

二氧化硅对 MLE-12 细胞脂质沉积及 PI3K/AKT/mTOR 通路的影响

郝小惠^{a,b}, 邵京^a, 吴慧^a, 靳宜璇^a, 郭灵丽^{a,b}, 刘和亮^{a,b}, 杨方^{a,b}

华北理工大学 a. 公共卫生学院 b. 河北省器官纤维化重点实验室, 河北 唐山 063210



DOI 10.11836/JEOM21388

摘要:

[背景] 脂质代谢失衡与多种疾病的发生发展密切相关, 磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶点 (PI3K/AKT/mTOR) 信号通路是脂质代谢的重要调控通路, 矽肺与脂质代谢异常是否有关尚待探索。

[目的] 观察二氧化硅 (SiO₂) 染毒后, 肺泡 II 型上皮细胞 MLE-12 细胞内脂质沉积情况, 胆固醇及 PI3K、AKT、mTOR 磷酸化蛋白表达的变化, 探讨 SiO₂ 是否通过该通路调控脂质变化。

[方法] (1) 采用 50 mg·L⁻¹ SiO₂ 混悬液染毒 MLE-12 细胞, 分为对照组和 12、24、48 h SiO₂ 染毒组。(2) 根据 PI3K 抑制剂 LY294002 对细胞增殖影响的实验结果, 选择 5 μmol·L⁻¹ 进行后续实验。将细胞分为对照、50 mg·L⁻¹ SiO₂、50 mg·L⁻¹ SiO₂+5 μmol·L⁻¹ LY294002、5 μmol·L⁻¹ LY294002 四组, 均染毒细胞 48 h。采用酶法试剂盒检测各组细胞内总胆固醇、游离胆固醇、胆固醇酯 (总胆固醇与游离胆固醇的差值)、甘油三酯含量, 采用油红“O”染色法观察细胞内脂质沉积状况, 采用 Western blotting 检测 PI3K、AKT、mTOR 磷酸化蛋白的表达水平。

[结果] (1) 50 mg·L⁻¹ 的 SiO₂ 染毒后, 与对照组相比, 随着染毒时间的延长: 细胞内总胆固醇、游离胆固醇和胆固醇酯的含量呈现增加的趋势, 24、48 h 组均明显升高, 在 48 h 组, 总胆固醇由对照组的 (2.242±0.181) mg·g⁻¹ 升高到 (5.148±0.544) mg·g⁻¹, 游离胆固醇由 (1.923±0.158) mg·g⁻¹ 升高至 (4.168±0.433) mg·g⁻¹, 胆固醇酯也从 (0.318±0.067) mg·g⁻¹ 升至 (0.978±0.134) mg·g⁻¹ (均 $P<0.01$); 与对照组相比, 甘油三酯含量无明显变化 ($P>0.05$); 细胞中的橙红色染色颗粒沉积增加, 48 h 橙红色颗粒细胞内沉积增加最明显 ($P<0.01$); p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 蛋白表达呈现增高的趋势, 在染毒 48 h 时达到高峰 (均 $P<0.01$)。 (2) 与 SiO₂ 染毒组相比, SiO₂+LY294002 组细胞内总胆固醇、游离胆固醇和胆固醇酯均降低 (均 $P<0.01$), 细胞内橙红色脂质染色颗粒沉积减少, 细胞 p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 蛋白表达降低 (均 $P<0.01$)。

[结论] SiO₂ 可能通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路诱导 MLE-12 细胞内胆固醇成分增加, 促进细胞内脂质沉积。

关键词: 二氧化硅; 胆固醇; 矽肺; 磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶点信号通路; MLE-12 细胞

Effects of silicon dioxide exposure on lipid deposition and PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in MLE-12 cells HAO Xiaohui^{a,b}, SHAO Jing^a, WU Hui^a, JIN Yixuan^a, GUO Lingli^{a,b}, LIU Heliang^{a,b}, YANG Fang^{a,b} (1.a. School of Public Health b. Hebei Key Laboratory of Organ Fibrosis, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063210, China)

Abstract:

[Background] Lipid metabolism imbalance is tightly linked to the development and progression of multiple diseases. The phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin (PI3K/AKT/mTOR) signaling pathway is important for the regulation of lipid metabolism. However, whether silicosis is associated with lipid metabolic abnormalities has yet to be explored.

[Objective] To observe the changes of lipid deposition, cholesterol, and phosphorylated proteins of PI3K/AKT/mTOR pathway in silicon dioxide (SiO₂)-induced MLE-12 cells and to explore potential mechanism of lipid composition regulated through the pathway.

[Methods] (1) MLE-12 cells were stimulated with 50 mg·L⁻¹ SiO₂ suspension, and divided into four groups: a control group and three SiO₂ groups (12, 24, and 48 h of stimulation). (2) Cell

基金项目

河北省自然科学基金项目 (H2018209332)

作者简介

郝小惠 (1971—), 女, 博士生, 教授;
E-mail: haoxiaohui2005@163.com

通信作者

杨方, E-mail: fangyang1955@163.com

伦理审批 不需要

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-08-21

录用日期 2022-02-17

文章编号 2095-9982(2022)05-0506-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

引用

郝小惠, 邵京, 吴慧, 等. 二氧化硅对 MLE-12 细胞脂质沉积及 PI3K/AKT/mTOR 通路的影响 [J]. 环境与职业医学, 2022, 39(5): 506-511.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21388

Funding

This study was funded.

Correspondence to

YANG Fang, E-mail: fangyang1955@163.com

Ethics approval Not required

Competing interests None declared

Received 2021-08-21

Accepted 2022-02-17

To cite

HAO Xiaohui, SHAO Jing, WU Hui, et al. Effects of silicon dioxide exposure on lipid deposition and PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in MLE-12 cells [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(5): 506-511.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21388

proliferation was detected to determine an optimal dose of LY294002, an inhibitor of PI3K protein. LY294002 at $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ was used for further study, in which MLE-12 cells cultured for 48 h were divided into four groups: a control group; a $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SiO_2 suspension stimulation group; a $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SiO_2 suspension and $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LY294002 treatment group; a $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LY294002 treatment group. Total cholesterol (TC), free cholesterol (FC), cholesterol ester (CE; total cholesterol minus free cholesterol), and triglycerides (TG) were measured with enzyme assay kits. Lipid deposition was observed using Oil Red O staining. The expressions of p-PI3K, p-AKT, and p-mTOR proteins were detected by Western blotting.

[Results] (1) The contents of TC, FC, and CE in the $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SiO_2 -induced MLE-12 cells were increased compared to those of the control group in a time-dependent manner by trend analysis, and the increment at 24 and 48 h were significant. By 48 h, the contents of cholesterol indicators were all elevated: TC from $(2.242\pm0.181) \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ to $(5.148\pm0.544) \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, FC from $(1.923\pm0.158) \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ to $(4.168\pm0.433) \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, and CE from $(0.318\pm0.067) \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ to $(0.978\pm0.134) \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, compared with the control group ($P<0.01$). The changes of TG were not significant ($P>0.05$). The SiO_2 suspension induced orange-red particle deposition in the MLE-12 cells, especially at 48 h ($P<0.01$). The protein expression levels of p-PI3K, p-AKT, and p-mTOR in SiO_2 -stimulated MLE-12 cells were higher than those of the control groups with the prolongation of stimulation time, which peaked at 48 h ($P<0.01$). (2) The contents of TC, FC, and CE in MLE-12 cells of the SiO_2 + LY294002 group were decreased, comparing to those of the SiO_2 stimulation only group ($P<0.01$), companied with less orange-red lipid deposition, and suppressed protein expression levels of p-PI3K, p-AKT, and p-mTOR ($P<0.01$).

[Conclusion] SiO_2 could induce increases of cholesterol and lipid deposition through activation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in MLE-12 cells.

Keywords: silicon dioxide; cholesterol; silicosis; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathway; MLE-12 cells

2020 年我国职业病年报数据显示,职业性尘肺病目前仍占据我国职业病新发病例的首位^[1],矽肺是主要的尘肺性疾病,而二氧化硅(silicon dioxide, SiO_2)是关键致病因素。因为没有确切有效的治疗手段,人们仍在探索矽肺发病机制及治疗方法。脂质是人体必需的重要营养物质之一,除供给机体能量外,也是构成机体组织、细胞的重要成分,脂质代谢失衡与多种疾病的发生发展密切相关^[2-4]。脂质代谢异常与肺纤维化疾病的关系研究,也成为近年研究的热点之一^[5-7]。本课题组前期研究发现,矽肺患者肺泡巨噬细胞脂质代谢失衡,细胞内脂滴沉积增多,胆固醇、氧化型低密度脂蛋白水平增高,巨噬细胞泡沫化,这些现象均与矽肺的发生发展密切相关^[8-9]。肺泡 II 型上皮细胞是 SiO_2 作用的效应细胞之一,也是肺内脂质代谢最活跃的细胞^[10],其细胞表面活性物质主要由磷脂和胆固醇组成,是维持肺泡正常功能的重要保障,胆固醇是表面活性物质中重要的中性脂肪并维持在稳定状态^[11]。肺部疾病发生时,肺泡 II 型上皮细胞内脂质成分发生变化,脂质稳态遭到破坏从而影响细胞功能^[12]。

细胞脂质稳态受多种信号通路的调节,磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶点(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase mammalian/target of rapamycin, PI3K/AKT/mTOR)信号通路在细胞周期、增殖、生长和脂质合成方面发挥重要作用^[13]。研究表明 PI3K/AKT/mTOR 信号通路通过调节脂肪合成相关因子固醇调节元件结合蛋白-1(sterol

regulatory element binding protein-1, SREBP-1)及其相关生脂酶的表达来调节脂质代谢^[14]。对于矽肺疾病中脂质代谢异常目前知之甚少。作为脂质代谢活跃的肺泡 II 型上皮细胞,其胆固醇等组分在 SiO_2 作用下是否存在失衡,PI3K/AKT/mTOR 信号通路是否参与其中仍不明确。MLE-12 细胞作为小鼠肺泡 II 型上皮细胞株,常用于矽肺发病机制体外研究。本研究利用体外 SiO_2 染毒 MLE-12 细胞,观察细胞内是否存在胆固醇稳态失衡,同时采用 PI3K 的特异性抑制剂 LY294002 干预观察 PI3K/AKT/mTOR 通路表达变化,探索 SiO_2 对肺泡上皮细胞胆固醇等脂质成分稳态的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂和主要仪器

MLE-12 细胞(中国上海康朗); SiO_2 (粒径 $1\sim5 \mu\text{m}$, 纯度 99%, 美国 Sigma-Aldrich), 充分研磨 4 h 后 120°C 下高压灭菌 20 min, 60°C 烘干备用; LY294002(以二甲基亚砷溶解制备浓度为 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储存液, 美国 Selleck); F12/杜尔贝科改良伊格培养基(DMEM)(1:1)培养基(美国 Gibco); 胎牛血清(FBS, 美国 SERANA); 组织细胞总胆固醇(total cholesterol, TC)、游离胆固醇(free cholesterol, FC)、甘油三酯(triglyceride, TG)酶法检测试剂盒(中国北京普利莱); 二辛宁可酸(BCA)法蛋白定量试剂盒(美国 Thermofisher); 鼠抗 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体, 兔抗 p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、p-mTOR、mTOR 多克隆抗体(美国 Affinity);

辣根过氧化物酶标记羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG) 二抗、辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG 二抗(中国成都正能); 超敏增强化学发光(ECL) 检测试剂盒(美国 Affinity); 油红“O”染料(美国 Sigma); 化学发光成像系统(XRS+, 美国 Bio-Rad); 酶标仪(iMARK, 美国 Bio-Rad); 显微镜成像系统(bx53, 日本 Olympus)。

1.2 细胞培养及分组

1.2.1 SiO₂ 染毒分组 将 MLE-12 细胞置于 10%的 FBS-F12/DMEM 培养基中, 在 37 °C、5%二氧化碳的细胞培养箱中培养。配制 50 mg·L⁻¹ 的 SiO₂ 溶解于 10%FBS 的 F12/DMEM 培养基中制成混悬液。细胞培养贴壁后, 分为对照组(正常培养的细胞), 50 mg·L⁻¹ SiO₂ 染毒 12、24、48 h 组。

1.2.2 LY294002 剂量选择及干预分组 取对数生长期 MLE-12 细胞, 以 5×10³ 个·孔⁻¹ 接种于 96 孔板。待细胞贴壁后, 换用无血清 F12/DMEM 培养基饥饿同步化处理 24 h。将细胞随机分为 4 组(每组设 4 个复孔), 将不同浓度 LY294002 试剂(0、5、10、15 μmol·L⁻¹) 加入细胞中培养 48 h 后, 每孔加入 MTS 试剂 10 μL, 继续置于细胞培养箱孵育 4 h, 以酶标仪在 490 nm 波长处测定细胞光密度(D) 值。另设 2 个不含细胞仅含 F12/DMEM 培养基孔用作空白组。采用公式“细胞增殖率=[(D_{实验组} - D_{空白组})/(D_{对照组} - D_{空白组})]×100%”计算细胞增殖率。与对照组相比, LY294002 使细胞存活率降低($F=157.79, P<0.01$), 依次为 0.68±0.08、0.45±0.07、0.23±0.35(均 $P<0.01$), 选择 5 μmol·L⁻¹ 的 LY294002 用于后续的实验研究。将细胞分为四组: 对照组(MLE-12 细胞在 10% FBS-F12/DMEM 条件下培养 48 h)、SiO₂ 组(50 mg·L⁻¹ SiO₂ 混悬液培养 48 h)、LY294002 实验组(5 μmol·L⁻¹ LY294002+50 mg·L⁻¹ SiO₂ 混悬液培养 48 h)、抑制剂对照组(5 μmol·L⁻¹ LY294002 培养 48 h)。

1.3 酶法检测细胞内 TC、FC、胆固醇酯(cholesteryl-ester, CE) 和 TG 含量

在 6 孔板中接种 5×10⁵ 个·孔⁻¹ 细胞, 待细胞贴壁后染毒至每组设定时间点, 去除培养基, 用磷酸盐缓冲液清洗细胞 2 次, 按照试剂盒说明书, 用试剂 A 液 0.2 mL 裂解细胞 20 min, 将 0.1 mL 上清液转移至 1.5 mL 的离心管中, 室温 2 000×g 离心 5 min。取 190 μL 的 B 工作液加入 96 孔板中, 分别取离心后上清 10 μL 加入其中孵育 30 min, 同时配制标准曲线, 560 nm 波长处检测各样本的 D 值, 利用标准曲线计算每个样本的 TC、FC 和 TG 含量, CE 即 TC 与 FC 的差值。用 BCA 法检测每个样本的蛋白浓度, 用蛋白含量校正细胞内各检测指标含量, 每个样本每组设 3 孔平行。

1.4 细胞油红“O”染色检测细胞内脂质

将圆形玻璃片提前进行无菌处理并放置于 24 孔培养板中, 将细胞按 5×10⁴ 接种于培养板中制作细胞爬片。按照实验分组对细胞施加不同的处理因素后, 4%的多聚甲醛固定后, 用 0.5%的异丙醇油红“O”染液在室温下染色细胞 30 min, 之后苏木素复染细胞核, 光学显微镜下进行图像采集, Image J 6.0 软件进行图像分析, 用细胞内红染颗粒总灰度密度积分/对照组总灰度密度积分平均值做相对定量。细胞内的脂肪和类脂等大部分脂质成分均可被油红“O”染色而着色。

1.5 Western blotting 法检测细胞 p-PI3K、p-AKT 和 p-mTOR 蛋白表达水平

将细胞接种于 6 孔板, 待细胞贴壁后, 加入不同的染毒并收集细胞, 用适量放射免疫沉淀法(RIPA) 裂解液裂解细胞, 牛血清白蛋白法检测蛋白浓度。将 15 μg 总蛋白加入 4×上样缓冲液后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 凝胶电泳分离蛋白质后, 用湿式电转印系统(200 mA, 60 min) 将蛋白转印在硝酸纤维素膜上, 并在膜上加入相应的一抗(1:1 000 稀释) 在 4 °C 环境中杂交过夜, 洗膜后加入与一抗对应的标记有辣根过氧化物的二抗(1:5 000 稀释) 常温孵育 2 h 后加入 ECL, 应用凝胶成像系统的化学发光法显色, Image J 6.0 软件进行条带的半定量分析, 以各组对应的非磷酸化的总蛋白作为内参, 对磷酸化蛋白表达量进行比较。

1.6 统计学分析

各组数据用 SPSS 24.0 进行统计学分析。计数资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Dunnett *t* 法分析 SiO₂ 染毒对细胞影响, 采用双因素方差分析分析 LY294002 对 SiO₂ 染毒后细胞变化的影响。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 SiO₂ 染毒后细胞变化

2.1.1 TC、FC、CE 及 TG 含量 如表 1 所示, 50 mg·L⁻¹ 的 SiO₂ 分别染毒 MLE-12 细胞 12、24、48 h 后, 与对照组相比, 随着染毒时间的延长, 细胞内 TC、FC 和 CE 的含量呈现增加的趋势, 24、48 h 组均明显升高(均 $P<0.01$); 但细胞内 TG 的含量没有明显变化($P>0.05$)。

2.1.2 油红“O”染色结果 如图 1 所示, 油红“O”染色后细胞质中可见被染成橙红色的颗粒状或油滴状物质分布, 大小不一形态各异。随着 SiO₂ 染毒时间延长, 细胞中的橙红色染色颗粒沉积增加, 染毒 48 h 时细胞内橙红色颗粒沉积增加最明显($P<0.01$)。

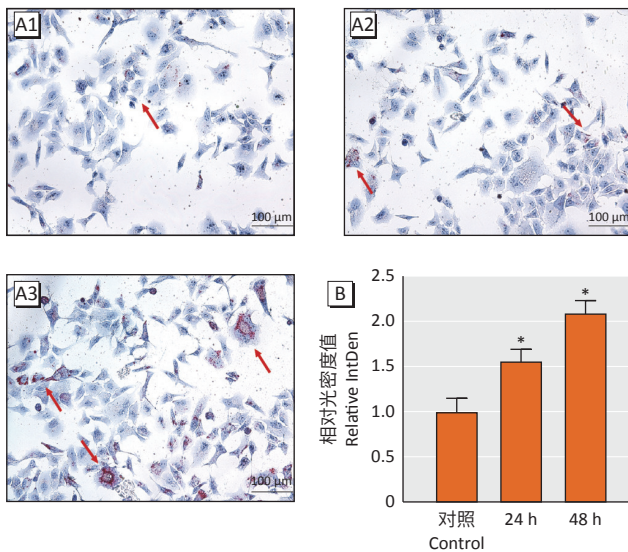
表 1 SiO₂ 染毒后细胞内 TC、FC、CE 及 TG 含量
($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 The intracellular contents of TC, FC, CE, and TG in SiO₂-stimulated cells ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

单位 (Unit):mg·g ⁻¹				
分组(Group)	TC	FC	CE	TG
对照(Control)	2.242±0.181	1.923±0.158	0.318±0.067	1.424±0.277
12 h	2.880±0.395	2.419±0.296	0.460±0.123	1.772±0.586
24 h	4.279±0.490*	3.456±0.362*	0.830±0.153*	1.424±0.269
48 h	5.148±0.544*	4.168±0.433*	0.978±0.134*	1.187±0.073
F	28.75	28.48	18.59	1.39
P	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05

[注]*: 与对照组相比, $P<0.01$ 。

[Note]*: Compared with the control group, $P<0.01$.



[注] A: 染色结果; 1: 对照组; 2: 24 h; 3: 48 h。箭头所示细胞内橙红色颗粒为油红“O”着色。B: 数值变化。*: 与对照组相比, $P<0.01$ 。

[Note] A: Staining results; 1: Control group; 2: 24 h; 3: 48 h. The arrow shows the intracellular orange-red particles stained by Oil Red O stains. B: Change. *: Compared with the control group, $P<0.01$.

图 1 SiO₂ 染毒后细胞内油红“O”染色结果

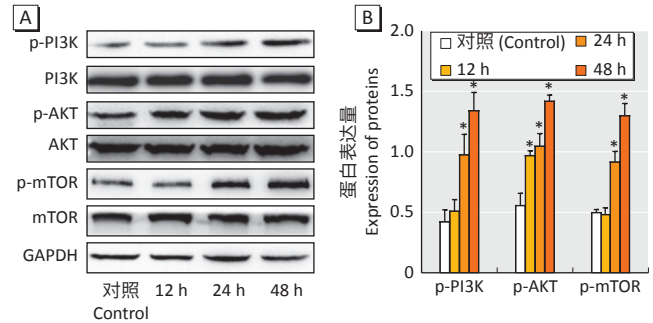
Figure 1 Oil Red O staining results of SiO₂-stimulated cells

2.1.3 磷酸化 PI3K、AKT、mTOR 蛋白含量 SiO₂ 染毒 MLE-12 细胞后 PI3K、AKT、mTOR 蛋白含量无增加(数据未展示),但相关蛋白发生磷酸化。随着染毒时间的增加,与对照组相比,p-PI3K 和 p-mTOR 蛋白表达在染毒 24 h 组表达即明显增高(均 $P<0.01$),p-AKT 蛋白在 12 h 组即明显增高($P<0.01$),三种磷酸化蛋白均在 48 h 表达最高(均 $P<0.01$)。见图 2。

2.2 LY294002 对 SiO₂ 染毒后细胞变化的影响

2.2.1 TC、FC、CE 及 TG 含量 染毒 48 h 后,与对照组相比,SiO₂ 对 MLE-12 细胞的染毒可使细胞内 TC、FC、CE 增高($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。当 SiO₂ 染毒的同时加入 PI3K 抑制剂 LY294002 共同作用于细胞时,可见 TC、FC、CE 的含量明显低于 SiO₂ 染毒组(均 $P<0.01$)。与

对照组相比,LY294002 作用于 MLE-12 细胞后,也可降低细胞内 TC、FC 的含量(均 $P<0.05$)。LY294002 对各组细胞 TG 的含量无影响($P>0.05$)。见表 2。



[注] A: 电泳图。B: 蛋白表达量。*: 与对照组相比, $P<0.01$ 。

[Note] A: Electrophoretic image. B: Protein expression levels. *: Compared with the control group, $P<0.01$.

图 2 SiO₂ 染毒后细胞内 p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 蛋白表达
Figure 2 The expressions of p-PI3K, p-AKT, and p-mTOR in SiO₂-stimulated cells

表 2 LY294002 对 SiO₂ 染毒后细胞内 TC、FC、CE 及 TG 含量的影响($n=3$)

Table 2 Effects of LY294002 on the intracellular contents of TC, FC, CE, and TG in SiO₂-stimulated cells ($n=3$)

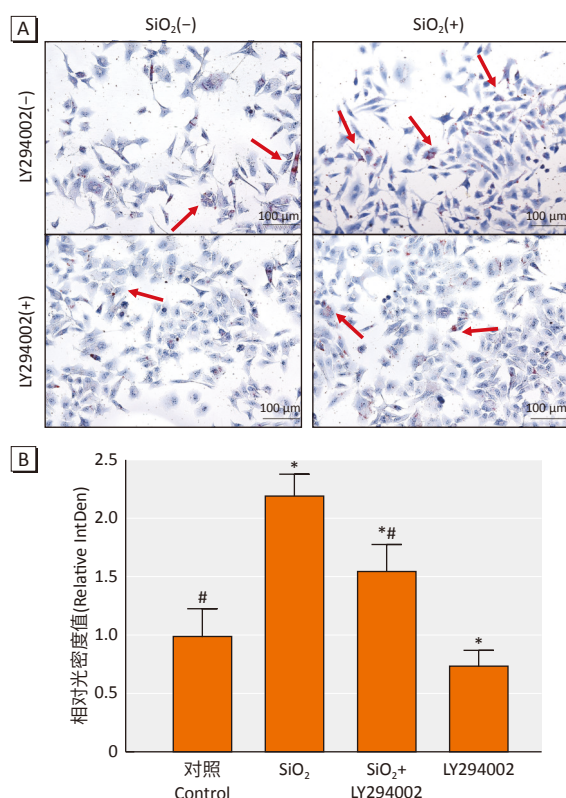
单位 (Unit):mg·g ⁻¹				
分组(Group)	TC	FC	CE	TG
对照(Control)	2.867±0.292	2.217±0.189	0.651±0.171	1.244±0.042
SiO ₂	5.464±0.421**	4.263±0.298**	1.201±0.269*	1.396±0.115
SiO ₂ +LY294002	3.715±0.306**	3.405±0.365**	0.309±0.294#	1.359±0.237
LY294002	2.201±0.227**	1.642±0.163**	0.559±0.077#	1.213±0.121
F	58.62	58.39	8.77	1.09
P	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05

[注] 与对照组相比, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ 。#: 与 SiO₂ 组相比, $P<0.01$ 。

[Note] Compared with the control group, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$. #: Compared with the SiO₂ stimulation group, $P<0.01$.

2.2.2 油红“O”染色结果 图 3 所示, 50 mg·L⁻¹ SiO₂ 染毒 MLE-12 细胞 48 h 后,细胞内油红“O”染色的橙红色颗粒明显增多($P<0.01$),当 SiO₂ 染毒的同时加入 LY294002 的处理时,细胞质中油红“O”着色的橙红色颗粒少于 SiO₂ 染毒组($P<0.01$)。同时,LY294002 处理的细胞内橙红色颗粒物的含量与对照组比较未见明显差异($P>0.05$)。

2.2.3 磷酸化 PI3K、AKT、mTOR 蛋白含量 染毒 48 h 后,与对照组相比,SiO₂ 染毒使 MLE-12 细胞的 p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 蛋白表达增高($P<0.01$),而 SiO₂ 染毒同时加入 LY294002 共同作用后,上述表达增高的蛋白受到抑制,与 SiO₂ 染毒组相比差异有统计学意义(均 $P<0.01$)。与对照组相比,LY294002 对细胞的 p-PI3K 蛋白表达有一定的抑制作用,对 p-AKT、p-mTOR 蛋白表达量未见影响(均 $P>0.05$)。见图 4。

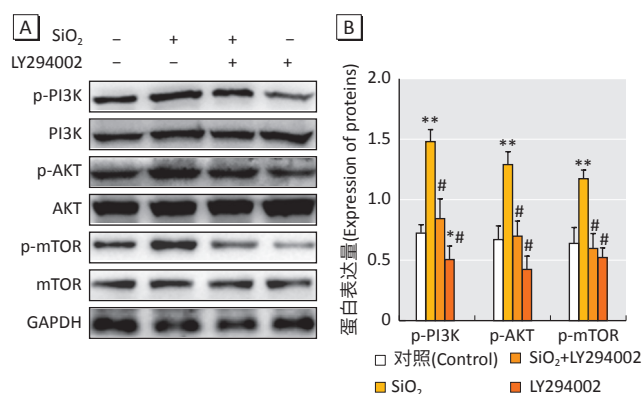


[注] A: 染色结果。箭头所示细胞内橙红色颗粒为油红“O”着色。B: 数值变化。*: 与对照组相比, $P < 0.01$; #: 与 SiO_2 组相比, $P < 0.01$ 。

[Note] A: Staining results. The arrow shows the intracellular orange-red particles stained by Oil Red O stains. B: Change. *: Compared with the control group, $P < 0.01$; #: Compared with the SiO_2 stimulation group, $P < 0.01$.

图3 LY294002对 SiO_2 染毒后细胞内油红“O”染色结果的影响

Figure 3 Effects of LY294002 on Oil Red O staining results of SiO_2 -stimulated cells



[注] A: 电泳图。B: 蛋白表达量。与对照组相比, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$; #: 与 SiO_2 组相比, $P < 0.01$ 。

[Note] A: Electrophoretic image. B: Protein expression levels. Compared with the control group, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$. #: Compared with the SiO_2 stimulation group, $P < 0.01$.

图4 LY294002对 SiO_2 染毒后细胞内p-PI3K、p-AKT、p-mTOR蛋白表达的影响

Figure 4 Effects of LY294002 on the expressions of p-PI3K, p-AKT, and p-mTOR in SiO_2 -stimulated cells

3 讨论

本研究结果显示,体外 SiO_2 染毒可增加小鼠肺上皮细胞内脂质成分沉积,TC、FC和CE增多,磷酸化激活的PI3K/AKT/mTOR通路可促进上述变化导致胞内脂质平衡改变。

MLE-12细胞是小鼠肺泡II型上皮细胞株,肺泡II型上皮细胞含有丰富的脂质成分,对调节肺泡表面活性物质代谢,维持肺泡内环境稳态有重要作用^[15]。胆固醇虽然占肺泡上皮细胞内脂质成分含量的20%左右,但却有着重要的生理功能。近年的研究认为,肺部疾病发生时,表面活性剂混合物中胆固醇水平升高是诱导肺损伤的机制之一^[16]。肺泡上皮细胞内增加的胆固醇主要有两种来源:外界转运入细胞和II型上皮细胞自身合成^[17]。体外培养细胞所用的血清来源于血液,其中含有多肽、脂肪、胆固醇、碳水化合物等多种成分,有成为体外培养细胞脂质转运及合成的原料基础,因此肺泡上皮细胞中增加的胆固醇有可能来源于细胞自身合成的增加或外界转运入细胞的增多。PI3K/AKT/mTOR信号通路是脂质代谢的重要调控通路之一^[11],本研究中 SiO_2 的染毒激活了该通路,表现为各成分蛋白的磷酸化活性形式表达增高。实验中应用PI3K的特异性抑制剂LY294002后,该通路活性受抑制,即磷酸化形式蛋白表达降低,从而使 SiO_2 染毒后细胞内增加的脂质成分和脂质沉积也被抑制,表明该通路的激活参与了细胞内脂质成分变化的调控。本研究只是初步观察了体外 SiO_2 刺激对肺泡上皮细胞胆固醇含量的影响,但未涉及胆固醇合成、转运的具体机制。尽管如此,也为今后研究脂质稳态与矽肺纤维化的关系提供了有益的线索。

随着代谢组学、转录组学、蛋白组学及生物信息学的发展,脂质代谢与疾病发生发展之间的关联被人们不断发现,脂质稳态失衡及多种脂质代谢产物与肺纤维化进展的关系研究成为近年热点。Reyfman等^[18]基于单细胞测序技术发现特发性肺纤维化患者的肺泡巨噬细胞、成纤维细胞、肺泡II型上皮细胞基因差异表达,显著变化的前500个基因均包含有脂质代谢途径,包括甾醇/类固醇生物合成过程、胆固醇代谢过程和脂质代谢过程;在患者肺组织转录组测序数据也显示胆固醇稳态相关基因的变化,某些代谢产物有促进细胞分泌胶原等细胞外基质的作用^[6-7]。矽肺纤维化疾病脂质代谢稳态失衡与疾病发生发展的关系研究甚少,有很广泛的探索空间。本研究观察到 SiO_2 染毒后,TG未见明显变化。含量丰富的磷脂成分是否有

变化,是今后需要探索的方面;另外,基于体外培养细胞的实验研究结论应该谨慎看待,需要在其他细胞株、动物模型等进一步研究探讨。

综上,本研究提示体外 SiO₂ 染毒可能通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路诱导 MLE-12 细胞内胆固醇成分增加,促进细胞内脂质沉积。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 2020年我国卫生健康事业发展统计公报[EB/OL]. [2021-08-01]. http://www.gov.cn/guoqing/2021-07/22/content_5626526.htm.
National Health Commission of the People's Republic of China. Statistical bulletin of China's health development in 2020. [2021-08-01]. http://www.gov.cn/guoqing/2021-07/22/content_5626526.htm.
- [2] FESSLER MB. A new frontier in immunometabolism. Cholesterol in lung health and disease[J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2017, 14(5): S399-S405.
- [3] YAO X, GORDON E M, FIGUEROA D M, et al. Emerging roles of apolipoprotein E and apolipoprotein A-I in the pathogenesis and treatment of lung disease[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 55(2): 159-169.
- [4] GOWDY K M, FESSLER M B. Emerging roles for cholesterol and lipoproteins in lung disease[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2013, 26(4): 430-437.
- [5] SURYADEVARA V, RAMCHANDRAN R, KAMP D W, et al. Lipid mediators regulate pulmonary fibrosis: potential mechanisms and signaling pathways[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4257.
- [6] LV T, JIANG K, WANG J, et al. Single-cell RNA sequencing profiling of the effects of aging on alveolar stem cells[J]. *Sci China Life Sci*, 2019, 62(8): 1028-1037.
- [7] SIVAKUMAR P, THOMPSON J R, AMMAR R, et al. RNA sequencing of transplant-stage idiopathic pulmonary fibrosis lung reveals unique pathway regulation[J]. *ERJ Open Res*, 2019, 5(3): 00117-2019.
- [8] 张秀峰, 朱丽, 刘舒鹏, 等. 矽肺患者肺泡巨噬细胞中胆固醇及ox-LDL水平分析[J]. *环境与职业医学*, 2016, 33(12): 1157-1161.
- ZHANG X F, ZHU L, LIU S P, et al. Analysis of cholesterol and ox-LDL levels in alveolar macrophages from patients with silicosis[J]. *J Environ Occup Med*, 2016, 33(12): 1157-1161.
- [9] HOU X, SUMMER R, CHEN Z, et al. Lipid uptake by alveolar macrophages drives fibrotic responses to silica dust[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 399.
- [10] FESSLER MB, SUMMER RS. Surfactant lipids at the host-environment interface. Metabolic sensors, suppressors, and effectors of inflammatory lung disease[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 54(5): 624-635.
- [11] SEHLMAYER K, RUWISCH J, ROLDAN N, et al. Alveolar dynamics and beyond-the importance of surfactant protein C and cholesterol in lung homeostasis and fibrosis[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 386.
- [12] ROQUE W, ROMERO F. Cellular metabolomics of pulmonary fibrosis, from amino acids to lipids[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2021, 320(5): C689-C695.
- [13] CHEN J, CHEN J, HUANG J, et al. HIF-2 α upregulation mediated by hypoxia promotes NAFLD-HCC progression by activating lipid synthesis via the PI3K-AKT-mTOR pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(23): 10839-10860.
- [14] ZHAO J, ZHANG X, GAO T, et al. SIK2 enhances synthesis of fatty acid and cholesterol in ovarian cancer cells and tumor growth through PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(1): 25.
- [15] PENE F, CLAESSENS Y E, MULLER O, et al. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and mTOR/P70 S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma[J]. *Oncogene*, 2002, 21(43): 6587-6597.
- [16] VOCKEROTH D, GUNASEKARA L, AMREIN M, et al. Role of cholesterol in the biophysical dysfunction of surfactant in ventilator-induced lung injury[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 298(1): L117-L125.
- [17] AGUDELO C W, SAMAHA G, GARCIA-ARCOS I. Alveolar lipids in pulmonary disease. A review[J]. *Lipids Health Dis*, 2020, 19(1): 122.
- [18] REYFMAN P A, WALTER J M, JOSHI N, et al. Single-cell transcriptomic analysis of human lung provides insights into the pathobiology of pulmonary fibrosis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 199(12): 1517-1536.
- (英文编辑: 汪源; 责任编辑: 王晓宇)
- (上接第 505 页)
- [19] ZHAO T X, WANG J K, SHEN L J, et al. Increased m⁶A RNA modification is related to the inhibition of the Nrf2-mediated antioxidant response in di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced prepubertal testicular injury[J]. *Environ Pollut*, 2020, 259: 113911.
- [20] ARUMUGAM T, GHAZI T, CHUTURGOON A A. Fumonisin B₁ alters global m⁶A RNA methylation and epigenetically regulates Keap1-Nrf2 signaling in human hepatoma (HepG2) cells[J]. *Arch Toxicol*, 2021, 95(4): 1367-1378.
- [21] WANG J, ISHFAQ M, XU L, et al. METTL3/m⁶A/miRNA-873-5 p attenuated oxidative stress and apoptosis in colistin-induced kidney injury by modulating Keap1/Nrf2 pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 517.
- [22] ŞENER G, PASKALOĞLU K, TOKLU H, et al. Melatonin ameliorates chronic renal failure-induced oxidative organ damage in rats[J]. *J Pineal Res*, 2004, 36(4): 232-241.
- [23] JIA Y, LI J, LIU P, et al. Based on activation of p62-Keap1-Nrf2 pathway, hesperidin protects arsenic-trioxide-induced cardiotoxicity in mice[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 758670.
- [24] LIU M, ZHENG B, LIU P, et al. Exploration of the hepatoprotective effect and mechanism of magnesium isoglycyrrhizinate in mice with arsenic trioxide-induced acute liver injury[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(6): 438.
- [25] YUAN Q, ZHU H, LIU H, et al. METTL3 regulates PM_{2.5}-induced cell injury by targeting OSGIN1 in human airway epithelial cells[J]. *J Hazard Mater*, 2021, 415: 125573.
- [26] 孟祥雯, 张雪洁, 张波, 等. 多柔比星体内外对心肌甲基化转移酶样3依赖的m⁶A RNA甲基化修饰的影响[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2018, 32(12): 930-937.
- MENG X W, ZHANG X J, ZHANG B, et al. Doxorubicin affects myocardial methyltransferase like 3-dependent m⁶A RNA methylation modification *in vivo* and *in vitro* [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2018, 32(12): 930-937.
- [27] DU Y, GUO W, HAN C, et al. N6-methyladenosine demethylase FTO impairs hepatic ischemia-reperfusion injury via inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fragmentation[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(5): 442.
- [28] MEYER K D, JAFFREY S R. Rethinking m⁶A readers, writers, and erasers[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2017, 33: 319-342.
- (英文编辑: 汪源; 责任编辑: 汪源)