF-1 通路充分激活下, 下游效应蛋白包括 Hmox1、Hk2、Pfk1 等蛋白质表达水平显著上调 (图 4e, f)。上述结果表明, 肺纤维化微环境中 AMs 增强 HIF-1 信号通路活性, 结合其显著上调 I- κ B/NF- κ B 信号通路、免疫反应调节和吞噬调节等通路蛋白, 提示 AMs 在肺纤维化后呈现高度促炎表型。

2.5 Tlr2 和 Pycard 的相互作用是 AMs 促炎表型的控制节点

在前述分析结果中, 我们重现了 AMs 在肺纤维化后增强促炎相关通路的活性, 如吞噬调节、免疫反应调节和 I- κ B/NF- κ B 信号通路。为了探索这三条通路之间的联系, 采用 STRING 数据库^[51] 来分析蛋白质-蛋白质相互作用及其网络。结果显示, 吞噬通路全部 10 个蛋白质, 有 6 个蛋白质之间具有 5 个已知相互作用, 全部形成一个内部连接的亚网络 (图 5a)。在炎症反应通路中, 全部 21 个蛋白质之间具有 55 个已知相互作用, 蛋白酶体相关的 4 个蛋白质组成一个亚网络, 其余蛋白质组成另一个亚网络 (图 5b)。I- κ B/NF- κ B 信号通路 14 个蛋白质中, 13 个蛋白质之间具有 3 个已知相互作用, 全部形成一个内部连接的亚网络 (图 5c)。三条通路都能够组成非常完整的网络, 网络内部高度连接, 其内部可能存在基于相互作用的机制。此三条通路共有蛋白质很少, 只有 Pycard 和 Tlr2, 两者在各自的网络中均占据比较重要的拓扑学位置, 其中 Pycard 在吞噬、炎症反应和 I- κ B/NF- κ B 信号通路中分别具有 1 个、4 个和 6 个已知相互作用, Tlr2 则分别有 2 个、11 个和 7 个已知相互作用 (图 5d)。上述结果表明, Tlr2 和其下游 Pycard 蛋白的相互作用是肺纤维化微环境 AMs 促炎表型的关键控制节点。我们进一步验证了 AMs 中 Tlr2 和 Pycard 的表达情况。

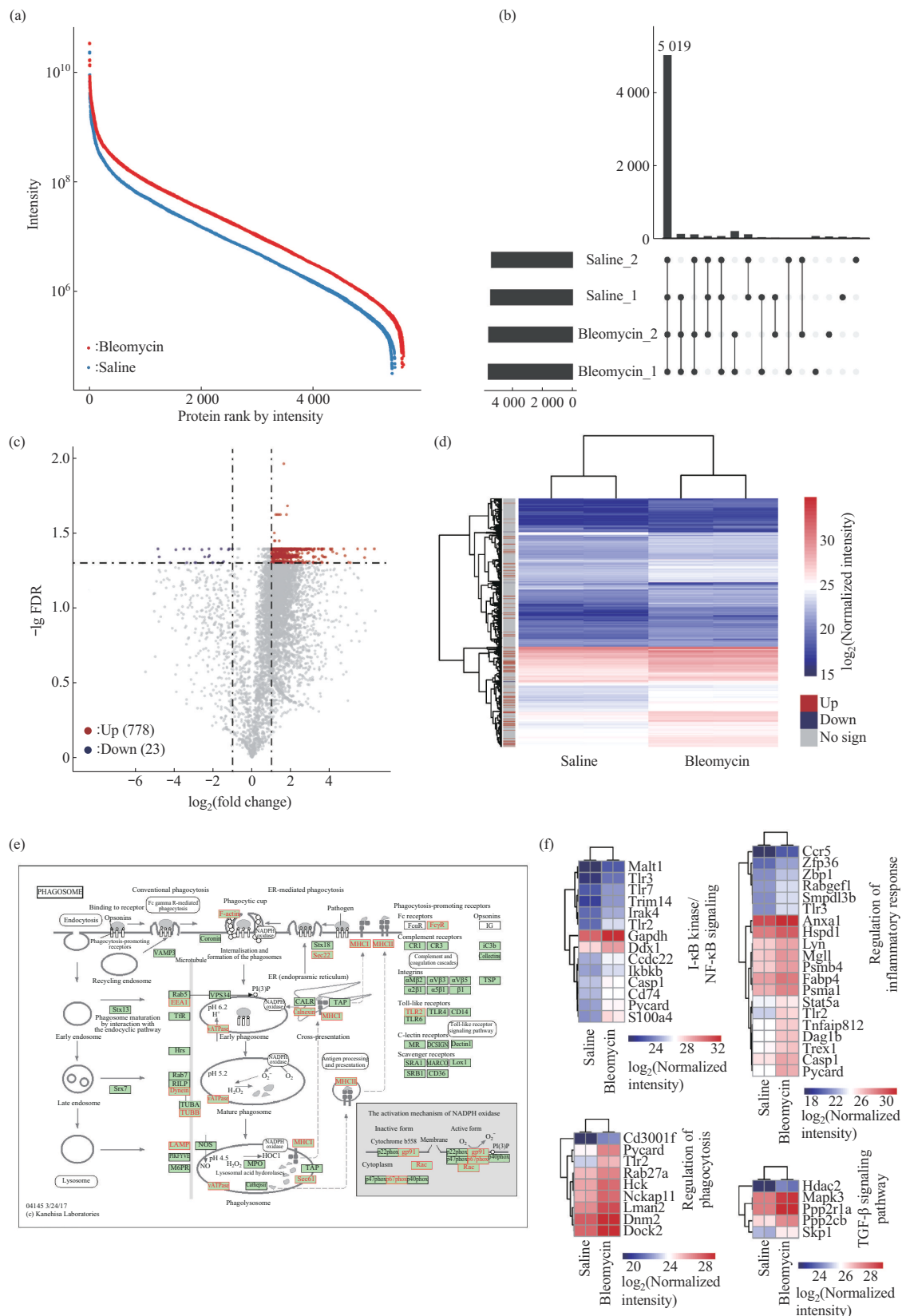
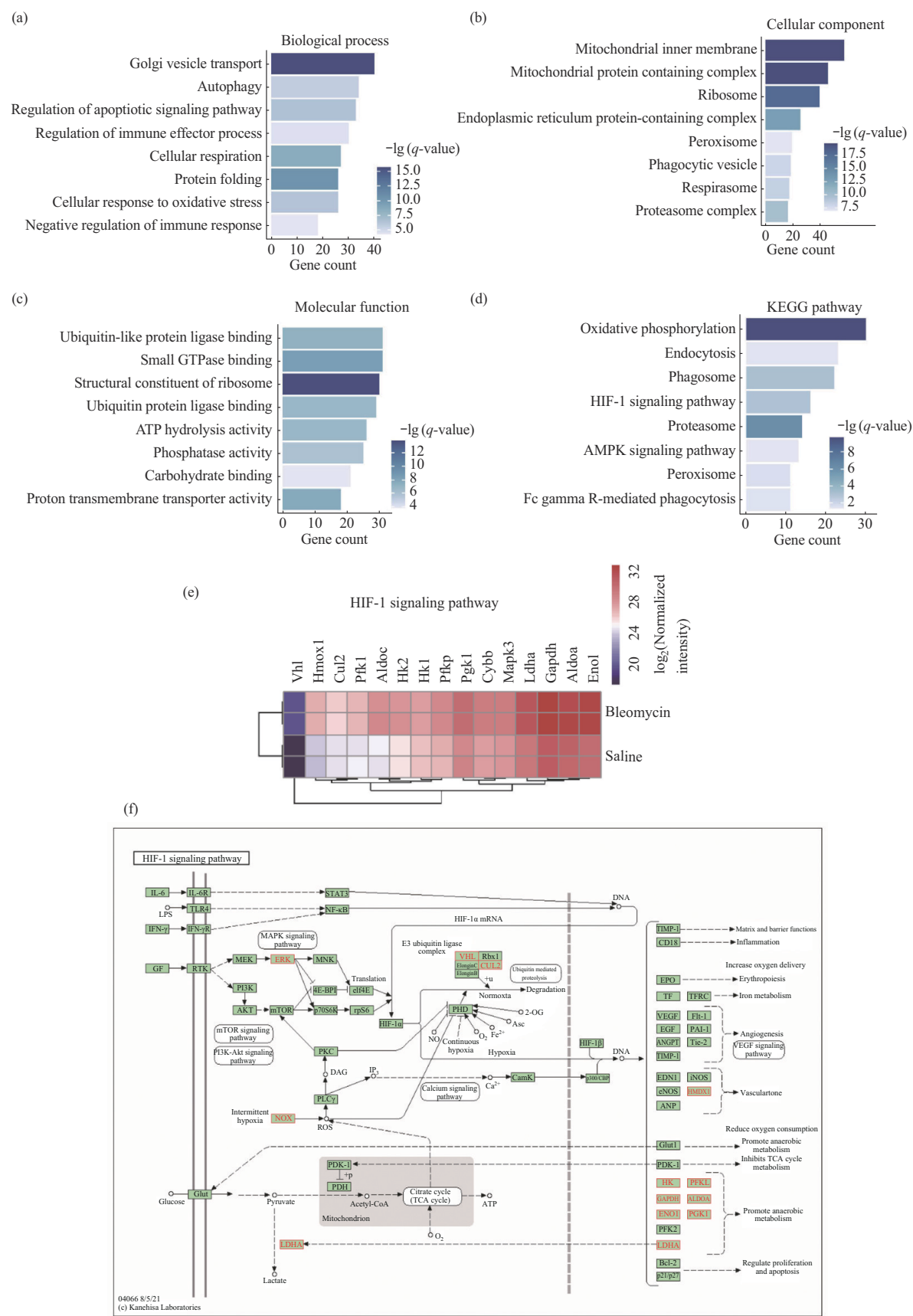


Fig. 3 The quantitative proteomic of AMs in bleomycin model compared with saline group

There were 20 mice in both saline group and bleomycin group, and AMs from each group was then divided into two subgroups. (a) Dynamic ranges of proteins. (b) UpSet plot showing the overlap of proteins from two biological replicates in each treatment group. (c) DEPs analysis displayed on volcano map. Red points represented upregulated proteins, blue points represented downregulated proteins and grey points for non-significance proteins. (d) The normalized proteins abundance showed on Heatmap. (e) The mechanism of phagosome forming. (f) Heatmap showing the upregulated DEPs associated with I- κ B/NF- κ B, inflammatory response, phagocytosis and TGF- β signaling, colors represent normalized intensity.



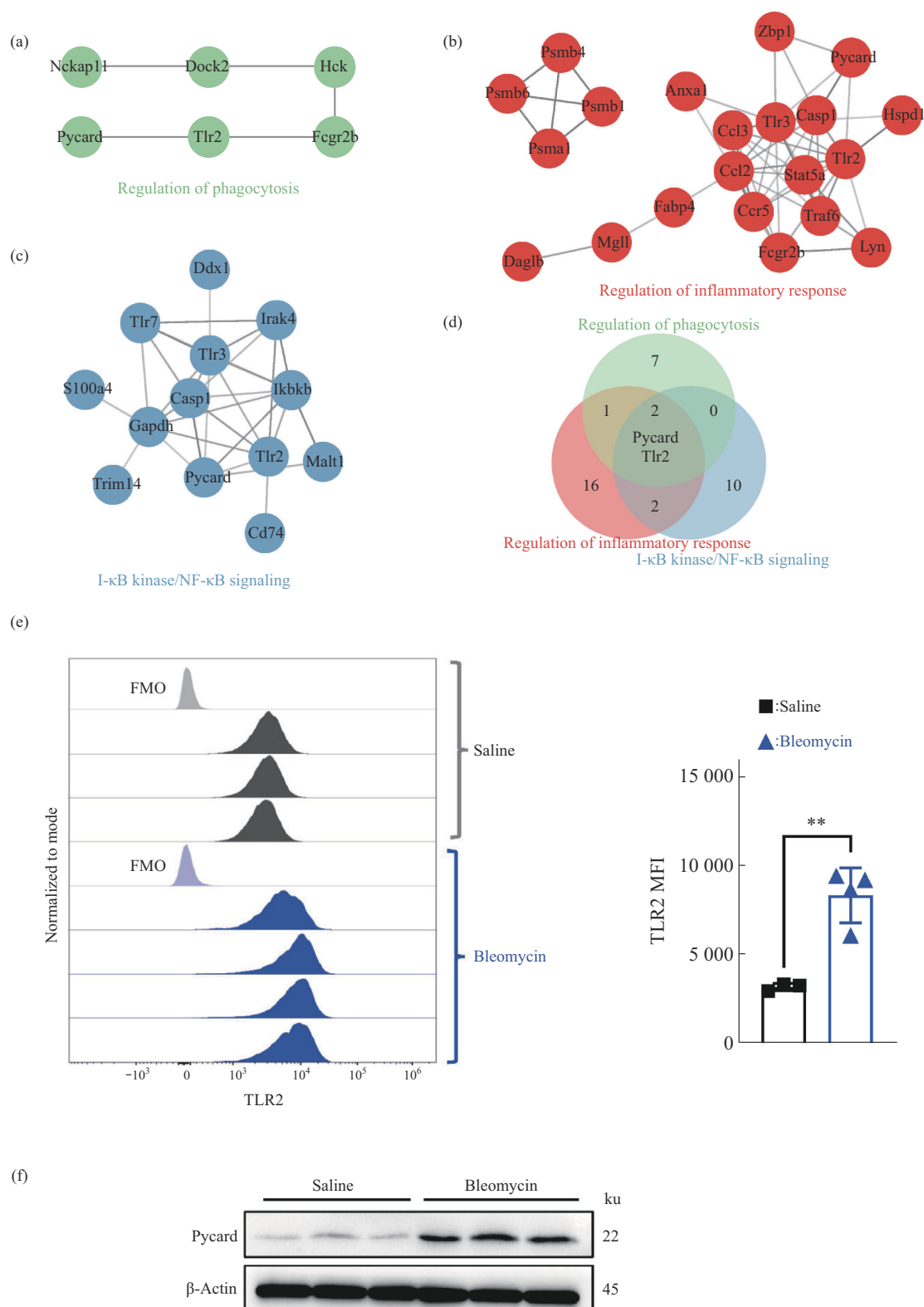


Fig. 5 The protein-protein interaction networks in upregulated DEPs of phagocytosis regulation, inflammatory response regulation and I-κB/NF-κB signaling

(a-c) STRING database curated reported protein interactions. Transparency of edges represent confidence score of STRING database. $**P < 0.01$.
(d) Venn plot showing the overlap of DEPs. (e) Flow cytometric analysis results for TLR2. (f) WB result for Pycard. Exposure time was 12 s. FMO: fluorescence minus one. MFI: mean fluorescence intensity.

流式分析结果显示, 与生理盐水组相比, 博来霉素组 AMs 表达 Tlr2 的平均荧光强度显著增加 ($P < 0.01$, 图 5e)。蛋白质印迹结果显示, 博来霉素组 AMs Pycard 蛋白表达水平显著升高 (图 5f)。上述结果说明, AMs 在肺纤维化后 Tlr2 和 Pycard 的表达水平显著增加。

3 讨 论

目前有多种可用于构建肺纤维化模型的诱导剂, 如石棉、博来霉素、二氧化硅、异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 和辐射等^[52-54]。其中, 博来霉素诱导的肺纤维化与人类肺纤维化状态相似、成本低、易诱导、重现性好, 是目前研究肺纤维化较为常用的实验性模型。博来霉素诱导肺纤维化的机制普遍认为是通过诱导细胞 DNA 的断裂, 产生自由基, 继而引发氧化应激反应, 导致细胞凋亡或坏死, 从而引起炎症反应并最终导致纤维化^[53, 55-56]。本文采用博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型开展研究。在该模型中, 小鼠表现出体重下降、肺系数和肺湿干重比显著增加, 以及肺部炎性细胞浸润和胶原沉积等一系列病理现象, 这与既往报道的博来霉素诱导肺纤维化的病理特征相符^[33-38]。

鉴于 AMs 在维持肺组织微环境稳态和肺纤维化过程中发挥重要作用^[17, 18, 25], 本文重点研究了 AMs 在肺组织正常生理和纤维化环境中的蛋白质表达谱变化。我们优化了原代 AMs 的样本制备与蛋白质提取流程 (表 S2)。在裂解液的选择上, 已发表文献中使用的裂解液成分为 8 mol/L 尿素和蛋白酶抑制剂^[32], 而我们的裂解液成分为 1% SDC、100 mmol/L Tris、10 mmol/L TCEP 和 40 mmol/L CAA。由于 SDC 能够更高效地溶解细胞内的蛋白质, 提高样品中蛋白质的提取率^[57-58], 且可在后续步骤中酸化析出并通过高速离心去除^[57, 59], 不会对质谱检测产生影响, 因此用 1% SDC 替代了 8 mol/L 尿素。在蛋白酶解条件的选择上, 采用了溶液内酶解, 以替代过滤辅助样品制备方法 (filter aided sample preparation, FASP)。该方法能够减少 FASP 过程导致的蛋白质损失^[60]。在还原剂的选择上, 在二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT) 与 TCEP 间, 优先选择了无味、不易挥发、不易被空气氧化的 TCEP。首先, TCEP 能够在酸性 pH 或 pH>7.5 的条件下保持活性^[61]。其次, TCEP 可以与烷基化试剂一起使用^[62-63], 并且作用强、稳定

性高, 是一种高效的还原二硫键试剂。除此之外, 溶液内酶解中 TCEP 和 CAA 的组合相较于 DTT 和碘乙酰胺 (iodoacetic acid, IAA), 可以增加鉴定的蛋白质数量和蛋白质序列覆盖率^[63-64]。

基于上述蛋白质组方法, 本研究获取了博来霉素诱导 21 d 后小鼠模型的 AMs 的蛋白质表达谱。将用于对照的生理盐水组 AMs 表达谱与已发表的生理 AMs 表达谱^[32]进行比对, 二者所鉴定的共有蛋白质数达到 5 320 个, 包括 AMs 经典的特征标志物, 能够满足研究的需求。在此基础上, 发现博来霉素组 AMs 蛋白丰度增加, 共 801 个 DEPs, 其中显著上调 778 个。在显著上调 DEPs 中, 发现如 I- κ B/NF- κ B 信号通路、炎症反应调节通路、吞噬调节通路等通路蛋白显著上调, 上述通路在巨噬细胞中的激活可促进其分泌促炎因子和趋化因子, 从而放大局部炎症反应。另一上调 DEPs 富集的通路为 TGF- β 信号通路, TGF- β 过度分泌能够致使微环境紊乱, 促进成纤维细胞活化增殖和迁移^[45-46, 65-67], 从而导致成纤维细胞分泌的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 增多及沉积, 而巨噬细胞正是微环境中 TGF- β 的主要来源之一^[67-68]。上述结果表明, 肺脏发生纤维化后, AMs 呈现促纤维化功能。KEGG 通路分析结果进一步显示, 博来霉素组 AMs 在氧化磷酸化、吞噬体、蛋白酶体、过氧化物酶体和 HIF-1 信号通路等通路蛋白显著上调。其中, HIF-1 信号通路中 Hmox1、Hk2、Cybb、Pfk1、Aldoc 和 Pgk1 等蛋白质显著上调, 与相关报道中纤维化微环境中上述蛋白质表达升高一致^[69-72], 提示肺纤维化微环境 AMs 表现出高度促炎活性。

目前已有较多报道利用不同的组学技术研究肺纤维化的致病机理与干预策略, 如蛋白质组和转录组等。在蛋白质组学方面, Bowman 等^[73]在临床研究中利用蛋白质组学技术探讨了肺纤维化患者血液中的生物标志物。Mayr 等^[74]对肺纤维化患者的血浆和肺泡灌洗液进行了蛋白质组研究, 并提出所发现的蛋白质标志物可以纵向监测患者和预测病理情况下肺组织细胞状态的变化。在动物研究中, Ding 等^[75]通过对博来霉素诱导的肺纤维化小鼠模型的肺组织进行蛋白质组学分析, 揭示了中药复方在改善肺纤维化方面的分子机制。Fu 等^[76]采用蛋白质组学研究了博来霉素和二氧化硅诱导的肺纤维化模型的肺组织蛋白质表达谱变化。以上研究虽均采用蛋白质组学技术, 但其样本为肺组织、肺泡灌

洗液或血液,未对原代细胞样本展开分析。本文首次利用蛋白质组学技术对博来霉素诱导肺纤维化小鼠模型中的AMs进行了研究,为该疾病的机理研究提供了新思路。

当前已有较多的研究采用RNA-seq技术分析肺纤维化微环境AMs的转录组。Aran等^[24]研究显示,肺纤维化后AMs表达基因如*S100a4*、*H2-Eb1*、*H2-Ab1*、*H2-Aa*、*S100a6*和*C1qa*等显著上调,本文的蛋白质组结果同样显示*S100a4*、*H2-Eb1*和*H2-Ab1*蛋白表达显著上调,但*H2-Aa*、*S100a6*和*C1qa*等蛋白质的表达与生理AMs无明显差异(表S1)。Joshi等^[77]研究显示,肺纤维化AMs高表达未成熟表型标志物(*Itgam*、*Cd36*),以及促纤维化基因(*Arg1*、*Ccr5*、*Jund*、*Fnl*和*Klf9*等),在本研究博来霉素组AMs中也呈现高表达*Arg1*和*Ccr5*蛋白,但*Itgam*和*Cd36*的表达无明显差异,未见*Jund*、*Fnl*和*Klf9*等蛋白质的表达(表S3)。上述AMs转录组与蛋白质组的对比分析说明,转录层面与蛋白质层面并非完全正相关,即一个基因mRNA表达水平高并不一定意味着其编码的蛋白质表达量也高,这是因为转录后和翻译后的调控机制(如mRNA剪接、蛋白质降解和修饰等)也影响蛋白质的最终表达水平。由此可见,转录组学和蛋白质组学各有优势,应该根据研究目的选择不同的研究方法。

已有研究指出,TLR2能够通过与酵母多糖和LPS等配体的相互作用激活促分裂原活化的蛋白质激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)信号通路,以及促进TNF- α 和IL-6等炎症因子的分泌,引发巨噬细胞的促炎反应^[78]。*Pycard*的表达增强及其聚集体的形成是巨噬细胞活化的早期反应^[79],并且可诱发NLRP3炎症小体过度激活,最终加剧肺纤维化情况下的炎症性组织损伤^[80]。更为重要的是,TLR2能够通过促进巨噬细胞*Pycard*聚集体的形成,加快炎症小体的组装过程,从而触发炎症反应^[81]。同样地,本文的蛋白质-蛋白质相互作用及其网络分析结果显示,肺纤维化微环境AMs中Tlr2和*Pycard*的表达显著上调,两蛋白质的相互作用是AMs促炎表型的关键控制节点。

综上所述,本研究的蛋白质组学结果显示,AMs在肺纤维化微环境中呈现高度的促炎活性,具体表现为显著上调I- κ B/NF- κ B信号通路、炎症反应调节、吞噬调节、TGF- β 信号通路和HIF-1信号通路等炎症和纤维化关联通路蛋白。更为重要的

是,Tlr2和*Pycard*的相互作用是AMs在肺纤维化微环境中发挥促炎作用的关键控制节点。因此,全面分析AMs促炎和促纤维化的蛋白质表达谱,对于解析肺纤维化的病理机制至关重要。

4 结 论

本研究探讨了AMs在肺纤维化微环境中蛋白质表达谱的变化。结果发现,AMs显著上调多条与炎症和纤维化关联的通路蛋白,并提示Tlr2和*Pycard*的相互作用是AMs表现出高度促炎活性的控制节点。

附件 见本文网络版(<http://www.pibb.ac.cn>, <http://www.cnki.net>):

PIBB_20240138_Document_S1.xlsx

PIBB_20240138_Figure_S1.pdf

PIBB_20240138_Table_S1.pdf

PIBB_20240138_Table_S2.pdf

PIBB_20240138_Table_S3.pdf

参 考 文 献

- [1] Vancheri C. Idiopathic pulmonary fibrosis and cancer: do they really look similar?. BMC Med, 2015, **13**: 220
- [2] Noble P W, Barkauskas C E, Jiang D. Pulmonary fibrosis: patterns and perpetrators. J Clin Invest, 2012, **122**(8): 2756-2762
- [3] Martinez F J, Collard H R, Pardo A, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. Nat Rev Dis Primers, 2017, **3**: 17074
- [4] Richeldi L, Collard H, Jones M G. Idiopathic pulmonary fibrosis. Lancet, 2017, **389**(10082): 1941-1952
- [5] Raghu G. Epidemiology, survival, incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis in the USA and Canada. Eur Respir J, 2017, **49**(1): 1602384
- [6] Hopkins R B, Burke N, Fell C, et al. Epidemiology and survival of idiopathic pulmonary fibrosis from national data in Canada. Eur Respir J, 2016, **48**(1): 187-195
- [7] Parimon T, Espindola M, Marchevsky A, et al. Potential mechanisms for lung fibrosis associated with COVID-19 infection. QJM, 2023, **116**(7): 487-492
- [8] Mehta P, Rosas I O, Singer M. Understanding post-COVID-19 interstitial lung disease (ILD): a new fibroinflammatory disease entity. Intensive Care Med, 2022, **48**(12): 1803-1806
- [9] Costabel U, Inoue Y, Richeldi L, et al. Efficacy of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis across prespecified subgroups in INPULSIS. Am J Respir Crit Care Med, 2016, **193**(2): 178-185
- [10] Cerri S, Monari M, Guerrieri A, et al. Real-life comparison of pirfenidone and nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: a 24-month assessment. Respir Med, 2019, **159**: 105803
- [11] Crestani B, Huggins J T, Kaye M, et al. Long-term safety and tolerability of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: results from the open-label extension study, INPULSIS-

- ON. *Lancet Respir Med*, 2019, **7**(1): 60-68
- [12] Flaherty K R, Wells A U, Cottin V, *et al.* Nintedanib in progressive fibrosing interstitial lung diseases. *N Engl J Med*, 2019, **381**(18): 1718-1727
- [13] Raghu G. Nintedanib in progressive fibrosing interstitial lung diseases. *N Engl J Med*, 2020, **382**(8): 779-780
- [14] Minutti C M, Knipper J A, Allen J E, *et al.* Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, **61**: 3-11
- [15] Zhang L, Wang Y, Wu G, *et al.* Macrophages: friend or foe in idiopathic pulmonary fibrosis?. *Respir Res*, 2018, **19**(1): 170
- [16] Lazarov T, Juarez-Carreño S, Cox N, *et al.* Physiology and diseases of tissue-resident macrophages. *Nature*, 2023, **618**(7966): 698-707
- [17] Westphalen K, Gusarova G A, Islam M N, *et al.* Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity. *Nature*, 2014, **506**(7489): 503-506
- [18] Neupane A S, Willson M, Chojnacki A K, *et al.* Patrolling alveolar macrophages conceal bacteria from the immune system to maintain homeostasis. *Cell*, 2020, **183**(1): 110-125.e11
- [19] Liao M, Liu Y, Yuan J, *et al.* Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat Med*, 2020, **26**(6): 842-844
- [20] Grant R A, Morales-Nebreda L, Markov N S, *et al.* Circuits between infected macrophages and T cells in SARS-CoV-2 pneumonia. *Nature*, 2021, **590**(7847): 635-641
- [21] Aegerter H, Kulikaukaite J, Crotta S, *et al.* Influenza-induced monocyte-derived alveolar macrophages confer prolonged antibacterial protection. *Nat Immunol*, 2020, **21**(2): 145-157
- [22] Machiels B, Dourcy M, Xiao X, *et al.* A gammaherpesvirus provides protection against allergic asthma by inducing the replacement of resident alveolar macrophages with regulatory monocytes. *Nat Immunol*, 2017, **18**(12): 1310-1320
- [23] Mould K J, Barthel L, Mohning M P, *et al.* Cell origin dictates programming of resident versus recruited macrophages during acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017, **57**(3): 294-306
- [24] Aran D, Looney A P, Liu L, *et al.* Reference-based analysis of lung single-cell sequencing reveals a transitional profibrotic macrophage. *Nat Immunol*, 2019, **20**(2): 163-172
- [25] Bringardner B D, Baran C P, Eubank T D, *et al.* The role of inflammation in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal*, 2008, **10**(2): 287-301
- [26] Misharin A V, Morales-Nebreda L, Reyfman P A, *et al.* Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *J Exp Med*, 2017, **214**(8): 2387-2404
- [27] Liu Y, Liu D, Liu Y, *et al.* Comprehensive proteomics analysis reveals dynamic phenotypes of tumor-associated macrophages and their precursor cells in tumor progression. *J Proteome Res*, 2024, **23**(2): 822-833
- [28] Wieczorek S, Combes F, Lazar C, *et al.* DAPAR & ProStaR: software to perform statistical analyses in quantitative discovery proteomics. *Bioinformatics*, 2017, **33**(1): 135-136
- [29] Yu G, Wang L G, Han Y, *et al.* clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS*, 2012, **16**(5): 284-287
- [30] Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, *et al.* STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res*, 2013, **41**(Database issue): D808-D815
- [31] Shannon P, Markiel A, Ozier O, *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*, 2003, **13**(11): 2498-2504
- [32] Qie J, Liu Y, Wang Y, *et al.* Integrated proteomic and transcriptomic landscape of macrophages in mouse tissues. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 7389
- [33] Manali E D, Moschos C, Triantafyllidou C, *et al.* Static and dynamic mechanics of the murine lung after intratracheal bleomycin. *BMC Pulm Med*, 2011, **11**: 33
- [34] Russo R C, Garcia C C, Barcelos L S, *et al.* Phosphoinositide 3-kinase γ plays a critical role in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Leukoc Biol*, 2011, **89**(2): 269-282
- [35] Tsubouchi K, Araya J, Minagawa S, *et al.* Azithromycin attenuates myofibroblast differentiation and lung fibrosis development through proteasomal degradation of NOX4. *Autophagy*, 2017, **13**(8): 1420-1434
- [36] Endo M, Oyadomari S, Terasaki Y, *et al.* Induction of arginase I and II in bleomycin-induced fibrosis of mouse lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, **285**(2): L313-L321
- [37] Zhang Z, Yu X, Fang X, *et al.* Preventive effects of vitamin D treatment on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Sci Rep*, 2015, **5**: 17638
- [38] Zhao H, Chan-Li Y, Collins S L, *et al.* Pulmonary delivery of docosahexaenoic acid mitigates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *BMC Pulm Med*, 2014, **14**: 64
- [39] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D, *et al.* Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse. *Am Rev Respir Dis*, 1979, **120**(4): 893-899
- [40] Ashcroft T, Simpson J M, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol*, 1988, **41**(4): 467-470
- [41] Hussell T, Bell T J. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol*, 2014, **14**(2): 81-93
- [42] Aegerter H, Lambrecht B N, Jakubzik C V. Biology of lung macrophages in health and disease. *Immunity*, 2022, **55**(9): 1564-1580
- [43] Shi T, Denney L, An H, *et al.* Alveolar and lung interstitial macrophages: definitions, functions, and roles in lung fibrosis. *J Leukoc Biol*, 2021, **110**(1): 107-114
- [44] Chinju A, Moriyama M, Kakizoe-Ishiguro N, *et al.* CD163⁺ M2 macrophages promote fibrosis in IgG4-related disease *via* toll-like receptor 7/interleukin-1 receptor-associated kinase 4/NF- κ B signaling. *Arthritis Rheumatol*, 2022, **74**(5): 892-901
- [45] Meng X M, Nikolic-Paterson D J, Lan H Y. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol*, 2016, **12**(6): 325-338
- [46] Budi E H, Schaub J R, Decaris M, *et al.* TGF- β as a driver of fibrosis: physiological roles and therapeutic opportunities. *J Pathol*, 2021, **254**(4): 358-373
- [47] Boutanquoi P M, Burgy O, Beltramo G, *et al.* TRIM33 prevents pulmonary fibrosis by impairing TGF- β 1 signalling. *Eur Respir J*, 2020, **55**(6): 1901346
- [48] Cramer T, Yamanishi Y, Clausen B E, *et al.* HIF-1 α is essential

- for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell*, 2003, **112**(5): 645-657
- [49] Whyte M K B, Walmsley S R. The regulation of pulmonary inflammation by the hypoxia-inducible factor-hydroxylase oxygen-sensing pathway. *Ann Am Thorac Soc*, 2014, **11**(Suppl 5): S271-S276
- [50] Peyssonnaud C, Datta V, Cramer T, *et al.* HIF-1 α expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest*, 2005, **115**(7): 1806-1815
- [51] Szklarczyk D, Gable A L, Nastou K C, *et al.* The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res*, 2021, **49**(D1): D605-D612
- [52] Liu T, De Los Santos F G, Phan S H. The bleomycin model of pulmonary fibrosis. *Methods Mol Biol*, 2017, **1627**: 27-42
- [53] B Moore B, Lawson W E, Oury T D, *et al.* Animal models of fibrotic lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, **49**(2): 167-179
- [54] Tashiro J, Rubio G A, Limper A H, *et al.* Exploring animal models that resemble idiopathic pulmonary fibrosis. *Front Med*, 2017, **4**: 118
- [55] Moeller A, Ask K, Warburton D, *et al.* The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis?. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, **40**(3): 362-382
- [56] Della Latta V, Cecchetti A, Del Ry S, *et al.* Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: from biological mechanisms to counteractions. *Pharmacol Res*, 2015, **97**: 122-130
- [57] Varnavides G, Madern M, Anrather D, *et al.* In search of a universal method: a comparative survey of bottom-up proteomics sample preparation methods. *J Proteome Res*, 2022, **21**(10): 2397-2411
- [58] Masuda T, Tomita M, Ishihama Y. Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *J Proteome Res*, 2008, **7**(2): 731-740
- [59] Lin Y, Liu Y, Li J, *et al.* Evaluation and optimization of removal of an acid-insoluble surfactant for shotgun analysis of membrane proteome. *Electrophoresis*, 2010, **31**(16): 2705-2713
- [60] Feist P, Hummon A B. Proteomic challenges: sample preparation techniques for microgram-quantity protein analysis from biological samples. *Int J Mol Sci*, 2015, **16**(2): 3537-3563
- [61] Melnikova D L, Skirda V D, Nesmelova I V. Effect of reducing agent TCEP on translational diffusion and supramolecular assembly in aqueous solutions of α -casein. *J Phys Chem B*, 2019, **123**(10): 2305-2315
- [62] Duong V A, Lee H. Bottom-up proteomics: advancements in sample preparation. *Int J Mol Sci*, 2023, **24**(6): 5350
- [63] Goodman J K, Zampronio C G, Jones A M E, *et al.* Updates of the In-gel digestion method for protein analysis by mass spectrometry. *Proteomics*, 2018, **18**(23): e1800236
- [64] Müller T, Winter D. Systematic evaluation of protein reduction and alkylation reveals massive unspecific side effects by iodine-containing reagents. *Mol Cell Proteomics*, 2017, **16**(7): 1173-1187
- [65] Fernandez I E, Eickelberg O. The impact of TGF- β on lung fibrosis: from targeting to biomarkers. *Proc Am Thorac Soc*, 2012, **9**(3): 111-116
- [66] Ye Z, Hu Y. TGF- β 1: gentlemanly orchestrator in idiopathic pulmonary fibrosis (Review). *Int J Mol Med*, 2021, **48**(1): 132
- [67] Saito A, Horie M, Nagase T. TGF- β signaling in lung health and disease. *Int J Mol Sci*, 2018, **19**(8): 2460
- [68] Nacu N, Luzina I G, Highsmith K, *et al.* Macrophages produce TGF- β -induced (beta-ig-h3) following ingestion of apoptotic cells and regulate MMP14 levels and collagen turnover in fibroblasts. *J Immunol*, 2008, **180**(7): 5036-5044
- [69] Fredenburgh L E, Perrella M A, Mitsialis S A. The role of heme oxygenase-1 in pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, **36**(2): 158-165
- [70] Yin X, Choudhury M, Kang J H, *et al.* Hexokinase 2 couples glycolysis with the profibrotic actions of TGF- β . *Sci Signal*, 2019, **12**(612): eaax4067
- [71] Paik Y H, Iwaisako K, Seki E, *et al.* The nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX) homologues NOX1 and NOX2/gp91(phox) mediate hepatic fibrosis in mice. *Hepatology*, 2011, **53**(5): 1730-1741
- [72] Vasse G F, Russo S, Barcaru A, *et al.* Collagen type I alters the proteomic signature of macrophages in a collagen morphology-dependent manner. *Sci Rep*, 2023, **13**(1): 5670
- [73] Bowman W S, Newton C A, Linderholm A L, *et al.* Proteomic biomarkers of progressive fibrosing interstitial lung disease: a multicentre cohort analysis. *Lancet Respir Med*, 2022, **10**(6): 593-602
- [74] Mayr C H, Simon L M, Leuschner G, *et al.* Integrative analysis of cell state changes in lung fibrosis with peripheral protein biomarkers. *EMBO Mol Med*, 2021, **13**(4): e12871
- [75] Ding L, Yang Y, Wang Z, *et al.* Qimai Feiluoping Decoction inhibits mitochondrial complex I-mediated oxidative stress to ameliorate bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Phytomedicine*, 2023, **112**: 154707
- [76] Fu Z, Yin H, Liu J, *et al.* Therapeutic effects of fatty acid binding protein 1 in mice with pulmonary fibrosis by regulating alveolar epithelial regeneration. *BMJ Open Respir Res*, 2023, **10**(1): e001568
- [77] Joshi N, Watanabe S, Verma R, *et al.* A spatially restricted fibrotic niche in pulmonary fibrosis is sustained by M-CSF/M-CSFR signalling in monocyte-derived alveolar macrophages. *Eur Respir J*, 2020, **55**(1): 1900646
- [78] Boehmer E D, Meehan M J, Cutro B T, *et al.* Aging negatively skews macrophage TLR2- and TLR4-mediated pro-inflammatory responses without affecting the IL-2-stimulated pathway. *Mech Ageing Dev*, 2005, **126**(12): 1305-1313
- [79] Bryan N B, Dorfleitner A, Rojanasakul Y, *et al.* Activation of inflammasomes requires intracellular redistribution of the apoptotic speck-like protein containing a caspase recruitment domain. *J Immunol*, 2009, **182**(5): 3173-3182
- [80] Joshi H, Almgren-Bell A, Anaya E P, *et al.* L-plastin enhances NLRP3 inflammasome assembly and bleomycin-induced lung fibrosis. *Cell Rep*, 2022, **38**(11): 110507
- [81] Jones C L, Weiss D S. TLR2 signaling contributes to rapid inflammasome activation during *F. novicida* infection. *PLoS One*, 2011, **6**(6): e20609

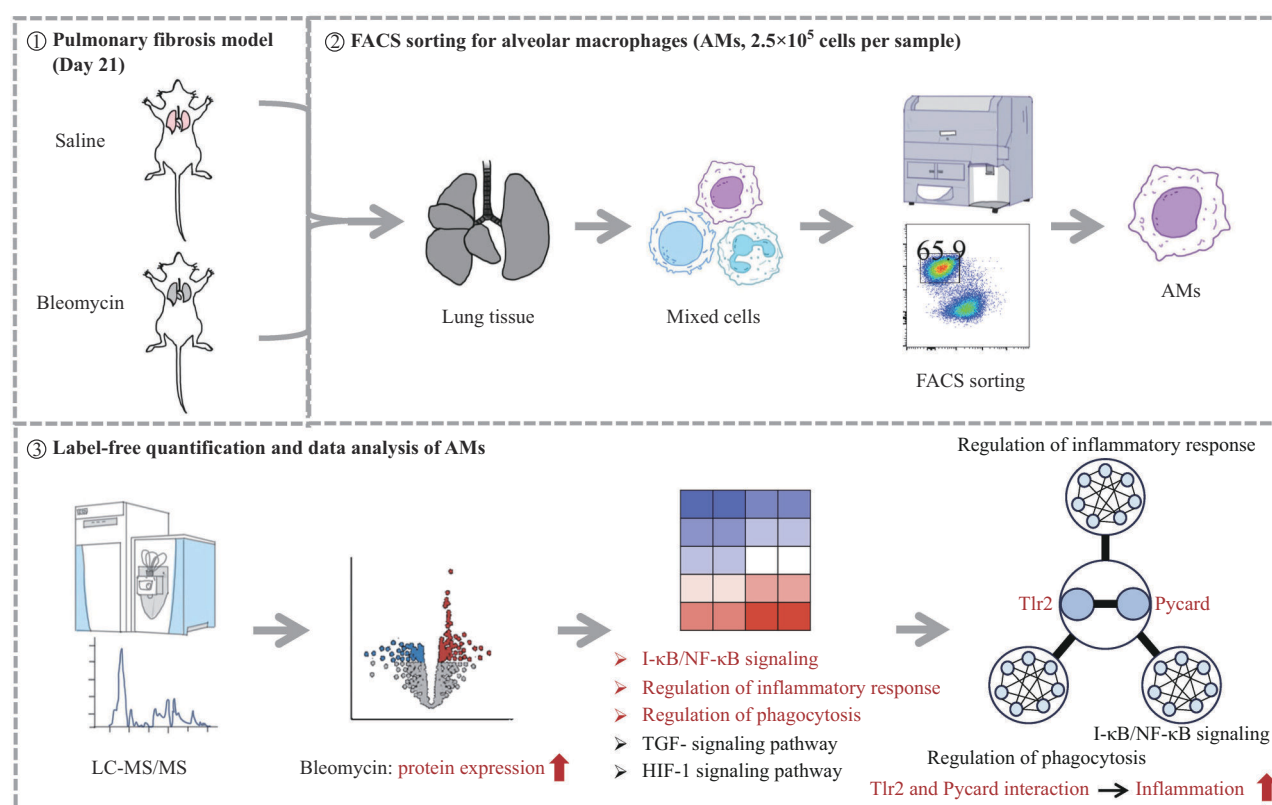
Proteomic Analysis of Alveolar Macrophages in Pulmonary Fibrosis Microenvironment*

WU Xia-Yan^{1,2)}, LIU Di²⁾, LIU Yu-Chen²⁾, JI Shu-Hui²⁾, FU Bin²⁾, LIU Ying²⁾, TANG Li^{1,2)}**

⁽¹⁾Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China;

⁽²⁾State Key Laboratory of Medical Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences (Beijing), Institute of Lifeomics, Academy of Military Medicine, Beijing 102206, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Alveolar macrophages (AMs) are critical for maintaining the homeostasis of pulmonary microenvironment. They process surfactants to ensure alveoli patency, and also serve as the first line of immune defense against pathogen invasion. Available studies have shown that monocyte-derived AMs continuously release pro-inflammatory cytokines and chemokines, recruiting other immune cells to the damaged area during pulmonary fibrosis. These monocyte-derived AMs maintains and amplifies inflammation, playing a negative role

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation (32200736).

** Corresponding author.

Tel: 86-10-61777091, E-mail: tangli731@163.com

Received: April 3, 2024 Accepted: July 16, 2024

in pulmonary fibrosis progression. Current researches have predominantly focused on the gene expression levels of AMs in pulmonary fibrosis microenvironment, with less emphasis on the function and regulation of proteins. This study aims to investigate the differentially expressed proteins (DEPs) of AMs under normal physiological conditions and after pulmonary fibrosis, in order to gain a more comprehensive understanding of the role of AMs in the progression of pulmonary fibrosis. **Methods** Firstly, the construction of bleomycin-induced pulmonary fibrosis mouse models was evaluated through using measurements such as body mass, lung coefficient, lung wet-to-dry mass ratio, H&E staining and Masson staining. Subsequently, AMs from both the saline controls and the pulmonary fibrosis models (2.5×10^5 cells per sample) were collected using FACS sorting, and protein expression profiles of these cells were obtained through label-free proteomics approach. The quality of the proteomic data was assessed by comparing our saline control proteomic data with public proteomic data of physiological AMs. Thirdly, DEPs analysis between the saline controls and the bleomycin groups was carried out using R package Prostar. Functional enrichment analyses of significantly upregulated DEPs were performed using R package Clusterprofiler for GO and KEGG pathways. Finally, the STRING database was used to explore the protein-protein interaction networks related to phagocytosis regulation, inflammatory response regulation, and I- κ B/NF- κ B signaling pathway. The expression levels of Tlr2 and Pycard were detected respectively by FACS and western blotting. **Results** Compared to the saline controls, mice in the bleomycin groups exhibited a lower average body mass, extensive infiltration of inflammatory cells, and deposition of collagen in the lungs. This indicates that bleomycin successfully induced pulmonary fibrosis in mouse models. The proteomic data of AMs obtained from these models was of high quality and fulfilled the research requirements. A comprehensive analysis showed that 778 proteins were upregulated in pulmonary fibrosis groups compared with control groups. Moreover, the signal pathways enriched in up-regulated DEPs were related to the I- κ B/NF- κ B pathway, inflammatory response regulation, phagocytosis regulation, TGF- β signaling, and HIF-1 pathway, indicating that AMs in pulmonary fibrosis microenvironment exerted pro-inflammatory and pro-fibrotic functions. Protein-protein interaction network analysis of the DEPs suggested that the interactions between Tlr2 and Pycard were control nodes for the pro-inflammatory phenotype of AMs, thereby contributing to pulmonary fibrosis progression. Further validation by FACS and Western blotting respectively confirmed that the expression levels of Tlr2 and Pycard in AMs were significantly increased after pulmonary fibrosis. **Conclusion** This study investigates the changes in the protein expression profile of AMs in the pulmonary fibrosis microenvironment. The results show that AMs notably enhanced the activity of various pathways associated with inflammation and fibrosis, suggesting that the interaction between Tlr2 and Pycard serves as a key control node for the highly pro-inflammatory behavior of AMs.

Key words proteomics, alveolar macrophages, bleomycin-induced pulmonary fibrosis

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0138