

抑制 TLR4/NF- κ B 通路逆转 SiO₂ 诱导的小鼠巨噬细胞炎症反应及 M1 促炎表型转化

蔡倩^{1,2}, 王晶³, 马佳¹, 马福成¹, 刘迎雪¹, 刘晓明¹

1. 宁夏大学生命科学学院/西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 宁夏 银川 750021
2. 宁夏医科大学公共卫生学院环境因素与慢性病控制重点实验室, 宁夏 银川 750004
3. 宁夏医科大学总医院病理科, 宁夏 银川 750004



DOI 10.11836/JEOM21184

摘要:

[背景] 二氧化硅(SiO₂)粉尘可引起肺泡巨噬细胞中的炎症事件和细胞损伤,但具体作用机制不明。

[目的] 探究抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路在 SiO₂ 诱导的小鼠巨噬细胞炎症反应及巨噬细胞表型改变中的作用。

[方法] 16 只 6~8 周龄的 C57BL/6 小鼠(雌雄各半)经 50 μ L 生理盐水或 50 μ L 50 mg·mL⁻¹ 的 SiO₂ 肺内灌注 14、28 d 后处死,苏木精伊红染色(HE)对肺组织进行病理学观察,采用免疫印迹法(WB)及免疫荧光法(IF)检测肺组织 TLR4 信号相关蛋白 Toll 样受体 4(TLR4)、髓样分化因子 88(Myd88)和肿瘤坏死因子受体相关因子 6(TRAF6)表达。小鼠巨噬细胞系 Raw264.7 细胞在暴露于 SiO₂ 前 1 h 加入 TLR4 抑制剂 M62812 进行预处理,后加入 SiO₂(100 μ g·cm⁻²)协同刺激 12 h,采用 WB 和 IF 检测 TLR4 介导的炎症信号关键蛋白 TLR4、Myd88、磷酸化的核因子 κ B P65(P-NF- κ B P65)、磷酸化的核因子 1 κ B 抑制蛋白 α (P-1 κ B α)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-6(IL-6)以及巨噬细胞 M1 表型标志蛋白一氧化氮合酶(iNOS)、分化抗原决定簇(CD86)和 M2 表型标志精氨酸酶-1(Arg-1)的表达。酶联免疫吸附实验(ELISA)检测在小鼠 Raw264.7 细胞中抑制 TLR4 后细胞培养液上清中炎症因子 TNF- α 、IL-6 的含量。

[结果] 小鼠气道灌注 SiO₂ 后,HE 染色结果显示第 14 天矽肺小鼠肺组织局部可见明显的肺纤维化结节。WB 结果显示,与对照组相比,矽肺小鼠肺组织中 TLR4 信号相关蛋白 TLR4、Myd88 和 TRAF6 表达水平上调($P < 0.05$)。IF 结果显示,与对照组相比,矽肺小鼠肺组织中 TLR4 和 Myd88 荧光强度增强,提示 TLR4 信号激活。体外实验显示与对照组相比,100 μ g·cm⁻² SiO₂ 处理小鼠 Raw264.7 细胞不同时间(6、12、24、48 h),TLR4、Myd88、P-NF- κ B P65 和 P-1 κ B α 的表达上调,其中 TLR4 和 P-1 κ B α 在 6、12 及 24 h 刺激组的上调有统计学意义($P < 0.05$),Myd88 在 12、24 h 刺激组的上调有统计学意义($P < 0.05$),P-NF- κ B P65 在 12 h 刺激组的上调有统计学意义($P < 0.05$)。采用抑制剂抑制 TLR4 表达后,可明显减弱 SiO₂ 诱导的 TLR4 及相关转导通路 Myd88、TRAF6、P-NF- κ B P65、TNF- α 和 IL-6 表达,同时下调 SiO₂ 暴露导致的巨噬细胞 M1 表型标志 iNOS 的表达,上调 M2 表型标志物 Arg-1 的表达。

[结论] 抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路可以逆转 SiO₂ 诱导的小鼠巨噬细胞炎症反应及向 M1 促炎表型转化。

关键词: 矽肺; TLR4/NF- κ B 信号通路; 巨噬细胞极化; 炎症反应

Reduction of inflammation response and transition of M1 toward M2 phenotypes of macrophages in response to SiO₂ challenge by inhibition of TLR4 CAI Qian^{1,2}, WANG Jing³, MA Jia¹, MA Fucheng¹, LIU Yingxue¹, LIU Xiaoming¹ (1. Key Laboratory of Ministry of Education for Conservation and Utilization of Special Biological Resources of Western China, College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China; 2. Key Laboratory of Environmental Factors and Chronic Disease Control, School of Public Health, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 3. Department of Pathology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract:

[Background] The mechanisms of silicon dioxide (SiO₂)-induced inflammation and cell injury in

基金项目

国家自然科学基金(31860318, 32070863)

作者简介

并列第一作者。

蔡倩(1984—),女,博士生;

E-mail: caiqian1212@126.com

王晶(1986—),女,硕士,技师;

E-mail: sunnywjing@126.com

通信作者

刘晓明, E-mail: erc1080@163.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-04-29

录用日期 2021-11-30

文章编号 2095-9982(2022)01-0071-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

蔡倩, 王晶, 马佳, 等. 抑制 TLR4/NF- κ B 通路逆转 SiO₂ 诱导的小鼠巨噬细胞炎症反应及 M1 促炎表型转化 [J]. 环境与职业医学, 2022, 39(1): 71-77.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21184

Funding

This study was funded.

Correspondence to

LIU Xiaoming, E-mail: erc1080@163.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2021-04-29

Accepted 2021-11-30

► To cite

CAI Qian, WANG Jing, MA Jia, et al. Reduction of inflammation response and transition of M1 toward M2 phenotypes of macrophages in response to SiO₂ challenge by inhibition of TLR4[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(1): 71-77.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21184

pulmonary macrophages are not fully characterized.

[Objective] To investigate the potential roles of inhibition of toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signaling in inflammation and macrophage polarization in mouse Raw264.7 cells in response to SiO₂ stimulation.

[Methods] Sixteen 6- to 8-week-old C57BL/6 mice, half male and half female, were intratracheally instilled with 50 μ L of SiO₂ (50 mg·mL⁻¹ in saline) or normal saline via oropharyngeal route, and the lungs of mice were harvested at 14 d and 28 d post the first challenge of SiO₂. HE staining of mouse lung was used for histopathological analysis. The expressions of TLR4 signaling-related proteins were detected by Western blotting (WB) and immunofluorescent (IF) assay, including TLR4, myeloid differentiation factor 88 (Myd88), and TNF receptor associated factor 6 (TRAF6). Raw264.7 cells were stimulated with SiO₂ (100 μ g·cm²) for 12 h in absence or presence of TLR4 inhibitor M62812 for 13 h before the culture supernatants and cell lysates were harvested for analysis. The expressions of key components of TLR4 signaling cascade including TLR4, Myd88, and phosphorylated nuclear factor-kappa B P65 (P-NF- κ B P65), P-1NF-kappa-B inhibitor α (P-1 κ B α), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin 6 (IL-6), M1 phenotype markers inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cluster of differentiation 86 (CD86), as well as M2 phenotype arginase-1 (Arg-1) were accessed by WB and IF. The expressions of inflammation factors IL-6 and TNF- α in supernatants were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

[Results] After SiO₂ intratracheal instillation for 14 d, the HE staining results showed obvious fibrotic nodules in the lung tissues of mice. The results of WB analysis revealed more abundant TLR4, Myd88, and TRAF6 in the silicosis mouse lung samples than in the controls. The results of IF assay showed an increased abundance of TLR4 and Myd88 proteins in the lung samples of silicosis mice at 14 d post the silica challenge, compared to the controls, indicating TLR4 signaling activation. As seen in the *in vitro* experiment, significant upregulations after the exposure to 100 μ g·cm² SiO₂ were observed in TLR4 and P-1 κ B α at 6, 12, and 24 h ($P < 0.05$); Myd88 at 12 and 24 h ($P < 0.05$); and P-NF- κ B P65 at 12 h ($P < 0.05$). The inhibitor significantly suppressed the expressions of TLR4, Myd88, TRAF6, P-NF- κ B P65, TNF- α , and IL-6 in Raw264.7 cells. In addition, the SiO₂-induced M1 phenotype marker iNOS was significantly suppressed, but the M2 phenotype marker Arg-1 was increased in the Raw264.7 cells.

[Conclusion] The inhibition of TLR4/NF- κ B signaling could result in a reduction of the inflammation response and the transition of M1 toward M2 phenotypes of macrophages in response to SiO₂ challenge.

Keywords: silicosis; TLR4/NF- κ B signaling; macrophage polarization; inflammation

矽肺病是由于吸入二氧化硅(silicon dioxide, SiO₂)结晶而引起的不可逆的职业性慢性纤维化肺病,目前尚无有效治疗手段^[1]。近年来,大量工业生产例如牛仔布喷砂、珠宝抛光、人造石工程、建筑施工和公路维修中的作业人员仍存在过量吸入 SiO₂ 的风险,作业人员患病不仅对自身身体健康造成严重危害,也给家庭和社会造成严重的经济负担。在许多发展中国家矽肺病仍然是影响社会健康发展的重大公共卫生和社会问题^[2-5]。

目前 SiO₂ 诱发矽肺病的致病机制尚未完全阐明。研究表明,肺泡巨噬细胞(alveolar macrophages, AM)是尘肺发生的启动细胞,慢性和急性接触 SiO₂ 后,AM活化引发的复杂炎症因子调控,而持续的慢性炎症微环境的刺激会导致肺脏不可逆的纤维化进程,这将最终决定矽肺病的发展^[6-7]。在多项不同的研究中证实 SiO₂ 颗粒和 SiO₂ 染毒细胞生成的氧化应激产物会导致细胞和肺部损伤;增加包括肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素-1 α (interleukin-1 α , IL-1 α)和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)等炎症细胞因子的表达;激活 Toll 样受体(toll-like receptor, TLR)细胞信号途径,导致特定转录因子,例如磷酸化的核因子 kappa B(P-nuclear factor-kappa

B, P-NF- κ B)的表达^[7-10]。其中对 TLR4/髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, Myd88)介导的炎症反应研究最为深入。研究者使用 Myd88 基因敲除小鼠模型,证实了在肺部应对 SiO₂ 刺激时 Myd88 信号通路激活能促进肉芽肿的形成及辅助性 T 细胞 17(T helper cell 17, Th17)相关的炎症反应^[11],进一步抑制炎症信号通路 NF- κ B 可防止 SiO₂ 诱导的矽肺小鼠的肺损伤^[12]。

因此, SiO₂ 粉尘可引起 AM 中的炎症事件和细胞损伤,但由于激活矽肺发生的信号通路以及其对细胞因子网络的调控机制极其复杂,尚未完全阐明。本研究旨在探索 SiO₂ 诱导的炎症反应中 TLR4 和相关信号通路的调节以及巨噬细胞促炎及抑炎表型在其中的作用。

1 对象与方法

1.1 实验材料

SiO₂(体外实验采用 2 μ m 粒径的 SiO₂,体内实验采用 0.5~10 μ m 粒径的 SiO₂)购自美国 Sigma 公司;C57BL/6(18~22 g, 6~8 周龄)小鼠购自中国北京维通利华实验动物技术有限公司;动物组织蛋白提取试剂盒购自中国北京雷根生物科技有限公司;细胞蛋白提取

试剂盒和 BCA 蛋白含量检测试剂盒购自中国北京凯基生物科技有限公司;小鼠巨噬细胞系(Raw264.7 细胞)购自美国模式培养物研究所;小牛血清购自澳大利亚 Ausbian 公司;DMEM 培养基、胰蛋白酶、青霉素、链霉素购自中国 HyClone 公司;TLR4 信号抑制剂 M62812 购自英国 Tocris 公司;兔抗 TLR4 多克隆抗体购自美国 Novus Biology 公司;鼠抗 P-NF- κ B P65 (NF- κ B 家族有 5 个成员,本研究中所用的抗体 P-NF- κ B P65 是 P-NF- κ B1 二聚体蛋白中的 P65 亚单位)、山羊 Myd88 单克隆抗体购自美国 R&D 公司;兔抗一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和分化抗原决定簇 86(cluster of differentiation 86, CD86)多克隆抗体购自英国 Abcam 公司;山羊精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1)多克隆抗体购自中国台湾 Abnova 公司;兔抗 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)及 β -肌动蛋白(β -actin)抗体购自中国 Bioss 公司;山羊抗兔和山羊抗鼠二抗购自中国北京中杉金桥生物科技有限公司。PVDF 膜购自美国 Millipore 公司;ECL 发光液购自美国 Amersham 公司。

1.2 体内实验

1.2.1 小鼠矽肺模型建立 根据前期工作基础及文献资料^[9-10],16 只 6~8 周的 C57BL/6 小鼠(雌雄各半)随机分成生理盐水对照组、SiO₂ 染毒组,每组各 8 只小鼠。SiO₂ 染毒组小鼠采用气道灌注法在小鼠气道内灌注粒径为 0.5~10 μ m、质量浓度为 50 mg·mL⁻¹ 的 SiO₂ 50 μ L,生理盐水组小鼠气道内灌注 50 μ L 生理盐水,在灌注后第 14 天时取小鼠肺组织。SiO₂ 使用之前采用高温烘烤 160 $^{\circ}$ C 2 h 以去除内毒素。动物实验经宁夏医科大学总医院医学科研伦理委员会批准(编号:2020-487),且遵循国家和单位有关实验动物管理和使用的规定。

1.2.2 苏木精和伊红染色 将小鼠肺组织固定在体积分数为 10%中性福尔马林溶液中,后续常规石蜡包埋,切成 5 μ m 厚的切片用于苏木精和伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色,具体染色方法如文献 [13] 所述,评估组织的损伤及结构改变。

1.2.3 检测小鼠肺组织中 TLR4/NF- κ B 信号相关蛋白的表达 采用免疫印迹(Western blotting, WB)检测 TLR4、Myd88 及肿瘤坏死因子受体相关因子 6(TNF receptor associated factor 6, TRAF6)的表达。使用总蛋白提取试剂盒(凯基生物,中国)提取小鼠肺组织总蛋白,将 30 μ g 总蛋白在体积分数为 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中进

行电泳,并将分离出的蛋白转移到 PVDF 膜上。之后,用质量分数 5%的脱脂牛奶封闭膜,并分别与目的基因的一抗(TLR4、Myd88、TRAF6 和 GAPDH)一起孵育。用辣根过氧化物偶联的二抗检测抗原抗体复合物。

采用免疫荧光(immunostaining, IF)检测小鼠肺组织中 TLR4 和 Myd88 的表达,将小鼠肺组织在体积分数为 4%的多聚甲醛溶液中固定过夜,然后包埋在冰冻切片包埋剂中,切成 10 μ m 厚度的切片。染色前冷冻切片放在室温下 30 min,然后再将其在 4%多聚甲醛溶液中固定 20 min,0.2%聚乙二醇辛基苯基醚通透后用体积分数为 5%驴血清孵育 1 h,一抗孵育过夜。PBS 洗掉一抗后,与一抗偶联的二抗在室温下孵育 2 h,封片后在 Leica TCS SP2A0BS 共聚焦系统下成像。

1.3 体外实验

1.3.1 细胞培养 小鼠 Raw264.7 细胞培养在含 10%(体积分数)小牛血清、1%(体积分数)的青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中,1 周传代 2~3 次,在 37 $^{\circ}$ C、含 5%(体积分数)CO₂ 的培养箱中稳定培养。

1.3.2 Raw264.7 细胞染毒和 TLR4/NF- κ B 通路关键蛋白的表达检测 体外实验采用粒径为 2 μ m,浓度为 100 μ g·cm⁻² SiO₂ 刺激小鼠 Raw264.7 细胞,0、6、12、24、48 h 后提取总蛋白,采用 WB 法检测 TLR4/NF- κ B 信号通路中 TLR4/Myd88、P-NF- κ B P65、磷酸化的核因子 1 κ B 抑制蛋白 α (P-1NF- κ B inhibitor α , P-1 κ B α)的表达,具体 WB 步骤同“1.2.3”。SiO₂ 使用之前采用高温烘烤 160 $^{\circ}$ C 2 h 以去除内毒素。

1.3.3 抑制 Raw264.7 细胞 TLR4 后相关蛋白及炎症因子表达水平检测 采用质量浓度为 3 μ g·mL⁻¹ 的 TLR4 抑制剂 M62812 抑制小鼠巨噬细胞 Raw264.7 中 TLR4 的表达。在 Raw264.7 细胞暴露于 SiO₂ 前 1 h 加入 TLR4 抑制剂 M62812 进行预处理,后加入 SiO₂ 协同刺激 12 h, M62812 的作用总时间为 13 h, SiO₂ 的染毒时间为 12 h。

使用总蛋白提取试剂盒(凯基生物,中国)提取 SiO₂ 及 TLR4 抑制剂处理的 Raw264.7 细胞的总蛋白,采用 WB 法检测 TLR4、Myd88、TRAF6、P-NF- κ B P65 以及炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的蛋白表达, WB 具体步骤同“1.2.3”。

采用 IF 检测小鼠 Raw264.7 细胞 P-NF- κ B P65 的表达情况,将各处理组的小鼠 Raw264.7 细胞在体积分数为 4%的多聚甲醛溶液中固定过夜,0.2%聚乙二醇辛基苯基醚通透后用体积分数为 5%驴血清孵育 1 h,一抗孵育过夜。PBS 洗掉一抗后,与一抗偶联的二抗在室温下孵育 2 h,封片后在 Leica TCS SP2A0BS 共聚焦

系统下成像。

小鼠 Raw264.7 细胞经 SiO_2 及 M62812 处理后, 收集培养基, 并以 $14\ 000\times g$ (离心半径 9.5 cm) 离心 5 min 以除去细胞碎片。采用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 测定在小鼠 Raw 264.7 细胞抑制 TLR4 表达后细胞培养上清液中 TNF- α 和 IL-6 含量, 将 ELISA 板预涂 100 μL 捕获抗体, 然后在添加细胞因子标准品或样品上清液之前, 将培养板用 10% 胎牛血清封闭 1 h。进一步温育 3 h 后, 洗涤孔并加入检测试剂 (检测抗体+抗生物素蛋白-HRP 试剂)。温育 1 h 后, 再次洗涤孔并加入底物。当产生适当的信号时, 使用终止溶液终止反应。最后, 使用酶标仪 (R&D 公司, 美国) 记录 450 nm 处的吸光度。

1.3.4 在小鼠 Raw264.7 细胞中抑制 TLR4 表达后巨噬细胞极性表型标志物的蛋白表达检测 使用总蛋白提取试剂盒 (凯基生物, 中国) 提取 SiO_2 及 TLR4 抑制剂处理的 Raw264.7 细胞的总蛋白, 采用 WB 法检测在小鼠 Raw264.7 细胞中抑制 TLR4 后巨噬细胞 M1 表型标志蛋白 iNOS、CD86 和 M2 表型标志 Arg-1 蛋白及内参 β -肌动蛋白 (β -actin) 的表达水平, WB 具体步骤同“1.2.3”。

1.4 统计学分析

所有实验结果均表示为均数 $\pm$ 标准差。采用 t 检验或者 One-way ANOVA 对实验结果进行分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

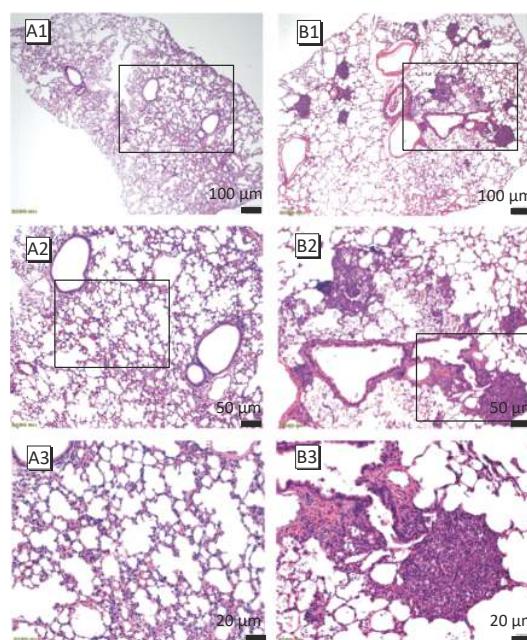
2 结果

2.1 矽肺小鼠肺组织 HE 病理学观察

小鼠肺组织解剖学形态显示: 生理盐水组肺呈粉红色, 光滑质软。 SiO_2 刺激后, 随时间延长肺部损伤进行性加重, 逐渐出现充血、体积增大、局部白色粟粒状结节等, 最终可见全肺结节等 (图片未展示)。HE 染色显示: SiO_2 刺激后第 14 天出现了纤维化病理改变, 表现为肺泡隔增厚, 肺泡腔缩小, 部分肺泡结构消失和结构紊乱, 局部可见纤维化结节, 结果表明与生理盐水组相比, 矽肺模型中的肺纤维化程度显著增加 (图 1)。

2.2 矽肺小鼠肺组织中 TLR4 信号相关蛋白表达变化

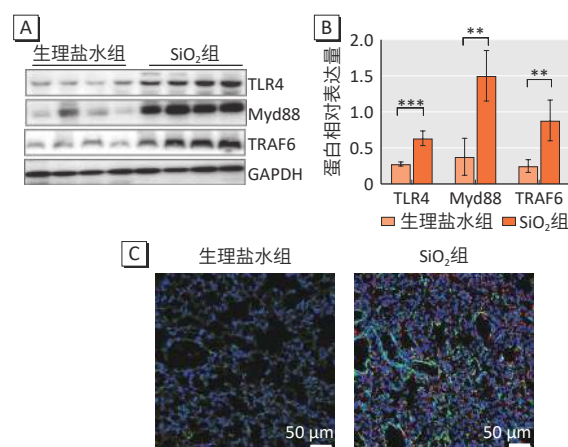
WB 结果显示, 与生理盐水组比较, 气道内滴注 SiO_2 第 14 天后矽肺小鼠肺组织中 TLR4、Myd88、TRAF6 蛋白表达水平明显增加 ($P<0.05$) (图 2A、图 2B)。IF 结果显示, 与生理盐水组比较, 矽肺小鼠肺组织中 TLR4 (绿色) 和 Myd88 (红色) 含量明显增加 (图 2C)。



[注] 黑框为放大部位。A、B 分别为生理盐水组和 SiO_2 组。1、2、3 表示不同放大倍数。

图 1 SiO_2 诱发小鼠肺组织矽肺结节 (HE 染色)

Figure 1 SiO_2 induces silicotic nodules in lungs of mice (HE staining)



[注] A: WB 检测小鼠肺组织中 TLR4、Myd88、TRAF6 蛋白水平; B: 小鼠肺组织中 TLR4、Myd88、TRAF6 蛋白水平的半定量分析 (**: $P<0.01$, ***: $P<0.001$) ($n=4$); C: IF 检测小鼠肺组织中 TLR4 (绿色) 和 Myd88 (红色) 蛋白的表达。

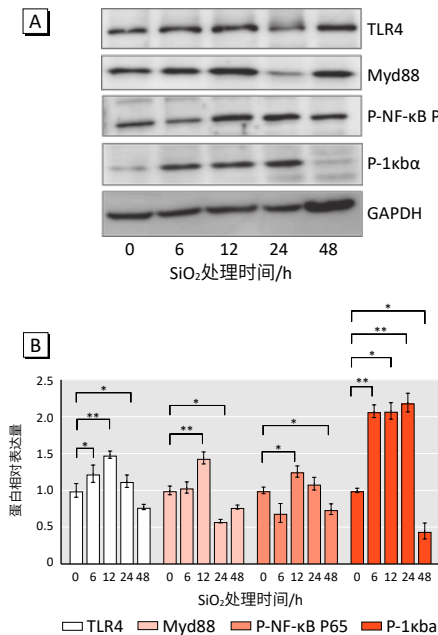
图 2 矽肺小鼠肺组织中 TLR4 信号通路活化

Figure 2 SiO_2 dynamically activates TLR4 signaling in lungs of silicosis mice

2.3 小鼠 Raw264.7 细胞经 SiO_2 染毒后 TLR4/NF- κB 通路蛋白的表达变化

WB 结果显示, 与对照组相比, 小鼠 Raw264.7 细胞暴露于 SiO_2 6 h 后 TLR4 及其相关通路调节剂 Myd88 的表达明显增加, 12 h 表达最高, 24、48 h 回落至正常水平。与对照组相比, 暴露于 SiO_2 12 h 的小鼠 Raw264.7 细胞中 P-NF- κB P65 的蛋白表达水平明显增加, 12 h 表达最高。与对照组相比, 暴露于 SiO_2 6 h 的小鼠

Raw264.7 细胞中 P-1kb α 表达明显增加, 并且上调至 24 h(图 3)。



[注] A: WB 检测 SiO_2 刺激 Raw264.7 细胞不同时间点 TLR4、Myd88、P-NF- κ B P65、P-1kb α 蛋白水平; B: Raw264.7 细胞不同时间点 TLR4、Myd88、P-NF- κ B P65、P-1kb α 蛋白的半定量分析(*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$)($n=3$)。

图 3 SiO_2 刺激小鼠 Raw264.7 细胞 TLR4/NF- κ B 通路信号活化

Figure 3 SiO_2 dynamically activates TLR4/NF- κ B signaling in Raw264.7 cells

2.4 抑制 TLR4 后 Raw264.7 细胞中 TLR4/NF- κ B 通路关键蛋白表达和炎症因子的表达

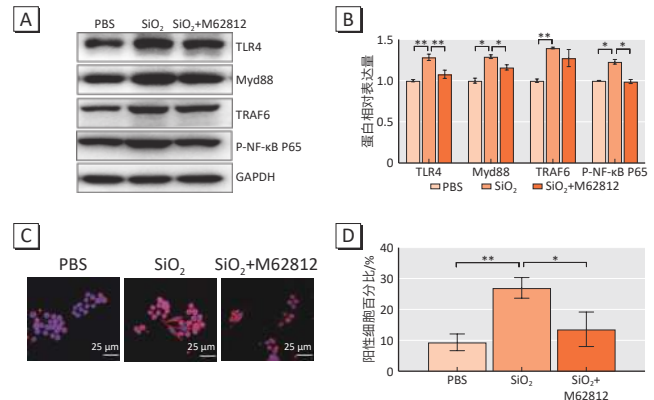
WB 结果表明, 与对照组相比, SiO_2 染毒 12 h 明显上调了小鼠 Raw264.7 细胞中 TLR4 及其相关通路主要信号分子 Myd88、TRAF6、P-NF- κ B P65、TNF- α 和 IL-6 的表达($P < 0.05$)。当在 SiO_2 染毒之前添加 TLR4 抑制剂 M62812 时, 小鼠 Raw264.7 细胞中 TLR4、Myd88、P-NF- κ B P65、TNF- α 和 IL-6 的上调效果减弱($P < 0.05$)(图 4A~图 4B, 图 5A~图 5B)。IF 结果显示, 与 SiO_2 染毒组比较, SiO_2 和 TLR4 抑制剂 M62812 刺激的 P-NF- κ B P65 的细胞核阳性百分比下降($P < 0.05$)(图 4C、图 4D)。

ELISA 结果显示, 与对照组相比, 小鼠 Raw264.7 细胞经 SiO_2 处理后细胞培养液上清中炎症细胞因子 TNF- α 和 IL-6 的分泌增加($P < 0.05$), 而在 TLR4 抑制剂 M62812 干预后下, 其表达水平较 SiO_2 染毒组显著降低($P < 0.05$)(图 5C)。

2.5 抑制 TLR4 逆转 SiO_2 诱导的 Raw264.7 细胞向 M1 促炎表型转化

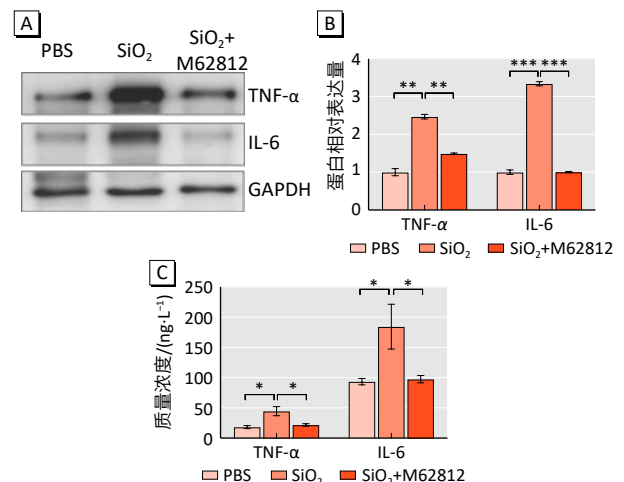
WB 结果表明, 与对照组相比, SiO_2 染毒 12 h 明显

上调了小鼠 Raw264.7 细胞中 M1 表型标志物 iNOS 和 CD86 的表达($P < 0.05$), 小鼠 Raw264.7 细胞经 SiO_2 染毒和 TLR4 抑制剂 M62812 协同刺激后 iNOS 的上调效果较 SiO_2 染毒组明显减弱($P < 0.05$)。同时, SiO_2 染毒明显下调了小鼠 Raw264.7 细胞中 M2 表型 Arg-1 的表达, SiO_2 染毒和 TLR4 抑制剂 M62812 协同刺激组的 Arg-1 的表达较 SiO_2 染毒组上调($P < 0.05$)(图 6)。



[注] A: WB 检测抑制 Raw264.7 细胞 TLR4 表达后 TLR4、Myd88、TRAF6、P-NF- κ B P65 蛋白水平; B: 抑制 Raw264.7 细胞 TLR4 表达后 TLR4、Myd88、TRAF6、P-NF- κ B P65 蛋白的半定量分析(*: $P < 0.05$, **: $P < 0.001$)($n=3$); C: 免疫荧光检测抑制 Raw264.7 细胞 TLR4 后 P-NF- κ B P65 的表达情况(标尺=25 μm); D: 采用 Image J 2.1.0 软件对 P-NF- κ B P65 核阳性着色的细胞进行定量分析, 阳性细胞百分比=核阳性细胞数量/细胞总数量(*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$)($n=3$)。

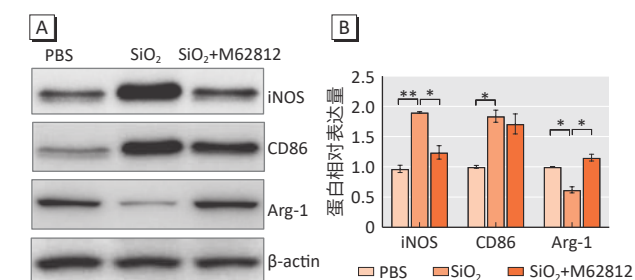
图 4 抑制 TLR4 表达抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路转导
Figure 4 TLR4 inhibitor inhibits silica-induced TLR4/NF- κ B signaling



[注] A: WB 检测抑制 Raw264.7 细胞 TLR4 表达后 TNF- α 和 IL-6 蛋白表达水平; B: 抑制 Raw264.7 细胞 TLR4 表达后 TNF- α 、IL-6 蛋白的半定量分析(**: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$)($n=3$); C: ELISA 检测抑制 Raw264.7 细胞 TLR4 表达后各组细胞培养上清液中的 TNF- α 和 IL-6 的含量(*: $P < 0.05$)($n=5$)。

图 5 抑制 TLR4 可以减轻 SiO_2 诱导的小鼠 Raw264.7 细胞的炎症反应

Figure 5 Reduction of inflammation in response to SiO_2 challenge by inhibition of TLR4 in Raw264.7 cells



[注] A: WB 检测抑制 Raw264.7 细胞 TLR4 表达后 iNOS、CD86、Arg-1 蛋白水平; B: 抑制 Raw264.7 细胞 TLR4 表达后 iNOS、CD86、Arg-1 蛋白的半定量分析(*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$) ($n=3$)。

图 6 抑制 TLR4 逆转 SiO₂ 诱导的小鼠 Raw264.7 细胞向 M1 促炎表型转化

Figure 6 Reduction of transition of M1 toward M2 phenotypes in response to SiO₂ challenge by inhibition of TLR4 in Raw264.7 cells

3 讨论

AM 位于免疫应答的关键环节, 它的激活将启动机体免疫应答。鉴于有证据表明, SiO₂ 可以在肺泡微环境中诱导炎症反应, 从而极大地促进其肺部纤维化进程^[10], 因此针对 AM 炎症的特定信号通路研究可能为预防矽肺纤维化提供新的治疗策略。

TLR4 是 Toll 样受体家族的成员, 在调节先天免疫力方面起主要作用, 以响应外源和内源性分子模式^[14-15]。TLR4 主要可以引发包括肺部炎症反应在内的各种器官的炎症反应。从体外和体内肺部损伤模型获得的结果支持 AM 是涉及 TLR4 激活的重要效应细胞^[16-17], 因而在 AM 中阻断或减弱 TLR4 信号, 有望成为研究尘肺发病机制和干预治疗的手段。在这项研究中, 本研究探讨了暴露于 SiO₂ 后 TLR4 是否影响以及如何影响小鼠 Raw264.7 细胞的炎症反应和巨噬细胞表型。

本研究发现在矽肺小鼠肺组织中 TLR4 信号传导被激活。同样的发现在 SiO₂ 诱导小鼠 Raw264.7 细胞中也被证实, 在 100 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ SiO₂ 刺激 12 h 后, 小鼠 Raw264.7 细胞被调节为 TLR4 表达上调的 M1 炎症表型。多项研究证实激活状态的 TLR4 募集了 TLR 信号转导衔接蛋白 Myd88, 然后使 1 $\text{k}\text{b}\alpha$ 磷酸化, 这种磷酸化导致 1 $\text{k}\text{b}\alpha$ 从 NF- κB 解离, 从而产生促炎细胞因子例如 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6^[18-20]。脂多糖是 TLR4 信号传导的经典激活剂, 研究发现减轻 TLR4/NF- κB 途径的激活可减少炎症介质来预防脂多糖引起的急性肺损伤^[21-22]。在本研究中, 通过抑制 TLR4 减弱了 SiO₂ 暴露后 TLR4、Myd88、P-NF- κB P65 蛋白的表达增加, 表明通过抑制 TLR4 直接抑制了 TLR4 信号通路的转导。TLR4 抑制后, TNF- α 和 IL-6 的水平也被抑制, 表明 TLR4 信号通

路与 SiO₂ 诱导的炎症反应有关。与本研究的发现一致, Chan 等^[7] 的研究证实抑制 TLR4 可以降低激活状态的 U937 细胞的炎症反应。

自发现巨噬细胞的两种极性表型以来, 更多的研究集中在巨噬细胞炎症性疾病上, 这两种功能表型是根据它们在炎症反应中发挥的作用和独特的基因表达模式来区分的。其中, M1 巨噬细胞具有促炎作用并负责炎症信号, 而 M2 巨噬细胞产生抗炎细胞因子参与消炎过程^[23-25]。通过研究巨噬细胞表型标记, 本研究证明了抑制 TLR4 可逆转 SiO₂ 诱导的小鼠 Raw264.7 细胞向 M1 促炎表型转化。在其他刺激引起的巨噬细胞炎症反应中也有类似现象的报道。例如, 缺失 TLR4 会导致巨噬细胞向 M2 表型极化, 并减轻颅脑外伤后神经炎症的发展^[26]。

因此, 本研究体内实验及体外实验证实 TLR4 在 SiO₂ 诱导的巨噬细胞炎症反应中起关键作用, 而抑制 TLR4 表达减弱了炎症反应及巨噬细胞向 M1 促炎表型转化。但由于矽肺发生机制复杂, TLR4 具体激活矽肺发生的信号通路以及其对细胞因子网络的调控机制值得进一步地深入探索。

参考文献

- [1] FAZEN LE, LINDE B, REDLICH CA. Occupational lung diseases in the 21st century: the changing landscape and future challenges[J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2020, 26(2): 142-148.
- [2] PARKER DL, CARL WR, FRENCH LR, et al. Characteristics of adolescent work injuries reported to the Minnesota Department of Labor and Industry[J]. *Am J Public Health*, 1994, 84(4): 606-611.
- [3] WU N, XUE C, YU S, et al. Artificial stone-associated silicosis in China: a prospective comparison with natural stone-associated silicosis[J]. *Respirology*, 2020, 25(5): 518-524.
- [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] HOY RF, CHAMBERS DC. Silica-related diseases in the modern world[J]. *Allergy*, 2020, 75(11): 2805-2817.
- [6] FUJIMURA N. Pathology and pathophysiology of pneumoconiosis[J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2000, 6(2): 140-144.
- [7] CHAN JY W, TSUI JC C, LAW PT W, et al. Regulation of TLR4 in silica-induced inflammation: an underlying mechanism of silicosis[J]. *Int J Med Sci*, 2018, 15(10): 986-991.
- [8] RIMAL B, GREENBERG AK, ROM WN. Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding[J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2005, 11(2): 169-173.
- [9] MA J, CAI Q, YANG D, et al. A positive feed forward loop between wnt/ β -catenin and NOX4 promotes silicon dioxide-induced epithelial-mesenchymal transition of lung epithelial cells[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 3404168.
- [10] WANG M, LI J, DONG S, et al. Silica nanoparticles induce lung inflamm-

- ation in mice via ROS/PARP/TRPM2 signaling-mediated lysosome impairment and autophagy dysfunction[J]. *Part Fibre Toxicol*, 2020, 17(1): 23.
- [11] LO RE S, YAKOUB Y, DEVOSSE R, et al. Uncoupling between inflammatory and fibrotic responses to silica: evidence from MyD88 knockout mice[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e99383.
- [12] DI GIUSEPPE M, GAMBELLI F, HOYLE GW, et al. Systemic inhibition of NF- κ B activation protects from silicosis[J]. *PLoS One*, 2009, 4(5): e5689.
- [13] SUN X, YI Y, YAN Z, et al. In utero and postnatal VX-770 administration rescues multiorgan disease in a ferret model of cystic fibrosis[J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11(485): eaau7531.
- [14] KUZMICH NN, SIVAK KV, CHUBAREV VN, et al. TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis[J]. *Vaccines (Basel)*, 2017, 5(4): 34.
- [15] ROMERIO A, PERI F. Increasing the chemical variety of small-molecule-based TLR4 modulators: an overview[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1210.
- [16] HUSSAIN S, JOHNSON CG, SCIURBA J, et al. TLR5 participates in the TLR4 receptor complex and promotes MyD88-dependent signaling in environmental lung injury[J]. *Elife*, 2020, 9: e50458.
- [17] RAYEES S, JOSHI JC, TAUSEEF M, et al. PAR2-mediated cAMP generation suppresses TRPV4-dependent Ca^{2+} signaling in alveolar macrophages to resolve TLR4-induced inflammation[J]. *Cell Rep*, 2019, 27(3): 793-805.E4.
- [18] KAWASAKI T, KAWAI T. Toll-like receptor signaling pathways[J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 461.
- [19] JU M, LIU B, HE H, et al. MicroRNA-27 a alleviates LPS-induced acute lung injury in mice via inhibiting inflammation and apoptosis through modulating TLR4/MyD88/NF- κ B pathway[J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(16): 2001-2018.
- [20] XU GR, ZHANG C, YANG HX, et al. Modified citrus pectin ameliorates myocardial fibrosis and inflammation via suppressing galectin-3 and TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 126: 110071.
- [21] CAO C, YIN C, SHOU S, et al. Ulinastatin protects against LPS-induced acute lung injury by attenuating TLR4/NF- κ B pathway activation and reducing inflammatory mediators[J]. *Shock*, 2018, 50(5): 595-605.
- [22] PŁÓCIENNIKOWSKA A, HROMADA-JUDYCKA A, BORZĘCKA K, et al. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(3): 557-581.
- [23] SAQIB U, SARKAR S, SUK K, et al. Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(25): 17937-17950.
- [24] ORECCHIONI M, GHOSHEH Y, PRAMOD AB, et al. Macrophage polarization: different gene signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively activated macrophages[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1084.
- [25] YUAN A, HSIAO YJ, CHEN HY, et al. Opposite effects of M1 and M2 macrophage subtypes on lung cancer progression[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14273.
- [26] YAO X, LIU S, DING W, et al. TLR4 signal ablation attenuated neurological deficits by regulating microglial M1/M2 phenotype after traumatic brain injury in mice[J]. *J Neuroimmunol*, 2017, 310: 38-45.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 陈姣)