

本文引文格式:王菲,严瑞卿,李霞,等. 蛋白激酶 C 抑制剂通过减少 NETs 形成减轻二氧化硅诱导的肺纤维化[J]. 右江民族医学院学报, 2025, 47(4): 551-558.

【论著与临床报道】

蛋白激酶 C 抑制剂通过减少 NETs 形成 减轻二氧化硅诱导的肺纤维化

王菲^{1,2}, 严瑞卿^{2,3}, 李霞^{1,2}, 谢子豪^{1,2}, 穆敏^{2,3}

1. 安徽理工大学医学院医学前沿实验中心系, 安徽 淮南 232001;
2. 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;
3. 安徽理工大学公共卫生学院职业卫生工程系, 安徽 合肥 231131)

摘要:目的 探究二氧化硅暴露致肺纤维化的分子机制(聚焦 NETs 的作用), 并评估蛋白激酶 C 抑制剂(LXS196)在不同时间窗的治疗效果。**方法** 构建硅沉着病小鼠模型, 将 C57BL/6 雄性小鼠随机分为 5 组($n=5$), ①对照组(Veh 组): 鼻腔滴注生理盐水 60 μ L; ②二氧化硅暴露组(CS 组): 鼻腔滴注二氧化硅悬液 60 μ L(12 mg/60 μ L); ③治疗组: 二氧化硅暴露后分别于第 1~2 天(LXS 1 d 组)、第 5~6 天(LXS 5 d 组)和第 12~13 天(LXS 12 d 组)腹腔注射蛋白激酶 C 抑制剂 LXS196(15 mg/kg·d, 连续 2 d)。本研究通过监测小鼠体重变化及肺功能呼吸参数, 评估硅沉着病小鼠的生理状态。实验终点处死小鼠后取肺组织, 采用组织病理学技术(HE、Masson 染色)观察二氧化硅暴露后小鼠肺部炎症反应及纤维化程度, 并通过免疫荧光染色共标检测中性粒细胞胞外陷阱(NETs)的表达变化。蛋白质免疫印迹法检测肺组织中 MPO、CitH3、 α -SMA 和 TGF- β 1 等关键蛋白的表达水平。**结果** 与 Veh 组相比, CS 组小鼠的体重恢复缓慢($P<0.05$), 小鼠呼吸功能受损, 其中 LXS 5 d 治疗组在用药后体重和肺功能改善最明显($P<0.05$)。病理学检查表明, 二氧化硅暴露显著加剧了肺部炎症反应和纤维化进程($P<0.001$), 同时表明暴露后第 5 天给药治疗效果最为显著($P<0.05$)。分子机制研究显示, CS 组小鼠肺组织中 MPO、CitH3、 α -SMA 和 TGF- β 1 等与炎症和纤维化相关蛋白表达水平均显著上调($P<0.05$), 而 LXS196 治疗可显著抑制这些指标的表达水平($P<0.05$)。**结论** 二氧化硅暴露通过诱发强烈的炎症反应并产生 NETs 导致严重肺毒性, LXS196 治疗后减少了 NETs 的释放, 进而缓解了硅沉着病肺纤维化, 其中在二氧化硅暴露后第 5 天、第 6 天时(急性期)(LXS 5 d 组)给药治疗效果最明显, 这一发现为阐明二氧化硅暴露致肺纤维化的分子机制提供了新的实验依据, 并为治疗硅沉着病肺纤维化提供新思路。

关键词: 矽肺; 肺纤维化; 中性粒细胞胞外陷阱; 蛋白激酶 C

中图分类号: R598 文献标识码: A 文章编号: 1001-5817(2025)04-0551-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-5817.2025.04.001

Protein kinase C inhibitor attenuates silica-induced pulmonary fibrosis by reducing NETs formation

WANG Fei^{1,2}, YAN Ruiqing^{2,3}, LI Xia^{1,2}, XIE Zihao^{1,2}, MU Min^{2,3}

1. Department of Medical Frontier Experimental Center, School of Medicine, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, Anhui, China;
2. 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;
3. Department of Occupational Health Engineering, School of Public Health, Anhui University of Science and Technology, Hefei 231131, Anhui, China)

基金项目: 国家自然科学基金项目(82304112)

第一作者: 王菲, 在读硕士研究生, 研究方向: 职业健康, E-mail: 19861400683@163.com

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

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanisms underlying silica-induced pulmonary fibrosis, with a focus on the role of neutrophil extracellular traps (NETs), and to evaluate the therapeutic efficacy of Protein kinase C inhibitor (LXS196) administered at different time windows. **Methods** A murine silicosis model was established using male C57BL/6 mice randomly allocated into five groups ($n=5$ per group): ① Vehicle group (Veh group): intranasal instillation of 60 μL normal saline; ② Silica-exposed group (CS group): intranasal instillation of 60 μL silica suspension (12 mg/60 μL); ③ Treatment groups: protein kinase C inhibitor LXS196 (15 mg/kg \cdot d, intraperitoneal injection for 2 consecutive days) administered at different time points post-silica exposure: Days 1~2 (LXS 1 d group), Days 5~6 (LXS 5 d group), and Days 12~13 (LXS 12 d group). Physiological status was assessed by monitoring body weight changes and pulmonary function parameters. At the experimental endpoint, mice were euthanized and lung tissues were harvested for histopathological analysis (HE, Masson staining) to evaluate inflammation and fibrosis severity, and immunofluorescence co-staining was performed to detect changes in NETs expression. Western Blot quantified protein expression levels of key proteins such as MPO, CitH3, α -SMA, and TGF- β 1 in lung tissues. **Results** Compared to the Veh group, CS group mice exhibited delayed body weight recovery ($P<0.05$) and impaired respiratory function. The LXS 5 d group demonstrated the most significant improvements in body weight and pulmonary function post-treatment ($P<0.05$). Histopathological analysis revealed that silica exposure markedly exacerbated pulmonary inflammation and fibrosis progression ($P<0.001$), with therapeutic intervention initiated at day 5 showing maximal efficacy ($P<0.05$). Molecular mechanism studies showed that the expression levels of inflammation- and fibrosis-related proteins such as MPO, CitH3, α -SMA, and TGF- β 1 in lung tissues of mice in the CS group were significantly upregulated ($P<0.05$), while LXS196 treatment significantly inhibited the expression levels of these indicators ($P<0.05$). **Conclusion** Silica exposure induces severe pulmonary toxicity by triggering robust inflammatory responses and NETs formation. LXS196 administration reduces NETs release and mitigates silicosis-associated pulmonary fibrosis, with optimal efficacy observed during the acute phase (Days 5~6 post-exposure, LXS 5 d group). These findings provide a novel experimental basis for elucidating the molecular mechanisms of silica-induced pulmonary fibrosis and offer new therapeutic strategies for the treatment of silicosis-associated pulmonary fibrosis.

Key words: silicosis; pulmonary fibrosis; neutrophil extracellular traps; Protein kinase C

硅沉着病(旧称矽肺病)的发病机制探索及防治策略研发已成为职业卫生与职业病学研究的关键方向。该疾病主要由职业暴露于结晶型游离二氧化硅颗粒所诱发,临床以渐进性肺部炎性损伤和不可逆性纤维化病变为典型病理特征^[1]。截至 2022 年底,我国职业性尘肺病累计报告 92.3 万例,其中硅沉着病因其快速进展、高致残率和高病死率成为最严重的亚型,但目前尚缺乏有效的靶向治疗药物^[2-3]。由此可见,阐明硅沉着病的分子发病机制,不仅能为其早期精准预防和靶向干预策略开辟新途径,还能为硅沉着病的防治工作提供科学依据。

中性粒细胞是人体和小鼠等哺乳动物中最丰富的先天免疫细胞,属于粒细胞亚类,在抗感染(尤其是细菌和真菌)和炎症反应中起关键作用^[4]。二氧化硅暴露后肺组织中形成了中性粒细胞胞外陷阱(Neutrophil Extracellular Traps, NETs),治疗后 NETs 数量减少,纤维化程度减轻^[5]。NETs 是中性粒细胞在激活状态下释放的一种网状结构,由解聚的染色质 DNA、颗粒蛋白(如 Myeloperoxidase, MPO)和组蛋白

及其修饰成分(如 Citrullinated Histone H3, CitH3)组成, MPO 和 CitH3 是 NETs 的主要标志物^[6-7]。在慢性炎症或持续性刺激条件下,中性粒细胞因无法有效清除致炎因素,进而通过释放 NETs 参与免疫应答,捕获并杀灭病原体^[8]。蛋白激酶 C(Protein kinase C, PKC)是一类丝氨酸/苏氨酸激酶,可以直接调控 NETs 的形成,在感染、自身免疫和纤维化疾病中起核心作用^[9]。蛋白激酶 C 抑制剂(Darovasertib, LXS196)是一种可治疗转移性葡萄膜黑色素瘤的药物,已有临床研究表明其毒性可控^[10]。本研究通过构建硅沉着病小鼠模型探讨二氧化硅暴露对小鼠肺部的损伤效应和分子机制,以及在不同时间段腹腔注射 LXS196 对硅沉着病小鼠的治疗作用,实验重点研究 NETs 在二氧化硅导致的肺纤维化进程中发挥的调控作用。该研究旨在为职业性硅沉着病的临床防治策略提供新的分子靶点和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 25 只 C57BL/6 雄性小鼠(8 周)购

自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司[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 °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《实验动物管理条例》(1988 年发布,2011 年、2017 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 MPO light chain/Myeloperoxidase(C-3)(sc390109)购自美国圣克鲁斯生物技术公司;Anit-Histone H3 (citrulline R2 + R8 + R17)(ab5103)购自艾博抗(上海)贸易有限公司;Rabbit Anti-TGF beta 1 antibody(bs-0086R)购自北京博奥森生物技术有限公司;Alpha smooth muscle actin Polyclonal antibody(14395-1-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 IgG(SA00001-1)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;TSAPLus 荧光双标三色染色试剂盒(绿光 iF488+红光 iF555)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;Darovasertib(Synonyms:LXS196;IDE196)(HY-101569)购自美迪西普亚医药科技(上海)有限公司;二氧化硅颗粒(S5631)、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate 分别购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司、默克密理博(中国)有限公司产品;DAPI(C1002)、4%多聚甲醛固定液(P0099-100mL)、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)和彩色预染蛋白分子量标准(6.5~270 kD Red)(BP-DL030)均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物实验设计 将 25 只 C57BL/6 雄性小鼠随机均分为 5 组,分别为:对照组(Veh 组),二氧化硅暴露组(CS 组),治疗组(LXS 1 d 组、LXS 5 d 组、LXS 12 d 组)。本实验通过鼻腔滴注的方式进行造模^[11],Roderick J 病理学分级 ≥ 2 级证明造模成功,该方法已在煤肺和硅沉着病小鼠模型中成功建立。在造模前,需对二氧化硅颗粒进行高温灭菌处理,随后用无菌生理盐水溶解二氧化硅颗粒,并将其封口后置于超声波震荡水浴锅,在 45~50 °C 条件下超声处理 20~30 min,以确保二氧化硅充分溶解。造模过程中,使用异氟烷对小鼠进行麻醉,待小鼠夹趾反射阴性,侧卧无自主翻身动作时,将小鼠置于手掌中使其身体保持直线,并用拇指轻轻抵住小鼠嘴巴,从鼻腔滴注二氧化硅悬液。滴注前先将二氧化硅悬液用振荡器振荡混匀,然后立即用移液枪吸出所需的二氧化硅悬液待用。成功建立的硅沉着病小鼠模型应表现出典型的病理特征,如肺泡炎症、纤维化改变及肺功能减退;此外,该模型

具有良好的稳定性,在相同实验条件下多次重复均可获得一致的结果。Veh 组小鼠通过鼻腔滴注 60 μ L 生理盐水,CS 组和治疗组小鼠通过鼻腔滴注 60 μ L 浓度为 12 mg/60 μ L 的二氧化硅悬液,基于先前研究表明炎症基因在二氧化硅暴露后第 7 天达到峰值^[12],所以将治疗组分为 LXS 1 d 组、LXS 5 d 组、LXS 12 d 组。具体给药方案为:LXS 1 d 组于实验第 1 天、第 2 天腹腔注射蛋白激酶 C 抑制剂;LXS 5 d 组在第 5 天、第 6 天给药;LXS 12 d 组于第 12 天、第 13 天给药,各组均每天记录 1 次小鼠体重,连续 21 d,第 21 天测肺功能。

1.2.2 肺组织取材 第 21 天测完肺功能后,对小鼠实施过量麻醉并取肺组织。操作时,首先固定小鼠的背部和尾部,然后通过腹腔注射戊巴比妥钠进行麻醉。待确保小鼠已死亡后,将其移至通风橱内,固定在泡沫板上。用镊子提起小鼠胸部皮肤,用剪刀剪开胸腔、腹腔皮肤和肋骨两侧,暴露心脏和肺脏。随后,剪断小鼠的腹主动脉,并将针头插入左心室,用生理盐水进行灌注,直至肺脏变白。完成后,取下整个肺组织,置于冰盒上,将右肺组织分为不同叶,分别存放于 4 个无酶 EP 管中,并迅速转移至 -80 °C 冰箱保存,以备后续 Western Blot 实验使用;左肺组织则放入 4%多聚甲醛溶液中固定,用于后续的染色切片分析。

1.2.3 HE 染色、Masson 染色观察小鼠肺组织形态

使用 PBS 和 4%多聚甲醛对小鼠进行灌流和固定处理,随后取出肺组织并置于 4%多聚甲醛溶液中固定 48~72 h。接下来,对组织进行包埋和切片处理,切片经过二甲苯 I 和二甲苯 II 脱蜡,再通过梯度酒精脱水。随后,使用 HE 和 Masson 染色试剂盒对切片进行染色。最后,用中性树胶封片,并在 BX53+DP74 显微镜下观察小鼠肺组织的肺泡结构、炎性浸润程度以及纤维化变化情况。通过 Pathology Scores 进行病理评分,等级 ≥ 1 即为出现炎性细胞浸润。

1.2.4 免疫荧光染色共标检测小鼠肺组织中 NETs 变化

小鼠肺组织石蜡切片在 60 °C 条件下烘 6~8 h,随后进行脱蜡、脱水,抗原修复 30 min,再用 3% H_2O_2 室温孵育 25 min 以阻断内源性过氧化物酶;用 3% BSA-PBS 溶液在室温下封闭 1 h,一抗在 4 °C 冰箱避光孵育过夜,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,向组织滴加 Alexa fluor 488 和 Alexa fluor 555 染色液室温避光孵育 10 min,PBS 洗涤后,细胞核用 DAPI 染色 10 min;使用抗 MPO 和 CitH3 的一抗进行双重免疫荧光标记,与一抗孵育过夜后用对应 HRP 二抗室温孵育 1 h,最后用抗荧光淬灭剂封片,使用激光扫描共聚焦显微镜对组织切片进行成像。MPO 阳性表达呈现绿色,CitH3 阳性表达呈现红色,NETs 阳性为 MPO 和 CitH3 共标,呈现黄色。

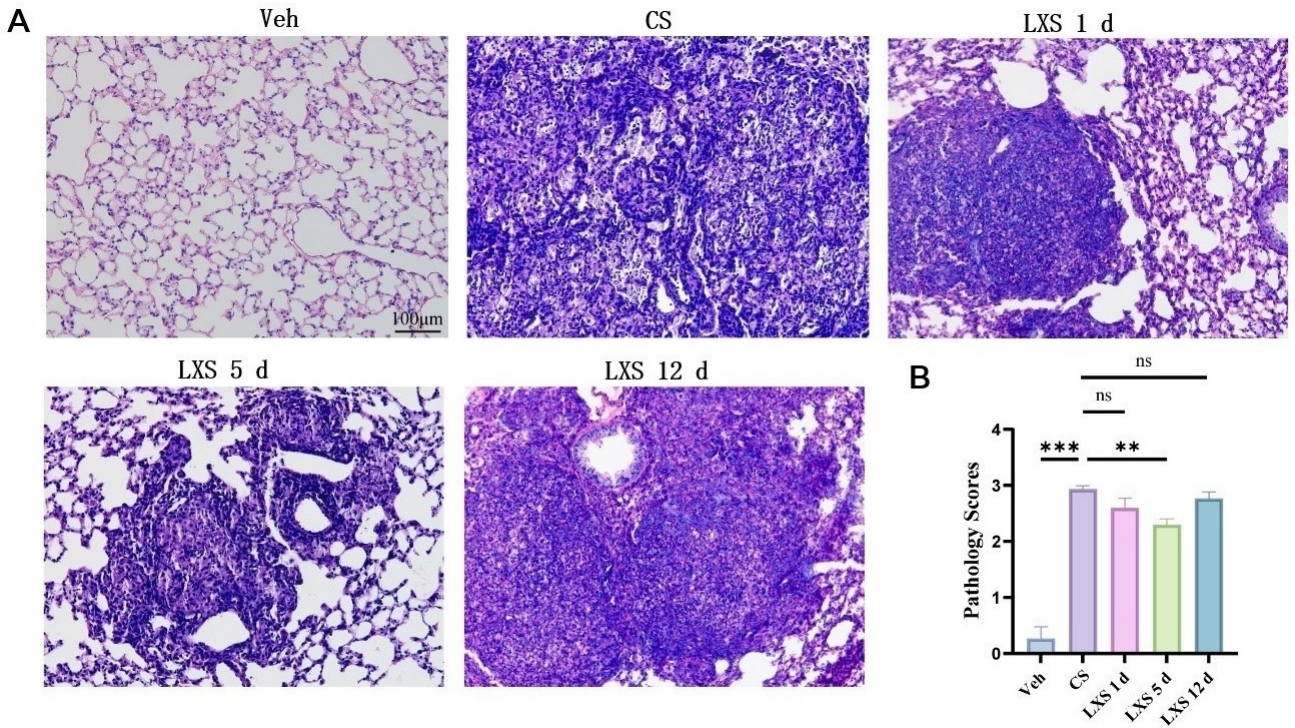
1.2.5 Western Blot 检测小鼠肺组织中 MPO、CitH3、TGF- β 1、 α -SMA 的蛋白表达量 取 20 mg 小鼠肺组织,加入 150 μ L 裂解缓冲液(含 RIPA、磷酸酶抑制剂及 PMSF),在冰上进行匀浆处理。随后,将样品置于 4 $^{\circ}$ C 摇床中持续振荡 2 h 以确保充分裂解。裂解完成后,样品在 4 $^{\circ}$ C 下以 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液用于蛋白质提取。使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度。接下来,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,将蛋白质样品上样后电泳分离,随后通过电转将蛋白质转移至 PVDF 膜上。膜经过封闭处理后,分别与针对目标蛋白的一抗在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。次日,使用相应的二抗在室温下孵育 1 h,最后通过 ECL 化学发光液进行显影。以 GAPDH 作为内参,利用 ImageJ

软件分析目标条带的灰度值,并计算相对表达量。

1.3 统计学方法 数据分析采用 GraphPad Prism 9.3 软件进行,所有实验均至少重复 3 次,结果以($\bar{x} \pm s$)表示。多组数据比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 二氧化硅暴露对小鼠肺部炎症的影响 HE 染色病理分析表明,相较于 Veh 对照组,CS 组实验鼠肺部可见严重的炎性细胞聚集,肺泡结构被破坏,部分区域肺泡壁显著增厚($P < 0.001$);LXS 1 d 组和 LXS 12 d 组与 CS 组相比差异无统计学意义($P > 0.05$);而 LXS 5 d 组肺部炎性细胞聚集区域相对较小,肺泡完整性更高($P < 0.05$)。见图 1。



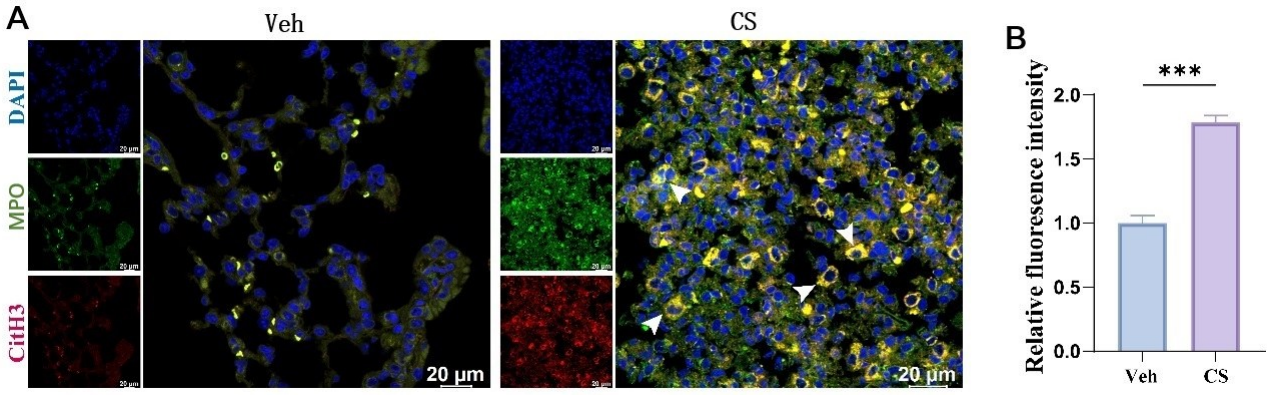
注:A为HE染色评估各组小鼠肺组织病理变化;B为病理评分(Pathology Scores)得分评估小鼠肺组织损伤情况。标尺长度:100 μ m;放大倍数: $\times 200$,** $P < 0.05$,*** $P < 0.001$, $n = 5$ 。

图 1 HE 检测二氧化硅暴露及不同时间治疗后小鼠肺组织的病理状态改变

2.2 二氧化硅暴露促进小鼠肺组织中 NETs 释放 免疫荧光染色显示,二氧化硅暴露后 MPO 和 CitH3 阳性共标显著升高趋势,即 NETs 释放增多($P < 0.001$)。见图 2。

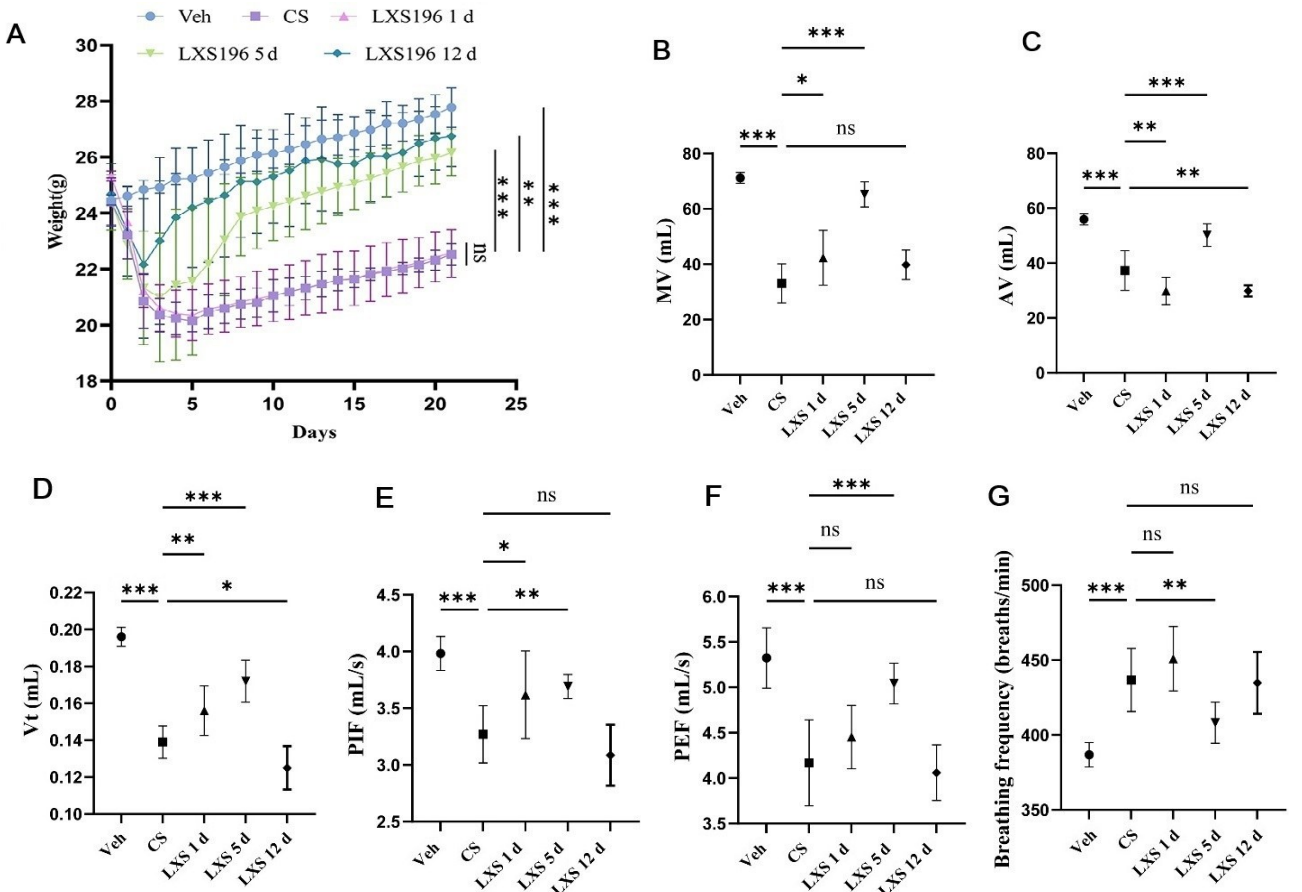
2.3 LXS196 抑制 NETs 释放,改善硅沉着病小鼠体重和肺功能 经过 21 d 连续体重测量发现,与 Veh 组相比,CS 组在初期体重下降最明显,说明二氧化硅导致肺部出现急性炎症,后期体重缓慢恢复,说明二氧化硅进一步导致肺部慢性损伤($P < 0.001$),治疗组中

仅有 LXS 5 d 组小鼠体重有明显的回升($P < 0.001$),LXS 1 d 组和 LXS 12 d 组则变化不明显。与 CS 组相比,LXS 1 d 组的 MV、Vt、PIF 值升高($P < 0.05$),AV 值降低($P < 0.05$),PEF、Breathing frequency 值差异无统计学意义($P > 0.05$);LXS 5 d 组的 MV、AV、Vt、PIF、PEF 升高($P < 0.05$),Breathing frequency 值降低($P < 0.01$);LXS 12 d 组 AV、Vt 值降低($P < 0.05$),MV、PIF、PEF、Breathing frequency 值差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 3。



注：A 为 Veh 组与 CS 组 NETs 阳性细胞表达；B 为肺组织中 NETs 阳性细胞表达的定量分析。
标尺长度：20 μm ；放大倍数： $\times 630$ ，*** $P < 0.001$ ， $n = 5$ 。

图 2 免疫荧光双重共标染色观察二氧化硅暴露后 NETs 的释放情况

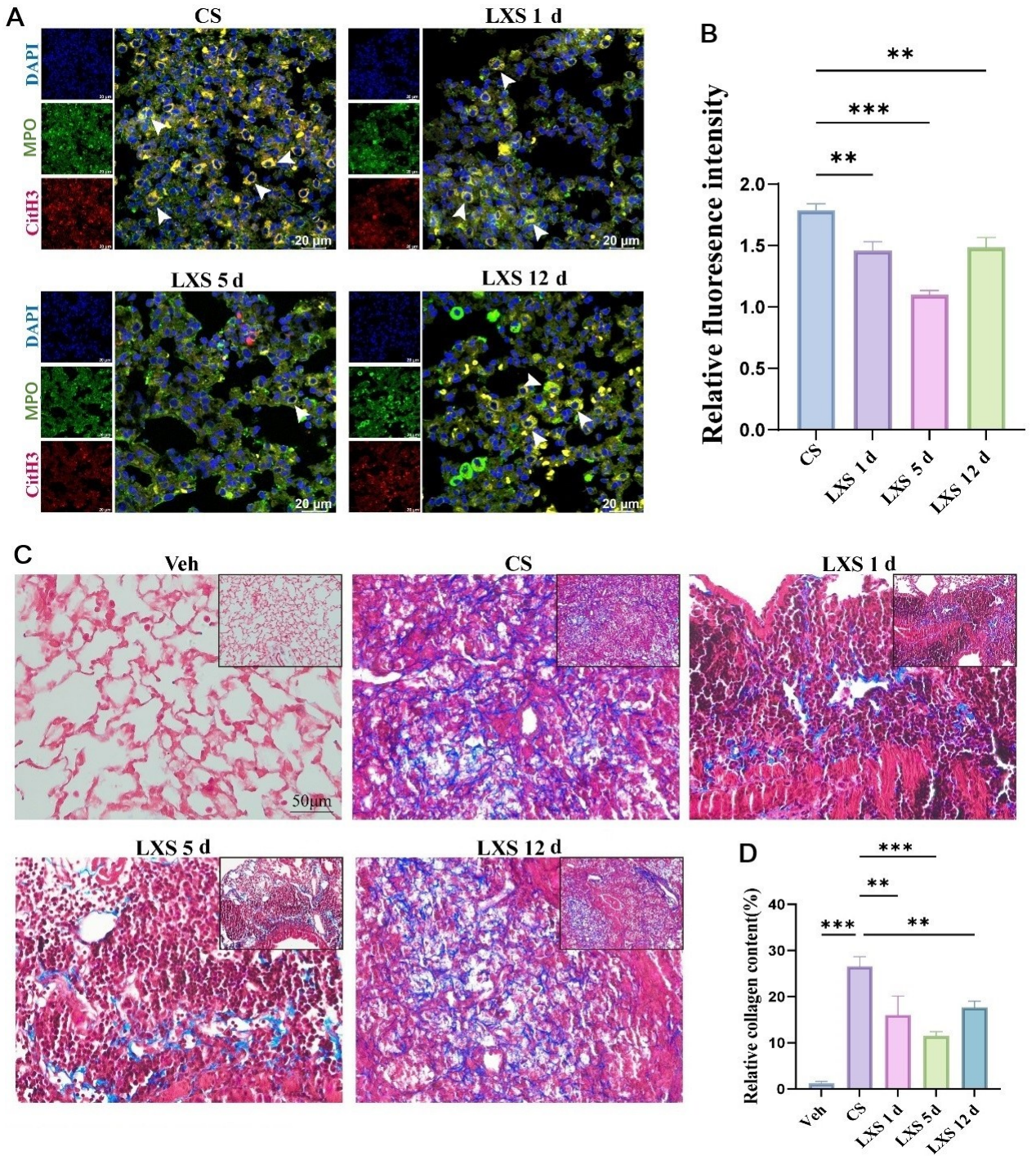


注：A 为小鼠 21 d 体重变化；B 为 MV(mL) 代表每分钟通气量；C 为 AV(mL) 代表累积体积代表；
D 为 Vt(mL) 代表潮气量；E. PIF(mL/s) 代表最大吸气流速；F 为 PEF(mL/s) 代表最大呼气流速；
G 为 Breathing frequency(breaths/min) 代表呼吸频率。* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ， $n = 5$ 。

图 3 小鼠体重和肺功能变化

2.4 LXS196 治疗后 MPO 和 CitH3 共标减少，即 NETs 释放减少，改善了小鼠硅沉着病肺纤维化。双重免疫荧光染色结果显示，与 CS 组相比，治疗组(LXS 1 d、5 d、12 d)的 MPO 和 CitH3 共标阳性细胞减少

($P < 0.05$)，其中 LXS 5 d 组共标的阳性细胞数量减少最明显($P < 0.001$)，即 NETs 释放显著降低；Masson 病理染色结果显示 LXS 5 d 组一定程度上改善了纤维化($P < 0.001$)，治疗效果最好。见图 4。



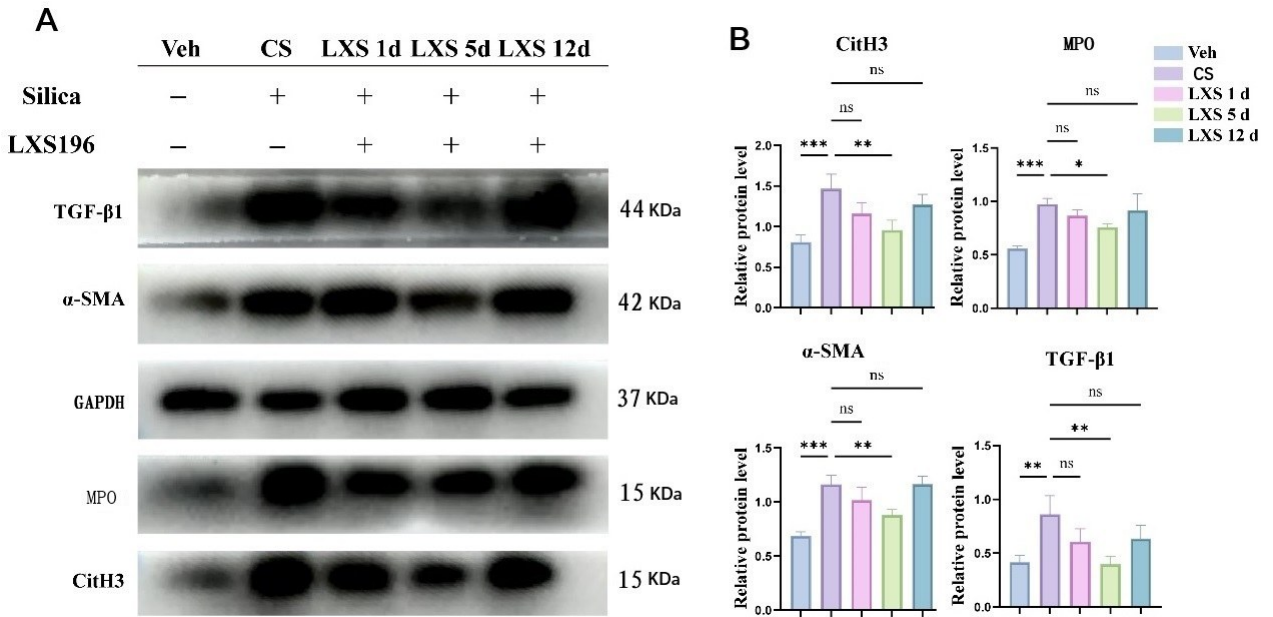
注:A为免疫荧光双重染色共标定位 NETs;B为肺组织中 NETs 阳性细胞定位的定量分析;C为 Masson 染色观察各组小鼠纤维化情况;D为相对胶原纤维面积百分比。 $** P < 0.05$, $*** P < 0.001$, $n = 5$ 。

图 4 免疫荧光染色和 Masson 观察 NETs 释放减少与纤维化的关系

(标尺长度:IF 为 20 μm ,Masson 为 50 μm ;放大倍数:IF 为 $\times 630$,Masson 为 $\times 400$)

2.5 Western Blot 结果显示 NETs 的释放增多时 α -SMA 和 TGF- β 1 等蛋白表达水平上调 与 Veh 组相比,CS 组 MPO、CitH3 蛋白表达水平上调 ($P < 0.001$),同时 α -SMA 和 TGF- β 1 蛋白表达水平也上调 ($P < 0.05$);与 CS 组相比,治疗组中 LXS 5 d 组中

MPO、CitH3、 α -SMA 和 TGF- β 1 蛋白表达水平下降 ($P < 0.05$),而 LXS 1 d 和 LXS 12 d 组中 MPO、CitH3、 α -SMA 和 TGF- β 1 蛋白表达水平下降但差异无统计学意义。见图 5。



注:A为各组 Western Blot 结果;B为 Veh 组与模型组蛋白表达水平比较的误差条形图。

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

图 5 Western Blot 实验检测 MPO、CitH3、 α -SMA 和 TGF- β 1 蛋白表达水平

3 讨论

当前有关硅沉着病的致病机制仍存在诸多未明之处。本实验采用鼻腔灌注二氧化硅悬液的方法建立二氧化硅暴露动物模型,重点探究二氧化硅对实验小鼠肺部毒性效应及其潜在的分子机制,以及蛋白激酶 C 抑制剂的治疗作用。

硅沉着病是一种由长期吸入二氧化硅粉尘引起的职业性肺病,其特征是慢性炎症、肺泡巨噬细胞活化及进行性肺纤维化^[13]。当外界病原体入侵或组织受损时,免疫系统会激活多种免疫细胞和生物活性物质,这些组分通过复杂的相互作用网络共同调控炎症进程^[14]。值得注意的是,若炎症反应过强或长期持续,则可能转变为致病因素,进而引发多种病理改变,包括组织纤维化等继发性病变^[15]。本实验研究发现 NETs 在硅沉着病小鼠肺组织中显著积聚。NETs 成分(如组蛋白、髓过氧化物酶等)可激活巨噬细胞,增强其促炎及促纤维化表型^[4]。而 NETs 作为 TGF- β 的上游触发因子可以通过 TGF- β /Smad2/3 导致肺纤维化^[16]。本实验病理学染色证明了二氧化硅暴露后对小鼠肺组织产生了严重的损伤,导致了严重的肺部炎症和纤维化。其中,NETs 在炎症反应的进展中具有关键性影响。免疫荧光双重染色结果显示,二氧化硅暴露后,NETs 释放显著增加,在 LXS196 治疗后,NETs 释放有所减少,其中 LXS 5 d 组 NETs 形成显著减少,肺功能结果显示,与 LXS 1 d 组和 LXS 12 d 组相比,LXS 5 d 组 MV、AV、Vt、PIF、PEF、Breathing frequency 的值更接近 Veh 组,并且统计学差异更显著,

一定程度上缓解了肺部炎症并改善了纤维化的发展。

有研究表明^[17],当微生物病原体体积超过中性粒细胞的吞噬能力时,中性粒细胞会通过释放 NETs 这一特殊机制来捕获和清除病原体,但是过度的 NETs 的形成造成组织的损伤^[18]。NETs 的形成存在两种途径——裂解型和非裂解型^[19]。裂解型的 NETs 主要由细菌、真菌、脂多糖等刺激产生,中性粒细胞会发生膜破裂,染色质解聚,释放颗粒蛋白,是一种程序性死亡方式,被认为会加剧炎症;非裂解型 NETs 主要由血小板激活或低强度(如低浓度佛波酯)刺激产生,此时中性粒细胞通过囊泡释放 DNA,而细胞膜是完整的中性粒细胞可以继续发挥原有的功能^[20]。本实验结果显示在暴露后第 5、6 天(LXS 5 d 组)腹腔注射 LXS 196 一定程度上缓解了纤维化,因此推测二氧化硅暴露后形成的 NETs 为裂解型。本课题研究了 NETs 的形成与纤维化之间的关系,Western Blot 结果显示,二氧化硅暴露后肺组织中的 MPO、CitH3、 α -SMA 和 TGF- β 1 等蛋白表达升高,而在第 5、6 天腹腔注射 LXS196 之后(LXS 5 d 组)蛋白表达水平明显有所下降,这说明 NETs 的形成确实与纤维化存在一定程度的联系。NETs 形成的早期或许可以通过捕获二氧化硅发挥保护作用,但过度形成 NETs 会导致病理损伤。本研究发现了在暴露后第 5、6 天(LXS 5 d 组)腹腔注射 LXS 196 效果较好,但并没有完全遏制硅沉着病肺纤维化的发生和发展,如何选择性清除致病性 NETs 而不影响宿主防御仍需探索。NETs 通过炎症放大、

促纤维化信号等加速硅沉着病进展,靶向 NETs 形成或降解(如 DNase I、PAD4 抑制剂)可能成为新型治疗策略。未来研究需结合单细胞测序和基因编辑技术,进一步明确 NETs 亚群及其在疾病不同阶段的作用。本研究的新颖之处在于揭示了二氧化硅暴露后肺组织中 NETs 释放显著增多,并能够触发小鼠肺部纤维化病变,并首次发现通过腹腔注射 LXS196 可以减少 NETs 的释放,并在一定程度上缓解了纤维化,这一发现成为本研究的创新性突破。

综上所述,本研究通过病理学分析发现,二氧化硅暴露后对实验小鼠肺部组织造成了严重损伤,同时 NETs 释放显著上升。Western Blot 数据表明,NETs 的增加会促进肺组织中 α -SMA 和 TGF- β 1 相关蛋白的表达,进而导致严重的肺纤维化,在使用 LXS196 抑制 NETs 释放后 α -SMA 和 TGF- β 1 蛋白的表达水平降低,Masson 染色显示纤维化程度减轻。这些结果提示,NETs 可能在二氧化硅所致肺纤维化的发生发展过程扮演重要角色,但 NETs 抑制剂从开发到临床应用仍面临诸多挑战,包括体内 NETs 活性的精准检测与调控等技术瓶颈。目前 NETs 在纤维化中的作用机制尚未完全阐明,需进一步开展基础与临床研究。这一发现为硅沉着病的分子靶向治疗提供了新的理论依据和研究方向。

参考文献:

- [1] 柳彤彤,韩燕星,蒋建东,等.矽肺药物治疗的研究进展[J].药学报,2023,58(5):1196-1203.
- [2] LIU Y P,ZHANG X X,WANG J,et al. ZC3H4 regulates infiltrating monocytes, attenuating pulmonary fibrosis through IL-10[J]. Respir Res,2022,23(1):204.
- [3] LIU X,JIANG Q T,WU P H,et al. Global incidence, prevalence and disease burden of silicosis: 30 years' overview and forecasted trends[J]. BMC Public Health,2023,23(1):1366.
- [4] ZHOU X Y,JIN S C,PAN J Y,et al. Damage associated molecular patterns and neutrophil extracellular traps in acute pancreatitis[J]. Front Cell Infect Microbiol,2022,12:927193.
- [5] SUN Q X,TAO X R,LI B,et al. C-X-C-chemokine-receptor-type-4 inhibitor AMD3100 attenuates pulmonary inflammation and fibrosis in silicotic mice[J]. J Inflamm Res,2022,15:5827-5843.
- [6] XIONG Y C,LIU S,LIU Y,et al. PI3K γ promotes neutrophil extracellular trap formation by noncanonical pyroptosis in abdominal aortic aneurysm[J]. JCI Insight,2024,9(16):e183237.
- [7] SHI M Y,XUE Q,XIE J H,et al. Protective effect of Shenqi Wenfei Formula against lipopolysaccharide/ciga-

rette smoke-induced COPD in Rat based on gut microbiota and network pharmacology analysis[J]. Front Microbiol,2024,15:1441015.

- [8] CASTANHEIRA F V S,KUBES P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation[J]. Blood,2019,133(20):2178-2185.
- [9] TACKENBERG H,MÖLLER S,FILIPPI M D,et al. The small GTPase Cdc42 negatively regulates the formation of neutrophil extracellular traps by engaging mitochondria[J]. Front Immunol,2021,12:564720.
- [10] PIPERNO-NEUMANN S,CARLINO M S,BONI V,et al. A phase I trial of LXS196, a protein kinase C (PKC) inhibitor, for metastatic uveal melanoma. [J]. Br J Cancer,2023,128(6):1040-1051.
- [11] 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.
- [12] HASEGAWA Y,FRANKS J M,TANAKA Y,et al. Pulmonary osteoclast-like cells in silica induced pulmonary fibrosis[J]. Sci Adv,2024,10(28):eadl4913.
- [13] LEUNG J,CHANG M,MOORE R E,et al. Gasdermin D and gasdermin E are dispensable for silica-mediated IL-1 β secretion from mouse macrophages[J]. Immunohorizons,2024,8(9):679-687.
- [14] BIEBER K,AUTENRIETH S E. Dendritic cell development in infection[J]. Mol Immunol,2020,121:111-117.
- [15] ZHAO Z,ZHU Y J,WAN D F. Exercise and tissue fibrosis: recent advances in therapeutic potential and molecular mechanisms [J]. Front Endocrinol (Lausanne),2025,16:1557797.
- [16] WU X J,YANG Y. Neutrophil extracellular traps (NETs) and fibrotic diseases [J]. Int Immunopharmacol,2024,133:112085.
- [17] THIAM H R,WONG S L,WAGNER D D,et al. Cellular mechanisms of NETosis[J]. Annu Rev Cell Dev Biol,2020,36:191-218.
- [18] ASCHENBRENNER A C,MOUKTAROUDI M,KRÄMER B,et al. Disease severity-specific neutrophil signatures in blood transcriptomes stratify COVID-19 patients [J]. Genome Med,2021,13(1):7.
- [19] SEHGAL R,KAUR N,MAIWALL R,et al. Plasma proteomic analysis identified proteins associated with faulty neutrophils functionality in decompensated cirrhosis patients with sepsis[J]. Cells,2022,11(11):1745.
- [20] LI C T,WU C X,LI F F,et al. Targeting neutrophil extracellular traps in gouty arthritis: insights into pathogenesis and therapeutic potential [J]. J Inflamm Res,2024,17:1735-1763.

收稿日期:2025-04-15;修回日期:2025-05-20

(本文编辑 钟琳)