

本文引文格式:杜苗苗,胡素侠,曹伟娅,等.基于RAGE/NF- $\kappa$ B信号轴探讨S100A8在煤尘诱导肺纤维化中的机制研究[J].右江民族医学院学报,2024,46(6):841-847,852.

【论著与临床报道】

## 基于RAGE/NF- $\kappa$ B信号轴探讨S100A8 在煤尘诱导肺纤维化中的机制研究

杜苗苗<sup>1,2</sup>,胡素侠<sup>3</sup>,曹伟娅<sup>2</sup>,邹元杰<sup>1,2</sup>,金海波<sup>1,2</sup>,穆敏<sup>1,4</sup>

- 安徽理工大学医学院医学前沿实验中心系,安徽 淮南 232001;
- 安徽理工大学工业粉尘防控与职业安全健康教育部重点实验室,安徽 淮南 232001;
- 安徽理工大学第一附属医院检验科,安徽 淮南 232007;
- 安徽理工大学公共卫生学院预防医学系,安徽 淮南 232001)

**摘要:**目的 观察煤尘在不同浓度下对小鼠肺部的毒性作用,并探讨S100钙结合蛋白A8(S100 calcium binding protein A8,S100A8)通过晚期糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products,RAGE)/NF- $\kappa$ B信号轴促进煤鼠尘肺病肺纤维化的作用机制。**方法** 构建煤鼠尘肺病模型(coal mouse pneumoconiosis,CMP),将C57BL/6小鼠随机分为4组,分别是生理盐水组(50  $\mu$ L,NS)、低浓度煤尘组(50  $\mu$ L,10 mg/mL,CMP-低)、中浓度煤尘组(50  $\mu$ L,30 mg/mL,CMP-中)和高浓度煤尘组(50  $\mu$ L,50 mg/mL,CMP-高)进行1周2次滴鼻,持续1个月。利用小鼠体重和肺功能呼吸参数检测并观察不同浓度的煤尘对小鼠体重变化和肺功能的影响。HE、Masson和Sirius Red染色实验检测不同浓度的煤尘对小鼠肺部炎症和肺纤维化的影响。IHC染色实验观察不同浓度的煤尘对S100A8蛋白表达水平的影响。Western Blot实验检测不同浓度的煤尘对小鼠肺组织中S100A8、RAGE、NF- $\kappa$ B、 $\alpha$ -SMA、Fibronectin和TGF- $\beta$ 1的蛋白表达水平。**结果** 与NS组相比,CMP-中组和CMP-高组小鼠体重和肺功能下降明显,而CMP-低组和NS组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与NS组相比,CMP-中组和CMP-高组促进了炎症及纤维化的进展且差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与NS组相比,CMP-中组和CMP-高组肺组织中S100A8、RAGE、NF- $\kappa$ B、 $\alpha$ -SMA、Fibronectin和TGF- $\beta$ 1的蛋白表达水平上调( $P < 0.05$ )。**结论** 煤尘浓度越高对小鼠肺部毒性作用越大;S100A8蛋白在煤鼠尘肺病中表达水平上调,且S100A8通过RAGE/NF- $\kappa$ B信号轴促进煤尘诱导的肺纤维化。

**关键词:**煤尘病;肺纤维化;S100钙结合蛋白A8;高级糖基化终产物受体

**中图分类号:**R598 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-5817(2024)06-0841-08

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2024.06.001

### Exploring the mechanism of S100A8 in coal dust-induced pulmonary fibrosis based on the RAGE/NF- $\kappa$ B signaling axis

DU Miaomiao<sup>1,2</sup>, HU Suxia<sup>3</sup>, CAO Weiya<sup>2</sup>, ZOU Yuanjie<sup>1,2</sup>, JIN Haibo<sup>1,2</sup>, MU Min<sup>1,4</sup>

- Department of Medical Frontier Experimental Center, School of Medicine, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, Anhui, China;
- Key Laboratory of Industrial Dust Prevention and Control, Occupational Safety and Health, Ministry of Education, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, Anhui, China;
- Department of Clinical Laboratory, The First Hospital of Anhui University of Science and Technology, Huainan 232007, Anhui, China;
- Department of Preventive Medicine, School of Public Health, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, Anhui, China)

**基金项目:**国家自然科学基金项目(82304112)

**第一作者:**杜苗苗,在读硕士研究生,研究方向:职业健康,E-mail:1684111804@qq.com

**通讯作者:**穆敏,教授,研究方向:职业健康,E-mail:candymu@126.com

**Abstract: Objective** To observe the toxic effects of coal dust at different concentrations on the lungs of mice and explore the mechanism by which S100 calcium binding protein A8 (S100A8) promotes lung fibrosis in coal mouse pneumoconiosis (CMP) through the receptor for advanced glycation end products (RAGE)/NF- $\kappa$ B signaling axis. **Methods** A CMP model was established, and C57BL/6 mice were randomly divided into four groups: saline group (50  $\mu$ L, NS), low-concentration coal dust group (50  $\mu$ L, 10 mg/mL, CMP-Low), medium-concentration coal dust group (50  $\mu$ L, 30 mg/mL, CMP-Medium), and high-concentration coal dust group (50  $\mu$ L, 50 mg/mL, CMP-High). Mice were intranasally instilled twice a week for one month. Mouse body weight and respiratory parameters of lung function were measured to observe the effects of different concentrations of coal dust on body weight changes and lung function. HE, Masson, and Sirius Red staining experiments were conducted to detect the effects of different concentrations of coal dust on lung inflammation and fibrosis in mice. IHC staining experiment was conducted to observe the effects of coal dust at different concentrations on the protein expression level of S100A8. Western Blot experiments were used to detect the protein expression levels of S100A8, RAGE, NF- $\kappa$ B,  $\alpha$ -SMA, Fibronectin, and TGF- $\beta$ 1 in the lung tissues of mice at different concentrations of coal dust. **Results** Compared with the NS group, the body weight and lung function of mice in the CMP-Medium and CMP-High groups decreased significantly, while there was no statistically significant difference between the CMP-Low group and the NS group ( $P > 0.05$ ). Compared with the NS group, the CMP-Medium and CMP-High groups promoted the progression of inflammation and fibrosis with statistically significant differences ( $P < 0.01$ ). Compared with the NS group, the protein expression levels of S100A8, RAGE, NF- $\kappa$ B,  $\alpha$ -SMA, Fibronectin, and TGF- $\beta$ 1 were upregulated in the lung tissues of the CMP-Medium and CMP-High groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The higher the concentration of coal dust, the greater the toxic effect on the lungs of mice. The expression level of S100A8 protein is upregulated in CMP, and S100A8 promotes coal dust-induced pulmonary fibrosis through the RAGE/NF- $\kappa$ B signaling axis.

**Key words:** pneumoconiosis; pulmonary fibrosis; S100 calcium-binding protein A8; advanced glycation end products receptor

煤工煤尘病 (coal worker's pneumoconiosis, CWP) 是指工人在工作中长期吸入煤尘 (包括煤矿粉尘或纯粉尘) 引起的以肺组织弥漫性结节状或网状间质性肺纤维化为特征的疾病, 是目前全世界最重要的职业之一<sup>[1]</sup>。据国家卫生健康委员会统计我国近年来职业病性尘肺病患者病例数正逐年增加, 截止 2021 年底, 患者数量累计高达 90 余万人<sup>[2]</sup>。CWP 具体的作用机制较为复杂且一旦发作将终生不可逆转, 临床上最常见的治疗方法有药物治疗, 如糖皮质激素和免疫抑制剂等, 虽然在一定程度上可有效缓解尘肺病的恶化、减轻临床症状, 但药物治疗的不良反应颇多且较为严重。此外, 已经发生的肺纤维化是无法通过药物治疗彻底逆转<sup>[3]</sup>。因此, 明确发病分子机制对尘肺病的早期精准预防和靶向治疗提供新思路, 为尘肺病职业防控提供实验依据。

中性粒细胞被认为是先天免疫防御的第一道防线, 能够调节多种过程, 如急性损伤、癌症、炎症和自身免疫疾病等<sup>[4]</sup>。S100 钙结合蛋白 A8 (S100 calcium binding protein A8, S100A8) 主要存在于中性粒细胞的胞质中, 占其总蛋白量约 45%, 在炎症、纤维化疾病中发挥着重要的作用<sup>[5]</sup>。当受到感染和炎症刺激时中性粒细胞分泌大量的 S100A8, 细胞外的 S100A8 主要是通过结合广泛存在于细胞膜上的不同膜受体亚型—

晚期糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycation endproducts, RAGE) 从而激活下游信号<sup>[6-7]</sup>。本研究主要通过建立煤鼠尘肺病 (coal mouse pneumoconiosis, CMP) 模型观察煤尘对小鼠肺部的毒性作用, 并探讨 S100A8 通过 RAGE/NF- $\kappa$ B 信号轴参与煤尘诱导肺纤维化的机制, 为尘肺病的治疗和预防提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 40 只 C57BL/6 雄性小鼠 (6~8 周) 购自常州开伟恩实验动物有限公司 [许可证号: SCXK(豫)2020-0005]。在实验开始前, 小鼠提前适应新环境 1~2 周, 室温在 22~26  $^{\circ}$ C、50% 湿度、自然昼夜交替下向小鼠提供充足的食物和水。所有程序均遵循《实验动物护理和使用指南》(美国国立卫生研究院第 8023 号出版物, 1978 年修订), 并经安徽理工大学机构动物护理与伦理委员会批准 (实验动物伦理审查号: 2023022601)。

1.1.2 主要试剂 S100A8 (E4F8V) (#47310)、NF- $\kappa$ B p65 (D14E12) (8242)、 $\beta$ -Actin Antibody (#4967) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; Rabbit Anti-RAGE antibody (bs-0177R)、Rabbit Anti-TGF beta 1 antibody (bs-0086R) 均购自北京博奥森生物技

术有限公司;Anti-alpha smooth muscle Actin(EPR53 68)(ab124964)购自美国 abcam 公司;Fibronectin Polyclonal antibody(15613-1-AP)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(SA00001-2)和辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠(SA00001-1)、碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG(SA00002-2)均购自美国 Proteintech 公司。煤尘颗粒收集于中国安徽省的一个煤矿<sup>[8]</sup>,76.84%的煤尘颗粒 $<5\ \mu\text{m}$ ,二氧化硅百分比 $<10\%$ 。4%多聚甲醛固定液(P0099-100 mL)、柠檬酸钠抗原修复液(P0081)、苏木素-伊红(HE)(C0105S)、马松三色染色(Masson)(C0189S)、彩色预染蛋白质分子量标准(10-170 kD)(P0075)和彩色预染蛋白分子量标准(6.5-270 kD)(P0071)、特超敏 ECL 化学发光试剂(P0081AS)均购自上海碧云天生物技术有限公司;天狼星红(Sirius Red)(BP-DL030)染色试剂盒购自南京森贝伽生物科技有限公司;AP 显色液(SK-5105)购自 Vector Laboratories, USA。

## 1.2 方法

1.2.1 动物实验设计 将 40 只 C57BL/6 雄性小鼠随机分为 4 组,分别为:生理盐水组(NS 组)、低浓度煤尘组(CMP-低)、中浓度煤尘组(CMP-中)、高浓度煤尘组(CMP-高),每组各 10 只。本实验采用鼻滴的方式进行造模,该实验方法在煤肺和矽肺小鼠中已建模成功<sup>[9-10]</sup>。造模前要将煤尘颗粒进行高温灭菌处理,随后使用无菌生理盐水对煤尘颗粒进行溶解,最后将煤尘溶液置于超声波震荡水浴锅中超声 20~30 min 使其充分溶解。造模时用异氟烷对小鼠进行麻醉,当小鼠的呼吸频率由浅快变为深慢时将小鼠放入手掌中使小鼠身体保持一条直线,然后用拇指抵住小鼠嘴巴从鼻腔滴注煤尘工作液。小鼠尘肺病造模成功应具有典型的病理特征变化,如肺泡炎症、纤维化改变以及肺功能的减退;此外,该模型还具有一定的稳定性,在相同条件下进行多次重复实验都可以获得相似的结果。NS 组通过鼻腔滴注 50  $\mu\text{L}$  生理盐水,模型组分别通过鼻腔滴注 50  $\mu\text{L}$  终浓度分别为 10 mg/mL、30 mg/mL 和 50 mg/mL 的煤尘溶液,1 周 2 次滴注,连续 1 个月。小鼠体重每 1 周称 1 次,连续 3 个月,在第 3 个月时对小鼠进行肺功能检测。

1.2.2 肺组织取材 造模 3 个月结束后处死小鼠获取肺组织。抓住小鼠的背部并夹住小鼠的尾巴腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉剂,待小鼠处于深度麻醉状态时,将其转移至通风橱中,固定在泡沫板上,随后用镊子扯起小鼠胸部的皮肤用剪刀剪开胸腔的皮肤和肋骨,暴露出心脏和肺脏后将小鼠的右心耳剪开,同时将针头插入小鼠的左心室用生理盐水进行灌注,待肺脏变白后,取下整个肺组织,将其放在冰盒上对整个肺组织进行分叶,其中右上叶、右中叶和右下叶分别保存于

不同的 EP 管中,随后转移至 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱用于后续的 Western Blot 实验;左叶肺组织置于 4% 多聚甲醛溶液中进行固定用于后续做染色切片。

1.2.3 HE 染色、Masson 染色、Sirius Red 染色观察小鼠肺组织形态 用 PBS 和 4% 多聚甲醛对小鼠进行灌注和固定之后,取下肺组织,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 48~72 h 后进行包埋和切片处理。依次在二甲苯 I、二甲苯 II 中脱蜡、梯度酒精中脱水后,使用 HE、Masson 和 Sirius Red 染色试剂盒进行染色,然后用中性树胶封片后在 BX53+DP74 显微镜下观察小鼠肺组织肺泡结构、炎性浸润程度和纤维化变化。

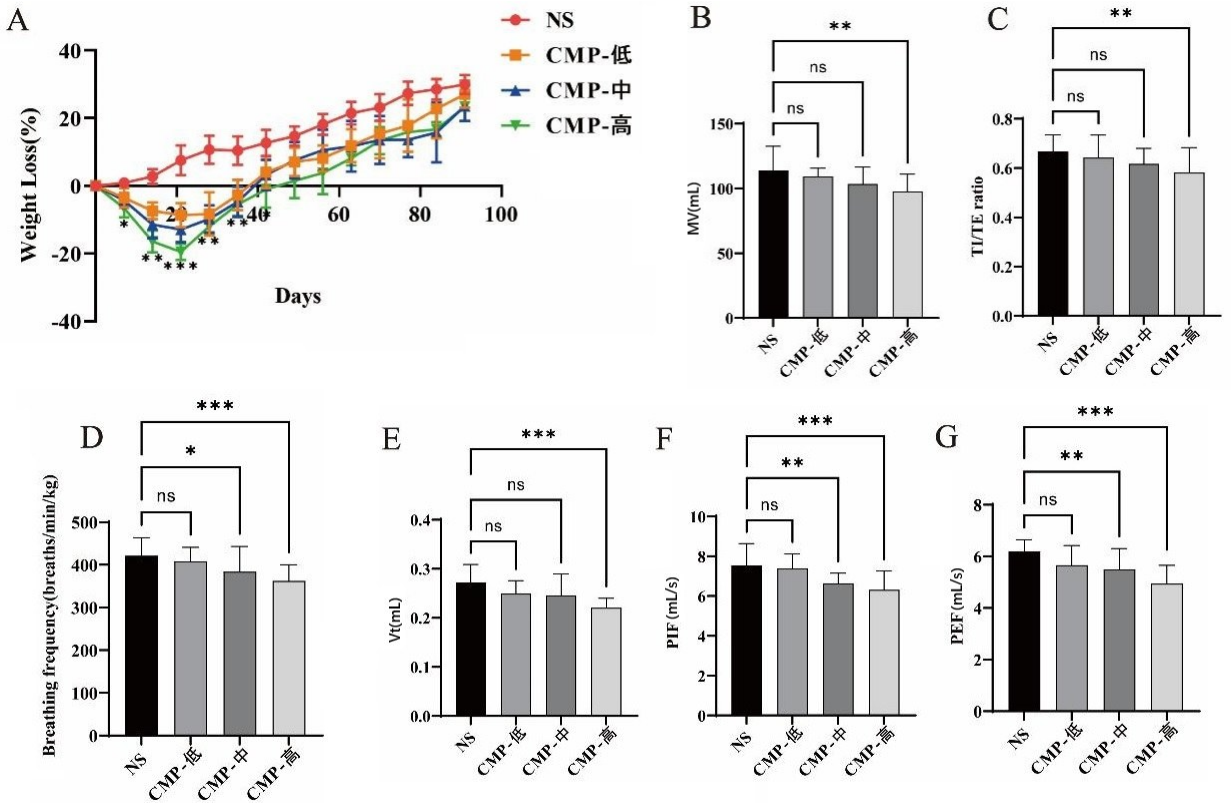
1.2.4 IHC 实验检测小鼠肺组织中 S100A8 蛋白表达水平 小鼠肺组织烘片 4~6 h 后进行脱蜡、脱水,抗原修复 30 min,随后用 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  室温孵育 10 min 以阻断内源性过氧化物酶,随后用 5% BSA-PBST 在室温下封闭 1 h,最后 4  $^\circ\text{C}$  一抗孵育过夜(S100A8 抗体稀释比 1:800);第 2 天复温 1 h 后用 PBST 清洗 3 次,每次 5 min,随后二抗在室温下孵育 1 h,滴加 AP 显色液显色,最后苏木素复染、封片。在 BX53+DP74 显微镜下观察 S100A8 蛋白阳性表达为红色。

1.2.5 Western Blot 检测小鼠肺组织中 S100A8、RAGE、NF- $\kappa\text{B}$ 、 $\alpha\text{-SMA}$ 、Fibronectin、TGF- $\beta\text{1}$  的蛋白表达水平 取 20 mg 小鼠肺组织后加入 150  $\mu\text{L}$  裂解液(RIPA+磷酸酶抑制剂+PMSF),随后置于冰上匀浆,然后在 4  $^\circ\text{C}$  摇床中摇动 2 h,使其充分裂解,之后将样本置于 4  $^\circ\text{C}$ ,12 000 r/min 高速离心 15 min 后吸取上清进行蛋白质提取,用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。随后制胶、上样、电泳、电转、封闭后孵育不同一抗 4  $^\circ\text{C}$  过夜,第 2 天进行二抗室温孵育 1 h,使用 ECL 化学发光液进行显影。以  $\beta\text{-actin}$  为内参,利用 ImageJ 软件测定目标条带强度并计算相对值。

1.3 统计学分析 使用 GraphPad Prism 9.3 软件进行数据统计分析。所有实验至少重复 3 次,结果用( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用单因素方差分析对多组数据进行统计分析。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 不同浓度的煤尘对小鼠体重和肺功能的影响 通过对小鼠进行为期 3 个月的体重检测发现,与 NS 组相比,CMP-高组对小鼠体重的损伤程度最为严重,且在第 20 天左右体重变化差异显著( $P < 0.001$ )。与 NS 组相比,CMP-低组的 MV、TI/TE、Breathing frequency、Vt、PIF、PEF 值差异无统计学意义( $P > 0.05$ );CMP-中组的 MV、TI/TE、Vt 值差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),Breathing frequency、PIF、PEF 值降低且差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );CMP-高组的 MV、TI/TE、Breathing frequency、Vt、PIF、PEF 值均降低( $P < 0.01$ )。见图 1。

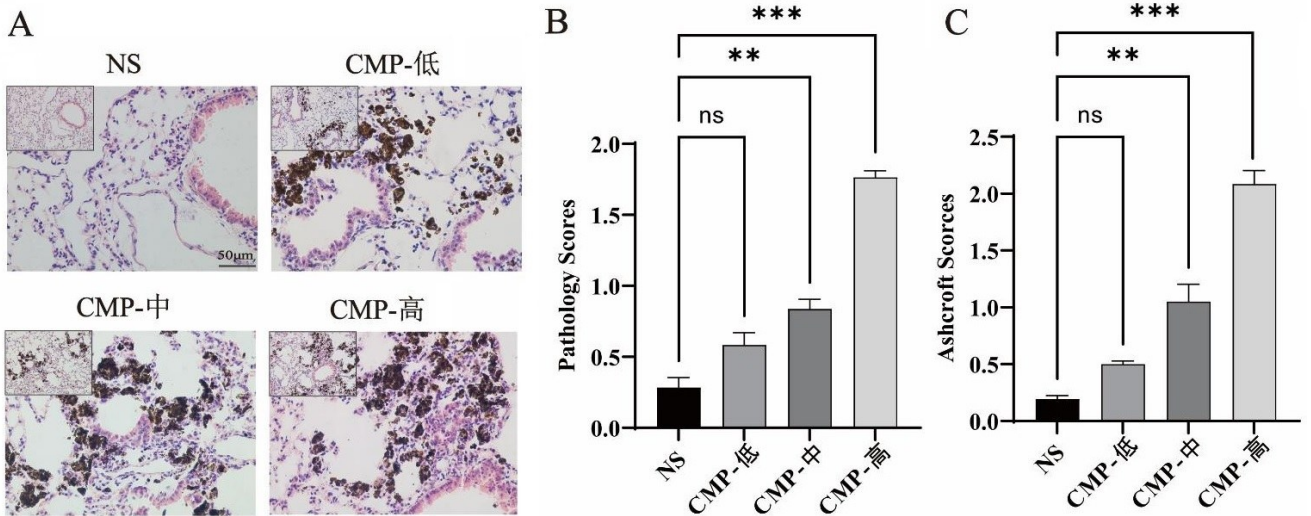


注：A. 小鼠 3 个月体重变化；B. MV(mL)代表分钟通气量；C. TI/TE ratio 代表吸气时间/呼气时间；  
D. Breathing frequency(breaths/min)代表呼吸频率；E. Vt(mL)代表潮气量；F. PIF(mL/s)代表最大吸气流速；  
G. PEF(mL/s)代表最大呼气流速。\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ,  $n = 5$ 。

图 1 小鼠体重和肺功能变化

2.2 不同浓度的煤尘对小鼠肺部炎症的影响 HE 染色结果显示,与 NS 组相比,CMP-低组小鼠肺组织有少量的煤尘颗粒和炎性细胞的浸润,肺泡结构相对较完整,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );CMP-中组煤

尘颗粒和炎性细胞浸润程度增加,肺泡结构受到损伤,气管壁轻度增厚 ( $P < 0.01$ );CMP-高组肺组织有大量的炎性细胞浸润,肺泡结构破坏严重且气管壁增厚明显 ( $P < 0.001$ )。见图 2。

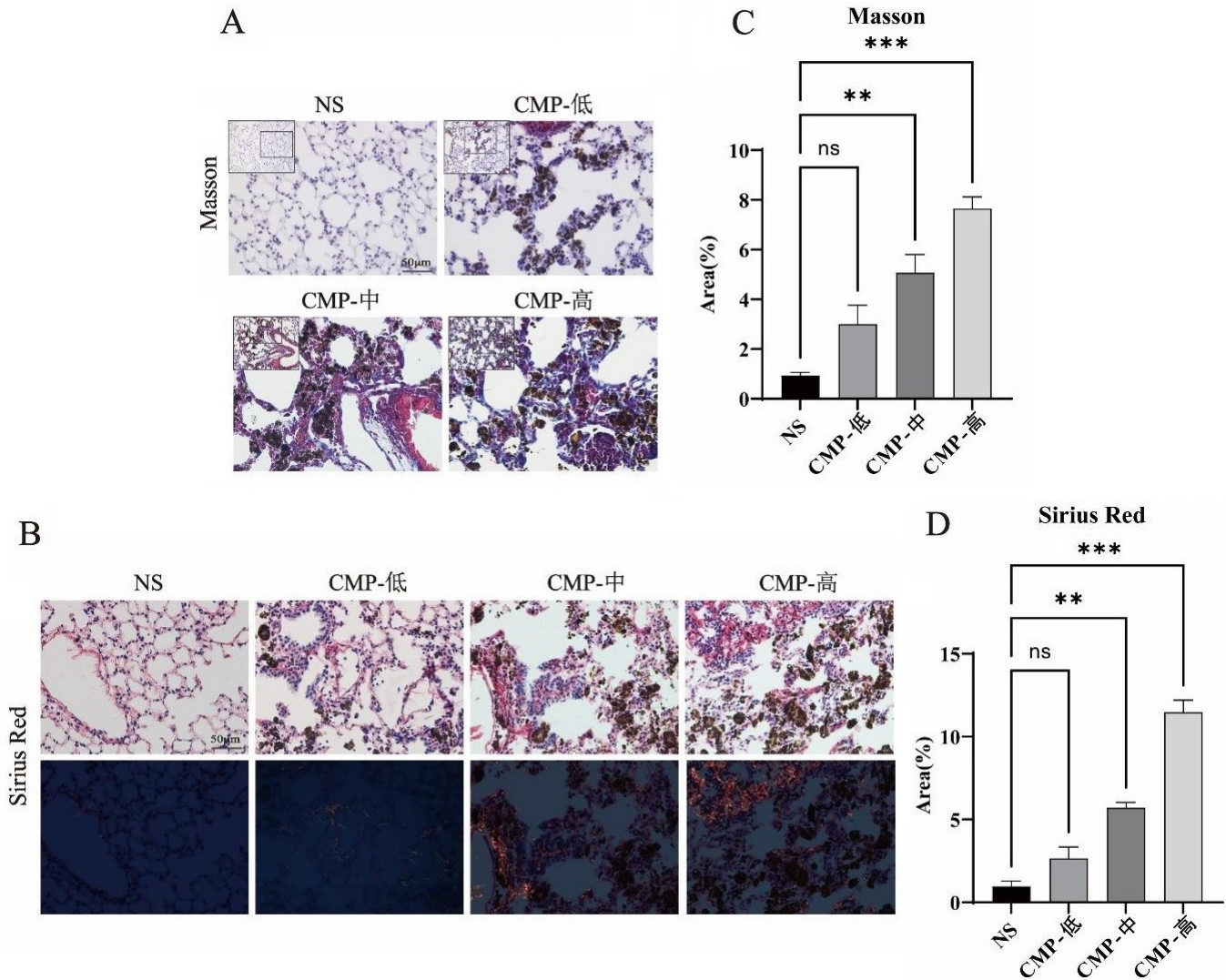


注：A. HE 染色评估各组小鼠肺组织形态学变化；B. Pathology Scores 得分评估小鼠肺组织损伤情况；  
C. Ashcroft Scores 得分评估小鼠肺组织纤维化情况。\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ,  $n = 6$ 。

图 2 HE 检测暴露于不同浓度的煤尘下小鼠肺组织病理学形态改变(标尺长度:50  $\mu\text{m}$ ,  $\times 400$ )和 Pathology Scores、Ashcroft Scores 得分

2.3 不同浓度的煤尘对小鼠肺部纤维化的影响 通过 Masson 染色发现, CMP-低组和 NS 组之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与 NS 组相比, CMP-中组小鼠肺组织在靠近煤尘和气管附近开始出现了蓝色的胶原纤维, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); CMP-高组肺组织蓝色胶原面积增加, 小鼠肺纤维化程度加重 ( $P < 0.001$ )。Sirius Red 染色用于评估 I 型和 III 型胶原

(其中 I 型胶原为黄色, III 型胶原为绿色) 纤维的差异表达, 根据染色结果发现, CMP-低组和 NS 组之间在 I 型和 III 型胶原纤维中差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与 NS 组相比, CMP-中组中的 I 型胶原纤维增加, III 型胶原减少, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); CMP-高组中的 I 型胶原纤维面积最多 ( $P < 0.001$ )。见图 3。



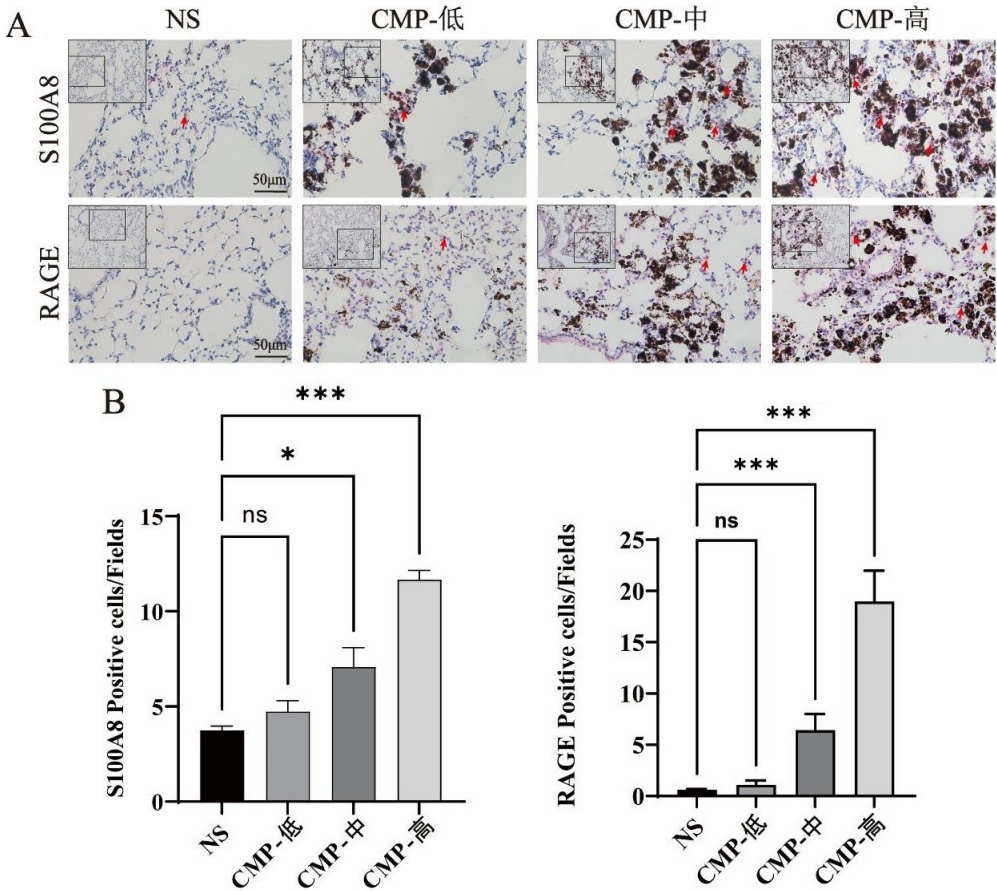
注: A 和 B. Masson 染色和 Sirius Red 染色观察各组小鼠肺部纤维化改变; C 和 D. 胶原纤维阳性面积百分比。\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ,  $n = 6$ 。

图 3 Masson 染色和 Sirius Red 染色观察小鼠肺部胶原纤维沉积(标尺长度:  $50 \mu\text{m}$ ,  $\times 400$ )

2.4 免疫组化 根据免疫组化染色结果, 经煤尘刺激后 S100A8、RAGE 表达水平上调, 随着煤尘浓度的增加, S100A8、RAGE 持续存在且表达量持续上调 (S100A8、RAGE 阳性细胞为红色), 但 CMP-低组与 NS 组之间差异并无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 4。

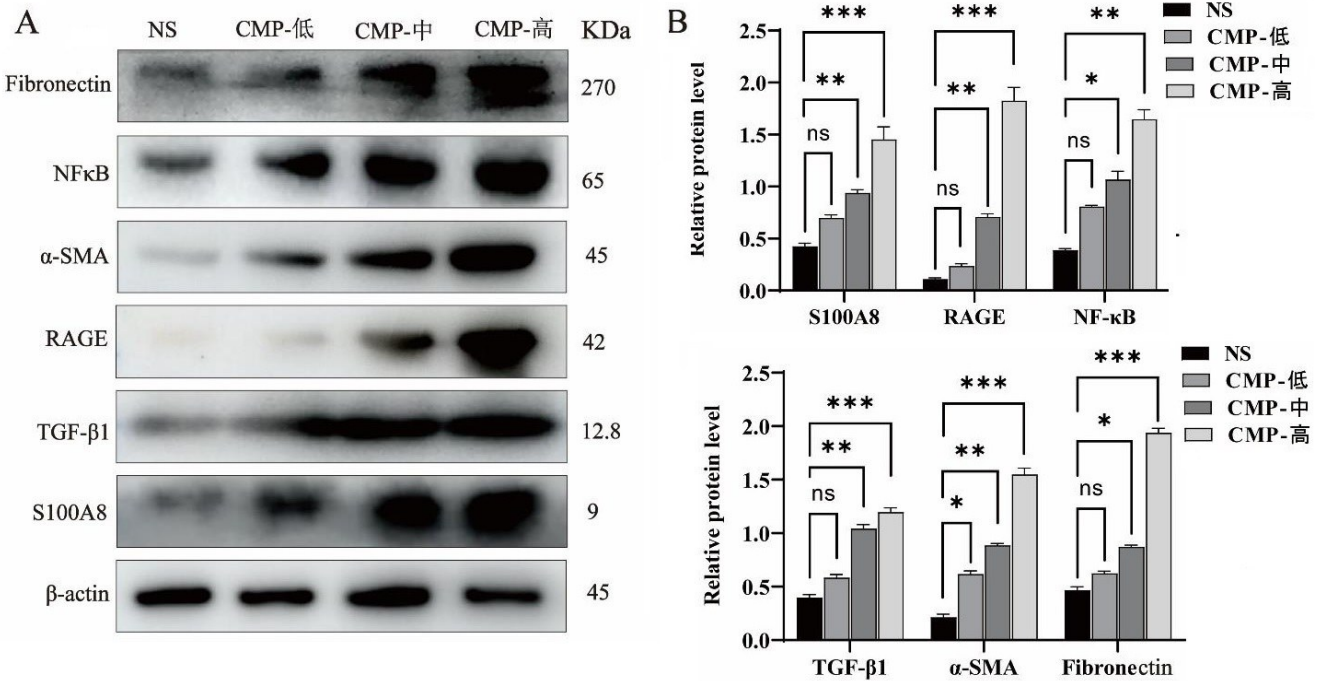
2.5 Western Blot 检测各组小鼠肺组织中 S100A8、RAGE、NF- $\kappa$ B、 $\alpha$ -SMA、Fibronectin、TGF- $\beta$ 1 蛋白表

达水平 与 NS 组相比, CMP-低组中的 S100A8、RAGE、NF- $\kappa$ B、Fibronectin、TGF- $\beta$ 1 蛋白水平上调但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),  $\alpha$ -SMA 蛋白水平上调且差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); CMP-中组和 CMP-高组中的 S100A8、RAGE、NF- $\kappa$ B、 $\alpha$ -SMA、Fibronectin、TGF- $\beta$ 1 蛋白水平均上调 ( $P < 0.01$ ); 且煤尘浓度越高, 各个蛋白表达水平越高 ( $P < 0.01$ )。见图 5。



注:A. 各组 S100A8、RAGE 阳性细胞表达;B. 肺组织中 S100A8 阳性细胞和 RAGE 阳性细胞表达的定量分析。\*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ,  $n = 6$ 。

图 4 IHC 染色观察不同浓度的煤尘对 S100A8、RAGE 阳性细胞表达情况(标尺长度:50  $\mu\text{m}$ ,  $\times 400$ )



注:A. 各组 Western Blot 结果;B. NS 组与模型组蛋白比较的误差条形图。

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ,  $n = 3$ 。

图 5 Western Blot 实验检测各组肺组织中 S100A8、RAGE、NF-κB、α-SMA、Fibronectin、TGF-β1 蛋白表达水平

### 3 讨论

目前,CWP 的具体发病机制尚未完全了解。煤尘颗粒的化学成分在 CWP 的发病机制中起着至关重要的作用,本研究通过小鼠鼻腔滴注煤尘溶液构建 CMP 模型,旨在探讨煤尘颗粒对小鼠肺部的毒害作用及其相关的作用机制。

尘肺通常具有职业特殊性,由于长期接触矿物质粉尘对呼吸道造成一定的刺激,患者可出现低热、咳嗽等炎症反应<sup>[11]</sup>。炎症是机体的基本防御机制。当机体受到感染刺激时体内的各种免疫细胞和细胞分子在参与调节炎症过程中形成一个巨大的调控网络,过度的炎症反应或炎症反应持续存在时可能会诱发机体发生其他疾病,如癌症、纤维化等<sup>[12]</sup>。在本实验中已通过组织病理学染色证明了煤尘刺激后可加速小鼠肺部炎症和纤维化的进展。另外,S100A8 在炎症的发展过程中起着决定性的作用,在创伤、感染、急性应激等许多炎症过程中强烈上调<sup>[13]</sup>。根据 IHC 染色结果可以看到,煤尘刺激后 S100A8 和 RAGE 蛋白表达水平上调且煤尘浓度越高 S100A8 和 RAGE 蛋白表达水平上调越显著。研究表明,S100A8 在肺纤维化患者标本中高表达,可作为特发性肺纤维化患者的重要预后生物标志物<sup>[14]</sup>。RAGE 作为一种模式识别受体能够与内源性配体(如 S100A8、HMGB1 和 AGEs)相互作用,从而激活多个信号级联反应<sup>[15]</sup>。RAGE 与 S100A8 结合后可诱导 MyD88 的激活从而使丝裂原活化蛋白激酶(如 p38、p42/44 激酶以及 ERK1/2)发生磷酸化导致 NF- $\kappa$ B 的核易位,从而增强各种促炎细胞因子和促纤维化因子(IL-6、IL-1 $\beta$  和 TGF- $\beta$ 1、 $\alpha$ -SMA)的转录,增加炎症细胞的趋动性和黏附性从而促进炎症的级联反应,加重炎症和纤维化的发展<sup>[16]</sup>。另外,NF- $\kappa$ B 通路的激活和抑制受两个关键介质调节,肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF6)和转化生长因子  $\beta$ -活化激酶 1 (TAK1)<sup>[16-17]</sup>。TRAF6 和 TAK1 在信号转导复合物中共同作用,还可以促进丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 的激活,MAPK 是独立于 IKK-NF- $\kappa$ B 通路从 TRAF5 分支的几种途径之一<sup>[18]</sup>。另外,数据表明 TRAF6-TAK1 轴有助于 SAMHD1 介导 NF- $\kappa$ B 的激活<sup>[19]</sup>,然而在本实验中并未研究 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 通路与 TAK1 磷酸化和激活的具体作用机制,这是本实验中的局限性。本课题组研究了 S100A8 是否通过与 RAGE 相互结合从而介导纤维化的发生,由 Western Blot 实验结果可知,与 NS 组相比,CMP-中组和 CMP-高组中的 S100A8、RAGE、NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平显著上调,而 CMP-低组和 NS 组蛋白水平差异无统计学意义,这表明了煤尘刺激后激活了 S100A8 与 RAGE 蛋白的表达。S100A8 与受体 RAGE 相互作用后激活下

游的 NF- $\kappa$ B 信号介导肺纤维化的发生发展,已采用 Western Blot 实验进行验证。在博来霉素(BLM)诱导的肺纤维化模型中使用抗 S100A8 中和抗体可以有效降低活化 NF- $\kappa$ B 的能力,减少炎症因子的释放,减弱肺成纤维细胞向肌成纤维细胞分化,降低肺纤维化的发展<sup>[20]</sup>。本研究与其他研究结果不同的是,本研究证明了煤尘刺激可诱导小鼠肺纤维化的发生并且煤尘刺激后小鼠肺组织中的 S100A8 蛋白表达水平显著上调,这是本研究中的一大亮点。另外,由 Western Blot 实验结果可知,S100A8 过表达可增加肺纤维化标志物  $\alpha$ -SMA、Fibronectin 和 TGF- $\beta$ 1 的蛋白表达水平。

综上所述,在本研究中通过组织病理学染色证明了煤尘浓度的增加对小鼠肺内毒性作用越大;煤尘浓度越高 S100A8 蛋白上调越显著;RAGE/NF- $\kappa$ B 信号轴加速煤尘诱导的肺纤维化。提示,S100A8 过表达可能是通过 RAGE/NF- $\kappa$ B 信号轴参与煤尘诱导肺纤维化的潜在作用机制,可能作为尘肺病潜在的治疗靶点。

#### 参考文献:

- [1] SONG Y,SOUTHAM K,BEAMISH B B,et al. Effects of chemical composition on the lung cell response to coal particles: Implications for coal workers' pneumoconiosis [J]. *Respirology*,2022,27(6):447-454.
- [2] 顾天成,李恒. 新发职业性尘肺病十年降幅超五成[N]. 新华每日电讯,2022-04-28(003).
- [3] MOSTAFA M M,BANSAL A,MICHI A N,et al. Genomic determinants implicated in the glucocorticoid-mediated induction of KLF9 in pulmonary epithelial cells[J]. *J Biol Chem*,2020,296:100065.
- [4] METZEMAEKERS M,GOUWY M,PROOST P. Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords[J]. *Cell Mol Immunol*,2020,17(5):433-450.
- [5] WANG S W,SONG R,WANG Z Y,et al. S100A8/A9 in inflammation[J]. *Front Immunol*,2018,9:1298.
- [6] 顾晓菲,陈鑫森,陈慧君,等. S100A8/RAGE、Caveolin-1 在中性粒细胞性支气管哮喘大鼠中的作用及罗红霉素对其表达的影响[J]. *中华结核和呼吸杂志*,2019,42(11):845-851.
- [7] 辛星. S100A8/A9 调控 RAGE/JAK2/STAT3 信号通路介导子宫内纤维化在宫腔粘连发生及转归中的作用机制研究[D]. 沈阳:中国医科大学,2022.
- [8] MU M,LI B,ZOU Y J,et al. Coal dust exposure triggers heterogeneity of transcriptional profiles in mouse pneumoconiosis and Vitamin D remedies[J]. *Part Fibre Toxicol*,2022,19(1):7.

- [9] 李绿梅. RhoA-ROCK2 通路参与幼年慢性应激大鼠情绪、认知障碍及海马突触可塑性改变的研究[D]. 银川: 宁夏医科大学, 2023.
- [10] SEO J, HWANG H, SOHN H, et al. Cyclin Y regulates spatial learning and memory flexibility through distinct control of the actin pathway[J]. *Mol Psychiatry*, 2023, 28(3):1351-1364.
- [11] 程厚之, 张丽凤, 梁祚仁, 等. 五味子乙素对铝中毒大鼠学习记忆及突触相关蛋白表达影响的研究[J]. *右江民族医学院学报*, 2021, 43(6):714-718.
- [12] 余明月, 苏凯奇, 申昕, 等. 电针对脑缺血再灌注学习记忆障碍大鼠海马源性神经营养因子转化和突触可塑性的影响[J]. *针刺研究*, 2024, 49(04):391-397.
- [13] 杨嘉誉, 马小涵, 张蕴, 等. 电针神庭、百会穴通过 ARC/GluR2/NMDAR2B 调节海马突触可塑性改善 MCAO/R 大鼠学习记忆的机制研究[J]. *中国中医急症*, 2024, 33(3):409-414.
- [14] WANG Q Z, KOHLS W, WILLS M, et al. A novel stroke rehabilitation strategy and underlying stress granule regulations through inhibition of NLRP3 inflammasome activation[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(1):e14405.
- [15] DING B, LIN C H, LIU Q, et al. Tanshinone IIA attenuates neuroinflammation via inhibiting RAGE/NF- $\kappa$ B signaling pathway in vivo and in vitro[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1):302.

收稿日期: 2024-09-09; 修回日期: 2024-10-20

(上接第 847 页)

- [9] WANG W Y, MU M, ZOU Y J, et al. Glycogen metabolism reprogramming promotes inflammation in coal dust-exposed lung [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 242:113913.
- [10] WANG W Y, MU M, ZOU Y J, et al. Inflammation and fibrosis in the coal dust-exposed lung described by confocal Raman spectroscopy[J]. *PeerJ*, 2022, 10:e13632.
- [11] 李淑吟. 二陈汤加味治疗尘肺病痰湿蕴肺型咳嗽的临床观察[J]. *西藏医药*, 2024, 45(3):130-132.
- [12] WU B C, SODJI Q H, OYELERE A K. Inflammation, fibrosis and cancer: mechanisms, therapeutic options and challenges[J]. *Cancers*, 2022, 14(3):552.
- [13] GEBHARAT C, NÉMETH J, ANGEL P, et al. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72(11):1622-1631.
- [14] HESSELSTRAND R, WILDT M, et al. Biomarkers from bronchoalveolar lavage fluid in systemic sclerosis patients with interstitial lung disease relate to severity of lung fibrosis[J]. *Respir Med*, 2013, 107(7):1079-1086.
- [15] PARK E Y, SEO M J, PARK J H. Effects of specific genes activating RAGE on polycystic kidney disease[J]. *Am J Nephrol*, 2010, 32(2):169-178.
- [16] KARIKÓ K, WEISSMAN D, WELSH F A. Inhibition of toll-like receptor and cytokine signaling: a unifying theme in ischemic tolerance [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24(11):1288-1304.
- [17] LU Z R, DENG M G, MA G S, et al. TRIM38 protects H9c2 cells from hypoxia/reoxygenation injury via the TRAF6/TAK1/NF- $\kappa$  B signalling pathway [J]. *PeerJ*, 2022, 10:e13815.
- [18] FAN Y H, YU Y, MAO R F, et al. TAK1 Lys-158 but not Lys-209 is required for IL-1 $\beta$ -induced Lys63-linked TAK1 polyubiquitination and IKK/NF- $\kappa$ B activation [J]. *Cell Signal*, 2011, 23(4):660-665.
- [19] ESPADA C E, ST GELAIS C, BONIFATI S, et al. TRA-F6 and TAK1 contribute to SAMHD1-mediated negative regulation of NF- $\kappa$ B signaling [J]. *J Virol*, 2021, 95(3):e01970-20.
- [20] ARAKI K, KINOSHITA R, TOMONOBU N, et al. The heterodimer S100A8/A9 is a potent therapeutic target for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *J Mol Med*, 2021, 99(1):131-145.

收稿日期: 2024-07-27; 修回日期: 2024-09-07