

# 不同浓度鸦胆子苦醇对小鼠矽肺纤维化的影响

康慧敏, 李柔, 王汉钦, 郑云帆, 陈适

湖南师范大学医学院, 湖南 长沙 410000



DOI 10.11836/JEOM23378

## 摘要:

**[背景]** 矽肺是一种肺部弥漫性纤维化疾病, 由长期暴露于游离二氧化硅( $\text{SiO}_2$ )粉尘引起, 发病机制复杂, 缺乏有效的治疗。鸦胆子苦醇(Bru)具有多种生物活性, 其在矽肺纤维化中的作用尚不明确。

**[目的]** 探究不同浓度 Bru 对  $\text{SiO}_2$  诱导小鼠矽肺纤维化的影响。

**[方法]** 将 30 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、矽尘组、Bru 低剂量( $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组、Bru 中剂量( $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组、Bru 高剂量( $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组, 每组 6 只; 除对照组外, 其余各组均采用一次性非气管暴露法滴注  $50 \mu\text{L}$ 、 $60 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\text{SiO}_2$  悬浊液建立矽肺小鼠模型, 对照组滴注等量生理盐水; Bru 组于染尘的同时腹腔注射 Bru, 连续注射 5 d, 随后隔天注射, 染尘 28 d 后处死小鼠, 收集肺组织。测定小鼠肺系数; 采用苏木精-伊红(HE)染色和 Masson 染色观察小鼠肺组织的病理变化; Western blot 法检测小鼠肺组织中凋亡蛋白 Cleaved-caspase 3、纤维化相关蛋白  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、I 型胶原蛋白(Col-I)、自噬相关蛋白 Beclin1、微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)、Sequestosome 1(p62/SQSTM1)蛋白、Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(Keap1)、核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)的表达水平; 实时荧光定量逆转录 PCR(RT-qPCR)检测小鼠肺组织中 Caspase 3、 $\alpha$ -SMA 和 Col-I mRNA 水平。

**[结果]** 与对照组相比, 矽尘组小鼠的肺系数明显升高( $P < 0.01$ ); 肺组织中肺泡壁受损, 出现炎性细胞浸润、纤维结节和胶原纤维沉积; Cleaved-caspase 3、 $\alpha$ -SMA 和 Col-I 的蛋白表达及转录水平均明显上调( $P < 0.01$ ); Beclin1、LC3-II/I、p62、Nrf2 表达水平增加( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 而 Keap1 表达水平下降( $P < 0.05$ )。与矽尘组相比, Bru 低、中剂量组小鼠肺系数降低( $P < 0.05$ ); 肺组织的病理损伤及胶原沉积明显改善; Cleaved-caspase 3、 $\alpha$ -SMA 和 Col-I 的蛋白表达及转录水平下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), Beclin1、LC3-II/I、p62、Nrf2 表达水平也均明显下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 中剂量组 Keap1 水平上升( $P < 0.05$ )。与矽尘组相比, Bru 高剂量组肺系数、病理损伤、Cleaved-caspase 3、 $\alpha$ -SMA 和 Col-I 的蛋白表达及转录水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); Beclin1、LC3-II/I 及 Nrf2 表达水平降低( $P < 0.01$ ), p62 蛋白表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), Keap1 蛋白水平上升( $P < 0.01$ )。

**[结论]** 低、中剂量 Bru 可能通过 Keap1-Nrf2 通路调控自噬, 改善自噬降解障碍, 降低矽肺小鼠的肺系数, 减轻矽肺小鼠肺组织中的细胞凋亡, 延缓矽肺纤维化的进展。

**关键词:** 矽肺; 鸦胆子苦醇; 肺纤维化; 自噬; 凋亡

**Effects of different concentrations of brusatol on silicosis fibrosis in mice** KANG Huimin, LI Rou, WANG Hanqin, ZHENG Yunfan, CHEN Shi (School of Medicine, Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410000, China)

## Abstract:

**[Background]** Silicosis is a diffuse fibrosis of the lungs caused by long-term inhalation of free silicon dioxide ( $\text{SiO}_2$ ). It has a complex pathogenesis and lacks effective treatment. Brusatol (Bru) has a variety of biological activities, and its role in silicosis fibrosis is unclear yet.

**[Objective]** To investigate the effects of different concentrations of Bru on  $\text{SiO}_2$ -induced silicosis fibrosis in mice.

**[Methods]** Thirty male C57BL/6J mice were randomly divided into five groups: a control group, a silica group, and three Bru intervention groups with low, medium, and high doses ( $1$ ,  $2$ , and  $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), with 6 mice in each group. Except the control group, the remaining groups were established as  $\text{SiO}_2$ -induced silicosis mouse models by using a single tracheal infusion of  $50 \mu\text{L}$   $60 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\text{SiO}_2$  suspension. The control group was dosed with equal amount of saline. The Bru intervention

## 基金项目

国家自然科学基金项目(82173493); 湖南省自然科学基金项目(2023JJ30423)

## 作者简介

康慧敏(1999—), 女, 硕士生;  
E-mail: sandwich@hunnu.edu.cn

## 通信作者

陈适, E-mail: chenshonest@163.com

## 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 2023-11-03

录用日期 2024-03-13

文章编号 2095-9982(2024)05-0539-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

## 引用

康慧敏, 李柔, 王汉钦, 等. 不同浓度鸦胆子苦醇对小鼠矽肺纤维化的影响[J]. 环境与职业医学, 2024, 41(5): 539-545.

## 本文链接

[www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM23378](http://www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM23378)

## Funding

This study was funded.

## Correspondence to

CHEN Shi, E-mail: chenshonest@163.com

## Editorial Board Members' authorship No

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2023-11-03

Accepted 2024-03-13

## To cite

KANG Huimin, LI Rou, WANG Hanqin, et al. Effects of different concentrations of brusatol on silicosis fibrosis in mice[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2024, 41(5): 539-545.

## Link to this article

[www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM23378](http://www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM23378)

groups were injected intraperitoneally with Bru for 5 consecutive days and then injected every other day. After 28 d of exposure, the mice were executed and lung tissues were collected. The lung coefficient of the mice was measured, and the pathological changes of the lung tissues were observed after hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining. The levels of apoptotic protein Cleaved-caspase 3, fibrosis-related protein  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), type I collagen (Col-I), autophagy-associated protein Beclin1, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), Sequestosome 1 (p62/SQSTM1), Kelch like ECH-associated protein-1 (Keap1), and nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Nrf2) were detected by Western blot. The mRNA levels of *Caspase 3*,  $\alpha$ -SMA, and *Col-I* were measured by realtime fluorescence-based quantitative PCR.

**[Results]** Compared with the control group, the lung coefficient of mice in the silica group was significantly increased ( $P < 0.01$ ); the lung tissues of the silicosis mice showed damaged alveolar walls, along with infiltration of inflammatory cells, fibrous nodules, and collagen deposition; furthermore, the protein and mRNA levels of Cleaved-caspase 3,  $\alpha$ -SMA, and Col-I were significantly increased ( $P < 0.01$ ); the expression levels of Beclin1, LC3-II/I, p62, and Nrf2 were increased, while that of Keap1 was decreased ( $P < 0.05$ ). The interventions with low and medium doses of Bru reduced lung coefficient ( $P < 0.05$ ) and protected against pathological damage and collagen deposition in the lung tissues of the silicosis mice; the protein and mRNA expression levels of Cleaved-caspase 3,  $\alpha$ -SMA, and Col-I were significantly decreased in the low and medium dose groups ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the expression levels of Beclin1, LC3-II/I, p62, and Nrf2 were also decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and the expression level of Keap1 was increased in the medium dose group ( $P < 0.05$ ). However, compared with the silica group, the differences in lung coefficient, pathological damage, and protein and mRNA expression levels of Cleaved-caspase 3,  $\alpha$ -SMA, and Col-I in the Bru high dose group were not statistically significant ( $P > 0.05$ ). In addition, the high dose of Bru decreased Beclin1, LC3-II/I, and Nrf2 expression levels ( $P < 0.01$ ), did not change p62 protein expression level ( $P > 0.05$ ), while increased Keap1 protein level ( $P < 0.01$ ).

**[Conclusion]** Low and medium doses of Bru might regulate autophagy through the Keap1-Nrf2 pathway, ameliorate autophagic degradation impairment, reduce pulmonary coefficient, attenuate apoptosis, and delay the progression of fibrosis in  $\text{SiO}_2$ -induced silicosis mice.

**Keywords:** silicosis; brusatol; lung fibrosis; autophagy; apoptosis

矽肺是由于长期吸入含游离二氧化硅(silicon dioxide,  $\text{SiO}_2$ )粉尘引起的肺部弥漫性纤维化疾病,是危害最严重的尘肺病之一<sup>[1]</sup>。自噬是真核细胞内的一种自我降解途径,对于维持细胞内环境稳态至关重要<sup>[2]</sup>。前期的研究发现,矽肺患者肺泡巨噬细胞(alveolar macrophages, AMs)及矽肺小鼠模型中自噬体增多,自噬底物蛋白 Sequestosome 1 (p62/SQSTM1)异常增高导致自噬降解障碍,进而加重 AMs 凋亡并促进纤维化的进展<sup>[3-4]</sup>,提示 p62 依赖的选择性自噬在矽肺的发生、发展中发挥重要作用。此外, p62 参与细胞内多条信号通路的调控,包括 Kelch 样环氧丙烷相关蛋白 1 (Kelch like ECH-associated protein-1, Keap1)-核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2 related factor 2, Nrf2) 信号通路<sup>[5]</sup>。Keap1-Nrf2 是重要的细胞防御和存活途径之一, Nrf2 作为核转录因子,与 Keap1 解离进入细胞核,诱导抗氧化基因的转录来激活细胞抗氧化反应<sup>[6]</sup>。研究发现由自噬失调引起的 p62 蛋白积累会诱导 Nrf2 持续激活,造成组织损伤<sup>[7-8]</sup>,另外在矽肺患者外周血单核细胞中发现 Nrf2 表达增加<sup>[9]</sup>,提示 Nrf2 可能参与矽肺的发病进程。

鸦胆子苦醇(brusatol, Bru)是从苦木科植物鸦胆子果实中提取出来的一种苦木内酯类化合物,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多重功效<sup>[10]</sup>。作为 Nrf2 的有效抑制剂, Bru 可通过抑制 Nrf2 的激活减少 p62 的转录延缓大鼠子宫内膜癌的发生,并可通过调控自噬减轻肾小管细胞凋亡<sup>[8, 11]</sup>。据此推测 Bru 可能通过抑制

Nrf2 调控 p62 依赖的选择性自噬,缓解矽肺纤维化。因此,本研究拟建立  $\text{SiO}_2$  诱导的小鼠矽肺模型,并予以不同浓度的 Bru 干预,探讨 Bru 对小鼠矽肺纤维化的作用。

## 1 对象与方法

### 1.1 实验动物

30 只无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 C57BL/6J 雄性小鼠, 6~8 周龄, 体重 20~25 g, 从湖南斯莱克景达实验动物有限公司获得(生产许可证号: 2019-0004)。小鼠饲养于湖南师范大学医学院 SPF 级饲养房, 许可证号: SYXK(湘)2020-0012, 温度和相对湿度分别保持在 21~25 °C 和 45%~65%, 昼夜周期各为 12 h, 饲养期间小鼠自主进食及饮水。进行实验前小鼠适应性喂养 1 周。本研究经湖南师范大学生物医学研究伦理委员会批准(审批号: 2021-308)。

### 1.2 动物模型的建立

天然结晶  $\text{SiO}_2$  颗粒 (Min-U-Sil 5, 97% < 5  $\mu\text{m}$ , 美国 Silica) 置于研钵中研磨 1 h 后溶于无菌生理盐水中, 配制成 60  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\text{SiO}_2$  悬液, 经高压灭菌后使用。根据 Bru 相关药理学研究<sup>[12-16]</sup>, 确定以 2  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  作为中剂量。采用随机数表法, 并根据动物实验剂量梯度设计原则, 将 30 只小鼠分为对照组、矽尘组、Bru 低剂量(1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组、Bru 中剂量(2  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组、Bru 高剂量(4  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组 5 组, 每组 6 只, 在实验第 1 天使用一次性非气管暴露法建立矽肺小鼠模型<sup>[17]</sup>。对照组: 气

管内滴注 50  $\mu\text{L}$  生理盐水; 矽尘组: 气管内滴注 50  $\mu\text{L}$ 、60  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\text{SiO}_2$  悬浊液; Bru 各剂量组: 在气管内滴注  $\text{SiO}_2$  悬浊液的同时, 分别按 1、2、4  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  的剂量腹腔注射 Bru(14907-95-3, 使用高效液相色谱法测定药物的纯度 $\geq 98\%$ , 中国埃法生物) 溶液 200  $\mu\text{L}$ , 连续注射 5 d, 随后隔天注射。各组小鼠在滴注 28 d 后处死, 收集肺组织。

### 1.3 肺系数的测定

麻醉小鼠后称量体重, 处死小鼠后分离肺组织并称重。计算各组小鼠肺系数: 肺系数( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )=肺脏质量( $\text{mg}$ )/体重( $\text{g}$ )。

### 1.4 组织学检查

小鼠处死后, 取左肺肺门处组织, 采用 4% 的多聚甲醛溶液固定, 经石蜡包埋后制成 5  $\mu\text{m}$  的切片。将切片进行苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin, HE) 和 Masson 三染后, 于光学显微镜 (DM 4000B 型, 德国 Leica) 下观察, 并使用 Image J v1.8.0 软件分析胶原着色的光密度值。在每个样本中选取 3 个不同区域进行评估, 并取平均值。

### 1.5 Western blot 检测肺组织相关蛋白的表达

取肺组织样本称重后匀浆并加入放射免疫沉淀法 (radioimmunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液 (P0013B, 中国碧云天) 裂解 1 h, 12000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 半径 18.5 cm, 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 20 min, 吸取上清蛋白并根据比辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒 (P0010, 中国碧云天) 说明书进行 BCA 定量。随后, 蛋白经变性、电泳、转膜, 封闭, 后于 4  $^{\circ}\text{C}$  温育 Cleaved-caspase 3 (1:1000, AC033, 中国碧云天)、Caspase 3 (1:1000, AF6311, 中国亲科生物)、I 型胶原蛋白 (collagen I, Col-I) (1:1000, AF7001, 中国亲科生物)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) (1:1000, A17910, 中国爱博泰克)、Beclin1 (1:1000, AF5128, 中国亲科生物)、p62 (1:1000, 5114, 美国 CST)、微管相关蛋白 1 轻链  $\beta 3$  (microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta, LC3B) (1:1000, 2775, 美国 CST)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase, GAPDH) (1:3000, AF7021, 中国亲科生物)、Nrf2 (1:1000, BF8017, 中国亲科生物)、Keap1 (1:1000, A11484, 中国爱博泰克) 一抗过夜。次日蛋白条带经 TBST 洗涤后于室温下温育辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗兔 IgG (1:4000, AS014, 中国爱博泰克) 或 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:4000, AS003, 中国爱博泰克) 二抗 1 h, 再以 TBST 洗涤。使用

增强型化学发光液 (BL520A, 中国白鲨生物) 显影后, 使用 Image J v1.8.0 软件对蛋白条带进行灰度值分析。以目的蛋白灰度值/内参蛋白 GAPDH 灰度值表示各目的蛋白的相对表达水平。

### 1.6 实时荧光定量 PCR (realtime fluorescence-based quantitative PCR, RT-qPCR) 检测肺组织相关 mRNA 的表达

取适量小鼠肺组织, 使用 TRIzol (R011-100, 中国鼎国昌盛生物) 法提取总 RNA, 并用核酸蛋白测定仪 (Bio Photometer D30, 德国 Eppendorf) 测定总 RNA 的浓度及纯度。根据 Prime Script RT 试剂盒 (RK20429, 中国爱博泰克) 说明书进行逆转录, 使用 SYBR Green Master Mix 试剂盒 (RK21204, 中国爱博泰克) 进行 RT-qPCR。以 GAPDH 作为内参基因, 使用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  方法计算各基因的相对表达量。引物名称及序列见表 1。

表 1 引物名称及序列  
Table 1 Primer names and sequences

引物名称	引物序列(5'-3')
Caspase 3 正向:	GCTGACTTCTGTATGCTTACTC 反向: AATTCCGTTGCCACCTTCCT
Col-I 正向:	CAGTGGCGGTTATGACTTCAG 反向: GGCTGCGGATGTTCTCAATC
$\alpha$ -SMA 正向:	GAACACGGCATCATCACCAA 反向: ATCTCCAGAGTCCAGCACAATA
GAPDH 正向:	AATGGTGAAGGTCGGGTGTA 反向: CGCTCTGGAAGATGGTGAT

### 1.7 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据统计分析。计量资料服从正态分布以均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示。各组组间比较采用单因素方差分析, 组间均数两两比较方差齐时采用最小显著性差异法 (least significant difference, LSD), 方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验。 $P < 0.05$  则表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度 Bru 对矽肺小鼠肺系数的影响

结果如表 2 所示, 染尘 28 d 后, 与对照组相比, 矽尘组小鼠肺系数升高 ( $P < 0.01$ ); 给予 Bru 干预后, Bru 低、中剂量组小鼠肺系数下降 ( $P < 0.05$ ), 而 Bru 高剂量组与矽尘组相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 不同浓度 Bru 对矽肺小鼠肺组织病理的影响

HE 染色结果如图 1A 所示, 与对照组小鼠相比, 矽尘组小鼠肺部结构损伤, 肺泡壁受损, 大量炎性细胞浸润, 伴有纤维结节。Bru 低、中剂量组小鼠肺组织炎性细胞浸润减少, 病理损伤较矽尘组有明显改善, 而 Bru 高剂量组小鼠肺组织病变与矽尘组相比未见明显改善。

表2 不同浓度 Bru 对矽肺小鼠肺系数的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )  
Table 2 Effects of different concentrations of Bru on lung coefficient of silicosis mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

组别	肺系数/( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )
对照组	5.27±0.26
矽尘组	7.40±0.47 <sup>aa</sup>
Bru低剂量组	6.45±0.43 <sup>b</sup>
Bru中剂量组	6.39±0.42 <sup>b</sup>
Bru高剂量组	6.73±0.56

[注] aa: 与对照组相比,  $P < 0.01$ ; b: 与矽尘组相比,  $P < 0.05$ 。

Masson 染色结果如图 1B、C 所示, 与对照组相比, 暴露于  $\text{SiO}_2$  的小鼠肺组织中可见大量胶原纤维沉积。Bru 干预后, 胶原纤维减少, Bru 低、中剂量组与矽尘组相比差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

### 2.3 不同浓度 Bru 对矽肺小鼠肺组织细胞凋亡的影响

与对照组相比, 矽尘组 Cleaved-caspase 3 的表达和转录水平均提高( $P < 0.01$ ); Bru 干预后, Bru 低、中剂量组 Cleaved-caspase 3 的水平下降( $P < 0.05$ ,  $P <$

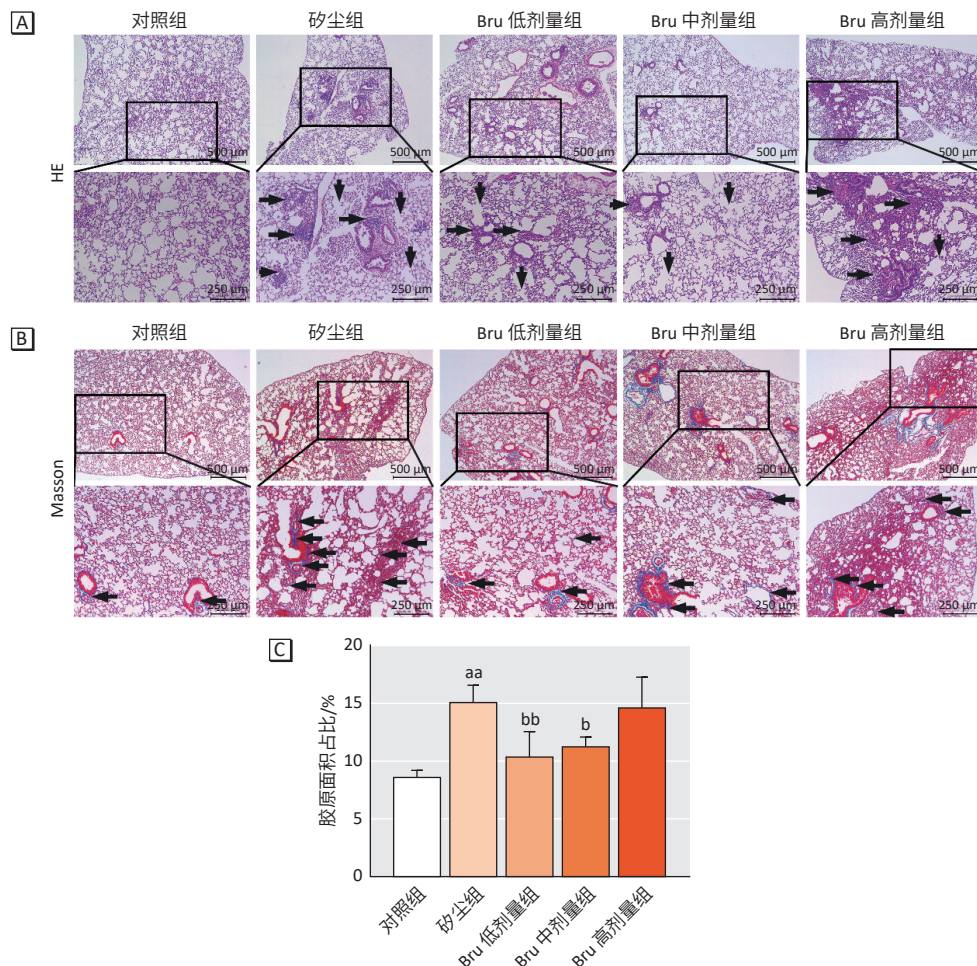
0.01), 而 Bru 高剂量组与矽尘组之间 Cleaved-caspase 3 的表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 2。

### 2.4 不同浓度 Bru 对矽肺小鼠肺组织纤维化相关蛋白及 mRNA 表达的影响

结果如图 3 所示,  $\text{SiO}_2$  暴露引起小鼠肺组织 Col-I 和  $\alpha$ -SMA 蛋白水平升高( $P < 0.01$ ), 而 Bru 低、中剂量组蛋白水平下降( $P < 0.01$ ), Bru 高剂量组与矽尘组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。RT-qPCR 检测 Col-I 和  $\alpha$ -SMA 的转录水平也得到相似的结果。

### 2.5 不同浓度 Bru 对矽肺小鼠肺组织自噬的影响

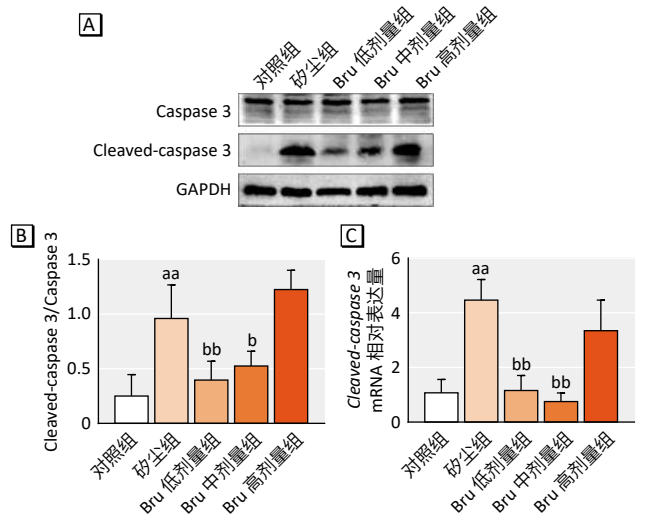
结果如图 4 所示, 相比于对照组, 矽尘组自噬相关蛋白 Beclin1、LC3-II/I 值和自噬底物蛋白 p62 的表达明显增加( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 而 Bru 低、中、高剂量组与矽尘组相比 Beclin1、LC3-II/I 值下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); Bru 低、中剂量组 p62 表达水平明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 而 Bru 高剂量组与矽尘组相比 p62 蛋白的表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。



[注] A: HE 染色; B: Masson 染色; C: 各组小鼠肺组织纤维化面积的百分比; 向右箭头表示炎性细胞浸润, 向下箭头表示肺泡结构受损, 向左箭头表示胶原沉积, 黑框表示放大部分; aa: 与对照组相比,  $P < 0.01$ ; 与矽尘组相比, b:  $P < 0.05$ ; bb:  $P < 0.01$ 。

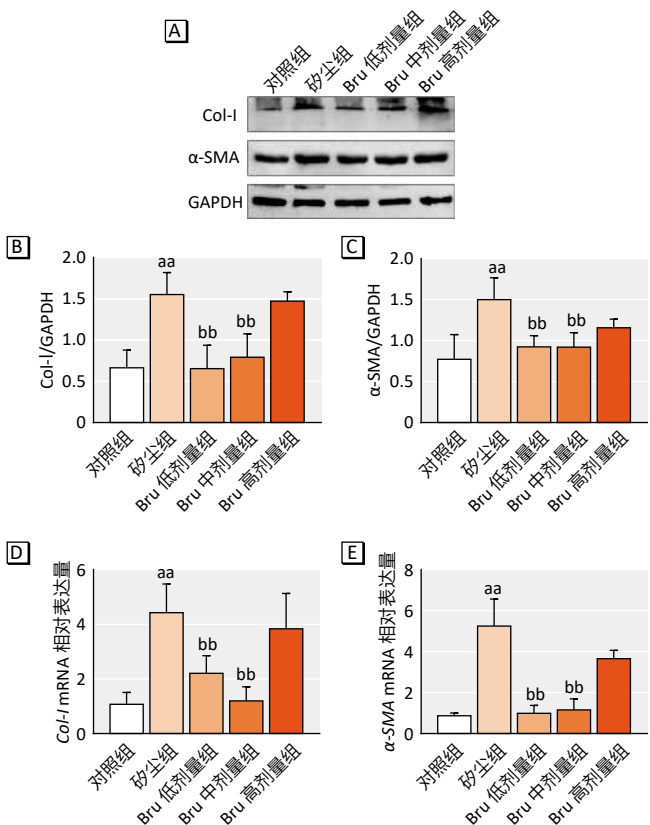
图1 各组小鼠肺组织病理变化的情况( $n=6$ )

Figure 1 Histopathological changes of lung tissues of mice in each group ( $n=6$ )



[注] A: 蛋白电泳图; B: Cleaved-caspase 3 蛋白相对表达量; C: Cleaved-caspase 3 mRNA 相对表达量。aa: 与对照组相比,  $P < 0.01$ 。与矽尘组相比, b:  $P < 0.05$ ; bb:  $P < 0.01$ 。

图 2 各组小鼠肺组织凋亡相关蛋白及 mRNA 表达的变化 ( $n=6$ )  
Figure 2 Changes in apoptosis-related protein and mRNA expression in lung tissues of mice in each group ( $n=6$ )

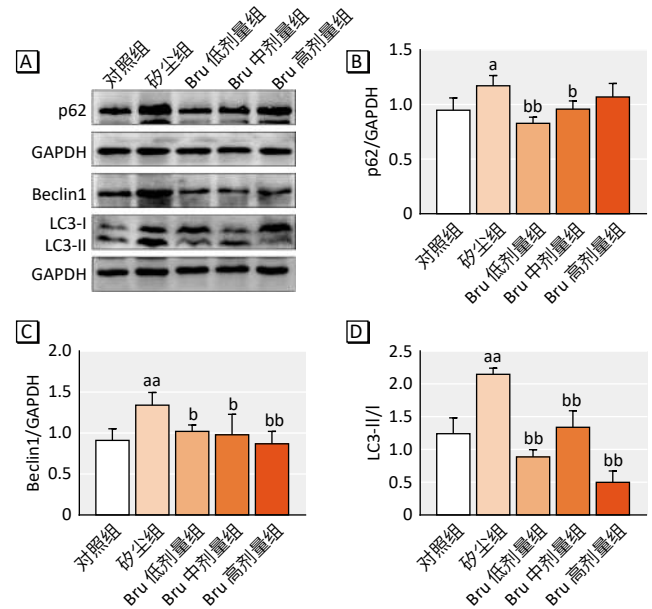


[注] A: 蛋白电泳图; B: Col-I 蛋白相对表达量; C:  $\alpha$ -SMA 蛋白相对表达量; D: Col-I mRNA 相对表达量; E:  $\alpha$ -SMA mRNA 相对表达量。aa: 与对照组相比,  $P < 0.01$ ; bb: 与矽尘组相比,  $P < 0.01$ 。

图 3 各组小鼠肺组织纤维化相关蛋白及 mRNA 表达的变化 ( $n=6$ )  
Figure 3 Changes in fibrosis-related protein and mRNA expression in lung tissues of mice in each group ( $n=6$ )

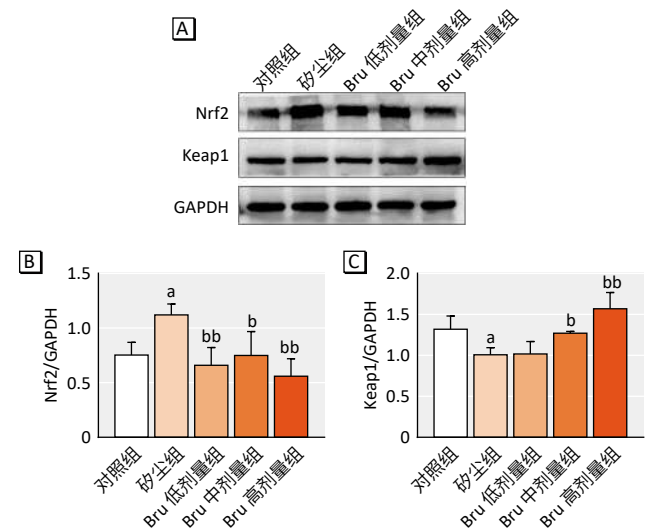
## 2.6 不同浓度 Bru 对矽肺小鼠肺组织 Nrf2、Keap1 蛋白表达的影响

结果如图 5 所示, 与对照组相比, 矽尘组小鼠肺组织中 Nrf2 蛋白水平增加 ( $P < 0.05$ ), Keap1 蛋白水平减少 ( $P < 0.05$ ); 而 Bru 干预后小鼠肺组织中 Nrf2 的蛋白水平下降, 其中 Bru 高剂量组最低 ( $P < 0.01$ ), Bru 中、高剂量组 Keap1 蛋白水平增加 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。



[注] A: 蛋白电泳图; B: p62 相对表达量; C: Beclin1 相对表达量; D: LC3-II 相对 LC3-I 的表达。与对照组相比, a:  $P < 0.05$ ; aa:  $P < 0.01$ 。与矽尘组相比, b:  $P < 0.05$ ; bb:  $P < 0.01$ 。

图 4 各组小鼠肺组织 p62、Beclin1 和 LC3 蛋白表达的变化 ( $n=6$ )  
Figure 4 Changes in protein expression of p62, Beclin1, and LC3 in lung tissues of mice in each group ( $n=6$ )



[注] A: 蛋白电泳图; B: Nrf2 相对表达量; C: Keap1 相对表达量。a: 与对照组相比,  $P < 0.05$ 。与矽尘组相比, b:  $P < 0.05$ ; bb:  $P < 0.01$ 。

图 5 各组小鼠肺组织 Nrf2、Keap1 蛋白表达的变化 ( $n=6$ )  
Figure 5 Changes in protein expression of Nrf2 and Keap1 in lung tissues of mice in each group ( $n=6$ )

### 3 讨论

矽肺的发病机制复杂且未完全阐明, 缺乏有效的治疗<sup>[18]</sup>。Bru 是中药鸦胆子的重要成分之一, 在矽肺中的作用未见报道。本研究通过建立不同浓度 Bru 多次干预的矽肺小鼠模型, 发现低、中剂量 Bru 可显著降低矽肺小鼠的肺系数, 抑制纤维化相关标志物 Col-I 和  $\alpha$ -SMA 的表达, 改善矽肺小鼠肺组织的病理损伤, 而高剂量 Bru 对上述指标的影响不明显, 提示 1、2 mg·kg<sup>-1</sup> Bru 具有抗矽肺纤维化的效应。

自噬是细胞维持内环境稳态的动态平衡过程, 是矽肺纤维化发生、发展的重要机制之一。Beclin1 和 LC3 是重要的自噬相关蛋白, 介导自噬体的形成。LC3 分为 I 型和 II 型, 在自噬过程中, 胞质 LC3-I 经泛素化修饰转变为脂质化形式的 LC3-II, 进而诱导自噬体的生长与闭合, 因此 LC3-II/I 可反映自噬体的变化<sup>[19]</sup>。p62 是选择性自噬中的关键蛋白, 与泛素化底物结合并转运至自噬溶酶体完成底物的降解。在自噬过程中 p62 蛋白的异常增高可提示 p62 绑定的泛素化蛋白聚集, 即自噬降解功能受损<sup>[20]</sup>。本研究发现低、中剂量 Bru 干预的矽肺小鼠肺组织中 Beclin1、LC3-II/I 和 p62 的蛋白表达下降, 证明低、中剂量 Bru 可抑制矽肺小鼠肺组织的自噬活性, 改善自噬降解障碍。凋亡是一种程序性细胞死亡, 与自噬密切相关。研究证实, 自噬失调引起的 p62 的积累促进细胞凋亡<sup>[21]</sup>。课题组前期的研究也发现阻碍自噬降解会加剧 SiO<sub>2</sub> 诱导的 AMs 凋亡<sup>[4]</sup>。Caspase 3 是凋亡途径中关键的下游调控因子, 当被激活后, 活化型 Caspase 3 引发下游 Caspase 级联反应, 以蛋白水解级联的方式切割细胞骨架和核蛋白, 从而诱导细胞凋亡<sup>[22-23]</sup>。因此, 活化型 Caspase 3 即 Cleaved-caspase 3 被视为凋亡事件的最终执行者, 其相对于总 Caspase 3 的表达水平可代表细胞凋亡程度。本研究观察到低、中剂量 Bru 可显著抑制 Cleaved-caspase 3 的表达, 提示低、中剂量 Bru 可能通过改善自噬降解障碍减轻 SiO<sub>2</sub> 触发的细胞凋亡。然而高剂量 Bru 对 p62 和 Cleaved-caspase 3 没有明显的抑制作用, 提示高剂量 Bru 未改善自噬降解障碍和凋亡, 这可能是高剂量 Bru 未发挥抗矽肺纤维化作用的原因之一。

Nrf2 是一种重要的核转录因子, 也是抗氧化防御系统的主要调节器<sup>[24]</sup>。正常情况下, Nrf2 与 Keap1 结合定位于细胞质中, 并通过泛素-蛋白酶体途径降解。在氧化刺激下, Nrf2 与 Keap1 解离并进入细胞核, 诱导抗氧化基因的转录, 保护细胞免受内源性和外源性

的氧化损伤<sup>[5]</sup>。研究证实 Keap1-Nrf2 通路、凋亡和自噬之间相互调节, 在有害化学物质诱导的细胞毒性中, 适度激活 Nrf2 具有抗凋亡作用<sup>[25]</sup>, 而 Nrf2 的持续高表达加剧细胞凋亡<sup>[8, 26-27]</sup>。此外, 由自噬失调引起的 p62 积累可增强其与 Keap1 的结合, 诱导 Nrf2 持续激活, 进一步加剧细胞凋亡和自噬抑制<sup>[8]</sup>。Bru 被广泛用作 Nrf2 的有效抑制剂<sup>[28]</sup>, 因此本研究进一步检测了矽肺小鼠肺组织中 Keap1-Nrf2 的蛋白水平以探究 Bru 调控自噬是否与 Keap1-Nrf2 通路有关。本研究结果表明, SiO<sub>2</sub> 暴露后小鼠肺组织中 Nrf2 水平增加, Keap1 水平下降, 提示 SiO<sub>2</sub> 激活 Keap1-Nrf2 通路。Bru 则逆转了由 SiO<sub>2</sub> 引起的 Nrf2 和 Keap1 蛋白水平的变化, 提示 Bru 可能通过 Keap1-Nrf2 通路调控自噬缓解矽肺纤维化。值得注意的是, Chen 等<sup>[29]</sup>发现 Nrf2 缺陷小鼠抗氧化反应减弱, 对镉暴露诱导的肾损伤更敏感, 证实了过度抑制 Nrf2 可导致氧化还原失衡和组织损伤。本次实验结果显示 Bru 高剂量组 Nrf2 蛋白水平最低, 推测在矽肺小鼠模型中高剂量 Bru 可能抑制了 Nrf2 对 SiO<sub>2</sub> 暴露的适应性激活, 阻碍下游抗氧化反应的启动, 导致细胞内活性氧积累加剧氧化损伤, 从而治疗效果不明显。

本研究尚有以下局限性: 没有定期监测小鼠的体重, 未能探讨不同浓度 Bru 对小鼠体重增长的影响; 在实验设计方面, 没有设立 Bru 对照组, 未探究 Bru 对小鼠生理状态的影响; 在机制研究方面, 尚需在细胞层面探究 Bru 的作用, 进一步探讨高剂量 Bru 的效果, 以及明确 Bru 抗矽肺纤维化的机制。

综上, 低、中剂量 (1、2 mg·kg<sup>-1</sup>) Bru 可能通过 Keap1-Nrf2 通路调控自噬, 改善自噬降解障碍, 减轻细胞凋亡, 延缓矽肺纤维化的进展。然而本次的实验结果也表明, 相较于低、中剂量 Bru, 高剂量 Bru 没有表现出显著的治疗效果。因此, 在未来的研究中需要注意 Bru 剂量的选择, 并需要进一步确定 Bru 抗矽肺纤维化的确切机制, 为矽肺的治疗提供更有效的策略。

### 参考文献

- [1] LIU X, JIANG Q, WU P, et al. Global incidence, prevalence and disease burden of silicosis: 30 years' overview and forecasted trends[J]. *BMC Public Health*, 2023, 23(1): 1366.
- [2] GLICK D, BARTH S, MACLEOD KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms[J]. *J Pathol*, 2010, 221(1): 3-12.
- [3] CHEN S, YUAN J, YAO S, et al. Lipopolysaccharides may aggravate apoptosis through accumulation of autophagosomes in alveolar macrophages of human silicosis[J]. *Autophagy*, 2015, 11(12): 2346-2357.
- [4] HE X, CHEN S, LI C, et al. Trehalose alleviates crystalline silica-induced pul-

- monary fibrosis via activation of the TFEB-mediated autophagy-lysosomal system in alveolar macrophages[J]. *Cells*, 2020, 9(1): 122.
- [5] JIANG T, HARDER B, DE LA VEGA MR, et al. p62 links autophagy and Nrf2 signaling[J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 88: 199-204.
- [6] JARAMILLO MC, ZHANG DD. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer[J]. *Genes Dev*, 2013, 27(20): 2179-2191.
- [7] DE LA VEGA MR, DODSON M, GROSS C, et al. Role of Nrf2 and autophagy in acute lung injury[J]. *Curr Pharmacol Rep*, 2016, 2(2): 91-101.
- [8] LIAN CY, CHU BX, XIA WH, et al. Persistent activation of Nrf2 in a p62-dependent non-canonical manner aggravates lead-induced kidney injury by promoting apoptosis and inhibiting autophagy[J]. *J Adv Res*, 2023, 46: 87-100.
- [9] ZHAO Y, XU G, LI H, et al. Genome-wide mRNA profiling identifies the Nrf2-regulated lymphocyte oxidative stress status in patients with silicosis[J]. *J Occup Med Toxicol*, 2021, 16(1): 40.
- [10] YU XQ, SHANG XY, HUANG XX, et al. Brusatol: A potential anti-tumor quassinoid from *Brucea javanica*[J]. *Chin Herb Med*, 2020, 12(4): 359-366.
- [11] FENG L, LI J, YANG L, et al. Tamoxifen activates Nrf2-dependent SQSTM1 transcription to promote endometrial hyperplasia[J]. *Theranostics*, 2017, 7(7): 1890-1900.
- [12] REN D, VILLENEUVE NF, JIANG T, et al. Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(4): 1433-1438.
- [13] YANG Y, TIAN Z, GUO R, et al. Nrf2 inhibitor, Brusatol in combination with trastuzumab exerts synergistic antitumor activity in HER2-positive cancers by inhibiting Nrf2/HO-1 and HER2-AKT/ERK1/2 pathways[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 9867595.
- [14] YE R, DAI N, HE Q, et al. Comprehensive anti-tumor effect of Brusatol through inhibition of cell viability and promotion of apoptosis caused by autophagy via the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105: 962-973.
- [15] OH ET, KIM CW, KIM HG, et al. Brusatol-mediated inhibition of c-Myc increases HIF-1 $\alpha$  degradation and causes cell death in colorectal cancer under hypoxia[J]. *Theranostics*, 2017, 7(14): 3415-3431.
- [16] 杨星. 鸦胆子苦醇对TNF- $\alpha$ 诱导的HaCaT细胞与银屑病样小鼠的作用及机制研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2020.
- YANG X. Effect and mechanism study of brusatol in TNF- $\alpha$ -induced HaCaT cells and psoriasis-like mice[D]. Chongqing: Chongqing University, 2020.
- [17] TAN S, YANG S, KANG H, et al. Atractylenolide II ameliorated autophagy dysfunction via epidermal growth factor receptor-mammalian target of rapamycin signals and alleviated silicosis fibrosis in mice[J]. *Lab Invest*, 2023, 103(2): 100024.
- [18] HANDRA CM, GURZU IL, CHIRILA M, et al. Silicosis: new challenges from an old inflammatory and fibrotic disease[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2023, 28(5): 96.
- [19] TANIDA I, UENO T, KOMINAMI E. LC3 and autophagy[M]//DERETIC V. Autophagosome and Phagosome. Totowa: Humana Press, 2008: 77-88.
- [20] ZAFFAGNINI G, SAVOVA A, DANIELI A, et al. p62 filaments capture and present ubiquitinated cargos for autophagy[J]. *EMBO J*, 2018, 37(5): e98308.
- [21] ZHU F, LI X, TANG X, et al. Neferine promotes the apoptosis of HNSCC through the accumulation of p62/SQSTM1 caused by autophagic flux inhibition[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 48(1): 124.
- [22] 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.
- [23] NAGATA S. Apoptosis and clearance of apoptotic cells[J]. *Annu Rev Immunol*, 2018, 36: 489-517.
- [24] BARTOLINI D, DALLAGLIO K, TORQUATO P, et al. Nrf2-p62 autophagy pathway and its response to oxidative stress in hepatocellular carcinoma[J]. *Transl Res*, 2018, 193: 54-71.
- [25] LI Z, ZHU J, WAN Z, et al. Theaflavin ameliorates renal ischemia/reperfusion injury by activating the Nrf2 signalling pathway *in vivo* and *in vitro*[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 134: 111097.
- [26] HOSEINRAD H, SHAHRESTANAKI JK, MOGHADDAM MM, et al. Protective effect of vitamin D3 against Pb-induced neurotoxicity by regulating the Nrf2 and NF- $\kappa$ B pathways[J]. *Neurotox Res*, 2021, 39(3): 687-696.
- [27] KONG Q, DENG H, LI C, et al. Sustained high expression of NRF2 and its target genes induces dysregulation of cellular proliferation and apoptosis is associated with arsenite-induced malignant transformation of human bronchial epithelial cells[J]. *Sci Total Environ*, 2021, 756: 143840.
- [28] CAI SJ, LIU Y, HAN S, et al. Brusatol, an Nrf2 inhibitor for future cancer therapeutic[J]. *Cell Biosci*, 2019, 9: 45.
- [29] CHEN C, HAN X, WANG G, et al. Nrf2 deficiency aggravates the kidney injury induced by subacute cadmium exposure in mice[J]. *Arch Toxicol*, 2021, 95(3): 883-893.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 王晓宇)