

• 基础研究 •

利拉鲁肽对二氧化硅诱导巨噬细胞极化的影响及机制

杨雨欣¹, 刘晨阳¹, 金琳玲¹, 周 宏², 何梦钰¹, 孔 辉¹, 解卫平^{1*}

¹南京医科大学第一附属医院呼吸与危重症医学科, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学附属无锡人民医院呼吸与危重症医学科, 江苏 无锡 214023

[摘 要] 目的: 初步探讨利拉鲁肽(liraglutide, Li)对二氧化硅(SiO₂)诱导巨噬细胞极化的影响及其机制。方法: 将巨噬细胞分为5组, 分别为: Control组、SiO₂组、SiO₂+Li(10 nmol/L)组、SiO₂+Li(100 nmol/L)组及SiO₂+Li(1 000 nmol/L)组。CCK-8法检测巨噬细胞活性; ELISA法测定各组细胞白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-10、转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 1分泌水平; Western blot测定NOD样受体蛋白3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)、半胱天冬蛋白酶1(cysteiny aspartate specific proteinase 1, Caspase-1)p20、精氨酸酶(arginase, Arg)-1表达; JC-1荧光探针染色测量各组巨噬细胞线粒体膜电位; DCFH-DA探针检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平。结果: 与Control组比较, SiO₂组NLRP3、Caspase-1 p20、Arg-1蛋白水平显著升高, IL-1 β 、IL-10、TGF- β 1分泌显著增加, 差异有统计学意义(P 均 < 0.001); 与SiO₂组比较, SiO₂+Li(10 nmol/L)组、SiO₂+Li(100 nmol/L)组及SiO₂+Li(1 000 nmol/L)组NLRP3、Caspase-1 p20、Arg-1蛋白水平降低, IL-1 β 、IL-10、TGF- β 1分泌减少, 差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。SiO₂组细胞内线粒体膜电位较Control组下降; 与SiO₂组比较, SiO₂+Li(10 nmol/L)组、SiO₂+Li(100 nmol/L)组及SiO₂+Li(1 000 nmol/L)组细胞内线粒体膜电位上升。SiO₂组ROS相对荧光强度较Control组增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与SiO₂组比较, SiO₂+Li(10 nmol/L)组、SiO₂+Li(100 nmol/L)组及SiO₂+Li(1 000 nmol/L)组ROS相对荧光强度逐渐降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: Li可通过改善SiO₂诱导的线粒体功能障碍, 减轻ROS氧化应激, 阻止NLRP3炎症小体活化, 抑制SiO₂诱导的M2型巨噬细胞极化。

[关键词] 利拉鲁肽; 二氧化硅; 巨噬细胞; NLRP3

[中图分类号] R563.13

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2024)10-1353-09

doi: 10.7655/NYDXBNSN240540

Effects and potential mechanisms of liraglutide on silica - induced polarization of macrophages

YANG Yuxin¹, LIU Chenyang¹, JIN Linling¹, ZHOU Hong², HE Mengyu¹, KONG Hui¹, XIE Weiping^{1*}

¹Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029; ²Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, the Affiliated Wuxi People's Hospital of Nanjing Medical University, Wuxi 214023, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects and potential mechanisms of liraglutide (Li) on macrophages polarization induced by silica (SiO₂). **Methods:** Macrophages were divided into five groups: the control group, SiO₂ group, SiO₂+Li (10 nmol/L) group, SiO₂+Li (100 nmol/L) group, and SiO₂+Li (1 000 nmol/L) group. The cytotoxicity of Li on the macrophages was assessed using the CCK-8 assay; levels of interleukin (IL)-1 β , IL-10 and transforming growth factor (TGF)- β 1 in each group were measured by ELISA. Western blot was used to determine the expression levels of NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), cysteinyl aspartate specific proteinase (Caspase-1)p20, and arginase-1 (Arg-1). Mitochondrial membrane potential in the macrophages was detected by using JC-1 fluorescent probe staining. Reactive oxygen species (ROS) levels in the macrophages from all groups were measured by using DCFH-DA probe. **Results:** Compared with the control group, the SiO₂ group showed significantly increased protein levels of NLRP3, Caspase-1 p20, and Arg-1, as well as elevated secretion of IL-1 β , IL-10, and TGF- β 1 (all $P < 0.010$). Compared with the SiO₂ group, the SiO₂+Li (10 nmol/L), SiO₂+Li

[基金项目] 国家自然科学基金(81870054, 82000061); 江苏省科教能力提升工程; 江苏省医学创新中心(CXZX202206); 南京医科大学第一附属医院青年基金培育计划(PY2022012)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wpxie@njmu.edu.cn

(100 nmol/L), and SiO₂+Li(1 000 nmol/L) groups showed decreased protein levels of NLRP3, Caspase-1 p20, and Arg-1, and reduced secretion of IL-1 β , IL-10, and TGF- β 1 (all $P < 0.05$). The mitochondrial membrane potential in the SiO₂ group was lower than that in the Control group; however, it increased in the SiO₂+Li(10 nmol/L), SiO₂+Li(100 nmol/L), and SiO₂+Li(1 000 nmol/L) groups compared to the SiO₂ group. The relative fluorescence intensity of ROS in the SiO₂ group was higher than that in the Control group, with statistically significant differences. Compared with the SiO₂ group, the relative fluorescence intensity of ROS in the SiO₂+Li(10 nmol/L), SiO₂+Li(100 nmol/L), and SiO₂+Li(1 000 nmol/L) groups gradually decreased, with statistically significant differences. **Conclusion:** Li may inhibit SiO₂-induced M2 macrophage polarization by improving SiO₂-induced mitochondrial dysfunction, reducing ROS oxidative stress, and preventing NLRP3 inflammasome activation.

[Key words] liraglutide; silica; macrophage; NLRP3

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(10): 1353-1361]

肺间质纤维化是一种以肺泡上皮损伤、成纤维细胞活化及增殖、细胞外基质沉积并伴有大量炎症细胞募集为特征的肺部疾病。特发性肺间质纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)机制不明、预后差,中位生存期仅3~5年^[1]。尽管尼达尼布、吡非尼酮、乙酰半胱氨酸等药物可用于治疗肺间质纤维化,但IPF患者预后依旧很差,仍需要进一步探讨肺间质纤维化机制,研发治疗IPF药物。目前用于研究肺间质纤维化的模型主要包括:博来霉素诱导肺间质纤维化动物模型、二氧化硅(SiO₂)诱导肺间质纤维化动物模型及辐射(放射)诱导肺间质纤维化动物模型。尽管博来霉素诱导肺间质纤维化动物模型是较常用的肺间质纤维化动物模型,但博来霉素诱导肺间质纤维化动物模型不能模拟肺间质纤维化进行性发展的特征,且造模28 d后小鼠肺纤维化有一定自限性;辐射(放射)诱导肺间质纤维化动物模型也可以用于肺间质纤维化机制探讨,但该方法建模周期长、辐射量难以把握、费用较高,并存在个体差异性;SiO₂是导致矽肺的主要原因,人体吸入SiO₂后巨噬细胞活化、矽结节形成、肺间质纤维化。SiO₂诱导的肺纤维化小鼠模型也是常用于研究肺纤维化发生发展机制的模型^[2]。SiO₂诱导肺间质纤维化动物模型尽管不能完全代表IPF的病理生理改变,但SiO₂一旦进入气道及肺组织中,难以从其中清除,可形成持续刺激,炎症反应剧烈,肺泡巨噬细胞极化,肺间质纤维化,因此, SiO₂诱导的肺间质纤维化模型可用于研究肺泡巨噬细胞参与的肺间质纤维化发生发展过程。本研究通过成功建立SiO₂诱导的巨噬细胞极化模型,初步探讨利拉鲁肽(liraglutide, Li)对巨噬细胞极化的作用及其细胞生物学机制和分子生物学机制。

肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, AM)作为一种高度异质性的免疫细胞,可分为M1、M2亚型,

两者可分泌各种促炎和促纤维化因子,诱导上皮细胞发生间充质转化,促使成纤维细胞增殖,在肺间质纤维化的发生发展中发挥重要作用。其中, M2型巨噬细胞极化是肺纤维化的重要病理学特征,抑制M2型巨噬细胞极化在肺纤维化中发挥重要保护作用^[3-4]。AM可经不同途径诱发表型改变,调节炎症因子分泌。NOD样受体(NOD-like receptor, NLR)以炎症小体的形式发挥作用,包括NLRP1、NLRP3、NLRP4等。炎症小体是一类多蛋白复合物,参与多种炎症因子的成熟和释放过程,介导细胞对病原体感染、组织损伤、吸入有害颗粒如SiO₂的应答^[5]。研究显示, NLRP3参与了人体多个组织器官纤维化过程^[6]。本课题组前期研究发现, NLRP3通过Smad2/3-Snail信号通路参与调控SiO₂诱导气道上皮细胞发生间充质转化^[7]。

Li是一种长效胰高血糖素样肽-1(glucagon like peptide-1, GLP-1)类似物,通过激活胰高血糖素样肽-1受体(glucagon like peptide-1 receptor, GLP-1R)治疗2型糖尿病,在治疗2型糖尿病的同时降低肝纤维化的发生^[8]。Li可通过抑制氧化应激、Smad信号通路来抑制心脏纤维化^[9-10]。Li可通过下调TGF- β 1表达,减弱TGF- β 1/Smad3信号转导,减轻肾纤维化^[11]。本课题组既往研究发现, Li可通过减少大鼠肺纤维化模型中肺部巨噬细胞等炎症细胞浸润和炎症因子释放,保护肺组织结构,减少胶原沉积,抑制上皮间充质转化,防治大鼠肺间质纤维化^[12]。本研究建立了SiO₂诱导的巨噬细胞极化模型,从细胞水平初步探究Li抑制M2型巨噬细胞极化的细胞生物学和分子生物学机制。

1 材料和方法

1.1 材料

急性单核细胞白血病细胞系 THP-1(中国科学

院上海细胞库),Li、佛波酯(phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA)、SiO₂(Sigma 公司,美国),RPMI 1640 培养基(Gibco 公司,美国),细胞计数试剂盒(cell counting kit, CCK)-8(杭州联科生物技术有限公司),白细胞介素(interleukin, IL)-1 β ELISA 检测试剂盒(上海恒远生物科技有限公司)、转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 1 ELISA 检测试剂盒(武汉华美生物工程有限公司),增强型线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)(上海碧云天生物技术公司),活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),CD68 抗体(Abcam 公司,美国),荧光染料 Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG(上海碧云天生物技术公司)NOD 样受体蛋白 3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)抗体(Novus 公司,美国);半胱天冬蛋白酶-1(cysteinyl aspartate specific proteinase, Caspase-1)p20 抗体、精氨酸酶(arginase, Arg)-1 抗体、IL-10 ELISA 检测试剂盒(武汉三鹰生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 SiO₂的制备

称取适量 SiO₂混匀于 0.9%生理盐水中,配制成浓度为 10 mg/mL 的储备液,超声 30 min,200 °C 灭菌 90 min 后,4 °C 保存备用。实验时,用 RPMI1640 培养基稀释为工作液。

1.2.2 巨噬细胞培养、诱导分化及分组

THP-1 细胞用含 10 %胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基培养于 37 °C、5% CO₂的细胞培养箱。取状态良好的 THP-1 细胞,加入 150 ng/mL PMA 诱导 48 h,细胞诱导贴壁为巨噬细胞。弃培养基,PBS 洗涤后用于后续实验。

细胞分为 5 组,分别为对照(Control)组、SiO₂组(SiO₂浓度为 50 μ g/cm²)及 SiO₂+Li(10、100、1 000 nmol/L)组。SiO₂+Li 组中先使用 Li 预处理 1 h,再使用 SiO₂刺激 24 h。

1.2.3 免疫荧光法检测 CD68 表达

取对数生长期 THP-1 细胞,制成 8 \times 10⁴个/mL 的细胞悬液,接种于装有爬片的 24 孔细胞培养板中,每孔 500 μ L 细胞悬液。加入 150 ng/mL PMA 诱导 48 h,细胞诱导贴壁为巨噬细胞。弃去培养基,PBS 洗涤 3 次,加入 4%多聚甲醛,室温下固定 20 min。弃去多聚甲醛,PBS 洗涤 3 次。0.1% Triton X-100 室温破膜后,PBS 洗涤 3 次。使用 5% BSA 室温封闭 30 min,去除 BSA,向 24 孔板中加入 CD68 抗体(1:1 000),4 °C 冰箱孵育过夜。次日使用 1 \times PBST 洗涤 3 次,加入荧

光二抗(1:1 000),37 °C 孵育 1 h,PBST 洗涤 3 次,每孔加入 DAPI 反应液 300 μ L,室温避光孵育 10 min 后,PBST 清洗 3 次,滴加适量抗荧光猝灭液封片,将爬片置于荧光显微镜下,观察荧光强度并拍照。

1.2.4 CCK-8 法检测巨噬细胞活性

将对数期 THP-1 细胞以 5 \times 10³个/孔接种于 96 孔板,PMA(150 ng/mL)诱导分化 48 h 后,弃上清,更换为含 0、1、10、100、1 000、10 000 nmol/L Li 的 RPMI 1640 完全培养基处理细胞 24 h,弃培养基,PBS 清洗 3 次,每孔加入 100 μ L CCK-8 工作液,孵育 2 h,采用全自动酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度值。按照公式细胞活力(%)=[(实验孔吸光度值-空白孔吸光度值)/(对照孔吸光度值-空白孔吸光度值)] \times 100%,计算细胞活力。

1.2.5 ELISA 法检测细胞培养上清中 IL-1 β 、IL-10 及 TGF- β 1

收集各组细胞培养上清于 4 °C、1 000 g 离心 20 min 去除杂质及细胞碎片。除空白孔外,分别将各组细胞培养上清及不同浓度标准品加入相应孔中(100 μ L/孔),用封板胶纸封住反应孔,37 °C 孵箱中孵育 90 min。洗板 4 次,除空白孔外,每孔加入 100 μ L 生物素化抗体工作液,用封板胶纸封住反应孔,37 °C 孵箱中孵育 60 min。洗板 4 次,除空白孔外,每孔加入 100 μ L 酶结合物工作液,用封板胶纸封住反应孔,37 °C 孵箱中孵育 30 min。洗板 4 次,每孔加入 100 μ L 显色剂,避光 37 °C 孵箱中孵育 15 min。每孔加入 100 μ L 终止液,混匀后在酶标仪上读取 450 nm 处的吸光度值。

1.2.6 Western blot 测定 NLRP3、Caspase-1 p20 及 Arg-1 表达水平

各组去除细胞培养液,加入细胞裂解液(含蛋白酶抑制剂)提取细胞总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度。各组细胞总蛋白使用浓度为 7.5%~12.5%的 SDS-PAGE 胶分离后转移到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h,加入 NLRP3 抗体(1:1 000)、Caspase-1 p20 抗体(1:1 000)、Arg-1 抗体(1:1 000),4 °C 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次后加入二抗,室温孵育 1 h。TBST 洗涤 3 次后加入 ECL 化学发光液,置于化学发光仪中曝光并拍照,使用 Image Lab 软件分析灰度值。

1.2.7 JC-1 荧光探针染色检测线粒体膜电位

将各组细胞接种于 6 孔板中,吸除培养液,PBS 洗涤 1 次,加入 1 mL 细胞培养液。各孔中分别加入 1 mL JC-1 染色工作液,充分混匀。37 °C 细胞培养箱

中孵育 20 min, 吸除上清, 用 JC-1 染色缓冲洗涤液洗涤 2 次, 加入 2 mL 细胞培养液, 使用荧光显微镜观察并拍照, 使用 Image J 软件分析平均荧光强度, 计算红色/绿色荧光度比值。

1.2.8 ROS 检测

将各组细胞接种于提前放置爬片的 24 孔板中, 向各孔加入含 10 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 的 RPMI 1640 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中孵育 1 h。弃去上清, 使用荧光显微镜拍摄细胞内 ROS 荧光图像。使用 Image J 软件分析平均荧光强度。

1.3 统计学方法

数据分析采用 GraphPad Prism 6.0 软件。所有

数据以均数 \pm 标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示。多个样本间均数比较采用单因素方差分析, 组间均数比较使用 LSD-*t* 检验法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 巨噬细胞鉴定

免疫荧光染色结果显示, 培养的细胞中 CD68 (巨噬细胞标志物) 表达阳性, 提示 PMA 成功诱导 THP-1 细胞贴壁分化为巨噬细胞(图 1)。

2.2 Li 对巨噬细胞活性的影响

与 Control 组相比, 不同浓度 Li (1、10、100、1 000、10 000 nmol/L) 处理巨噬细胞 24 h 后, 细胞活性

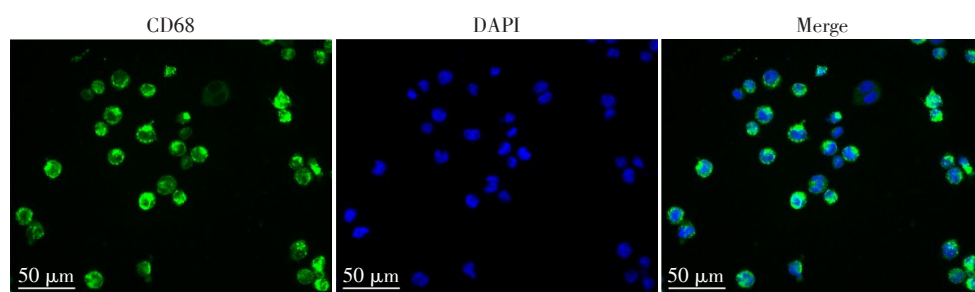


图 1 巨噬细胞免疫荧光鉴定($\times 400$)

Figure 1 Immunofluorescence identification of cultured macrophages($\times 400$)

差异无统计学意义($P > 0.05$), 提示在 1~10 000 nmol/L 内, Li 对巨噬细胞无明显细胞毒性(图 2)。1 nmol/L 浓度太低不易显示出差异, 10 000 nmol/L 在人体内浓度太高, 故选择 10、100、1 000 nmol/L 3 个浓度梯度完成后续实验。

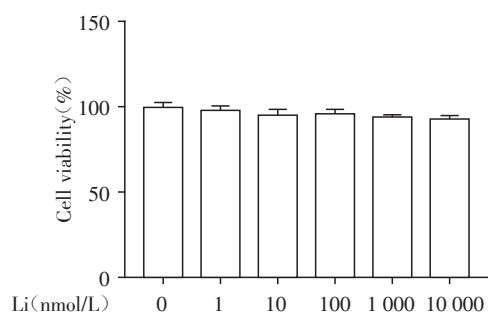


图 2 Li 对培养的巨噬细胞活性的影响($n=3$)

Figure 2 Effects of Li on the cell viability in cultured macrophages($n=3$)

2.3 Li 对巨噬细胞 NLRP3 活化的影响

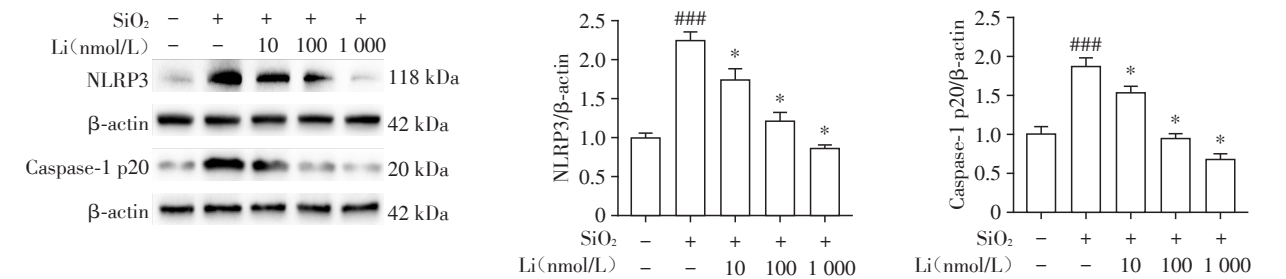
与 Control 组相比, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ SiO_2 作用于巨噬细胞 24 h, 可显著上调 NLRP3 和活化的 Caspase-1 p20 蛋白表达($P < 0.001$)。与 SiO_2 组相比, SiO_2 +Li (10 nmol/L) 组、 SiO_2 +Li (100 nmol/L) 组及 SiO_2 +Li (1 000 nmol/L)

组 NLRP3、Caspase-1 p20 表达水平降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 3)。以上结果提示 Li (10、100、1 000 nmol/L) 可浓度依赖性抑制 SiO_2 诱导的 NLRP3 及 Caspase-1 p20 蛋白表达。

2.4 Li 对巨噬细胞 IL-1 β 、IL-10 及 TGF- β 1 表达的影响

SiO_2 组 IL-1 β 水平为 (127.00 ± 17.05) pg/mL, 较 Control 组 (37.72 ± 10.23) pg/mL 明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.001$); 与 SiO_2 组相比, SiO_2 +Li (10 nmol/L) 组、 SiO_2 +Li (100 nmol/L) 组及 SiO_2 +Li (1 000 nmol/L) 组 IL-1 β 水平分别为 (77.40 ± 12.55)、(64.74 ± 6.86)、(41.55 ± 12.74) pg/mL, 较 SiO_2 组降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.001$, 图 4A)。

SiO_2 组 IL-10 水平为 (212.70 ± 6.97) pg/mL, 较 Control 组 (70.88 ± 3.21) pg/mL 明显增加, 差异具有统计学意义($P < 0.001$); SiO_2 +Li (10 nmol/L) 组、 SiO_2 +Li (100 nmol/L) 组及 SiO_2 +Li (1 000 nmol/L) 组 IL-10 水平分别为 (127.80 ± 7.70)、(110.80 ± 6.53)、(85.13 ± 7.17) pg/mL, 较 SiO_2 组明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.001$, 图 4B)。



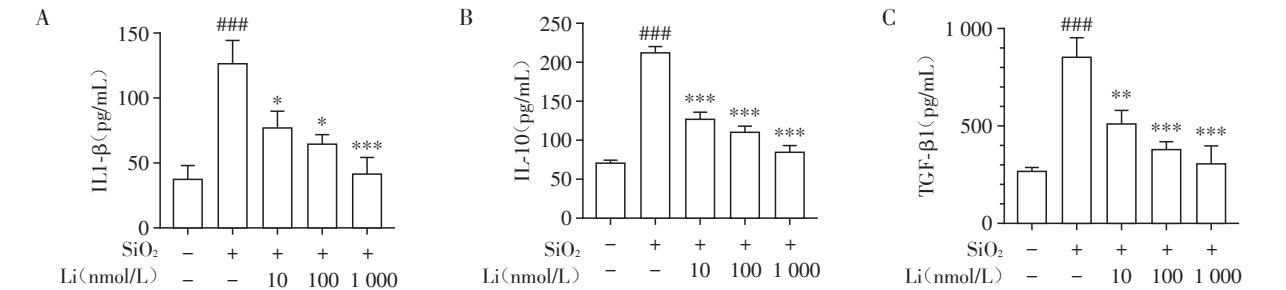
A: The expression levels of NLRP3 and Caspase-1 p20 were determined by Western blotting. B, C: Quantitative analysis of the expression levels of NLRP3(B) and Caspase-1 p20(C). Compared with the control group, $^{###}P < 0.001$; compared with the SiO₂ group, $^{*}P < 0.05$ ($n=3$).

图3 Li对SiO₂诱导巨噬细胞中NLRP3活化的影响

Figure 3 Effects of Li on the activation of NLRP3 inflammasome in macrophages induced by SiO₂

SiO₂组TGF- β 1水平为(854.60 \pm 98.00)pg/mL,较Control组(268.40 \pm 19.29)pg/mL明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.001$); SiO₂+Li(10 nmol/L)组、SiO₂+Li(100 nmol/L)组及SiO₂+Li(1 000 nmol/L)组TGF- β 1水平(分别为511.20 \pm 66.53、386.70 \pm 32.30、308.00 \pm 89.20 pg/mL,较SiO₂组明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.001$,图4C)。

以上结果提示Li(10、100、1000 nmol/L)可浓度依赖性抑制SiO₂诱导的细胞上清中IL-1 β 、IL-10及TGF- β 1分泌。



The levels of IL-1 β (A), IL-10(B) and TGF- β 1(C) in the cell supernatant were quantified by using ELISA. Compared with the control group, $^{###}P < 0.001$; compared with the SiO₂ group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$ ($n=4$).

图4 Li对SiO₂诱导巨噬细胞中IL-1 β 、IL-10及TGF- β 1分泌的影响

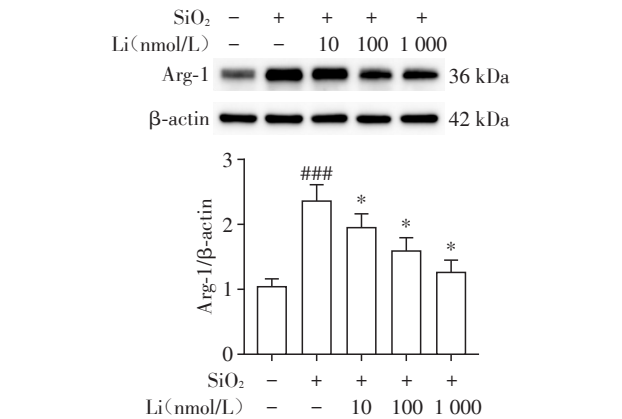
Figure 4 Effects of liraglutide on the secretion of IL-1 β , IL-10 and TGF- β 1 in macrophages induced by SiO₂

2.5 Li对巨噬细胞Arg-1表达的影响

与Control组相比, SiO₂组细胞中Arg-1蛋白表达水平显著升高($P < 0.001$)。与SiO₂组相比, SiO₂+Li(10 nmol/L)组、SiO₂+Li(100 nmol/L)组及SiO₂+Li(1 000 nmol/L)组Arg-1表达水平降低,差异有统计学意义(P 均 < 0.05 ,图5)。以上结果提示Li(10、100、1 000 nmol/L)可浓度依赖性抑制SiO₂诱导的Arg-1蛋白表达。

2.6 Li对巨噬细胞线粒体膜电位的影响

与Control组相比,在SiO₂处理的巨噬细胞中, JC-1红色荧光强度明显减弱,绿色荧光强度增强,提示线粒体膜电位下降。与SiO₂组相比, SiO₂+Li(10 nmol/L)组、SiO₂+Li(100 nmol/L)组及SiO₂+Li(1 000 nmol/L)线粒体内红色荧光逐渐增强、绿色荧光逐渐降低,提示Li(10、100、1 000 nmol/L)



Western blot was used to detect the expression of Arg-1. Compared with the control group, $^{###}P < 0.001$; compared with the SiO₂ group, $^{*}P < 0.05$ ($n=4$).

图5 Li对SiO₂诱导巨噬细胞极化的影响

Figure 5 Effects of liraglutide on the polarization in macrophages induced by SiO₂

可浓度依赖性保护 SiO₂ 诱导的线粒体膜电位下降 (图6)。

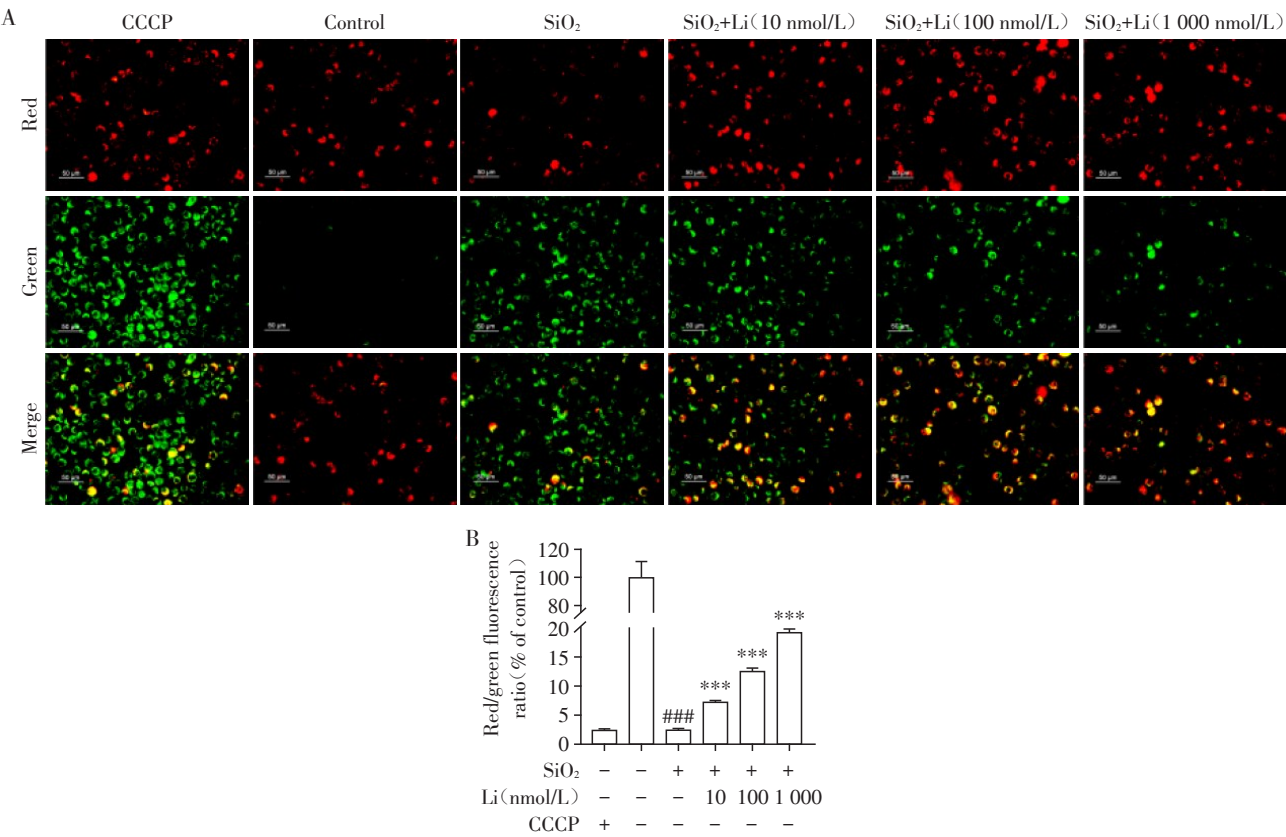
2.7 Li对巨噬细胞ROS水平的影响

与 Control 组相比, SiO₂ 组 ROS 相对荧光强度增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 SiO₂ 组相比, SiO₂+Li (10 nmol/L) 组、SiO₂+Li (100 nmol/L) 组及 SiO₂+Li (1 000 nmol/L) 组 ROS 相对荧光强度逐渐下降, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.05 , 图7)。以上结果提示 Li (10、100、1 000 nmol/L) 可浓度依赖性减少 SiO₂ 诱导的 ROS 生成。

3 讨 论

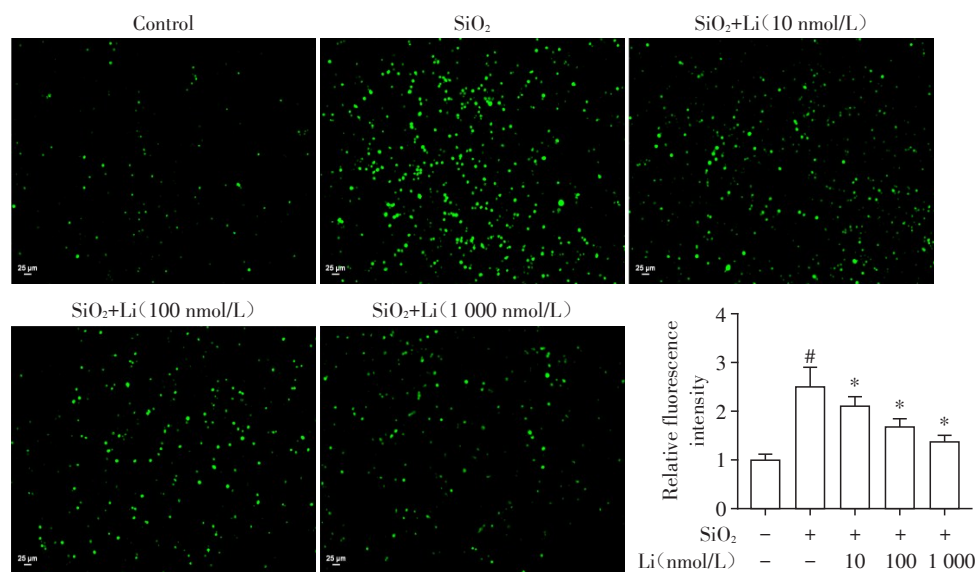
间质性肺病是以弥漫性肺实质、肺泡炎和间质纤维化为病理特征, 以渐进性劳力性呼吸困难为临床主要症状的一类疾病的总称, 最终可发展成蜂窝肺及呼吸衰竭, 严重影响患者生活质量^[13-14]。间质

性肺病预后差, 特别是 IPF 缺乏有效治疗手段。近年来随着恶性肿瘤发病率逐年增高, 抗肿瘤的化疗药物如博来霉素等可引起间质性肺病, 程序性死亡受体-1 (programmed cell death protein 1, PD-1)、细胞程序性死亡-配体 1 (programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1) 临床的广泛应用也是导致间质性肺病的重要原因之一, 已逐渐引起广泛关注和重视。目前间质性肺病、肺间质纤维化机制尚不完全明了。AM 是肺组织的重要免疫细胞之一, 参与肺部免疫应答、宿主防御和损伤后修复。当吸入有害颗粒、病原体或发生变态反应时, AM 等免疫细胞在局部聚集, 释放各种炎症因子和生长因子, 引起局部炎症, 导致间质性肺炎, 最终发展为肺间质纤维化^[15]。因此, 巨噬细胞在间质性肺病、肺间质纤维化发生发展过程中可能发挥了重要作用。朱佳丽等^[12]研究发现, 口服灌胃 Li 可减轻大鼠模型的肺间质纤维



The JC-1 fluorescent probe was utilized to evaluate the mitochondrial membrane potential. A: Following CCCP treatment, a decrease in mitochondrial membrane potential was indicated by a reduction in red fluorescence intensity and an increase in green fluorescence within the mitochondria. Compared to the control group, there was a decline in red fluorescence intensity and an elevation in green fluorescence within the mitochondria of the SiO₂ group, suggesting a decline in mitochondrial membrane potential. In comparison with the SiO₂ group, there was a progressive augmentation in red fluorescence within the mitochondria of the SiO₂+Li (10 nmol/L) group, SiO₂+Li (100 nmol/L) group, and SiO₂+Li (1 000 nmol/L) group, simultaneously accompanied by a gradual decrease in green fluorescence. B: Quantitative analysis of red/green fluorescence ratio. Compared with the control group, ^{###} $P < 0.001$; compared with the SiO₂ group, ^{***} $P < 0.001$ ($n=4$).

图6 Li对SiO₂诱导巨噬细胞线粒体膜电位的影响
Figure 6 Effects of liraglutide on mitochondrial membrane potential in macrophages induced by SiO₂



The DCFH-DA probe was utilized to evaluate the levels of ROS in each experimental group. In comparison to the control group, there was a significant increase in the relative fluorescence intensity of ROS in the SiO₂ group. Furthermore, a gradual decrease in the relative fluorescence intensity of ROS was observed in the SiO₂+Li(10 nmol/L), SiO₂+Li(100 nmol/L) and SiO₂+Li(1 000 nmol/L) groups when compared to the SiO₂ group. Compared with the control group, [#]*P* < 0.05; compared with the SiO₂ group, ^{*}*P* < 0.05(*n*=5).

图7 Li对SiO₂诱导巨噬细胞ROS水平的影响
Figure 7 Effects of liraglutide on ROS levels in macrophages induced by SiO₂

化,但巨噬细胞在其中作用及其机制尚不完全明了。巨噬细胞在矽肺相关的间质性肺病发病机制中发挥重要作用,本研究建立了SiO₂诱导的巨噬细胞极化模型,从炎症反应、氧化应激、线粒体功能,探讨了Li对SiO₂诱导巨噬细胞极化的细胞及分子生物学机制。

THP-1细胞是急性单核细胞白血病细胞系,经PMA诱导贴壁后可具有“巨噬细胞样功能”,被广泛用于构建炎症相关疾病的细胞模型。本研究在体外应用PMA诱导的THP-1巨噬细胞,从细胞和分子水平进一步探究Li对巨噬细胞极化的作用及机制。SiO₂与巨噬细胞共培养24 h, M2型巨噬细胞标志蛋白Arg-1表达增加,上清液中M2型巨噬细胞炎症因子IL-10、TGF-β1浓度增高,提示SiO₂可诱导巨噬细胞向M2型极化。

Jiao等^[15]研究发现,巨噬细胞吞噬SiO₂后,释放相关炎症因子、生长因子,导致肺泡上皮细胞(alveolar epithelial cell, AEC)损伤,炎症因子释放进一步增加,上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)。NLRP3炎症小体在炎症因子的成熟、释放中发挥重要作用,并介导免疫应答。炎症小体包括4种类型,其中NLRP3在炎症反应中的作用最引人关注。NLRP3主要由感受器NLRP3蛋白、适配器凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis associated speck like

protein containing a CARD, ASC)以及效应器Caspase-1 3部分组成。巨噬细胞吞噬SiO₂,诱导NLRP3组装活化, pro-Caspase-1剪切为活化的Caspase-1 p10和Caspase-1 p20,加速IL-1β成熟及分泌,导致炎症瀑布^[16]。本研究结果显示, SiO₂与巨噬细胞共培养,可上调NLRP3蛋白组分及Caspase-1 p20表达,增加细胞培养上清中炎症因子IL-1β分泌,提示SiO₂可促进NLRP3炎症小体活化。

NLRP3炎症小体活化在M1型巨噬细胞极化中被广泛研究,也有研究提示, NLRP3炎症小体参与M2型巨噬细胞活化。Liu等^[17]发现泛素特异性蛋白酶19可通过抑制NLRP3炎症小体活化,减少M2型巨噬细胞极化。Krishnan等^[18]发现NLRP3炎症小体抑制剂MCC 950可减少小鼠肾组织中M2型巨噬细胞数量。本研究也发现,在SiO₂诱导的巨噬细胞中, NLRP3活化同样伴随着M2型巨噬细胞极化,提示NLRP3炎症小体可能参与M2型巨噬细胞极化,但其具体分子机制尚需进一步研究。

TGF-β1主要来源于M2型巨噬细胞,是强有力的促进成纤维细胞活化、驱动纤维化发生的重要细胞因子。本研究发现, SiO₂刺激后可诱导巨噬细胞向M2型极化,并分泌大量TGF-β1。研究表明, SiO₂可通过激活NLRP3炎症小体,促进巨噬细胞分泌大量的促炎因子IL-1β^[19]。而IL-1β可通过激活巨噬细

胞表面IL-1受体促进TGF- β 1表达,增强TGF- β 1介导的促纤维化作用^[20]。

乙酰半胱氨酸为还原型谷胱甘肽的前体物质,能够清除自由基,增加抗氧化能力,调节氧化-抗氧化失衡,可用于肺间质纤维化的治疗。氧化应激在肺间质纤维化的发生发展中可能发挥了重要作用。ROS是细胞有氧代谢过程中产生的中间产物,可与不饱和脂肪酸形成脂质活性氧,破坏细胞内膜结构,造成细胞损伤。线粒体作为氧化磷酸化的关键场所,可能参与了ROS的产生和代谢。线粒体内膜两侧的质子或其他离子浓度不对称时,产生线粒体膜电位。膜电位正常是维持线粒体稳态、强化氧化磷酸化的条件,有利于维持细胞的正常生理功能。线粒体功能障碍引起的氧化应激增强可促进ROS大量生成^[21-22],进而激活NLRP3,促进IL-1 β 、IL-18的成熟与分泌,导致一系列瀑布样炎症反应^[23-25]。肺组织慢性炎症诱导肺成纤维细胞活化,并合成和分泌大量细胞外基质,导致肺组织结构破坏和肺间质纤维化形成。本研究显示,SiO₂与巨噬细胞共培养24 h后,巨噬细胞线粒体膜电位下降、ROS水平增高,NLRP3炎症小体活化,提示线粒体作为能量代谢的重要细胞器,偶联了能量代谢与NLRP3介导的巨噬细胞炎症反应过程。

近年来研究发现,Li是能量代谢的重要调节剂,不仅可调节糖脂代谢,还具有抗炎、抗氧化应激及减轻肾、心、肝等器官纤维化的作用^[8-11]。例如在肾纤维化中,Li可通过抑制下游信号分子Smad3的活化,减弱TGF- β 1/Smad3信号转导,抑制EMT,减少细胞外基质的分泌和沉积,最终阻止肾纤维化的发展^[11]。在心肌纤维化中,Li可通过抑制局部肾素-血管紧张素系统活性,下调TGF- β 1表达,抑制其下游致纤维化因子Col-IV的生成,发挥抗纤维化作用^[9]。本课题组研究发现,Li可抑制肺动脉高压大鼠肺动脉周围CD68⁺巨噬细胞和甲苯胺蓝染色阳性的肥大细胞聚集,可通过抑制TGF- β 1和IL-1 β 诱导Smad/非Smad信号通路激活,抑制肺动脉内皮细胞间质转化,保护肺血管内皮细胞,发挥治疗PAH作用^[26]。此外,Li可通过下调TGF- β 1表达减轻博来霉素诱导的大鼠肺部炎症反应及胶原合成,从而改善肺纤维化^[12]。本研究进一步发现,Li可缓解SiO₂诱导的培养巨噬细胞线粒体膜电位的下降,改善线粒体功能,减少ROS氧化应激,减弱NLRP3相关炎症反应,抑制M2型巨噬细胞极化,这可能是Li发挥抗炎和抗纤维化作用的潜在细胞和分子生物学机制。

综上所述,本研究从线粒体功能、氧化应激、炎症反应等过程,探讨了Li对SiO₂诱导的培养巨噬细胞向M2极化的抑制作用及其机制。发现Li可抑制SiO₂诱导的巨噬细胞线粒体功能障碍,降低ROS水平,抑制NLRP3炎症小体活化,抑制体外培养的巨噬细胞向M2极化,下调炎症因子TGF- β 1、IL-10表达,提示Li可通过抑制SiO₂诱导的M2型巨噬细胞极化,调节相关疾病的病理生理过程。

[参考文献]

- [1] SPAGNOLO P, KROPSKI J A, JONES M G, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: disease mechanisms and drug development[J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 222: 107798
- [2] WANG J, ZHANG X X, LONG M, et al. Macrophage-derived GPNMB trapped by fibrotic extracellular matrix promotes pulmonary fibrosis[J]. *Commun Biol*, 2023, 6(1): 136
- [3] LI Q F, CHENG Y, ZHANG Z, et al. Inhibition of ROCK ameliorates pulmonary fibrosis by suppressing M2 macrophage polarisation through phosphorylation of STAT3[J]. *Clin Transl Med*, 2022, 12(10): e1036
- [4] DENG L L, OUYANG B S, SHI H L, et al. Icariside II attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by modulating macrophage polarization [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 317: 116810
- [5] PAIK S, KIM J K, SILWAL P, et al. An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(5): 1141-1160
- [6] SONG M Y, WANG J X, SUN Y L, et al. Inhibition of gasdermin D - dependent pyroptosis attenuates the progression of silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(3): 1213-1224
- [7] LI X, YAN X P, WANG Y L, et al. NLRP3 inflammasome inhibition attenuates silica-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 362(2): 489-497
- [8] TAN Y J, ZHEN Q, DING X Y, et al. Association between use of liraglutide and liver fibrosis in patients with type 2 diabetes[J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 935180
- [9] CHEN P, YANG F, WANG W Y, et al. Liraglutide attenuates myocardial fibrosis via inhibition of AT1R-mediated ROS production in hypertensive mice [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2021, 26(2): 179-188
- [10] SUN W, MI H, HE D Y, et al. Liraglutide suppresses myocardial fibrosis progression by inhibiting the smad signaling pathway[J]. *Curr Med Sci*, 2023, 43(5): 955-960
- [11] OUGAARD M E, SEMBACH F E, JENSEN H E, et al. Liraglutide improves the kidney function in a murine model

- of chronic kidney disease[J]. *Nephron*, 2020, 144(11): 595-606
- [12] 朱家丽,徐 健,韩宏浩,等. 利拉鲁肽对博来霉素诱导大鼠肺纤维化的作用及其机制研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(2): 166-173
- [13] BRUNI C, CAMPOCHIARO C, DE VRIES-BOUWSTRA J K. Interstitial lung disease: how should therapeutics be implemented? [J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2023, 49(2): 279-293
- [14] MCCARTHY C, KEANE M P. Contemporary concise review 2021: interstitial lung disease [J]. *Respirology*, 2022, 27(7): 539-548
- [15] JIAO B Y, ZHANG Q Y, JIN C M, et al. IRF4 participates in pulmonary fibrosis induced by silica particles through regulating macrophage polarization and fibroblast activation[J]. *Inflammation*, 2024, 47(1): 45-59
- [16] ZHOU H, ZHANG Q, LIU C Y, et al. NLRP3 inflammasome mediates abnormal epithelial regeneration and distal lung remodeling in silica-induced lung fibrosis[J]. *Int J Mol Med*, 2024, 53(3): 25
- [17] LIU T, WANG L Q, LIANG P P, et al. USP19 suppresses inflammation and promotes M2-like macrophage polarization by manipulating NLRP3 function via autophagy [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(10): 2431-2442
- [18] KRISHNAN S M, LING Y H, HUUSKES B M, et al. Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome reduces blood pressure, renal damage, and dysfunction in salt-sensitive hypertension[J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115(4): 776-787
- [19] LAM M, MANSELL A, TATE M D. Another one fights the dust: targeting the NLRP3 inflammasome for the treatment of silicosis[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2022, 66(6): 601-611
- [20] GAIROLA S, SINHA A, KAUNDAL R K. Linking NLRP3 inflammasome and pulmonary fibrosis: mechanistic insights and promising therapeutic avenues [J]. *Inflammopharmacology*, 2024, 32(1): 287-305
- [21] YAO J J, LI Y X, MENG F, et al. Enhancement of suppression oxidative stress and inflammation of quercetin by nano-decoration for ameliorating silica-induced pulmonary fibrosis [J]. *Environ Toxicol*, 2023, 38(7): 1494-1508
- [22] LIU S, CHEN D Q, LI X, et al. Fullerene nanoparticles: a promising candidate for the alleviation of silicosis-associated pulmonary inflammation [J]. *Nanoscale*, 2020, 12(33): 17470-17479
- [23] XU Z M, SHEN J M, LIN L H, et al. Exposure to irregular microplastic shed from baby bottles activates the ROS/NLRP3/Caspase-1 signaling pathway, causing intestinal inflammation[J]. *Environ Int*, 2023, 181: 108296
- [24] XIAN H X, LIU Y, RUNDBERG NILSSON A, et al. Metformin inhibition of mitochondrial ATP and DNA synthesis abrogates NLRP3 inflammasome activation and pulmonary inflammation [J]. *Immunity*, 2021, 54(7): 1463-1477
- [25] ZHONG Z Y, LIANG S, SANCHEZ-LOPEZ E, et al. New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation[J]. *Nature*, 2018, 560(7717): 198-203
- [26] WANG J J, YU M, XU J, et al. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) mediates the protective effects of dipeptidyl peptidase IV inhibition on pulmonary hypertension [J]. *J Biomed Sci*, 2019, 26(1): 6
- [收稿日期] 2024-05-27
(本文编辑:戴王娟)