

辅酶 Q10 对小鼠矽肺纤维化的作用

蒯文轩^a, 孙岳^a, 杨安宁^b, 刘洋^a, 王宇欣^a, 黎伟华^c, 李思睿^a, 付有娟^a, 赵枫^a, 王发选^a, 刘志宏^a

宁夏医科大学 a. 公共卫生与管理学院职业卫生与环境卫生系 b. 国家卫生健康委员会代谢性心血管疾病研究重点实验室, 宁夏血管损伤与修复研究重点实验室 c. 实验动物中心, 宁夏 银川 750004

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.19333

摘要:

[背景] 矽肺是危害最严重的职业病, 目前无特效治疗方案。研究发现辅酶 Q10 可缓解氨甲蝶呤诱导的肺纤维化, 但能否缓解矽肺纤维化尚无文献报道; 此外, 羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (HMGCR) 作为内源性合成辅酶 Q10 的限速酶是否在该过程中发生变化也无研究报道。

[目的] 探讨辅酶 Q10 对小鼠矽肺纤维化的影响及 HMGCR 在该过程中的变化。

[方法] C57BL/6 小鼠随机分为 3 组: 对照组 (生理盐水组)、模型组 (SiO₂ 组)、治疗组 (SiO₂+ 辅酶 Q10 组), 每组 8 只。模型组、治疗组采用气管内一次性滴注 0.1 mL SiO₂ 悬液 (50 mg/mL) 构建小鼠矽肺模型, 对照组同法滴注等体积生理盐水。治疗组术后 48 h 给予辅酶 Q10 100 mg/(kg·d) 灌胃。术后 60 d 处死各组小鼠, 行 HE 及天狼星红染色, 观察肺组织病理改变和胶原纤维沉积情况; 碱水解法检测小鼠肺组织羟脯氨酸含量; 实时荧光定量 PCR 法检测 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 的 mRNA 表达, 免疫组织化学法、Western blot 检测 α -SMA 及 HMGCR 蛋白表达。

[结果] 模型组炎症细胞浸润及纤维化程度较对照组升高, 而治疗组炎症细胞浸润及纤维化程度均较模型组减轻。模型组羟脯氨酸含量为 (0.65±0.06) μ g/mg, 较对照组 [(0.54±0.05) μ g/mg] 升高, 而治疗组羟脯氨酸含量为 (0.55±0.05) μ g/mg, 较模型组降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。对照组、模型组、治疗组 α -SMA mRNA 的相对表达量分别为 24 381.85±3 301.44、31 812.66±8 335.82、21 587.55±9 489.53, 模型组 α -SMA mRNA 表达高于对照组及治疗组 ($P<0.05$)。模型组 α -SMA 蛋白、HMGCR 蛋白表达均较对照组升高, 而治疗组较模型组降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。

[结论] 辅酶 Q10 能够减轻小鼠矽肺纤维化并降低 HMGCR 表达。

关键词: 辅酶 Q10; 矽肺; 纤维化; α 平滑肌肌动蛋白; 羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶

Effect of coenzyme Q10 on silicosis fibrosis in mice LIN Wen-xuan^a, SUN Yue^a, YANG An-ning^b, LIU Yang^a, WANG Yu-xin^a, LI Wei-hua^c, LI Si-ru^a, FU You-juan^a, ZHAO Feng^a, WANG Fa-xuan^a, LIU Zhi-hong^a (a. Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health and Management b. Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Diseases Research, National Health Commission, Ningxia Key Laboratory of Vascular Injury and Repair Research c. Laboratory Animal Center, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract:

[Background] Silicosis is the most serious occupational disease, and there is no specific treatment plan. It had been found that coenzyme Q10 (CoQ10) can relieve methotrexate-induced pulmonary fibrosis, but whether it can alleviate silicosis fibrosis has not been reported; in addition, it has not been reported whether hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase (HMGCR), as a rate limiting enzyme for endogenous synthesis of CoQ10, has changed in this process.

[Objective] This experiment investigates the effect of CoQ10 on silicosis fibrosis in mice and the associated potential change of HMGCR.

[Methods] C57BL/6 mice were randomly divided into three groups: control group (saline group), model group (SiO₂ group), and treatment group (SiO₂+CoQ10 group), with eight mice in each group. Every mouse in the model group and the treatment group was exposed to 0.1 mL SiO₂ suspension (50 mg/mL) by intratracheal instillation to build mouse silicosis model, while

基金项目

宁夏回族自治区重点研发计划项目 (2019BEG03023); 国家自然科学基金项目 (81700404); 宁夏回族自治区 2019 年大学生创新创业训练计划项目 (19-1976); 宁夏医科大学 2018 年第二批校级特殊人才启动项目 (XT2018012)

作者简介

蒯文轩 (1993—), 女, 硕士生;
E-mail: wenxuanlin592@163.com

通信作者

刘志宏, E-mail: jwclzh@163.com

伦理审批

已获取

利益冲突

无申报

收稿日期

2019-05-16

录用日期

2019-08-28

文章编号

2095-9982(2019)10-0949-06

中图分类号

R135.2

文献标志码

A

► 引用

蒯文轩, 孙岳, 杨安宁, 等. 辅酶 Q10 对小鼠矽肺纤维化的作用 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36 (10): 949-954.

► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19333

Funding

This study was funded.

Correspondence to

LIU Zhi-hong, E-mail: jwclzh@163.com

Ethics approval

Obtained

Competing interests

None declared

Received

2019-05-16

Accepted

2019-08-28

► To cite

LIN Wen-xuan, SUN Yue, YANG An-ning, et al. Effect of coenzyme Q10 on silicosis fibrosis in mice [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(10): 949-954.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19333

the control group was instilled with the same volume of normal saline. After 48 h of model establishment, the mice in the treatment group were given 100 mg/(kg·d) CoQ10 by gavage. After 60 d, all mice were sacrificed. The pathological changes and collagen deposition were observed after HE and Sirius red staining. The hydroxyproline (HYP) content in the lung tissues of mice was detected by alkaline hydrolysis. The alpha smooth muscle actin (α -SMA) mRNA expression was detected by real-time quantitative fluorescence PCR. The α -SMA and HMGCR protein expressions were detected by immunohistochemistry and Western blot.

[Results] Inflammatory cell infiltration and fibrosis were more prominent in the model group than in the control group, and less severe in the treatment group than in the model group. The HYP content of the model group was (0.65 ± 0.06) $\mu\text{g}/\text{mg}$, which was higher than that of the control group $[(0.54\pm 0.05)$ $\mu\text{g}/\text{mg}]$, while the HYP content of the treatment group was (0.55 ± 0.05) $\mu\text{g}/\text{mg}$, which was lower than that of the model group ($P < 0.05$). The relative expression levels of α -SMA mRNA in the control group, the model group, and the treatment group were $24\ 381.85\pm 3\ 301.44$, $31\ 812.66\pm 8\ 335.82$, and $21\ 587.55\pm 9\ 489.53$, respectively; the expression of α -SMA mRNA in the model group was higher than those in the control group and the treatment group ($P < 0.05$). The expression levels of α -SMA and HMGCR proteins were higher in the model group than in the control group, and lower in the treatment group than in the model group ($P < 0.05$).

[Conclusion] CoQ10 can attenuate silicosis fibrosis and reduce HMGCR expression in mice.

Keywords: coenzyme Q10; silicosis; fibrosis; alpha smooth muscle actin; hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase

矽肺是我国危害最严重的职业病,其特征表现为SiO₂粉尘被吸入并阻留于肺内,引起肺组织弥漫性纤维化^[1]。临床上主要采用支气管肺泡灌洗术结合抗纤维化及其并发症的药物,同时给予氧疗、心理辅导等综合治疗策略^[2],并无特效治疗方案。因此,挖掘更安全、更方便,同时兼得预防和治疗等多方面优势的新药,对于减轻患者症状和社会负担具有重要意义。辅酶Q10是内源性合成的脂溶性抗氧化剂,可有效预防蛋白质、脂类和DNA的氧化^[3];作为线粒体氧化呼吸链重要组成部分,参与ATP合成^[4]。此外,辅酶Q10能够调控自噬相关蛋白、缓解氨甲蝶呤诱导的肺纤维化^[5],但能否缓解矽肺纤维化尚无文献报道。羟甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶(hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase, HMGCR)作为内源性合成辅酶Q10的限速酶是否在该过程中发生变化也无研究报道。因此,探讨辅酶Q10对于治疗小鼠矽肺纤维化的作用及该过程中HMGCR的变化,有利于为扩展矽肺治疗的机制研究提供新视角。

1 材料与方法

1.1 动物饲养

SPF级6~8周龄雄性C57BL/6小鼠24只,体重 (20 ± 2) g,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,生产许可证号SCXK(京)2016-0002。于宁夏医科大学SPF级实验动物中心动物房适应性饲养一周后随机分为三组:对照组、模型组、治疗组,每组8只。饲养条件为12 h光照,12 h黑暗,温度 (23 ± 1) °C,相对湿度40%~50%,自主饮水及进食,小鼠饲养、造模等遵循宁夏医科大学实验动物中心实验动物管理和使用的相关规定,试验程序经宁夏医科大学实验动物

中心实验动物福利委员会审核,许可证号SYXK(宁)2015-0001。

1.2 药物及试剂

SiO₂ (Sigma, 美国),辅酶Q10 (北京索莱宝生物科技有限公司,中国),玉米油(阿拉丁,中国),天狼星红试剂盒、HE染色试剂盒(北京雷根生物科技有限公司,中国),羟脯氨酸试剂盒(碱水解法)(南京建成生物制品研究所,中国), α 平滑肌肌动蛋白(alpha smooth muscle actin, α -SMA)兔源一抗(成都正能公司,中国),HMGCR鼠源一抗(SANTA, 美国),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)兔源一抗、小鼠二步法检测试剂盒(小鼠增强聚合物法检测系统)、兔二步法检测试剂盒(兔增强聚合物法检测系统)、小鼠山羊血清、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(中山金桥生物技术有限公司,中国),逆转录试剂盒、qPCR试剂盒(TaRaKa, 日本),全蛋白提取试剂盒(凯基生物技术股份有限公司,中国),分离胶、浓缩胶(海利克斯,中国),丙烯酰胺(北京博奥拓科技有限公司,中国),过硫酸铵、四甲基乙二胺(Sigma, 美国),5 \times 上样缓冲液(康为世纪,中国),超敏ECL化学发光试剂盒(新赛美生物科技有限公司,中国)。

1.3 矽肺模型制备

小鼠异氟烷麻醉后,暴露气管,对照组气管内滴注0.1 mL生理盐水,模型组和治疗组分别气管内滴注50 mg/mL SiO₂悬液0.1 mL,缝合皮肤,观察小鼠生存状态。术后48 h,给予治疗组小鼠100 mg/(kg·d)辅酶Q10灌胃,其他小鼠自主饮食饲养。术后60 d,0.3 mL 0.3%乌拉坦腹腔注射麻醉处死小鼠,取右肺中叶,生理盐水冲洗后4%多聚甲醛固定,其余肺组织-80°C冰箱冻存,进行后续实验。

1.4 HE 染色及天狼星红染色

4%多聚甲醛固定右肺中叶48h后,脱水,包埋,5μm厚度切片,56℃烤片6h后行HE染色及天狼星红染色。HE染色步骤:石蜡切片经二甲苯脱蜡,2次×10min;梯度酒精脱水(100%酒精,2次×5min;95%酒精、85%酒精、75%酒精、50%酒精,各1次×5min);蒸馏水洗3min,苏木素染色6min,蒸馏水冲洗10s,盐酸乙醇分化5s,蒸馏水冲洗3min,伊红染色5min,蒸馏水冲洗5s;85%酒精1次×15s、95%酒精1次×15s、100%酒精2次×3min,二甲苯2次×3min;中性树胶封片后光学显微镜检测。天狼星红染色步骤:脱蜡完成后(步骤同HE染色),天狼星红染色液滴染40min,蒸馏水冲洗2min,去除表面染液,常规脱水透明(同HE染色),中性树胶封片,观察小鼠肺组织纤维化改变。

1.5 羟脯氨酸测定(碱水解法)

羟脯氨酸作为构成胶原蛋白的特殊氨基酸,在非胶原蛋白中很少见,而胶原蛋白是胶原纤维的主要成分,因此,检测各组肺组织羟脯氨酸含量可间接反映肺组织纤维化程度^[6]。实验开始前先按照说明书准备所需试剂。天平准确称取50mg冻存的小鼠肺组织,冰上剪碎,加入1mL水解液,96℃水浴充分水解20min,流水冷却后,调节各管pH为6.0~6.8,加双蒸水至10mL混匀,加入适量活性炭,3500r/min离心10min(离心半径8.6cm),取上清1mL做检测。设空白管、标准管及测定管,按照说明书依次滴加一、二、三号试剂,混匀后60℃水浴15min,冷却后3500r/min离心10min(离心半径8.6cm),取200μL上清于96孔板,利用酶标仪在波长550nm处检测各管光密度值(D),根据如下计算公式计算各组小鼠肺组织羟脯氨酸含量(μg/mg)。

$$\text{羟脯氨酸含量} (\mu\text{g/mg湿重}) = \frac{D_{\text{测定}} - D_{\text{空白}}}{D_{\text{标准}} - D_{\text{空白}}} \times$$

$$\text{标准品浓度} (5\mu\text{g/mg}) \times \frac{\text{水解液总体积} (10\text{mL})}{\text{组织湿重} (\text{mg})}$$

1.6 实时荧光定量PCR

称取各组小鼠肺组织,冰上剪碎,加入RZ裂解液,匀浆处理,按照天根试剂盒说明书提取各组小鼠肺组织总mRNA,使用微量分光光度计测量样品总RNA的浓度及纯度;按照TaKara逆转录操作说明书,将提取的mRNA逆转录为cDNA,逆转录条件为37℃×15min,85℃×5s,cDNA产物浓度为0.5μg/10μL体系;再进行

实时荧光定量PCR,检测各组小鼠肺组织α-SMA在转录水平的表达差异,数据处理采用2^{-ΔΔCt}对目的基因进行相对定量分析,α-SMA及β-actin的扩增效率分别为98.6%、92.9%。引物序列详见表1。

表1 实时荧光定量PCR所用引物

基因名称	序列(5'-3')	长度(bp)
α-SMA	正向引物: CCTTCGTGACTACTGCCGAG	338
	反向引物: GTCAGCAATGCTGGGTACAT	
β-actin	正向引物: GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG	174
	反向引物: ATGCCACAGGATTCCATACC	

1.7 免疫组织化学

各组小鼠肺组织石蜡切片二甲苯脱蜡,2次×10min,梯度酒精脱水(100%酒精,2次×5min;95%酒精、85%酒精、75%酒精、50%酒精,各1次×5min),枸橼酸钠(pH=6)抗原热修复15min,山羊血清封闭10min,α-SMA/HMGCR一抗(1:100稀释)孵育过夜,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔/抗鼠二抗孵育30min,DAB显色6min,苏木素染色20s,流水冲洗2min,脱水、透明、封片(同HE染色),普通光镜显微镜下40倍物镜取图,观察各组α-SMA及HMGCR蛋白表达情况,以Image-Pro Plus 6.0软件统计阳性区域,结果以阳性区域累积光密度值与图片面积的比值进行定量。

1.8 Western blot检测α-SMA及HMGCR蛋白表达

每组8只小鼠各称取50mg肺组织于1.5mL离心管中,冰上剪碎,加入现配的全蛋白提取试剂(按照说明书配制即可)后进行匀浆处理,4℃过夜,12000r/min离心5min(离心半径8.6cm),将上清转移至新的离心管中,紫外分光光度法检测蛋白浓度;5×上样缓冲液将蛋白统一稀释成3μg/μL,99℃×5min变性处理;将10μL蛋白上样缓冲液准确加入SDS-PAGE凝胶电泳孔中,恒压80V跑完浓缩胶后换恒压120V,根据目的蛋白相对分子质量大小决定电泳停止时间。使用全能型蛋白转印系统,将SDS-PAGE凝胶中的目的蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上;4%脱脂牛奶室温封闭2h,PBST洗10min×3次;一抗4℃摇床孵育过夜,PBST洗10min×3次;二抗室温摇床孵育2h,PBST洗10min×3次;将化学发光试剂均匀地滴加在PVDF膜上,在凝胶成像仪上成像并分析结果,采用Image Lab软件进行灰度值分析,目的蛋白的表达量 = D_{目的片段} / D_{内参GAPDH}

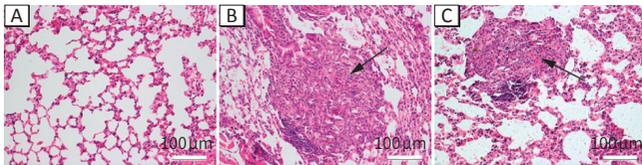
1.9 统计学分析

采用SPSS 20.0软件进行统计学分析,各组数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-t法,检验水准为 $\alpha=0.05$,双侧检验。

2 结果

2.1 肺组织病理学变化

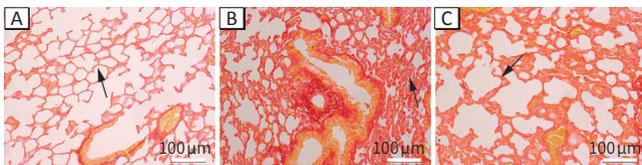
2.1.1 HE染色 HE染色结果如图1所示:对照组小鼠肺组织肺泡结构基本完整,肺泡壁无明显增厚,炎症细胞未出现明显聚集;模型组肺组织结构破坏明显,肺间质及肺泡腔内炎症细胞大量聚集,矽结节形成且直径较大;治疗组有炎症细胞的聚集,但肺泡壁结构尚可,矽结节出现,但结节较少且直径小。



[注] A: 对照组; B: 模型组; C: 治疗组。黑色箭头指示矽结节。

图1 各组小鼠肺组织HE染色($\times 200$)

2.1.2 天狼星红染色 天狼星红染色结果如图2所示:对照组小鼠肺泡结构正常,间质无胶原沉积;模型组小鼠肺组织胶原含量明显增多,肺泡间质胶原沉积增厚明显,肺泡结构破坏;治疗组小鼠肺间质亦出现胶原沉积,但与模型组相比,纤维化减轻。



[注] A: 对照组; B: 模型组; C: 治疗组。箭头所指为肺泡间质胶原纤维沉积。

图2 各组小鼠肺组织天狼星红染色($\times 200$)

2.2 肺组织羟脯氨酸含量

对照组、模型组、治疗组羟脯氨酸含量分别为 (0.54 ± 0.05) $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、 (0.65 ± 0.06) $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、 (0.55 ± 0.05) $\mu\text{g}/\text{mg}$,三组之间差异有统计学意义($F=5.28$, $P=0.030$)。模型组羟脯氨酸含量高于对照组($P=0.041$),而治疗组羟脯氨酸含量低于模型组($P=0.013$)。

2.3 肺组织 α -SMA mRNA和蛋白表达

2.3.1 mRNA 三组小鼠肺组织中 α -SMA的mRNA表达差异有统计学意义($F=4.82$, $P=0.015$)。结果如表2所示:模型组 α -SMA的mRNA表达水平高于对照组

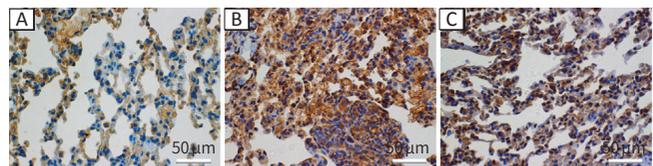
($P=0.048$);治疗组 α -SMA的mRNA表达低于模型组($P=0.004$),差异均有统计学意义。

2.3.2 蛋白 免疫组织化学法结果显示三组小鼠肺组织 α -SMA蛋白表达间的差异有统计学意义($F=6.74$, $P=0.007$)。DAB显色后显微镜下观察到(棕色区域为阳性表达区域,棕色区域多,说明该蛋白表达高):模型组 α -SMA阳性区域大于对照组,而治疗组 α -SMA阳性区域小于模型组。采用Image-Pro Plus 6.0软件进一步统计后发现:模型组小鼠肺组织 α -SMA表达量高于对照组($P=0.008$);而治疗组较模型组小鼠肺组织 α -SMA表达量有所下降($P=0.005$)。见表2、图3。

表2 辅酶Q10对小鼠肺组织 α -SMA mRNA和蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	mRNA	蛋白	
		免疫组织化学法	Western blot
对照组	24381.85 \pm 3301.44	0.0088 \pm 0.01	0.3583 \pm 0.21
模型组	31812.66 \pm 8335.82*	0.0226 \pm 0.01*	1.0860 \pm 0.17*
治疗组	21587.55 \pm 9489.53#	0.0107 \pm 0.01#	0.6669 \pm 0.12**
<i>F</i>	4.82	6.74	15.72
<i>P</i>	0.015	0.007	0.001

[注] *: 与对照组相比, $P<0.05$; #: 与模型组相比, $P<0.05$ 。



[注] A: 对照组; B: 模型组; C: 治疗组。棕色区域代表阳性表达区域。

图3 各组小鼠肺组织 α -SMA蛋白表达(免疫组织化学法, $\times 400$)

Western blot结果显示三组小鼠肺组织 α -SMA蛋白表达间的差异有统计学意义($F=15.72$, $P=0.001$),结果见表2。模型组小鼠肺组织 α -SMA表达量高于对照组($P<0.001$),治疗组 α -SMA表达量高于对照组($P=0.042$),但低于模型组($P=0.021$)。电泳条带见图4。

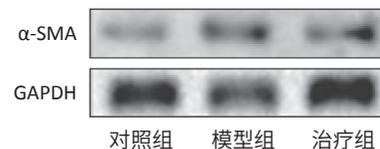
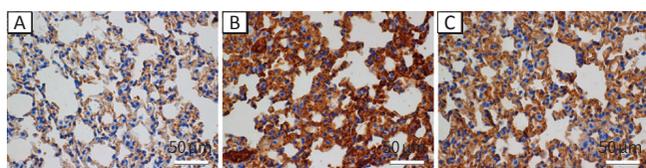


图4 各组小鼠肺组织 α -SMA蛋白表达电泳条带

2.4 肺组织HMGCR蛋白表达

免疫组织化学法检测结果显示三组小鼠肺组织HMGCR蛋白表达间的差异有统计学意义($F=9.58$, $P=0.002$)。光镜下肉眼观察到模型组阳性表达区域多

于对照组, 治疗组阳性表达区域少于模型组而多于对照组, 使用 Image-Pro Plus 6.0 软件进一步统计各组阳性表达区域后进行方差分析发现: 模型组小鼠肺组织 HMGR 表达高于对照组 ($P < 0.001$), 治疗组小鼠组织 HMGR 表达较模型组下降 ($P = 0.041$), 但表达高于对照组 ($P = 0.022$), 差异均有统计学意义。见图 5、表 3。



[注] A: 对照组; B: 模型组; C: 治疗组。棕色区域代表阳性表达区域。
图 5 小鼠肺组织 HMGR 蛋白表达 (×400)

表 3 辅酶 Q10 对小鼠肺组织 HMGR 蛋白表达的影响
($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	免疫组织化学法	Western blot
对照组	0.0218±0.01	0.1677±0.06
模型组	0.0464±0.01*	0.4832±0.19*
治疗组	0.0353±0.01**	0.3209±0.17**
<i>F</i>	9.58	8.80
<i>P</i>	0.002	0.002

[注] *: 与对照组相比, $P < 0.05$; #: 与模型组相比, $P < 0.05$ 。

Western blot 检测结果显示, 三组小鼠肺组织 HMGR 蛋白表达间的差异有统计学意义 ($F = 8.80$, $P = 0.002$), 见表 3。模型组小鼠肺组织 HMGR 表达量高于对照组 ($P < 0.001$), 而治疗组小鼠肺组织 HMGR 表达量高于对照组 ($P = 0.037$), 但低于模型组 ($P = 0.034$), 差异均有统计学意义。电泳条带见图 6。



图 6 各组小鼠肺组织 HMGR 蛋白表达电泳条带

3 讨论

本次研究发现辅酶 Q10 能够减缓 SiO₂ 所致的矽肺炎症, 降低肺组织纤维化程度, 减少纤维灶的产生, 治疗组 HMGR 表达降低。

目前, 我国累计报告尘肺病超过 85 万例, 其中矽肺占比 50% 以上^[7]。矽肺特征表现是 SiO₂ 颗粒进入机体, 刺激肺组织启动自我修复机制, 激活成纤维细胞产生胶原纤维。当肺组织受到反复刺激时, 成纤维细胞异常增殖分泌大量胶原纤维, 致肺间质胶原沉积, 肺间质增厚甚至出现瘢痕^[8]。目前矽肺的治疗采取抗

炎、抗纤维化及肺灌洗的治疗方法结合氧疗与心理疏导的综合治疗策略, 但治疗效果均不满意。辅酶 Q10 具有抗氧化、抗纤维化、清除自由基、扩张血管、减少促炎因子产生等作用, 被广泛用于降低血液黏度、改善冠状动脉血运重建后缺血和再灌注损伤。多项研究表明, 辅酶 Q10 发挥着广泛的抗纤维化作用, 如: 辅酶 Q10 能够通过上调自噬相关途径, 对氨甲蝶呤诱导的肺纤维化起保护作用^[5]; 通过抑制转化生长因子 β-1 表达进而抑制肝纤维化^[9]; 辅酶 Q10 还能够通过活性氧触发的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路缓解精氨酸诱导的胰腺纤维化, 降低胰腺组织胶原沉积^[10]; 临床试验研究发现, 辅酶 Q10 能够降低心肌纤维化生物标志的产生^[11]。

大多矽肺动物模型的制备方法是大鼠非气管暴露法灌注 1 mL 50 mg/mL SiO₂ 悬液^[12-14], 但大鼠非气管暴露法造模存在灌注后呛咳严重、死亡率较高的不足。因此, 本次实验以 C57BL/6 小鼠 50 mg/mL SiO₂ 悬液气管内滴注进行矽肺模型制备, 根据小鼠与大鼠体重比值, 将滴注剂量降低 10 倍^[15], 即 0.1 mL。此外, 经查阅文献发现, 10 mg/kg 辅酶 Q10 灌胃 3 周, 每周 3 次, 可缓解 ICR 小鼠肝纤维化^[9], 又因机体各器官辅酶 Q10 含量差异较大, 肝脏辅酶 Q10 含量明显高于肺组织内辅酶 Q10 含量^[16]。通过预实验观察, 100 mg/kg·d 辅酶 Q10 连续灌胃 60 d 可减轻矽肺小鼠肺纤维化程度, 故以该剂量作为辅酶 Q10 灌胃剂量。

本研究病理学结果显示, 模型组肺泡结构严重破坏, 炎性细胞聚集, 这与其他矽肺模型病理表现一致^[17]。天狼星红染料是一种强酸性阴离子染料, 可与呈碱性的胶原反应, 使胶原纤维呈现红色, 广泛用于检测纤维化组织中的胶原分布; 羟脯氨酸是胶原蛋白所特有的非必需氨基酸^[18], 可用来评价成纤维细胞活化程度, 本研究经天狼星红染色观察各组胶原沉积情况, 发现模型组小鼠胶原纤维水平明显高于对照组, 治疗组胶原纤维水平低于模型组但高于对照组, 碱水解法检测各组小鼠肺组织羟脯氨酸含量, 发现与天狼星红染色结果一致; 两种不同实验方法共同验证说明辅酶 Q10 可能存在一定的抗矽肺纤维化作用。

α-SMA 是成纤维细胞活化的标志, 参与合成多种细胞外基质成分, 促进纤维灶形成, 是肺纤维化形成过程的必要步骤, 如博来霉素诱导的肺纤维化及矽肺纤维化^[19-20]; 采用实时荧光定量 PCR 及免疫组织化学法和 Western blot 从转录和翻译两个水平检测肌成纤

维细胞标记物 α -SMA 的表达,发现模型组表达量高于对照组,而治疗组表达低于模型组,且差异均有统计学意义,进一步提示辅酶 Q10 可能具有一定的抗矽肺纤维化作用。

辅酶 Q10 作为线粒体内膜上递氢复合体的重要组成成分,对细胞能量代谢产生起至关重要的作用, HMGCR 是生物体内自主合成辅酶 Q10 的限速酶。本研究通过免疫组织化学法及 Western blot 检测各组小鼠肺组织 HMGCR 表达,发现模型组 HMGCR 蛋白表达高于对照组,而辅酶 Q10 治疗组 HMGCR 表达低于模型组但高于对照组,该结果提示在矽肺纤维化发生过程中伴随 HMGCR 的改变,而给予外源性辅酶 Q10 后, HMGCR 表达较模型组降低,也提示辅酶 Q10 与 HMGCR 间可能存在调控关系,将在后续的研究中进一步挖掘。

综上所述,辅酶 Q10 能够减轻 SiO_2 诱导的矽肺纤维化,下调羟脯氨酸及 α -SMA 表达,且该过程伴随着 HMGCR 的表达改变,这可能为后续矽肺治疗的机制研究提供新的切入点。然而由于矽肺纤维化发生机制较为复杂,辅酶 Q10 减轻矽肺纤维化的具体机制尚不明确,今后将继续围绕这一新视角对缓解矽肺纤维化的可能机制进行更深层次地挖掘。

参考文献

- [1] 郭敬文,张振玲,邵华. 矽肺纤维化治疗药物的研究进展 [J]. 中国工业医学杂志, 2018, 31 (2) : 120-123.
- [2] 周笑云,刘桂桃. 矽肺的治疗进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18 (105) : 134-135.
- [3] 李小君,李春明,马麟娟,等. 辅酶 Q10 的抗氧化性及其对卵巢功能的影响 [J]. 中华生殖与避孕杂志, 2018, 38 (7) : 606-609.
- [4] 查锡良,药立波. 生物化学与分子生物学 [M]. 第 8 版. 北京:人民卫生出版社, 2013 : 175-179.
- [5] MOHAMED DI, KHAIRY E, TAWFEK SS, et al. Coenzyme Q10 attenuates lung and liver fibrosis via modulation of autophagy in methotrexate treated rat [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109 : 892-901.
- [6] 宋瑞瑞,张晓雪,时亚欣,等. 3-甲基腺嘌呤对染矽尘大鼠肺组织胶原纤维 mRNA 表达的影响 [J]. 环境与职业医学, 2016, 33 (10) : 1000-1004.
- [7] 中华预防医学会劳动卫生与职业病分会职业性肺部疾病学组. 尘肺病治疗中国专家共识 (2018 年版) [J]. 环境与职业医学, 2018, 35 (8) : 677-689.
- [8] 苏程程,向国安,马永强,等. ATP 清除剂三磷酸腺苷双磷酸酶对实验性矽肺的干预作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32 (5) : 792-797.
- [9] CHOI H K, POKHAREL Y R, LIM S C, et al. Inhibition of liver fibrosis by solubilized coenzyme Q10 : role of Nrf2 activation in inhibiting transforming growth factor- β 1 expression [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2009, 240 (3) : 377-384.
- [10] XUE R, WANG J, YANG L, et al. Coenzyme Q10 ameliorates pancreatic fibrosis via the ROS-triggered mTOR signaling pathway [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019 : 8039694.
- [11] ALEHAGEN U, AASETH J, ALEXANDER J, et al. Less fibrosis in elderly subjects supplemented with selenium and coenzyme Q10—A mechanism behind reduced cardiovascular mortality? [J]. BioFactors, 2018, 44 (2) : 137-147.
- [12] 徐忠波,赵杰,贾晓明,等. 骨化三醇对大鼠矽肺纤维化的干预作用及其机制 [J]. 环境与职业医学, 2018, 35 (3) : 272-276.
- [13] 陈紫莺,候晓敏,崔洁,等. 银杏叶提取物改善肺内淋巴转运对大鼠矽肺病程的影响 [J]. 环境与职业医学, 2018, 35 (4) : 366-370.
- [14] 王娜,杨萌,雷素英,等. 多聚鸟苷酸干预大鼠矽肺纤维化的内质网应激作用机制 [J]. 中国职业医学, 2017, 44 (4) : 399-407.
- [15] LIU F, LIU J, WEND D, et al. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells depletion may attenuate the development of silica-induced lung fibrosis in mice [J]. PLoS One, 2010, 5 (11) : e15404.
- [16] 肖新才,冯翔,苏宜香. 辅酶 Q10 抗氧化作用研究进展 [J]. 国外医学卫生学分册, 2003, 30 (4) : 216-221.
- [17] 刘微,刘和亮,张秀峰,等. 矽肺大鼠肺内淋巴管增生与纤维化进程的关系 [J]. 环境与职业医学, 2016, 33 (8) : 753-757.
- [18] 张爱琴,张永军,马胜林,等. 中肺合剂对放射性肺损伤大鼠肺羟脯氨酸的影响 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2018, 18 (5) : 288-289.
- [19] 黄霖晗,韩佳,徐昌君,等. 黄芪甲苷对肺纤维化小鼠 α -SMA、I 型和 III 型胶原表达影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21 (1) : 47-50.
- [20] 胡青青,周恩敏,金克,等. 褪黑素对博来霉素诱导肺纤维化小鼠 α -SMA 和 E-cadherin 表达的影响 [J]. 温州医科大学学报, 2018, 48 (8) : 577-581.

(英文编辑:汪源;编辑:龚士洋,陈姣;校对:王晓宇)