

中文摘要

Nrf2 在 TGF- β 1 诱导的小鼠乳腺纤维化中的作用及其机制研究

奶牛乳腺纤维化是一种慢性的、进行性功能失调的病理过程，该病理过程会缩短奶牛泌乳年限，使产奶量明显下降，奶品质变差，严重时可发展为乳腺硬化，最终导致奶牛淘汰，严重制约奶牛业的发展。目前，关于奶牛乳腺纤维化的研究进展缓慢，缺乏有效的治疗手段。因此如何有效地缓解奶牛乳腺纤维化并深入探究其潜在发病机制，具有十分重要的研究意义和价值。核因子 E2 相关因子 2 (Nuclear factor erythroid 2 related factor 2, Nrf2) 是细胞内适应性抗氧化应激反应的主要调节因子，具有缓解炎症、抗氧化、调节代谢等多种生物学功能。但是，Nrf2 在乳腺纤维化中的作用及机制尚未见报道。因此，本文通过建立乳腺内灌注 TGF- β 1 的方式构建小鼠乳腺纤维化模型和 TGF- β 1 诱导的小鼠乳腺上皮细胞 (Mice mammary epithelial cells, mMECs) 间充质转化 (Epithelial mesenchymal transformation, EMT) 模型为基础，系统研究了 Nrf2 对小鼠乳腺纤维化的影响及其机制，以期为靶向 Nrf2 防治奶牛乳腺纤维化病变提供理论依据。

首先，为了明确 Nrf2 在小鼠乳腺纤维化中的影响，本研究通过构建 TGF- β 1 诱导的小鼠乳腺纤维化模型，利用组织病理学、Western blot 和 qRT-PCR 等试验技术手段，探究了 Nrf2 基因缺失对小鼠乳腺纤维化相关指标的影响。结果显示，与野生型小鼠相比，Nrf2 敲除小鼠乳腺组织胶原纤维沉积显著增多，纤维化相关蛋白及 mRNA 水平显著升高。随后，本研究在 mMECs 中分别加入 Nrf2 的激活剂 (tBHQ) 和抑制剂 (RA) 后，以 TGF- β 1 诱导 EMT 过程为基础，进一步明确 Nrf2 在乳腺纤维化中的影响，结果显示，与正常对照组相比，加入 RA 后纤维化相关蛋白及 mRNA 水平显著升高，而 tBHQ 能够显著抑制纤维化相关蛋白及 mRNA 的水平。以上结果表明 Nrf2 的激活能够抑制纤维化表型指标的升高进而缓解小鼠乳腺纤维化的发展。

为了探究 Nrf2 在小鼠乳腺纤维化中的作用机制，本研究通过在体和离体纤维化模型中以 Western blot 实验方法对 TGF/Smad 信号通路活化情况进行检测，研究结果显示，与对照组相比，抑制或敲除 Nrf2 显著激活 TGF/Smad 信号通路，而激活 Nrf2 显著抑制 TGF/Smad 信号通路的激活，随后，本研究对线粒体损伤和线粒体自噬情况进行检测，结果发现，与 WT-TGF- β 1 组相比，Nrf2^{-/-}-TGF- β 1

组中线粒体损伤更为严重，并且线粒体自噬相关蛋白表达显著降低，导致 ROS 生成增多，体外研究结果与体内一致。最后，为了进一步探究 Nrf2 对小鼠乳腺纤维化的影响是否通过 ROS 介导，本研究分别在体内外加入 ROS 清除剂(NAC)后检测纤维化相关蛋白的表达情况，结果发现 NAC 显著缓解体内外由 TGF- β 1 诱导的纤维化相关蛋白表达的升高。进一步机制研究发现，过量积累的 ROS 显著激活 TGF/Smad 信号通路促进纤维化相关蛋白的表达，而加入 NAC 后能够显著抑制 TGF/Smad 信号通路的激活进而缓解小鼠乳腺纤维化的发展。

以上结果表明，Nrf2 的激活能够缓解 TGF- β 1 诱导的小鼠乳腺纤维化的发展，其主要通过调控线粒体自噬及线粒体损伤影响 ROS 的生成，进而以 TGF/Smad 信号通路介导小鼠乳腺纤维化发展。因此，Nrf2 有望成为缓解奶牛乳腺纤维化病变的潜在靶点。

关键词；

乳腺纤维化；Nrf2；转化生长因子- β 1；线粒体；活性氧

Abstract

The role and mechanism of Nrf2 in TGF- β 1-induced mammary fibrosis in mice

Cow mammary fibrosis is a chronic, pathological process of sexual dysfunction, the pathological process will shorten the lactating years of dairy cows, milk production significantly decreased, milk quality deteriorates, severe can develop mammary sclerosis, and eventually lead to the elimination of dairy cows, seriously restrict the development of dairy industry. At present, the research progress of cow mammary fibrosis is slow and there is a lack of effective treatment. Therefore, it is of great research significance and value to effectively alleviate mammary fibrosis of cows and deeply explore its potential pathogenesis.

Nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Nrf2) is the main regulator of adaptive anti-oxidative stress response in cells, which has multiple biological functions such as relieving inflammation, anti-oxidation and regulating metabolism. However, the role and mechanism of Nrf2 in mammary fibrosis have not been reported. Therefore, based on the Epithelial mesenchymal transformation (EMT) process, systematically investigate the effects and its mechanisms of Nrf2 on TGF- β 1-induced mice mammary fibrosis, in order to provide theoretical basis for the prevention and treatment of mammary fibrosis in cows by targeting Nrf2.

First, in order to clarify the effect of Nrf2 on mice mammary fibrosis, the study explored the effect of Nrf2 gene deletion on related indicators of mice mammary fibrosis by constructing a mice mammary fibrosis model induced by TGF- β 1 and using histopathology, Western blot and qRT-PCR. The results showed that compared with wild-type mice, collagen fiber deposition and fibrosis-related protein and mRNA levels in mammary tissue of Nrf2 knockout mice were significantly increased. Subsequently, we added the activator (tBHQ) and inhibitor (RA) of Nrf2 into mMECs, and further clarified the influence of Nrf2 on mammary fibrosis based on the EMT process induced by TGF- β 1. The results showed that, compared with the normal control group, fibrosis-related protein and mRNA levels increased significantly after the addition of RA. tBHQ significantly inhibited the levels of fibrosis-related proteins and mRNA. These results indicate that the activation of Nrf2 inhibit the increase of fibrosis phenotypic indexes and thus alleviate the development of mammary fibrosis in mice.

In order to explore the mechanism of Nrf2 in mice mammary fibrosis, the

activation of TGF/Smad signaling pathway was detected by Western blot experimental methods in vivo and in vitro. The results showed that, compared with the control group, inhibition or knockout of Nrf2 significantly activated TGF/Smad signaling pathway, while activation of Nrf2 significantly inhibited the activation of TGF/Smad signaling pathway. Subsequently, mitochondrial damage and mitochondrial autophagy were detected in this study, and the results showed that compared with the WT-TGF- β 1 group, mitochondrial damage was more serious in Nrf2^{-/-}-TGF- β 1 group, and the expression of mitochondrial autophagy related proteins was significantly decreased, and the production of ROS was increased. The results of in vitro study were consistent with those in vivo. Finally, in order to further explore whether the effect of Nrf2 on mammary fibrosis in mice is mediated by ROS, we detected the expression of fibrosis-related proteins after adding ROS scavenger (NAC) respectively in vitro and in vivo. The results showed that NAC significantly alleviated the increase of fibrosis-related protein expression induced by TGF- β 1 in vitro and in vivo. Further mechanism studies revealed that excessive accumulation of ROS significantly activated TGF/Smad signaling pathway and promoted the expression of fibrosis-related proteins, while the addition of NAC significantly inhibited the activation of TGF/Smad signaling pathway and thus alleviated the development of mammary fibrosis in mice.

These results indicate that the activation of Nrf2 alleviate the development of TGF- β 1-induced mammary fibrosis in mice, which affects ROS generation mainly through the regulation of mitochondrial autophagy and mitochondrial damage, and then mediates the mammary fibrosis process in mice through the TGF/Smad signaling pathway. Therefore, Nrf2 is expected to be a potential target for alleviating mammary fibrosis in dairy cows.

Keywords:

Mammary fibrosis; Nrf2; TGF- β 1; Mitochondria; ROS

关于学位论文使用授权的声明

本人完全了解吉林大学有关保留、使用学位论文的规定，同意吉林大学保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权吉林大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

论文级别：■硕士 □博士

学科专业：基础兽医学

论文题目：Nrf2 在 TGF- β 1 诱导的小鼠乳腺纤维化中的作用及其机制研究

作者签名：徐平

指导教师签名：柳臣臣

2023 年 6 月 7 日

目 录

中文摘要	I
ABSTRACT.....	III
前 言	1
第一篇 文献综述	3
第一章 奶牛乳腺纤维化的研究进展	3
1.1 奶牛乳腺纤维化概况.....	3
1.2 奶牛乳腺纤维化的诱因.....	3
1.3 奶牛乳腺纤维化的预防与治疗.....	5
1.4 小结.....	5
第二章 纤维化的研究进展	6
2.1 纤维化相关机制.....	6
2.2 TGF- β 1 及 TGF/Smad 信号通路.....	8
2.3 小结.....	10
第三章 Nrf2 的研究进展	11
3.1 Nrf2 的概况	11
3.2 Nrf2 与纤维化	12
3.3 Nrf2 与线粒体损伤	12
3.4 Nrf2 与线粒体自噬	13
3.5 小结.....	14
第二篇 研究内容	15
第一章 Nrf2 在 TGF- β 1 诱导的小鼠乳腺纤维化中的作用研究.....	15
1.1 材料.....	15
1.2 方法.....	17
1.3 结果.....	24
1.4 讨论.....	29
1.5 小结.....	31

第二章 Nrf2 在 TGF- β 1 诱导的小鼠乳腺纤维化中的作用机制研究	32
2.1 材料.....	32
2.2 方法.....	34
2.3 结果.....	37
2.4 讨论.....	45
2.5 小结.....	47
结 论	48
参考文献	49
导师简介	61
作者简介	62
致 谢	63

缩写词表

英文缩写	英文全称	中文全称
ARE	Antioxidant reaction element	抗氧化反应元件
ATP	Adenosine triphosphate	三磷酸腺苷
α -SMA	α -smooth muscle actin	α -平滑肌肌动蛋白
ECM	Extracellular matrix	细胞外基质
EMT	Epithelial mesenchymal transformation	上皮细胞间充质转化
E-cad	E-cadherin	E-钙黏蛋白
EndMT	Endothelialmesenchymal transition	内皮细胞间充质转化
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
HSP60	Heat shock protein60	热休克蛋白 60
LPS	Lipopolysaccharides	脂多糖
MFN2	Mitofusin2	线粒体融合蛋白
mMECs	Mice mammary epithelial cells	小鼠乳腺上皮细胞
Nrf2	Nuclear factor erythroid-2 related factor 2	核因子 E2 相关因子 2
Nrf2 ^{-/-}	Nrf2 knockout mice	Nrf2 基因敲除小鼠
NAC	N-acetyl-L-cysteine	N-乙酰-L-半胱氨酸
NF- κ B	Nuclear factor kappa-B	核因子 κ B
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸缓冲盐溶液
Pink1	PTEN induced putative kinase 1	PTEN 诱导假定激酶 1
Parkin	parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase	E3 泛素连接酶 parkin
PHB2	Prohibitin-2	抑制素-2
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
rpm	Revolutions per minute	每分钟转数
TGF- β 1	Transforming growth factor- β 1	转化生长因子- β 1
Vim	Vimentin	波形蛋白
WT	Wild type	野生型小鼠

前 言

奶牛乳腺纤维化通常由久治不愈的乳腺炎迁延所致,不同的病原菌引起的临床型和隐型乳腺炎均可导致奶牛乳腺不同程度的纤维化病变。奶牛乳腺纤维化病变使奶牛产奶量明显下降,奶品质变差,最终导致奶牛淘汰,给奶牛业带来严重的经济损失,但是目前关于防治奶牛乳腺纤维化的研究仍处于初级阶段^[1-6],因此,深入研究奶牛乳腺纤维化的致病机制并寻找防治的潜在靶点是今后需要继续探究的方向。

转化生长因子 β (Transforming Growth Factor β , TGF- β) 是具有多种功能的细胞因子,涉及细胞增殖、分化、趋化和许多免疫细胞的活化^[7, 8],其在纤维化中具有广泛研究^[9, 10]。此外, TGF- β 1 是有效的促纤维化介质,它能够诱导细胞外基质 (Extracellular matrix, ECM) 的产生^[11]。当器官或组织发生纤维化时, TGF- β 1 的分泌水平显著升高,促进 ECM 在细胞间隙中大量积累^[12, 13],过度的 ECM 沉积导致正常细胞的生理功能及结构被破坏,促进上皮细胞间充质转化 (Epithelial mesenchymal transformation, EMT), 进一步加剧纤维化的发展^[12, 14]。因此,本研究分别在野生型小鼠和 Nrf2 敲除小鼠乳腺导管内注射 TGF- β 1 构建体内小鼠乳腺纤维化模型以及 TGF- β 1 诱导小鼠乳腺上皮细胞 (Mice mammary epithelial cells, mMECs) EMT 过程作为体外小鼠乳腺纤维化模型。

核因子 E2 相关因子 2 (Nuclear factor erythroid 2 related factor 2, Nrf2) 是抗氧化反应的主要调节因子,其能够通过调节多种抗氧化酶的代谢或表达来缓解细胞氧化应激反应。有研究表明, Nrf2 通过与抗氧化反应元件 (Antioxidant response element, ARE) 结合,中和 ROS 以恢复细胞氧化还原平衡^[15],受损的线粒体是 ROS 产生的主要来源之一,ROS 作为生物多种生理过程的关键信号分子,其过度积累导致的氧化损伤,将进一步加剧线粒体功能障碍,最终导致细胞死亡^[16],因此, Nrf2 是维持线粒体稳态和结构完整性的重要参与者^[17]。此外,越来越多的文献证实 Nrf2 在参与纤维化的发展进程中起着重要作用,Zhang 等人研究表明, Nrf2 通过抗氧化途径来抑制 EMT 过程从而缓解博来霉素诱导的肺纤维化^[18],Kavian 等发现 Nrf2 通过调节抗氧化反应相关信号分子以及 ROS 产生以抑制系

统性硬化症中的皮肤纤维化的发展进程^[19]，上述研究结果提示，Nrf2 参与的抗氧化反应途径在乳腺纤维化的发病中可能起着重要作用。

线粒体自噬对线粒体质量控制尤为关键，受损伤的线粒体及其释放的有害成分可通过线粒体自噬清除，进而在保护细胞方面发挥重要作用。哺乳动物中受损线粒体的消除通常由 PTEN 诱导假定激酶 1 (PTEN induced putative kinase 1, Pink1) 和 E3 泛素连接酶 Parkin (parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase, Parkin) 组成的途径介导。Bhatia 等人研究发现，通过调节 Pink1/Mfn2/Parkin 途径介导巨噬细胞线粒体自噬可缓解肾纤维化中 ECM 的积累^[20]，Undamatla 等人证明肝细胞线粒体自噬受到抑制是非酒精性脂肪性肝发病机制的早期症状，能够加速肝脏纤维化的发展^[21]，此外，有研究表明，Nrf2 能够通过线粒体自噬清除受损线粒体以保护心肌细胞^[22]。因此，我们推测 Nrf2 在小鼠乳腺纤维化的发展进程中可能通过调节线粒体自噬以发挥保护作用。

鉴于上述，本研究拟利用免疫荧光、qRT-PCR、Western blot 等技术，以 TGF- β 1 作为诱导剂构建乳腺纤维化小鼠模型及细胞模型，从整体和细胞水平探究 Nrf2 在小鼠乳腺纤维化中的作用及其机制。

第一篇 文献综述

第一章 奶牛乳腺纤维化的研究进展

1.1 奶牛乳腺纤维化概况

奶牛乳腺纤维化通常由久治不愈的乳腺炎迁延所致，奶牛饲养环境差、细菌微生物因素和遗传因素等刺激因素均可引起乳腺炎^[23-25]，持续的炎症反应导致免疫系统被破坏，激活损伤相关分子模式最终导致奶牛乳腺纤维化的发生，不同的病原菌引起的临床型和隐型乳腺炎可导致奶牛乳腺不同程度的纤维化病变。奶牛乳腺纤维化病变使奶牛产奶量明显下降，奶品质变差，最终导致奶牛淘汰，给奶牛业带来严重的经济损失，但是目前关于防治奶牛乳腺纤维化的研究仍处于初级阶段。

1.2 奶牛乳腺纤维化的诱因

1.2.1 奶牛乳腺纤维化与慢性炎症

慢性炎症往往是奶牛乳腺纤维化的重要启动因素，在炎症发生过程中，白细胞和纤维细胞在组织中被募集，与激活的免疫细胞共同诱导促炎细胞因子的产生。随后，趋化细胞因子进一步推动单核细胞、T 细胞和 B 细胞浸润到损伤部位^[26]。单核细胞分化成 M1 或 M2 巨噬细胞，M1 巨噬细胞被“经典”激活后，产生促炎细胞因子，如肿瘤坏死因子 α 、白介素-1 和白介素-6，从而维持组织炎症。M2 巨噬细胞在暴露于白介素-4，白介素-10 和白介素-13 后“替代”激活，并具有抗炎及促纤维化特性。在慢性炎症条件下，促炎 M1 巨噬细胞缓慢转化为更具抗炎性、促纤维化的 M2 表型分泌介质，促进损伤部位愈合^[27, 28]。

纤维细胞同样来源于单核细胞，是成纤维细胞的前体。组织或器官损伤后，纤维细胞响应多种配体和趋化因子迁移到损伤器官组织，分化为成纤维细胞样细胞，占成纤维细胞总数的一小部分^[29, 30]。为了帮助伤口愈合，纤维细胞产生几种基质蛋白，如 Collagen I, Collagen III, Vimentin 等^[31]。此外，细胞因子和生长

因子也可由纤维细胞产生, 如白介素、转换因子生长- β 和血小板衍生生长因子等。已知肌成纤维细胞的激活、炎症细胞募集、新血管生成等也可由这些因素诱导^[28]。此外, He 等人发现外源性 SDF-1 能够通过激活 NF- κ B 通路促进乳腺上皮细胞间充质转化, 诱导炎症反应, 抑制上皮细胞增殖并引起乳腺纤维化^[32]。

1.2.2 奶牛乳腺纤维化与氧化应激

奶牛乳腺纤维化与氧化应激有密切联系, 过去几十年来积累的证据已经确定了许多促进纤维化的重要致病机制, 氧化应激是包括肺部在内的各种器官纤维化的重要分子机制^[33,34]。所有器官都含有多种抗氧化剂, 以防止氧化应激, 抗氧化能力的消耗会导致氧化应激, 从而诱导纤维化的发生。氧化应激引起组织器官损伤机制主要在于 ROS, 过度累积的 ROS 能够造成脂质、蛋白质和核酸等大分子损伤, 最终导致细胞结构和功能被破坏, 为纤维化的发展创造条件, 此外, ROS 可以作为信号传递分子参与细胞内信号通路传导, 如 AKT/NF- κ Bp65, TGF/Smad 信号通路等^[35]。有研究发现, 氧化应激通过激活肌成纤维细胞从而在肾小管间质纤维化中起重要作用^[36]。抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC) 能够直接清除氧自由基, 提高细胞的抗氧化能力。越来越多的研究也表明 NAC 发挥抗纤维化功效的原因是其具有抑制 TGF- β 1 分泌的作用^[37], 此外, Radisky 等人研究发现, 由 MMP-3 诱导的乳腺上皮细胞能够发生上皮-间充质转化而获得肌成纤维细胞样特征, 并且该过程取决于 ROS^[38], 这为氧化应激与乳腺纤维化之间存在联系提供证据。

1.2.3 奶牛乳腺纤维化与线粒体损伤

线粒体存在于大多数细胞中, 对环境因素的变化十分敏感。一些细微的改变就会导致线粒体功能障碍或线粒体损伤^[39]。融合和分裂之间的平衡是线粒体损伤的代偿机制之一^[40], 在正常情况下, 受损伤的线粒体会与另一个线粒体融合, 通过交换正常功能所必需的化合物来减轻线粒体功能障碍, 在严重的线粒体应激情况下, 通过线粒体自噬的过程对有缺陷的线粒体进行识别和消除以维持线粒体质量平衡^[41]。另一方面, 线粒体受到损伤后, 能够将线粒体活性氧 (mtROS) 和线粒体 DNA (mtDNA) 释放到细胞微环境中, 启动具有免疫增强功能的炎症反

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/097022162160006050>