

黄芪甲苷联合槲皮素抑制二氧化硅诱导的巨噬细胞焦亡活化的机制

朱文文^{1,2}, 杜忠君², 马英华², 赵宁霞³, 孙世超², 邵华²

1. 山东中医药大学中医学院, 山东 济南 250355;

2. 山东第一医科大学(山东省医学科学院), 山东省职业卫生与职业病防治研究院毒理学研究中心, 山东 济南 250062;

3. 康复大学青岛中心医院(青岛市中心医疗集团)重症医学科

摘要:目的 探究黄芪甲苷(astragaloside IV, ASV)联合槲皮素(querletin, QUE)抑制二氧化硅(silicon dioxide, SiO₂)诱导的巨噬细胞焦亡活化的分子机制。方法 建立大鼠肺泡巨噬细胞(NR8383)和大鼠成纤维细胞(RFL-6)体外共培养体系,实验分为6组,对照组、药物组、SiO₂组、SiO₂+药物组、SiO₂+Belnacasan(Bel)组、SiO₂+药物+Bel组,干预24h后,收集细胞和上清液,采用ELISA法检测上清液中转化生长因子β1(transforming growth factor β1, TGF-β1)、肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor alpha, TNF-α)、高迁移率族蛋白B1(high mobility group box-1, HMGB1)的水平,Western blot法检测RFL-6细胞中α-SMA、Vimentin、E-Cadherin(E-cad)蛋白含量,PT-PCR及Western blot法分别检测NR8383细胞中的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1(Caspase-1)、白介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)和IL-18的mRNA及蛋白表达水平。结果 与对照相比, SiO₂组上清液中TGF-β1、TNF-α、HMGB1水平明显升高(P<0.05), RFL-6细胞中α-SMA、Vimentin蛋白含量升高, E-cad蛋白含量降低, NR8383细胞中(Cleaved-)Caspase-1、IL-1β、IL-18 mRNA及蛋白表达水平均升高(P<0.05);与SiO₂组相比, SiO₂+药物组、SiO₂+Bel组和SiO₂+药物+Bel组上清液中TGF-β1、TNF-α、HMGB1水平明显降低(P<0.05), RFL-6细胞中α-SMA、Vimentin蛋白含量降低, E-cad蛋白含量升高, NR8383细胞中(Cleaved-)Caspase-1、IL-1β、IL-18 mRNA及蛋白表达水平均降低(P<0.05)。结论 ASV联合QUE可能通过抑制共培养体系中暴露于SiO₂的巨噬细胞的焦亡水平来降低炎症因子的分泌,进而抑制成纤维细胞的纤维化水平。

关键词:细胞焦亡;黄芪甲苷;槲皮素;矽肺;巨噬细胞

中图分类号:R329.2;R135.2 文献标志码:A 文章编号:1003-8507(2025)07-1202-08

DOI: 10.20043/j.cnki.MPM.202412036

Mechanism of astragal side IV combined with quercetin in inhibiting silica-induced macrophage proptosis activation

ZHU Wen-wen*, DU Zhong-jun, MA Ying-hua, ZHAO Ning-xia, SUN Shi-chao, SHAO Hua

*School of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250355, China

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanism by which Astragal side IV (ASV) combined with Quercetin (QUE) inhibits silica (SiO₂)-induced macrophage proptosis activation. **Methods** An in vitro co-culture system was established using rat alveolar macrophages (NR8383) and rat fibroblasts (RFL-6). The experiment was divided into six groups: control group, drug group, SiO₂ group, SiO₂ + drug group, SiO₂ + Balmacaan (Bel) group, and SiO₂ + drug + Bel group. After 24 hours of intervention, cell and supernatant samples were collected. The levels of transforming growth factor β1 (TGF-β1), tumor necrosis factor alpha (TNF-α), and high mobility group box-1 (HMGB1) in the supernatant were measured using ELISA. The protein levels of α-SMA, Vimentin, and E-Cadherin (E-cad) in RFL-6 cells were detected using Western blot. The mRNA and protein expression levels of Caspase-1, interleukin-1β (IL-1β), and IL-18 in NR8383 cells were assessed using PCR and Western blot, respectively. **Results** Compared to the control group, the levels of TGF-β1, TNF-α, and HMGB1 in the supernatant of the SiO₂ group were significantly increased (P<0.05), the protein levels of α-SMA and Vimentin in RFL-6 cells were elevated, while E-cad protein levels were reduced. The expression levels of (Cleaved-)Caspase-1, IL-1β, and IL-18 mRNA and protein in NR8383 cells were also significantly increased (P<0.05). Compared to the SiO₂ group, the levels of TGF-β1, TNF-α, and HMGB1 in the supernatants of the SiO₂ + drug group, SiO₂ + Bel group, and SiO₂ + drug + Bel group were significantly decreased (P<0.05). The protein levels of α-SMA and Vimentin in RFL-6

基金项目:国家重点研发计划(2022YFC2503202);山东省中医药科技项目(M-2023238)

作者简介:朱文文(1987—),女,博士在读,主管技师,研究方向:肺部纤维化及中西医结合治疗研究

通信作者:邵华, E-mail: chinashaohua5888@163.com

cells were reduced, and E-cad protein levels were elevated. The expression levels of (Cleaved-)Caspase-1, IL-1 β , and IL-18 mRNA and protein in NR8383 cells were also significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** ASV combined with QUE may reduce the secretion of inflammatory factors by inhibiting the proptosis levels of macrophages exposed to SiO₂ in the co-culture system, thereby suppressing the fibrosis levels in fibroblasts.

Keywords: Cell proptosis; Astragal side IV; Quercetin; Silicosis; Fibrosis; Macrophages

矽肺是一种由于长期暴露于游离二氧化硅粉尘引起的、以肺部炎症和不可逆的弥漫性结节性纤维化为特征的肺部疾病^[1]。目前,矽肺的发病机制仍不明确,其中涉及多种促炎及促纤维化因子,以及这些因子介导的多细胞相互作用。肺泡巨噬细胞 (alveolar macrophages, AMs)是肺组织中固有的免疫细胞,是维持内环境稳态的重要防线,也是局部炎症和纤维化病变的重要参与者^[2]。研究表明肺泡内堆积的二氧化硅颗粒反复刺激 AMs, AMs 活化后可以使促炎和促纤维化因子如 IL-1 β , TNF- α 和 TGF- β 1 等表达升高,成纤维细胞受到作用后产生胶原蛋白,导致肺纤维化^[3-4]。

细胞焦亡是一种不同于凋亡的、有炎症反应相伴的特殊的细胞程序性死亡方式,经典途径主要由 Caspase-1 介导,激活的 Caspase-1 使 IL-1 β 和 IL-18 前体剪切为成熟的 IL-1 β 和 IL-18, 释放到胞外发挥炎症作用^[5]。研究表明,矽肺小鼠肺组织中 Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 均有明显升高的现象,抑制 Caspase-1 活性可以减轻矽肺小鼠肺部炎症和纤维化水平^[4,6]。黄芪甲苷 (astragaloside IV, ASV) 和槲皮素 (quercetin, QUE) 均是黄芪的重要活性单体成分,槲皮素也广泛存在于其他植物中,研究表明黄芪及其单体 ASV 和 QUE 在一定剂量下均具有减轻矽肺模型动物肺损伤和纤维化的作用^[7-9]。但 ASV 联合 QUE 是否会有更好的抗炎及抗纤维化作用,其中机制如何,均尚不清楚。故本研究模拟矽肺的发病过程,根据以往的研究^[10]建立大鼠肺泡巨噬细胞 (rat alveolar macrophages, NR8383) 和大鼠成纤维细胞 (rat fibroblasts-6, RFL-6) 的体外共培养细胞体系,观察 ASV 联合 QUE 对共培养体系中 NR8383 细胞分泌的炎症因子及 RFL-6 细胞中纤维化相关蛋白水平的影响,并探讨联合药物对 NR8383 细胞焦亡水平的影响,为临床应用黄芪甲苷联合槲皮素治疗矽肺提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂 全波段酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); 细胞 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Stepone plus 型实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR) 仪 (美国 ABI 公

司); 双垂直电泳仪 (北京六一仪器厂); Alpha 图像分析软件、灰度分析软件 (美国 Alpha Innotech 公司)。游离二氧化硅 (美国 Sigma-Aloric, 纯度为 99.00%, 80.00% 粒径为 1 ~ 5 μ m); 黄芪甲苷 (成都德斯特生物科技有限公司); 槲皮素 (美国 Sigma-Aloric); Belnacasan (VX-765, 美国 Sigma 公司); F12K 培养基 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (上海达特希尔生物科技有限公司); 青霉素 / 链霉素溶液、Tryple Express (美国 Gibco 公司); 第一链 cDNA 合成试剂盒、实时荧光定量染料 SYBR-Green (Thermo 公司); 二辛宁可酸 (Bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒 (加拿大 Millipore 公司); 电化学发光试剂盒 (美国 Pierce 公司); 大鼠 TNF- α 、TGF- β 1 酶联免疫吸附实验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (杭州联科生物技术科技有限公司); 大鼠 HMGB1 ELISA 试剂盒、Cleaved-Caspase-1、IL-18、IL-1 β 抗体 (英国 abcam); Vimentin、E-Cad、 α -SMA、肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (武汉三鹰); 辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase, HRP) 标记的二抗 (南京生兴生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 共培养体系的建立 NR8383 和 RFL-6 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。配制 NR8383 和 RFL-6 细胞悬液, Transwell 培养基下室每孔接种 RFL-6 细胞 25×10^4 个, 上室接种 NR8383 细胞 5×10^4 个, 于含 20% 胎牛血清和 1% 青霉素 - 链霉素的 F12K 完全培养基中共培养。

1.2.2 药物浓度的筛选 首先通过 CCK8 实验, 以 1×10^4 个 / ml 浓度分别接种 NR8383 细胞和 RFL-6 细胞于 96 孔板上, 每组设 6 个复孔, 检测不同 ASV+QUE 联合药物浓度 (10、20、40 和 80 μ mol/L) 分别对两种细胞存活力的影响, 筛选出联合药物浓度范围; 然后通过共培养体系, 设置对照组、SiO₂ 组及不同联合药物浓度组, 每组设 3 个复孔, 共培养 24h 后, 通过观察不同药物浓度对 RFL-6 细胞 α -SMA、Vimentin、E-cad 蛋白水平的影响确定最终药物干预浓度。

1.2.3 分组及干预 实验分 6 组: 对照组、药物组、SiO₂ 组、SiO₂+ 药物组、SiO₂+Bel 组、SiO₂+ 药物 +Bel 组, NR8383 和 RFL-6 细胞共培养 24 h 后, 进行药物干预。对照组不做任何干预; 药物组共培养体系中仅

给予 ASV 及 QUE 终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的混合药液; 其余 4 组 NR8383 细胞(Transwell 上室)均给予终浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 的 SiO_2 混悬液, SiO_2 + 药物组共培养体系同时给予 ASV 及 QUE 终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的混合药液, SiO_2 +Bel 组同时给予终浓度为 100nM 的焦亡抑制剂 Belnacasan, SiO_2 + 药物 +Bel 组同时给予 ASV 及 QUE 终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的混合药液及终浓度为 100nM 的 Belnacasan。每组设 3 个复孔, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5.0% CO_2 培养箱中培养 24h 后, 收集上清及细胞, 保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱以备后续实验。

1.2.4 ELISA 法检测细胞上清中 TGF- β 1、TNF- α 和 HMGB1 含量 采用 TGF- β 1、TNF- α 和 HMGB-1 ELISA 试剂盒检测细胞上清中 TGF- β 1、TNF- α 和 HMGB-1 的水平。根据说明书做好样本前处理及标准品的倍比稀释。显色后于 450 nm 主波长及 570 nm 参考波长下测各孔吸光度。根据标准系列吸光度值及浓度值绘制标准曲线, 然后根据标准曲线分别计算样本中 TGF- β 1、TNF- α 和 HMGB1 的浓度水平。

1.2.5 Western blot 法检测 RFL-6 细胞中 α -SMA、Vimentin、E-cad 蛋白含量 取收集好的 RFL-6 细胞, 加入适量体积的 RIPA(使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂)裂解细胞, 离心收集上清总蛋白, BCA 法测蛋白浓度。提取的蛋白经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 转移到硝酸纤维素膜; 将抗 α -SMA、Vimentin、E-cad 一抗稀释(1 : 1 000)后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 室温下与 HRP 标记的二抗(1 : 3 000)孵育 30 min, 洗涤 3 次。对膜进行增强化学发光处理, 并暴露于成像系统; 采用 AlphaEasefc 软件对结果进行定量分析, β -actin 为内参蛋白。

1.2.6 RT-PCR 法检测 NR8383 细胞中 Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 mRNA 表达量 TRIzol 试剂盒提取 NR8383 细胞总 RNA, 使用逆转录酶第一链 cDNA 合成试剂盒将其逆转录为 cDNA。用 Premier 6.0 设计 Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 引物, 引物序列见表 1。PCR 反应条件如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30s 预变性; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15s 变性, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30s 退火, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30s 延伸, 共 40 次循环; 熔解曲线: 65 $^{\circ}\text{C}$ \rightarrow 95 $^{\circ}\text{C}$, 每升温 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 采集一次荧光信号。以 GAPDH 为内参照, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算 mRNA 相对表达量。

1.2.7 Western blot 法检测 NR8383 细胞中 Cleaved-Caspase-1、IL-18 和 IL-1 β 蛋白含量 取收集好的 NR8383 细胞, 提取总蛋白并测定蛋白浓度。蛋白经电泳分离后转移到硝酸纤维素膜, 将抗 Cleaved-Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 一抗稀释(1 : 1 000)后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 室温下与

HRP 标记的二抗(1 : 3 000)孵育 30 min, 洗涤 3 次。对膜进行增强化学发光处理, 并暴露于成像系统。采用 AlphaEasefc 软件对结果进行定量分析, β -actin 为内参蛋白。

表 1 NR8383 细胞焦亡指标引物列表

Table 1 List of primers for pyroptosis indicators in NR8383 cells

基因	引物 (5'-3')	产物长度 (bp)
Caspase-1	F: TGCCTGGTCTTGTGACTTGGAG	132
	R: TGTCTGGGAAGAGGTAGAAACG	
IL-1 β	F: TGTGACTCCTGGGATGATGAC	160
	R: CCACTTGTGGCTTATGTTCTCTC	
IL-18	F: GGCTGCCATACCAGAAGAAGG	101
	R: ATTCCAAGTCTCCATTATCTTCAGG	
GAPDH	F: CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	R: GCTGGAAGAATGGGACTTGCT	

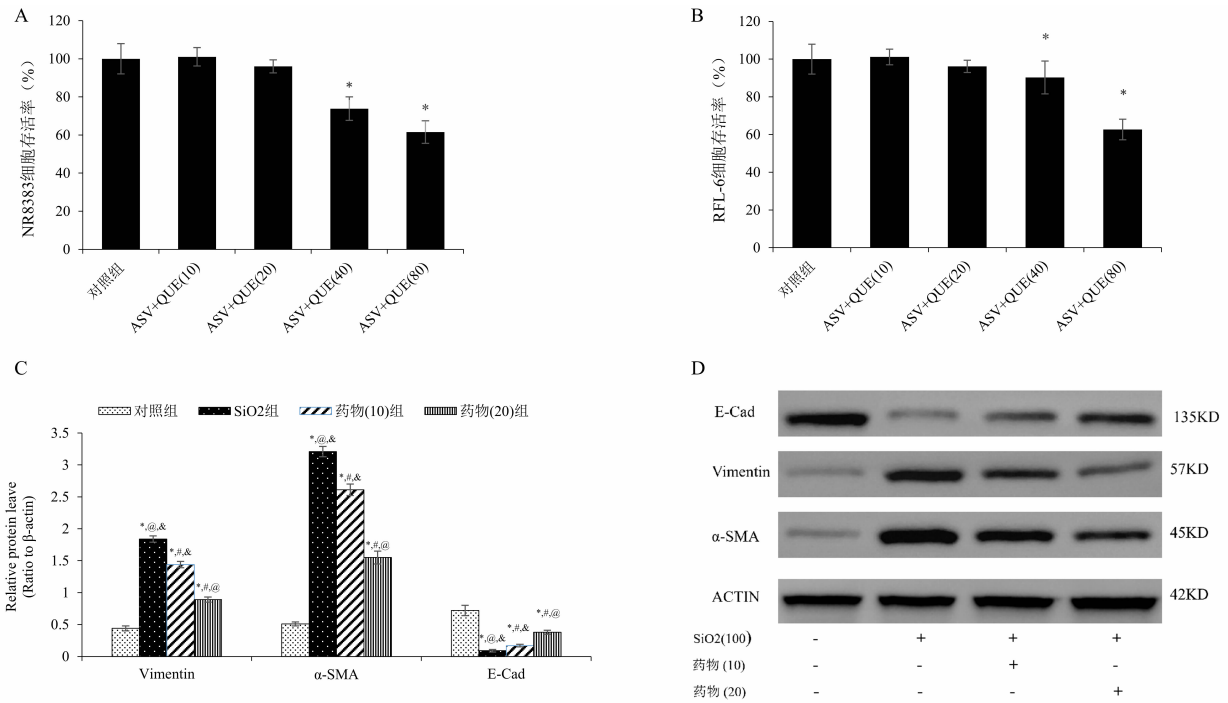
1.3 统计学分析 采用 SPSS 27.0 统计软件, 符合正态性的计量资料以(均数 \pm 标准差)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 ASV+QUE 联合药物剂量的确定 如图 1A、B 所示, 与对照组相比, 培养 24 h 后, 10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 联合药物浓度对 NR8383 细胞和 RFL-6 细胞的存活率均无显著影响($P>0.05$), 在 40 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 联合药物浓度下, NR8383 细胞和 RFL-6 细胞的存活率均降低($P<0.05$), 故进一步对 10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的联合药物作进一步筛选。如图 1C、D 所示, 与对照组相比, SiO_2 组 RFL-6 细胞中的 Vimentin 和 α -SMA 蛋白显著增高, E-Cad 水平显著降低 ($P<0.05$), 经 10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ ASV+QUE 联合药物分别干预后, 与 SiO_2 组相比, Vimentin 和 α -SMA 蛋白水平有明显的降低, E-Cad 水平明显升高 ($P<0.05$), 而且 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的联合药物要比 10 $\mu\text{mol/L}$ 的联合药物抗纤维化作用效果好($P<0.05$)。故后续共培养体系中, ASV+QUE 联合药物浓度选用 20 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 细胞上清中 TGF- β 1、TNF- α 、HMGB1 含量变化

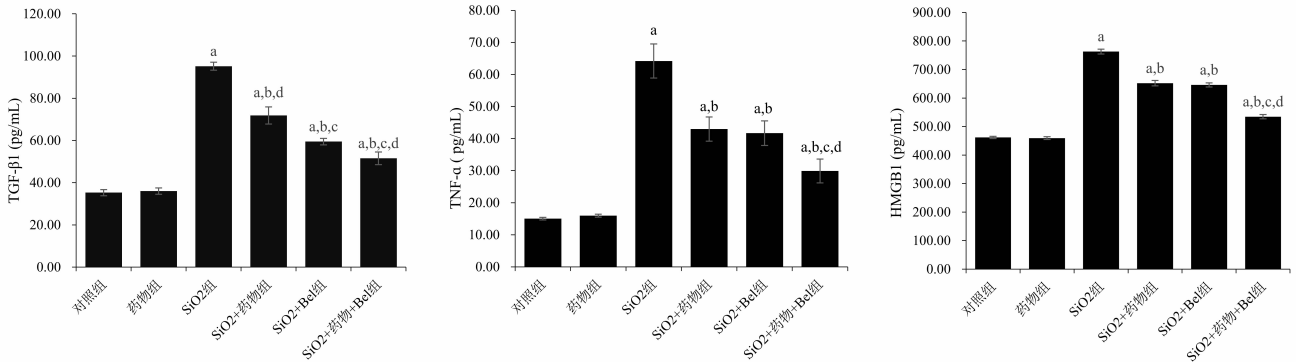
如图 2 所示, 与对照组相比, 药物组上清中 TGF- β 1、TNF- α 、HMGB1 的含量变化差别无统计学意义 ($P>0.05$), SiO_2 组上清中 TGF- β 1、TNF- α 、HMGB1 含量均显著升高($P<0.05$); 与 SiO_2 组相比, SiO_2 + 药物组及 SiO_2 +Bel 组上清中 TGF- β 1、TNF- α 、HMGB1 水平下降($P<0.05$); 与 SiO_2 +Bel 组和 SiO_2 + 药物组相比, SiO_2 + 药物 +Bel 组 TGF- β 1、TNF- α 、HMGB1 水平均降低($P<0.05$)。



注: * 与对照组相比, $P < 0.05$; # 与 SiO₂ 组相比, $P < 0.05$; @ 与药物(10)组相比, $P < 0.05$; & 与药物(20)组相比, $P < 0.05$ 。

图 1 ASV+QUE 联合药物剂量的确定

Figure 1 Determination of drug dose of ASV+QUE combination



注: a 与对照组相比, $P < 0.05$; b 与 SiO₂ 组相比, $P < 0.05$; c 与 SiO₂+ 药物组相比, $P < 0.05$; d 与 SiO₂+Bel 组相比, $P < 0.05$ 。

图 2 共培养体系上清中炎症因子的变化(n=3)

Figure 2 Changes of inflammatory factors in the supernatant of co-culture system (n=3)

2.3 RFL-6 细胞 α-SMA、Vimentin、E-cad 蛋白含量变化 如图 3 所示,与对照组相比,药物组 RFL-6 细胞纤维化相关蛋白 α-SMA、Vimentin、E-cad 含量变化差别无统计学意义($P > 0.05$),SiO₂ 组 RFL-6 细胞中 α-SMA 和 Vimentin 蛋白水平均显著升高,E-cad 蛋白水平显著降低($P < 0.05$);与 SiO₂ 组相比,SiO₂+ 药物组及 SiO₂+Bel 组均表现为 α-SMA 和 Vimentin 蛋白水平下降,E-cad 蛋白水平升高 ($P < 0.05$);与 SiO₂+ 药物组及 SiO₂+Bel 组相比,SiO₂+ 药物 +Bel 组 α-SMA 和 Vimentin 蛋白水平降低,E-cad 蛋白水平升高($P < 0.05$)。

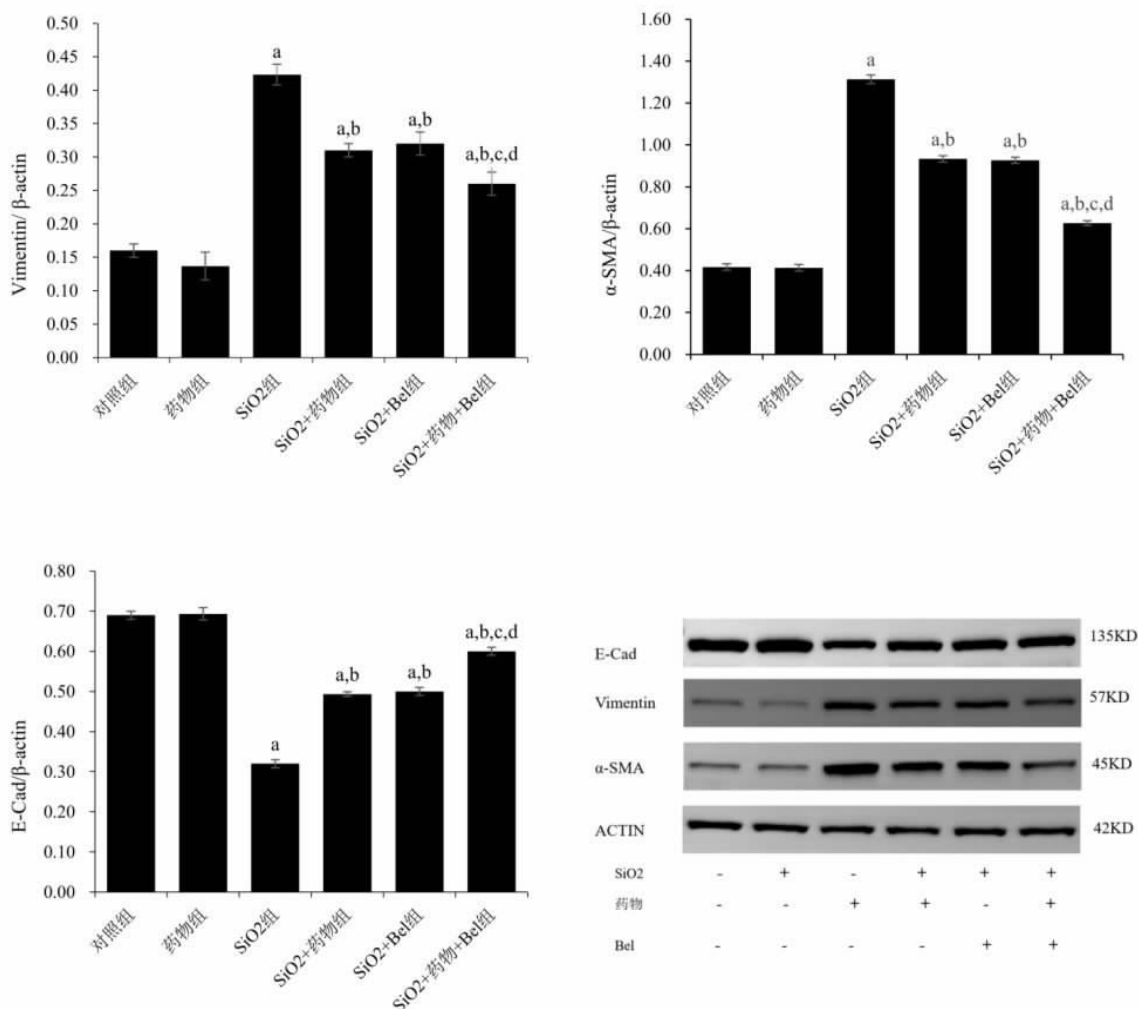
2.4 NR8383 细胞中 Caspase-1、IL-18 和 IL-1β mRNA 含量变化 图 4 显示,与对照组相比,药物组 NR8383 细胞中 Caspase-1、IL-18、IL-1β mRNA 水平

变化差异无统计学意义 ($P > 0.05$),SiO₂ 组 NR8383 细胞中 Caspase-1、IL-18、IL-1β mRNA 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与 SiO₂ 组相比,SiO₂+ 药物组及 SiO₂+Bel 组 NR8383 细胞中的 Caspase-1、IL-18、IL-1β mRNA 水平显著降低($P < 0.05$);与 SiO₂+ 药物组及 SiO₂+Bel 组相比,SiO₂+ 药物 +Bel 组的 Caspase-1、IL-18、IL-1β mRNA 水平降低($P < 0.05$)。

2.5 NR8383 细胞中 Cleaved-Caspase-1、IL-18 和 IL-1β 蛋白含量变化 图 5 显示,与对照组相比,药物组 NR8383 细胞中 Cleaved-Caspase-1、IL-18、IL-1β 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$),SiO₂ 组 Cleaved-Caspase-1、IL-18、IL-1β 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$);与 SiO₂ 组相比,SiO₂+ 药物组及 SiO₂+Bel 组 NR8383 细胞中的 Cleaved-Caspase-1、

IL-18、IL-1 β 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与 SiO₂+ 药物组及 SiO₂+Bel 组相比, SiO₂+ 药物 +Bel 组

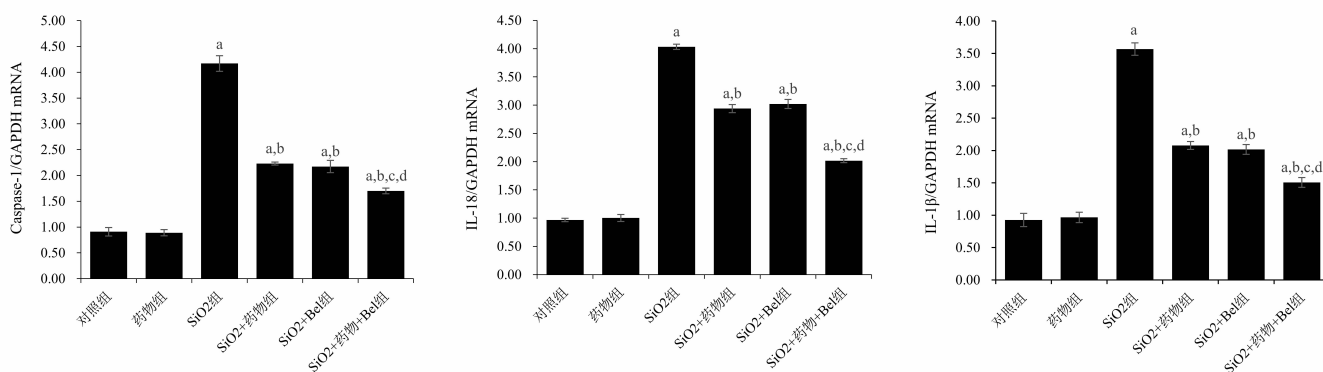
Cleaved-Caspase-1、IL-18、IL-1 β 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。



注: a 与对照组相比, $P < 0.05$; b 与 SiO₂ 组相比, $P < 0.05$; c 与 SiO₂+ 药物组相比, $P < 0.05$; d 与 SiO₂+Bel 组相比, $P < 0.05$ 。

图 3 共培养体系中 RFL-6 细胞 Vimentin、 α -SMA、E-cad 蛋白表达水平的变化 ($n=3$)

Figure 3 Changes of Vimentin, α -SMA and E-cad protein levels in RFL-6 cells in co-culture system ($n=3$)



注: a 与对照组相比, $P < 0.05$; b 与 SiO₂ 组相比, $P < 0.05$; c 与 SiO₂+ 药物组相比, $P < 0.05$; d 与 SiO₂+Bel 组相比, $P < 0.05$ 。

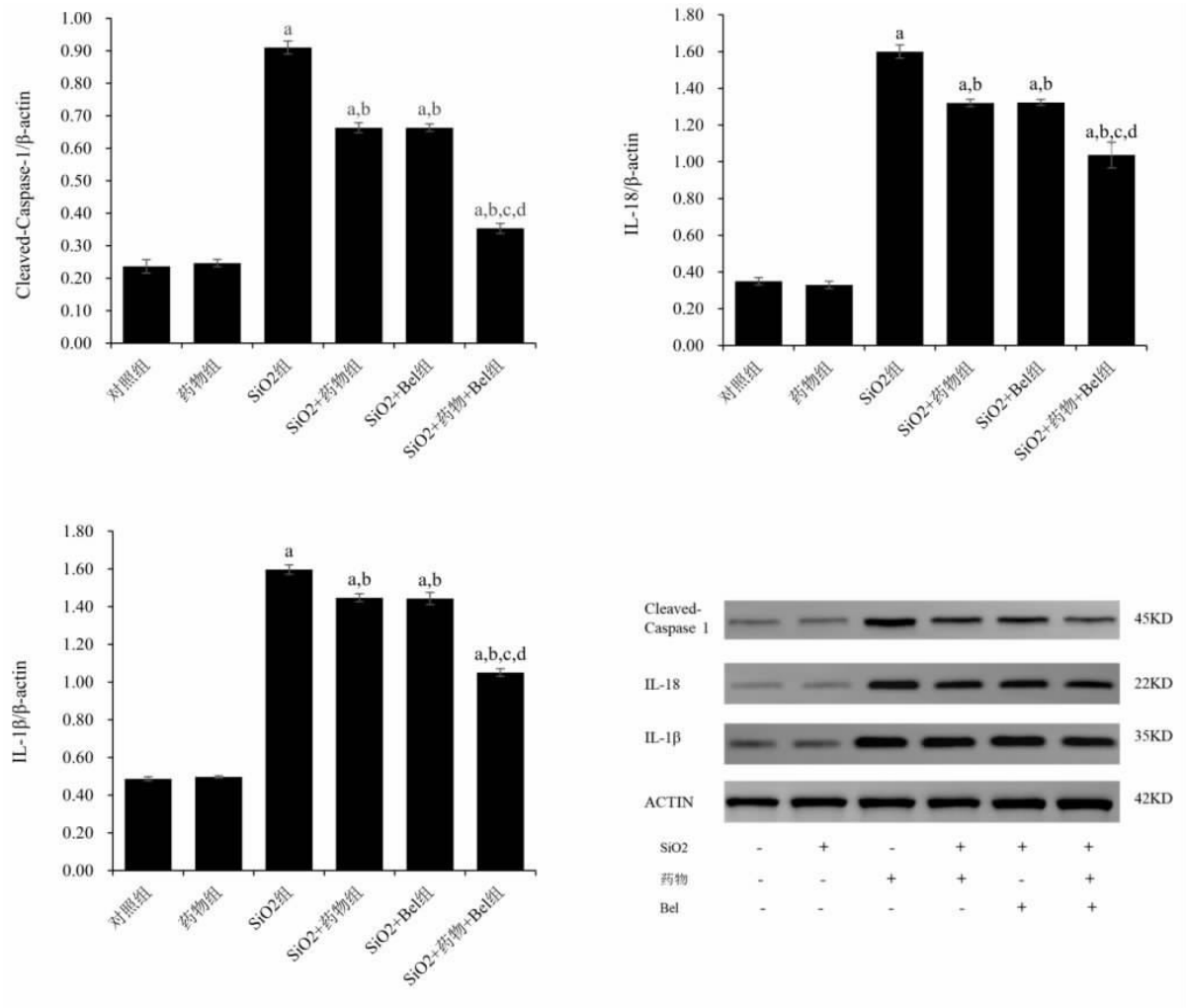
图 4 共培养体系中 NR8383 细胞中 Caspase-1、IL-18 和 IL-1 β mRNA 水平的变化 ($n=3$)

Figure 4 Changes of Caspase-1, IL-18 and IL-1 β mRNA levels in NR8383 cells in co-culture system ($n=3$)

3 讨论

矽肺作为最重要的职业病之一,其高发病率和高病死率给患者和社会带来了沉重的负担。目前矽肺

尚无有效的治疗方法,其发病机制复杂且尚不清楚^[1]。AMs 作为肺泡腔最丰富的固有免疫细胞,具有强大的吞噬功能,是抵御外来侵略的第一道防线^[2]。研究



注:a 与对照组相比, $P < 0.05$; b 与 SiO₂ 组相比, $P < 0.05$; c 与 SiO₂+ 药物组相比, $P < 0.05$; d 与 SiO₂+Bel 组相比, $P < 0.05$ 。

图 5 共培养体系中 NR8383 细胞中 Cleaved-Caspase-1、IL-18 和 IL-1β 蛋白表达水平的变化($n=3$)

Figure 5 Changes of Cleaved-Caspase-1, IL-18 and IL-1β protein levels in NR8383 cells in co-culture system ($n=3$)

表明, AMs 在肺纤维化的发展中起着多种作用, 包括炎症细胞的调节、受损组织的清除、肌成纤维细胞的募集和活化以及分泌多种细胞因子、生长因子、构建细胞的调控网络^[13]。当 SiO₂ 被吸入肺部后, AMs 识别 SiO₂ 颗粒上的类似病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 并与其自身表面上的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 结合, 触发促炎因子和促纤维化细胞因子的释放^[14]。成纤维细胞作为下游的效应细胞, 在 AMs 细胞释放的细胞因子作用下, 向肌成纤维细胞转化, 介导肺纤维化的发生^[15-16]。本研究选用 NR8383 和 RFL-6 细胞建立体外共培养体系, 探讨 ASV 联合 QUE 对共培养体系的作用, 及其中的细胞焦亡机制。本研究根据预实验及本实验室前期结果^[17], 选用 100 μg/ml 的 SiO₂ 混悬液干预共培养体系中 NR8383 细胞。结果显示, SiO₂ 干预的共培养体系上清液中, 炎症因子 TGF-β1、TNF-α、HMGB1 的水平显著升高; 而且 SiO₂ 干预的共培养体系中 RFL-6 细胞中的

α-SMA、Vimentin 蛋白水平明显升高, E-cad 蛋白水平显著降低。提示 SiO₂ 颗粒被 NR8383 细胞吞噬后, 刺激 NR8383 细胞分泌 TGF-β1、TNF-α、HMGB1 等细胞因子, 这些细胞因子进入共培养液中, 刺激 RFL-6 细胞, 使 α-SMA、Vimentin 蛋白表达增多, E-cad 蛋白表达减少。

ASV 是黄芪中的主要活性单体, 已被证明具有广泛的抗炎和抗纤维化作用^[18], ASV 不仅能改善糖尿病引起的心肌病大鼠的心肌炎症和纤维化^[19], 还能减轻 PM_{2.5} 引起的肺部炎症及纤维化^[20]。QUE 也是黄芪中的重要活性成分, 而且也广泛存在于其他植物当中。研究表明 QUE 具有持久的抗炎^[21]和广泛的抗纤维化作用^[22-23]; QUE 可通过抑制 TNF-α、TGF-β1、基质金属蛋白等衰老相关分泌表型的分泌, 减轻矽肺小鼠肺纤维化程度^[9]。有研究者通过对治疗新型冠状病毒肺炎的中药成分进行分析, 发现 ASV 和 QUE 是这些中药发挥抗纤维化和抗炎作用的重要成分^[24]。本研究通过参阅文献^[19,25-26]和实验确定了 ASV+QUE 的联

合用药浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$, 研究表明, 该浓度下 ASV 联合 QUE 可以明显降低共培养体系中 TNF- α 、TGF- β 1、HMGB1 的水平, 进而使 RFL-6 细胞中 α -SMA、Vimentin 蛋白表达下降, E-cad 蛋白表达升高。

近期, 随着对细胞焦亡的研究, 有研究者提出了“焦亡-炎症反应-纤维化”的轴样病理改变^[27]。当吸入性二氧化硅粉尘与 AMs 膜上的 PRRs 受体识别后, 激活胞内 caspase-1 活性, 使 IL-1 β 、IL-18 前体成熟并释放, 导致肺组织的炎症反应^[28]。本研究结果显示, SiO₂ 可以使共培养体系中 NR8383 细胞的 Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 的 mRNA 水平和 Cleaved-Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达水平均显著升高, 说明 SiO₂ 激活了 NR8383 细胞的 Caspase-1 酶活性, 使 IL-1 β 、IL-18 蛋白成熟并释放入胞外共培养体系中, 进一步影响体系中 RFL-6 细胞的生物效应。

细胞焦亡作为一种程序性死亡方式, 区别于与自噬和凋亡的是可以引起组织炎症反应, 对于肺组织损伤, 细胞焦亡既可以直接造成肺部细胞的死亡, 亦可通过引起的炎症反应损伤邻近细胞。因此, 如果能够有效的抑制细胞焦亡, 对于肺疾病的防治将具有重大的意义^[29]。有研究通过抑制 NLRP3 或 Caspase-1 来防止巨噬细胞的焦亡, 减轻 SiO₂ 介导的肺部炎症和纤维化^[30-31]。ASV 就可以通过降低 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、GSDMD 和 GSDMD-N 水平, 抑制 NLRP3 炎症小体介导的焦亡, 减轻脑缺血再灌注^[32]。ASV 也可以抑制 PM_{2.5} 激活的肺组织焦亡水平来减轻 PM_{2.5} 对肺的损伤^[20]。QUE 也可以通过抑制 NLRP3 信号通路, 降低肺内促炎因子水平, 减轻肺损伤, 保护肺功能^[33]。本实验用 ASV 联合 QUE 作用于 SiO₂ 暴露的共培养体系后, NR8383 细胞表现出焦亡相关指标 Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 的 mRNA 水平和 Cleaved-Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达水平均降低, RFL-6 细胞的 α -SMA、Vimentin 蛋白表达下降, E-cad 蛋白表达升高, 这与用焦亡抑制剂 Belnacasan 干预 SiO₂ 暴露的共培养体系的效果一样。

综上所述, ASV 联合 QUE 可能通过抑制共培养体系中暴露于 SiO₂ 的巨噬细胞的焦亡水平来降低炎症因子的分泌, 进而抑制成纤维细胞的纤维化水平。后续可通过动物实验进一步探究 ASV 联合 QUE 抑制焦亡通路的靶蛋白, 为临床应用黄芪甲苷联合槲皮素治疗早期矽肺提供理论依据。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] Song MY, Wang JX, Sun YL, et al. Tetrandrine alleviates silicosis by inhibiting canonical and non-canonical NLRP3 inflammasome activation in lung macrophages [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(5): 1274-1284.
- [2] Fan T, Huang ZX, Wang W, et al. Proteasome inhibition promotes autophagy and protects from endoplasmic reticulum stress in rat alveolar macrophages exposed to hypoxia-reoxygenation injury [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2018, 233(10): 6748-6758.
- [3] Marrocco A, Frawley K, Pearce LL, et al. Metabolic adaptation of macrophages as mechanism of defense against crystalline silica [J]. *Journal of Immunology*, 2021, 207(6): 1627-1640.
- [4] Tao HH, Zhao H, Mo AW, et al. VX-765 attenuates silica-induced lung inflammatory injury and fibrosis by modulating alveolar macrophages pyroptosis in mice [J]. *Ecotoxicology and Environment Safety*, 2023, 249: 114359.
- [5] Yu P, Zhang X, Liu N, et al. Pyroptosis: mechanisms and diseases [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6(1): 128.
- [6] Peukert K, Steinhagen F, Fox M, et al. Tetracycline ameliorates silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis via inhibition of caspase-1 [J]. *Respiratory Research*, 2022, 23(1): 21.
- [7] 陈丽, 颜春鲁, 赵翊, 等. 黄芪对矽肺大鼠肺组织胶原合成的影响 [J]. *工业卫生与职业病*, 2017, 43(5): 359-362.
Chen L, Yan CL, Zhao Y, et al. Effects of astragalus and astragalus extract on collagen synthesis in rat lungs exposed to silica [J]. *Industrial Health and Occupational Diseases*, 2017, 43(5): 359-362. (In Chinese)
- [8] Li NN, Wu K, Feng FF, et al. Astragaloside IV alleviates silica-induced pulmonary fibrosis via inactivation of the TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathway [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2021, 47(3): 16.
- [9] Geng F, Xu MY, Zhao L, et al. Quercetin alleviates pulmonary fibrosis in mice exposed to silica by inhibiting macrophage senescence [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 912029.
- [10] Sai LL, Yu GC, Bo CX, et al. Profiling long non-coding RNA changes in silica-induced pulmonary fibrosis in rat [J]. *Toxicology Letters*, 2019, 310: 7-13.
- [11] Barnes H, Goh NSL, Leong TL, et al. Silica-associated lung disease: An old-world exposure in modern industries [J]. *Respirology*, 2019, 24(12): 1165-1175.
- [12] Joshi N, Walter JM, Misharin AV. Alveolar macrophages [J]. *Cellular Immunology*, 2018, 330: 86-90.
- [13] Tan SY, Chen S. Macrophage autophagy and silicosis: current perspective and latest insights [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(1): 453.
- [14] 余杰, 毛丽君, 赵金垣. 二氧化硅通过肺泡巨噬细胞的识别反应启动肺内炎症损伤的机制 [J]. *中国工业医学杂志*, 2015, 28(4): 265-269.
Yu J, Mao LJ, Zhao JY. Mechanism of intrapulmonary inflammatory injury initiated by recognition response of alveolar macrophages by silica [J]. *Chinese Journal of Industrial Medicine*, 2015, 28(4): 265-269. (In Chinese)
- [15] Ou L, Zhang P, Huang ZP, et al. Targeting STING-mediated pro-inflammatory and pro-fibrotic effects of alveolar macrophages and fibroblasts blunts silicosis caused by silica particles [J]. *Journal of*

- Hazardous Materials, 2023, 458: 131907.
- [16] Cheng DM, Xu Q, Wang Y, et al. Metformin attenuates silica-induced pulmonary fibrosis via AMPK signaling [J]. Journal of Translational Medicine, 2021, 19(1): 349.
- [17] 马洁,孟祥敬,厉铭,等. SiO₂ 诱导巨噬细胞线粒体分裂在肺成纤维细胞活化中的作用[J]. 中国工业医学杂志, 2024, 37(2): 111-117, 222.
- Ma J, Meng XJ, Li M, et al. Role of SiO₂ induced mitochondrial division in the activation of pulmonary fibroblasts in macrophages[J]. Chinese Journal of Industrial Medicine, 2024, 37(2): 111-117, 222. (In Chinese)
- [18] 薛松妍,董怡,王冕,等. 黄芪甲苷对阿霉素诱导的扩张型心脏病大鼠心肌纤维化和 Th17 细胞分化的影响[J]. 现代生物医学进展, 2024, 24(12): 2207-2213, 2268.
- Xue SY, Dong Y, Wang M, et al. Effects of astragaloside IV on myocardial fibrosis and Th17 Cell differentiation in rats with adriamycin induced dilated cardiomyopathy [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2024, 24(12): 2207-2213, 2268. (In Chinese)
- [19] 吴余,张红,陈彦豪,等. 基于 PI3K/Akt/eNOS 通路探讨黄芪甲苷对糖尿病心脏病大鼠心功能的保护机制[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(10): 2329-2332.
- Wu Y, Zhang H, Chen YH, et al. To investigate the protective mechanisms of astragaloside IV on cardiac function in diabetic cardiomyopathy rats based on the PI3K/Akt/eNOS signaling pathway [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2023, 34(10): 2329-2332. (In Chinese)
- [20] Huang DM, Shi SH, Wang YL, et al. Astragaloside IV alleviates PM_{2.5}-caused lung toxicity by inhibiting inflammasome-mediated pyroptosis via NLRP3/caspase-1 axis inhibition in mice [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022, 150: 112978.
- [21] 彭小锋,李秀壮,唐蓉萍,等. 槲皮素的生物活性及应用研究进展[J]. 山东化工, 2024, 53(8): 136-139.
- Peng XF, Li XZ, Tang RP, et al. Research progress on the biological activity and application of quercetin[J]. Shandong Chemical Industry, 2024, 53(8): 136-139. (In Chinese)
- [22] Ohmae S, Akazawa S, Takahashi T, et al. Quercetin attenuates adipogenesis and fibrosis in human skeletal muscle [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2022, 615: 24-30.
- [23] Hohmann MS, Habieli DM, Coelho AL, et al. Quercetin enhances ligand-induced apoptosis in senescent idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts and reduces lung fibrosis in vivo [J]. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2019, 60(1): 28-40.
- [24] Yu MX, Song X, Ma XQ, et al. Investigation into molecular mechanisms and high-frequency core TCM for pulmonary fibrosis secondary to COVID-19 based on network pharmacology and data mining[J]. Annals of Palliative Medicine, 2021, 10(4): 3960-3975.
- [25] Li NN, Feng FF, Wu K, et al. Inhibitory effects of astragaloside IV on silica-induced pulmonary fibrosis via inactivating TGF- β 1/Smad3 signaling[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019, 119: 109387.
- [26] Zhang XC, Cai YL, Zhang W, et al. Quercetin ameliorates pulmonary fibrosis by inhibiting SphK1/S1P signaling[J]. Biochemistry and Cell Biology, 2018, 96(6): 742-751.
- [27] 张力,茆军,张立,等. 细胞焦亡与组织纤维化[J]. 基础医学与临床, 2018, 38(12): 1766-1770.
- Zhang L, Mao J, Zhang L, et al. Pyroptosis and tissue fibrosis [J]. Basic and Clinical Medicine, 2018, 38(12): 1766-1770. (In Chinese)
- [28] 赵诗雨,单蕾,何平. 细胞焦亡与肺部疾病纤维化的相关研究进展[J]. 新疆医学, 2021, 51(8): 952-954, 978.
- Zhao SY, Shan L, He P. Advances in research on Pyroptosis and pulmonary disease fibrosis[J]. Xinjiang Medical Journal, 2021, 51(8): 952-954, 978. (In Chinese)
- [29] Liu JJ, Fan GQ, Tao NN, et al. Role of pyroptosis in respiratory diseases and its therapeutic potential [J]. Journal of Inflammation Research, 2022, 15: 2033-2050.
- [30] Zhao Q, Hao C, Wei J, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate silica-induced pulmonary fibrosis by inhibiting apoptosis and pyroptosis but not autophagy in rats [J]. Ecotoxicology and Environment Safety, 2021, 216: 112181.
- [31] Yin H, Fang L, Wang L, et al. Acute silica exposure triggers pulmonary inflammation through macrophage pyroptosis: an experimental simulation [J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 874459.
- [32] Xiao L, Dai ZW, Tang WJ, et al. Astragaloside IV alleviates cerebral Ischemia-Reperfusion injury through NLRP3 Inflammasome-Mediated pyroptosis inhibition via activating Nrf2 [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 2021: 9925561.
- [33] El-Shaer NO, Hegazy AM, Muhammad MH. Protective effect of quercetin on pulmonary dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats via inhibition of NLRP3 signaling pathway [J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2023, 30(14): 42390-42398.

收稿日期: 2024-12-03