

综合应激反应抑制剂对实验性矽肺纤维化模型中肺泡巨噬细胞内质网应激信号的调节作用

李雅倩, 安旭亮, 白倚菲, 刘洋, 高学敏, 蔡文臣, 徐洪, 杨方

华北理工大学公共卫生学院, 河北 唐山 063200



DOI 10.11836/JEOM23117

摘要:

[背景] 矽肺是我国最严重的职业病之一, 需要新的治疗靶点和疗法, 综合应激反应抑制剂 (ISRIB) 对矽肺的作用及机制仍未所知。

[目的] 研究 ISRIB 对矽肺纤维化的作用及可能的作用机制。

[方法] 研究分体内、外实验两部分。随机将 40 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠分为对照组、ISRIB 对照组、矽肺模型组、ISRIB 治疗组, 每组 10 只。采用气管一次灌注 50 μL 200 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ SiO_2 混悬液构建矽肺小鼠模型。灌注 SiO_2 一周 (对照组及 ISRIB 对照组灌注等量生理盐水) 后, 开始给 ISRIB 对照组及 ISRIB 治疗组小鼠每天腹腔注射 200 μL 2.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ISRIB, 其余组别注射等量生理盐水, 至 4 周。采用小动物 CT 仪观察各组小鼠肺野清晰度及肺纹理; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察各组小鼠肺组织病理学形态和矽结节形成情况; 采用 Van Gieson (VG) 染色观察结节胶原沉积情况; 采用免疫荧光法检测肺组织磷酸化 (p)-蛋白激酶 RNA 样 ER 激酶 (p-PERK) 的表达和定位, 采用免疫印迹法检测 I 型胶原蛋白 (Col I) 及内质网应激信号相关蛋白 p-PERK、磷酸化肌醇需求蛋白-1 α (p-IRE-1 α)、磷酸化真核翻译启动因子-2 α (p-eIF-2 α)、活化转录因子 4 (ATF4) 和 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3) 的表达情况。体外培养小鼠肺泡巨噬细胞 (MH-S 细胞), 分为对照组、ISRIB 对照组 (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、 SiO_2 诱导组 (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和 ISRIB 干预组 (先给予 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ISRIB 处理 1 h, 再给予 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ SiO_2 诱导)。采用免疫荧光法检测 MH-S 细胞 p-PERK 的表达; 采用免疫印迹法检测内质网应激信号相关蛋白 p-PERK、p-IRE-1 α 、p-eIF-2 α 和 ATF4 的表达情况。

[结果] 体内实验中, CT 结果显示矽肺模型组小鼠肺纹理增粗, 肺野内可见数个大小不等的高密度影, 主要分布于支气管周围; 和矽肺模型组相比, ISRIB 治疗组高密度影数量和体积均减少。HE 染色结果显示矽肺模型组部分肺组织失去正常肺结构, 有矽结节形成, 矽结节周围肺泡增厚, 有炎症细胞浸润; ISRIB 治疗组矽结节面积和个数明显减少, 矽结节范围被局限。VG 染色结果显示矽肺模型组肺组织胶原纤维面积占比为 21.47% \pm 2.59%; ISRIB 治疗组中, 肺组织胶原纤维面积占比降至 9.34% \pm 1.06%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。免疫荧光染色结果显示, 小鼠矽结节肺内 p-PERK 强表达, 且定位于巨噬细胞; 体外实验的 SiO_2 诱导的 MH-S 细胞中 p-PERK 荧光表达明显增加; 体内、外实验的 ISRIB 治疗或干预组中 p-PERK 表达强度均减弱。免疫印迹结果显示, 与对照组相比, 体内、外实验中 SiO_2 刺激后内质网应激信号相关蛋白 p-PERK、p-IRE-1 α 、p-eIF-2 α 和 ATF4 表达上调; 而与 SiO_2 诱导组相比, ISRIB 治疗或干预组中 p-PERK、p-IRE-1 α 、p-eIF-2 α 和 ATF4 的表达降低, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

[结论] ISRIB 通过抑制巨噬细胞内质网应激信号的激活发挥拮抗矽肺纤维化的作用。

关键词: 矽肺; 纤维化; 综合应激反应抑制剂; 巨噬细胞; 内质网应激

Regulatory effect of integrated stress response inhibitors on endoplasmic reticulum stress signals in macrophages in silicotic mice LI Yaqian, AN Xuliang, BAI Yifei, LIU Yang, GAO Xuemin, CAI Wenchen, XU Hong, YANG Fang (School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063200, China)

Abstract:

[Background] Silicosis is one of the most serious occupational diseases in China, requiring new treatment targets and therapies. The effects and mechanisms of integrated stress response inhibitors (ISRIB) on silicosis are still unknown.

[Objective] To observe the effects of ISRIB on silicosis fibrosis and its possible mechanisms.

基金项目

国家自然科学基金项目 (82204006); 河北省自然科学基金项目 (H2020209292); 河北省高等学校科学技术研究项目 (QN2022170); 河北省研究生创新资助项目 (CXZZBS2023 121); 河北省省属高校基本科研业务费研究项目 (JQN2020006)

作者简介

李雅倩 (1992—), 女, 博士生;
E-mail: lyqewbar@163.com

通信作者

杨方, E-mail: fangyang@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 2023-04-14

录用日期 2023-10-12

文章编号 2095-9982(2023)12-1444-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

引用

李雅倩, 安旭亮, 白倚菲, 等. 综合应激反应抑制剂对实验性矽肺纤维化模型中肺泡巨噬细胞内质网应激信号的调节作用 [J]. 环境与职业医学, 2023, 40(12): 1444-1450.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM23117

Funding

This study was funded.

Correspondence to

YANG Fang, E-mail: fangyang@ncst.edu.cn

Editorial Board Members' authorship

No

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2023-04-14

Accepted 2023-10-12

To cite

LI Yaqian, AN Xuliang, BAI Yifei, et al. Regulatory effect of integrated stress response inhibitors on endoplasmic reticulum stress signals in macrophages in silicotic mice [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2023, 40(12): 1444-1450.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM23117

[Methods] The study was divided into two parts: *in vivo* and *in vitro* experiments. For the *in vivo* part, 40 SPF grade male C57BL/6J mice were randomly divided into four groups: control group, ISRIB group, silicotic model group, and ISRIB treatment group, with 10 mice in each group. A silicotic mouse model was established by using a single tracheal infusion of 50 μL 200 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ SiO_2 suspension. After one week of perfusion with SiO_2 (the control group and the ISRIB group were perfused with an equal amount of sodium chloride solution), the ISRIB group and the ISRIB treatment group were intraperitoneally injected with 200 μL 2.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ISRIB for four weeks, and mice of other groups were injected with equal amounts of sodium chloride solution. A micro-CT instrument was used to observe the lung field clarity and lung texture of each group; hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe the histopathology morphology of the lung and the formation of silicon nodules; Van Gieson (VG) staining was used to observe the deposition of collagen in silicotic nodules; immunofluorescence assay was used to detect the expression and localization of p-protein kinase RNA-like ER kinase (PERK) in lung tissue; immunoblotting was used to detect the expression of collagen I (Col I) and endoplasmic reticulum stress signal related proteins p-PERK, p-inositol-requiring enzyme-1 α (p-IRE-1 α), p-eukaryotic initiation factor 2 α (p-eIF-2 α), activating transcription factor 4 (ATF4), and NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3). For the *in vitro* part, mouse alveolar macrophages MH-S cells were cultured *in vitro* and divided into a control group, an ISRIB (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) group, a SiO_2 induction group (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), and an ISRIB treatment group (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ISRIB treatment for 1 h, followed by 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ SiO_2 induction). Immunofluorescence assay was used to detect the expression of p-PERK in MH-S cells; immunoblotting was used to determine expressions of endoplasmic reticulum stress signal related proteins p-PERK, p-IRE-1 α , p-eIF-2 α , and ATF4.

[Results] The CT images showed that the lung markings of the silicotic model group mice were thickened, and several high-density shadows of varying sizes were observed in the lung field, mainly distributed around the bronchi. Compared with the silicotic model group, the ISRIB treatment group showed a decrease in the number and volume of high-density shadows. The HE staining results showed that lung tissues in the silicotic model group lost their normal structure, with the formation of silicon nodules, around which were thickened alveoli around the silicon nodules, and infiltration of inflammatory cells; the area and number of silicon nodules in the ISRIB treatment group were significantly reduced, and the range of silicon nodules was limited. The results of VG staining showed that the proportion of collagen fiber area in the lung tissue of the silicotic model group was $21.47\%\pm 2.59\%$, and it decreased to $9.34\%\pm 1.06\%$ in the ISRIB treatment group, with a statistically significant difference ($P < 0.05$). The immunofluorescence results showed that p-PERK was strongly expressed in the silicotic nodules and localized in macrophages; the expression of p-PERK was also significantly increased in the SiO_2 induced MH-S cells, while the intensity of p-PERK was weakened in the ISRIB treatment groups both *in vitro* and *in vivo*. The results of immunoblotting showed that compared with the control group, the expressions of endoplasmic reticulum stress signal related proteins p-PERK, p-IRE-1 α , p-eIF-2 α , and ATF4 were upregulated after SiO_2 stimulation *in vivo* and *in vitro*; compared with the SiO_2 induction group, the expressions of p-PERK, p-IRE-1 α , p-eIF-2 α , and ATF4 were significantly downregulated in the ISRIB treatment group *in vivo* and *in vitro*, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$).

[Conclusion] ISRIB antagonizes silicosis fibrosis by inhibiting the activation of macrophage endoplasmic reticulum stress signals.

Keywords: silicosis; fibrosis; integrated stress response inhibitor; macrophage; endoplasmic reticulum stress

矽肺是由于长期暴露于职业粉尘环境中吸入可吸入结晶二氧化硅(respirable crystalline silica, RCS)导致的以矽结节形成和弥漫性肺间质纤维化为主要病理特征的慢性肺疾病^[1],在我国是最严重的职业病之一。近年来,发达国家由于职业防护不到位,相继出现了打磨人造石等引起新尘肺病种产生的职业^[2]。矽肺发病隐匿,周期长,疾病持续进展无法逆转,尚无有效治疗手段,给患者、家庭和社会带来沉重的负担^[3-4]。因此,迫切需要进一步探索矽肺发病机制,为其治疗提供新的靶点和思路。

课题组前期研究结果发现,肺泡巨噬细胞受到呼吸性结晶型二氧化硅的刺激后,蛋白质折叠出现错误,内质网应激信号被激活^[5-6],内质网应激通过激活促凋亡通路,诱导上皮-间质转化,促进炎症反应,进一步介导肺纤维化重塑^[7-8]。抗纤维化短肽N-乙酰基-丝氨酸-天冬氨酸-赖氨酸-脯氨酸(N-acetyl-serine-aspartyl-lysine-proline, Ac-SDKP)能抑制矽肺纤维化进程中内质

网应激信号通路的激活从而延缓纤维化进展^[9],但由于其半衰期短、易失活,进入临床试验阶段还面临许多困难。综合应激反应抑制剂(integrated stress response inhibitor, ISRIB)是研发于2013年的一种小分子药物^[10],是蛋白激酶RNA样ER激酶(protein kinase RNA-like ER kinase, PERK)信号通路抑制剂,可逆转真核翻译启动因子2 α (eukaryotic initiation factor 2 alpha, eIF-2 α)磷酸化的作用,从而抑制活化转录因子4(activating transcription factor 4, ATF4)的激活。由于eIF-2 α 磷酸化与记忆巩固有关,目前针对ISRIB的研究主要集中在阿尔茨海默病、脑震荡、认知障碍等脑部疾病,发现ISRIB在鼠神经退行性病变和创伤性脑损伤模型中起到重要的保护作用^[11-12]。在肺纤维化中,ISRIB能够通过修复肺泡上皮细胞的损伤从而延缓肺纤维化的进展^[13]。目前对于ISRIB对矽肺的作用机制仍未所知,内质网应激是触发综合应激反应的机制之一,因此,本研究拟通过体内外实验观察ISRIB能否通

过对肺泡巨噬细胞内质网应激信号的调节从而发挥拮抗矽肺纤维化的作用及其机制。

1 对象与方法

1.1 实验动物

8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠(20±2)g 40 只, SPF 级, 购于北京维通利华动物技术有限公司 [SCXY(京)2016-0008], 饲养于华北理工大学实验动物中心清洁级动物房 [SYXK(冀)2020-0007], 饲养环境明暗各 12 h 循环, 恒温 26 °C, 自由饮食饮水。本研究方案经华北理工大学伦理委员会批准, 批准编号为 LX2019033, 符合动物研究伦理学要求。小鼠肺泡巨噬细胞株 MH-S 细胞购自中国科学院细胞库。

1.2 主要仪器和试剂

1.2.1 主要仪器 小动物 CT 仪(NEMO-II NMC-20, 中国平生), 光学显微镜(DP 80, 日本 OLYMPUS), 荧光显微镜(U-HGLGPS, 日本 OLYMPUS), 显影仪(ChemiScope 6100 EXP, 上海勤翔)。

1.2.2 细胞和主要试剂 SiO₂ 粉尘(美国 Sigma); 罗斯威尔公园纪念研究所(Roswell Park Memorial Institute, RPMI) 1640 培养基(以色列 BI); 胎牛血清(中国李记); β-巯基乙醇(中国瑞帕特); ISRIB(CAS 号: 1597403-47-8, 纯度 ≥95%, 美国 Cayman); 异氟烷(中国 RWD); 苏木素-伊红(Hematoxylin eosin, HE) 染液以及 Van Gieson(VG) 染液(中国贝索); 蛋白提取试剂盒(中国英文特); I 型胶原蛋白(collagen I, Col I)(中国博士德); 肌醇需求蛋白-1α(inositol-requiring enzyme-1α, IRE-1α)(中国 Abclonal); 磷酸化肌醇需求蛋白-1α(p-inositol-requiring enzyme-1α, p-IRE-1α)(英国 Abcam); PERK(中国华安); 磷酸化 PERK(p-PERK)(美国 Affinity); eIF-2α(中国 Abclonal); 磷酸化 eIF-2α(p-eIF-2α)(中国华安); ATF4(中国华安); α-微管蛋白(α-tubulin, α Tub)(中国 Abclonal); NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)(中国华安); 荧光二抗(美国 Novex); 含二脒基苯基吲哚(diamidine phenyl indole, DAPI) 的封片剂(美国 Cell Signaling); 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)。

1.3 动物模型的建立

将小鼠随机分为 4 组(每组 10 只)。(1)对照组: 气管一次性灌注 50 μL 0.9%氯化钠溶液, 一周后每天腹腔注射 200 μL 0.9%氯化钠溶液;(2)ISRIB 对照组:

灌注方法同对照组, 一周后每天腹腔注射 200 μL 2.5 mg·kg⁻¹ ISRIB 溶液;(3)矽肺模型组: 根据课题组前期实验结果, 气管一次性灌注 50 μL 200 mg·mL⁻¹ SiO₂ 混悬液^[14], 一周后每天腹腔注射 200 μL 0.9%氯化钠溶液;(4)ISRIB 治疗组: 灌注方法同矽肺模型组, 一周后每天腹腔注射 2.5 mg·kg⁻¹ 的 ISRIB 溶液 200 μL。各组小鼠均饲养至 4 周。用 1%戊巴比妥钠麻醉小鼠, 取小鼠肺组织, 4%多聚甲醛固定左肺, 用于 HE 染色、VG 染色和免疫荧光染色, 将其余肺组织冻于-80 °C 冰箱保存备用。

1.4 细胞培养

MH-S 细胞在 37 °C、5% CO₂ 的孵育箱中培养, 用含 15%胎牛血清和 0.1%β-巯基乙醇的 RPMI 1640 培养基培育细胞。本实验选用第 3 代细胞进行实验, 用空白培养基将细胞同步化 24 h 后分为 4 组。(1)对照组: 用不含血清的培养基培养;(2)ISRIB 对照组: 无血清培养条件下, 给予 1 μg·mL⁻¹ ISRIB 处理;(3)SiO₂ 诱导组: 无血清培养条件下, 给予 100 μg·mL⁻¹ SiO₂ 诱导;(4)ISRIB 干预组: 无血清培养条件下, 先给予 1 μg·mL⁻¹ ISRIB 处理 1 h, 再给予 100 μg·mL⁻¹ SiO₂ 诱导。

1.5 小动物 CT 图像采集

造模结束后饲养小鼠至 4 周取材前, 用异氟烷麻醉小鼠, 采用小动物 CT 仪拍摄小鼠活体肺 CT 图像, 小鼠采用俯卧位, 拍摄期间确保动物舱门关闭, 挡板归位, 并使用 PadCam 软件视频监控观察小鼠状态, 使用 cruiser 1.7.40 软件采集拍摄数据, 使用 recon daemon 1.7.40 软件离线重建拍摄数据, 使用 avatar3 1.7.40 软件分析拍摄数据和重建肺结构。

1.6 HE 染色观察肺组织病理形态

肺组织经 4%多聚甲醛溶液固定 24 h, 流水过夜去除组织中的甲醛, 在梯度乙醇溶液脱水, 最后浸泡于石蜡溶液中 6 h, 用包埋机将肺组织包埋。将蜡块切成 4 μm 厚的肺切片。切片常规脱蜡至水, 用苏木素染液染色 3 min, 2%盐酸酒精溶液中分化数秒, 再将切片置于水中返蓝 15 min, 使用伊红染液染色 2 min 后将切片放入 90%乙醇溶液 5 min, 依次将切片置于无水乙醇和二甲苯中浸泡, 彻底透明后用中性树胶封片。待切片干燥后镜下观察肺组织形态。

1.7 VG 染色观察肺组织胶原沉积情况

脱蜡至水步骤同 HE 染色, 将铁苏木素 A 和铁苏木素 B 等比例混合后滴于组织表面染色 3 min, 然后在 2%盐酸酒精中分化 2 min, 在自来水中水化 10 min, 再将 VG 染液覆盖于组织表面染色 10 min, 再放入 90%

乙醇溶液 5 min, 余下步骤同 HE 染色。

1.8 免疫荧光染色观察细胞 p-PERK 阳性表达情况

石蜡切片脱蜡至水, 细胞爬片洗去固定液, 加入乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)溶液后, 采用高压修复 80 s 使抗原暴露, 滴加 p-PERK (1:100), 4 °C 孵育过夜, 次日用磷酸盐缓冲液将切片洗 3 次后, 将荧光二抗充分覆盖于组织和细胞上, 于 37 °C 恒温箱孵育 90 min, 用含 DAPI 的封片剂封片。荧光显微镜下观察阳性细胞染色。

1.9 免疫印迹法检测内质网应激信号以及胶原蛋白表达水平

使用总蛋白提取试剂盒提取小鼠肺组织和 MH-S 细胞总蛋白, 比辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒测定蛋白浓度后以每个泳道 15 μg 的蛋白量进行常规电泳电转。按 1:1000 稀释一抗 Col I、p-PERK、PERK、p-IRE-1α、IRE-1α、p-eIF-2α、eIF-2α、ATF4、NLRP3、α Tub, 置于 4 °C 冰箱孵育过夜, 次日含吐温的缓冲盐水(triethanolamine-buffered saline + Tween, TBST)洗三次后, 二抗(1:5000)室温孵育 40 min, 采用 ECL 发光试剂盒显色。后期采用 Image-Pro-plus 6.0 图像处理软件对条带进行定量分析。

1.10 统计学分析

所有实验至少重复 3 次, 数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS 20.0 统计分析软件将数据进行完全随机设计的单因素方差分析; 两两比较方差齐采用最小显著性差异法(least significant difference, LSD)检验, 方差不齐则采用 Tamhane's 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

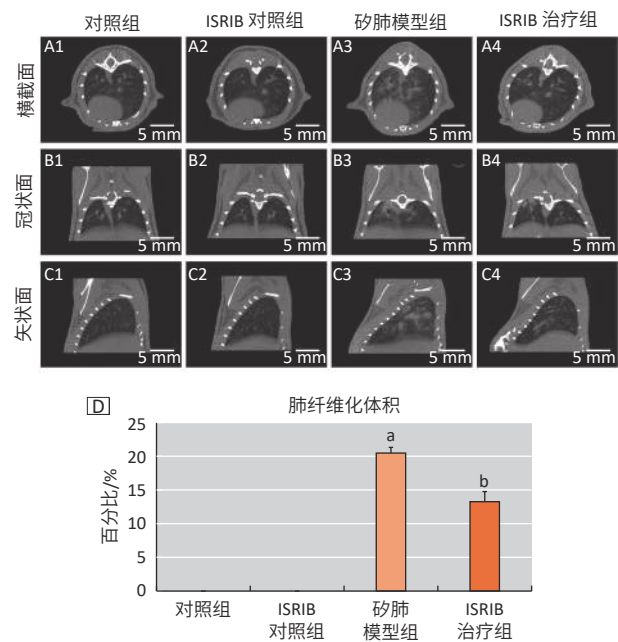
2 结果

2.1 ISRIB 抑制矽肺小鼠胶原沉积

各组小鼠均无死亡情况出现。取材前, 对照组体重(24.56±0.23)g, ISRIB 对照组(25.35±0.43)g, 矽肺模型组(20.79±0.67)g, ISRIB 治疗组(22.39±0.42)g。小鼠肺部 CT 显示, 对照组以及 ISRIB 对照组小鼠双肺纹理清晰, 走向和分布正常, 肺野内未见明显异常密度影; 矽肺模型组小鼠肺纹理增粗, 肺野内见数个大小不等的高密度影, 主要分布于支气管周围; 和矽肺模型组相比, ISRIB 治疗组高密度影数量和体积均减少($P < 0.05$)。结果见图 1。

HE 染色结果显示, 对照组和 ISRIB 对照组组肺泡结构完整、肺泡壁薄, 无炎症及渗出; 矽肺模型组可见部分肺组织失去正常肺结构, 有矽结节形成, 矽

结节周围肺泡增厚, 有炎症细胞浸润; 而和矽肺模型组相比, ISRIB 治疗组矽结节面积和个数明显减少, 矽结节范围被局限。结果见图 2A1-A4。VG 染色结果显示, 矽肺模型组有较多胶原沉积, 肺组织胶原纤维面积占比为 21.47%±2.59%; 而和矽肺模型组相比, ISRIB 治疗组胶原沉积面积显著减少, 肺组织胶原纤维面积占比降至 9.34%±1.06%, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 结果见图 2B1-B4, 图 2C。同样, 免疫印迹结果显示, 和对照组相比, 矽肺模型组 Col I 和 NLRP3 的表达上调, 而给予 ISRIB 干预后, 肺组织 Col I 和 NLRP3 的表达下调, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 结果见图 3。

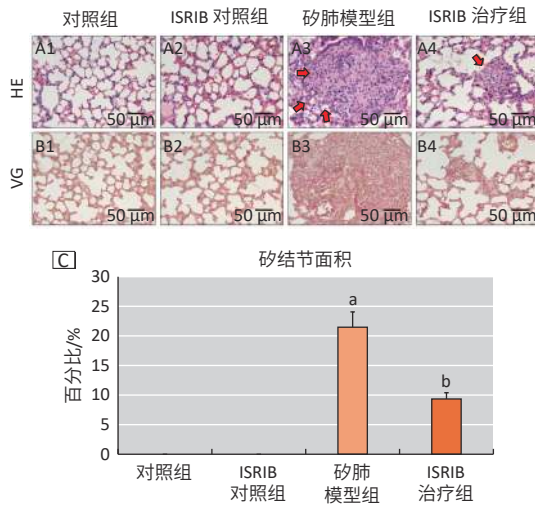


[注] A: CT 横截面, B: CT 冠状面, C: CT 矢状面; 1: 对照组, 2: ISRIB 对照组, 3: 矽肺模型组, 4: ISRIB 治疗组。D: 肺纤维化体积定量图; a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与矽肺模型组比较, $P < 0.05$ 。

图 1 CT 观察活体小鼠肺成像及肺纤维化体积定量比较
Figure 1 Quantitative comparison of pulmonary fibrosis volume of living mice lung imaging by micro CT

2.2 ISRIB 抑制矽肺小鼠内质网应激信号通路的激活

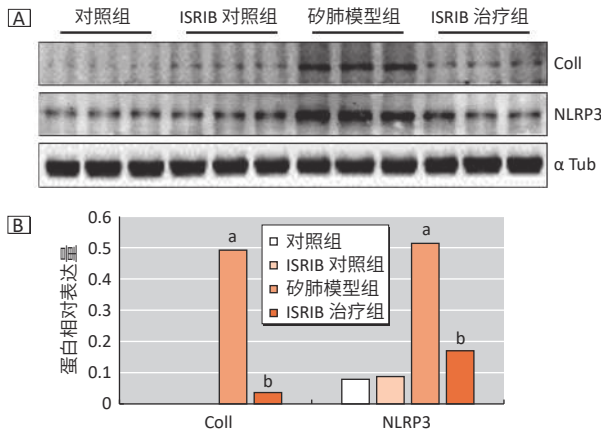
免疫荧光结果显示, p-PERK 在矽肺模型组小鼠肺结节中表达明显增强, 并且和巨噬细胞标记物 CD68 共定位; 而与矽肺模型组相比, ISRIB 治疗组 p-PERK 的表达明显降低。HE 所示组织结构与前述结果一致。结果见图 4。免疫印迹结果显示, 和对照组相比, 内质网应激信号相关蛋白 p-PERK、p-IRE-1α、p-eIF-2α 和 ATF4 在矽肺模型组中上调; 而与矽肺模型组相比, 上述因子在 ISRIB 治疗组中的表达下调, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结果见图 5。



[注] A: HE 染色, B: VG 染色; 1: 对照组, 2: ISRIB 对照组, 3: 矽肺模型组, 4: ISRIB 治疗组; 红色箭头所指为矽结节。C: 矽结节面积定量图; a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与矽肺模型组比较, $P < 0.05$ 。

图 2 ISRIB 对矽肺小鼠胶原沉积的调节作用 (HE 染色和 VG 染色) (20×)

Figure 2 The regulatory effect of ISRIB on collagen deposition in silicotic mice (HE staining and VG staining) (20×)



[注] A: 各指标免疫印迹图, B: Coll 和 NLRP3 表达量定量图; a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与矽肺模型组比较, $P < 0.05$ 。

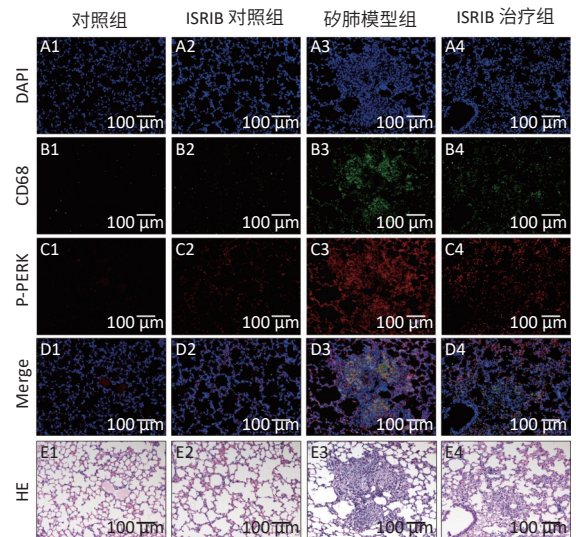
图 3 ISRIB 对各组小鼠胶原沉积的调节作用 (免疫印迹法)

Figure 3 The regulatory effect of ISRIB on collagen deposition in each group of mice (immunoblotting)

2.3 ISRIB 抑制 SiO₂ 诱导的 MH-S 细胞中内质网应激信号通路的激活

取第 3 代细胞进行实验, 镜下观察细胞密度为 70% 时按照前述分组进行细胞诱导实验。细胞免疫荧光染色结果显示, SiO₂ 诱导组中可见 p-PERK 的强表达, 而给予 ISRIB 干预后, ISRIB 干预组中 p-PERK 的荧光强度明显减少, 结果见图 6。免疫印迹结果显示, 与对照组相比, SiO₂ 诱导组中内质网应激信号相关蛋白 p-PERK、p-IRE-1α、p-eIF-2α 和 ATF4 的表达上调; 与 SiO₂ 诱导组相比, ISRIB 干预组中的 p-PERK、p-IRE-1α、p-eIF-2α

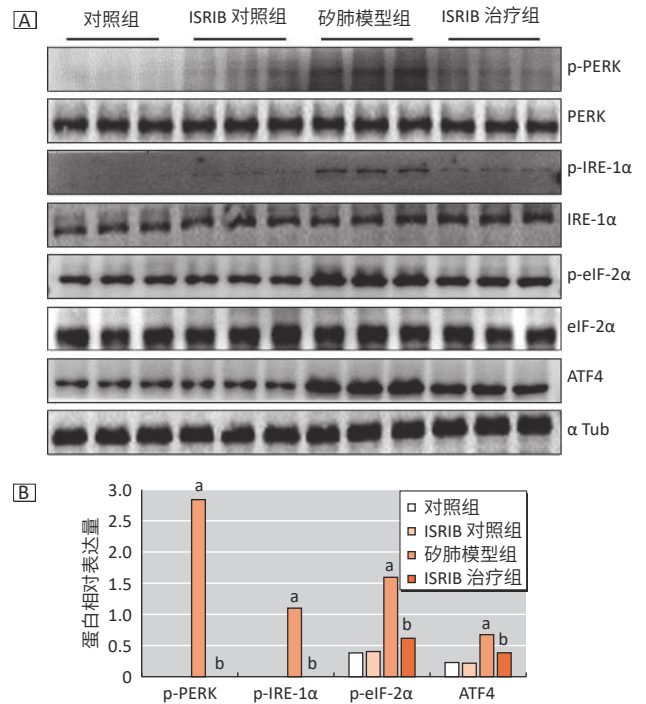
和 ATF4 表达下调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见图 7。



[注] A: DAPI, B: CD68, C: p-PERK, D: 组合图, E: HE 染色; 1: 对照组, 2: ISRIB 对照组, 3: 矽肺模型组, 4: ISRIB 治疗组。

图 4 p-PERK 和 CD68 在小鼠肺组织中的共定位 (免疫荧光染色) (20×)

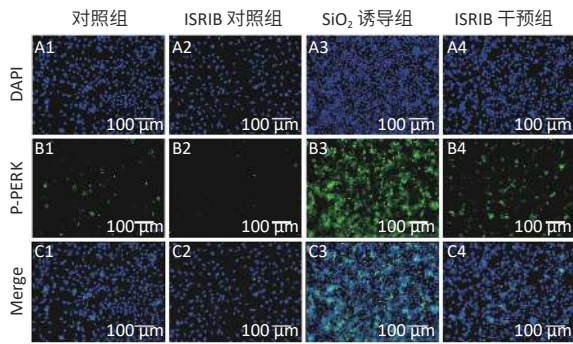
Figure 4 The colocalization of p-PERK and CD68 in mice (immunofluorescence staining) (20×)



[注] A: 各指标免疫印迹图; B: p-PERK、p-IRE-1α、p-eIF2α 和 ATF4 表达量定量图; a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与矽肺模型组比较, $P < 0.05$ 。

图 5 ISRIB 对各组小鼠 p-PERK、p-IRE-1α、p-eIF-2α 和 ATF4 蛋白水平的影响 (免疫印迹法)

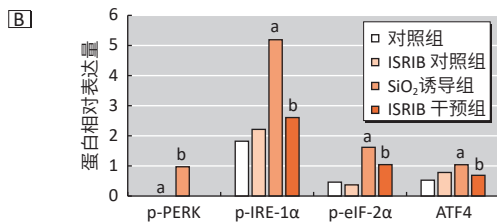
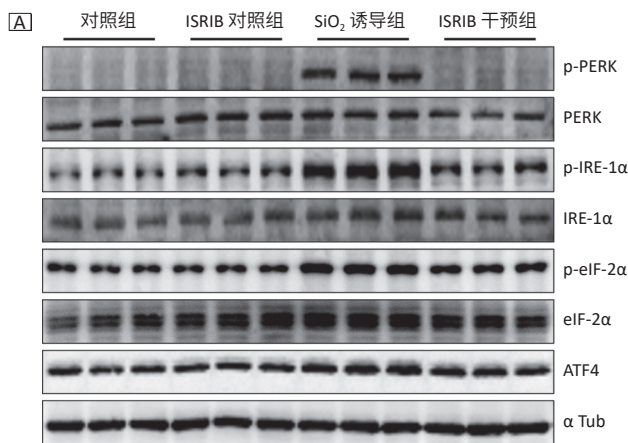
Figure 5 Effects of ISRIB on the expressions of p-PERK, p-IRE-1α, p-eIF-2α, and ATF4 in each group of mice (immunoblotting)



[注] A: DAPI, B: p-PERK, C: 组合图。

图 6 p-PERK 在 MH-S 细胞中的表达 (免疫荧光染色) (20×)

Figure 6 Expression of p-PERK in MH-S cells (immunofluorescence staining) (20×)



[注] A: 各指标免疫印迹图, B: p-PERK、p-IRE-1α、p-eIF2α 和 ATF4 表达量定量图; a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 SiO₂ 诱导组比较, $P < 0.05$ 。

图 7 ISRIB 对 SiO₂ 诱导的 MH-S 细胞中 p-PERK、p-IRE-1α、p-eIF-2α 和 ATF4 蛋白水平的影响 (免疫印迹法)

Figure 7 Effects of ISRIB on the expressions of p-PERK, p-IRE-1α, p-eIF-2α, and ATF4 in SiO₂-induced MH-S cells (immunoblotting)

3 讨论

为探寻矽肺治疗的新方法,本研究采用气管一次性灌注法构建小鼠矽肺模型,给予 ISRIB 治疗后,小鼠纤维化指标 Col I 显著下调,肺功能明显改善,内质网应激信号相关因子的表达显著下调,表明 ISRIB 具有一定抗矽肺纤维化的效应。

由于职业健康覆盖率较低,目前实际患矽肺病人可能远大于已知病例数,且临床使用的抗纤维化药物吡非尼酮、汉防己甲素等在预防疾病进展和改善患

者生活质量方面疗效有限^[15-16],因此仍需进一步探寻治疗矽肺的有效治疗靶点和治疗药物。内质网的功能旨在促进蛋白质的正确折叠和运输,在正常情况下,葡萄糖相关肽 78(glucose-related peptide 78, GRP78)与内质网应激传感器 PERK、活化转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6) 和 IRE1α 结合,并抑制其信号转导。随着错误折叠的蛋白积累,GRP78 与传感器的结合减少,PERK 在与 GRP78 解离后发生自磷酸化,其下游的 eIF-2α 的 Ser51 位点被磷酸化,导致 mRNA 的翻译减少,这一系列反应激活 ATF4,从而促进抗氧化反应等基因的表达^[7]。课题组前期研究结果证实 SiO₂ 在大鼠体内外激活 GRP78 从而激活内质网应激信号^[17],本研究观察到一次性灌注 SiO₂ 后,免疫荧光结果显示小鼠矽结节内 p-PERK 强表达,且定位于巨噬细胞,免疫印迹结果显示小鼠肺组织内质网应激信号相关蛋白 p-PERK、p-IRE-1α、p-eIF-2α 和 ATF4 表达显著上调。说明 ISRIB 能抑制二氧化硅诱导的小鼠体内外内质网应激信号的激活。

在肺纤维化进展过程中,内质网应激是重要的驱动因素,巨噬细胞发生内质网应激后可通过外泌体诱导肌成纤维细胞分化,驱动纤维化进展^[18]。靶向线粒体的抗氧化剂也能抑制内质网应激信号的激活,从而抑制炎症反应以及随后的肺纤维化进展^[19]。因此阻断内质网应激信号通路对于阻抑矽肺纤维化进展起着至关重要的作用。本实验结果显示,给予小分子药物 ISRIB 干预后,首先在小鼠体内观察到无论是矽结节面积还是胶原沉积情况均有显著改善,证实了 ISRIB 在 SiO₂ 诱导的矽肺纤维化模型中有抑制胶原沉积,延缓肺纤维化进展的效应。为进一步探讨 ISRIB 抑制胶原沉积的作用机制,本实验观察了内质网应激信号通路相关因子的表达,结果显示 ISRIB 的干预在矽肺小鼠肺内阻断了 PERK 以及 eIF-2α 的磷酸化,从而阻止了其下游 ATF4 的激活。作为综合应激反应抑制剂^[20],ISRIB 能拮抗 p-eIF-2α 破坏细胞内蛋白质稳态的效应,直接结合于真核起始因子 2B(eukaryotic initiation factor 2B, eIF2B),维持 eIF2B 的正常功能,启动被抑制的蛋白质翻译,使细胞恢复蛋白质稳态,从而恢复正常的细胞状态与功能^[21]。此外,本实验研究结果还显示 ISRIB 同样阻抑了内质网应激另一传感器 IRE-1α 的磷酸化,提示 ISRIB 可能还通过抑制内质网应激 IRE-1α 通路,从而达到抑制内质网应激的效应。

本研究结果显示巨噬细胞标记物 CD68 和 p-PERK 发生共定位,提示巨噬细胞发生内质网应激。另外,体

外培养小鼠肺泡巨噬细胞(MH-S)细胞,给予SiO₂刺激后,内质网应激信号被激活,而ISRIB显著抑制内质网应激信号的激活。巨噬细胞受SiO₂刺激后发生极化是矽肺纤维化进展的驱动环节之一^[22],改变巨噬细胞极化状态可减轻肺纤维化^[23]。而PERK及其下游信号是巨噬细胞免疫抑制功能的代谢中枢^[24],此外,内质网应激传感器的缺失,会导致巨噬细胞无法发生M1极化^[25]。ISRIB作为内质网应激的抑制剂,可能通过抑制巨噬细胞发生极化从而发挥抗纤维化作用。

本研究尚存在一定的局限性,例如只选择雄性小鼠作为实验对象,未能排除性别因素的影响;此外,可以结合前人的研究结论,同时在上皮细胞以及成纤维细胞上研究ISRIB的效应以拓展ISRIB可能的作用机制。

矽肺纤维化的治疗目前仍然是难点,已批准上市的药物吡非尼酮和尼达尼布由于药物的耐受性和副作用等问题,使用范围十分受限^[26]。ISRIB在动物实验中即使达到饱和浓度也未出现副作用,并且在起效浓度时保留急性综合应激反应的细胞保护作用^[27],ISRIB能通过修复受损的肺泡II型上皮细胞从而改善石棉和博来霉素所致小鼠肺纤维化^[13],十分适合进入临床试验,为矽肺的治疗提供新思路。

综上所述,本研究通过体内外实验验证了ISRIB可通过抑制巨噬细胞内质网应激信号的激活拮抗矽肺纤维化的进展。

参考文献

- [1] HOY R, CHAMBERS DC. Silica-related diseases in the modern world[J]. *Allergy*, 2020, 75(11): 2805-2817.
- [2] HOY RF, BAIRD T, HAMMERSCHLAG G, et al. Artificial stone-associated silicosis: a rapidly emerging occupational lung disease[J]. *Occup Environ Med*, 2018, 75(1): 3-5.
- [3] LEUNG CC, YU IT S, CHEN W. Silicosis[J]. *Lancet*, 2012, 379(9830): 2008-2018.
- [4] BARNES H, GOH NS L, LEONG TL, et al. Silica-associated lung disease: An old-world exposure in modern industries[J]. *Respirology*, 2019, 24(12): 1165-1175.
- [5] 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-κB pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5656.
- [6] MAO N, FAN Y, LIU W, et al. Oxamate attenuates glycolysis and ER stress in silicotic mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(6): 3013.
- [7] BURMAN A, TANJORE H, BLACKWELL TS. Endoplasmic reticulum stress in pulmonary fibrosis[J]. *Matrix Biol*, 2018, 68-69: 355-365.
- [8] FU L, ZHAO H, XIANG Y, et al. Reactive oxygen species-evoked endoplasmic reticulum stress mediates 1-nitropyrene-induced epithelial-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis[J]. *Environ Pollut*, 2021, 283(6): 117134.
- [9] JIN F, GENG F, XU D, et al. Ac-SDKP attenuates activation of lung macrophages and bone osteoclasts in rats exposed to silica by inhibition of TLR4 and RANKL signaling pathways[J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 1647-1660.
- [10] SIDRAUSKI C, ACOSTA-ALVEAR D, KHOUTORSKY A, et al. Pharmacological brake-release of mRNA translation enhances cognitive memory[J]. *eLife*, 2013, 2: e00498.
- [11] HALLIDAY M, RADFORD H, SEKINE Y, et al. Partial restoration of protein synthesis rates by the small molecule ISRIB prevents neurodegeneration without pancreatic toxicity[J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(3): e1672.
- [12] CHOU A, KRUKOWSKI K, JOPSON T, et al. Inhibition of the integrated stress response reverses cognitive deficits after traumatic brain injury[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(31): E6420-E6426.
- [13] WATANABE S, MARKOV NS, LU Z, et al. Resetting proteostasis with ISRIB promotes epithelial differentiation to attenuate pulmonary fibrosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(20): e2101100118.
- [14] LI S, LI Y, ZHANG Y, et al. N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline regulates lung renin angiotensin system to inhibit epithelial-mesenchymal transition in silicotic mice[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 408: 115255.
- [15] SPAGNOLO P, KROPSKI JA, JONES MG, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: Disease mechanisms and drug development[J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 222: 107798.
- [16] SONG MY, WANG JX, SUN YL, et al. Tetrandrine alleviates silicosis by inhibiting canonical and non-canonical NLRP3 inflammasome activation in lung macrophages[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(5): 1274-1284.
- [17] ZHANG L, XU D, LI Q, et al. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (Ac-SDKP) attenuates silicotic fibrosis by suppressing apoptosis of alveolar type II epithelial cells via mediation of endoplasmic reticulum stress[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 350: 1-10.
- [18] QIN X, LIN X, LIU L, et al. Macrophage-derived exosomes mediate silica-induced pulmonary fibrosis by activating fibroblast in an endoplasmic reticulum stress-dependent manner[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(9): 4466-4477.
- [19] JEONG JS, YOON Y, KIM W, et al. NecroX improves polyhexamethylene guanidine-induced lung injury by regulating mitochondrial oxidative stress and endoplasmic reticulum stress[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2023, 69(1): 57-72.
- [20] COSTA-MATTIOLI M, WALTER P. The integrated stress response: From mechanism to disease[J]. *Science*, 2020, 368(6489): 384.
- [21] ZYRYANOVA AF, KASHIWAGI K, RATO C, et al. ISRIB blunts the integrated stress response by allosterically antagonising the inhibitory effect of phosphorylated eIF2 on eIF2B[J]. *Mol Cell*, 2021, 81(1): 88-103.e6.
- [22] TANG Q, XING C, LI M, et al. Pirfenidone ameliorates pulmonary inflammation and fibrosis in a rat silicosis model by inhibiting macrophage polarization and JAK2/STAT3 signaling pathways[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 244: 114066.
- [23] LI S, GAO S, JIANG Q, et al. Clevudine attenuates bleomycin-induced early pulmonary fibrosis via regulating M2 macrophage polarization[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 101: 108271.
- [24] RAINES LN, ZHAO H, WANG Y, et al. PERK is a critical metabolic hub for immunosuppressive function in macrophages[J]. *Nat Immunol*, 2022, 23(3): 431-445.
- [25] SHAN B, WANG X, WU Y, et al. The metabolic ER stress sensor IRE1α suppresses alternative activation of macrophages and impairs energy expenditure in obesity[J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(5): 519-529.
- [26] GALLI JA, PANDYA A, VEGA-OLIVO M, et al. Pirfenidone and nintedanib for pulmonary fibrosis in clinical practice: Tolerability and adverse drug reactions[J]. *Respirology*, 2017, 22(6): 1171-1178.
- [27] RABOUW HH, LANGEREIS MA, ANAND AA, et al. Small molecule ISRIB suppresses the integrated stress response within a defined window of activation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(6): 2097-2102.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 刘燕, 丁瑾瑜)