

运动训练对小鼠矽肺纤维化的干预作用

靳馥宇, 王晓菁, 刘文静, 李雅倩, 高学敏, 蔡文臣, 毛娜, 刘和亮

华北理工大学公共卫生学院, 河北 唐山 063200



DOI 10.11836/JEOM23076

摘要:

[背景] 尘肺病是我国最严重的职业病, 其中矽肺病占一半左右。运动训练作为肺康复训练的关键及核心对矽肺纤维化的干预作用尚不明确。

[目的] 探讨运动训练对矽肺小鼠的干预作用。

[方法] 将 40 只 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠随机分为 4 组, 每组 10 只, 实验分组为对照组、运动训练组、矽肺模型组和运动训练干预组。采用一次性气管灌注 50 μL 的 SiO_2 悬浊液 ($200 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 制备矽肺小鼠模型; 采用跑步机以 0° 倾斜角度, $12.3 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$, $60 \text{ min}\cdot\text{d}^{-1}$, $5 \text{ d}\cdot\text{周}^{-1}$, 共 4 周, 制备运动训练模型。采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察肺组织病理学形态; 采用 Van Gieson (VG) 染色观察肺组织胶原蛋白沉积; 采用免疫荧光染色检测 p-蛋白激酶 R 样内质网激酶 (PERK) 的表达; 采用免疫组织化学染色法检测细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 (p21) 和 p-p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38) 的表达; 采用免疫印迹法检测内质网应激信号主要因子 p-肌醇需求蛋白-1 α (p-IRE-1 α)、p-PERK、p-真核翻译启动因子-2 α (p-eIF-2 α), 衰老信号主要因子 p-p53、p21、p16, 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号主要因子 p-p38、p-细胞外调节蛋白激酶 (p-ERK)、p-应激活化蛋白激酶 (p-JNK) 的蛋白表达。

[结果] 小鼠经急性 SiO_2 暴露后, 小动物计算机断层扫描 (CT) 显示矽肺模型组肺组织呈现高密度阴影, 运动训练干预组中肺组织阴影面积较少。HE 结果显示矽肺模型组中肺组织矽结节面积占比为 $(18.67\pm 3.89)\%$, 运动训练干预组中肺组织矽结节面积占比降低至 $(8.78\pm 1.05)\%$, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。VG 结果显示矽肺模型组中肺组织胶原纤维面积占比为 $(10.37\pm 2.18)\%$, 运动训练干预组中肺组织胶原纤维面积占比降低至 $(4.35\pm 0.89)\%$, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。免疫荧光染色结果显示, 矽肺模型组肺组织中 p-PERK 在矽结节位置表达较高, 运动训练干预组肺组织中 p-PERK 表达减少。免疫组织化学染色结果显示, 矽肺模型组肺组织中 p21 和 p-p38 的表达增多, 运动训练干预组肺组织中 p21 和 p-p38 的表达减少。免疫印迹法结果显示, 与对照组相比较, 矽肺模型组肺组织中 p-IRE-1 α (0.11 ± 0.03)、p-PERK (0.95 ± 0.40)、p-eIF-2 α (3.53 ± 0.91)、p-p53 (1.78 ± 0.07)、p21 (1.98 ± 0.10)、p16 (1.26 ± 0.17)、p-p38 (0.41 ± 0.09)、p-ERK (0.42 ± 0.05) 和 p-JNK (3.20 ± 1.23) 蛋白表达水平平均上调 ($P<0.05$); 与矽肺模型组相比较, 运动训练干预组肺组织中, p-IRE-1 α (0.03 ± 0.01)、p-PERK (0.31 ± 0.12)、p-eIF-2 α (0.30 ± 0.06)、p-p53 (0.76 ± 0.08)、p21 (0.18 ± 0.11)、p16 (0.70 ± 0.24)、p-p38 (0.03 ± 0.00)、p-ERK (0.19 ± 0.03) 和 p-JNK (0.46 ± 0.21) 蛋白表达水平平均下调 ($P<0.05$)。

[结论] 运动训练可减轻矽肺小鼠肺纤维化, 抑制内质网应激信号、MAPK 信号和衰老信号的异常表达。

关键词: 运动训练; 矽肺; 肺纤维化; 内质网应激; 衰老

Intervention effect of physical exercise on silicotic mice JIN Fuyu, WANG Xiaojing, LIU Wenjing, LI Yaqian, GAO Xuemin, CAI Wenchen, MAO Na, LIU Heliang (School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063200, China)

Abstract:

[Background] Pneumoconiosis is the most serious occupational disease in China, and silicosis accounts for about half of it. Any intervention effect of physical exercise as the key and core of lung rehabilitation training on silicosis is still unclear.

[Objective] To explore potential intervention effect of physical exercise on silicotic mice.

[Methods] Forty SPF C57BL/6 male mice were randomly divided into four groups, 10 in each group, including a control group, a physical exercise group, a silicosis model group, and a silicosis

基金项目

国家自然科学基金 (82204006); 河北省自然科学基金 (H2022209039); 河北省高等学校科学技术研究项目 (QN2022007); 厦门医学院机能与临床转化福建省高校重点实验室开放课题 (XMMC-FCTM202203)

作者简介

靳馥宇 (1996—), 男, 博士生;
E-mail: fuyujinfy@163.com

通信作者

刘和亮, E-mail: liuheliang@ncst.edu.cn

作者中包含编委会成员 无

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2023-03-09

录用日期 2023-08-10

文章编号 2095-9982(2023)09-0997-08

中图分类号 R135.2

文献标志码 A

►引用

靳馥宇, 王晓菁, 刘文静, 等. 运动训练对小鼠矽肺纤维化的干预作用 [J]. 环境与职业医学, 2023, 40(9): 997-1004.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM23076

Funding

This study was funded.

Correspondence to

LIU Heliang, E-mail: liuheliang@ncst.edu.cn

Editorial Board Members' authorship No

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2023-03-09

Accepted 2023-08-10

► To cite

JIN Fuyu, WANG Xiaojing, LIU Wenjing, et al. Intervention effect of physical exercise on silicotic mice [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2023, 40(9): 997-1004.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM23076

model + physical exercise intervention group. Silicotic mouse model was established by using 50 μL SiO_2 suspension ($200 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). A treadmill was used to prepare mice receiving physical exercise at 0° inclination, $12.3 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$, $60 \text{ min}\cdot\text{d}^{-1}$, $5 \text{ d}\cdot\text{week}^{-1}$ for 4 weeks. Pathological morphology of lung tissues was evaluated after hematoxylin-eosin (HE) staining; deposition of collagen in lung tissues was evaluated after Van Gieson (VG) staining; expression of p-protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) was detected by immunofluorescence staining; expressions of cyclin dependent kinase inhibitors (p21) and p-p38 mitogen activated protein kinase (p38) were detected by immunohistochemistry. The protein expressions of endoplasmic reticulum stress signal factors [p-inositol-requiring enzyme-1 α (p-IRE-1 α), p-PERK, and p-eukaryotic initiation factor-2 α (p-eIF-2 α)], senescence signal factors (p-p53, p21, and p16), mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal factors [p-p38, p-extracellular regulated protein kinases (p-ERK), and p-stress-activated protein kinase (p-JNK)] were detected by Western blotting.

[Results] After designed acute SiO_2 exposure, the images of micro computed tomography (CT) showed high density shadows in lung tissues of the silicotic mice and less shadows in lung tissues of the physical exercise intervention mice. After HE staining, the proportions of silicotic nodule area in lung tissues was $(18.67\pm 3.89)\%$ in the silicosis model group, and significantly decreased to $(8.78\pm 1.05)\%$ in the silicosis model + physical exercise intervention group ($P < 0.05$). After VG staining, the proportion of collagen fiber area of lung tissues was $(10.37\pm 2.18)\%$ in the silicosis model group, and significantly decreased to $(4.35\pm 0.89)\%$ in the silicosis model + physical exercise intervention group ($P < 0.05$). The results of immunofluorescence staining showed that in the silicosis model group, the expression of p-PERK increased at the location of silicotic nodules, while in the silicotic model + physical exercise intervention group, the expression of p-PERK decreased. The immunohistochemical staining results showed that the expression of p21 and p-p38 increased in the lung tissues of the silicosis model group; the expression of p21 and p-p38 decreased in the lung tissues of the silicosis model + physical exercise intervention group. The results of Western blotting showed that compared with the control group, the expression levels of p-IRE-1 α (0.11 ± 0.03), p-PERK (0.95 ± 0.40), p-eIF-2 α (3.53 ± 0.91), p-p53 (1.78 ± 0.07), p21 (1.98 ± 0.10), p16 (1.26 ± 0.17), p-p38 (0.41 ± 0.09), p-ERK (0.42 ± 0.05), and p-JNK (3.20 ± 1.23) of the silicosis model group were all upregulated ($P < 0.05$). Compared with the silicosis model group, the expression levels of p-IRE-1 α (0.03 ± 0.01), p-PERK (0.31 ± 0.12), p-eIF-2 α (0.30 ± 0.06), p-p53 (0.76 ± 0.08), p21 (0.18 ± 0.11), p16 (0.70 ± 0.24), p-p38 (0.03 ± 0.00), p-ERK (0.19 ± 0.03), and p-JNK (0.46 ± 0.21) of the silicosis model + physical exercise intervention group were downregulated ($P < 0.05$).

[Conclusion] Physical exercise may alleviate pulmonary fibrosis in silicotic mice, and inhibit abnormal expressions of endoplasmic reticulum stress signal, MAPK signal, and senescent signal.

Keywords: physical exercise; silicosis; lung fibrosis; endoplasmic reticulum stress; senescence

职业性尘肺病是我国最严重的职业病,其中矽肺病占 40%左右,是尘肺中危害最严重的一种。其病因明确,可控可防,起病隐匿,病程长,治疗手段有限,给社会 and 患者本人造成了严重的经济负担^[1]。2020 年全国职业病危害现状统计调查显示,存在粉尘危害的企业占比 74.18%,接触粉尘的劳动者占比 47.40%^[2]。因此,虽然新发病例数呈逐年下降趋势,但是不断累积的职业性尘肺病群体仍是我国严重的公共卫生问题之一。

2020 年,国家卫健委下发了《关于开展基层医疗机构尘肺病康复站(康复点)试点工作的通知》,开启了尘肺病肺康复治疗的新里程,以最小的经济成本帮助患者正确认识疾病,延缓病情进展,从而减少医疗费用支出,提升生活质量,是尘肺病患者救治的关键^[3]。而运动训练是肺康复的关键所在,也是肺康复的核心^[3]。已有研究显示,暴露于环境颗粒物引起的肺部损伤模型中,运动训练可通过抑制丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、线粒体氧化应激水平和细胞凋亡,对肺组织起保护作用,还可以上调端粒酶逆转录酶和端粒酶的活性,从而抑制细胞衰老^[4-6]。课题组前期研究也发现, SiO_2 介导的内质网应激信号的活化介导了级联炎症反应和生长因子

分泌,能够驱动肺泡 II 型上皮细胞衰老,并通过 MAPK 介导成纤维细胞的增殖和向肌成纤维细胞分化,促进了矽结节的形成和细胞外基质的大量沉积,是矽肺纤维化发生、发展的重要机制^[7-9]。因此本研究拟建立矽肺小鼠模型,观察运动训练对矽肺纤维化的干预作用,为尘肺病肺康复治疗提供新的实验依据。

1 对象与方法

1.1 主要仪器和试剂

跑步机(SA101,中国赛昂斯);小动物计算机断层扫描(computer tomography, CT)(NEMO-II NMC-20,中国平生); SiO_2 粉尘(美国 Sigma);异氟烷(中国瑞沃德);苏木素-伊红(hematoxylin eosin, HE)染液和 Van Gieson(VG)染液(中国贝索);蛋白提取试剂盒(中国英文特);肌醇需求蛋白-1 α (inositol-requiring enzyme-1 α , IRE-1 α)(中国爱博泰克);p-IRE-1 α (英国 Abcam);蛋白激酶 R 样内质网激酶(protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)(中国华安);p-PERK(美国 Affinity);真核翻译启动因子-2 α (eukaryotic initiation factor 2 α , eIF-2 α)(中国爱博泰克);p-eIF-2 α (中国华安);p-p53(中国爱博泰克);细胞周期蛋白依赖

性激酶抑制剂(p21)(美国 BD); p16(中国爱博泰克); p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK/p38)(美国 BD); p-p38(美国 BD); 细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)(美国 BD); p-ERK(美国 BD); 应激活化蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK/JNK)(美国 BD); p-JNK(美国 BD); β -肌动蛋白(actin)(中国爱博泰克); 荧光二抗(美国 Novex); 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(美国 Cell Signaling); 组化二抗(中国中杉金桥); 免疫印迹二抗(美国 KPL); 增强型化学发光试剂(enhanced chemiluminescence, ECL)(中国庄盟)。

1.2 动物模型的建立

尘(矽)肺患者绝大多数为男性,本课题组前期研究结果也显示性别差异对矽肺病理进展无显著影响。因此本研究选择 8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, (25±5) g, 共 40 只进行研究^[7], 购于北京华阜康生物科技股份有限公司 [SCXY(京)2020-0004], 饲养于华北理工大学实验动物中心屏障实验室 [SYXK(冀)2020-007], 饲养温度为(22±2) °C, 昼夜交替, 自由食水。本实验经华北理工大学动物伦理委员会批准(SQ2022024), 符合动物伦理学要求。

1.3 小动物 CT 观察肺组织阴影面积

根据说明书的操作, 拍摄活体小鼠肺部的 CT 图像。将小鼠放入小动物仓中, 保持俯卧姿势, 并使用异氟烷持续麻醉小鼠, 小鼠体温保持在(34±2) °C。在此期间使用 PadCam 视频监控持续观察小鼠状态。使用 cruiser 1.7.4.0 软件采集数据, 使用 recon daemon 1.7.4.0 软件离线重建数据, 使用 avatar3 1.7.4.0 软件观察肺组织阴影面积。

1.3.1 预训练 小鼠在小鼠跑步机上以 0.2 km·h⁻¹, 15 min·d⁻¹, 45°倾斜角度的条件进行预训练, 共 3 d。然后行最大运动能力测试(maximal exercise running test, MERT): 5 min 热身(45°倾斜角度, 0.2 km·h⁻¹), 按每 2.5 min 增加 0.1 km·h⁻¹ 的频率增速, 至小鼠力竭(即 10 次电刺激后不再运动)^[10]。

1.3.2 正式训练 按照体重将小鼠随机分为 4 组: (1) 对照组(10 只), 气管灌注 50 μ L 的 0.9%氯化钠溶液, 饲养 4 周; (2) 运动训练组(10 只), 小鼠在跑步机上以 60% MERT 进行运动训练^[11](即 0°倾斜角度, 12.3 m·min⁻¹, 60 min·d⁻¹, 5 d·周⁻¹, 共 4 周); (3) 矽肺模型组(10 只), 一次性气管灌注 50 μ L 的 SiO₂(200 mg·mL⁻¹) 粉尘悬浊液饲养 4 周^[6]; (4) 运动训练干预组(10 只),

一次性气管灌注 50 μ L 的 SiO₂(200 mg·mL⁻¹) 粉尘悬浊液, 1 d 后在小鼠跑步机上以 60% MERT 进行运动训练(即 0°倾斜角度, 12.3 m·min⁻¹, 60 min·d⁻¹, 5 d·周⁻¹, 共 4 周)。4 周后, 戊巴比妥麻醉小鼠, 取出小鼠肺脏, 左侧肺叶用于形态学观察, 经 4%多聚甲醛固定 24 h, 常规脱水, 石蜡包埋后切片(4 μ m) 备用; 其余肺叶置于 -80 °C 冰箱冻存备用。

1.4 HE 染色观察肺组织病理形态

石蜡切片置于 60 °C 烤箱中烤片 6 h, 然后置于二甲苯 I 和 II 各 15 min, 无水乙醇 I 和 II 各 10 min, 90%乙醇 5 min, 80%乙醇 5 min, 70%乙醇 5 min, 最终置于自来水 15 min, 苏木素染液覆盖组织 3 min, 入 2%盐酸酒精分化液, 分化 10 s, 自来水中返蓝 15 min, 伊红染液覆盖组织 2 min, 依次入 90%乙醇 5 min, 无水乙醇 I 和 II 各 10 min, 二甲苯脱水透明 I 和 II 各 15 min, 中性树胶封片, 观察肺组织病理形态。

1.5 VG 染色观察肺组织胶原沉积

石蜡切片置于 60 °C 烤箱中烤片 6 h, 然后置于二甲苯 I 和 II 各 15 min, 无水乙醇 I 和 II 各 10 min, 90%乙醇 5 min, 80%乙醇 5 min, 70%乙醇 5 min, 最终置于自来水 15 min, 铁苏木素 A、B 混合(1:1)覆盖组织 3 min, 入 2%盐酸酒精分化液, 分化 1 min, 自来水中水化 10 min, VG 染液覆盖组织 10 min, 依次入 90%乙醇 5 min, 无水乙醇 I 和 II 各 10 min, 二甲苯脱水透明 I 和 II 各 15 min, 中性树胶封片, 观察肺组织胶原沉积。

1.6 免疫荧光染色观察 p-PERK 的阳性细胞染色

石蜡切片置于 60 °C 烤箱中烤片 6 h, 然后置于二甲苯 I 和 II 各 15 min, 无水乙醇 I 和 II 各 10 min, 90%乙醇 5 min, 80%乙醇 5 min, 70%乙醇 5 min, 最终置于自来水 15 min。将切片置于乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 修复液中, 采用高压修复 80 s 暴露抗原, 孵育一抗 p-PERK(稀释比为 1:100), 4 °C 孵育过夜, 次日用二抗驴抗鼠荧光素 5-异硫氰酸酯孵育组织, 置于 37 °C 恒温箱 90 min, DAPI 染核, 观察 p-PERK 的阳性细胞染色。

1.7 免疫组织化学染色观察 p21 和 p-p38 阳性细胞染色

石蜡切片置于 60 °C 烤箱中烤片 6 h, 然后置于二甲苯 I 和 II 各 15 min, 无水乙醇 I 和 II 各 10 min, 90%乙醇 5 min, 80%乙醇 5 min, 70%乙醇 5 min, 最终置于自来水 15 min, 将切片置于 EDTA 修复液中, 采用高压修复 80 s 暴露抗原, 内源性过氧化物酶阻断剂封闭切片 15 min, 孵育一抗 p21 和 p-p38(稀释比均为 1:200), 4 °C 孵育过夜, 次日用组化二抗 PV-6000 孵育组织,

置于 37 °C 恒温箱 40 min, 3, 3-二氨基苯联胺显色, 苏木素染核, 观察 p21 和 p-p38 阳性细胞染色。

1.8 免疫印迹法检测内质网应激信号因子、衰老信号因子和 MAPK 信号因子的蛋白表达水平

采用蛋白提取试剂盒提取肺组织总蛋白。取 30 mg 的肺组织置于 1.5 mL 离心管, 加入 300 μ L 总蛋白裂解液, 采用匀浆器充分研磨, 4 °C 离心机以转速 12 000 r·min⁻¹、离心半径 8.2 cm 离心 15 min, 提取上清液。二喹啉甲酸(bicin chonic acid, BCA)法测定蛋白浓度, 以每孔 15 μ g 的质量进行常规电泳及电转。一抗 IRE-1 α 、p-IRE-1 α 、PERK、p-PERK、eIF-2 α 、p-eIF-2 α 、p-p53、p21、p16、p38、p-p38、ERK、p-ERK、JNK、p-JNK 和 β -actin 稀释比均为 1:1 000, 4 °C 过夜; 二抗(1:5 000) 37 °C 孵育箱孵育 40 min, ECL 发光试剂盒显色。采用 Image-Pro-plus 6.0 图像处理软件对条带进行灰度值分析, 用目标蛋白与内参蛋白的比值进行蛋白相对表达量的分析。

1.9 统计学分析

所有实验均重复 3 次。采用 SPSS 20.0 统计分析软件进行统计学分析, 所有数据均以均数 $\pm$ 标准差表示, 多组间采用完全随机设计的单因素方差分析, 两两比较方差齐采用 LSD 检验, 方差不齐采用 Tamhane's 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 跑步训练减轻矽肺小鼠肺纤维化

小动物 CT 结果显示, 与对照组相比较, 运动训练组肺叶无差异, 而矽肺模型组肺叶发现高密度阴影, 主要分布于气管及支气管周围; 与矽肺模型组相比较, 运动训练干预组中, 肺叶的阴影较少且面积较小。结果见图 1。

HE 染色结果显示, 与对照组相比较, 运动训练组肺组织无差异, 而矽肺模型组肺组织中可见矽结节面积较大, 与矽肺模型组相比较, 运动训练干预组肺组织中, 矽结节面积较小, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。VG 染色结果显示, 与对照组相比较, 运动训练组肺组织无差异, 而矽肺模型组肺组织中胶原纤维面积增多, 与矽肺模型组肺组织相比, 运动训练干预组肺组织中胶原纤维面积减少, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结果见图 2 和表 1。

2.2 运动训练抑制矽肺小鼠内质网应激信号的表达

免疫荧光染色结果显示, 与对照组相比较, 运动训练组肺组织无差异, 而矽肺模型组肺组织中 p-PERK 表达较高, 且主要表达在矽结节区域, 运动训练干预

组肺组织中仅有少量 p-PERK 的表达。结果见图 3。

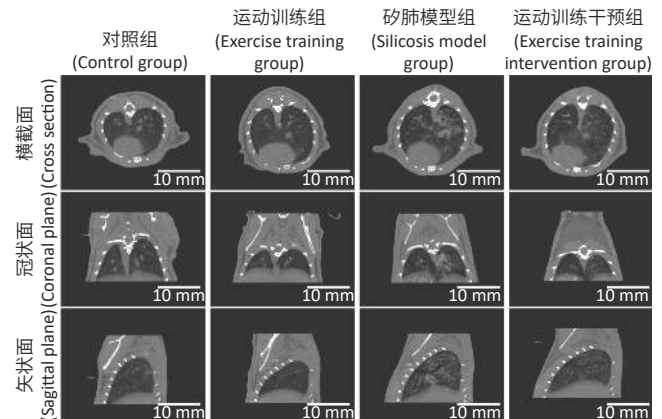
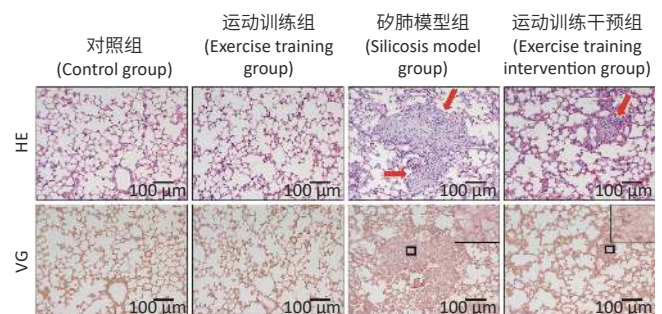


图 1 小动物 CT 观察活体小鼠矽肺纤维化进展
Figure 1 CT images of fibrosis progression in living mice



[注] 红色箭头指向矽结节, 黑色长方形内红色为胶原纤维。

[Note] The red arrow points to a silicotic nodule, and the black rectangle in the picture shows collagen fibers in red.

图 2 运动训练对矽肺小鼠肺组织形态学和胶原沉积的影响 (20 $\times$)

Figure 2 Effects of physical exercise on morphology and collagen deposition in silicotic mice (20 $\times$)

表 1 运动训练减缓小鼠矽肺纤维化进展和抑制矽肺小鼠胶原纤维沉积 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Progression of silicosis fibrosis in mice slowed down and collagen fiber deposition in silicotic mice inhibited by physical exercise ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

组别(Group)	矽结节面积占比(Proportions of silicotic nodule area in lung tissues)/%	胶原纤维沉积面积占比 (Proportion of collagen fiber area in lung tissues)/%
对照组(Control group)	0.00 $\pm$ 0.00	0.93 $\pm$ 0.39
运动训练组(Physical exercise group)	0.00 $\pm$ 0.00	1.07 $\pm$ 0.51
矽肺模型组(Silicosis model group)	18.67 $\pm$ 3.89 ^a	10.37 $\pm$ 2.18 ^a
运动训练干预组 (Physical exercise intervention group)	8.78 $\pm$ 1.05 ^b	4.35 $\pm$ 0.89 ^b
F	58.564	39.36
P	<0.01	<0.01

[注] a: 与对照组相比, $P < 0.05$; b: 与矽肺模型组相比, $P < 0.05$ 。

[Note] a: Compared with the control group, $P < 0.05$; b: Compared with the silicosis model group, $P < 0.05$.

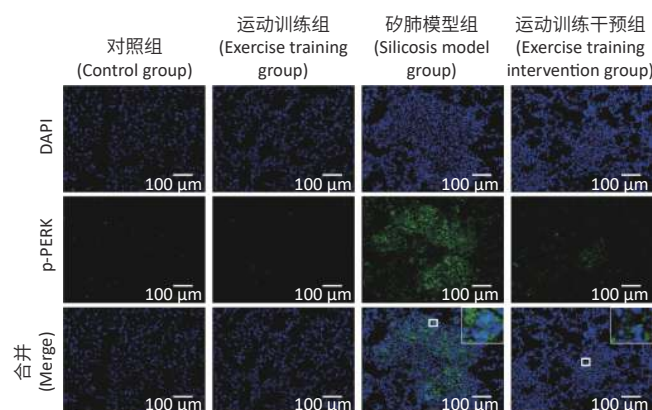
免疫印迹法结果显示, 与对照组相比较, 运动训练组肺组织无差异, 而矽肺模型组肺组织中内质网应激信号主要因子 p-IRE-1 α 、p-PERK 和 p-eIF-2 α 蛋白表

达水平上调($P < 0.05$);与矽肺模型组相比较,运动训练干预组肺组织中 p-IRE-1 α 、p-PERK 和 p-eIF-2 α 蛋白表达水平下调($P < 0.05$)。结果见图 4。

2.3 运动训练抑制矽肺小鼠衰老信号的表达

免疫组织化学染色结果显示,与对照组相比较,运动训练组肺组织无差异,矽肺模型组肺组织中 p21 表达较多,且主要表达在矽结节区域,运动训练干预组肺组织中 p21 的表达较少。结果见图 5。

免疫印迹法结果显示,与对照组相比较,运动训练组肺组织无差异,而矽肺模型组肺组织中衰老信号主要因子 p-p53、p21 和 p16 蛋白表达水平上调($P < 0.05$);与矽肺模型组相比较,运动训练干预组肺组织中 p-p53、p21 和 p16 蛋白表达水平下调($P < 0.05$)。结果见图 6。

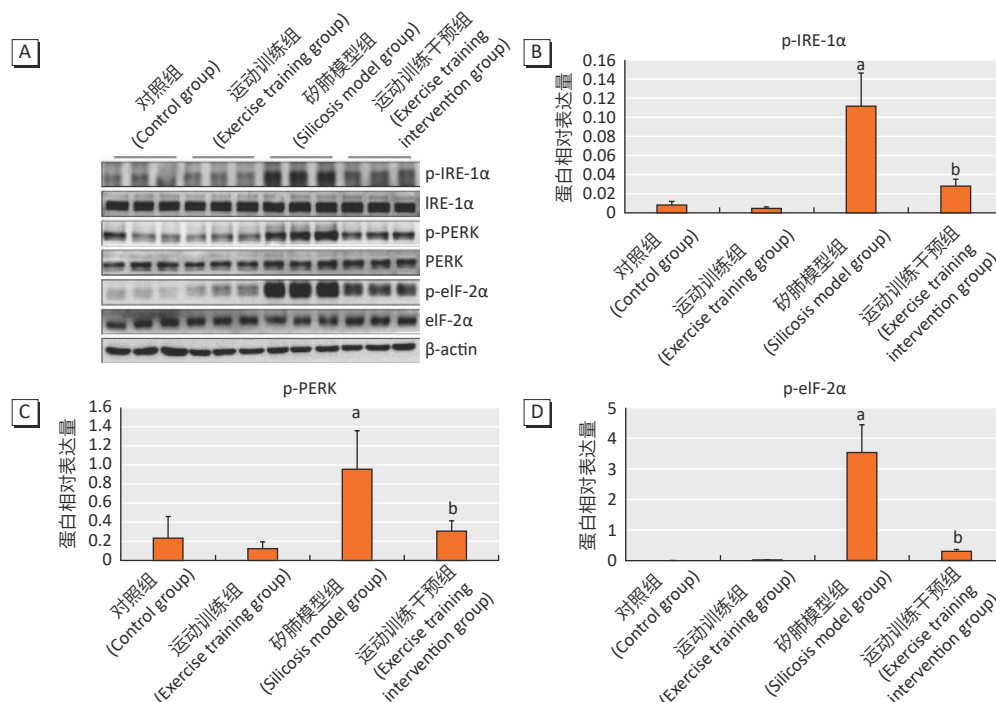


[注] 图中白色长方形内为共表达阳性细胞。

[Note] The white rectangle in the figure shows co-expression positive cells.

图 3 运动训练对矽肺小鼠肺组织 p-PERK 荧光表达的影响 (20 $\times$)

Figure 3 Effect of physical exercise on p-PERK fluorescence expression in silicotic mice (20 $\times$)

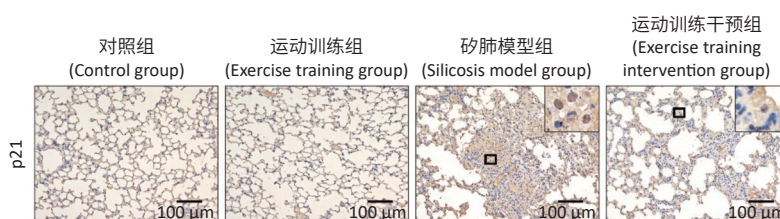


[注] A 为蛋白电泳图。B—D 分别为 p-IRE-1 α 、p-PERK、p-eIF-2 α 的蛋白相对表达量。a: 与对照组相比, $P < 0.05$; b: 与矽肺模型组相比, $P < 0.05$ 。

[Note] A: Protein electrophoresis map. B-D: Relative protein expression levels of p-IRE-1 α , p-PERK, and p-eIF-2 α , respectively. a: Compared with the control group, $P < 0.05$; b: Compared with the silicosis model group, $P < 0.05$.

图 4 运动训练对矽肺小鼠肺组织 p-IRE-1 α 、p-PERK、p-eIF-2 α 蛋白表达的影响

Figure 4 Effects of physical exercise on protein expressions of p-IRE-1 α , p-PERK, and p-eIF-2 α in silicotic mice

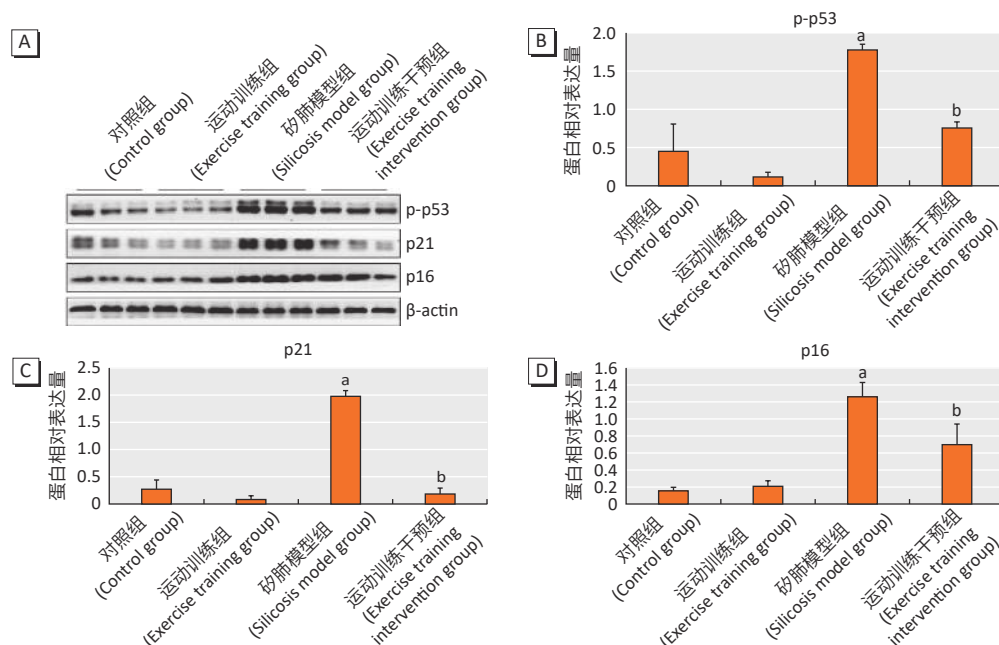


[注] 图中黑色长方形内为细胞阳性染色。

[Note] The black rectangle shows positive staining of cells.

图 5 运动训练对矽肺小鼠肺组织 p21 表达的影响 (20 $\times$)

Figure 5 Effect of physical exercise on p21 expression in silicotic mice (20 $\times$)



[注] A 为蛋白电泳图。B—D 分别为 p-p53、p21、p16 的蛋白相对表达量。a: 与对照组相比, $P < 0.05$; b: 与矽肺模型组相比, $P < 0.05$ 。

[Note] A: Protein electrophoresis map. B-D: Relative protein expression levels of p-p53, p21, and p16, respectively. a: Compared with the control group, $P < 0.05$; b: Compared with the silicosis model group, $P < 0.05$.

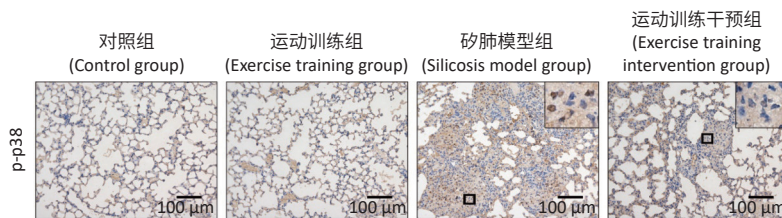
图 6 运动训练对矽肺小鼠肺组织 p-p53、p21、p16 蛋白表达的影响

Figure 6 Effects of physical exercise on protein expressions of p-p53, p21, and p16 in silicotic mice

2.4 运动训练抑制矽肺小鼠 MAPK 信号的表达

免疫组织化学染色结果显示,与对照组相比较,运动训练组肺组织无差异,矽肺模型组肺组织中 p-p38 表达较多,且主要表达在矽结节区域,而运动训练干预组肺组织中,仅有少量 p-p38 的表达。结果见图 7。

免疫印迹法结果显示,与对照组相比较,运动训练组肺组织无差异,而矽肺模型组肺组织中 MAPK 信号主要因子 p-ERK、p-p38 和 p-JNK 蛋白表达水平上调($P < 0.05$);与矽肺模型组相比较,运动训练干预组肺组织中 p-ERK、p-p38 和 p-JNK 蛋白表达水平下调($P < 0.05$)。结果见图 8。

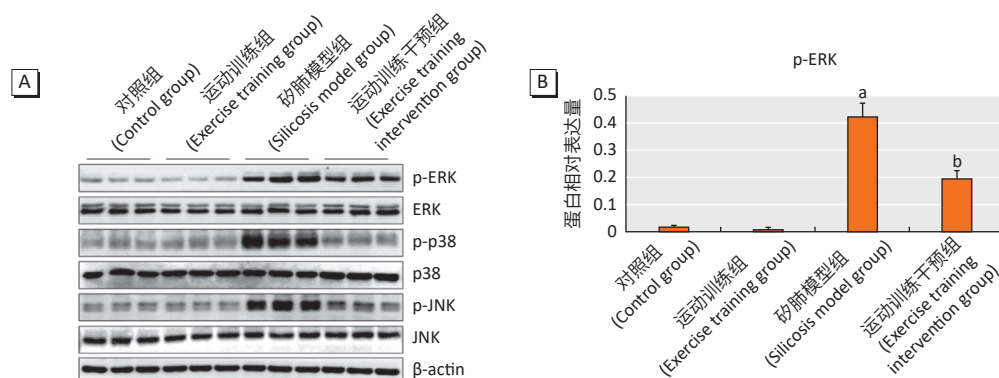


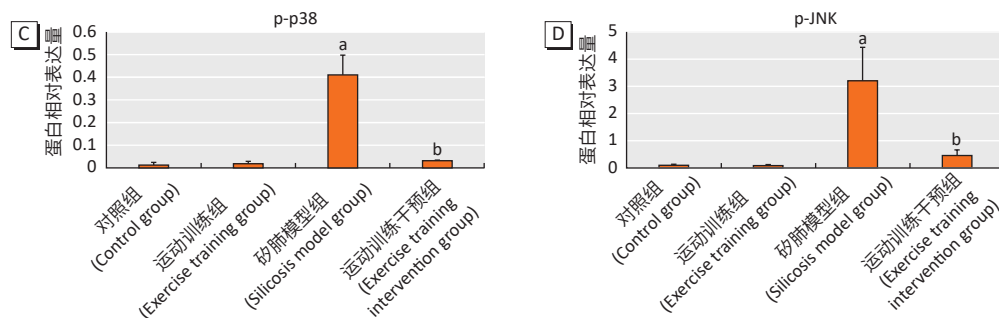
[注] 图中黑色长方形内为细胞阳性染色。

[Note] The black rectangle shows positive staining of cells.

图 7 运动训练对矽肺小鼠肺组织 p-p38 表达的影响 (20×)

Figure 7 Effect of physical exercise on p-p38 expression in silicotic mice (20×)





[注] A 为蛋白电泳图。B-D 分别为 p-ERK、p-p38、p-JNK 的蛋白相对表达量。a: 与对照组相比, $P < 0.05$; b: 与矽肺模型组相比, $P < 0.05$ 。

[Note] A: Protein electrophoresis map. B-D: Relative protein expression levels of p-ERK, p-p38, p-JNK, respectively. a: Compared with the control group, $P < 0.05$; b: Compared with the silicosis model group, $P < 0.05$.

图 8 运动训练对矽肺小鼠肺组织 p-ERK、p-p38、p-JNK 蛋白表达的影响

Figure 8 Effects of physical exercise on protein expressions of p-ERK, p-p38, and p-JNK in silicotic mice

3 讨论

长期吸入游离性 SiO_2 导致巨噬细胞活化、肺泡 II 型上皮异常增殖肥大、肺泡 I 型上皮细胞和内皮细胞凋亡, 以及成纤维细胞增殖和向肌成纤维细胞分化, 最终导致矽结节形成和弥漫性肺间质纤维化, 是矽肺纤维化发生、发展的主要病理变化^[1,12]。巨噬细胞内质网应激信号的活化^[7]、肺泡 II 型上皮细胞衰老^[8]和 MAPK 信号介导的成纤维细胞增殖和肌成纤维细胞分化^[9]则是矽肺纤维化重要的病理生理学机制。

内质网中未折叠蛋白的积聚引起内质网应激, 磷酸化 PERK 进一步使其下游蛋白 eIF-2 α 磷酸化, 致细胞周期停滞, 促进细胞凋亡, 并介导整合应激反应, 是促进线粒体功能障碍和衰老的重要因素, 也是肺纤维化的进展的重要驱动因素^[13-14]。本研究结果也显示, 染尘小鼠肺组织内 p-IRE-1 α 、p-PERK、p-eIF-2 α 蛋白水平上调, 衰老信号相关指标 p-p53、p21 和 p16 蛋白水平也上调, 伴随着矽结节形成和细胞外基质沉积, 提示内质网应激信号和衰老信号的活化可能参与了实验性矽肺纤维化进展。其他研究中, 人支气管上皮细胞 Toll 样受体信号和内质网应激信号的活化能够激活 p38 MAPK 和 ERK 信号, 促进白介素-6 和白介素-8 的生成, 药理性干预激酶活性能够显著抑制这种协同促炎效应^[15]。上述结果提示, 内质网应激、细胞衰老和 MAPK 信号的协同作用共同参与了矽肺纤维化的发生与发展, 其具体协同作用机制仍需进一步研究探讨。

虽然运动训练对肺部疾病患者的影响尚缺少大样本、高质量、长时间随访的实验研究。但多数研究认为, 肺康复运动训练对慢性肺疾病患者可能具有重要临床意义, 其完成度与 1 年全因死亡率关系密切, 因此无论从哪个方面来讲, 运动训练都值得推广, 且

早期干预可能更有益处^[16-17]。与无运动常规护理相比较, 无监督运动能够显著提高《圣乔治呼吸问卷》和《慢性呼吸疾病问卷》评分, 体现了运动训练对肺部疾病患者生活质量的临床益处^[18]。此外, 以运动训练为主的康复治疗可提高煤工尘肺患者的运动能力和耐力, 还可以改善其呼吸状况和肺健康, 减少疾病对生活的困扰, 提高生存质量^[19]。本研究中, 为了观察早期干预对小鼠矽肺纤维化形成的作用, 因此选择在染尘第一天后进行正式运动训练。其他研究也显示, 运动训练能够显著改善 $\text{PM}_{2.5}$ 引起的肺部炎症, 显著抑制肺毒性效应和肺损伤^[4]。有氧运动训练还能够降低 $\text{PM}_{2.5}$ 引起的肺炎症因子白介素-6 和肿瘤坏死因子- α 含量, 抑制线粒体自噬, 从而抑制 $\text{PM}_{2.5}$ 导致的肺氧化应激损伤、促炎效应和细胞凋亡^[5]。另外, 运动训练通过拮抗内质网应激损伤, 调节免疫应答从而拮抗细胞衰老, 从而改善老年性小鼠的代谢水平和代谢功能^[20-22]。有氧运动训练可通过调节 p-p38 和 p-ERK1/2 的表达水平恢复抗衰老蛋白的水平以及减弱氧化应激减轻衰老引起的心肌肥大^[23]。本研究显示, 运动训练减轻了矽肺小鼠肺组织病变程度, 延缓矽结节形成, 抑制胶原蛋白的沉积, 同时抑制了 SiO_2 介导的内质网应激损伤、细胞衰老和 MAPK 信号的异常激活。上述结果为尘肺病患者的肺康复治疗提供了新的依据和实验依据, 然而其作用机制仍需进一步研究探讨。

综上所述, 运动训练可减轻矽肺小鼠肺纤维化, 抑制内质网应激信号、MAPK 信号和衰老信号的异常表达。

参考文献

- [1] LI T, YANG X, XU H, et al. Early identification, accurate diagnosis, and treatment of silicosis[J]. Can Respir J, 2022, 2022: 3769134.
- [2] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 2020年我国卫生健康事业发展

- 统计公报 [EB/OL]. [2021.07.13]. <http://www.nhc.gov.cn/guihuaxxs/s10743/202107/af8a9c98453c4d9593e07895ae0493c8.shtml>
- National Health Commission of the People's Republic of China. Statistical Bulletin on the Development of China's Health Industry in 2020 [EB/OL]. [2021.07. 13]. <http://www.nhc.gov.cn/guihuaxxs/s10743/202107/af8a9c98453c4d9593e07895ae0493c8.shtml>
- [3] 中华预防医学会劳动卫生与职业病分会职业性肺病学组, 中华预防医学会煤炭系统分会职业病学组. 尘肺病康复中国专家共识(2022年版) [J]. *环境与职业医学*, 2022, 39(5): 574-588.
- Occupational Lung Disease Group of Labor Hygiene and Occupational Diseases Branch of Chinese Preventive Medicine Association, Occupational Diseases Group of Coal System Branch of Chinese Preventive Medicine Association. Consensus of Chinese experts on pulmonary rehabilitation of pneumoconiosis (2022) [J]. *J Environ Occup Med*, 2022, 39(5): 574-588.
- [4] QIN F, FAN Z, XU M, et al. Amelioration of ambient particulate matter (PM_{2.5})-induced lung injury in rats by aerobic exercise training [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 731594.
- [5] SO B, PARK J, JANG J, et al. Effect of aerobic exercise on oxidative stress and inflammatory response during particulate matter exposure in mouse lungs [J]. *Front Physiol*, 2022, 12: 773539.
- [6] DENHAM J, SELLAMI M. Exercise training increases telomerase reverse transcriptase gene expression and telomerase activity: A systematic review and meta-analysis [J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 70: 101411.
- [7] LI Y, CAI W, JIN F, et al. Thalidomide alleviates pulmonary fibrosis induced by silica in mice by inhibiting ER stress and the TLR4-NF- κ B pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5656.
- [8] LI T, YANG XY, XU DJ, et al. OC-STAMP overexpression drives lung alveolar epithelial cell type II senescence in silicosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 4158495.
- [9] XU H, YANG F, SUN Y, et al. A new antifibrotic target of Ac-SDKP: inhibition of myofibroblast differentiation in rat lung with silicosis [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40301.
- [10] ANDRADE-SOUSA AS, PEREIRA PR, MACKENZIE B, et al. Aerobic exercise attenuated bleomycin-induced lung fibrosis in Th2-dominant mice [J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0163420.
- [11] NEMMAR A, AL-SALAM S, YUVARAJU P, et al. Exercise training mitigates water pipe smoke exposure-induced pulmonary impairment via inhibiting NF- κ B and activating Nrf2 signalling pathways [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 7459612.
- [12] LI Y, JIN F, LI T, et al. Minute cellular nodules as early lesions in rats with silica exposure via inhalation [J]. *Vet Sci*, 2022, 9(6): 251.
- [13] EMANUELLI G, NASSEHZADEH-TABRIZ N, MORRELL NW, et al. The integrated stress response in pulmonary disease [J]. *Eur Respir Rev*, 2020, 29(157): 200184.
- [14] MANEVSKI M, MUTHUMALAGE T, DEVADOSS D, et al. Cellular stress responses and dysfunctional Mitochondrial-cellular senescence, and therapeutics in chronic respiratory diseases [J]. *Redox Biol*, 2020, 33: 101443.
- [15] MIJOŠEK V, LASITSCHKA F, WARTH A, et al. Endoplasmic reticulum stress is a danger signal promoting innate inflammatory responses in bronchial epithelial cells [J]. *J Innat Immun*, 2016, 8(5): 464-478.
- [16] SKLAR MC, GRIECO DL. Walk a mile in my shoes: assessing the importance of pulmonary rehabilitation in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Chest*, 2022, 161(3): 597-598.
- [17] NOLAN CM, POLGAR O, SCHOFIELD SJ, et al. Pulmonary rehabilitation in idiopathic pulmonary fibrosis and COPD: a propensity-matched real-world study [J]. *Chest*, 2022, 161(3): 728-737.
- [18] TAYLOR D, JENKINS AR, PARROTT K, et al. Efficacy of unsupervised exercise in adults with obstructive lung disease: a systematic review and meta-analysis [J]. *Thorax*, 2021, 76(6): 591-600.
- [19] 王苗苗, 张群, 云翔, 等. 运动训练干预对尘肺稳定期患者康复的作用 [J]. *中国康复医学杂志*, 2021, 36(5): 564-69.
- WANG MM, ZHANG Q, YUN X, et al. Effects of exercise training intervention on rehabilitation of patients with stable pneumoconiosis [J]. *J Rehabil Med*, 2021, 36(5): 564-69.
- [20] ARMSTRONG M, VOGIATZIS I. Personalized exercise training in chronic lung diseases [J]. *Respirology*, 2019, 24(9): 854-862.
- [21] RUAN L, LI F, LI S, et al. Effect of different exercise intensities on hepatocyte apoptosis in HFD-induced NAFLD in rats: the possible role of endoplasmic reticulum stress through the regulation of the IRE1/JNK and eIF2 α /CHOP signal pathways [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6378568.
- [22] YOON KJ, AHN A, PARK SH, et al. Exercise reduces metabolic burden while altering the immune system in aged mice [J]. *Aging*, 2021, 13(1): 1294-1313.
- [23] BAGHAIEE B, KARIMI P, SIAHKOUHIAN M, et al. Moderate aerobic exercise training decreases middle-aged induced pathologic cardiac hypertrophy by improving Klotho expression, MAPK signaling pathway and oxidative stress status in Wistar rats [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2018, 21(9): 911-919.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 汪源)