

二氧化硅染尘小鼠肺纤维化相关炎症和氧化应激因子的响应及关键基因表达

吕达^a, 杨慧楠^a, 刘春城^{a, b}, 王乐^a, 赵宏宇^{a, b}, 蔡禄^{a, b}

内蒙古科技大学 a. 生命科学与技术学院 b. 内蒙古自治区功能基因组生物信息学重点实验室,
内蒙古 包头 014010

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.21061

摘要:

[背景] 二氧化硅(SiO₂)长期沉积在肺组织中能够诱发炎症与纤维化反应,进而导致尘肺病,但其发病机制尚未明确。

[目的] 探究SiO₂对小鼠肺部纤维化的影响及其相关机制。

[方法] 将35只C57BL/6小鼠随机分成空白对照组、生理盐水对照组、20 g·L⁻¹ SiO₂染尘组、60 g·L⁻¹ SiO₂染尘组4个组别,其中空白对照组5只,其余组别各10只。采用非气管暴露法在第0天和第14天进行2次染尘,按照小鼠体重灌注不同体积的SiO₂悬浊液。在染尘第28天和第56天时取小鼠肺组织和血清。10倍光学显微镜下观察肺组织HE切片;ELISA法检测肺组织中小鼠成纤维生长因子(FGF)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和转化生长因子-β(TGF-β)3种炎症因子的质量分数(后简称含量),检测血清中超氧化物歧化酶(SOD)、活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)3种氧化应激因子的水平;10倍显微镜下观察Masson染色切片胶原纤维分布;分光光度计检测肺组织中羟脯氨酸含量;实时荧光定量PCR技术检测肺组织中*Col1a2*和α-SMA mRNA表达水平的变化。

[结果] HE染色结果显示:SiO₂染尘组与生理盐水对照组相比有明显的炎症细胞浸润,部分出现纤维结节。炎症因子检测结果显示:20 g·L⁻¹和60 g·L⁻¹染尘组小鼠在染尘第56天时,TGF-β、FGF、TNF-α含量分别是3.42、3.62 ng·g⁻¹, 15.20、19.78 ng·g⁻¹和9.02、11.30 ng·g⁻¹,较生理盐水组均有增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。氧化应激因子检测结果显示:小鼠20 g·L⁻¹染尘组在染尘第28和56天时,MDA浓度分别是0.23、0.26 μmol·L⁻¹, ROS水平均为11 U·L⁻¹, SOD质量浓度分别0.43、0.44 μg·L⁻¹;小鼠60 g·L⁻¹染尘组在染尘第28和56天时,MDA浓度为0.28、0.34 μmol·L⁻¹, ROS水平分别是13、14 U·L⁻¹, SOD质量浓度分别0.38、0.36 μg·L⁻¹;相比于生理盐水对照组,在两个时间点两个浓度染尘组小鼠血清中MDA、ROS水平增加, SOD水平下降,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。在染尘第28和56天时,20 g·L⁻¹染尘组的小鼠羟脯氨酸含量为0.25、0.28 mg·g⁻¹, 60 g·L⁻¹染尘组为0.32、0.43 mg·g⁻¹,较生理盐水组升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。观察Masson染色切片,在第28、56天时,染尘组小鼠肺组织相较于生理盐水对照组胶原面积增大。基因表达水平检测结果显示:小鼠60 g·L⁻¹染尘组在染尘第28、56天时,相较于生理盐水组,*Col1a2*基因表达量上升至1.62倍和3.08倍,α-SMA基因表达量分别上升至2.05倍和3.34倍,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

[结论] SiO₂染尘小鼠肺部产生纤维化的进程中,可导致肺部出现炎症反应、氧化应激反应以及肺组织中胶原沉积等综合效应。

关键词: 肺纤维化;二氧化硅;胶原沉积;炎症反应;氧化应激

Responses of inflammatory factors and oxidative stress factors and expressions of key genes associated with pulmonary fibrosis in silica-exposed mice LYU Da^a, YANG Huinan^a, LIU Chuncheng^{a, b}, WANG Le^a, ZHAO Hongyu^{a, b}, CAI Lu^{a, b} (a.School of Life Science and Technology b.Inner Mongolia Autonomous Region Key Laboratory of Functional Genome Bioinformatics, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou, Inner Mongolia 014010, China)

Abstract:

[Background] It is well known that long-term deposition of silicon dioxide (SiO₂) in lung tissues can induce inflammation and fibrosis and result in pneumoconiosis, but pathogenesis of pneumoconiosis remains elusive.

基金项目

国家自然科学基金(62071259, 61671256, 31760247);内蒙古自然科学基金(2021MS03007)

作者简介

吕达(1995—),男,硕士生;
E-mail: 1451860025@qq.com

通信作者

蔡禄, E-mail: nmcailu@163.com
赵宏宇, E-mail: zhaohongyu2000@163.com

伦理审批

已获取

利益冲突

无申报

收稿日期

2021-02-26

录用日期

2021-07-15

文章编号

2095-9982(2021)10-1150-06

中图分类号

R114

文献标志码

A

► 引用

吕达, 杨慧楠, 刘春城, 等. 二氧化硅染尘小鼠肺纤维化相关炎症和氧化应激因子的响应及关键基因表达[J]. 环境与职业医学, 2021, 38(10): 1150-1155.

► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21061

Funding

This study was funded.

Correspondence to

CAI Lu, E-mail: nmcailu@163.com
ZHAO Hongyu, E-mail: zhaohongyu2000@163.com

Ethics approval

Obtained

Competing interests

None declared

Received

2021-02-26

Accepted

2021-07-15

► To cite

LYU Da, YANG Huinan, LIU Chuncheng, et al. Responses of inflammatory factors and oxidative stress factors and expressions of key genes associated with pulmonary fibrosis in silica-exposed mice[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(10): 1150-1155.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21061

[Objective] This experiment investigates the effect of SiO₂ on pulmonary fibrosis in mice.

[Methods] Thirty-five C57BL/6 mice were randomly divided into four groups: a blank control group (5 mice), a normal saline control group (10 mice), a 20 g·L⁻¹ SiO₂ group (10 mice), and a 60 g·L⁻¹ SiO₂ group (10 mice). The mice were exposed by intratracheal instillation of SiO₂ suspension on day 0 and day 14, and the lung tissue and serum samples were collected on day 28 and day 56 after silica or saline instillation. HE sections of lung tissues were observed under optical microscope (10× magnification). ELISA was used to detect the levels of three inflammatory cytokines including fibroblast growth factor (FGF), tumor necrosis factor-α (TNF-α), and transforming growth factor-β (TGF-β) in lung tissues, and three oxidative stress factors including superoxide dismutase (SOD), reactive oxygen species (ROS), and malondialdehyde (MDA) in serum. The distributions of collagen fibers in Masson-stained sections were observed under microscope (10× magnification). The level of hydroxyproline (HYP) in lung tissues was detected with a spectrophotometer. The expressions of *Col1a2* and α -SMA mRNA in lung tissues were measured by real-time PCR.

[Results] The results of HE staining showed that there were obvious infiltration of inflammatory cells and some fibrous nodules in the two SiO₂ groups compared with the normal saline control group. The detection results of inflammatory factors indicated that on day 56, the levels of TGF-β in lung tissues of the 20 g·L⁻¹ SiO₂ group and the 60 g·L⁻¹ SiO₂ group were 3.42 and 3.62 ng·g⁻¹, the levels of FGF were 15.20 and 19.78 ng·g⁻¹, the levels of TNF-α were 9.02 and 11.30 ng·g⁻¹, respectively, all higher than those of the normal saline group ($P < 0.01$). The detection results of oxidative stress factors showed that the levels of MDA in serum of the 20 g·L⁻¹ SiO₂ group on day 28 and day 56 were 0.23 and 0.26 μmol·L⁻¹, the levels of ROS were both 11 U·L⁻¹, and the levels of SOD were 0.43 and 0.44 μg·L⁻¹, respectively; in the 60 g·L⁻¹ SiO₂ group on day 28 and day 56, the levels of MDA were 0.28 and 0.34 μmol·L⁻¹, the levels of ROS were 13 and 14 U·L⁻¹, and the levels of SOD were 0.38 and 0.36 μg·L⁻¹, respectively. The serum levels of MDA and ROS were higher and the level of SOD was lower in the two SiO₂ groups than in the normal saline control group ($P < 0.01$). The levels of HYP on day 28 and day 56 were 0.25 and 0.28 mg·g⁻¹ in the 20 g·L⁻¹ SiO₂ group, and 0.32 and 0.43 mg·g⁻¹ in the 60 g·L⁻¹ SiO₂ group, respectively, all higher than those in the normal saline control group ($P < 0.01$). Compared with the normal saline control group, the Masson staining sections demonstrated that the collagen areas in lung tissues of the mice exposed to SiO₂ on day 28 and day 56 were obviously increased. The relative expression levels of *Col1a2* mRNA in the 60 g·L⁻¹ SiO₂ group on day 28 and day 56 were 1.62 and 3.08 times higher than those in the normal saline control group, respectively; the relative expression levels of α -SMA mRNA were 2.05 and 3.34 times higher, respectively ($P < 0.01$).

[Conclusion] There exist combined effects of inflammation, oxidative stress, and collagen deposition in lung tissues during silica-induced pulmonary fibrosis in mice.

Keywords: pulmonary fibrosis; silicon dioxide; collagen deposition; inflammatory reaction; oxidative stress

尘肺病是因为患者长期接触生产性粉尘,呼吸系统的清除和防御机制受到损害,进而引起肺组织纤维化^[1]。目前尘肺病发病机制尚未解释清楚,所以一旦确诊,临床上没有根治的方法^[2]。

有研究表明,尘肺病发病与炎症反应等免疫响应具有密切的关系^[3]。二氧化硅(SiO₂)进入肺部首先作用于上皮细胞和内皮细胞等,促使这些细胞释放炎症介质,引起血小板聚集,促进血管扩张和增加血管通透性,使炎症细胞聚集到损伤部位^[4]。在尘肺病发病初期和发病末期均有巨噬细胞诱发炎症反应。巨噬细胞能够合成并且释放肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素-6等炎症因子。随着炎症的发展,肺泡上皮细胞和巨噬细胞释放促纤维化和转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)。TGF-β具有多种功能,通过刺激成纤维细胞以及肌成纤维细胞分泌胶原等细胞外基质以及调控蛋白多糖的表达参与尘肺病的发病过程^[5]。

氧化应激反应在纤维化发生发展阶段扮演了非常重要的角色^[6]。人类肺组织相较于其他器官暴露于更高浓度的氧环境中,更容易受到氧化应激的损伤。当体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生过

多或抗氧化能力不足时,过量的ROS存在于组织或细胞内,可以诱发氧化应激,将导致肺组织的损伤。Matsuzawa等^[7]通过检测血清氧化应激标志物,得出了纤维化进展过程中存在氧化/抗氧化失衡的结论。氧化应激可以通过刺激相关基因表达来调节细胞生长、增殖和死亡,进而促进肺纤维化。

肺组织中胶原纤维的生成与聚集是尘肺病的标志^[8]。细胞外基质的沉积和纤维灶的形成是肺纤维化的标志性特征。I型胶原和α-平滑肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)是肺内细胞外基质中的重要成分和特征性标志物。纤维灶主要是由活化的肌成纤维细胞组成,肌成纤维细胞能够合成胶原、α-SMA等细胞外基质的主要成分。有研究人员通过对间质性肺炎活检分析发现,上皮细胞死亡后,肺泡表面基底膜脱落,在成纤维细胞和肌成纤维细胞等间充质细胞中会大量合成新的细胞外基质,从而加速肺部纤维化^[9]。

目前,同时从炎症反应、氧化应激反应以及胶原沉积三个方面综合研究粉尘颗粒导致肺纤维化的工作较少,而这对于理解尘肺病的致病机理具有重要的意义。鉴于此,本研究拟对染尘后的小鼠进行为期56 d的实验,在此期间对不同染尘时间的小鼠样本进

行病理学研究,同时测定炎症因子、氧化应激因子以及胶原形成相关的基因 mRNA 的表达量,为尘肺病的发病机制研究提供一定的依据。

1 对象与方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2019-0010;动物饲养温度控制在 25℃ 左右,空气湿度 50%~60%,光照时间昼夜交替各 12 h;适应饲养 7 d 后进行实验,动物实验经内蒙古科技大学实验动物管理委员会审查批准,审批号为 NMKGJDX-2017-03。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 Nanodrop 2000 紫外分光光度计(Thermo Fisher 科技公司,美国),Eclipse Ti-U 荧光倒置显微镜(尼康株式会社,日本),Synergy HT 多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司,美国),实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司,美国)。

1.2.2 主要试剂 TNF- α 、TGF- β 、成纤维生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、ROS、丙二醛(malondialdehyde, MDA)的酶免试剂盒(江苏南京晶美生物科技有限公司,中国);苏木素-伊红染色(haematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒、Masson 染色试剂盒、羟脯氨酸(北京索莱宝有限公司,中国);直径 1~5 μm 的 SiO_2 粉末(Sigma 公司,美国);总 RNA 提取试剂(RNAiso Plus)、反转录试剂盒(Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser)、实时荧光定量 PCR 试剂盒(TB Green™ Premix EX Taq™ II, TaKaRa 公司,日本);Col1a2 基因和 α -SMA 基因扩增引物(苏州金维智公司,中国),其他试剂(分析纯,国药集团,中国)。

1.3 实验方法

1.3.1 构建小鼠模型 根据前期实验结果设定染尘剂量。将 35 只 SPF 级 C57BL/6 小鼠(雄性、体重约 20~25 g、8~10 周)随机分成空白对照组(5 只)、生理盐水对照组(10 只)、20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ SiO_2 染尘组(10 只)、60 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ SiO_2 染尘组(10 只)共 4 组。采用非气管暴露法构建小鼠模型,每只小鼠灌注 SiO_2 的量为 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (以小鼠体重计),用无菌的生理盐水配制 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 60 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 SiO_2 悬浊液,按照小鼠体重灌注不同体积的 SiO_2 悬浊液^[8-9]。分别于第 0 天和第 14 天进行二次灌注。

1.3.2 样本采集 空白对照组全部在第 28 天处死,其

余各组小鼠分别于第 28 天和第 56 天处死。用剪刀镊子剪开胸腔,分离出肺组织,然后用生理盐水将肺组织冲洗干净,滤纸拭干。将左肺叶剪下浸泡在 4% (体积分数,下同)的多聚甲醛溶液。

1.3.3 HE 与 Masson 染色 将小鼠肺组织浸泡在 4% 的多聚甲醛固定液中 24 h 后进行脱水、石蜡包埋、切片操作,然后按照索莱宝 HE 染色和 Masson 染色步骤进行染色操作,将染好色的切片放到光学显微镜下观察,拍照记录并比较不同样本间的差异。

1.3.4 肺组织 TGF- β 、TNF- α 、FGF 测定 采用 ELISA 法测定, TGF- β 和 FGF 的检出限为 0.3375 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, TNF- α 的检出限为 0.27 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。首先将肺组织切成小块,加入适量 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液。用匀浆器将样本研磨充分, 3000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ (离心半径 10 cm) 离心 20 min, 收集上清液待测。检测过程按照试剂盒标准步骤进行,结果以每克湿肺组织中含上述因子的质量分数(后称含量)表示。

1.3.5 血清中 SOD、ROS、MDA 测定 采用 ELISA 测定血清中 SOD、ROS、MDA, SOD 检出限为 0.105 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, ROS 检出限为 0.3 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$, MDA 的检出限为 0.03 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。小鼠眼球取血,室温血液自然凝固 20 min, 2500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ (离心半径 10 cm) 离心 20 min, 收集到的上清液即为血清。检测过程按照试剂盒标准步骤进行。

1.3.6 羟脯氨酸含量检测 称取约 20 mg 肺组织于消解管中,按照 200 μL :20 mg (盐酸:肺组织)的比例加入 6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸,煮沸 3 h 后 16000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ (离心半径 10 cm) 离心 20 min,然后用 10 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液中和至 pH 值为 7,加蒸馏水定容至 400 μL ,用分光光度计在 560 nm 波长下测得光密度(D)值代入标准曲线中计算每克湿肺组织含羟脯氨酸的质量分数(后称含量)。

1.3.7 Col1a2 基因和 α -SMA 基因表达检测 将小鼠肺组织用液氮研磨充分加入 1 mL TaKaRa 公司的 RNAiso Plus,然后按照总 RNA 提取试剂的说明书步骤进行 RNA 提取,分光光度计检测所得到的总 RNA 浓度和纯度,再按反转录试剂盒步骤将 RNA 反转录为 cDNA 链,以 cDNA 链作为模板链, GAPDH 基因为内参基因进行扩增。扩增反应程序设定为:95℃ 30 s;95℃ 5 s, 57℃ 34 s, 40 个循环;95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。以基因 GAPDH 为内参,以生理盐水对照组为基准,通过处理组目的基因与内参基因的 Ct 差值($\Delta\text{Ct}_{\text{处理}}$)减去对照组目的基因与内参基因的 Ct 差值($\Delta\text{Ct}_{\text{对照}}$),得出 $\Delta\Delta\text{Ct}$,然后以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值计算目的基因 mRNA 表达相对量。引物序列见表 1。

表1 RT-PCR分析的引物序列
Table 1 RT-PCR primer sequences

基因名称	正向 (5'-3')	反向 (5'-3')
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTG	TGTAGACCATGTAGTTGAAGGTCA
Col1a2	AGCGCTTCTTGATGAGAAA	ACGTCGTAGTTCAAGGCTGCT
α -SMA	ACTACTGCCGAGCGTGAGAT	CCAATGAAAGATGGCTGGAA

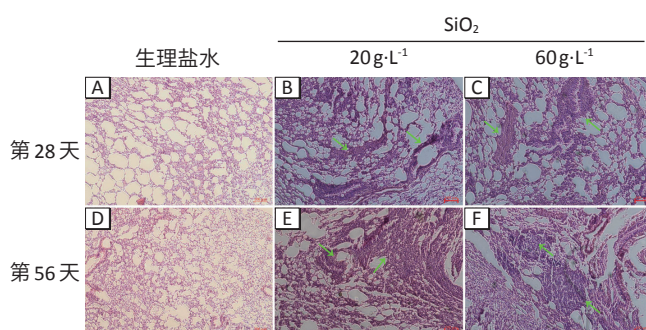
1.4 统计学分析

采用SPSS 19.0进行分析,使用 $\bar{x}\pm s$ 描述,组间差异采用单因素方差分析和LSD检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 小鼠肺组织形态学变化

光镜下观察HE染色的切片结果(图1):生理盐水对照组组织结构完整,肺泡间隔均匀,无间质纤维组织增生。20 g·L⁻¹和60 g·L⁻¹两组小鼠染尘第28天时,肺部结构被破坏,肺间质和肺泡内有大量的细胞浸润;当染尘到第56天时,小鼠肺部炎性细胞有所减少,血管壁增厚,形成明显的纤维结节。



[注] 图A和D为盐水对照组,图B、C、E、F为SiO₂染尘组,绿色箭头代表肺部产生的纤维化效应。

图1 小鼠肺组织 HE 染色结果

Figure 1 HE staining results of lung tissues of mice

2.2 肺组织中炎症因子水平的变化

炎症因子检测结果显示(图2):空白对照组小鼠肺组织中,TGF- β 、FGF和TNF- α 含量分别是1.09、3.63、3.13 ng·g⁻¹,与空白对照组相比,生理盐水组小鼠在第28天和第56天时肺组织中3种炎症因子的含量均无明显变化($P>0.05$);20 g·L⁻¹和60 g·L⁻¹染尘组小鼠在染尘至第56天时,TGF- β 、FGF、TNF- α 含量分别是3.42、3.62 ng·g⁻¹,15.20、19.78 ng·g⁻¹和9.02、11.30 ng·g⁻¹,较生理盐水组均有增高,差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.3 血清中氧化应激水平指标的变化

氧化应激因子检测结果显示(图3):空白对照组小鼠血清中,MDA、ROS和SOD的水平分别是0.19 μ mol·L⁻¹、7 U·L⁻¹和0.58 μ g·L⁻¹;与空白对照组相比,

在第28、56天时生理盐水组小鼠血清中上述3种因子水平均无明显变化($P>0.05$);20 g·L⁻¹染尘组小鼠在染尘第28、56天时,MDA浓度为0.23、0.26 μ mol·L⁻¹,ROS水平均为11、11 U·L⁻¹,SOD质量浓度为0.43、0.44 μ g·L⁻¹;60 g·L⁻¹染尘组小鼠在染尘第28、56天时,MDA浓度为0.28、0.34 μ mol·L⁻¹,ROS水平为13、14 U·L⁻¹,SOD质量浓度为0.38、0.36 μ g·L⁻¹;在染尘第28、56天时,两个染尘组小鼠血清中MDA、ROS水平增加,SOD水平下降,与生理盐水组相比差异均有统计学意义($P<0.05$)。

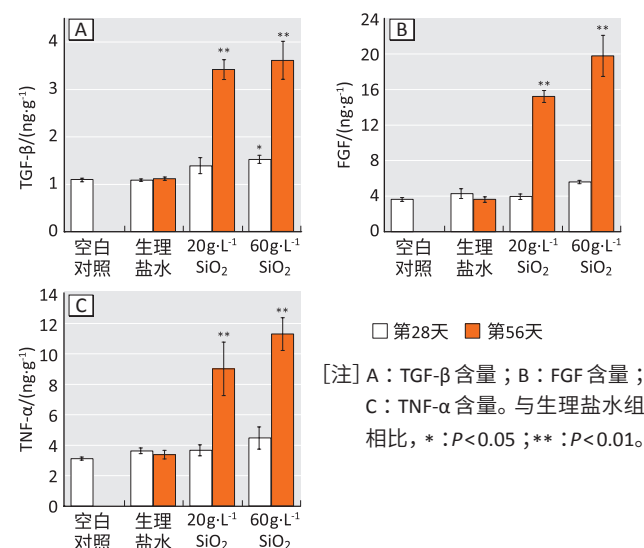


图2 小鼠肺组织炎症因子检测结果

Figure 2 Inflammatory factor levels in lung tissues of mice

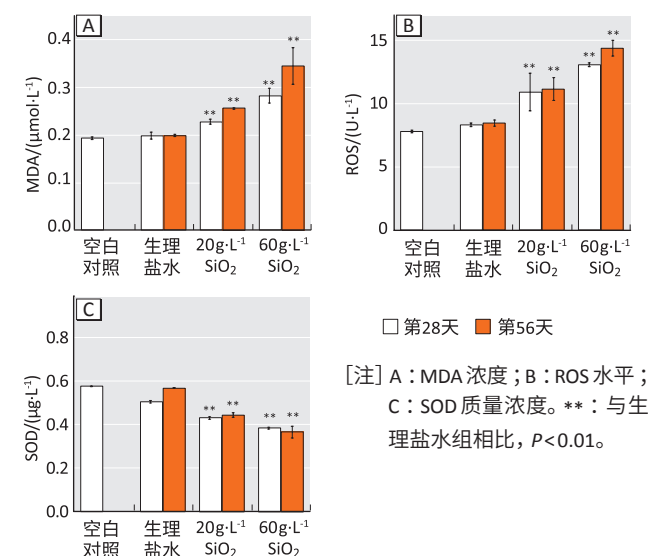


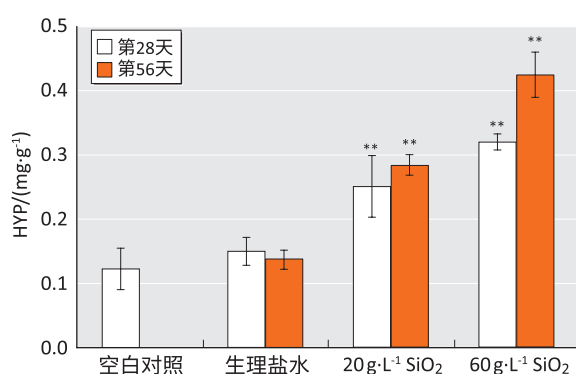
图3 小鼠血清中氧化应激因子检测结果

Figure 3 Oxidative stress factor levels in serum of mice

2.4 肺组织中胶原含量的变化

如图4所示:在第28、56天时,生理盐水组小鼠肺组织羟脯氨酸含量均为0.15 mg·g⁻¹,与空白对照组

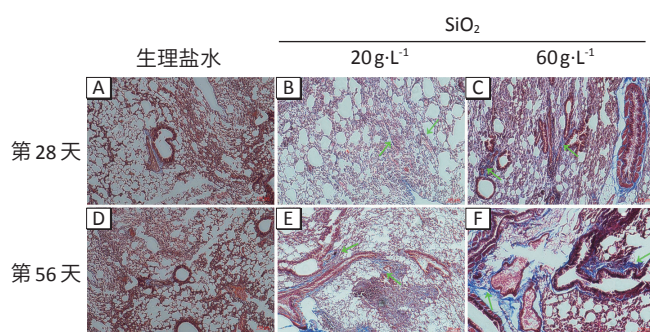
($0.12 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 相比无差异 ($P > 0.05$) ; 在染尘第 28、56 天时, $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 染尘组小鼠, 羟脯氨酸含量为 0.25 、 $0.28 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 染尘组为 0.32 、 $0.43 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 较生理盐水对照组增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。如图 5 所示: Masson 染色可将胶原纤维染成蓝色, 肌纤维染成红色, 随着纤维化进程加重, 胶原纤维累积; 生理盐水组有少量蓝色, SiO_2 染尘组明显比生理盐水组蓝色范围更加广阔。通过检测基因表达量可知 (图 6): 相较于生理盐水组, $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 染尘组小鼠在第 28 天时, *Col1a2* 和 $\alpha\text{-SMA}$ 基因表达量分别上升至 1.62 倍和 2.05 倍; 在第 56 天时, 上升至 3.08 倍和 3.34 倍。



[注] **: 与生理盐水组相比, $P < 0.01$ 。

图 4 小鼠肺组织中羟脯氨酸含量检测结果

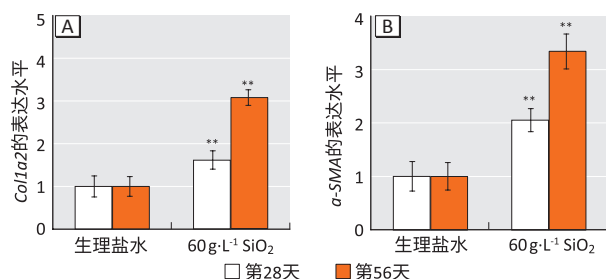
Figure 4 Hydroxyproline levels in lung tissues of mice



[注] 图 A 和 D 为盐水对照组, 图 B、C、E、F 为 SiO_2 染尘组; 绿色箭头代表肺部胶原纤维增多。

图 5 小鼠肺组织 Masson 染色结果

Figure 5 Masson staining results of lung tissues of mice



[注] **: 与生理盐水组相比, $P < 0.01$ 。

图 6 肺组织中 *Col1a2* (A) 和 $\alpha\text{-SMA}$ (B) 基因 mRNA 表达水平
Figure 6 mRNA expression levels of *Col1a2* (A) and $\alpha\text{-SMA}$ (B) in lung tissues of mice

3 讨论

本研究的结果表明, 在小鼠染尘后肺组织出现了纤维化的特征。染尘组小鼠肺组织中出现了血管壁增厚现象, 肺部形成了纤维结节; 随着染尘时间的延长, 炎症因子和氧化应激因子的含量出现不同程度的增加; 羟脯氨酸含量的增加表明肺组织中积累过量 SiO_2 后可导致肺部胶原纤维增多; $\alpha\text{-SMA}$ 和 *Col1a2* 基因表达水平明显升高, Masson 染色显示染尘组的小鼠肺组织中染蓝区域增多, 同样说明肺组织中出现了胶原纤维增多的现象。以上结果可以看出, 小鼠肺内 SiO_2 染尘可导致肺组织出现纤维化的症状。

本实验研究结果显示, 小鼠染尘进行到第 56 天时, $\text{TGF-}\beta$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 、FGF 含量均随着 SiO_2 浓度增加而增加, 说明 SiO_2 在小鼠肺部沉积能够引发明显的炎症反应; 而染尘至第 28 天时, 仅有高浓度染尘组小鼠 $\text{TGF-}\beta$ 略有升高。有研究显示尘肺病患者在病理学上的最初表现为肺泡炎症, 此时大量炎性细胞向肺内浸润活化, 释放多种具有生物活性的细胞因子^[10]; 也有研究将尘肺病的发展过程分为正常期、炎症期、进展期和纤维化期四个时期^[11]。在本实验小鼠染尘至第 28 天时可能正处于纤维化的诱发阶段, 故而出现上述结果。从实验结果可判断染尘至第 56 天时小鼠肺组织局部已经形成了纤维化, 3 种细胞因子的含量均增加, 说明这 3 种因子在纤维化的形成过程中可能都发挥了重要的功能。有研究人员同样发现在 SiO_2 染尘大鼠肺纤维化进程中 $\text{TGF-}\beta$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 、FGF 等细胞因子水平明显增加^[3]。这些结果均表明, 炎症反应在尘肺病发生发展过程具有非常重要的作用, 免疫反应分泌的炎症因子对后续肺纤维化可能起到了重要的促进效应。

除了炎症反应之外, 氧化应激反应也参与了肺纤维化的过程^[12]。本实验研究结果表明, 当 SiO_2 在肺部累积刺激肺组织产生氧化应激因子, ROS 随着纤维化进程最高提升至近 2 倍; 小鼠染尘后 MDA 提高到 1.78 倍, SOD 含量最多降低了 38%。正常的肺稳态需要细胞内外氧化物和抗氧化物的平衡, 自由基在尘肺病患者肺部积累引起自由基对机体长期、反复的损害, 促进肺纤维化的形成^[13]。有研究表明, 小鼠血清中 MDA 含量的升高加重了氧自由基对机体的损害; 而 SOD 水平随着染尘时间延长而降低, 意味着小鼠肺组织纤维化程度加深, 体内清除氧自由基能力减弱^[14]。也是学者发现随着慢性阻塞性肺疾病患者病情的加重, 机体

中出现了氧化应激反应^[15]。这些结果表明机体氧化应激失衡与肺纤维化的发生发展有着密切的关系。

本实验同时从 Masson 染色、羟脯氨酸含量变化和 α -SMA 和 *Col1a2* 基因表达水平的角度表明了 SiO₂ 的刺激会促使肺组织中胶原累积导致肺纤维化。肺纤维化组织中胶原蛋白、弹性蛋白和纤维连接蛋白等成分的聚集会促使胶原纤维的形成^[16]。也有研究表明,通过非气管暴露法灌注博来霉素可导致大鼠 α -SMA 的表达水平和胶原含量明显升高^[14]。

本研究发现,随着染尘时间的延长,炎症反应更剧烈,氧化应激反应持续增强,胶原累积量逐渐增多,这些因素异常升高对肺纤维化的进程起到了促进作用。从这三个角度出发研究 SiO₂ 致肺纤维化的生物学效应,可为尘肺病致病机理的理解和后期治疗提供一定的参考价值。

参考文献

- [1] 孙晴波, 林炳静, 徐寒梅, 等. 肺纤维化的发病机制及其治疗药物研究进展 [J]. 药学进展, 2018, 42 (11) : 868-873.
- [2] CHEN J, YAO Y, SU X, et al. Comparative RNA-Seq transcriptome analysis on silica induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice silicosis model [J]. J Appl Toxicol, 2018, 38 (5) : 773-782.
- [3] ZHAO H, JIANG Z, LV R, et al. Transcriptome profile analysis reveals a silica-induced immune response and fibrosis in a silicosis rat model [J]. Toxicol Lett, 2020, 333 : 42-48.
- [4] WYNN TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis [J]. J Exp Med, 2011, 208 (7) : 1339-1350.
- [5] ZHAN TW, TIAN YX, WANG Q, et al. Cangrelor alleviates pulmonary fibrosis by inhibiting GPR17-mediated inflammation in mice [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 62 (15) : 261-269.
- [6] YANG DX, QIU J, ZHOU HH, et al. Dihydroartemisinin alleviates oxidative stress in bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. Life Sci, 2018, 205 : 176-183.
- [7] MATSUZAWA Y, KAWASHIMA T, KUWABARA R, et al. Change in serum marker of oxidative stress in the progression of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2015, 32 : 1-6.
- [8] URBAN ML, MANENTI L, VAGLIO A. Fibrosis-a common pathway to organ injury and failure [J]. N Engl J Med, 2015, 373 (1) : 95-96.
- [9] BAPTISTA AL, PARRA ER, FILHO JV, et al. Structural features of epithelial remodeling in usual interstitial pneumonia histologic pattern [J]. Lung, 2006, 184 (4) : 239-244.
- [10] LIU T, DE LOS SANTOS FG, PHAN SH. The bleomycin model of pulmonary fibrosis [M] //RITTIÉ L. Fibrosis. New York, NY : Humana Press, 2017, 1627 : 27-42.
- [11] CAO Z, SONG M, LIU Y, et al. A novel pathophysiological classification of silicosis models provides some new insights into the progression of the disease [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2020, 202 : 110834.
- [12] FOIS AG, PALIOGIANNIS P, SOTGIA S, et al. Evaluation of oxidative stress biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis and therapeutic applications : A systematic review [J]. Respir Res, 2018, 19 (1) : 51.
- [13] FANG SC, GUO HF, CHENG YS, et al. CircHECTD1 promotes the silica-induced pulmonary endothelial-mesenchymal transition via HECTD1 [J]. Cell Death Dis, 2018, 9 (3) : 396.
- [14] LUO S, GONG J, CAO X, et al. Ligustilide modulates oxidative stress, apoptosis, and immunity to avoid pathological damages in bleomycin induced pulmonary fibrosis rats via inactivating TLR4/MyD88/NF-KB P65 [J]. Ann Transl Med, 2020, 8 (15) : 931.
- [15] WIEGMAN CH, LI F, RYFFEL B, et al. Oxidative stress in ozone-induced chronic lung inflammation and emphysema : a facet of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Front Immunol, 2020, 11 : 1957.
- [16] RAGHU G, COLLARD HR, EGAN JJ, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement : idiopathic pulmonary fibrosis : evidence-based guidelines for diagnosis and management [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183 (6) : 788-824.

(英文编辑 : 汪源 ; 责任编辑 : 丁瑾瑜)