

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.18.004

中性粒细胞胞外诱捕网在矽肺中的作用研究*

刘浪^{1,2} 潘频华^{1Δ} 胡永斌¹ 罗百灵¹ 谭洪毅¹ 李海涛¹

(1 中南大学湘雅医院呼吸与危重症医学科 湖南长沙 410008; 2 湖南省职业病防治院 湖南长沙 410008)

摘要 目的:通过构建二氧化硅诱导动物矽肺模型,探讨中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)在矽肺中可能的作用。**方法:**将 C57BL/6J 雄性小鼠完全随机分为磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)组、脱氧核糖核酸酶 I (deoxyribonuclease I, DNase I)组、二氧化硅+PBS 组、二氧化硅+DNase I 组。通过气管内滴注二氧化硅(0.2 g/kg)混悬液构建小鼠矽肺模型, PBS 组与 DNase I 组注入等体积的 PBS。在二氧化硅(silicon dioxide, SiO₂)混悬液注入后的第 0 小时、10 小时小鼠气管内注入 DNase I (5 mg/kg), 以后 DNase I 持续给药: 5 mg/kg/day, 直到 SiO₂ 混悬液注入后的 28 天。二氧化硅(SiO₂)干预 28 天后, 取各组小鼠肺组织与肺泡灌洗液, 通过 PicoGreen 荧光染料检测支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中 NETs 水平, 酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测 BALF 中转化生长因子 β1 (transforming growth factor-β1, TGF-β1)与炎症因子白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素 1β(interleukin-1β, IL-1β)、肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)水平, HE 染色和 Masson 染色观察肺组织的病理学变化, Western Blot 检测肺组织中 NETs 特异性组分瓜氨酸化组蛋白 3(citrullinated-histone3, Cit-H3)表达。**结果:**SiO₂ 干预 28 天后, 与 PBS 组相比, 二氧化硅+PBS 组小鼠肺组织炎症损伤加重, BALF 中促炎介质 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平上升; 肺组织发生纤维化, 大量硅结节形成; 肺组织中 Cit-H3 蛋白表达量增加, BALF 中 NETs 水平显著升高。予以 NETs 抑制剂 DNase I 进行干预后, 肺组织 NETs 水平显著下降, 二氧化硅诱导的肺部炎症损伤、纤维化显著减轻。**结论:**NETs 水平升高可能介导了二氧化硅诱导的小鼠矽肺模型肺部炎症损伤与纤维化。

关键词:矽肺; 中性粒细胞胞外诱捕网; 炎症; 纤维化

中图分类号: Q95-3; R135.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)18-3417-06

The Pathogenic Roles of Neutrophil Extracellular Traps in the Silicosis*

LIU Lang^{1,2}, PAN Pin-hua^{1Δ}, HU Yong-bin¹, LUO Bai-ling¹, TAN Hong-yi¹, LI Hai-tao¹

(1 Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan, 410008, China;

2 Hunan Prevention and Treatment Control for Occupational Diseases, Changsha, Hunan, 410008, China)

ABSTRACT Objective: To explore the possible roles of NETs in the silicosis via constructing silica-induced silicosis animal models. **Method(s):** Male C57BL/6 mice were randomly assigned to four groups: 1) PBS group (PBS, n=20); 2) DNase I group (DNase I, n=20); 3) silica + PBS group (SiO₂+PBS, n=20); 4) silica + DNase I group (SiO₂+DNase I, n=20). After anesthesia, mice were instilled with a single intratracheal dose of SiO₂ at 0.2 g/kg. The same dose of PBS was served as vehicle control. After SiO₂ treatment, mice was treated with DNase I (5 mg/kg, once per day). Lung tissue samples and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were collected at 28 day after SiO₂ treatment. Part of the left lung were collected for hematoxylin and eosin (HE) staining, Masson staining. The IL-1β, IL-6 and TGF-β1 in BALF were measured by ELISA. The free DNA (cf-DNA/NETs) level in BALF was detected by PicoGreen fluorescent dye. The expression of Cit-H3 in lung tissue were measured by Western blot. **Result (s):** Compared with the PBS group, after 28 days of SiO₂ intervention, the lung tissue of silica group showed severe inflammation injury and fibrosis, a large number of silica nodules were formed, and the levels of NETs, IL-1β, IL-6 and TGF-β1 in the lung tissue were significantly increased. After intervention with DNase I, the levels of NETs in lung tissue were significantly decreased, and silica-induced lung inflammation injury and fibrosis were significantly reduced. **Conclusion(s):** The increase of NETs may mediate the lung inflammation and fibrosis in silica-induced silicosis.

Key words: Silicosis; NETs; Inflammation; Fibrosis

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R135.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)18-3417-06

前言

矽肺一旦发生,就呈进行性发展,造成弥漫性肺纤维化,导致肺顺应性降低,患者肺功能受损,严重影响患者的生活工作

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81770080);湖南省卫生计生委科研计划课题(C2016036)

作者简介:刘浪(1980-),硕士研究生,主要研究方向:职业病尘肺, E-mail: 1750658252@qq.com

Δ 通讯作者:潘频华(1968-),博士生导师,教授,主要研究方向:呼吸危重症,

E-mail: pinhuapan668@126.com, 电话: 0731-89753287

(收稿日期:2019-04-08 接受日期:2019-04-30)

能力、生活质量^[1-3]。2014年国家卫计委公布的全国职业病报告显示:2014年全国共发现职业病29972例,其中尘肺病占总数的89.7%,矽肺占整个职业病的38.3%。尽管目前职业病防治手段、法规得到进一步完善,但是矽肺的预防与治疗情况并不乐观,仍缺乏有效的治疗手段^[4]。因此,探究其发病机制,寻求有效的治疗靶点,尤为重要。

中性粒细胞是重要的固有免疫细胞,机体可动员大量的中性粒细胞从循环中进入损伤部位,具有趋化、吞噬、杀菌等多种生物学功能。2004年,Brinkmann等^[5]研究者发现:病原体激活的中性粒细胞能释放出一种网状物质来限制、杀灭细菌,并将这种物质命名为中性粒细胞胞外诱捕网(Neutrophil extracellular traps, NETs)。后续有越来越多的证据表明:中性粒细胞过度激活,导致NETs过度产生,会导致剧烈炎症反应和组织损伤^[6-9],与哮喘、慢性阻塞性肺病、肺纤维化、呼吸道感染、肺损伤等众多呼吸道疾病密切相关^[10-13]。

Rada等^[14]研究者发现外周血中性粒细胞受二氧化硅晶体刺激后会产生大量NETs,且随着二氧化硅刺激浓度的增加,NETs的产生随之增加,提示NETs可能在二氧化硅晶体所致的矽肺中也起到了重要作用,但目前NETs在矽肺病理生理机制中的作用并不完全清楚,本研究拟通过构建二氧化硅诱导动物矽肺模型,探讨NETs在矽肺中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF级C57BL/6J雄性小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。NETs特异性抑制剂DNase I、二氧化硅晶体购自美国Sigma公司;HE、Masson染色试剂购自武汉谷歌生物;肺组织羟脯氨酸检测试剂盒购自南京建成生物研究所;IL-1 β 、IL-6、TGF- β 1 ELISA试剂盒购自达科为生物技术有限公司;兔单克隆抗体Cit-H3、GAPDH购自美国Cell Signaling Technology公司;PicoGreen dsDNA检测试剂盒购自美国Invitrogen公司。

1.2 方法

1.2.1 急性肺损伤模型构建及取材 40只SPF级C57BL/6J雄性小鼠(7-8周,20-25g)随机分为四组:PBS组、DNase I组、PBS+SiO₂组、DNase I+SiO₂组,每组小鼠10只。用戊巴比妥钠麻醉小鼠后,小鼠气管内注入SiO₂悬液构建小鼠矽肺模型(剂量0.2 g/kg),注入SiO₂悬液后,沿着小鼠长轴快速转动,使SiO₂悬液在小鼠肺内分布均匀;PBS组、DNase I组气管内注入等体积的磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered solution, PBS)。在SiO₂混悬液注入后的第0小时、10小时气管内注入DNase I(5 mg/kg),以后DNase I持续给药:5 mg/kg/day,直到SiO₂混悬液注入后的28天。SiO₂干预28天后,小鼠注入过量戊巴比妥钠麻醉,每组5只小鼠进行肺泡灌洗:将小鼠固定,暴露气管,20G规格的静脉留置针插入小鼠气管,每次缓慢注入0.5 mL PBS(2 mM EDTA)灌洗,灌洗2次,共1 mL,每次灌洗液回收比例85%以上。另外每组5只老鼠取肺组织,右肺置于4%多聚甲醛溶液中固定24小时后进行包埋、切片,进行肺组织HE染色、Masson染色;左肺放于液氮中速冻后放于-80℃冰箱中贮存,检测羟脯氨酸含量,western blot检测Cit-H3表达量。

1.2.2 肺组织病理检测 取包埋好的石蜡进行切片,切片厚度

0.4 μ m,根据说明书步骤进行HE染色与Masson染色,并在光镜下观察各组肺组织的病理损伤,由一名经验丰富的病理科医生采用双盲法半定量进行病理评分。肺组织炎症损伤评分标准:① 无肺泡炎症,计0分;② 轻度肺泡炎症损伤,计1分;可见少量炎症细胞浸润、肺泡间隔轻度增厚,炎症损伤局限(炎症损伤面积<20%全肺面积),肺泡结构完整;③ 中度肺泡炎症损伤,计2分;损伤处炎症细胞明显增多,肺泡间隔增厚,炎症损伤扩散(炎症损伤面积占20%-50%全肺面积)④ 重度肺泡炎症损伤,计3分;重度肺组织结构损伤(炎症损伤面积>50%全肺面积,肺泡基本结构破坏),可见肺实变形成。肺纤维化病理评分标准如下:① 肺组织未见明显的纤维沉积,计0分;② 轻度肺组织纤维沉积,总面积<20%,出现散在、未融合的小矽肺结节,肺泡结构发生轻微紊乱,计1分;③ 中度肺组织纤维沉积,总面积占20%-50%,出现较大、部分融合的矽肺结节,计2分;④ 重度肺组织纤维沉积,总面积>50%,出现弥漫性、融合的大矽肺结节,肺组织重度紊乱。

1.2.3 肺组织羟脯氨酸含量检测 取小鼠左上肺,放于精密电子天平上称重,记录重量,用眼科剪剪碎,进行肺组织羟脯氨酸含量检测,具体步骤依据羟脯氨酸试剂盒说明书。

1.2.4 肺泡灌洗液检测 肺泡灌洗液4℃离心(500 $\times$ g,10 min),BALF上清进行炎症因子IL-1 β 、IL-6以及促纤维化因子TGF- β 1检测,具体步骤依据ELISA试剂盒说明书。

1.2.5 Western Blot 检测 取各组小鼠左下肺黄豆大小肺组织,加入200 μ L含有蛋白酶抑制剂RIPA裂解液,再用匀浆器充分匀浆,置于冰上30分钟充分裂解,然后离心,加入蛋白上样缓冲液加热蛋白变性,在SDS-PAGE凝胶中电泳,上层胶80V,30分钟;下层胶120V,60分钟,取0.22 μ m PVDF膜转膜,5%脱脂奶粉封闭1小时,一抗配置: Cit-H3(1:1000)、GAPDH(1:1000);一抗4℃摇床孵育过夜,洗膜,孵育二抗(1:5000)1小时,再洗膜三次,进行条带显影。

1.2.6 肺泡灌洗液中NETs含量检测 此次实验采用picogreen法检测胞外游离DNA,测定采用的是Invitrogen公司生产的PicoGreen dsDNA检测试剂盒;① 根据试剂说明书制作出标准曲线;② 再取待测肺泡灌洗液样本100 μ L,加入Invitrogen公司picogreen试剂100 μ L,室温、避光环境下反应5分钟,然后在荧光检测仪检测590 nm荧光强度,根据标准曲线计算出相对应的浓度值。在操作过程中要注意避光,孵育时间终止尽快上机检测,以免荧光发生淬灭。

1.3 统计学分析

用GraphPad Prism software version 6.00进行作图,统计分析采用SPSS19.0软件。各组样本不同NETs含量进行正态性检验,计量资料以($\bar{x} \pm s$)形式表示;两组间的比较采用t检验;两组以上的多组间比较用单因素方差分析(One-way ANOVA)。相关性研究采用Pearson相关分析,计算相关系数r和P值,以P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肺组织中NETs水平比较

小鼠气管内注入SiO₂混悬液28天后,肺泡灌洗液中NETs水平较PBS组显著上调(图1A, P<0.01)。运用DNase I

干预后,小鼠肺泡灌洗液中 NETs 水平显著下调,与 SiO_2 +PBS 组相比,差异具有统计学意义(图 1A, $P<0.05$)。同时,我们运用 western blot 的方法检测各组肺组织中 NETs 特异性组分瓜氨酸化组蛋白 3 (citrullinated-histone3, Cit-H3) 的表达,在

SiO_2 +PBS 组肺组织中 Cit-H3 较 PBS 组明显上调,运用 DNase I 干预后其表达显著下调,各组间比较差异具有统计学意义(图 1B、图 1C, $P<0.05$)。

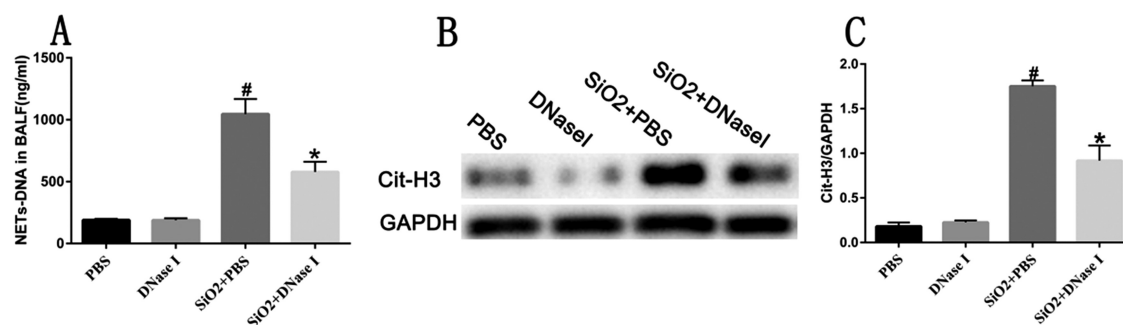


图 1 各组小鼠肺组织中 NETs 水平比较

Fig.1 Comparison of the level of NETs between mice in different groups

Note: PBS: PBS group; DNase I: DNase I group; SiO_2 +PBS: SiO_2 +PBS group; SiO_2 +DNase I: SiO_2 +DNase I group;

Data are expressed as $\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=5$. [#] $P<0.01$, compared with PBS group; ^{*} $P<0.05$, compared with SiO_2 +PBS group.

2.2 各组肺组织病理改变

SiO_2 混悬液气管内注入 28 天后,取小鼠肺组织行 HE 染色,并进行肺损伤病理评分。在 SiO_2 +PBS 组:可见肺组织的结构明显得到破坏,中性粒细胞与单个核细胞在肺组织中广泛浸润,肺泡壁明显增厚,大量矽肺结节(上皮样细胞与巨噬细胞聚

集,形成局灶样微肉芽肿)形成(图 2C);使用 NETs 特异性抑制 DNase I 干预后, SiO_2 诱导的肺部炎症损伤显著降低(图 2D),只有小而散在的矽肺结节出现;与 SiO_2 +PBS 组相比, DNase I+ SiO_2 组肺病理评分显著下降,两组间比较具有统计学差异($P<0.05$)(图 2F)。

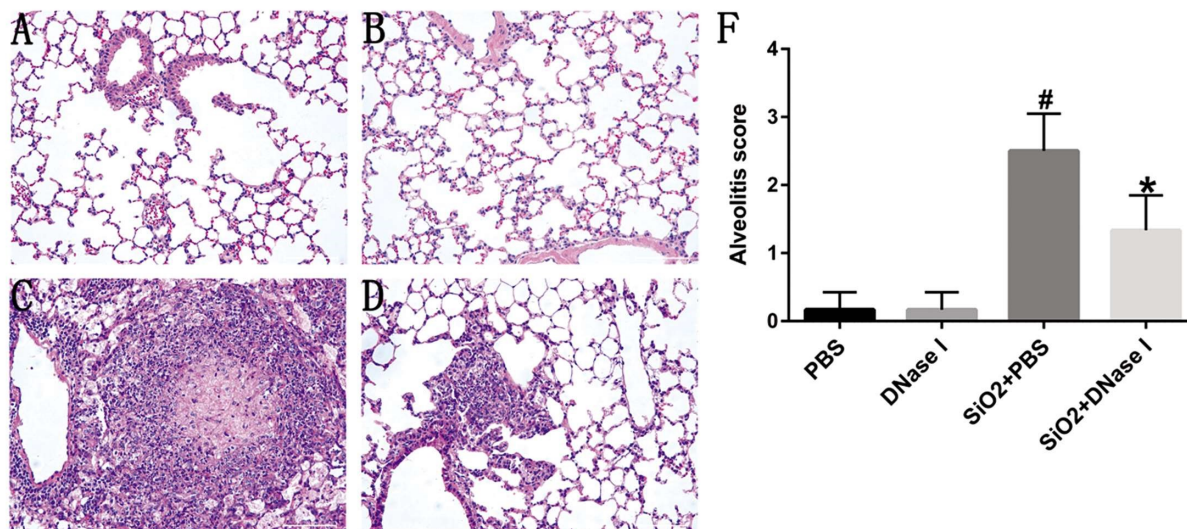


图 2 各组小鼠肺组织病理改变比较

Fig.2 Comparison of the pathological changes of lung tissue between mice in different groups(200 $\times$)

Note: A: PBS group; B: DNase I group; C: SiO_2 +PBS group; D: SiO_2 +DNase I group; Data are expressed as $\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=5$. [#] $P<0.01$, compared with PBS group; ^{*} $P<0.05$, compared with SiO_2 +PBS group.

2.3 各组小鼠 BALF 中炎症因子水平比较

$\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 、 $\text{TNF-}\alpha$ 是肺损伤中重要的炎症因子;在 SiO_2 注入 28 天后,与正常对照组相比, SiO_2 +PBS 组小鼠肺泡灌洗液中 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 、 $\text{TNF-}\alpha$ 水平显著上调,差异具有统计学意义(图 3A、3B、3C, $P<0.01$);与 SiO_2 +PBS 组相比, NETs 特异性抑制剂 DNase I 干预后肺泡灌洗液中炎症因子 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 、 $\text{TNF-}\alpha$ 水平显著下降(图 3A、3B、3C, $P<0.05$)。以上结果提示降低 NETs 含量可显著改善 SiO_2 诱导的肺炎症损伤。

2.4 各组小鼠肺组织纤维沉积情况

二氧化硅沾染动物肺组织后会持续、弥漫的肺纤维化。在 SiO_2 干预小鼠 28 天后,Masson 染色结果显示: SiO_2 +PBS 组肺组织中大量的纤维沉积,肺组织纤维化严重,肺纤维化评分与正常对照组相比显著升高(图 4C、4E, $P<0.01$)。使用 DNase I 干预后,肺组织中纤维沉积明显减少减少(图 4D),与 SiO_2 +PBS 组相比, SiO_2 +DNase I 肺纤维化评分显著下降,且具有差异具有统计学意义(图 4E, $P<0.05$)。

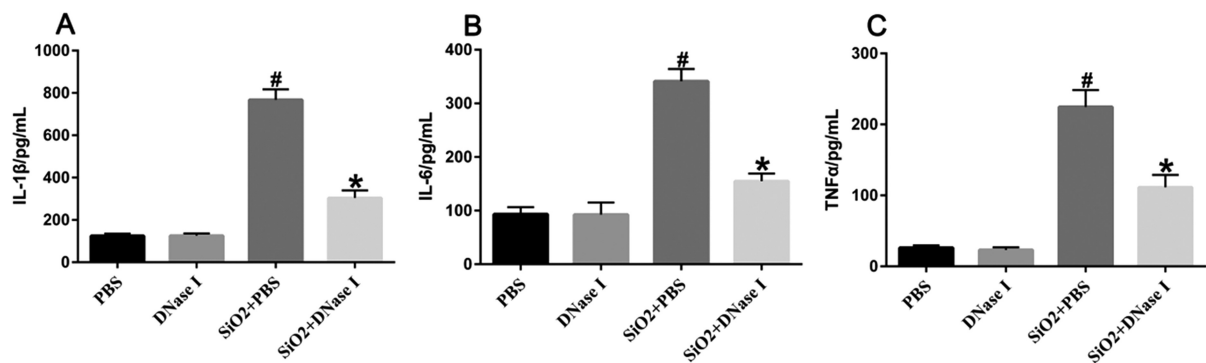


图3 各组小鼠肺泡灌洗液中炎症因子水平比较

Fig.3 Comparison of the inflammatory factors in the BALF of mice in different groups

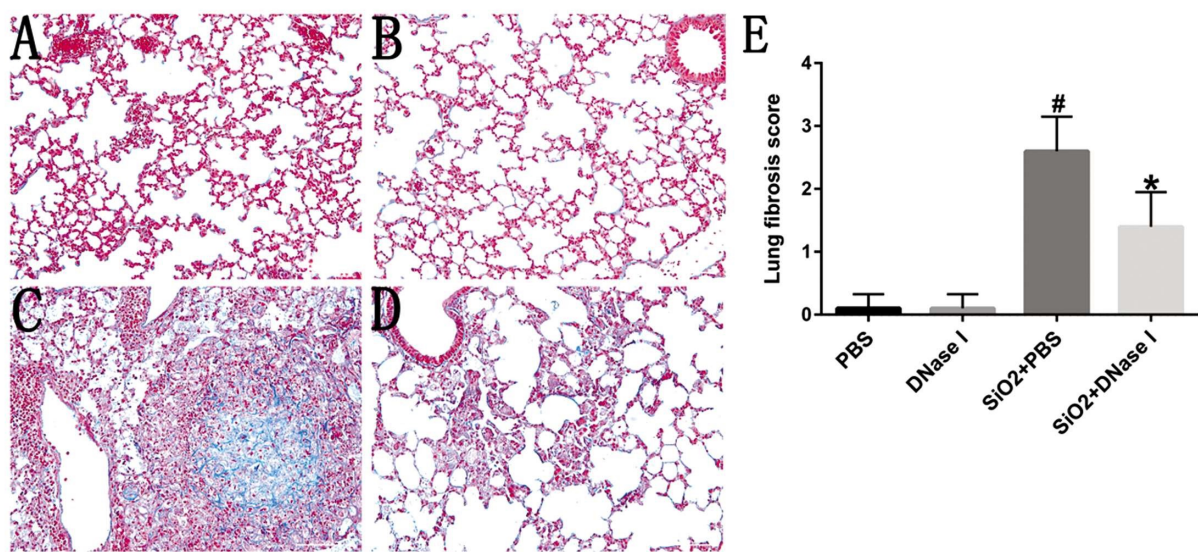
Note: PBS: PBS group; DNase I: DNase I group; SiO₂+PBS: SiO₂+PBS group; SiO₂+DNase I: SiO₂+DNase I group; Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, n=5.[#]*P* < 0.01, compared with PBS group; ^{*}*P* < 0.05, compared with SiO₂+PBS group.

图4 各组小鼠肺组织纤维沉积情况的比较

Fig.4 Comparison of the fiber deposition in the lung tissue of mice in different groups (200×)

Note: A: PBS group; B: DNase I group; C: SiO₂+PBS group; D: SiO₂+DNase I group; Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, n=5.[#]*P* < 0.01, compared with PBS group; ^{*}*P* < 0.05, compared with SiO₂+PBS group.

2.5 各组肺组织中羟脯氨酸与肺泡灌洗液中 TGF-β1 水平比较

羟脯氨酸是胶原纤维特有的氨基酸,其含量可以间接反映组织纤维化的程度;TGF-β1 是一个重要的促纤维化因子,在肺纤维化的形成当中扮演着重要的角色。在 SiO₂ 注入 28 天后,与正常对照组相比, SiO₂+PBS 组小鼠肺组织羟脯氨酸含量、肺泡灌洗液中促纤维化因子 TGF-β1 显著上调(图 5A、5B, *P* < 0.01);与 SiO₂+PBS 组相比, DNase I 干预后促羟脯氨酸含量、纤维化因子 TGF-β1 水平显著下降(图 5A、5B, *P* < 0.05)。以上结果提示降低 NETs 含量可显著改善 SiO₂ 诱导的肺纤维沉积。

3 讨论

矽肺是一种致残率、致死率均较高的职业性尘肺病,患者出现弥漫性肺纤维化,严重降低患者的肺功能。矽肺患者呼吸系统抵抗能力较低,大部分患者还合并有慢性阻塞性肺疾病、肺结核、肺癌等呼吸系统疾病,治疗难度大。目前,矽肺的发病机制还未完全阐明,尚无有效的治疗药物问世。因此,探究矽肺发病机制,及有效的治疗药物仍十分重要。本研究建立了二

氧化硅诱导的动物矽肺模型,探索 NETs 在矽肺发病过程中可能的作用。研究结果显示:二氧化硅诱导的小鼠矽肺模型中,肺组织 NETs 水平升高;NETs 特异性抑制剂 DNase I 能通过降低矽肺小鼠肺组织中 NETs 水平,减轻 SiO₂ 诱导的肺部炎症损伤、纤维化。

机体长时间处于富含二氧化硅粉尘的环境中时,大量二氧化硅堆积于肺内,导致肺组织炎症损伤。Lopes 等^[15]认为二氧化硅可通过如下机制导致肺损伤与纤维化:① 直接细胞毒作用,可损伤吞噬的巨噬细胞或者直接损伤肺泡上皮细胞;② 产生大量的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 与活性氮 (reactive nitrogen species, RNS) 损伤肺组织;③ 产生促炎与促纤维化因子,例如 TNF-α、IL-1β、TGF-β 等;④ 促炎与促纤维化因子可激活纤维母细胞,促进胶原纤维的产生与堆积;⑤ 促进肺实质细胞凋亡;目前矽肺导致肺损伤与纤维化的确切机制还不是很明确,还需要进一步实验探究与阐明。

目前大部分研究者对矽肺病理生理机制探究,均着眼于肺泡巨噬细胞。二氧化硅进入肺部后,肺泡巨噬细胞进一步吞噬

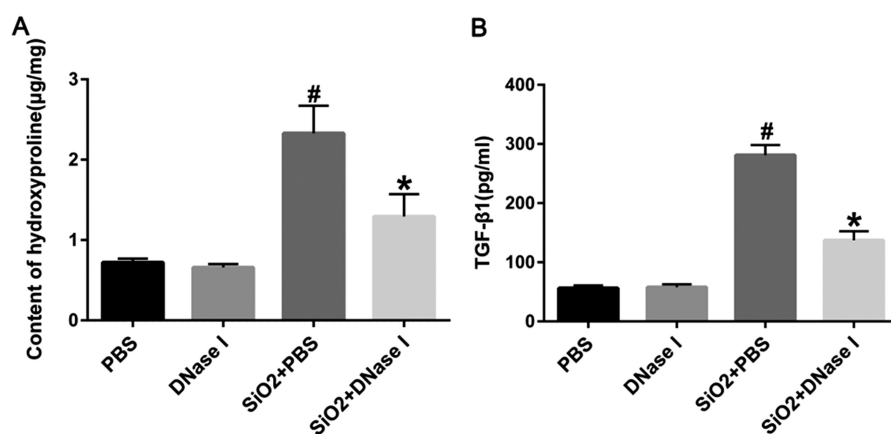


图5 各组小鼠肺组织中羟脯氨酸含量与 BALF 中 TGF-β1 水平比较

Fig.5 Comparison of Hydroxyproline Content in Lung Tissue and TGF-β1 Level in BALF of mice in different Groups

Note: PBS: PBS group; DNase I: DNase I group; SiO₂+PBS: SiO₂+PBS group; SiO₂+ DNase I: SiO₂+ DNase I group;Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, n=5.[#]P<0.01, compared with PBS group; ^{*}P<0.05, compared with SiO₂+PBS group.

处理,巨噬细胞活化,产生大量的炎症因子与氧化应激产物,进一步损伤肺组织^[16,17]。研究显示矽肺患者与矽肺动物模型肺泡灌洗液中有大量中性粒细胞聚集,而降低矽肺动物模型肺泡灌洗液中中性粒细胞水平后,矽肺严重程度得到缓解^[18]。因此,除肺泡巨噬细胞外,中性粒细胞在矽肺的发生发展中可能也起着重要的作用。

中性粒细胞胞外诱捕网是中性粒细胞激活时,细胞崩解释放线粒体或核 DNA 组成,形成网状结构,这些结构上覆盖着有杀菌作用的组蛋白和颗粒成分,具有抗病原菌入侵的屏障作用,但当 NETs 产生过多时还可损伤组织细胞,产生强烈的炎症损伤反应^[19]。近来,许多研究发现中性粒细胞胞外诱捕网与哮喘、慢性阻塞性肺疾病、肺损伤、肺炎等肺部炎症疾病密切相关^[10,20,21]。我们课题组在前期研究中发现急性肺损伤小鼠肺内 NETs 水平急剧升高,肺组织炎症损伤严重,运用 NETs 特异性抑制剂降解 NETs 后,肺损伤严重程度显著缓解^[12,22,23]。因此,中性粒细胞胞外诱捕网就像一柄双刃剑,一方面可作为机体抵抗病原微生物入侵的屏障,反过来也可加剧组织的炎症损伤,探究其在矽肺病理生理机制中的作用十分必要。Rada 等^[4]研究者发现人外周血中性粒细胞受二氧化硅晶体刺激后会产生大量 NETs,提示 NETs 可能在二氧化硅晶体所致的矽肺中起到了重要作用,但还未有体内实验数据证实。在我们的研究中:二氧化硅干预 28 天后,小鼠肺泡灌洗液中 NETs 含量显著上升,肺组织中肺组织病理炎症损伤严重,肺泡灌洗液中炎症因子 IL-1β、IL-6、TNFα 水平显著上升。当使用 NETs 特异性抑制剂 DNase I 干预小鼠后,肺组织与肺泡灌洗液中的 NETs 水平显著减少,炎症因子 IL-1β、IL-6、TNFα 水平下降,二氧化硅诱导的肺损伤炎症损伤得到缓解。以上结果提示二氧化硅诱导的动物矽肺模型具有高水平的 NETs,可加重小鼠肺部炎症损伤。

中性粒细胞胞外诱捕网除了可引发肺部炎症,还在纤维化进程中起着重要的作用^[24-28]。Robledo 等^[29]研究者证实钙稳态失调诱导中性粒细胞胞外诱捕网产生,加速囊性肺纤维化病程进展。肽酰基精氨酸脱亚氨酶作为诱导 NETs 产生的重要环节,在炎症性疾病与纤维化中发生发展过程中起着重要的作用^[26]。Chrysanthopoulou 等^[30]研究者进一步探究 NETs 诱发纤维机

制,发现 NETs 促进纤维发生,可能与促进纤维母细胞分化,加速细胞外基质合成有关。在我们的研究中,二氧化硅干预小鼠 28 天后,肺组织中 NETs 水平上升,肺泡灌洗液中促纤维化因子 TGF-β1 水平显著上调,大量胶原纤维在肺内沉积。运用中性粒细胞胞外诱捕网特异性清除剂 DNase I 干预后,肺泡灌洗液中 TGF-β1 水平显著下调,肺组织纤维化情况得到显著改善。从肺组织病理、羟脯氨酸含量、促纤维化因子水平结果来看, DNase I 降低 NETs 含量可显著改善 SiO₂ 诱导的肺纤维沉积,其机制可能与 NETs 促进促纤维化因子 TGF-β1 的产生有关。

矽肺一旦发生,便呈进行性进展,因此有效干预措施显得尤为重要。目前主要的治疗方式有:① 药物治疗:目前多使用钙离子拮抗剂汉防己甲素抗肺纤维化,糖皮质激素也有一定疗效,同时结合患者病情以及并发症,联合止咳化痰、抗结核等对症支持治疗;② 支气管肺泡灌洗,分为小容量肺段灌洗与双肺双侧大容量灌洗;对于小容量肺段灌洗主要是在灌洗液中加入抗生素、抗肺纤维化、免疫增强剂,抗感染,增强患者体质;后者,主要是通过灌洗的方式,清除沉积肺内的粉尘与炎性分泌物;③ 干细胞治疗:干细胞治疗矽肺是目前研究的热点所在,但仍处于基础研究阶段,还有待大样本的临床试验研究验证其有效性,发展前景广阔;④ 肺移植:目前肺移植是终末期矽肺患者有效治疗方式,但在我国还存在着供体稀少的窘境,且肺移植的长期疗效并不乐观。综上,目前矽肺的预防与治疗情况并不乐观,缺乏有效的治疗手段。在我们的研究中:NETs 特异性消除剂 DNase I 能有效地降低二氧化硅诱导小鼠矽肺模型中 NETs 含量,改善二氧化硅诱导的肺部炎症损伤与纤维化,提示 NETs 可能作为矽肺治疗的潜在靶点,NETs 特异性消除剂 DNase I 可作为矽肺患者潜在的治疗药物。但本研究只涉及动物实验,二氧化硅诱导中性粒细胞胞外诱捕网的产生的具体机制还有待进一步的研究。

综上所述,二氧化硅可通过激活中性粒细胞释放中性粒细胞胞外诱捕网,加重小鼠肺部炎症损伤与肺纤维化;NETs 抑制剂 DNase I 可通过降低 NETs 水平,改善二氧化硅诱导的肺炎性损伤与肺纤维化。DNase I 可特异性降解中性粒细胞胞外诱捕网,可作为矽肺患者潜在的治疗药物,但其有效性只在二氧

化硅诱导矽肺动物模型上验证,其具体机制有效性还有待大样本的临床试验研究阐明。

参 考 文 献(References)

- [1] Rimal B, Greenberg A K, Rom W N. Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2005, 11 (2): 169-173
- [2] Kitaguchi Y, Fujimoto K, Hanaoka M, et al. Pulmonary function impairment in patients with combined pulmonary fibrosis and emphysema with and without airflow obstruction [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2014, 9: 805-811
- [3] Leung C C, Yu I T, Chen W. Silicosis [J]. *Lancet*, 2012, 379(9830): 2008-2018
- [4] Chen H, Hu W, Shen Y. Current situation and progression in the drug therapy for silicosis [J]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*, 2017, 35(9): 716-718
- [5] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J]. *Science*, 2004, 303(5663): 1532-1535
- [6] Merza M, Hartman H, Rahman M, et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Trypsin Activation, Inflammation, and Tissue Damage in Mice With Severe Acute Pancreatitis [J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(7): 1920-1931
- [7] Yang H, Marion T N, Liu Y, et al. Nanomaterial Exposure Induced Neutrophil Extracellular Traps: A New Target in Inflammation and Innate Immunity[J]. *J Immunol Res*, 2019, 2019: 3560180
- [8] Castanheira F, Kubes P. Neutrophils and NETS in modulating acute and chronic inflammation[J]. *Blood*, 2019[Epub ahead of print]
- [9] Lachowicz-Scroggins M E, Dunican E M, Charbit A R, et al. Extracellular DNA, Neutrophil Extracellular Traps, and Inflammasome Activation in Severe Asthma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019[Epub ahead of print]
- [10] Uddin M, Watz H, Malmgren A, et al. NETopathic Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Severe Asthma[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 47
- [11] Storisteanu D M, Pocock J M, Cowburn A S, et al. Evasion of Neutrophil Extracellular Traps by Respiratory Pathogens [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017, 56(4): 423-431
- [12] Li H, Zhou X, Tan H, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of acid-aspiration-induced ALI/ARDS [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(2): 1772-1784
- [13] Porto B N, Stein R T. Neutrophil Extracellular Traps in Pulmonary Diseases: Too Much of a Good Thing?[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 311
- [14] Rada B. Neutrophil Extracellular Traps and Microcrystals [J]. *J Immunol Res*, 2017, 2017: 2896380
- [15] Lopes-Pacheco M, Bandeira E, Morales M M. Cell-Based Therapy for Silicosis[J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 5091838
- [16] Lee S, Hayashi H, Mastuzaki H, et al. Silicosis and autoimmunity[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2017, 17(2): 78-84
- [17] Pollard K M. Silica, Silicosis, and Autoimmunity[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 97
- [18] Lo R S, Dumoutier L, Couillin I, et al. IL-17A-producing gammadelta T and Th17 lymphocytes mediate lung inflammation but not fibrosis in experimental silicosis[J]. *J Immunol*, 2010, 184(11): 6367-6377
- [19] Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(2): 134-147
- [20] Gan T, Yang Y, Hu F, et al. TLR3 Regulated Poly I:C-Induced Neutrophil Extracellular Traps and Acute Lung Injury Partly Through p38 MAP Kinase[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 3174
- [21] Yadav R, Yoo D G, Kahlenberg J M, et al. Systemic levels of anti-PAD4 autoantibodies correlate with airway obstruction in cystic fibrosis[J]. *J Cyst Fibros*, 2019[Epub ahead of print]
- [22] Liu S, Su X, Pan P, et al. Neutrophil extracellular traps are indirectly triggered by lipopolysaccharide and contribute to acute lung injury[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 37252
- [23] Liu S, Yue Y, Pan P, et al. IRF-1 Intervention in the Classical ROS-Dependent Release of NETs during LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice[J]. *Inflammation*, 2019, 42(1): 387-403
- [24] Khan M A, Ali Z S, Swezey N, et al. Progression of Cystic Fibrosis Lung Disease from Childhood to Adulthood: Neutrophils, Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation, and NET Degradation[J]. *Genes (Basel)*, 2019, 10(3)[Epub ahead of print]
- [25] Rebordao M R, Amaral A, Lukasik K, et al. Impairment of the antifibrotic prostaglandin E₂ pathway may influence neutrophil extracellular traps-induced fibrosis in the mare endometrium [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2019, 67 :1-10
- [26] Wong S L, Wagner D D. Peptidylarginine deiminase 4: a nuclear button triggering neutrophil extracellular traps in inflammatory diseases and aging[J]. *FASEB J*, 2018, 32(12): 6358-6370
- [27] Gray R D, Hardisty G, Regan K H, et al. Delayed neutrophil apoptosis enhances NET formation in cystic fibrosis[J]. *Thorax*, 2018, 73(2): 134-144
- [28] Martinez-Aleman S R, Campos-Garcia L, Palma-Nicolas J P, et al. Understanding the Entanglement: Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Cystic Fibrosis [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 104
- [29] Robledo-Avila F H, Ruiz-Rosado J D, Brockman K L, et al. Dysregulated Calcium Homeostasis in Cystic Fibrosis Neutrophils Leads to Deficient Antimicrobial Responses[J]. *J Immunol*, 2018, 201 (7): 2016-2027
- [30] Chrysanthopoulou A, Mitroulis I, Apostolidou E, et al. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts [J]. *J Pathol*, 2014, 233(3): 294-307