

· 论 著 ·

煤矿粉尘对大鼠白介素-6和let-7e的影响研究

李百春¹, 孙宇涵¹, 张慧芳^{1,2}, 路小婷^{1,2}, 宋静^{1,2}, 孔晓梅², 王林平^{1,2}

1.山西医科大学公共卫生学院, 山西 太原 030001; 2.国家卫生健康委员会尘肺病重点实验室, 山西 太原 030001

摘要: **目的** 探讨煤矿粉尘致大鼠白介素-6 (IL-6) 和let-7e的水平变化, 为煤工尘肺机制研究提供依据。**方法** 清洁级健康雄性SD大鼠64只, 随机纳入对照组、煤尘组、混合尘组和石英组。采用非暴露式气管灌注法, 对照组一次性给予生理盐水1 mL灌入气管, 各染尘组一次性给予粉尘悬浮液1 mL, 于染尘1个月和6个月后麻醉处死, 取大鼠肺组织进行苏木精-伊红染色, 采用Szapiel评分体系进行肺组织病理学评分; 采用酶联免疫吸附法检测肺泡灌洗液IL-6水平, 实时荧光定量PCR测定let-7e相对表达量。**结果** 染尘1个月, 煤尘组和混合尘组大鼠肺组织内均可见少量煤斑和炎性渗出; 石英组大鼠肺组织结构破坏, 肺泡间隔轻度纤维化增厚。染尘6个月, 煤尘组大鼠可见较多煤斑, 肺泡间隔轻度纤维化增厚; 混合尘组大鼠肺泡结构破坏, 肺间质纤维增生, 可见硅结节; 石英组大鼠肺泡结构明显破坏, 间质纤维增生显著, 可见硅结节。染尘时间和染尘类型交互影响肺组织病理学评分、IL-6水平和let-7e相对表达量 ($P<0.05$)。同一染尘类型内, 染尘6个月大鼠肺组织病理学评分和IL-6水平高于染尘1个月, let-7e相对表达量低于染尘1个月 (均 $P<0.05$); 同一染尘时间内, 各染尘组大鼠肺组织病理学评分和IL-6水平高于对照组, let-7e相对表达量低于对照组 (均 $P<0.05$)。**结论** 煤矿粉尘可引起大鼠IL-6水平升高和let-7e表达降低, 染尘类型与染尘时间可交互影响IL-6和let-7e水平。

关键词: 煤矿粉尘; 煤工尘肺; 白介素-6; let-7e

中图分类号: R135.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-5087 (2024) 02-0093-04

Effects of coal mine dust on interleukin-6 and let-7e in rats

LI Baichun¹, SUN Yuhan¹, ZHANG Huifang^{1,2}, LU Xiaoting^{1,2}, SONG Jing^{1,2}, KONG Xiaomei², WANG Linping^{1,2}

1.School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China;

2.Key Laboratory of Pneumoconiosis, National Health Commission, Taiyuan, Shanxi 030001, China

Abstract: Objective To investigate the changes in the levels of interleukin-6 (IL-6) and let-7e in rats induced by coal mine dust, so as to provide the basis for the mechanism of coal worker's pneumoconiosis (CWP). **Methods** Sixty-four clean and healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into the control group, coal dust group, mixed dust group (mixed coal and silica dust) and quartz group. The rats in the control group were exposed to 1 mL physiological saline by non-exposure tracheal perfusion, and the rats in the dust-exposed groups were exposed to 1 mL dust suspension. Rats were sacrificed by anesthesia after 1 month and 6 months, lung tissue was observed using hematoxylin-eosin staining, the pathological change in the lungs was scored using the Szapiel scoring system, the levels of IL-6 in the bronchoalveolar lavage fluid were detected using enzyme-linked immunosorbent assay, and the expression of let-7e was determined by quantitative real-time PCR. **Results** A month after exposure, a small amount of coal spots and inflammatory exudation were observed in the lung tissue of the coal dust group and the mixed dust group. The quartz group showed tissue structure destruction and mild fibrosis and thickening of alveolar septum. Six months after exposure, there were more coal spots and slightly thickened alveolar septum in the coal dust group, and hyperplasia of pulmonary interstitial fibers, destruction of alveolar structure and silica nodules were observed in the mixed dust group. In

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2024.02.001

基金项目: 国家卫生健康委员会尘肺重点实验室
(2020-PT320-005)

作者简介: 李百春, 硕士研究生在读, 公共卫生专业

通信作者: 王林平, E-mail: sxwlp5945@sxmu.edu.cn

the quartz group, the alveolar structure was obviously destroyed, the interstitial fiber proliferation was significant and silica nodules were seen. Two-factor analysis of variance showed that the interaction between duration of exposure and dust type significantly influenced the pathological score of lung tissue, IL-6 levels, and let-7e expression levels ($P<0.05$). Under the same dust type, the pathological score of lung tissue and IL-6 levels were higher at 6 months after exposure than at 1 month, while the relative expression of let-7e was lower at 6 months after exposure than at 1 month (all $P<0.05$). Under the same duration of exposure, the pathological score of lung tissue and IL-6 levels were higher in the dust-exposed groups than in the control group, while the relative expression of let-7e was lower in the dust-exposed groups than in the control group (all $P<0.05$). **Conclusions** Coal dust can cause an increase in levels of IL-6 and a decrease in let-7e expression in rats. The type of dust and duration of exposure can interactively affect IL-6 and let-7e.

Keywords: coal mine dust; coal worker's pneumoconiosis; interleukin-6; let-7e

据统计, 2021 年全国共报告各类职业病新病例 15 407 例, 其中职业性尘肺病 11 809 例, 占各类新发职业病的 76.65%; 其中主要为煤工尘肺^[1]。煤工尘肺是最主要的尘肺类型之一, 发病机制较复杂, 早期常出现炎症反应, 随时间推移, 肺组织逐渐发生弥漫性纤维化^[2-3]。白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 是一种炎症因子, 在各类炎症反应中起重要作用, 且可诱导成纤维细胞增殖^[2]。尘肺病患者血清 IL-6 水平高于正常人群^[3-4]。let-7e 是一种与肺纤维化有关的微 RNA (microRNA, miRNA), 可抑制巨噬细胞内炎症, 在特发性肺纤维化中起关键作用^[5-6]。本研究采用气道灌注法给予大鼠不同种类煤矿粉尘, 探讨煤工尘肺病变时 IL-6 和 let-7e 水平的变化, 为探索煤工尘肺机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

光学电子显微镜 (日本尼康公司); Spectra-MaxM2 型多功能酶联免疫检测仪 (美国 Molecular devices 公司); 荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司)。IL-6 检测试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司); Trizol Reagent (日本 TaKaRa 生物工程公司); 反转录试剂盒 (北京天根生物科技有限公司); 实时荧光定量 PCR 试剂盒 (北京天根生物科技有限公司); U6 引物 (广州复能基因公司)。煤矿粉尘均来自山西省煤矿且分散度一致, 包括煤尘 (游离 SiO₂ 含量 5%)、混合尘 (游离 SiO₂ 含量 30%) 和石英 (游离 SiO₂ 含量 99%), 混合尘指煤尘与石英混合; 粉尘经充分磨细后, 用生理盐水制备质量浓度 50 g/L 的粉尘悬浮液。

1.2 实验动物

64 只清洁级健康雄性 SD 大鼠来自北京华阜康公司, 体重 (200±10) g, 生产许可证号: SCXK

(京) 2019-0008。动物饲料来自山西医科大学动物房, 生产许可证号: SCXK (京) 2019-0010。饲养环境: 温度 21~26 ℃、相对湿度 40%~70%, 通风良好, 房间内无噪音。实验前适应性饲养 1 周。本研究通过山西医科大学实验动物福利伦理委员会审查, 审批号: SYDL2023023。

1.3 方法

1.3.1 动物分组与处理

大鼠随机分为对照组、煤尘组、混合尘组和石英组, 每组 16 只。乙醚麻醉后, 行非暴露式气管插管术, 对照组一次性给予生理盐水 1 mL 灌入气管, 煤尘组、混合尘组和石英组分别一次性给予相应的粉尘悬浮液 1 mL 灌入气管。染尘 1 个月和 6 个月后麻醉处死, 收集肺泡灌洗液并分离肺组织, -80 ℃保存。

1.3.2 肺组织病理学分析

采用 10% 福尔马林固定大鼠肺标本, 常规石蜡包埋、切片, 苏木精-伊红 (HE) 染色。采用 Szapiel 评分体系进行肺组织病理学评分, 反映肺组织病变情况。

1.3.3 IL-6 水平检测

采用 IL-6 酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒, 按照说明书步骤稀释标准品和肺泡灌洗液, 并设置空白对照。显色终止后, 使用酶标检测仪检测波长 450 nm 下各孔光密度值, 根据标准品的质量浓度和光密度值制作标准曲线, 计算肺泡灌洗液 IL-6 水平。

1.3.4 let-7e 相对表达量检测

采用实时荧光定量 PCR 检测肺组织 let-7e 相对表达量。称取 50 mg 肺组织加 1 mL Trizol Reagent, 振荡混匀, 按照说明书提取总 RNA, 采用 25 μL 反应体系, 37 ℃ 孵育 15 min, 进行 miRNA 加 Poly (A) 尾。20 μL 反转录体系, 42 ℃, 50 min; 85 ℃, 5 min, 合成 cDNA。20 μL 扩增体系, 95 ℃, 10 min; 95 ℃, 15 s; 60 ℃, 1 min, 35 个循环。

1.4 统计分析

采用 SPSS 25.0 软件统计分析。定量资料服从正态分布，采用均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 描述，组间比较采用两因素方差分析，单独效应分析采用简单效应检验，分析染尘时间和染尘类型对肺组织病理学评分、IL-6 水平和 let-7e 相对表达量的交互作用。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠基本情况

染尘过程中，大鼠未出现死亡。染尘 1 个月，各组大鼠饮食和活动均正常，皮毛色泽光滑。染尘 6

个月，对照组大鼠饮食和活动正常，各染尘组大鼠出现一定程度暴躁和消瘦现象。

2.2 大鼠肺组织病变情况比较

染尘 1 个月，对照组大鼠肺泡壁边缘清晰、结构完整；煤尘组和混合尘组大鼠肺组织内可见少量煤斑和炎性渗出；石英组大鼠肺组织结构破坏，肺泡间隔轻度纤维化增厚。染尘 6 个月，对照组中肺泡壁边缘清晰、结构完整；煤尘组大鼠肺组织内可见大量煤斑，肺泡间隔出现纤维化增厚；混合尘组大鼠肺泡结构破坏，肺间质纤维增生，间质可见硅结节；石英组大鼠肺泡结构明显破坏，间质纤维增生显著，可见硅结节。

表 1 不同染尘时间和染尘类型大鼠肺组织病理学评分、IL-6 和 let-7e 比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of pathological score of lung tissue, IL-6 levels and let-7e expression in rats with different types of dust and duration of exposure ($\bar{x}\pm s$)

组别	肺组织病理学评分		IL-6/ (ng/mL)		let-7e 相对表达量	
	染尘1个月	染尘6个月	染尘1个月	染尘6个月	染尘1个月	染尘6个月
对照组	0.35±0.06	0.33±0.05	32.94±0.64	33.18±0.30	1.00±0.00	1.00±0.00
煤尘组	1.05±0.06	1.58±0.10	33.88±0.10 ^①	35.33±0.58 ^{①②}	0.93±0.03 ^①	0.53±0.05 ^{①②}
混合尘组	1.23±0.05	2.08±0.10	34.62±0.84 ^①	37.59±0.42 ^{①②}	0.80±0.07 ^①	0.49±0.08 ^{①②}
石英组	1.65±0.06	2.90±0.08	35.92±0.66 ^①	39.89±0.53 ^{①②}	0.68±0.10 ^①	0.34±0.07 ^{①②}
F 值	116.167		35.609		36.600	
P 值	<0.001		<0.001		<0.001	

注：①表示在同时间点与对照组比较 $P<0.05$ ；②表示在同染尘类型组与染尘 1 个月比较 $P<0.05$ 。

2.3 大鼠肺组织病理学评分、IL-6 和 let-7e 水平比较

两因素方差分析显示，染尘时间和染尘类型的交互作用对肺组织病理学评分、IL-6 和 let-7e 水平有统计学意义 ($P<0.05$)，见表 1。简单效应分析结果显示，同一染尘类型内，与染尘 1 个月相比，染尘 6 个月大鼠肺组织病理学评分和 IL-6 水平较高，let-7e 相对表达量较低 (均 $P<0.05$)。同一染尘时间内，与对照组相比，各染尘组大鼠肺组织病理学评分和 IL-6 水平较高，let-7e 相对表达量较低 (均 $P<0.05$)。见表 2。

3 讨论

本研究采用非暴露式气管灌注法，将煤尘、混合尘和石英分别注入大鼠气管。研究发现，这 3 种粉尘可引起大鼠不同纤维化程度的病理改变，染尘时间和染尘类型对肺组织病理学评分、IL-6 和 let-7e 存在交互影响。

同一染尘类型内，与染尘 1 个月相比，染尘 6 个月大鼠肺组织病理学评分和 IL-6 水平较高，

表 2 染尘时间和染尘类型对大鼠肺组织病理学评分、IL-6 和 let-7e 的简单效应分析

Table 2 Simple effect analysis of type of dust and duration of exposure on pathological score of lung tissue, IL-6 levels and let-7e expression in rats

项目	肺组织病理学评分		IL-6 水平		let-7e 相对表达量	
	F 值	P 值	F 值	P 值	F 值	P 值
染尘时间/月						
1	234.458	<0.001	41.710	<0.001	47.537	<0.001
6	929.458	<0.001	220.029	<0.001	190.055	<0.001
组别						
对照组	0.250	0.622	0.749	0.391	<0.001	>0.999
煤尘组	110.250	<0.001	27.521	<0.001	118.628	<0.001
混合尘组	289.000	<0.001	115.960	<0.001	130.056	<0.001
石英组	625.000	<0.001	207.019	<0.001	179.873	<0.001

let-7e 相对表达量较低，与其他研究结果一致。蔡婷峰等^[7]研究发现，硅肺模型肺纤维化评分随染尘时间增加而增加。尹琴等^[8]发现，大鼠硅肺模型中 IL-6 水平在不同染尘时间上有差异，染尘处理与染尘时间交互影响 IL-6 水平。此外，有研究发现，在

脂多糖刺激下, let-7e 相对表达量呈下降趋势^[9], 提示染尘时间长的煤工尘肺大鼠炎症程度高。

在同一染尘时间内, 与对照组相比, 染尘组大鼠肺组织病理学评分和 IL-6 水平较高, let-7e 相对表达量较低; 变化程度由小到大依次为煤尘组、混合尘组和石英组。有研究表明, 不同岗位的煤矿工人接触的粉尘类型不同导致尘肺发病率不同, 石英组的病变程度高于煤尘组^[10-11]。ZHAI 等^[12] 研究发现煤工尘肺的纤维化程度越高, IL-6 水平越高。let-7e 与炎症密切相关, 在不同的生理和病理过程中是重要的调节因子^[13-14], 而煤工尘肺与炎症也密切相关^[15-16]。因此, 石英组 let-7e 相对表达量较低可能与煤矿工人接触游离 SiO₂ 引起炎症反应有关, 且炎症反应随游离 SiO₂ 浓度升高而加剧。本研究提示 IL-6 和 let-7e 水平可能与大鼠煤工尘肺病变有关, 但是否可以作为煤工尘肺的生物标志物仍需进一步的研究验证。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 2021 年我国卫生健康事业发展统计公报 [EB/OL]. [2024-01-05]. <http://www.nhc.gov.cn/guihuaxxs/s3586s/202207/51b55216c2154332a660157abf28b09d.shtml>.
- [2] MOODLEY Y P, SCAFFIDI A K, MISSO N L, et al. Fibroblasts isolated from normal lungs and those with idiopathic pulmonary fibrosis differ in interleukin-6/gp130-mediated cell signaling and proliferation [J]. *Am J Pathol*, 2003, 161 (1): 345-354.
- [3] 姚三巧, 杨宁伟, 郭菲菲, 等. Th1/Th2 细胞因子在暴露粉尘工人血清中的表达及在煤工尘肺监测中的价值 [J]. *中华预防医学杂志*, 2018, 52 (11): 1158-1163.
- [4] 张少峰, 李志恒, 王仲峰. 尘肺 96 例 IL-6、CRP、D-D、Fib 检测结果分析 [J]. *预防医学*, 2023, 35 (4): 320-322.
- [5] ELLIOT S, PERIERA-SIMON S, XIA X, et al. MicroRNA let-7 downregulates ligand-independent estrogen receptor-mediated male-predominant pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 200 (10): 1246-1257.
- [6] WU Y X, HE H Q, DING Y H, et al. MK2 mediates macrophage activation and acute lung injury by regulating let-7e miRNA [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 315 (3): 371-381.
- [7] 蔡婷峰, 宋向荣, 李宏玲, 等. 不同时间点大鼠矽肺模型病理改变观察 [J]. *中国职业医学*, 2020, 47 (4): 385-389.
- [8] 尹琴, 杨洁, 范存愈, 等. 化纤散结复方颗粒通过 PI3K/AKT/NF-κB 信号通路改善大鼠矽肺纤维化 [J]. *中国职业医学*, 2022, 49 (3): 272-279.
- [9] SWAIN T, DEEVER C M, LEWANDOWSKI A, et al. Lipopolysaccharide (LPS) induced inflammatory changes to differentially expressed miRNAs of the host inflammatory response [J/OL]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2021, 237 [2024-01-05]. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2021.110267>.
- [10] 乔俊华. 大鼠煤工尘肺动物模型的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2009.
- [11] 闫进德, 曹岩, 李翠兰, 等. 煤矿在职接尘工人煤工尘肺的发病情况 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2010, 28 (10): 783-785.
- [12] ZHAI R, LIU G, GE X, et al. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin 6 (IL-6), and their soluble receptors in coal workers' pneumoconiosis [J]. *Respir Med*, 2002, 96 (10): 829-834.
- [13] LIN Z W, GE J F, WANG Z, et al. Let-7e modulates the inflammatory response in vascular endothelial cells through ceRNA crosstalk [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7 [2024-01-05]. <https://doi.org/10.1038/srep42498>.
- [14] GUI L, ZHANG Q, CAI Y, et al. Effects of let-7e on LPS-stimulated THP-1 cells assessed by iTRAQ proteomic analysis [J/OL]. *Proteomics Clin Appl*, 2018, 12 (5) [2024-01-05]. <https://doi.org/10.1002/prca.201700012>.
- [15] ZHANG Y C, LIANG J J, CAO N D, et al. Coal dust nanoparticles induced pulmonary fibrosis by promoting inflammation and epithelial-mesenchymal transition via the NF-κB/NLRP3 pathway driven by IGF1/ROS-mediated AKT/GSK3β signals [J/OL]. *Cell Death Discov*, 2022, 8 (1) [2024-01-05]. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01291-z>.
- [16] QIAN Q, CAO X, WANG B, et al. TNF-α-TNFR signal pathway inhibits autophagy and promotes apoptosis of alveolar macrophages in coal worker's pneumoconiosis [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234 (5): 5953-5963.

收稿日期: 2023-09-04 修回日期: 2024-01-05 本文编辑: 刘婧出