

MSR1 对矽肺小鼠脂质蓄积和炎症因子分泌的影响研究

刘 艺¹, 李金城¹, 周昱慧¹, 何海兰¹, 郭灵丽^{1,2}, 郝小惠^{1,2}, 王宏丽^{1,2}, 刘和亮^{1,2}

摘要 目的 探究 A 类清道夫受体 1 (MSR1) 在矽肺小鼠肺组织内的表达及其在小鼠单核巨噬细胞 (RAW264.7) 中介导的炎症和脂质代谢的作用。方法 24 只 C57BL/6 雄性小鼠随机分为对照组、染毒 7 d 组、染毒 14 d 组和染毒 28 d 组, 每组 6 只。RAW264.7 细胞分为对照组、siRNA-MSR1 组、SiO₂ 组、siRNA-MSR1 + SiO₂ 刺激组。通过苏木精-伊红 (HE) 染色和 Van Gieson (VG) 染色观察小鼠肺组织病理变化; 油红 O 染色镜下观察脂质蓄积情况; 免疫组织化学染色 (IHC) 检测 MSR1 的表达以及定位; 免疫印迹法检测 MSR1、炎症因子肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、白介素 (IL)-6、IL-1 β 的表达。结果 与对照组相比, HE 和 VG 染色结果显示矽肺小鼠肺组织中炎性细胞聚集, 胶原分布增加; IHC 结果显示, 矽肺小鼠模型中 MSR1 的表达上调; 油红 O 染色结果显示小鼠肺组织出现大量橙红色脂滴; 免疫印迹结果显示, 与对照组比较, 矽肺小鼠肺组织中 MSR1、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 表达均上调 ($P < 0.05$)。与对照组比较, SiO₂ 细胞刺激组 MSR1 的表达上调, siRNA-MSR1 组的 MSR1 表达降低 ($P < 0.05$), SiO₂ 组细胞内出现橙红色脂滴, siRNA-MSR1 + SiO₂ 刺激组脂滴蓄积程度低于 SiO₂ 组 ($P < 0.01$); ELISA 结果显示 SiO₂ 细胞刺激组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 表达上调 ($P < 0.05$)。与 SiO₂ 组比较, siRNA-MSR1 + SiO₂ 刺激组的 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 表达下调 ($P < 0.05$)。结论 MSR1 参与了矽肺小鼠肺组织和细胞内脂质成分的调控及炎症因子的释放; 抑制 MSR1 的表达可以拮抗巨噬细胞的炎症反应和脂质异常蓄积。MSR1 可能是今后干预矽肺病程进展的潜在治疗靶点。

关键词 矽肺; 炎症反应; 脂质代谢; A 类清道夫受体; 巨噬细胞; MSR1

中图分类号 R 135.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)11-1928-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.021

矽肺是由于接尘工人长期吸入大量游离二氧化

硅粉尘引起的, 以矽结节的形成和弥漫性纤维化为主要病变的世界范围内严重的职业病^[1], 该疾病致死率高且尚无有效的治愈手段。因此, 开展矽肺的分子机制研究, 对完善矽肺治疗和提供干预措施有着重要的理论和现实意义^[2]。课题组前期研究^[3]表明, 矽肺患者巨噬细胞内发生脂滴沉积形成泡沫细胞。该研究表明巨噬细胞摄取脂质会增加转化生长因子的分泌, 从而促进肺纤维化进程。因此, 阻止巨噬细胞脂质摄取可能会减轻矽肺纤维化反应, 但其具体的调控机制还有待进一步探索。A 类清道夫受体 1 (macrophage scavenger receptor 1, MSR1) 在矽肺患者的巨噬细胞中, MSR1 的表达水平随着矽肺期别的增高而有增加趋势, 巨噬细胞对 SiO₂ 纳米颗粒的摄取和炎症因子的分泌因沉默 MSR1 而受到强烈抑制^[4], 但 MSR1 在矽肺脂质代谢和炎症反应中是否发挥了关键调控作用还不清楚。因此, 该研究拟在小鼠矽肺模型中探究 MSR1 发挥的具体作用, 并在巨噬细胞系小鼠单核巨噬细胞 (mouse mononuclear macrophages cells, RAW264.7) 中加以验证, 以期寻找矽肺干预和治疗的靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 (北京华阜康生物科技股份有限公司); RAW264.7 细胞 (美国 ScienCell 生物技术公司); DMEM 高糖培养基、胎牛血清 (FBS) (美国 Gibco 公司); 二氧化硅 (silicon dioxide, SiO₂) (粒径 0.5 ~ 10.0 μm) (美国 Sigma 公司); 兔多克隆抗体巨噬细胞 MSR1 (美国 ABclonal 公司); 兔多克隆抗体肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α (上海 Arigo 公司); 兔多克隆抗体白介素 (interleukin, IL)-1 β (美国 ABclonal 公司); 兔多克隆抗体 IL-6 (杭州华安公司); HRP 标记羊抗小鼠 IgG 二抗、HRP 标记羊抗兔 IgG 二抗、 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (英国 Abcam 公司); ECL 显色液 (北京普利莱公司); PV6000 通用型两步法免疫组化试剂 (北京中杉公司); 油红 O 染料 (美国 Sigma 公司); 化学发光成像系统 (XRS+, 美国 Bio-Rad 公司)。

2023-06-14 接收

基金项目: 河北省自然科学基金 (编号: H2022209021、H202220-9039); 河北省重点研发计划项目 (编号: 192777129D)

作者单位: ¹ 华北理工大学公共卫生学院, 唐山 063210

² 河北省器官纤维化重点实验室, 唐山 063210

作者简介: 刘 艺, 女, 硕士研究生;

刘和亮, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: tsruoshui@163.com

1.2 实验动物及分组 SPF级C57BL/6雄性小鼠24只,6~8周龄,20~25 g/只(北京华阜康生物科技股份有限公司)均在华北理工大学SPF级实验动物中心饲养,温度23℃,相对湿度45%~50%,昼夜交替12 h,自主饮水及进食,适应性喂养1周后进行试验。该研究经华北理工大学实验动物伦理委员会审查批准(SQ2022128)。随机分组为生理盐水对照组和SiO₂染毒组小鼠,每组各6只,采用一次性气管滴注法在小鼠气管内灌注50 μl 粒径为0.5~10.0 μm(100 mg/ml) SiO₂悬浊液制备矽肺小鼠模型,生理盐水对照组给予同样体积的生理盐水,在灌注后7、14、28 d取小鼠肺组织。

1.3 细胞培养和处理 小鼠巨噬细胞RAW264.7在37℃含5% CO₂的培养箱中用DMEM高糖培养基培养,细胞培养贴壁后,实验分组为:①对照组:10% FBS-DMEM高糖培养基培养;②SiO₂组:2% FBS-DMEM高糖+50 μg/ml的SiO₂混悬液培养;③siRNA-MSR1组:取对数生长期的RAW264.7细胞接种于6孔板,转染MSR1的小干扰RNA,用转染培养基进行培养;④siRNA-MSR1+SiO₂刺激组:转染24 h后加入SiO₂混悬液培养。

1.4 免疫组织化学染色 石蜡切片常规脱蜡至水,用枸橼酸钠缓冲液进行抗原修复,3% H₂O₂内源性过氧化物酶阻断剂常温孵育15 min,血清封闭后滴加兔抗MSR1(1:100),4℃暗盒过夜后滴加二抗37℃孵育30 min,DAB显色,苏木精染色30 s,脱水透明,中性树脂封片,显微镜下观察MSR1的表达。

1.5 免疫印迹法 提取肺组织和细胞蛋白,BCA试剂盒测定蛋白浓度,取15 μg蛋白进行电泳和转膜,一抗4℃过夜,二抗摇床孵育2 h。使用ECL发光试剂应用凝胶成像系统检测信号,计算目的蛋白

的相对表达量。

1.6 统计学处理 采用SPSS 20.0软件进行统计学分析。对于计量资料若符合正态分布或近似正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD法。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 矽肺小鼠模型的成功建立 HE染色结果显示,对照组小鼠肺组织结构正常,肺泡结构完整;染毒7 d组小鼠肺组织结构轻微破坏;染毒14 d组小鼠肺泡结构有破坏,出现炎细胞聚集;染毒28 d组小鼠肺组织内有大量炎细胞浸润,肺泡壁增厚,形成以巨噬细胞和成纤维细胞为主的细胞结节。VG染色结果显示,对照组小鼠肺泡结构完整,间质未见胶原沉积;随着染毒时间的延长,胶原分布明显增多,形成细胞性结节,肺组织发生纤维化病变,与HE结果保持一致,矽肺小鼠模型建立成功。见图1。

2.2 小鼠模型肺组织脂质蓄积 油红O染色结果如图2所示,染毒组小鼠肺组织出现橙红色脂滴,随着染毒时间的延长,肺组织脂滴蓄积情况逐渐加重。与对照组比较,染毒28 d组小鼠肺组织橙红色脂滴颗粒蓄积更明显。

2.3 小鼠模型肺组织炎症反应 Western blot结果如图3所示,与对照组比较,染毒7 d组和染毒14 d组的TNF- α 的表达升高($P<0.05$),而染毒28 d组显著升高($P<0.01$);IL-6的表达变化与TNF- α 相似,随着染毒时间的延长,IL-6的表达持续升高;IL-1 β 在染毒组小鼠肺组织中表达上调,与对照组比较,染毒28 d组IL-1 β 的表达差异有统计学意义($P<0.01$)。

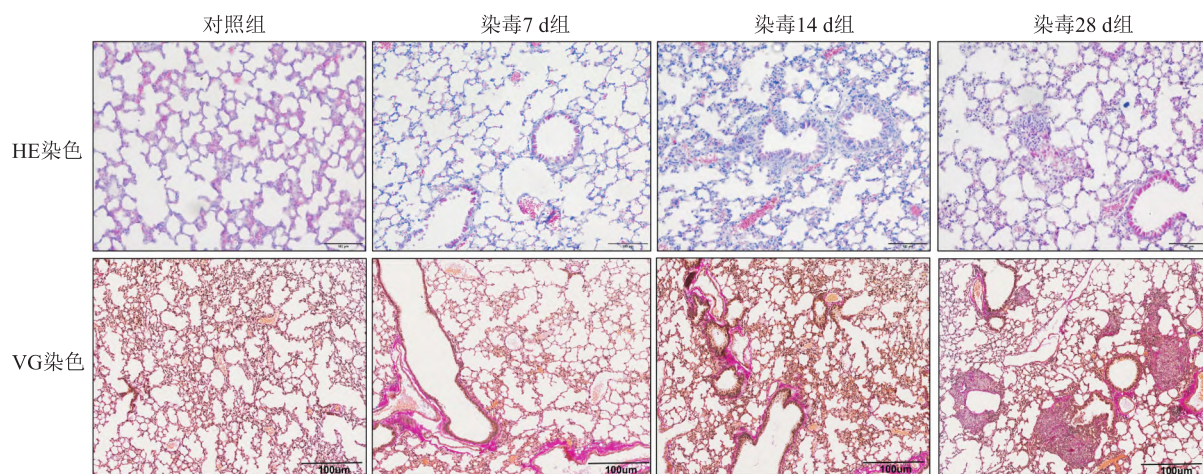


图1 小鼠肺组织病理学染色 ×200

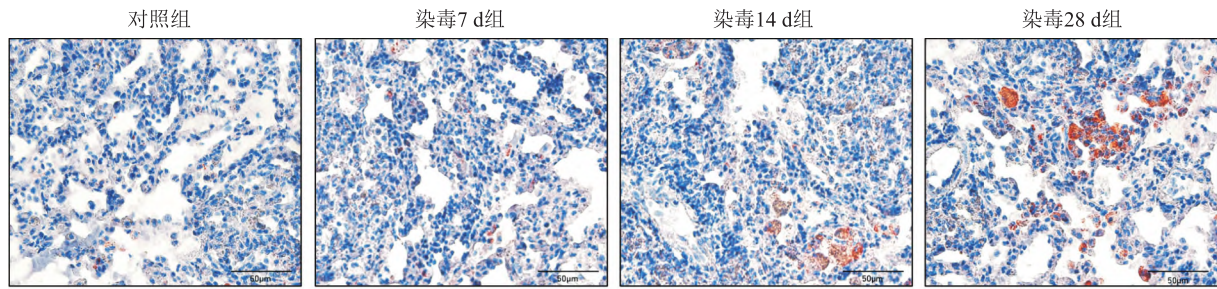


图2 小鼠肺组织油红O染色结果 ×400

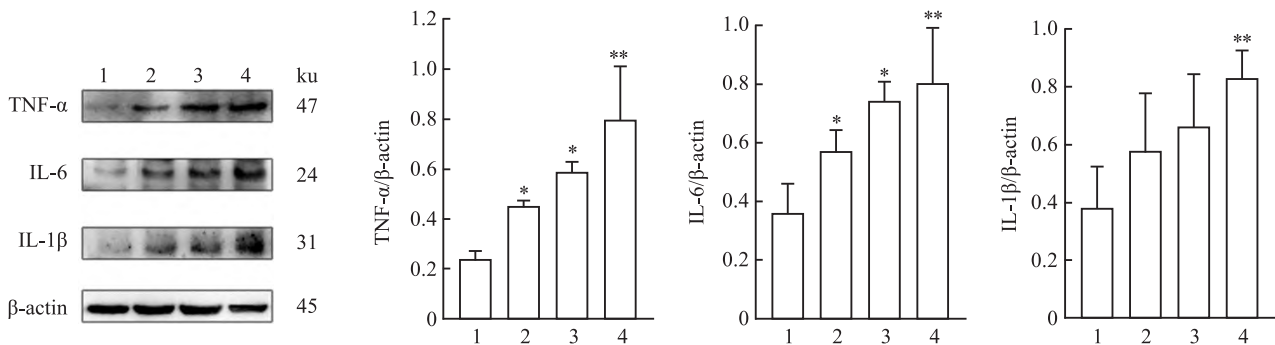


图3 Western blot 检测小鼠肺组织炎症因子的表达

1:对照组;2:染毒7 d组;3:染毒14 d组;4:染毒28 d组;与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 MSR1 在模型肺组织的表达变化 Western blot 结果如图4所示,与对照组比较,染毒14 d组的 MSR1 表达升高 ($P < 0.05$),染毒28 d组的 MSR1 的表达显著升高 ($P < 0.01$)。此外,对矽肺小鼠模型肺组织进行免疫组织化学染色,结果如图5所示, MSR1 棕黄色染色颗粒主要表达于细胞质,以巨噬细胞着色为主,肺间质居多。与对照组比较, MSR1 在染毒组小鼠肺组织中表达上调。

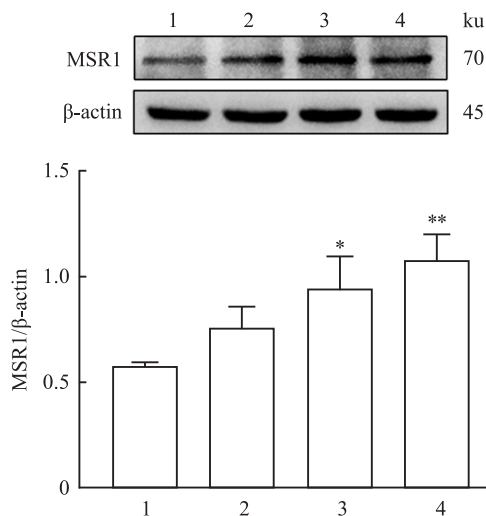


图4 Western blot 检测 MSR1 在小鼠肺组织的表达情况

1:对照组;2:染毒7 d组;3:染毒14 d组;4:染毒28 d组;与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.5 敲低 MSR1 抑制巨噬细胞对 SiO₂ 的刺激反应 Western blot 结果如图6A所示,与对照组比较, SiO₂ 组巨噬细胞 RAW264.7 中 MSR1 的表达升高 ($P < 0.05$), siRNA-MSR1 组中 MSR1 的表达下降 ($P < 0.05$);与 siRNA-MSR1 组比较, siRNA-MSR1 + SiO₂ 刺激组巨噬细胞的 MSR1 的表达升高 ($P < 0.05$)。油红 O 染色结果如图6B所示, SiO₂ 组巨噬细胞 RAW264.7 细胞形态变圆,细胞核增大呈蓝色,位于胞质一侧,胞质内出现橙红色脂滴。与 SiO₂ 组比较, siRNA-MSR1 + SiO₂ 刺激组细胞胞质中橙红色脂滴减少,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。同时, siRNA-MSR1 组细胞内红色脂滴与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图6。ELISA 结果如表1所示,与对照组比较, SiO₂ 组细胞上清液中 TNF-α、IL-6、IL-1β 的含量升高 ($P < 0.05$), siRNA-MSR1 组 TNF-α、IL-6、IL-1β 的含量降低 ($P < 0.05$)。其中 siRNA-MSR1 + SiO₂ 刺激组的炎症因子的含量低于 SiO₂ 组, TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

矽肺是全球最严重的职业性肺纤维化疾病之一,是由于长期接触 SiO₂ 粉尘引起的,有明显的肺部炎症和纤维化的慢性间质性肺疾病,该疾病具有

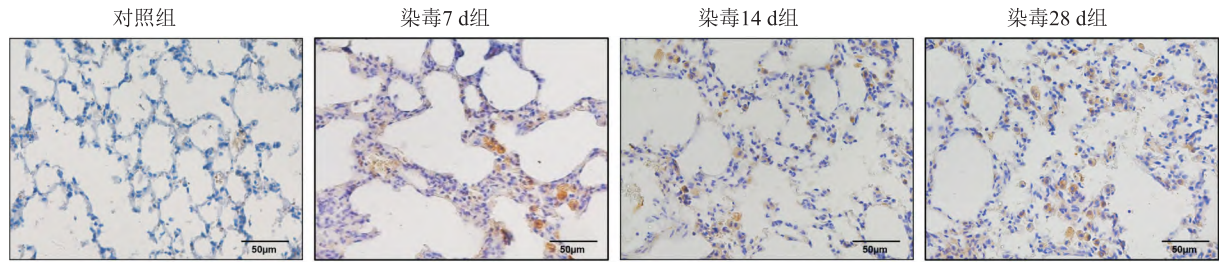
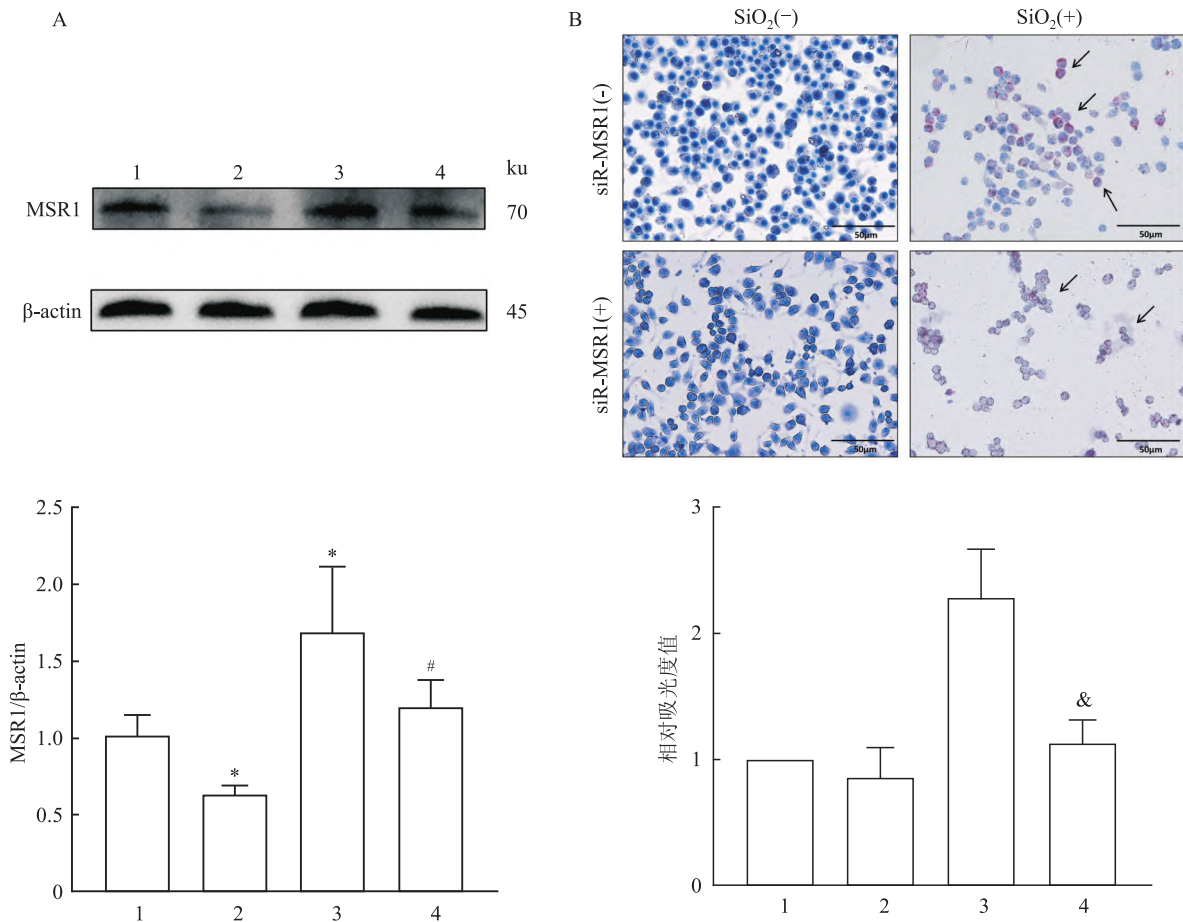


图5 免疫组织化学染色结果 ×400

图6 小鼠单核巨噬细胞对 SiO₂ 的刺激反应

A: Western blot 检测蛋白表达水平统计图; B: 细胞油红 O 染色 ×400; 1: 对照组; 2: siRNA-MSR1 组; 3: SiO₂ 组; 4: siRNA-MSR1 + SiO₂ 刺激组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 siRNA-MSR1 组比较: # $P < 0.05$; 与 SiO₂ 组比较: & $P < 0.01$

表1 细胞培养基上清液中炎症因子的含量($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	TNF- α (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)
对照	25.26 $\pm$ 10.49	30.93 $\pm$ 3.99	23.21 $\pm$ 5.14
siRNA-MSR1	4.71 $\pm$ 1.24 *	10.10 $\pm$ 0.71 *	7.66 $\pm$ 0.70 *
SiO ₂	51.97 $\pm$ 14.16 *	72.41 $\pm$ 10.70 *	57.70 $\pm$ 4.94 *
siRNA-MSR1 + SiO ₂ 刺激	17.50 $\pm$ 3.14 #	25.33 $\pm$ 5.00 #	24.46 $\pm$ 5.09 #
F 值	14.846	54.635	68.980

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 SiO₂ 组比较: # $P < 0.05$

进行性、不可逆性等特点^[5]。目前尽管工人在作业时采取了预防措施,但矽肺的发病率仍然居高不下,

在发展中国家尤其严重。在矽肺发病进程中肺内巨噬细胞对 SiO₂ 颗粒的摄取可能导致其崩解坏死,释放的 SiO₂ 颗粒被更多的巨噬细胞吞噬,周而复始导致持续的炎症和纤维化^[2]。在结晶 SiO₂ 引起的纤维性肺炎模型中,肺泡内巨噬细胞和中性粒细胞蓄积引起持续的毒性和炎症反应^[6],巨噬细胞和促炎细胞因子如 TNF- α 以及这些细胞产生的 IL-1 β 在暴露于 SiO₂ 后的早期炎症反应中发挥着重要的作用^[7]。此外,已有研究^[3]表明脂质代谢在矽肺的发

病机制中具有重要作用,脂质代谢失衡导致大量泡沫细胞形成可能是矽肺病程发展的一个重要因素。代谢组学分析结果显示无论是矽肺早期炎症期还是进展期,发生改变的主要代谢产物是脂质和类脂化合物^[8]。在特发性肺纤维化相关研究中表明介导特发性肺纤维化重塑的特定代谢途径包括鞘脂代谢途径^[9],鞘脂代谢途径中相关酶的变化可能参与调控矽肺的发病进程。因此,脂质代谢在矽肺纤维化发展过程中可能起重要作用。为阐明脂质代谢和炎症反应在矽肺发病过程中发挥的作用,课题组前期通过在矽肺和纤维化相关数据库筛选高表达的细胞因子,结果显示 MSR1 在矽肺中高表达的同时也可介导脂质代谢。MSR1 是一种以同源三聚体形式存在的 I 型跨膜糖蛋白,属于受体超家族,参与调节和维持正常脂质代谢。已有研究^[10]表明巨噬细胞表面的 MSR1 可以不受胆固醇的负反馈对 ox-LDL 进行摄取从而形成富含脂质的泡沫细胞。在小鼠体内高表达 MSR1 基因有助于清除体内载脂蛋白,降低胆固醇^[11]。但目前 MSR1 在矽肺发病过程中对脂质代谢及分泌炎症因子的调控作用机制尚不明确。

炎症和纤维化是矽肺的典型病理特征^[12]。在 SiO₂ 诱导的小鼠矽肺模型中矽肺小鼠肺组织中纤维化和炎症增强,这之前报道^[13]一致,提示造模成功。此外,研究表明, SiO₂ 进入肺内后,肺内巨噬细胞首先做出应答,免疫组织化学染色和 Western blot 结果显示矽肺小鼠肺组织 MSR1 表达升高,且与染毒时间存在相关性。在 SiO₂ 刺激的巨噬细胞中也显示了相似的现象,提示 MSR1 在矽肺的进展中可能发挥着重要的调控作用。油红 O 染色显示在矽肺小鼠肺组织中脂质蓄积增加,Western blot 结果显示矽肺小鼠肺组织中炎症因子表达上调,提示脂质代谢和炎症反应可能在矽肺的病程进展中发挥重要作用。而有研究^[14]表明 MSR1 的表达与肝脏富含脂质的泡沫样巨噬细胞的发生相关,但在矽肺脂质代谢中的调控机制尚不清楚。为探究 MSR1 对 SiO₂ 刺激的巨噬细胞中脂质蓄积和炎症反应的影响,该研究在 RAW264.7 细胞中沉默 MSR1 的表达,结果显示 SiO₂ 刺激 RAW264.7 细胞后,MSR1 的表达升高,转染 MSR1 的小干扰 RNA 后其表达受到抑制。而抑制 MSR1 减轻了 SiO₂ 诱导的脂质蓄积和炎症反应的增强,提示 MSR1 参与了 SiO₂ 对肺组织和细胞内脂质成分的调控以及介导的炎症反应。

综上所述,该研究表明 MSR1 可能在矽肺小鼠

模型脂质异常蓄积和炎症反应中发挥了关键调控作用,MSR1 可能是干预矽肺病程进展的潜在治疗靶点。具体分子调控机制及调控通路的研究值得今后进一步探索。

参考文献

- [1] Tan S, Chen S. The mechanism and effect of autophagy, apoptosis, and pyroptosis on the progression of silicosis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15):8110.
- [2] Graham W G. Silicosis[J]. Clin Chest Med, 1992, 13(2):253-67.
- [3] Hou X, Summer R, Chen Z, et al. Lipid uptake by alveolar macrophages drives fibrotic responses to silica dust[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):399.
- [4] Orr G A, Chrisler W B, Cassens K J, et al. Cellular recognition and trafficking of amorphous silica nanoparticles by macrophage scavenger receptor A[J]. Nanotoxicology, 2011, 5(3):296-311.
- [5] Cassel S L, Eisenbarth S C, Iyer S S, et al. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(26):9035-40.
- [6] Lardot C G, Huaux F A, Broeckeaert F R, et al. Role of urokinase in the fibrogenic response of the lung to mineral particles[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 157(2):617-28.
- [7] Lee E, Lee E J, Kim H, et al. Overexpression of apolipoprotein A1 in the lung abrogates fibrosis in experimental silicosis[J]. PLoS One, 2013, 8(2):e55827.
- [8] Ma R, Fan Y, Huang X, et al. Lipid dysregulation associated with progression of silica-induced pulmonary fibrosis[J]. Toxicol Sci, 2023, 191(2):296-307.
- [9] Zhao Y D, Yin L, Archer S, et al. Metabolic heterogeneity of idiopathic pulmonary fibrosis: a metabolomic study[J]. BMJ Open Respir Res, 2017, 4(1):e000183.
- [10] 刘红利,孙颖,郎艳松,等.单核/巨噬细胞脂质代谢和炎症在动脉粥样硬化中的作用[J].细胞与分子免疫学杂志,2014,30(11):1224-7.
- [11] Wölle S, Via D P, Chan L, et al. Hepatic overexpression of bovine scavenger receptor type I in transgenic mice prevents diet-induced hyperbetalipoproteinemia[J]. J Clin Invest, 1995, 96(1):260-72.
- [12] He R, Yuan X, Lv X, et al. Caveolin-1 negatively regulates inflammation and fibrosis in silicosis[J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(1):99-107.
- [13] Gao J, Li C, Wang X, et al. Oridonin attenuates lung inflammation and fibrosis in silicosis via covalent targeting iNOS[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 153:113532.
- [14] Govaere O, Petersen S K, Martinez-lopez N, et al. Macrophage scavenger receptor 1 mediates lipid-induced inflammation in non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Hepatol, 2022, 76(5):1001-12.

The effect of MSR1 on the secretion of inflammatory factors and lipid accumulation in silicosis mice

Liu Yi¹, Li Jincheng¹, Zhou Yuhui¹, He Hailan¹, Guo Lingli^{1,2},

Hao Xiaohui^{1,2}, Wang Hongli^{1,2}, Liu Heliang^{1,2}

(¹School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210;

²Hebei Key Laboratory of Organ Fibrosis, Tangshan 063210)

Abstract Objective To investigate the expression of class A scavenger receptor 1 (MSR1) in the lungs of silicosis mice and its role in inflammation and lipid metabolism mediated by mouse mononuclear macrophages (RAW264.7). **Methods** 24 C57BL/6 male mice were randomly divided into control group, exposed 7 d group, exposed 14 d group, exposed 28 d group, with 6 mice in each group. RAW264.7 cells were divided into control group, siRNA-MSR1 group, SiO₂ group and siRNA-MSR1 + SiO₂ stimulation group. The pathological changes of lung tissue in mice were observed by HE and VG staining. Lipid accumulation was observed under oil red O staining microscope. Immunohistochemical staining (IHC) was used to detect the expression and localization of MSR1. The expression of MSR1, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6 and IL-1 β were detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, HE and VG staining results showed that inflammatory cells gathered and collagen distribution increased in the lung tissue of silicosis mice. Oil red O staining showed that a large number of orange-red lipid droplets appeared in the lung tissue of mice. IHC results showed that the expression of MSR1 was up-regulated in silicosis inflammation stage. Western blot results showed that the expression of MSR1, TNF- α , IL-6 and IL-1 β was up-regulated in silicosis inflammation stage ($P < 0.05$). The expression of MSR1 in the SiO₂ cell stimulation group was up-regulated ($P < 0.05$), and the expression of MSR1 in the siRNA-MSR1 group decreased ($P < 0.05$), and lipid droplets also appeared in the SiO₂ cell stimulation group. The accumulation of lipid droplets in siRNA-MSR1 + SiO₂ stimulation group was lower than that in SiO₂ group ($P < 0.01$). ELISA results showed that the expression of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in SiO₂ cell stimulation group was up-regulated ($P < 0.05$). Compared with SiO₂ group, the expression of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in siRNA-MSR1 + SiO₂ stimulation group was down-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** MSR1 is involved in the regulation of lipid components and the release of inflammatory factors in lung tissue and cells of silicosis mice. Inhibition of MSR1 expression can antagonize the inflammatory response and abnormal lipid accumulation in macrophages. MSR1 may be a potential therapeutic target for future intervention in the progression of silicosis.

Key words silicosis; inflammatory response; lipid metabolism; class A scavenger receptor; macrophage; MSR1