

氧化钕暴露对小鼠肺组织炎症因子及转化生长因子- β /Smads通路的影响

吕佳玲, 王素华, 高艳荣, 李怡博, 宋海燕

内蒙古科技大学包头医学院, 内蒙古 包头 014040

摘要:

[背景] 稀土氧化钕 (Nd_2O_3) 可引起大鼠肺组织形成细胞纤维结节, 但其机制尚不明确。转化生长因子- β (TGF- β)/Smads 信号通路是经典致纤维化通路, 但其在 Nd_2O_3 导致的肺损伤过程中的作用少有研究。

[目的] 探讨 Nd_2O_3 对雄性小鼠肺组织炎症因子及纤维化因子含量以及细胞信号转导分子 *Smad2*、*Smad3* 表达情况的影响, 初步阐明 Nd_2O_3 致小鼠肺损伤的机制。

[方法] 将 144 只 SPF 级健康成年雄性小鼠随机分为 1 个对照组和 3 个 Nd_2O_3 染尘组, 每组 36 只, 采用非暴露式气管注入法建立小鼠肺损伤模型。3 个染尘组分别灌注 62.5、125、250 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Nd_2O_3 悬液, 灌肺体积为 0.1 mL, 对照组给予等体积的生理盐水, 分别于染尘后第 7、14、28 天各组分别处死 12 只小鼠。采用 HE 染色后显微镜下观察各组小鼠肺组织, 碱水解法测定肺组织中羟脯氨酸 (HYP) 含量, 酶联免疫吸附试验检测肺组织中肿瘤坏死因子 (TNF- α)、白介素 6 (IL-6)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、结缔组织生长因子 (CTGF) 含量, 实时荧光定量 PCR 法检测肺组织中 *Smad2*、*Smad3* mRNA 相对表达量, 蛋白质免疫印迹法检测 250 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量组肺组织中 *Smad2*、*Smad3* 及其 p-*Smad2*、p-*Smad3* 蛋白相对表达量。

[结果] HE 染色结果显示, 第 7 天染尘组小鼠肺组织以炎性渗出为主, 第 14 天有明显的纤维增生, 第 28 天时高剂量出现细胞纤维结节。染尘后第 7、14、28 天时, 125、250 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Nd_2O_3 染尘组小鼠肺组织 HYP 含量均高于对照组, 在第 28 天时 250 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组达到最高, 为 (1.87 \pm 0.19) $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。与对照组比较: 除 14 天 TGF- β 1 外, 染尘后第 7、14、28 天, 各 Nd_2O_3 染尘组小鼠肺组织中的 IL-6、TNF- α 、TGF- β 1、CTGF 的含量均升高 (均 $P < 0.05$); IL-6、TNF- α 在染尘第 14 天升到最高, 250 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Nd_2O_3 组小鼠肺组织中含量分别为 (5 502.96 \pm 76.53)、(2 484.58 \pm 71.82) $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$; TGF- β 1、CTGF 的含量在第 28 天达到最高, 250 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Nd_2O_3 组小鼠肺组织中含量分别为 (0.71 \pm 0.08)、(6.17 \pm 0.19) $\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。除第 7 天 *Smad3* 外, 染尘后各时间点小鼠肺组织中 *Smad2*、*Smad3* mRNA 相对表达量均升高 (均 $P < 0.05$), *Smad2*、*Smad3* 在 mRNA 水平上均在染尘第 28 天达到最高, 此时 250 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Nd_2O_3 组小鼠肺组织中 *Smad2*、*Smad3* mRNA 相对表达量分别为 10.04 \pm 0.61、11.87 \pm 0.88。250 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Nd_2O_3 组小鼠肺组织中 *Smad2*、*Smad3*、p-*Smad2*、p-*Smad3* 蛋白相对表达水平均高于对照组 ($P < 0.05$), *Smad2* 蛋白在第 28 天时达到最高, 相对表达量为 1.16 \pm 0.16, *Smad3*、p-*Smad2*、p-*Smad3* 第 14 天时达到最高, 相对表达量分别为 2.05 \pm 0.10、1.37 \pm 0.05、2.63 \pm 0.09。

[结论] Nd_2O_3 暴露可引起小鼠肺组织发生炎症反应和纤维化, 其机制可能与 TGF- β /Smads 通路的激活有关。

关键词: 稀土; 氧化钕; 肺纤维化; 转化生长因子- β 1; 细胞信号转导分子

Effect of neodymium oxide exposure on inflammatory factors and transforming growth factor- β /Smads pathway in mouse lung tissues LYU Jialing, WANG Suhua, GAO Yanrong, LI Yibo, SONG Haiyan (Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou, Inner Mongolia 014040, China)

Abstract:

[Background] Rare earth neodymium oxide (Nd_2O_3) can cause cell fibrous nodules in rat lung tissues, but the mechanism is not clear. The transforming growth factor- β (TGF- β)/Smads signaling pathway is a classic fibrosis pathway, but its role in lung injury caused by Nd_2O_3 is rarely studied.

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.21009

基金项目

国家自然科学基金项目 (81860575, 82073524); 内蒙古自治区研究生教育创新计划项目 (SZ2020053)

作者简介

吕佳玲 (1995—), 女, 硕士生;
E-mail: 2285734099@qq.com

通信作者

王素华, E-mail: bt_wangshuhua@163.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-01-08

录用日期 2021-07-22

文章编号 2095-9982(2021)09-1022-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

► 引用

吕佳玲, 王素华, 高艳荣, 等. 氧化钕暴露对小鼠肺组织炎症因子及转化生长因子- β /Smads 通路的影响 [J]. 环境与职业医学, 2021, 38(9): 1022-1028.

► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21009

Funding

This study was funded.

Correspondence to

WANG Suhua, E-mail: bt_wangshuhua@163.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2021-01-08

Accepted 2021-07-22

► To cite

LYU Jialing, WANG Suhua, GAO Yanrong, et al. Effect of neodymium oxide exposure on inflammatory factors and transforming growth factor- β /Smads pathway in mouse lung tissues[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(9): 1022-1028.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21009

[Objective] This experiment explores the effects of Nd_2O_3 on lung tissue inflammatory factors, fibrosis factors, and cell signaling transduction molecules *Smad2* and *Smad3*, and preliminarily elucidates the mechanism of Nd_2O_3 induced lung injury in mice.

[Methods] A total of 144 SPF-grade healthy adult male mice were randomly divided into one control group and three Nd_2O_3 exposed groups, with 36 mice in each group. Non-exposed tracheal injection was used to establish mouse lung injury models. The three exposed groups were perfused with 0.1 mL Nd_2O_3 suspension at 62.5, 125, and 250 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. The control group was given equal volumes of normal saline. Twelve mice in each group were sacrificed 7, 14, and 28 days after exposure respectively. Lung tissue morphology was observed with hematoxylin-eosin staining (HE staining); hydroxyproline (HYP) was determined by alkaline hydrolysis method; tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), and connective tissue growth factor (CTGF) in mouse lung tissues were detected by enzyme-linked immunosorbent assay; the relative expression levels of *Smad2* and *Smad3* mRNA in the lung tissues of mice were evaluated by real-time quantitative PCR; the relative expressions of *Smad2*, *Smad3*, p-*Smad2*, and p-*Smad3* proteins in the lung tissues of the 250 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ group were detected by Western blotting.

[Results] The results of HE staining showed that after the mice were exposed to Nd_2O_3 , compared with the control group, the exposed groups showed inflammatory exudation on the 7th day, fibrogenesis on the 14th day, and cell fibrous nodules on the 28th day. The HYP levels in the lung tissues of mice on the 7th, 14th, and 28th days after exposure were higher than those in the control group, and the 250 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ group on the 28th day reached the highest level, $(1.87\pm 0.19) \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$. Compared with the control group, the levels of IL-6, TNF- α , TGF- β 1, and CTGF in the lung tissues in the exposed groups were higher than those in the control group on the 7th, 14th, and 28th days ($P < 0.05$), except the TGF- β 1 level on the 14th day; the levels of IL-6 and TNF- α rose to the highest on the 14th day, and the levels in the 250 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Nd_2O_3 group were $(5\,502.96\pm 76.53)$ and $(2\,484.58\pm 71.82) \text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$, respectively; the levels of TGF- β 1 and CTGF reached the highest on the 28th day, and the levels in the 250 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Nd_2O_3 group were (0.71 ± 0.08) and $(6.17\pm 0.19) \text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$, respectively. The relative expression levels of *Smad2* and *Smad3* mRNA in the lung tissues of mice at each time point after exposure were higher than those in the control group ($P < 0.05$), except *Smad3* mRNA on the 7th day; the mRNA levels of *Smad2* and *Smad3* reached the highest on the 28th day, and the levels in the 250 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Nd_2O_3 group were 10.04 ± 0.61 and 11.87 ± 0.88 respectively. The relative protein expression levels of *Smad2*, *Smad3*, p-*Smad2*, and p-*Smad3* in the 250 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Nd_2O_3 group were higher than those in the control group ($P < 0.05$); the *Smad2* level reached a maximum of 1.16 ± 0.16 on the 28th day, and the levels of *Smad3*, p-*Smad2*, and p-*Smad3* reached a maximum of 2.05 ± 0.10 , 1.37 ± 0.05 , and 2.63 ± 0.09 respectively on the 14th day.

[Conclusion] Nd_2O_3 exposure can cause inflammation and fibrosis in the lung tissues of mice, and the mechanism may be related to the activation of the TGF- β /Smads pathway.

Keywords: rare earth; neodymium oxide; pulmonary fibrosis; transforming growth factor- β 1; cell signaling transduction molecule

稀土钕的用途日益广泛,但是在生产稀土钕的过程中,会产生稀土氧化钕(neodymium oxide, Nd_2O_3)粉尘,而稀土 Nd_2O_3 粉尘会导致一系列的职业病危害^[1]。已有研究发现,长期在钕及其化合物浓度较高环境中作业的工人肺部会产生纤维性病变,最终导致尘肺的形成^[2]。

二氧化硅(silicon dioxide, SiO_2)粉尘粒径 $< 0.5 \mu\text{m}$,经呼吸道进入肺组织,黏附在肺泡壁上,巨噬细胞吞噬粉尘激活了核因子- κB (nuclear factor kappa-B, NF- κB),激活的 NF- κB 不仅诱导释放白介素6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等促进炎症的细胞因子,还与下游转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)的启动子结合,诱导促纤维化因子 TGF- β 1 的表达^[1], TGF- β 1 与特异性受体结合,激活下游细胞信号转导分子 *Smad2*、*Smad3*, 并使其磷酸化(p-*Smad2*、p-*Smad3*)后进入细胞核,将组织纤维化信号传导入核,激活经典致纤维化通路 TGF- β /Smads 通路^[3]。

Nd_2O_3 为粒径 $0.2 \mu\text{m}$ 的粉尘,同 SiO_2 颗粒均属于

细颗粒,通过呼吸道进入肺部后,支气管和肺泡区域纤毛的摆动很难将其清除,沉积在肺部的粉尘颗粒大多被肺泡巨噬细胞吞噬^[1],从而激活 NF- κB 炎症通路,但是否会激活 TGF- β /Smads 通路尚不清楚。有学者研究表明巨噬细胞对 SiO_2 的识别是启动矽肺发病的关键点,而肺泡巨噬细胞在吞噬粉尘的过程中被活化,产生固有免疫应答反应,其特征表现为细胞因子及生长因子的合成与释放^[4]。有研究发现, Nd_2O_3 灌肺后会引起大鼠肺组织急性损伤,前期以炎症损伤为主,晚期形成纤维细胞性结节^[1],胶原表达也同时增多,而羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)可反映胶原的代谢情况,因此测定 HYP 的含量可换算成胶原含量。流行病学调查发现,稀土粉尘可以导致尘肺,其影像学具有一般尘肺的特点,却又轻于一般尘肺如矽肺,但其机制不详^[5]。

本研究将 C57BL/6 雄性小鼠暴露于不同浓度稀土 Nd_2O_3 后,观察染尘后第 7、14、28 天小鼠肺组织病理学变化,检测小鼠肺组织中 HYP、炎症因子 IL-6/TNF- α 、促纤维化因子 TGF- β 1、结缔组织生长因子

(connective tissue growth factor, CTGF) 的含量以及 TGF- β /Smads 通路上 *Smad2*、*Smad3* mRNA 相对表达量、各蛋白表达量, 探讨 TGF- β /Smads 通路在 Nd_2O_3 致小鼠肺损伤过程中的作用, 初步阐明 Nd_2O_3 致小鼠肺损伤过程中的机制。

1 对象与方法

1.1 实验试剂与仪器

Nd_2O_3 购于中国包头市瑞鑫稀土冶炼厂, 麻醉剂三溴乙醇购于中国南京爱贝生物科技有限公司, 酶联免疫吸附试验试剂盒购于中国武汉伊莱瑞特公司, 总 RNA 提取、反转录、实时荧光定量 PCR 以及蛋白质的检测试剂盒均购买于美国 Promega 公司。

低温高速离心机 (TDZ-WS) 产于中国上海安亭科学仪器厂, Cyler[®]96 instrument PCR 仪购于美国 Applied Biosystems 公司, BAYGENE 电泳仪 (BG-Power600k) 购于中国北京百晶生物技术有限公司, 多功能微孔板检测系统 (Synergy HT) 购于美国 Bio Tek 公司, SYNGENE 凝胶成像及分析系统购于英国 SYNGENE 公司。

1.2 动物分组与染尘

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 144 只, 体重 20~22 g, 购自中国斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 生产许可证号: SCXK (京) 2019-0010。所有小鼠均饲养在内蒙古科技大学包头医学院实验动物中心, 自由摄食及饮水。本研究经包头医学院伦理审查委员会的评估 [批准号: 包医伦审 2018 第 (020) 号]。饲养条件: 室温控制在 (24 \pm 3) $^{\circ}\text{C}$, 室内湿度 (50 \pm 10)%, 12h 间断照明, 昼夜交替, 定时排风换气, 保持室内无噪声、无强刺激等。

实验动物随机分为 1 个对照组和 3 个染尘组, 每组 36 只, 将 121 $^{\circ}\text{C}$ 、20 min 高压灭菌后的 Nd_2O_3 溶于无菌生理盐水制成 62.5、125、250 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ Nd_2O_3 悬液, 置于磁力搅拌器上备用。使用三溴乙醇麻醉小鼠后, 分别取各浓度 Nd_2O_3 悬液各 0.1 mL 通过非暴露式一次性气管注入法灌肺, 对照组灌注 0.1 mL 生理盐水。染尘后分别于第 7、14、28 天三个时间点处死小鼠, 每组每个时间点均处死 12 只, 取肺组织进行检测。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 肺组织病理学检查 称重之后取小鼠左侧肺组织固定于 4% 多聚甲醛中, 进行 HE 染色, 在 200 倍显微镜下观察。

1.3.2 碱水解法测定肺组织中 HYP 含量 称取小鼠右

侧肺组织 80 mg 于 10 mL 比色管, 加水解液, 水浴。冷却加指示剂, 摇匀加 pH 调节剂, 液体出现黄绿色停止。加双蒸水至刻度线。取水解液加活性炭, 混匀后离心, 取上清加底物液, 混匀静置加缓冲液, 5 min 后加显色剂, 再次水浴冷却后离心取上清, 双蒸水调零后于 550 nm 波长下测光密度值。

1.3.3 酶联免疫吸附试验检测肺组织中 TNF- α 、IL-6、TGF- β 1、CTGF 含量 取 10 mg 小鼠肺组织置于 2.0 mL 离心管中, 与预冷的磷酸盐缓冲液按照质量体积比 1 g : 9 mL 的比例制成组织匀浆, 5 000 $\times g$ 离心 10 min, 取上清, 按试剂盒说明书的操作步骤通过酶联免疫吸附法进行测定。

1.3.4 实时荧光定量 PCR 法检测肺组织中 *Smad2*、*Smad3* mRNA 表达量 使用 ReliaPrep[™]miRNA Cell and Tissue Miniprep System 试剂盒提取肺组织总 RNA, 使用北京全式金生物技术有限公司 AT351-01 试剂盒进行逆转录, 之后进行实时荧光定量 PCR 反应。每个样品设置 3 个复孔, 以 β -actin 为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各样品的 mRNA 相对表达量。引物由上海生物工程有限公司合成, 各基因引物序列见表 1。按照 95 $^{\circ}\text{C}$, 120 s, 循环 1 次; 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s 循环 50 次; 温度降至 75 $^{\circ}\text{C}$ 后 mRNA 实时荧光定量 PCR 反应完成。

表 1 引物序列表
Table 1 Gene primer sequence

基因名称	上游引物 5'-3'	下游引物 5'-3'
<i>Smad2</i>	ctc tcc aac gtt aac cga aat g	cac cta tgt aat aca agc gca c
<i>Smad3</i>	att cca ttc ccg aga aca cta a	tag gtc caa gtt att gtg tgc t
β -actin	cta cct cat gaa gat cct gac c	cac agc ttc tct ttg atg tca c

1.3.5 蛋白质免疫印迹法检测肺组织 *Smad2*、*Smad3*、p-*Smad2*、p-*Smad3* 蛋白表达量 通过对各染尘剂量组小鼠肺组织 HE 染色、HYP 的检测, 发现在 250 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ Nd_2O_3 剂量下, 小鼠肺组织纤维化损伤最为明显, 因此每组选取 3 只小鼠, 检测肺组织中 *Smad2*、*Smad3*、p-*Smad2*、p-*Smad3* 蛋白表达量。取小鼠肺组织称重 30 mg, 剪碎后加入蛋白裂解液, 于冰上破碎组织, 静置离心后取上清液蛋白定量、变性, 经电泳、转膜、封闭、孵育、洗膜后, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参进行 *Smad2*、*Smad3*、p-*Smad2*、p-*Smad3* 蛋白相对表达量的测定。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 22.0 软件进行分析, 计量资料均以均

数±标准差表示,对数据进行正态性检验和方差齐性检验。*Smad2*、*Smad3*蛋白相对表达量符合正态分布且方差齐,采用两独立样本 *t* 检验。HYP、IL-6、TNF- α 、TGF- β 1、CTGF、*Smad2/Smad3* mRNA 表达量采用方差分析,方差齐的数据采用 LSD-*t* 进行两两比较;染尘第7天 HYP、TNF- α 、*Smad2/Smad3* mRNA 表达量、染尘第14天 *Smad3* mRNA 表达量、染尘第28天 TNF- α 含量方差不齐,采用 Dunnett's T3 检验进行两两比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况观察

灌肺时无动物死亡,各组动物体重随实验时间逐渐增加,各组小鼠体重变化如图1。

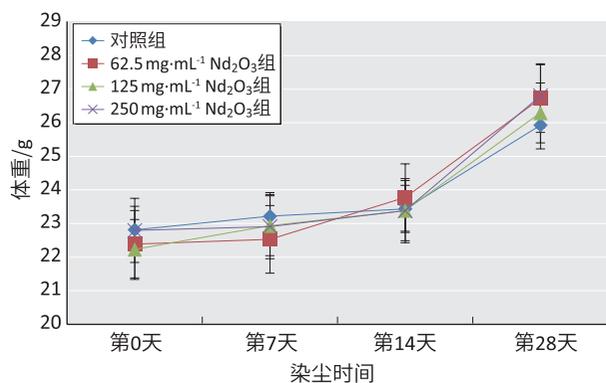


图1 Nd₂O₃ 染尘后小鼠体重变化 (n=12)

Figure 1 Changes in body weight of mice after Nd₂O₃ exposure (n=12)

2.2 HE 染色病理结果

生理盐水对照组肺泡结构完整;小鼠暴露于 Nd₂O₃ 后,第7天肺组织以炎性渗出为主,第14天有明显的纤维增生,第28天时高剂量出现细胞纤维结节。见图2。

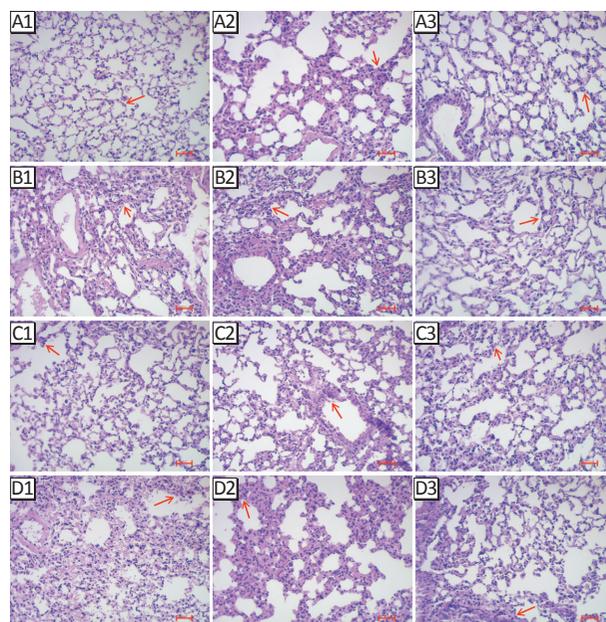
2.3 HYP 含量

染尘后第7、14、28天时,125、250 mg·mL⁻¹ Nd₂O₃ 染尘组 HYP 含量均高于对照组 ($P<0.05$),且在染尘后第28天时,250 mg·mL⁻¹ Nd₂O₃ 组 HYP 含量达到最高,为 (1.87±0.19) $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。见表2。

2.4 IL-6、TNF- α 、TGF- β 1、CTGF 含量

除14天 TGF- β 1 外,染尘后第7、14、28天,各 Nd₂O₃ 染毒组小鼠肺组织中的 IL-6、TNF- α 、TGF- β 1、CTGF 的含量均高于对照组 (均 $P<0.05$)。在染尘后第14天时,小鼠肺组织中 IL-6、TNF- α 的含量达到最高;促纤维化因子 TGF- β 1、CTGF 的含量在第28天达到最

高。见表3。



[注] A: 对照组; B: 62.5 mg·mL⁻¹ Nd₂O₃ 组; C: 125 mg·mL⁻¹ Nd₂O₃ 组; D: 250 mg·mL⁻¹ Nd₂O₃ 组。1: 第7天; 2: 第14天; 3: 第28天。

图2 Nd₂O₃ 染尘后小鼠肺组织 HE 染色结果 (×200)

Figure 2 HE staining results of the lung tissues in mice after Nd₂O₃ exposure (×200)

表2 Nd₂O₃ 染尘后各组小鼠肺组织 HYP 含量比较 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table2 Comparison of HYP levels in the lung tissues of mice after Nd₂O₃ exposure ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	染尘时间		
	第7天	第14天	第28天
对照组	0.77±0.01	1.01±0.09	0.94±0.00
62.5 mg·mL ⁻¹ Nd ₂ O ₃ 组	0.94±0.01 ^a	1.10±0.09	1.24±0.08 ^a
125 mg·mL ⁻¹ Nd ₂ O ₃ 组	1.49±0.13 ^{ab}	1.53±0.06 ^{ab}	1.50±0.02 ^{ab}
250 mg·mL ⁻¹ Nd ₂ O ₃ 组	1.54±0.01 ^{ab}	1.63±0.08 ^{ab}	1.87±0.19 ^{abc}
F	104.93	43.147	44.36
P	<0.05	<0.05	<0.05

[注] a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与 62.5 mg·mL⁻¹ Nd₂O₃ 组比较, $P<0.05$; c: 与 125 mg·mL⁻¹ Nd₂O₃ 组比较, $P<0.05$ 。

2.5 Smad2、Smad3 mRNA 的表达

除第7天 *Smad3* 外,染尘后第7、14、28天各 Nd₂O₃ 染尘组 *Smad2*、*Smad3* mRNA 的相对表达量均高于对照组 (均 $P<0.05$),且随着染尘剂量的升高,染尘后小鼠肺组织中 *Smad2*、*Smad3* mRNA 的相对表达量呈现增多的趋势,以 250 mg·mL⁻¹ Nd₂O₃ 组相对表达量最多。染尘第28天时,250 mg·mL⁻¹ Nd₂O₃ 组小鼠肺组织中 *Smad2*、*Smad3* mRNA 相对表达量分别达到 10.04±0.61、11.87±0.88。见表4。

表3 Nd₂O₃ 染尘后各组小鼠肺组织 IL-6、TNF-α、TGF-β1、CTGF 含量 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 3 The levels of IL-6, TNF-α, TGF-β1, and CTGF in the lung tissues of mice after Nd₂O₃ exposure ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	IL-6/ (pg·mg ⁻¹)			TNF-α/ (pg·mg ⁻¹)		
	第7天	第14天	第28天	第7天	第14天	第28天
对照组	1178.67±7.08	1378.79±140.91	1430.23±19.75	1066.27±41.66	1374.01±23.65	1366.82±113.12
62.5 mg·mL ⁻¹ Nd ₂ O ₃ 组	1653.59±39.86 ^a	3943.34±262.64 ^a	3115.10±144.43 ^a	1580.83±7.67 ^a	1760.26±8.01 ^a	1660.53±18.48 ^a
125 mg·mL ⁻¹ Nd ₂ O ₃ 组	2653.42±119.7 ^{ab}	4438.41±33.14 ^{ab}	3392.30±28.02 ^{ab}	1817.04±16.02 ^{ab}	1964.75±10.61 ^{ab}	1871.53±4.01 ^{ab}
250 mg·mL ⁻¹ Nd ₂ O ₃ 组	3493.35±231.4 ^{abc}	5502.96±76.53 ^{abc}	4368.02±127.32 ^{abc}	2300.58±10.89 ^{abc}	2484.58±71.82 ^{abc}	2467.69±68.36 ^{abc}
F	307.89	639.57	780.84	2426.75	726.07	243.48
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

组别	TGF-β1/ (ng·mg ⁻¹)			CTGF/ (ng·mg ⁻¹)		
	第7天	第14天	第28天	第7天	第14天	第28天
对照组	0.23±0.00	0.25±0.04	0.24±0.05	2.97±0.07	2.94±0.14	3.38±0.03
62.5 mg·mL ⁻¹ Nd ₂ O ₃ 组	0.29±0.04 ^a	0.30±0.02	0.35±0.03 ^a	3.13±0.16 ^a	4.67±0.13 ^a	5.18±0.13 ^a
125 mg·mL ⁻¹ Nd ₂ O ₃ 组	0.31 ±0.01 ^a	0.38±0.05 ^{ab}	0.38±0.01 ^a	4.46±0.03 ^{ab}	5.14±0.14 ^{ab}	5.29±0.13 ^a
250 mg·mL ⁻¹ Nd ₂ O ₃ 组	0.42±0.01 ^{abc}	0.44±0.07 ^{ab}	0.71±0.08 ^{abc}	5.56±0.14 ^{abc}	6.09±0.15 ^{abc}	6.17±0.19 ^{abc}
F	72.29	14.89	88.52	575.46	425.473	381.06
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

[注] a : 与对照组比较, P<0.05 ; b : 与 62.5 mg·mL⁻¹ Nd₂O₃ 组比较, P<0.05 ; c : 与 125 mg·mL⁻¹ Nd₂O₃ 组比较, P<0.05。

表4 Nd₂O₃ 染尘后各组小鼠肺组织 Smad2、Smad3 mRNA 的相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

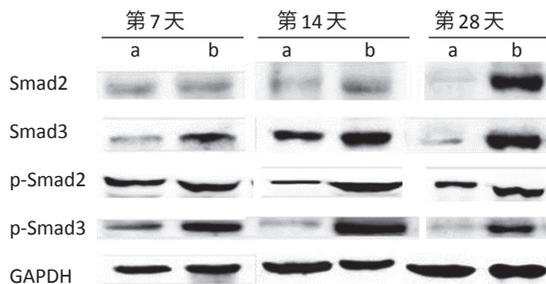
Table 4 The relative expression levels of Smad2 and Smad3 mRNA in the lung tissues of mice after Nd₂O₃ exposure ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	Smad2			Smad3		
	第7天	第14天	第28天	第7天	第14天	第28天
对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
62.5 mg·mL ⁻¹ Nd ₂ O ₃ 组	3.49±0.40 ^a	4.60±1.00 ^a	4.85±0.88 ^a	1.79±0.43	4.37±0.16 ^a	6.70±0.86 ^a
125 mg·mL ⁻¹ Nd ₂ O ₃ 组	4.70±0.57 ^a	5.64±0.76 ^a	8.70±0.83 ^a	3.02±0.53 ^a	8.67±0.15 ^a	9.62±0.27 ^a
250 mg·mL ⁻¹ Nd ₂ O ₃ 组	5.43±0.63 ^a	7.81±0.96 ^a	10.04±0.61 ^a	5.32±0.70 ^a	9.37±0.28 ^a	11.87±0.88 ^a
F	78.8	56.91	162.04	58.96	2448.89	261.74
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

[注] a : 与对照组比较, P<0.05。

2.6 Smad2、Smad3、p-Smad2、p-Smad3 蛋白的表达

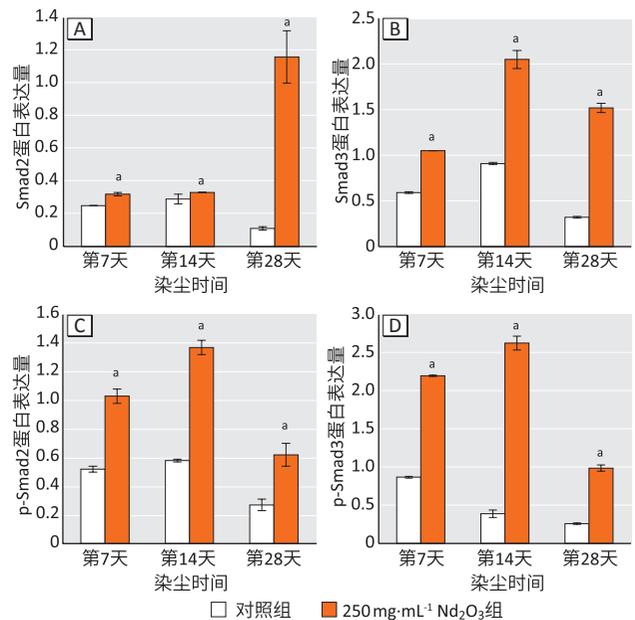
在 250 mg·mL⁻¹ Nd₂O₃ 剂量下, 染尘后小鼠肺组织中 Smad2、Smad3、p-Smad2、p-Smad3 蛋白相对表达量均高于对照组 (P<0.05), Smad2 蛋白相对表达量在染尘后第 28 天达到最高, 与 mRNA 检测结果一致; 而 Smad3、p-Smad2、p-Smad3 蛋白相对表达量在第 14 天达到最高, 第 28 天出现下降。见图 3、图 4。



[注] a : 对照组 ; b : 250 mg·mL⁻¹ Nd₂O₃ 组。

图3 250 mg·mL⁻¹ Nd₂O₃ 组小鼠肺组织 Smad2、Smad3、p-Smad2、p-Smad3 蛋白表达量条带图 (n=3)

Figure 3 The protein expression bands of Smad2, Smad3, p-Smad2, and p-Smad3 in the lung tissues of mice in the 250 mg·mL⁻¹ Nd₂O₃ group (n=3)



[注] a : 与对照组比较, P<0.05。

图4 250 mg·mL⁻¹ Nd₂O₃ 组小鼠肺组织 Smad2 (A)、Smad3 (B)、p-Smad2 (C)、p-Smad3 (D) 蛋白相对表达量 (n=3)

Figure 4 The relative expression levels of Smad2 (A), Smad3 (B), p-Smad2 (C), and p-Smad3 (D) proteins in the lung tissues of mice in the 250 mg·mL⁻¹ Nd₂O₃ group (n=3)

3 讨论

本研究对雄性健康成年小鼠进行Nd₂O₃灌肺染尘处理后,小鼠肺组织HE结果显示,在染尘后第28天时,250 mg·mL⁻¹ Nd₂O₃组小鼠肺组织有细胞纤维结节形成。HYP的检测结果表明,染尘组小鼠肺组织HYP含量在各时间点高于对照组,且在染尘第28天时,250 mg·mL⁻¹ Nd₂O₃组小鼠肺组织中HYP含量达到最高。这一结果说明Nd₂O₃染尘后可以引起小鼠肺组织中胶原纤维表达量升高,250 mg·mL⁻¹ Nd₂O₃可导致小鼠肺纤维化。

Nd₂O₃进入人体后,因其粒径小,最终会黏附在肺泡腔的表面。Nd₂O₃颗粒的入侵,会激活巨噬细胞,在清除Nd₂O₃粉尘异物的同时释放大量的炎症因子^[6]。在粉尘进入肺组织,引起组织炎症时,单核巨噬细胞活化后会产生TNF-α、IL-6、TGF-β1以及CTGF等细胞因子。TNF-α是一种可以诱导白细胞在炎症部位大量聚集的促炎因子,它不仅激活嗜中性粒细胞,还提高其吞噬能力,更与IL-1β共同放大IL-6的表达,在免疫调节和炎症调节中发挥重要作用,各种炎症因子共同促进肺纤维化发展^[7]。本实验结果发现:在染尘后第7、14、28天时,各染尘剂量组小鼠肺组织中IL-6、TNF-α含量均高于对照组,且在第14天时达到最高。以上结果表明Nd₂O₃暴露可引起小鼠炎症因子水平升高。粉尘进入肺组织,首先会引起肺组织炎症反应,持续性的炎症反应最终会引起肺组织纤维化,在这一过程中TGF-β1发挥着关键作用。在肺纤维化发生和形成中产生的TGF-β1,在与细胞膜上的特异性受体结合后,TGF-β1信号通路中的递质分子Smad2、Smad3活化,磷酸化后的Smad2、Smad3携带纤维化信号进入细胞核,促进纤维蛋白的合成,致使纤维蛋白在肺间质和肺泡间过度沉积^[8]。有研究发现,Smad3是TGF-β1受体激活后起纤维化作用的主要靶点,以Smad3磷酸化为TGF-β/Smads通路激活的关键标志^[9]。而且TGF-β1可以与其下游效应分子CTGF促成肺组织纤维化的发生^[10]。本研究发现在染尘第7、14、28天时各染尘剂量组TGF-β1、CTGF均高于对照组,各染尘剂量组小鼠肺组织中TGF-β/Smads通路相关基因Smad2、Smad3 mRNA及蛋白相对表达量较对照组均升高,且250 mg·mL⁻¹ Nd₂O₃剂量组p-Smad2、p-Smad3蛋白表达量较对照组均升高。染尘第28天时,Smad3 mRNA相对表达量达到最高,但其蛋白相对表达量却较染尘第14天有所下降。可能是由于从mRNA到蛋白

质的翻译过程受多种因素的影响,如mRNA非翻译区序列的差异变化、mRNA核糖体结合部位的序列、转运RNA丰度等,这些因素影响了蛋白质的合成,导致mRNA与蛋白质表达水平出现差异^[11]。以上结果表明小鼠暴露于Nd₂O₃后,肺组织内TGF-β/Smads通路启动因子TGF-β1、协同因子CTGF、TGF-β/Smads通路中的关键基因Smad2、Smad3表达水平升高,p-Smad2、p-Smad3表达水平升高,提示Nd₂O₃可以激活TGF-β/Smads通路,最终引起肺组织纤维化。

综上,本研究显示稀土Nd₂O₃暴露可引起小鼠肺组织发生炎症反应和纤维化,其机制可能与TGF-β/Smads通路的激活有关。

参考文献

- [1] 刘莉,戴纪强,志强,等. 稀土对人体健康损害研究进展[J]. 中国职业医学, 2019, 46(5): 625-627, 632.
LIU L, DAI JQ, ZHI Q, et al. Research progress on rare earth in the damage of human health [J]. China Occup Med, 2019, 46(5): 625-627, 632.
- [2] 郑姗姗. NF-κB炎症通路在稀土氧化钕颗粒物致大鼠肺炎性损伤过程中的作用及机制研究[D]. 包头: 内蒙古科技大学包头医学院, 2015.
ZHENG SS. Regulation of NF-κB signaling in Neodymium oxide induced lung acute injury [D]. Baotou: Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, 2015.
- [3] HU HH, CHEN DQ, WANG YN, et al. New insights into TGF-β/Smad signaling in tissue fibrosis [J]. Chem-Biol Interact, 2018, 292: 76-83.
- [4] ZHOU Z, JIANG R, YANG X, et al. circRNA mediates silica-induced macrophage activation via HECTD1/ZC3H12A-dependent ubiquitination [J]. Theranostics, 2018, 8(2): 575-592.
- [5] 色音图,王琳琳,贺咏平,等. 稀土尘肺病的影像学研究[J]. 中国冶金工业医学杂志, 2020, 37(2): 141-142.
SE YT, WANG LL, HE YP, et al. Imaging study of rare earth pneumoconiosis [J]. Chin Med J Metall Ind, 2020, 37(2): 141-142.
- [6] SHAPOURI-MOGHADDAM A, MOHAMMADIAN S, VAZINI H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(9): 6425-6440.
- [7] 吴雨珊,金寿德,强丽霞,等. IL-1β、IL-6及TNF-α在慢性

- 阻塞性肺疾病中的作用及研究进展 [J]. 国际呼吸杂志, 2021, 41 (4) : 298-303.
- WU YS, JIN SD, QIANG LX, et al. Role and research progress of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Int J Respir, 2021, 41 (4) : 298-303.
- [8] 傅为武, 欧阳雅蓉, 黄彩依, 等. 基于 TGF- β 1/Smads 通路治疗心肌纤维化的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2021, 18 (4) : 41-44.
- FU W W, OUYANG YR, HUANG CY, et al. Research progress of treatment of myocardial fibrosis based on TGF- β 1/Smads pathway [J]. China Med Herald, 2021, 18 (4) : 41-44.
- [9] XIAO J, MENG XM, HUANG XR, et al. miR-29 inhibits bleomycin-induced Pulmonary fibrosis in mice [J]. Mol Ther, 2012, 20 (6) : 1251-1260.
- [10] 黄莺, 徐芳. 虎杖总蒽醌对肺间质纤维化大鼠上皮间质转化过程中 TGF β 1-smad 信号通路的影响 [J]. 中成药, 2021, 43 (1) : 204-207.
- HUANG Y, XU F. Effect of polygonum cuspidatum total anthraquinone on TGF β 1-smad signaling pathway in the process of epithelial-mesenchymal transition in rats with pulmonary interstitial fibrosis [J]. Chin Tradit Patent Med, 2021, 43 (1) : 204-207.
- [11] 常美会, 初晓宇, 伍宁丰. 翻译速率对重组蛋白表达影响的研究进展 [J]. 中国农业科技导报, 2017, 19 (4) : 45-50.
- CHANG MH, CHU XY, WU NF. Progress on the influence of translation rate on the expression of recombinant proteins [J]. J Agric Sci Technol, 2017, 19 (4) : 45-50.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 王晓宇)

第十六届全国环境与职业医学研究生学术研讨会会议通知 (第二轮)

为活跃学术思想、拓展研究视野、鼓励创新意识、增进校际交流和培养年轻人才, 由《环境与职业医学》编委会和中南大学湘雅公共卫生学院主办, 南华大学公共卫生学院、上海市预防医学会协办的“第十六届全国环境与职业医学研究生学术研讨会”将于 2021 年 10 月 21—24 日在湖南长沙举行。

一、会议主题

研究与实践 —— 弥合裂痕

二、会议安排

本次会议将包括: ①大会特邀专家报告; ②大会研究生报告; ③分会报告与讨论、专家点评。同时将设立优秀论文奖、优秀大会报告奖、优秀分会报告奖。

三、会议信息

(1) 会议时间和地点。时间: 10 月 21—24 日, 其中: 21 日报到, 22—23 日开会, 24 日离会。地点: 中南大学湘雅医学院湘雅图书馆 (湖南省长沙市桐梓坡路 172 号)。

(2) 会议费用。全日制在读研究生和受邀编委参会免缴会议费 (资料费), 研究生报到时请出示学生证; 其他参会人员收取会议费 (资料费) 1000 元。交通、食宿自理。会前转账, 转账信息如下。开户银行: 中信银行上海静安支行; 单位名称: 上海市预防医学会; 账号: 7311 4101 8260 0081 476; 转账请注明“16 届研会”字样及缴费者姓名。

四、报名方式

本届会议研究生参会仅限征文投稿者报名, 参会资格以获得编辑部确认参会邮件为准。2021 年 8 月 20 日起已开放报名通道, 请至 <https://www.wjx.cn/vj/eGSIF4I.aspx> 填写参会回执, 同时将导师签字的参会推荐信 (请至本刊主页 www.jeom.org 右侧“信息公告”下载) 发送至 jeom@scdc.sh.cn, 邮件标题请设为“第十六届研究生会参会推荐信+学校+姓名”。编委参会请选择“特邀嘉宾 (免收会议注册费)”即可。

五、联系方式

《环境与职业医学》编辑部: 汪源, 手机: 15901638562; E-mail: wangyuan@scdc.sh.cn。

中南大学湘雅公共卫生学院: 段燕英, 手机: 13755190365; E-mail: duanyan@csu.edu.cn

《环境与职业医学》编辑部

2021 年 9 月 25 日