

海藻糖通过下调 PAI-1/P53 通路减轻博来霉素诱导的肺泡上皮细胞衰老

朱含月¹, 蒋小岗^{2*}

¹无锡市第二人民医院药学部, 无锡 214002; ²苏州大学药学院, 苏州 215123

摘要:探讨海藻糖对博来霉素诱导的肺泡上皮细胞衰老的作用及其可能机制。应用博来霉素诱导类肺泡上皮细胞系 A549 细胞构建肺泡上皮细胞衰老模型, 采用 Western blot 和衰老相关 β -半乳糖苷酶染色法检测海藻糖对博来霉素诱导 A549 细胞衰老的影响; 联合应用海藻糖与自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤或氯喹, 并使用 Western blot 检测衰老标志蛋白的影响; Western blot 测定海藻糖对纤溶酶原激活物抑制剂-1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)/P53 通路的影响。结果表明, 海藻糖可改善博来霉素诱导的肺泡上皮细胞衰老, 增加肺泡上皮细胞中微管相关蛋白轻链 3 II 型 (microtubule-associated protein 1 light chain 3 II, LC3II) 水平, 但自噬抑制剂不能逆转海藻糖对肺泡上皮细胞衰老改善的作用; 海藻糖能下调博来霉素诱导的肺泡上皮细胞中 PAI-1 和 P53 蛋白表达水平。综上, 海藻糖可减轻肺泡上皮细胞衰老, 这与其下调 PAI-1/P53 通路有关, 但与海藻糖激活自噬无关。

关键词:海藻糖; 肺泡上皮细胞; 细胞衰老; 肺纤维化; 纤溶酶原激活物抑制剂-1

中图分类号: R966; R563.9

文献标志码: A

文章编号: 1001-6880(2026)8-1757-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2026.8.014

CSTR: 32307.14.1001-6880.2026.8.014

Trehalose alleviates bleomycin-induced senescence of alveolar epithelial cells by downregulating PAI-1/P53 pathway

ZHU Han-yue¹, JIANG Xiao-gang^{2*}

¹Department of Pharmacy, Wuxi No. 2 People's Hospital, Wuxi 214002, China;

²College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China

Abstract: This study aims to explore the effect and underlying mechanism of trehalose on bleomycin-induced the senescence of alveolar epithelial cells. Bleomycin was used to induce senescence in human alveolar epithelial-like A549 cells. The degree of senescence in A549 cells, induced by bleomycin with or without trehalose was determined via Western blot and senescence-associated β -galactosidase staining. Trehalose was used in combination with the autophagy inhibitors 3-methyladenine or chloroquine, and Western blot was used to detect changes in marker proteins of cellular senescence. Additionally, Western blot was used to determine the effects of trehalose on the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)/P53 pathway. The results demonstrated that trehalose alleviated the senescence of alveolar epithelial cells, and increased the levels of LC3II in alveolar epithelial cells. Inhibition of autophagy did not reverse the trehalose-induced improvement in alveolar epithelial cell senescence. Trehalose downregulated the expression levels of PAI-1 and P53 in bleomycin-treated alveolar epithelial cells. In conclusion, trehalose alleviated the senescence of alveolar epithelial cells, which was related to the downregulation of PAI-1/P53 pathway but not to autophagy activation induced by trehalose.

Key words: trehalose; alveolar epithelial cells; cell senescence; pulmonary fibrosis; plasminogen activator inhibitor-1

肺纤维化是一种慢性进行性间质性肺疾病, 其重要病理特征之一是肺泡上皮细胞衰老^[1]。以往研究表明, 肺纤维化患者的肺泡上皮细胞呈现明显

的细胞衰老特征, 包括肺泡上皮细胞中 P21 蛋白表达增加和衰老相关 β -半乳糖苷酶 (senescence-associated β -galactosidase, SA- β -gal) 活性增强^[2]。衰老的肺泡上皮细胞分泌大量衰老相关分泌表型因子, 这些因子激活肺成纤维细胞并导致细胞外基质大量

收稿日期: 2025-06-09 接受日期: 2025-12-19

基金项目: 国家自然科学基金 (82273991)

* 通信作者 E-mail: jiangxiaogang@suda.edu.cn

生成,进一步恶化肺纤维化^[3]。因此,改善肺泡上皮细胞衰老已成为治疗肺纤维化的潜在靶点^[4]。

博来霉素是由轮枝链霉菌产生的多肽类抗生素,具有抗肿瘤作用,其不良反应之一是引起肺纤维化。博来霉素诱导的肺纤维化动物模型是目前最常用的肺纤维化模型,且随着2003年Aoshiba等^[5]首次发现博来霉素致动物肺泡上皮细胞发生衰老以后,博来霉素诱导肺泡上皮细胞衰老模型也已成为肺泡上皮细胞衰老机制及药物发现中应用最广泛的模型。Jiang等^[6]在博来霉素刺激的肺泡上皮细胞中发现升高的纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)通过激活P53-P21通路促进肺泡上皮II型上皮细胞衰老,从而加速肺纤维化疾病的进程,而肺泡上皮细胞条件性敲除PAI-1能明显改善肺泡上皮细胞衰老,进而减轻博来霉素所致的肺纤维化。最近,YTH结构域包含蛋白1(YTH domain containing 1, YTHDC1)^[7]、肾连蛋白(nephronectin)^[8]、沉默信息调节因子5(silent information regulator 5, SIRT5)^[9]等因子也被发现参与了博来霉素致肺泡上皮细胞衰老的过程。随着对博来霉素诱导肺泡上皮细胞机制的深入探讨,博来霉素诱导的肺纤维化细胞与动物模型作为目前与肺纤维化疾病最为接近的经典模型,将会更好地推动肺纤维化药物的发现研究。

海藻糖是一种天然二糖,具有抗氧化和抗肿瘤活性^[10]。研究表明^[11],海藻糖可保护肺泡巨噬细胞进而减轻二氧化硅粉尘引起的肺纤维化。前期研究发现^[12],海藻糖抗肺纤维化活性可能与下调 β -连环蛋白(β -catenin)从而抑制肺肌成纤维细胞转化有关。然而,目前对海藻糖是否具有改善肺泡上皮细胞衰老的作用尚不清楚。因此,该研究探讨了海藻糖对博来霉素诱导肺泡上皮细胞衰老的作用及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器

类肺泡上皮细胞系A549细胞(批号:sibcb-190620a,中国科学院上海细胞库)。

海藻糖、3-甲基腺嘌呤、氯喹、巴弗洛霉素-A1(纯度:99%、99%、99%、90%,批号:0000308579、0000192625、0000209952、0000199235,美国Sigma公司);SA- β -gal染色试剂盒(批号:A089D210915,海门碧云天生物试剂有限公司);胎牛血清(批号:1842926,以色列Biological Industries公司);F12细

胞培养基(批号:RNBj7491,美国Sigma公司);兔抗P21抗体、兔抗纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)抗体(批号:00078021、00066951,武汉三鹰生物技术有限公司);小鼠抗P53抗体(批号:F0217,美国Santa Cruz公司);兔抗微管相关蛋白轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)II抗体(批号:2053,美国Cell Signaling Technology公司)。

BB150二氧化碳培养箱(美国Thermo科学仪器公司);Tanon5200化学发光成像系统(上海天能生命科学有限公司);Olympus X51倒置显微镜(日本奥林巴斯公司)。

1.2 细胞培养与给药

A549细胞在含10%胎牛血清的F12培养基中在37℃、含5%CO₂的二氧化碳培养箱中培养。海藻糖的使用浓度根据海藻糖在正常肺成纤维细胞和正常气道上皮细胞使用浓度确定^[9,10]。按细胞密度 6×10^4 个/mL接种于6孔板中。第2d,使用博来霉素(50 μ g/mL)与100、200 mmol/L海藻糖、1 mmol/L 3-甲基腺嘌呤或20 mmol/L氯喹联合处理细胞。48 h后,细胞进行染色处理或制备蛋白提取物。

1.3 采用SA- β -gal染色法观察肺泡上皮细胞蓝染情况

A549细胞经博来霉素(50 μ g/mL)处理48 h时后,用PBS洗涤1次,加入 β -gal染色固定液,室温条件下固定细胞10 min,然后用PBS洗涤3次(每次3 min)。弃去PBS后,用染色液(1 mL染色液:染色液A 10 μ L,染色液B 10 μ L,染色液C 930 μ L, X-Gal溶液10 μ L)染色,再用封口膜密封后于37℃孵育过夜。最后,将染色液更换为PBS,在倒置显微镜下观察细胞蓝染情况并拍照。

1.4 Western blot 检测蛋白表达

用含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液制备蛋白样品,通过SDS-PAGE分离粗蛋白提取物,随后将蛋白质转移至PVDF膜上,用5%脱脂牛奶封闭。封闭1 h后,将膜与相应的一抗孵育过夜,然后与对应的二抗孵育1 h。随后使用化学发光成像系统扫描PVDF膜。采用Image J对蛋白条带灰度的相对定量分析。

1.5 统计学分析

采用GraphPad Prism 6.0软件进行数据分析并作图,采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方

差分析,使用 Tukey's test 进行事后检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 博来霉素诱导肺泡上皮细胞衰老

P21 是细胞衰老的重要标志物之一。用博来霉素处理 A549 细胞,通过 Western blot 检测 A549 细

胞中 P21 蛋白表达水平。如图 1 所示,50 $\mu\text{g/mL}$ 博来霉素显著增加了 A549 细胞中 P21 蛋白表达水平;SA- β -gal 染色法是检测细胞衰老的金标准方法,如图 2 所示,A549 细胞经 50 $\mu\text{g/mL}$ 博来霉素处理后,蓝染细胞数量显著增加。上述结果表明,博来霉素可诱导肺泡上皮细胞衰老。

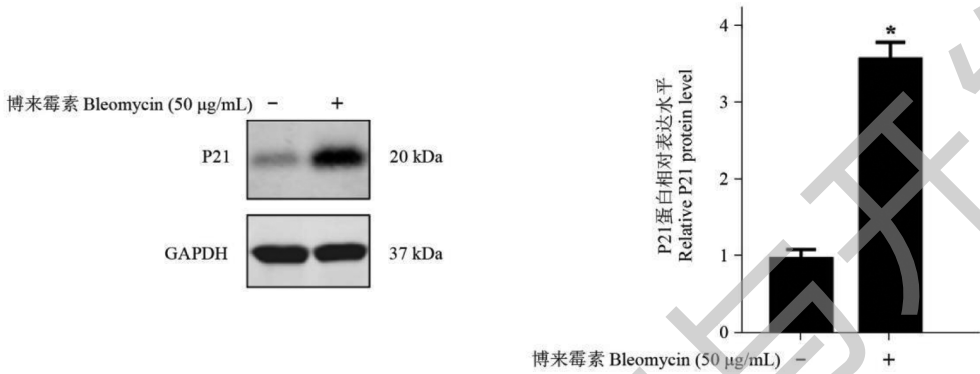


图 1 博来霉素对 A549 细胞中 P21 蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of bleomycin on the expression level of P21 protein in A549 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与对照组比较: * $P < 0.05$,下同。Note:Compared with control group, * $P < 0.05$,the same below.

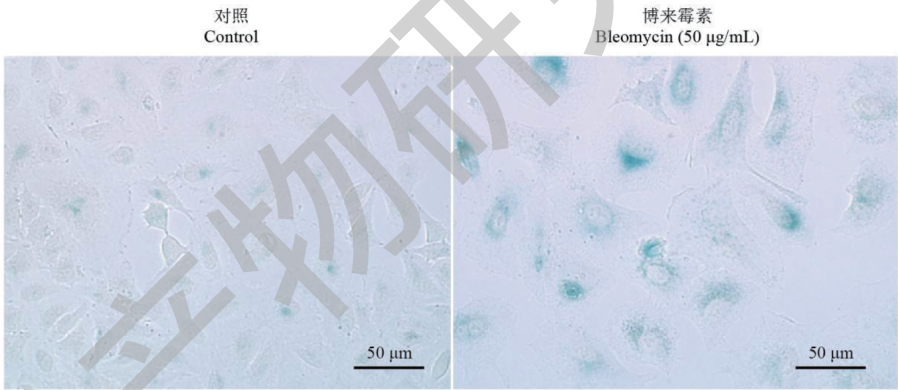


图 2 博来霉素对 A549 细胞中 SA- β -gal 染色的影响(400 $\times$)

Fig. 2 Effect of bleomycin on the staining of SA- β -gal in A549 cells (400 $\times$)

2.2 海藻糖减轻博来霉素诱导的肺泡上皮细胞衰老

首先,通过 Western blot 评估海藻糖对博来霉素处理的 A549 细胞中 P21 蛋白表达水平的影响。以 100、200 mmol/L 浓度的海藻糖处理后,A549 细胞中 P21 蛋白表达水平显著下调(见图 3)。同时使用 SA- β -gal 染色法检测海藻糖对博来霉素诱导的 A549 细胞衰老的影响,结果显示,100 mmol/L 海藻糖显著减少了衰老肺泡上皮细胞的数量(见图 4)。这些结果表明,海藻糖可改善博来霉素诱导的肺泡上皮细胞衰老。

2.3 海藻糖激活肺泡上皮细胞自噬

上述结果显示,海藻糖可改善肺泡上皮细胞衰

老,那么海藻糖是如何对肺泡上皮细胞衰老发挥有益作用的。由于海藻糖是已知的自噬诱导剂,因此首先确定海藻糖是否能诱导 A549 细胞发生自噬。如图 5 所示,海藻糖显著增加了 A549 细胞中自噬标志物微管相关蛋白轻链 3 II 型(microtubule-associated protein 1 light chain 3 II,LC3II)蛋白表达水平,表明海藻糖可诱导肺泡上皮细胞自噬。

2.4 海藻糖不通过激活自噬来发挥改善肺泡上皮细胞衰老的作用

首先使用自噬形成抑制剂 3-甲基腺嘌呤研究自噬是否参与海藻糖改善肺泡上皮细胞衰老的作用。结果表明,3-甲基腺嘌呤未能逆转海藻糖引起

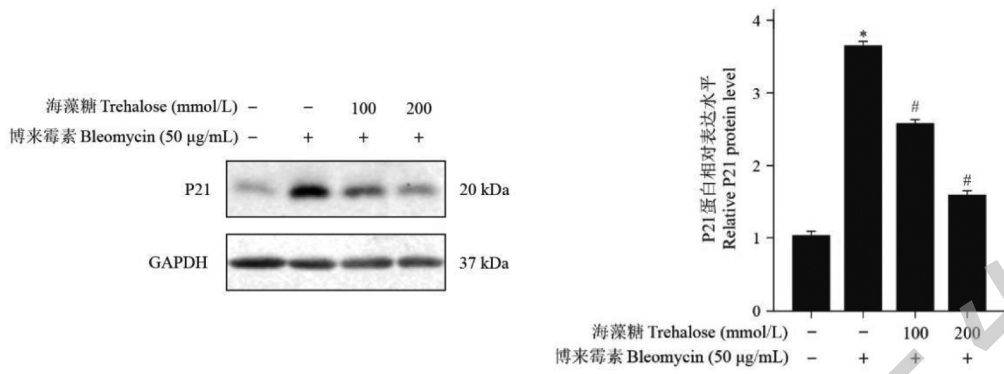


图 3 海藻糖对博来霉素诱导的 A549 细胞中 P21 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of trehalose on the expression level of P21 in bleomycin-induced A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与博来霉素组比较, # $P < 0.05$, 下同。Note: Compared with bleomycin group, # $P < 0.05$, the same below.

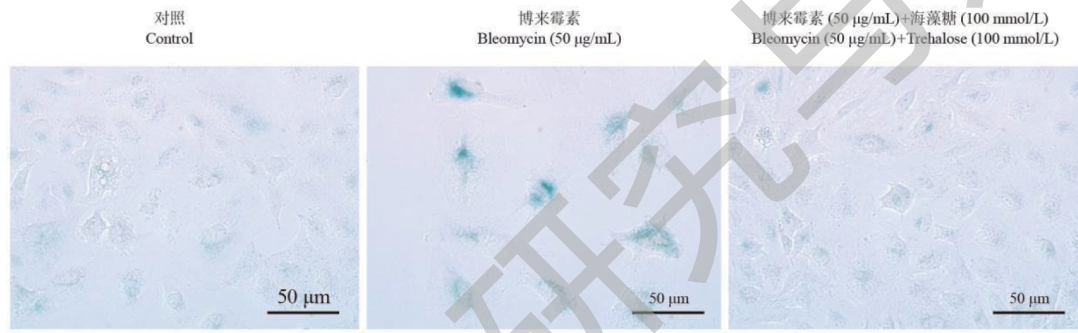


图 4 海藻糖对博来霉素诱导的 A549 细胞中 SA- β -gal 染色的影响 (400 $\times$)

Fig. 4 Effect of trehalose on the staining of SA- β -gal in bleomycin-induced A549 cells (400 $\times$)

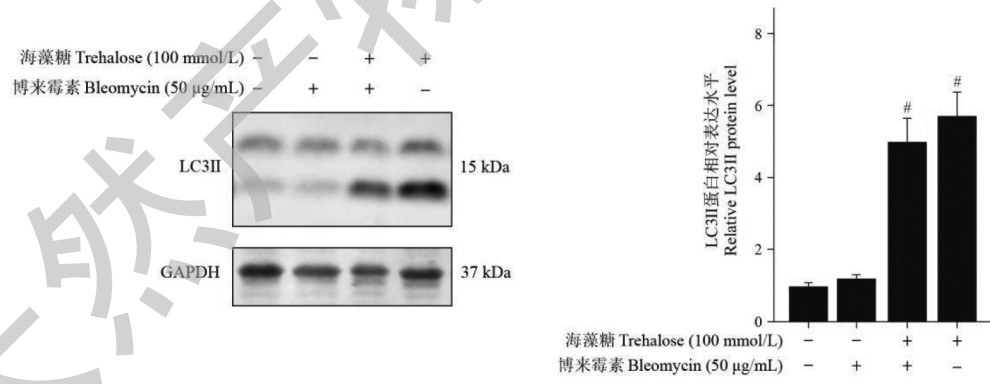


图 5 海藻糖对博来霉素诱导的 A549 细胞中 LC3II 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of trehalose on the expression level of LC3II in bleomycin-induced A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

的 P21 蛋白表达水平的下调(见图 6)。进一步,应用自噬流抑制剂氯喹研究自噬通量的动态变化是否影响海藻糖对肺泡上皮细胞的保护作用。如图 7 所示,氯喹未能逆转海藻糖引起的 P21 蛋白表达水平的下降。结果表明,海藻糖对肺泡上皮细胞衰老的改善作用与其激活自噬可能无关。

2.5 海藻糖抑制博来霉素处理的肺泡上皮细胞中的 PAI-1/P53 通路

PAI-1/P53 通路是已知的调节肺泡上皮细胞衰老的通路。因此,通过 Western blot 检测海藻糖对 PAI-1 和 P53 蛋白表达水平的影响。如图 8 所示,海藻糖在肺泡上皮细胞衰老过程中可明显下调

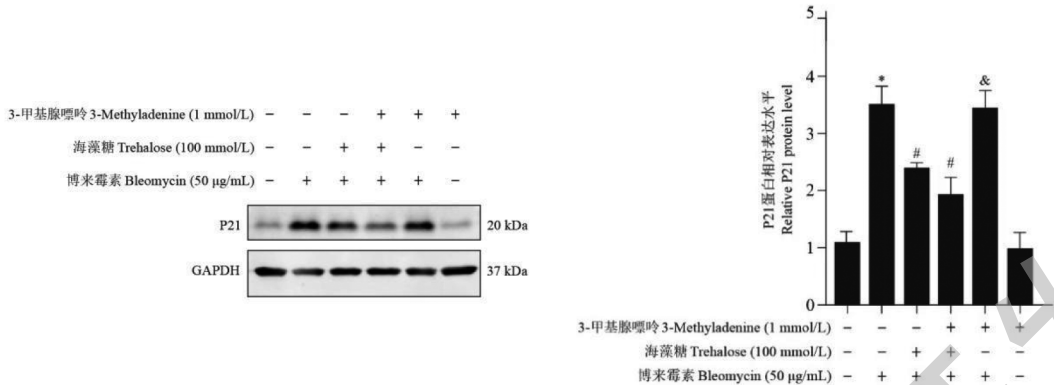


图6 海藻糖和3-甲基腺嘌呤联用对博来霉素诱导的A549细胞中P21蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effects of trehalose and 3-methyladenine on the expression level of P21 in bleomycin-induced A549 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与3-甲基腺嘌呤组比较,* $P < 0.05$ 。Note:Compared with 3-methyladenine group,* $P < 0.05$ 。

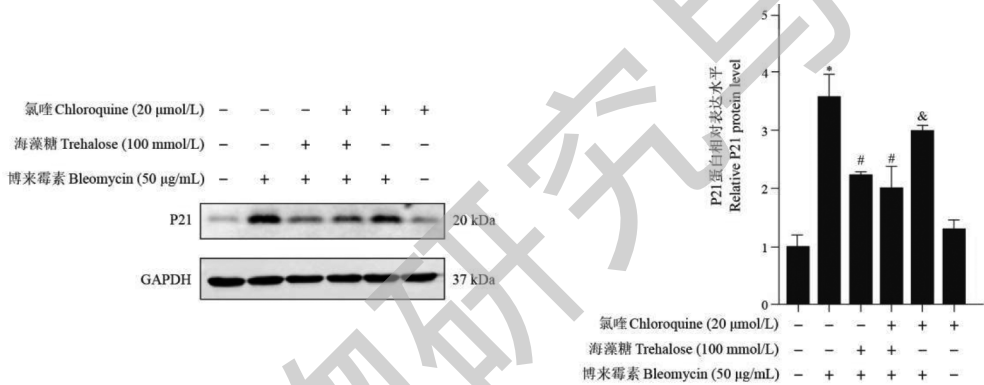


图7 海藻糖和氯喹联用对博来霉素诱导的A549细胞中P21蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effects of trehalose and chloroquine on the expression level of P21 in bleomycin-induced A549 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与氯喹组比较,* $P < 0.05$ 。Note:Compared with chloroquine group,* $P < 0.05$ 。

PAI-1 和 P53 蛋白表达水平。上述结果表明,海藻糖可通过下调 PAI-1/P53 通路改善肺泡上皮细胞衰老。

3 讨论与结论

肺纤维化的病理成因复杂,患者肺组织内大量聚集着衰老的肺泡上皮细胞,表现为 P21 蛋白水平异常和 SA- β -gal 染色阳性细胞比率的异常增加^[13]。然而,目前临床用于治疗肺纤维化的药物尼达尼布和吡非尼酮并不能改善肺泡上皮细胞衰老^[14]。因此,寻找可改善肺泡上皮细胞衰老的活性化合物是肺纤维化药物发现的潜在策略。

在该研究中,海藻糖在博来霉素诱导的 A549 细胞衰老模型中显著改善了肺泡上皮细胞的衰老。尽管海藻糖是公认的自噬激活剂^[15],但该研究发现海藻糖激活自噬与其改善肺泡上皮细胞衰老的作用无关。另一方面,Rangarajan 等^[16]也发现,尽管尼达

尼布可激活自噬,但其治疗肺纤维化的作用与尼达尼布激活自噬的活性无关。然而,自噬在肺泡上皮细胞衰老中的作用以及自噬对肺纤维化是否有益尚未完全阐明。该研究和 Rangarajan 等^[16]的报道仅揭示了这一现象,仍需更大量的工作来阐明上述未知问题。

在肺泡上皮细胞中,PAI-1/P53 通路异常激活可促进肺泡上皮细胞衰老,从而加速肺纤维化疾病的进程,而下调 PAI-1/P53 通路可改善肺泡上皮细胞衰老并减轻博来霉素诱导的肺纤维化程度^[6,17]。该研究中发现海藻糖可显著下调 PAI-1 和 P53 蛋白表达水平,表明下调 PAI-1/P53 通路可能是海藻糖改善肺泡上皮细胞衰老的机制之一。然而,目前研究无法确定海藻糖是否直接作用于 PAI-1/P53 通路来改善肺泡上皮细胞衰老。另一方面,海藻糖具有抗氧化活性^[18,19],因此,海藻糖有可能通过直接调

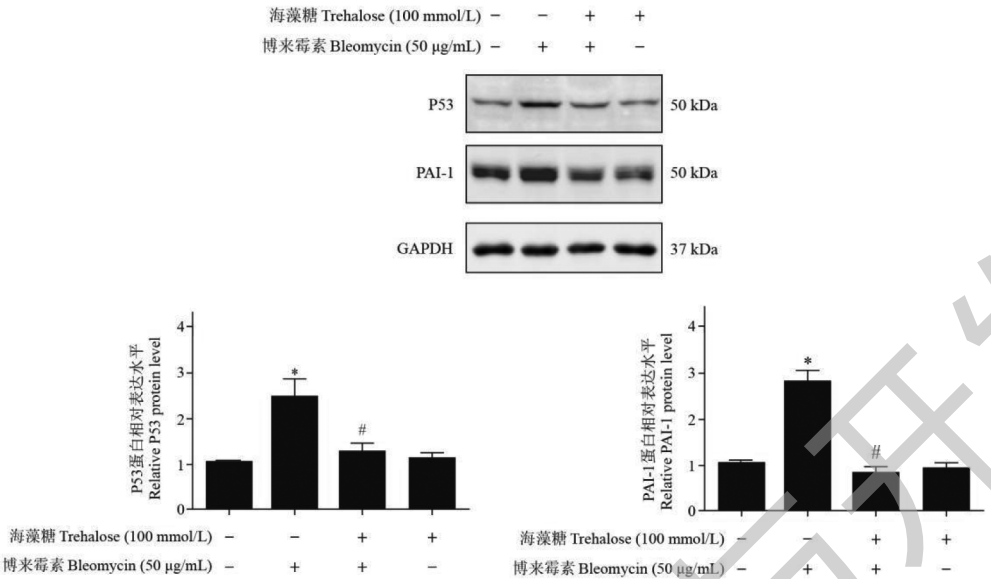


图 8 海藻糖对博来霉素诱导的 A549 细胞中 PAI-1 和 P53 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effects of trehalose on the expression level of PAI-1 and P53 in bleomycin-induced A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

控活性氧进而抑制 PAI-1/P53 通路发挥减轻肺泡上皮细胞衰老的作用(见图 9)。此外,小窝蛋白-1(caveolin-1)^[20]、第 10 号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)^[21]与博来霉素致肺泡

上皮细胞衰老密切相关,其是否与海藻糖作用也有待探究。因此,需要深入研究来阐明海藻糖改善肺泡上皮细胞衰老的分子机制,为海藻糖治疗肺纤维化以及发现潜在的治疗肺纤维化药物新靶点提供有益的证据。

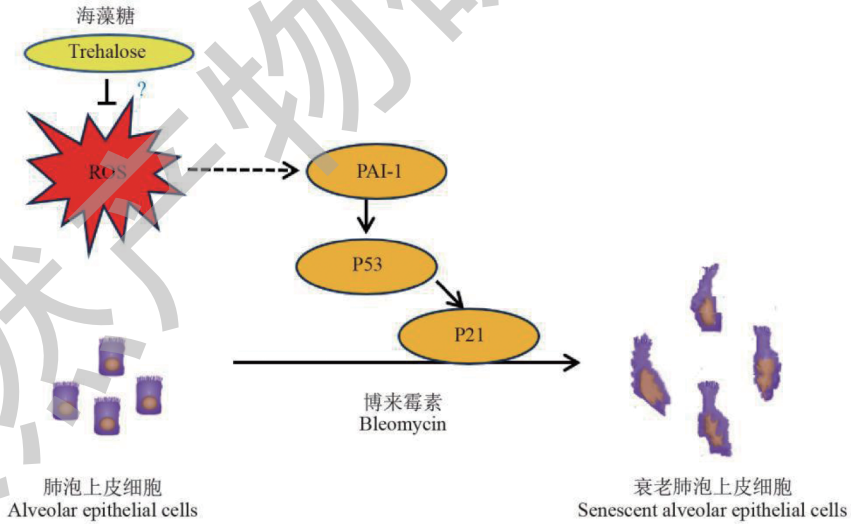


图 9 海藻糖减轻博来霉素诱导肺泡上皮细胞衰老的可能机制

Fig. 9 Possible mechanisms of trehalose in alleviating bleomycin-induced senescence in alveolar epithelial cells

自噬激活剂改善肺纤维化的作用一直是肺纤维化领域关注的焦点。既往研究表明^[22],自噬与肺纤维化之间的关系复杂,至今尚未阐明。此外,包括自噬在内的肺泡上皮细胞衰老的病理机制仍不清楚。该研究从自噬激活剂——海藻糖与肺泡上皮细胞衰

老的角度,阐述了海藻糖通过调节 PAI-1/P53 通路改善肺泡上皮细胞衰老的作用,既发现了海藻糖的新活性和新机制,为海藻糖减轻肺纤维化的作用提供了新认识,同时也为从天然产物宝库中寻找改善细胞衰老的活性化合物^[23]提供了新证据。

数据可用性声明: 本篇论文的关联数据可在 ScienceDB 数据库 (<https://doi.org/10.57760/sciencedb.nprd.00410>) 中访问获取。

参考文献

- 1 Liu RM, Liu G. Cell senescence and fibrotic lung diseases [J]. *Exp Gerontol*, 2020, 132:110836.
- 2 Shivshankar P, Brampton C, Miyasato S, et al. Caveolin-1 deficiency protects from pulmonary fibrosis by modulating epithelial cell senescence in mice [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 47:28-36.
- 3 Yao CF, Guan XR, Carraro G, et al. Senescence of alveolar type 2 cells drives progressive pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2021, 203:707-717.
- 4 Barnes PJ, Baker J, Donnelly LE. Cellular senescence as a mechanism and target in chronic lung diseases [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 200:556-564.
- 5 Aoshiba K, Tsuji T, Nagai A. Bleomycin induces cellular senescence in alveolar epithelial cells [J]. *Eur Respir J*, 2003, 22:436-443.
- 6 Jiang CS, Liu G, Luckhardt T, et al. Serpine 1 induces alveolar type II cell senescence through activating p53-p21-Rb pathway in fibrotic lung disease [J]. *Aging Cell*, 2017, 16:1114-1124.
- 7 Zhang CF, Chen LP, Xie C, et al. YTHDC1 delays cellular senescence and pulmonary fibrosis by activating ATR in an m6A-independent manner [J]. *EMBO J*, 2024, 43:61-86.
- 8 Guo JY, Wang Y, Liu QD, et al. Nephronectin (NPNT) is a crucial determinant of idiopathic pulmonary fibrosis; modulating cellular senescence via the ITGA3/YAP1 signaling axis [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2025, 12:e01956.
- 9 Hou WY, Zhao YL, Yang LQ, et al. SIRT5-mediated desuccinylation prevents mitochondrial dysfunction in alveolar epithelial cells senescence and pulmonary fibrosis [J]. *Cell Signal*, 2025, 132:111830.
- 10 Chaitanya NSN, Devi A, Sahu S, et al. Molecular mechanisms of action of trehalose in cancer: a comprehensive review [J]. *Life Sci*, 2021, 269:118968.
- 11 He X, Chen S, Li C, et al. Trehalose alleviates crystalline silica-induced pulmonary fibrosis via activation of the TFEB-mediated autophagy-lysosomal system in alveolar macrophages [J]. *Cells*, 2020, 9:122.
- 12 Lu FQ, Sun XH, Xu XF, et al. SILAC-based proteomic profiling of the suppression of TGF-beta1-induced lung fibroblast-to-myofibroblast differentiation by trehalose [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 391:114916.
- 13 Hong XJ, Wang LH, Zhang KX, et al. Molecular mechanisms of alveolar epithelial stem cell senescence and senescence-associated differentiation disorders in pulmonary fibrosis [J]. *Cells*, 2022, 11:877.
- 14 Zhang YW, Jones KD, Achta-Zadeh N, et al. Histopathological and molecular analysis of idiopathic pulmonary fibrosis lungs from patients treated with pirfenidone or nintedanib [J]. *Histopathology*, 2019, 74:341-349.
- 15 Sharma V, Makhdooni M, Singh L, et al. Trehalose limits opportunistic mycobacterial survival during HIV co-infection by reversing HIV-mediated autophagy block [J]. *Autophagy*, 2021, 17:476-495.
- 16 Rangarajan S, Kurundkar A, Kurundkar D, et al. Novel mechanisms for the antifibrotic action of nintedanib [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 54:51-59.
- 17 Rana T, Jiang CS, Liu G, et al. PAI-1 regulation of TGF-beta1-induced alveolar type II cell senescence, SASP secretion, and SASP-mediated activation of alveolar macrophages [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2020, 62:319-330.
- 18 Zhang SY, Qiu X, Zhang Y, et al. Metabolomic analysis of trehalose alleviating oxidative stress in myoblasts [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24:13346.
- 19 Xi HM, Chen XY, Liang K, et al. Trehalose alleviates D-galactose-induced aging-related granulosa cell death in ovaries [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25:12643.
- 20 Linge A, Weinhold K, Blasche R, et al. Downregulation of caveolin-1 affects bleomycin-induced growth arrest and cellular senescence in A549 cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39:1964-1974.
- 21 Tian YQ, Li H, Qiu T, et al. Loss of PTEN induces lung fibrosis via alveolar epithelial cell senescence depending on NF-kappaB activation [J]. *Aging Cell*, 2019, 18:e12858.
- 22 Lv XX, Li K, Hu ZW. Autophagy and pulmonary fibrosis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1207:569-579.
- 23 Tang J, Hong Q, Li YL, et al. Anti-aging effect of asperuloside on BJ cells and molecular docking study [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2022, 34(S2):33-39.