分 类 号_____ 学号 D201078118

学校代码 10487 密级_____

華中科技大學

博士学位论文

白介素-1β 在石英致肺脏、心脏、肾脏炎性和纤维化反应过程中的作用及机制研究

学位申请人： 郭嘉丽

学 科 专 业： 劳动卫生与环境卫生学

指 导 教 师： 陈卫红 教授

答 辩 日 期： 2013 年 5 月

A dissertation submitted to Huazhong University of Science and Technology for the Degree of Doctor

The role of interleukin-1β in silica-induced pulmonary, cardiac and renal inflammation and fibrosis

Candidate : Jiali Guo

Major : Occupational & Environmental Health

Supervisor: Prof. Weihong Chen

Huazhong University of Science & Technology

Wuhan 430030, P. R. China

May, 2013

独创性声明

本人郑重声明，本学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果的总结。尽我所知，除文中已经标明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本人将承担本声明引起的一切法律后果。

学位论文作者签名：

日期：　　年　　月　　日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权华中科技大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密□ ，在_____年解密后适用本授权书。

本论文属于

不保密□。

（请在以上方框内打“√”）

学位论文作者签名：　　指导教师签名：

日期：　　年　　月　　日　　日期：　　年　　月　　日

目　录

英文缩写 ……1

摘　要 ……3

Abstract ……6

前　言 ……10

第一部分　小鼠石英暴露后体内 IL-1β 的变化及 IL-1β 抗体的中和效力 ……12

材料与方法 ……12

结　果 ……15

讨　论 ……18

第二部分　IL-1β 在石英导致矽肺发病过程中的作用 ……20

第一节　IL-1β 在石英导致肺损伤中的作用 ……20

材料和方法 ……21

结　果 ……22

讨　论 ……24

第二节 IL-1β 在石英导致肺部炎性反应中的作用 ……25

材料和方法 ……26

结　果 ……29

讨　论 ……36

第三节 IL-1β 在石英导致肺部纤维化中的作用 ……38

材料和方法 ……38

结　果 ……44

讨　论 ……50

第三部分　石英暴露所致心肾炎性及纤维化反应和 IL-1β 在该反应中的作用 ……52

第一节 石英暴露所导致的心脏炎性及纤维化反应和 IL-1β 在该反应中的作用 ····52
材料和方法 ·····53
结　果 ·····55
讨　论 ·····62
第二节 石英暴露所导致的肾脏炎性及纤维化反应和 IL-1β 在该反应中的作用 ····65
材料和方法 ·····65
结　果 ·····67
讨　论 ·····75
结　论 ·····78
创新与不足 ·····79
参考文献 ·····80
综　述 ·····94
附　录 ·····115
致　谢 ·····117

英文缩写

英文缩写	英文全称	中文全称
AKP	alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	凋亡相关点样蛋白
BALF	bronchoalveolar lavage fluid	肺泡灌洗液
CASPASE-1	cysteine-containing aspartate-specific protein-1	天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1
DAMP	danger associated molecular patterns	危险相关分子模式
DEPC	diethylpyroearbonate	二乙基焦磷酰胺
ECM	extracellular matrix	细胞外基质
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
HE	hematoxylin and eosin	苏木素-伊红
IFN-γ	interferon-gamma	γ-干扰素
IL	interleukin	白介素
IL-Ra	interleukin receptor antagonist	IL-受体拮抗剂
LDH	lactate dehydrogenase	乳酸脱氢酶
LRR	leucine-rich repeats	富含亮氨酸的重复单位
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1	单核细胞趋化蛋白 1
NF-κb	nuclear factor-κb	核因子卡波粒
NO	nitric oxide	一氧化氮
NLRs	NOD-like receptors	NOD 样受体
OD	optical density difference	吸光度
PAMP	pathogen associated molecular patterns	病原相关分子模式

PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PRR	pattern recognition receptors	模式识别受体
PYD	pyrin domain	热蛋白结构域
ROS	reactive oxygen species	活性氧簇
RT-PCR	reverse transcription-PCR	逆转录聚合酶链反应
TGF-β1	transforming growth factor-β1	转化生长因子-β
TLRs	Toll-like receptors	Toll 样受体
TNF-α	tumor necrosis factor-α	肿瘤坏死因子-α
TP	total protein	总蛋白

白介素-1β 在石英致肺脏、心脏、肾脏炎性和纤维化反应过程中的作用及机制研究

学位申请人：郭嘉丽

导　　师：陈卫红 教授

摘　要

目的：石英粉尘广泛存在于采矿、建筑和水泥制造等生产场所空气中。除职业暴露外，工业污染、沙尘暴、火山爆发等也可以造成生活环境中石英的暴露。石英的暴露严重危害人体健康，其导致的职业病——矽肺就是一种由于长期吸入石英粉尘而形成的以肺纤维化为特征的疾病，其发病机制仍不十分清楚。此外，流行病学研究显示，石英暴露与工人心脏和肾脏疾病的高发可能有关，但石英机体暴露后导致的具体的心脏和肾脏改变仍不清楚。既往研究表明炎性反应和纤维化是石英导致矽肺发病过程中的两个基本反应。白介素（IL）-1β 作为一种重要的前致炎性因子，已经被证明在多种疾病如糖尿病、关节炎和矽肺的炎性反应中发挥重要作用。我们前期研究也发现石英可诱导巨噬细胞释放 IL-1β。为了系统研究 IL-1β 在石英致矽肺发病过程中的作用及机制，以及石英导致的心脏、肾脏损伤和 IL-1β 在该损伤过程中的作用，我们利用小鼠作为实验对象进行研究。本研究的主要目的是：（1）探讨 IL-1β 在矽肺炎性反应和纤维化过程中的作用以及 IL-1β 通过何种机制发挥该作用；（2）观察石英暴露是否引发小鼠心脏和肾脏的炎性反应及纤维化反应；（3）探讨 IL-1β 在石英暴露导致的心肾改变中的作用。

方法：采用标准石英粉尘悬液气管灌注的方法构建小鼠矽肺模型，通过使用 IL-1β 抗体中和的方法形成小鼠 IL-1β 中和模型。实验使用 128 只 C57BL/6 小鼠，随机分成空白对照组、生理盐水组、石英组、石英+IL-1β 抗体组，每组 32 只；分别在灌肺处理后 1、7、28、84 d 各处死 8 只小鼠，进行如下指标的检测：

（1）酶联免疫吸附试验法（ELISA）测定小鼠肺泡灌洗液和血清中的 IL-1β 水平，评估 IL-1β 抗体的中和效力。

（2）肺脏：肺组织制作病理切片，进行 H&E 和 Masson 染色，分别评估小鼠肺

部炎性反应和纤维化反应程度；检测肺泡灌洗液中总蛋白（TP）、乳酸脱氢酶（LDH）和碱性磷酸酶（AKP），观察小鼠肺部损伤水平；对小鼠肺泡灌洗液中细胞总数、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和淋巴细胞进行计数，并用 ELISA 法测定肺泡灌洗液中肿瘤坏死因子-α（TNF-α）和单核细胞趋化蛋白-1（MCP-1）含量，评价小鼠肺部炎性反应水平；实时荧光定量 PCR 法检测肺组织转化生长因子-β（TGF-β）、I 型胶原和纤维粘连素 mRNA 水平，评价小鼠肺纤维化情况；ELISA 法检测肺泡灌洗液中 Th1 型免疫应答代表性细胞因子 γ-干扰素（IFN-γ）和 Th2 型免疫应答代表性细胞因子 IL-4，评价小鼠肺部 Th1/Th2 平衡水平。

（3）心脏：对各组小鼠心脏组织中的炎性指标（IL-1β、IL-6、TNF-α、MCP-1）、纤维化指标（TGF-β、I 型胶原、III 型胶原、纤维粘连素）和 Th1/Th2 平衡指标（IFN-γ、IL-13）的 mRNA 水平进行实时荧光定量 PCR 检测，观察石英暴露导致小鼠心脏组织的炎性和纤维化反应。

（4）肾脏：对各组小鼠肾脏组织中的炎性指标（IL-1β、IL-6、TNF-α）、纤维化指标（TGF-β、I 型胶原、III 型胶原、纤维粘连素）和 Th1/Th2 平衡指标（IFN-γ、IL-4）的 mRNA 水平进行实时荧光定量 PCR 检测，观察石英暴露导致小鼠肾脏组织的炎性和纤维化反应。

结果：本研究结果显示：

（1）加入 IL-1β 抗体后，小鼠肺泡灌洗液和血清的 IL-1β 水平较石英组在染尘后 7、28、84 d 均显著降低，差异有统计学意义（P<0.01）。

（2）石英组和石英+IL-1β 抗体组小鼠肺组织病理切片在染尘后 1、7、28、84 d 均可看到明显的炎性反应，其评分结果与对照组相比，差异有统计学意义（P<0.01），两组在染尘后 28、84 d 均可看到明显的胶原沉积，其评分结果与对照组相比，差异有统计学意义（P<0.01）；石英+IL-1β 抗体组上述改变较同期的石英组明显减轻，差异有统计学意义（P<0.05）。

（3）石英组和石英+IL-1β 抗体组小鼠肺泡灌洗液中 TP、LDH 和 AKP 水平在染尘后 1、7、28、84 d 均显著升高；与对照组相比，差异有统计学意义（P<0.01）；石英+IL-1β 抗体组小鼠上述指标在染尘后第 1 d 均低于石英组，差异有统计学意义（P<0.05）。

（4）石英组和石英+IL-1β 抗体组小鼠肺泡灌洗液中细胞总数、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和淋巴细胞数目及 TNF-α 和 MCP-1 含量在染尘后 1、7、28、84 d 均显著升高，与对照组相比，差异有统计学意义（P<0.01）；石英+IL-1β 抗体组小鼠肺泡灌洗

液中细胞总数、巨噬细胞、淋巴细胞数目在染尘后 4 个时间点上较同期石英组显著降低，差异有统计学意义（P<0.01）；TNF-α 含量在染尘后 7、28、84 d 较同期石英组显著降低，差异有统计学意义（P<0.01）；MCP-1 含量在染尘后 1、7 d 较同期石英组显著降低，差异有统计学意义（P<0.01）。

（5）与对照组相比，石英组肺组织中 TGF-β、I 型胶原、纤维粘连素 mRNA 水平在染尘后 28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（P<0.01）；石英+IL-1β 抗体组小鼠上述 3 个指标较同期石英组显著降低，差异有统计学意义（P<0.01）。

（6）石英组和石英+IL-1β 抗体组小鼠肺部 IFN-γ/IL-4 比值较对照组显著降低，差异有统计学意义（P<0.01），石英+IL-1β 抗体组小鼠肺部 IFN-γ/IL-4 比值较同期石英组有明显回升，差异有统计学意义（P<0.05）。

（7）石英组小鼠心脏组织中 TNF-α、MCP-1、I 型胶原和纤维粘连素 mRNA 水平在染尘后 7、28、84 d 较对照组均显著升高，IL-1β 和 IL-6 mRNA 水平在染尘后 7、28 d 较对照组均显著升高，差异均有统计学意义（P<0.05）；石英+IL-1β 抗体组小鼠 IL-6、TNF-α 和 MCP-1 mRNA 水平较同期石英组显著降低，差异有统计学意义（P<0.05）。

（8）石英组小鼠肾脏组织中 IL-1β、IL-6、TGF-β、III 型胶原、纤维粘连素 mRNA 水平在染尘后 7、28、84 d 较对照组均显著升高，TNF-α 和 I 型胶原 mRNA 水平在染尘后 7、28 d 较对照组均显著升高，差异有统计学意义（P<0.05）；石英+IL-1β 抗体组小鼠 TNF-α、TGF-β、I 型胶原、III 型胶原、纤维粘连素 mRNA 水平较同期石英组显著降低，差异有统计学意义（P<0.05）。

（9）石英组小鼠肾脏组织中 IFN-γ 和 IL-4 mRNA 水平在染尘后 7、28、84 d 较对照组均有升高的趋势；与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组小鼠 IFN-γ mRNA 水平升高更为明显。

结论：综合上述结果，结论为：

（1）IL-1β 在石英致矽肺发病过程中发挥了重要作用，拮抗 IL-1β 可以减轻石英诱导的炎性和纤维化反应。

（2）气管灌注石英粉尘可导致心脏和肾脏出现炎性和纤维化反应。

（3）拮抗 IL-1β 可减轻石英导致的心脏炎性反应，对心脏纤维化反应作用不明显。

（4）拮抗 IL-1β 可减轻石英导致的肾脏炎性和纤维化反应。

关键词：石英；小鼠；IL-1β；肺脏；心脏；肾脏；炎性反应；纤维化

The role of interleukin-1β in silica-induced pulmonary, cardiac and renal inflammation and fibrosis

Candidate for Ph.D: Jiali Guo
Supervisor: Professor Weihong Chen

Abstract

Objectives: Silica exposure primarily occurs in workplace such as metal or coal mining, construction, and glass and clay manufacturing industries. In addition to occupational exposures, environmental exposure occurs as a result of industrial contaminations, volcanic explosions and sandstorms. Prolonged inhalation of silica is classically associated with an occupational pulmanory disease called silicosis, which has been studied extensively. Additionally, epidemiological studies showed that silica exposure can also induce cardiovascular and renal diseases. Interleukin (IL)-1β is an important pro-inflammatory cytokine. It is evidenced that IL-1β is involved in many diseases such as diabetes, arthritis and the inflammation stage of silicosis. Our previous studies showed that IL-1β could be induced by the co-culture of macrophages and silica dust. In order to explore the role of IL-1β in silicosis and silica-induced cardiac and renal damages, we designed mice experiments in our study. The main objectives of this study are as follows: (1) to explore the role of IL-1β in silicosis and to study how IL-1β exerts its function in silicosis; (2) to observe the effects of inhalational silica dust on the heart and kidney tissues of mice; (3) to assess the role of IL-1β in silica-induced cardiac and renal inflammation and fibrosis.

Methods: In this study, we generated a silicosis model by intratracheally instilled standard silica dust to mice and used an anti-IL-1β monoclonal antibody (mAb) to directly neutralize the silica-induced IL-1β in the mice. A total of 128 mice were randomly divided into four groups as the blank control group, physiological saline group, silica group and silica+IL-1β mAb group. On days 1, 7, 28 and 84 after instilled treatment, 8 mice of each group were sacrificed and the followed indicators were measured:

(1) The IL-1β consentrations in BALF and serum were measure by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

(2) Lungs: the lung inflammation and fibrosis were scored by histological sections which were stained with H&E and Masson, respectively; the lung injury was assessed by measuring the total protein (TP), lactate dehydrogenase (LDH) and alkaline phosphatase (AKP) levels in BALF; to evaluate the lung inflammation, the numbers of total cell, macrophage, neutrophil and lymphocyte and the levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in BALF were measured; to evaluate the lung fibrosis, the mRNA expression levels of transforming growth factor-β (TGF-β), collagen I and fibronectin were measured by real-time quantitative PCR; to observe the changes of Th1/Th2 balance, the representive Th1 cytokine such as interferon-γ (IFN-γ) and Th2 cytokine such as IL-4 in BALF were measured by ELISA.

(3) Hearts: to observe the inhalational silica-induced cardiac inflammation and fibrosis, we used real-time quantitative PCR to measure the mRNA levels of inflammatory indicators (IL-1β, IL-6, TNF-α and MCP-1), fibrotic indicators (TGF-β, collagen I, collagen III and fibronectin) and indicators of Th1/Th2 balance (IFN-γ and IL-13).

(4) Kidneys: to investigate the inhalational silica-induced renal inflammation and fibrosis, we used real-time quantitative PCR to measure the mRNA levels of inflammatory indicators (IL-1β, IL-6 and TNF-α), fibrotic indicators (TGF-β, collagen I, collagen III and fibronectin) and indicators of Th1/Th2 balance (IFN-γ and IL-4).

Results: (1) The levels of IL-1β in BALF and serum of silica+IL-1β mAb group were significantly lower than those in silica group on days 7, 28 and 84 (P<0.01).

(2) The pathological sections of the lung tissues stained with H&E in the silica and silica+IL-1β groups showed obvious inflammation on days 1, 7, 28 and 84 (P<0.01), and the pathological sections of the lung tissues stained with Masson in the silica and silica+IL-1β groups showed significant collagen deposition on days 28 and 84 (P<0.01); anti-IL-1β significantly attenuated the inflammation and fibrosis mentioned above (P<0.05).

(3) The levels of TP, LDH and AKP in BALF of the silica and silica+IL-1β mAb group mice were significantly increased on days 1, 7, 28 and 84 (P<0.01); the usage of anti-IL-1β mAb significantly decreased the levels of the above indicators (P<0.05).

(4) The numbers of total cell, macrophage, neutrophil and lymphocyte and the contents of TNF-α and MCP-1 in BALF of the silica and silica+IL-1β mAb group mice were significantly increased on days 1, 7, 28 and 84 (P<0.01); the numbers of total cell, macrophage and lymphocyte of the silica+IL-1β mAb group mice were significantly decreased that those of the silica group mice (P<0.01); the TNF-α content was also significantly decreased by the usage of anti-IL-1β mAb on days 7, 28 and 84 (P<0.05); the consentration of MCP-1 in BALF of the silica+IL-1β mAb group was significantly decreased on days 1 and 7 when compared with that in the silica group (P<0.01).

(5) The mRNA levels of TGF-β, collagen I and fibronectin of the lung tissues in the silica group were significantly increased on days 28 and 84 (P<0.01); the levels of these indicators were significantly decreased by anti-IL-1β mAb (P<0.01).

(6) The ratio of IFN-γ/IL-4 was significantly decreased in the silica exposed mice on days 7, 28 and 84 (P<0.01), however, the ratio in the silica+IL-1β mAb group was significantly higher than that in the silica group (P<0.05).

(7) Significantly increased mRNA expression of TNF-α, MCP-1, collagen I and fibronectin in heart tissues were shown on days 7, 28 and 84 and significantly increased mRNA expression of IL-1β and IL-6 were shown on days 7 and 28 (P<0.05); neutralization of IL-1β significantly decreased the mRNA levels of IL-6, TNF-α and MCP-1 (P<0.05).

(8) Significantly increased mRNA levels of IL-1β, IL-6, TGF-β, collagen III and fibronectin in kidney tissues were shown on days 7, 28 and 84 and obviously increased mRNA expression of TNF-α and collagen I were shown on days 7 and 28 (P<0.05); the usage of IL-1β antibody significantly decreased the mRNA expressions of TNF-α, TGF-β, collagen I, collagen III and fibronectin (P<0.05).

(9) Both of the IFN-γ and IL-4 mRNA levels in the kidneys of silica exposed mice were increased, and when compared with that in the silica group, the IFN-γ mRNA level was significantly increased in the silica+IL-1β mAb group on days 28 and 84 (P<0.05).

Conclusions: (1) IL-1β plays an important role in the silicosis progression. Depletion of IL-1β could attenuate the silica-induced lung inflammation and fibrosis.

(2) The inhalational silica can induce the cardiac and renal inflammatory and fibrotic responses.

(3) IL-1β exerts significant effects in the inhalational silica-induced cardiac

inflammation, but exerts little effects in the inhalational silica-induced cardiac fibrosis.

(4) IL-1β has an important function in the inhalational silica-induced renal inflammatory and fibrotic responses.

Key words: silica; mouse; IL-1β; lung; heart; kidney; inflammation; fibrosis

前 言

石英是广泛存在于地壳中的矿物质之一。石英粉尘广泛存在于采矿、建筑、水泥制造等生产环境的空气中；除职业暴露外，火山爆发、沙尘暴等自然现象也可以导致生活环境中石英粉尘的暴露[1-3]。有研究显示，我国西北部沙尘暴降尘中石英的浓度高达 17.36%到 40.09%[4]。石英粉尘暴露的健康危害明确，其长期暴露除导致职业病——矽肺外，与慢性阻塞性肺病、气管支气管炎、哮喘和肺癌等多种疾病均明确相关[5]。近年研究显示，累计接尘量与工人心血管疾病死亡率存在剂量-反应关系，石英暴露与慢性肾脏疾病之间存在确定的正相关关系[6-7]。实验室研究也提示，将石英粉尘与人体脐静脉内皮细胞共同培养，可以导致内皮细胞释放大量的炎性因子如白介素（IL）-1β、IL-6 和肿瘤坏死因子-α（TNF-α）；将石英粉尘与人体肾脏细胞共同培养，可以观察到石英粉尘对通过提高胞浆钙浓度对肾脏细胞造成直接损伤[8-9]。

石英暴露导致的矽肺已被广泛研究，但其始发和发展过程中发挥重要作用的细胞和分子机制仍不完全清楚[10]。研究表明，固有免疫和适应性免疫应答在矽肺发病过程中发挥了重要作用，固有免疫细胞如肺泡巨噬细胞在矽肺发病过程中发挥了基础性作用[5, 11-12]。石英粉尘经呼吸道进入肺泡后，首先可以激活肺泡巨噬细胞，通过巨噬细胞内的 Nalp3 炎性体导致 IL-1β 成熟与释放。IL-1β 与其他炎性介质如 TNF-α、单核细胞趋化蛋白-1（MCP-1）可以通过诱导其他炎性介质释放以及募集炎性细胞浸润而始发和放大石英导致的肺部炎性反应[13-17]。同时，肺泡巨噬细胞也可以释放致纤维化因子如转化生长因子-β（TGF-β）[18-19]。TGF-β 可以诱导成纤维细胞分化为成熟的肌成纤维细胞，进而分泌细胞外基质成分促进纤维化形成[20]。此外，其他炎性细胞如淋巴细胞和嗜中性粒细胞也可以通过促进细胞外基质成分的合成而放大纤维化反应[13, 21-23]。基于目前研究进展，已证明有多种因子参与矽肺的发病过程，主要包括 IL-1β、TNF-α、MCP-1 和 TGF-β 等[24]。但尚无证据证明在这些因子中，哪个因子在矽肺发病过程中发挥了核心作用。动物实验已经证明，IL-1β 基因敲除的小鼠对石英粉尘导致的肺部炎性反应具有良好的抵抗性；使用 IL-1 受体拮抗剂的小鼠可以限制石英导致的

肺纤维化反应[25-26]。此外，对 Nalp3 基因敲除致 IL-1β 无法产生的小鼠染尘后不会出现肺部胶原沉积[27-28]。上述研究结果说明 IL-1β 在矽肺发病过程中有积极的作用，但尚无研究证明 IL-1β 通过何种机制发挥该作用。因此，IL-1β 在矽肺发病过程中的作用值得进一步探讨[5]。

一般情况下，肺脏是石英粉尘暴露的第一脏器。石英粉尘肺暴露如何引起肺外脏器的损伤仍不清楚，目前研究者提出两种可能，一是入肺的石英粉尘可以刺激肺组织发生一系列损伤与炎性反应，产生相应的炎性介质，这些炎性介质可以被释放到血液循环系统，进而对其他脏器发挥一定作用；二是在肺泡-气血屏障之间存在一定的微孔，入肺的石英粉尘颗粒本身或者颗粒物的某些成分可以通过这些微孔直接进入血液循环系统，进而影响其他脏器[10, 29-30]。流行病学研究表明，心脏和肾脏均有可能为矽肺发病的受累脏器[31-33]。从生理学上讲，心脏和肾脏有一定的相互作用，一个脏器的急性或慢性损伤会导致另一个脏器的急性或慢性损伤[34-35]。基于同一种致病因子，石英粉尘是否会在心脏和肾脏引起类似于肺脏的炎性和纤维化反应，以及 IL-1β 是否同样在心脏和肾脏的炎性纤维化反应中发挥作用，目前仍不清楚。

为了探讨石英肺暴露是否同样可以导致心脏、肾脏发生炎性和纤维化改变，以及 IL-1β 在石英导致的肺脏、心脏和肾脏炎性及纤维化反应中的作用，本研究用石英粉尘悬液灌肺的方法，制作了小鼠矽肺模型，又使用仓鼠抗小鼠 IL-1β 抗体中和石英暴露后产生的 IL-1β，构建了小鼠 IL-1β 中和模型。通过石英组和空白组的比较，观察石英肺灌注导致的心脏和肾脏炎性和纤维化反应；通过石英组和石英+IL-1β 抗体组的比较，评估 IL-1β 在石英粉尘导致的肺脏、心脏和肾脏炎性和纤维化反应中的作用。

本研究主要包括三部分内容：（1）石英粉尘染尘后小鼠体内 IL-1β 的变化和 IL-1β 抗体的中和效力；（2）IL-1β 在石英粉尘肺暴露后导致的小鼠肺损伤、肺炎性反应和肺纤维化过程中的作用；（3）石英粉尘肺暴露所导致的小鼠心脏、肾脏炎性和纤维化反应及 IL-1β 在该反应中的作用。

第一部分　小鼠石英暴露后体内 IL-1β 的变化及 IL-1β 抗体的中和效力

游离二氧化硅粉尘，俗称石英，是引发矽肺的代表性粉尘。矽肺的发病机制至今仍不十分清楚，严重地限制了矽肺的临床预防与治疗。免疫学说认为石英诱导的矽肺始发于固有免疫应答，涉及到多细胞多分子，但在众多分子中，哪种分子发挥核心作用并不清楚[12, 36]。IL-1β 是一种经典的炎性因子，主要依赖于固有免疫细胞尤其是巨噬细胞内的 Nalp3 炎性小体成熟与分泌[37]。实验研究表明，与正常小鼠比较，Nalp3 基因敲除的小鼠对石英暴露导致的肺炎性反应和纤维化具有良好的抵抗性[38]。我们假定 IL-1β 在矽肺发病过程中发挥了核心作用。

本部分研究中，我们通过给小鼠肺灌注标准石英粉尘悬液，建立小鼠矽肺模型；并通过 IL-1β 抗体的使用建立小鼠 IL-1β 中和模型。通过分析小鼠肺泡灌洗液中的 IL-1β 水平，评价 IL-1β 在小鼠矽肺发病过程中的表达以及本研究中 IL-1β 抗体的中和效力。

材料与方法

1. 石英粉尘

本研究所采用石英粉尘为中国标准石英，由中国疾病预防控制中心，国家职业卫生与毒物控制所提供。粉尘 SiO_2 含量＞97%，粒径分布为：＜1 μm，57%；1-2 μm，34%；2-3 μm，4.5%；3-4 μm，3.0%；4-5 μm，1.5%。

2. 主要仪器

2.1 ELX-800 酶标仪：美国 Bio-Rad 公司；

2.2 电子天平：德国 Satorius 公司；

2.3 低温离心机（5180R）：德国 Eppendorf 公司；

2.4 恒温水浴箱：上海精宏实验设备有限公司；

2.5 磁力搅拌器：上海司乐仪器厂；

2.6 恒温振荡器：德国 Eppendorf 公司

2.7 移液器：德国 Eppendorf 公司；

2.8 超声波清洗仪：华南超声设备厂。

3. 主要试剂

3.1 仓鼠抗小鼠白介素-1β 抗体（anti-IL-1β mAb）：美国 Biolegend 公司；

3.2 仓鼠 IgG：美国 Biolegend 公司；

3.3 小鼠 IL-1β ELISA 试剂盒：深圳达科为生物技术有限公司；

3.4 戊巴比妥钠：德国 Merck 公司；

3.5 氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、盐酸（分析纯）：天津恒兴化学试剂制造有限公司。

4. 主要试剂的配制

4.1 10×PBS（0.1 M）

称取 80.00 g 氯化钠，35.80 g 磷酸氢二钠，2.00 g 氯化钾，2.00 g 磷酸二氢钾于 800 ml 三蒸水中使其溶解，用盐酸调 PH 值至 7.2-7.4。最后加三蒸水定容至 1 000 ml。如未完全溶解，可于 60 ℃水浴中助溶。使用前 10 倍稀释，制成 0.01 M 工作液。于 120 ℃高压灭菌 20 min，冷却备用。

4.2 生理盐水

取 9 mg 氯化钠溶于 800 ml 三蒸水中，定容至 1 000 ml。然后将其高压灭菌，冷却后备用。

4.3 灌肺悬液配制

（1） 石英+IgG 悬液配制：称取 50 mg 中国标准石英，经高压灭菌并干燥。于超净台中，将粉尘置于 200 μl 生理盐水中，于超声仪进行超声混匀，再加入 800 μl 仓鼠 IgG（1 μg/μl），密封，混匀，备用。

（2） 石英+IL-1β 抗体悬液配制：称取 50 mg 中国标准石英，经高压灭菌并干燥。于超净台中，将粉尘置于 200 μl 生理盐水中，于超声仪进行超声混匀，再加入 800 μl 仓鼠抗小鼠 IL-1β 抗体（1 μg/μl），密封，混匀，备用。

（3） 溶剂混合液：将 200 μl 生理盐水与 800 μl 仓鼠 IgG 混匀，备用。

5. 实验动物分组

为了解肺泡灌洗液中 IL-1β 时间变化趋势和确定时间点，进行第一期实验：80 只 C57BL/6 小鼠，（购买于武汉大学实验动物中心），体重为 18-20 g。小鼠于清洁级动物房（湖北省疾病预防控制中心）饲养。饲养条件为：自由饮食正常灭菌水和饲料；温度 23 ℃-25 ℃；湿度 50%-60%；明暗各 12 h（150-300 Lux）。将小鼠适应性喂养一周后，随机分为 2 组，即石英组和空白对照组，每组 40 只。每组下又分为 1 h、2 h、4 h、8 h、16 h、24 h、48 h、7 d 共 8 个时间点，每个时间点 5 只。

第二期实验动物分组：128 只清洁级雄性 C57BL/6 小鼠（购买于武汉大学实验动物中心），体重为 18-20 g。喂养条件同上，适应性喂养一周后，对小鼠进行称重编号，并随机分为 4 组，即石英+IL-1β 抗体组，石英组，生理盐水组，空白对照组，每组 32 只。

6. 粉尘暴露

6.1 麻醉

将小鼠用 1%戊巴比妥钠溶液按照 45 mg/kg 的剂量腹腔注射，3 min 左右出现昏迷（手捏鼠尾无反应，或者四肢舒张自然下垂），即认为已经麻醉。

6.2 灌肺

将麻醉后的小鼠固定，使其颈部皮肤平坦暴露。用酒精棉球擦拭颈部皮肤进行消毒后，将颈部皮肤垂直剪开长度为 5 mm 左右的开口，并对皮下组织进行钝性分离，使气管暴露。然后用 7-号钝头注射器针头经口腔插入气管，如果可以透过气管看到灌肺针，说明灌肺针已正确插入气管，否则，应当重新调整进针方向，确保灌肺针插入气管后，进行不同悬液的灌注。各组小鼠灌肺悬液成分如下：石英+IL-1β 抗体组，给予石英+IL-1β 抗体悬液 50 μl；石英组，给予石英+IgG 悬液 50 μl；生理盐水组，给予溶剂混合液 50 μl；空白对照组，不予处理。灌肺结束后，进行伤口消毒并缝合。

7. 动物处死以及肺泡灌洗液、血清收集

7.1 处死

分别于动物灌肺处理后第 1、7、28、84 d，每组随机取 8 只小鼠，经乙醚麻醉后，眼球后静脉丛放血处死。

7.2 血清收集

对分好组的小鼠行眼球摘除，将血液收集于无菌 EP（1.5 ml）管中。将采集好的血液于室温静置 40 min 后，转移至 4 ℃静置 2 h，之后于 4 ℃，3 000 rpm 离心 10 min。将血清分装，于-80 ℃保存待检测。

7.3 肺泡灌洗液收集

轻轻分离肺组织以及气管，于甲状软骨上方将气管剪断，取出肺组织，称重。将 7-号灌肺针插入气管，结扎。对肺组织进行 1 ml ×3 次灌洗。灌洗所用液体为 4 ℃生理盐水。3 次灌洗液分别装入 3 个不同的 EP 管，于 4 ℃，1 000 rpm 离心。将首次灌洗液的上清分装，保存于-80 ℃，待检。

8. 肺泡灌洗液中 IL-1β 的检测

肺泡灌洗液中 IL-1β 的水平采用 ELISA 试剂盒（深圳达科为生物技术有限公司）进行测定。检测过程严格按照说明书进行操作。简述如下，将肺泡灌洗液进行适当倍数的稀释后进行检测。每个试剂盒每次检测都需要做标准曲线。每个样本的各检测因子均应做复孔，最后取其平均值。

9. 统计学分析方法

结果均以 $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ 表示。组间差异的比较采用方差分析以及 Dunnett-t 检验，以 $P<0.05$ 为统计学差异的最低标准，数据的统计学分析采用 SAS9.1 软件。

结 果

1. 小鼠石英急性暴露后肺泡灌洗液（BALF）中 IL-1β 浓度变化

采用 ELISA 方法对小鼠 BALF 中 IL-1β 浓度进行检测。如图 1.1 所示，与空白对照组相比，小鼠染尘 1 h 时，BALF 中 IL-1β 含量变化不明显。从染尘 1 h 开始，石英组 BALF 中 IL-1β 含量逐渐升高，并在其后所有时间点上均高于空白对照组。染尘后 24 h 内，IL-1β 浓度有轻微波动，但整体呈现升高的趋势。到染尘后 7 d 时，石英组

BALF 中 IL-1β 含量已经达到空白对照组的 3 倍左右。

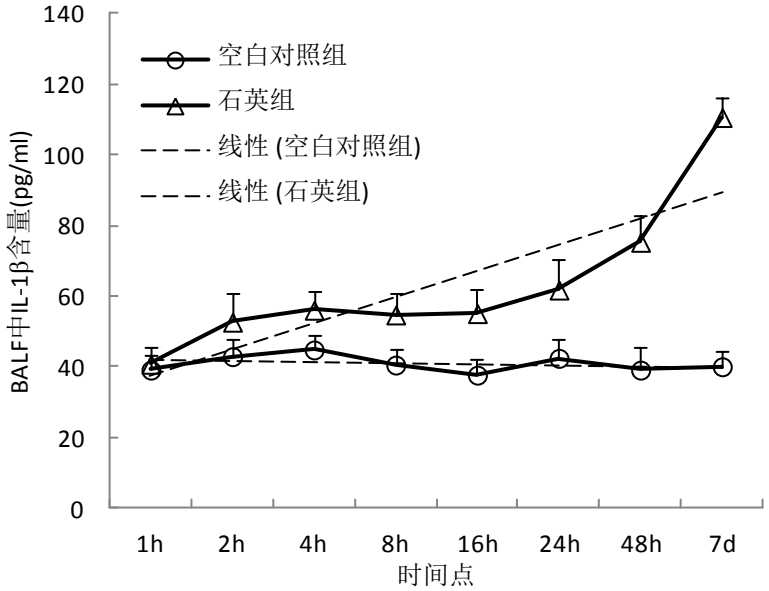


图 1.1 石英暴露小鼠肺泡灌洗液中 IL-1β 时间变化曲线

2. 小鼠矽肺发病过程中体内 IL-1β 含量变化及 IL-1β 抗体的中和效果评价

2.1 小鼠 BALF 中 IL-1β 含量变化以及 IL-1β 抗体的中和效果

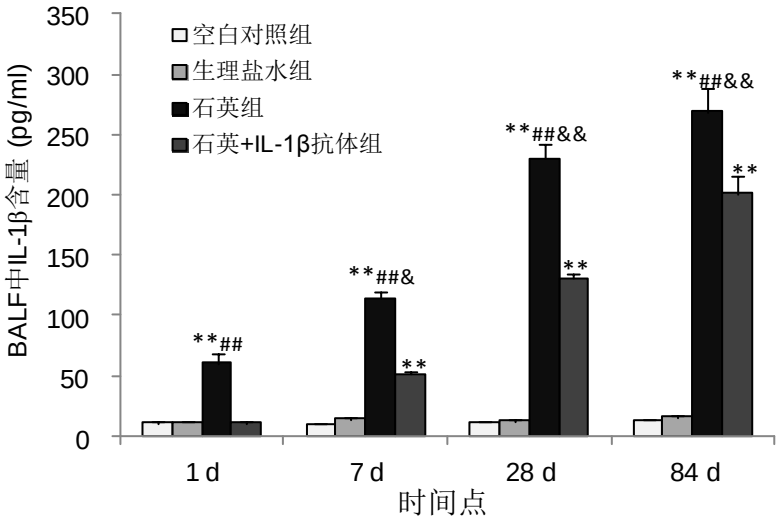
如图 1.2 所示，石英组 BALF 中 IL-1β 含量在染尘后 4 个时间点（第 1、7、28、84 d）上均显著高于空白对照或生理盐水组，差异有统计学意义（P<0.01）。另外，在染尘后第 7、28、84 d，BALF 中 IL-1β 含量均显著高于第 1 d，差异有统计学意义（P<0.05）。但是 BALF 中 IL-1β 含量在 28 d 和 84 d 这 2 个时间点上没有统计学差异。

石英+IL-1β 抗体组 BALF 中 IL-1β 含量在 1 d 时与空白对照组或生理盐水组接近，之后呈现逐渐升高的趋势，但均低于同期石英组 BALF 中 IL-1β 的水平，且差异有统计学意义（P<0.01）。

2.2 小鼠血清中 IL-1β 含量变化以及 IL-1β 抗体的中和效果

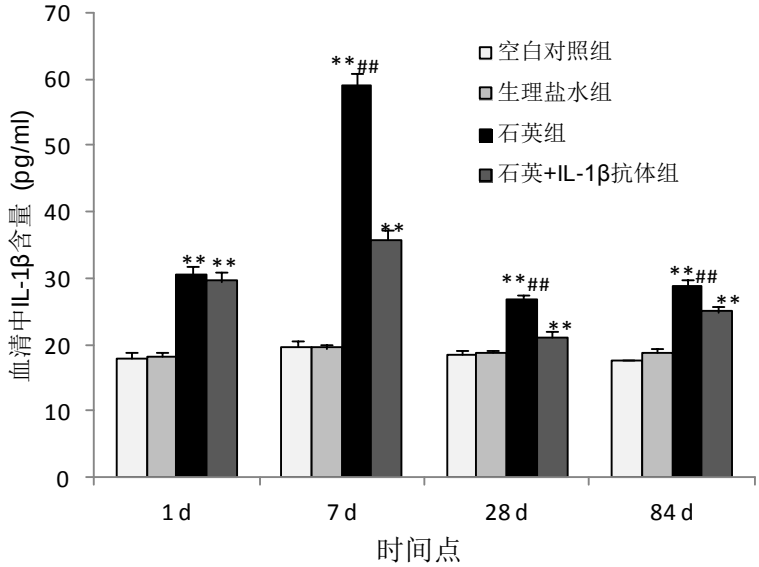
如图 1.3 所示，与空白对照或者生理盐水组相比，石英组小鼠血清中的 IL-1β 含量在染尘后第 1、7、28、84 d 显著升高，差异有统计学意义（P<0.01），并且在第 7 d 达到高峰。与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组 BALF 中 IL-1β 含量在 1 d 无显著变化，

但在第 7、28、84 d 显著降低，差异有统计学意义（P<0.01）。



注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与同期空白对照组比较，$^{**}P$<0.01；
与同期石英+IL-1β 抗体组比较，$^{\#\#}P$<0.01；
与 1d 石英组相比，$^{\&}P$<0.05，$^{\&\&}P$<0.01。

图 1.2 各组小鼠肺泡灌洗液中 IL-1β 含量



注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与同期空白对照组比较，$^{**}P$<0.01；
与同期石英+IL-1β 抗体组比较，$^{\#\#}P$<0.01。

图 1.3 各组小鼠血清中 IL-1β 含量

讨 论

本部分研究结果显示，石英肺暴露以后，可以引起小鼠肺泡灌洗液中 IL-1β 含量明显升高，并且在肺泡灌洗液中从染尘后 1 h 到 84 d 呈现持续升高的趋势。IL-1β 是一种经典的前致炎性因子，现有研究显示，IL-1β 的成熟和分泌主要依赖于固有免疫细胞如肺泡巨噬细胞内的 Nalp3 炎性小体途径[39]。Cassel 等人研究表明，Nalp3 基因敲除的细胞不能表达 IL-1β[27, 40]。石英经呼吸道进入机体后，首先可被肺泡巨噬细胞吞噬，导致 IL-1β 分泌[13, 41]；同时石英的细胞毒性可以导致巨噬细胞细胞膜破裂或者细胞死亡，这两种结果均可导致巨噬细胞内容物如炎性介质、酶类以及被吞噬的石英粉尘释放。被释放的石英粉尘又继续被其他的巨噬细胞吞噬，这个循环过程可能是导致肺泡灌洗液中 IL-1β 持续升高的主要原因[10, 42-43]。此外，我们的研究结果也表明，在肺组织暴露于石英粉尘后，IL-1β 发挥了长期的作用。

越来越多的流行病学研究显示，石英粉尘肺暴露不仅可以导致矽肺，还可以导致肺外器官如心血管系统疾病发病率升高[6]。关于石英肺暴露导致肺外器官疾病的途径，目前主要提出两点：一是小颗粒粉尘可能通过肺部气-血屏障直接入血，进而对心血管系统以及其他脏器造成损伤[44-45]；二是石英粉尘肺暴露后，可以导致肺组织释放大量炎性介质，这些介质被释放入血，进而对心血管系统或其他脏器发挥作用，引发疾病产生[46-47]。我们的研究结果显示，石英粉尘的肺暴露可以引起血清中 IL-1β 表达量长期的升高，说明 IL-1β 有可能在石英导致的肺外脏器损伤中发挥重要作用[48]。

我们的研究结果显示，如果在染尘同时给予适量的 IL-1β 抗体，可以显著降低肺泡灌洗液中 1、7、28、84 d 以及血清中 7、28、84 d 时间点上 IL-1β 的含量。从图 1.2 和 1.3 可以看到，IL-1β 抗体的使用虽然并未能完全抑制 IL-1β，但可以降低 IL-1β 含量，差异有统计学意义（$P<0.01$），并且将这种抑制效果一直维持在染尘后 84 d。现有阶段，有多种方法可以抑制 IL-1β 在体内的生物学功能，比如 IL-1β 或者 IL-1 受体（IL-1R）基因敲除，或者 IL-1β 受体拮抗剂如阿那白滞素及 IL-1β 抗体的使用[49]。IL-1R 为 IL-1α 和 IL-1β 的共同受体，阻断 IL-1R 可以同时阻断 IL-1α 和 IL-1β 的生物学功能，但研究表明，IL-1α 和 IL-1β 具有不完全相同的生物学作用[50-51]。因此，特异性的抑制

IL-1β 更能明确反应 IL-1β 在矽肺发病过程中的作用。另外，考虑到基因敲除技术在临床意义上的局限性，我们本次研究选用 IL-1β 抗体特异性地中和 IL-1β。我们的结果证明，本研究中 IL-1β 抗体的使用有效地中和了石英诱导的 IL-1β。

综上分析，在小鼠石英肺暴露后，小鼠肺泡灌洗液以及血清中的 IL-1β 水平均长期升高。其中，肺泡灌洗液可以反映肺组织局部反应，而血清对全身性反应具有一定的代表作用。这说明 IL-1β 在石英导致的肺组织以及肺外脏器损伤中均有可能发挥重要作用。本实验在石英粉尘肺暴露初期使用 IL-1β 抗体，可以有效中和石英诱导的 IL-1β。

第二部分　IL-1β 在石英导致矽肺发病过程中的作用

矽肺是由于在生产过程中长期吸入游离二氧化硅粉尘而引起的以肺部弥漫性纤维化为主的全身性疾病[5, 52]。从免疫学上讲，矽肺的发病过程主要包括以下几个环节：①石英粉尘被固有免疫系统识别并被固有免疫细胞（肺泡巨噬细胞）吞噬；②固有免疫细胞膜受损及细胞死亡；③固有免疫细胞产生大量炎性因子以及纤维化因子；④固有免疫细胞产生的部分因子可以促进树突状细胞分化成熟，进而激活适应性免疫系统；⑤适应性免疫系统活化并产生一系列应答反应；⑥肺组织纤维化最终形成[12]。从病理改变上讲，矽肺的发病过程主要包括炎性反应和纤维化两个阶段，另外，在矽肺发病过程中，石英粉尘对肺组织的损伤作用也不容忽视[10, 14]。我们前一部分研究结果表明，IL-1β 的高表达在矽肺发病过程中贯穿始终。另有研究表明，IL-1β 基因敲除的小鼠对石英有较好的耐受力，对矽肺早期的炎性病理改变具有较好的抵抗性[25]；而且 IL-1R 拮抗剂的使用，可以减轻甚至逆转石英暴露导致的肺纤维化[26]。但 IL-1β 如何影响矽肺发病过程中炎性反应和纤维化两个环节仍不清楚。

本部分研究在构建小鼠矽肺模型以及小鼠 IL-1β 抑制模型的基础上，通过对小鼠肺组织切片的炎性及纤维化进行评价，对小鼠肺泡灌洗液中损伤指标包括总蛋白（TP）、乳酸脱氢酶（LDH）、碱性磷酸酶（AKP），对炎性指标包括 TNF-α、MCP-1 以及 Th1/Th2 平衡指标包括干扰素-γ（IFN-γ）和 IL-4 进行 ELISA 检测，对细胞总数和炎性细胞如巨噬细胞、嗜中性粒细胞、淋巴细胞进行分类计数，对小鼠肺组织中纤维化指标包括 TGF-β、I 型胶原、纤维粘连素进行实时荧光定量 PCR 分析，观察 IL-1β 抗体对小鼠矽肺发病过程中这些代表性因子的影响，进一步探讨 IL-1β 在矽肺发病过程中作用。

第一节　IL-1β 在石英导致肺损伤中的作用

本节研究的主要目的是观察小鼠矽肺发病过程中损伤指标的改变以及 IL-1β 在此变化过程中的作用。我们在小鼠染尘后第 1、7、28、84 d 对小鼠肺泡灌洗液中 TP、

LDH、AKP 水平进行检测并评价 IL-1β 抗体对该 3 种指标的作用。

材料和方法

1. 粉尘样本

中国标准石英粉尘。

2. 主要仪器

同于第一部分。

3. 主要试剂

3.1-3.5 同于第一部分；

3.6 BCA 法测定超微量蛋白含量试剂盒、AKP 测定试剂盒和 LDH 测定试剂盒：南京建成生物工程研究所。

4. 主要试剂配制

同于第一部分。

5. 实验动物分组

同于第一部分。

6. 粉尘暴露

同于第一部分。

7. 动物处死以及肺泡灌洗液收集

同于第一部分。

8. 肺泡灌洗液中 TP 含量、LDH 活力及 AKP 活性的检测

对肺泡灌洗液中的 TP 含量，LDH 活力，AKP 活性均采用相应试剂盒（南京建成生物工程研究所），按照试剂盒所提供的说明书进行定量测定。其中，LDH 活力采用 2，4-二硝基苯肼法检测，TP 含量和 AKP 活性采用比色法检测。简述如下：将于-80 ℃保存的肺泡灌洗液取出后，室温化冻并进行适当倍数的稀释后，再进行检测。每次检测都应该设立标准孔和对照孔。每个指标均应做复孔，最后取其平均值。

9. 统计学分析方法

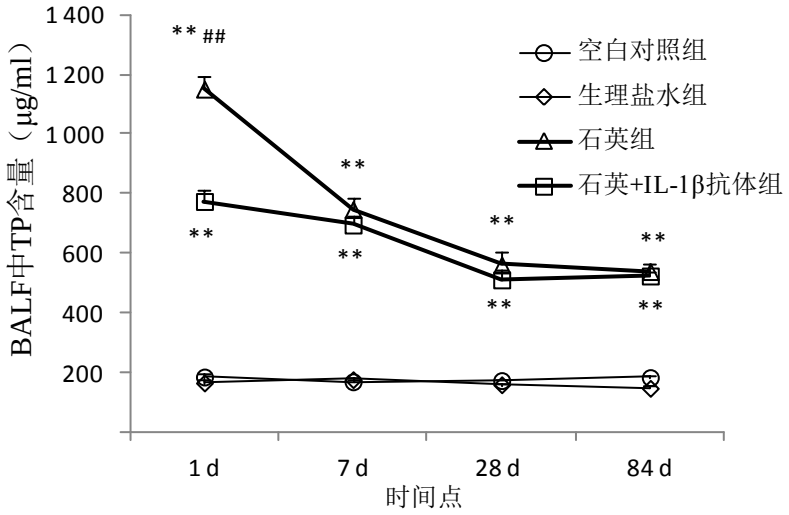
结果均以 $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ 表示。组间差异的比较采用方差分析以及 Dunnett-t 检验，以 $P<0.05$

为统计学差异的最低标准，数据的统计学分析采用 SAS9.1 软件。

结 果

1. 肺泡灌洗液中 TP 含量

如图 2.1 所示，与空白对照组或者生理盐水组相比，石英组和石英+IL-1β 抗体组小鼠肺泡灌洗液中 TP 含量在染尘后第 1、7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（P<0.01）。与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组小鼠肺泡灌洗液中 TP 含量在染尘后第 1 d 显著降低，差异有统计学意义（P<0.01）。之后，石英组和石英+IL-1β 抗体组 TP 含量逐渐降低，并且在染尘后第 7 d 以后，两组 TP 含量趋于一致。



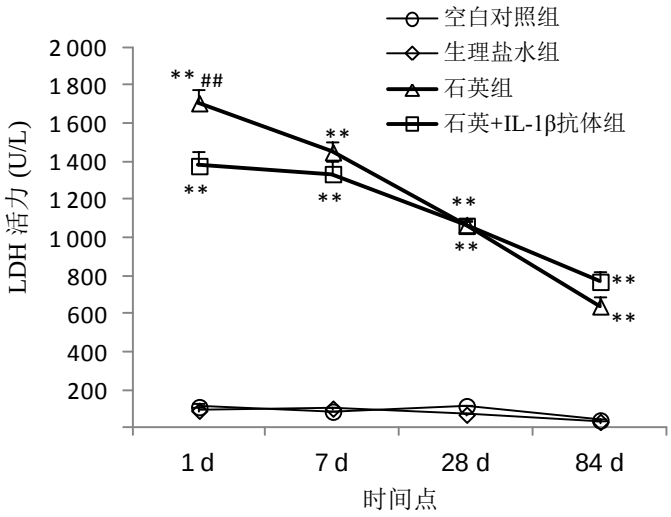
注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与同期空白对照组比较，$^{**}P$<0.01；
与同期石英组比较，$^{\#\#}P$<0.01。

图 2.1 各组小鼠肺泡灌洗液中 TP 含量

2. 肺泡灌洗液中 LDH 活力

如图 2.2 所示，与空白对照组或者生理盐水组相比，石英组和石英+IL-1β 抗体组小鼠肺泡灌洗液中 LDH 活力在染尘后第 1、7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（P<0.01）。与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组小鼠肺泡灌洗液中 LDH 活力在染尘后第 1 d 显著降低，差异有统计学意义（P<0.01）。之后，石英组和石英+IL-1β 抗体组 LDH 活力逐渐降低，在染尘后第 7、28、84 d，两组之间 LDH 活力水平无显著差

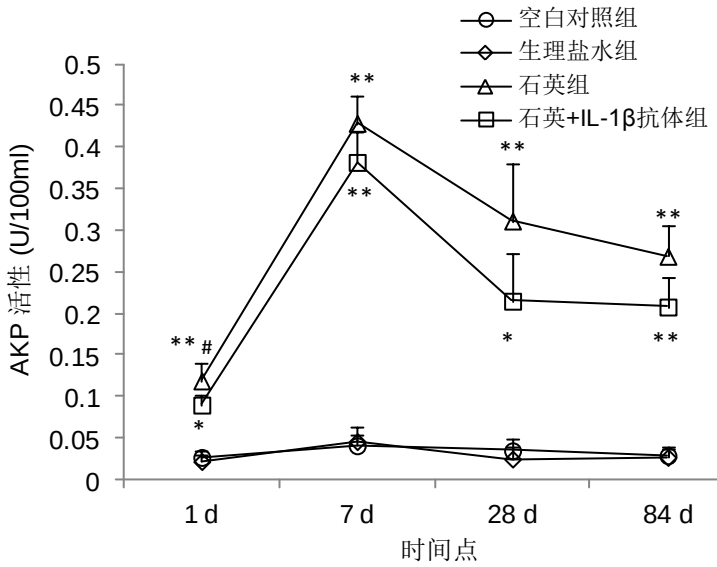
异。



注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与同期空白对照组比较，$^{**}P<0.01$；
与同期石英组比较，$^{\#\#}P<0.01$。

图 2.2 各组小鼠肺泡灌洗液中 LDH 活性

3. 肺泡灌洗液中 AKP 活性



注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与同期空白对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；
与同期石英组比较，$^{\#\#}P<0.01$。

图 2.3 各组小鼠肺泡灌洗液中 AKP 活力

肺泡灌洗液中 AKP 活性在石英或者石英+IL-1β 抗体染尘后显著升高，与空白对照或生理盐水组相比，差异有统计学意义（P<0.05），并且在染尘后第 7 d 上升到高峰，随后呈现降低趋势。与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组小鼠肺泡灌洗液中 AKP 活性降低，并且在染尘后第 1 d，差异有统计学意义（P<0.05）。见图 2.3。

讨 论

本节研究中，我们通过石英粉尘肺灌注的方法，观察了石英粉尘对小鼠肺组织的损伤作用。结果显示，石英粉尘暴露对肺组织有较为严重的损伤作用，主要表现在石英染尘后第 1、7、28、84 d 均可以观察到损伤指标 TP 含量、LDH 活力、AKP 活性的显著升高。另外，我们通过采用石英与 IL-1β 抗体共同灌注的方法，研究 IL-1β 在石英导致肺损伤过程中的作用。如第一部分研究结果所示，石英+IL-1β 抗体组肺泡灌洗液中 IL-1β 中和效果显著。本节研究结果表明，IL-1β 抗体的使用可以在石英肺暴露后短期内显著减轻石英的肺损伤作用，主要表现在石英+IL-1β 抗体组肺泡灌洗液中 TP 含量、LDH 活力、AKP 活性仅在染尘后第 1 d 显著降低，但其长期作用并不明显，说明 IL-1β 可能只在石英导致的肺急性损伤过程中发挥了重要的作用。

石英粉尘对肺组织的急性损伤作用主要与粉尘颗粒对肺组织的直接刺激有关。我们组的前期细胞实验研究结果显示，石英粉尘染毒浓度高低、石英粉尘颗粒大小、以及石英粉尘表面金属元素含量的差异，均会导致不同的细胞损伤效应[53-54]。以往的研究表明，石英粉尘对肺泡上皮细胞、支气管上皮细胞以及巨噬细胞均有一定的损伤作用[55-57]。本研究中将石英粉尘直接灌注到小鼠肺组织中，为探讨石英粉尘对小鼠肺组织中不同细胞种类的损伤作用，我们选择了 TP、LDH 以及 AKP 这 3 个损伤指标进行评估。在正常肺组织中，完好的肺泡上皮-血管屏障可以防止血液中蛋白渗出。肺泡灌洗液中的 TP 主要是肺泡上皮-血管屏障受损后，由血浆渗出产生。因此我们使用 TP 含量反应肺泡上皮-血管屏障的损伤程度[58-59]。LDH 是一种胞浆酶，当细胞膜受损时，LDH 被大量释放。本研究选用 LDH 活力来反应肺组织中细胞膜损伤程度[60-62]。肺组织中的 AKP 主要表达与Ⅱ型肺泡上皮。在肺急性损伤过程中，Ⅱ型肺泡上皮可以延

伸并迁移至损伤部位，恢复肺泡上皮屏障以维护肺组织内环境稳态。但当Ⅱ型肺泡上皮细胞裂解活细胞膜受损时，在肺泡灌洗液中便可检出 AKP，因此，我们选用 AKP 来反应肺泡上皮的损伤程度[63-65]。

从本实验结果可以看到，石英粉尘对肺组织内各类细胞的损伤作用是长期存在的。我们后续的实验结果表明，本次研究所采用的石英粉尘剂量和暴露时间可以成功构建小鼠矽肺模型。因此，我们认为，石英粉尘暴露所导致的肺内损伤存在于矽肺发病的整个过程当中。从时间趋势上来看，随着暴露时间的延长，该损伤作用虽有一定程度的降低，但依然显著高于空白对照组或生理盐水组，差异有统计学意义（$P<0.01$）。有研究表明，给小鼠肺灌注打印机碳粉颗粒后，同样可以引起肺泡灌洗液中 TP 和 LDH 显著升高。

除本研究中所采用的 3 种损伤指标外，有研究表明，石英粉尘还可以引起巨噬细胞或大鼠肺组织产生以 ROS 升高为特征的氧化损伤[66]。石英粉尘导致的 ROS 主要是由肺内巨噬细胞吞噬石英粉尘后发生的氧呼吸爆发所产生[67]。ROS 可以通过激活胞内信号转导通路如 NF-κB 等刺激致炎性因子等的表达，从而介导后续的炎性反应或纤维化形成[68-69]。

另外，我们的研究结果显示，中和 IL-1β 并不能长期抑制石英粉尘的肺内损伤作用。可能是因为石英粉尘导致的肺内损伤作用主要受粉尘的形态、组分等影响，阻断 IL-1β 并不能改变粉尘的这些特点，因此，阻断 IL-1β 不能长期有效地抑制上述损伤作用。

第二节 IL-1β 在石英导致肺部炎性反应中的作用

本节研究的主要目的是观察小鼠矽肺发病过程中炎性指标的改变以及 IL-1β 在此变化过程中的作用。我们在小鼠染尘后第 1、7、28、84 d 对小鼠肺组织切片进行 H&E 染色，对炎性反应程度进行评分；对肺泡灌洗液中细胞总数和巨噬细胞、嗜中性粒细胞、淋巴细胞进行计数；并且对肺泡灌洗液中 TNF-α、MCP-1 水平进行检测。

材料和方法

1. 粉尘样本

中国标准石英粉尘。

2. 主要仪器

2.1-2.8 同于第一部分；

2.9 LKBV 超薄切片机：瑞典 LKB 公司；

2.10 光学显微镜：日本 OLYMPUS 公司；

2.11 生物组织包埋仪：浙江金华科迪仪器设备有限公司。

3. 主要试剂

3.1-3.4 同于第一部分；

3.5 氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、盐酸、氢氧化钠（分析纯）、伊红、苏木素：天津恒兴化学试剂制造有限公司。

3.6 多聚甲醛：美国 Sigma 公司；

3.7 瑞-姬氏染液：南京建成生物工程研究所；

3.8 小鼠 TNF-α、MCP-1 ELISA 试剂盒：深圳达科为生物技术有限公司。

4. 主要试剂的配制

4.1-4.3 同于第一部分；

4.4 0.2 M Na_2HPO_4

称取 29.08 g Na_2HPO_4，加入 800 ml 三蒸水中，使其溶解，定容至 1 000 ml，备用。

4.5 0.2 M KH_2PO_4

称取 27.2 g KH_2PO_4，加入 800 ml 三蒸水中，使其溶解，定容至 1 000 ml，备用。

4.6 1 M NaOH

称取 10 g NaOH 加入 200 ml 三蒸水中，使其溶解，定容至 250 ml。

4.7 盐酸乙醇分化液

取盐酸 0.5 ml 加入 75%乙醇 100 ml 中，混匀，备用。

4.8 4%多聚甲醛

称取 16 g 多聚甲醛粉末（美国，Sigma 公司），置于 200 ml 三蒸水中。水浴加热至 60 ℃，滴加 5-7 滴 1 M NaOH 溶液，使之完全溶解。然后加入 160 ml 0.2 M Na_2HPO_4 溶液以及 40 ml 0.2 M KH_2PO_4 溶液。混匀后于 4 ℃密封保存。

4.9 苏木素染液

称取 2.5 g 苏木素置于 25 ml 无水乙醇中，再加入已经溶有 2.5 g 明矾的三蒸水 500 ml。加热煮沸后，缓慢加入 1.25 g 氧化汞，注意防止溶液溅出。再次加热煮沸 2 min。将容器稍作冷却后，浸入冷水中继续使之冷却。最后加入 20 ml 醋酸。混匀后室温保存，备用，使用前应先过滤。

4.10 伊红染液

将 0.8 g 伊红置于 50 ml 三蒸水中，用玻棒搅拌混匀，再加入约 25 ml 95%乙醇溶液，定容至 100 ml，滴加 1-2 滴醋酸后混匀，备用。

5. 实验动物分组

同于第一部分。

6. 粉尘暴露

同于第一部分。

7. 动物处死以及肺泡灌洗液收集

同于第一部分。

8. 肺组织切片制作

8.1 每只小鼠均取左肺置于 4%多聚甲醛中固定 24 h。

8.2 将固定好的肺组织流水冲洗过夜，用浓度梯度酒精脱水处理（75%乙醇 2 min×2 次→80%乙醇 2 min×2 次→90%乙醇 2 min×2 次→95%乙醇 2 min×2 次→无水乙醇 2 min×2 次）。

8.3 将组织块于香柏油Ⅰ和香柏油Ⅱ中各透明 12 h。

8.4 将透明好的组织块于石蜡Ⅰ中渗透 2 h，于石蜡Ⅱ中渗透 30 min。渗透过程均应该在 60 ℃的温箱进行。然后用石蜡包埋组织块。

8.5 调整切片机，将蜡块固定在切片机上进行切片。切片厚度为 5 μm。

8.6 将展片机水温调至 40 ℃，左手拿毛笔托起切片，右手用眼科镊轻轻拎起切片的一角，将切片平铺于水面上。整个动作要轻柔连贯，待展片充分后，用玻片轻轻捞起切片。将玻片置于玻片架上，置于 37 ℃温箱过夜。

9. 组织切片 H&E 染色

9.1 将石蜡切片于 60 ℃温箱烘烤 1 h 左右。

9.2 脱蜡：将石蜡切片于二甲苯Ⅰ浸泡 2 min，转入二甲苯Ⅱ中浸泡 2 min。

9.3 水化：将切片于浓度梯度酒精（无水乙醇 2 min×2 次→95%乙醇 2 min×2 次→90%乙醇 2 min×2 次→80%乙醇 2 min×2 次→75%乙醇 2 min×2 次）进行水化。

9.4 将切片于 PBS 中浸泡 5 min 后，于蒸馏水中浸泡 2 min。

9.5 于苏木素染液中浸泡 5 min，自来水冲洗 1 min。

9.6 于 1%盐酸中分化数秒钟，自来水冲洗 1 min。

9.7 于 5%氨水中反蓝数秒钟，自来水冲洗 1 min。

9.8 于伊红染液中浸泡 10 min。

9.9 于浓度梯度酒精（75%乙醇 2 min×2 次→80%乙醇 2 min×2 次→90%乙醇 2 min×2 次→95%乙醇 2 min×2 次→无水乙醇 2 min×2 次）中进行脱水。

9.10 于二甲苯中进行透明（10 min×2 次）后，用中性树胶封片。

9.11 于光学显微镜下观察，进行炎性反应评分，并拍片。

10. 肺炎性反应评分

炎性反应按照 Szapiel 的方法分为 4 级：正常肺组织，记为 0 分；轻度炎性反应，肺泡壁轻度的炎性增厚，炎性范围发生在局部，面积小于可视面积的 20%，记为 1 分；中度炎性反应，炎性反应累及面积达到可视面积的 20%-50%，记为 2 分；重度炎性反应，有严重的炎性细胞浸润并且导致肺实变，累及面积占可视面积的 50%以上，记为 3 分[70]。

11. 肺泡灌洗液中细胞计数

将 3 管中的细胞沉淀悬浮于 500 μl PBS 中，混匀后推片，将玻片置于室温自然晾

干。同时，对该悬浮液利用细胞计数板和细胞计数器，在显微镜下进行细胞总数的计数。

12. 肺泡灌洗液中炎性细胞分类计数

上述玻片自然晾干后，按照瑞氏-吉姆萨染液试剂盒（南京建成生物工程研究所）说明书进行染色。要注意推片不可太厚，另外要等玻片干透以后才可以染色，否则细胞容易脱落。

染色成功后，按照细胞形态学特点（图 2.4），于显微镜下鉴定随机 300 个细胞中巨噬细胞，嗜中性粒细胞和淋巴细胞的个数。

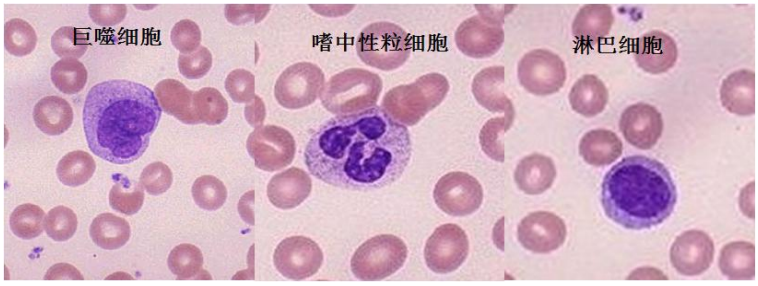


图 2.4 巨噬细胞、嗜中性粒细胞、淋巴细胞镜下形态

13. 肺泡灌洗液中 TNF-α、MCP-1 含量测定

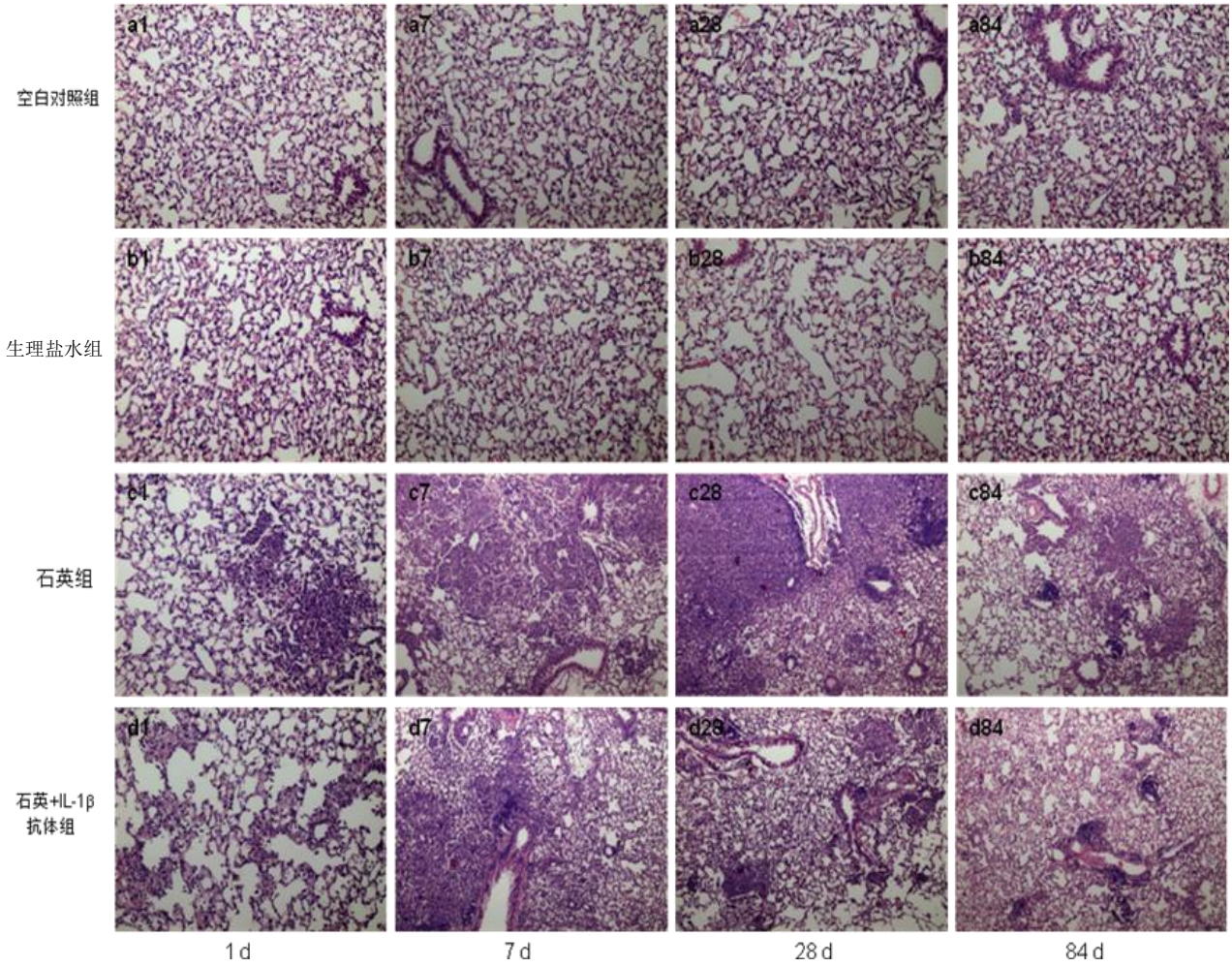
肺泡灌洗液中 TNF-α、MCP-1 的水平采用 ELISA 试剂盒（深圳达科为生物技术有限公司）进行测定。检测过程以及注意事项同于第一部分。

14. 统计学分析方法

结果均以 $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ 表示。组间差异的比较采用方差分析以及 Dunnett-t 检验，以 $P<0.05$ 为统计学差异的最低标准，数据的统计学分析采用 SAS9.1 软件。

结　果

1. 各组小鼠肺组织病理学改变



注：a1、b1、c1、d1 为染尘后第 1 d；a7、b7、c7、d7 为染尘后第 7 d；
a28、b28、c28、d28 为染尘后第 28 d；a84、b84、c84、d84 为染尘后第 84 d。

图 2.5 各组小鼠肺组织切片 H&E 染色镜下观察（200×）

由图 2.5 可见，空白对照组以及生理盐水组在灌肺后第 1、7、28 和 84 d 均未见炎性改变。石英组在染尘后第 1 d 可以看到肺组织内有明显的炎性细胞浸润聚集现象；相比较而言，石英+IL-1β 抗体组炎性细胞浸润聚集现象较轻。石英组在染尘后第 7 d 可以看到肺组织内炎性细胞较第 1 d 增多，炎性反应更加强烈；同样，石英+IL-1β 抗体组炎性细胞数目较 1 d 也明显增多，但仍然低于第 7 d 石英组。石英组在染尘后第 28 d，肺组织内炎性细胞浸润现象达到 4 个时间点中的最严重状态，并且肺泡腔中的渗出物明显增多；而在石英+IL-1β 抗体组，炎性细胞浸润聚集的现象开始减轻。石英

组和石英+IL-1β 抗体组肺组织炎性反应在染尘后第 84 d 较第 28 d 均有所减轻，而且石英+IL-1β 抗体组明显轻于石英组。我们对上述炎性反应进行量化评分，结果如表 1 所示，可以看出，在染尘后第 1、7、28 d 石英+IL-1β 抗体组肺组织炎性反应程度较石英组明显减轻，差异有统计学意义（P<0.05）。

表 1 肺组织切片炎性反应评分

分组 (n=8)	1 d	7 d	28 d	84 d
空白对照组	0	0	0	0
生理盐水组	0	0	0	0
石英组	$1.83\pm0.41^{**}$	$2.33\pm0.82^{**}$	$2.67\pm0.52^{**}$	$1.33\pm0.52^{**}$
石英+IL-1β 抗体组	$1.00\pm0.63^{**\#\#}$	$1.67\pm0.52^{**\#}$	$1.17\pm0.41^{**\#\#}$	$1.17\pm0.41^{**}$

注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{**}P$<0.01；
与石英组比较，$^{\#}P$<0.05，$^{\#\#}P$<0.01。

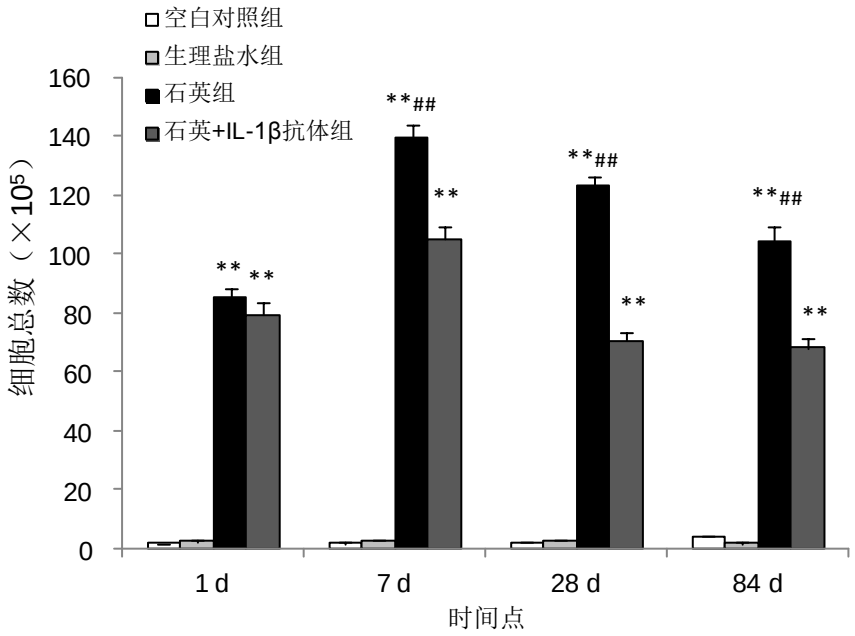
2. 各组小鼠肺泡灌洗液中细胞总数以及炎性细胞分类计数结果

2.1 细胞总数

与空白对照组或者生理盐水组相比，石英组和石英+IL-1β 抗体组肺泡灌洗液中的细胞总数在染尘后第 1、7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（P<0.01）。与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组小鼠肺泡灌洗液中的细胞总数在染尘后第 7、28、84 d 均显著降低，差异有统计学意义（P<0.01）。见图 2.6。

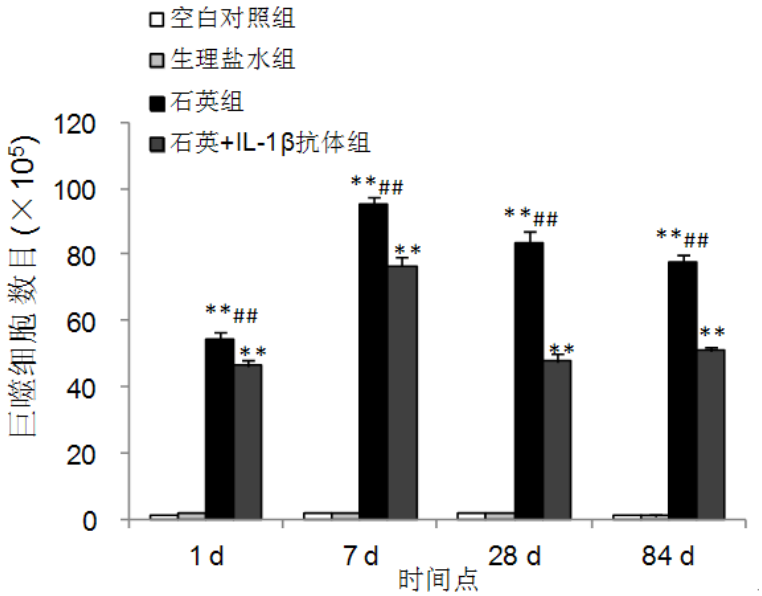
2.2 巨噬细胞计数

与空白对照组或者生理盐水组相比，石英组和石英+IL-1β 抗体组肺泡灌洗液中的巨噬细胞数目在染尘后第 1、7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（P<0.01）。与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组小鼠肺泡灌洗液中的巨噬细胞数目在染尘后第 1、7、28、84 d 均显著降低，差异有统计学意义（P<0.01）。见图 2.7。



注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{**}P<0.01$；与石英组比较，$^{\#\#}P<0.01$。

图 2.6 各组小鼠肺泡灌洗液中细胞总数

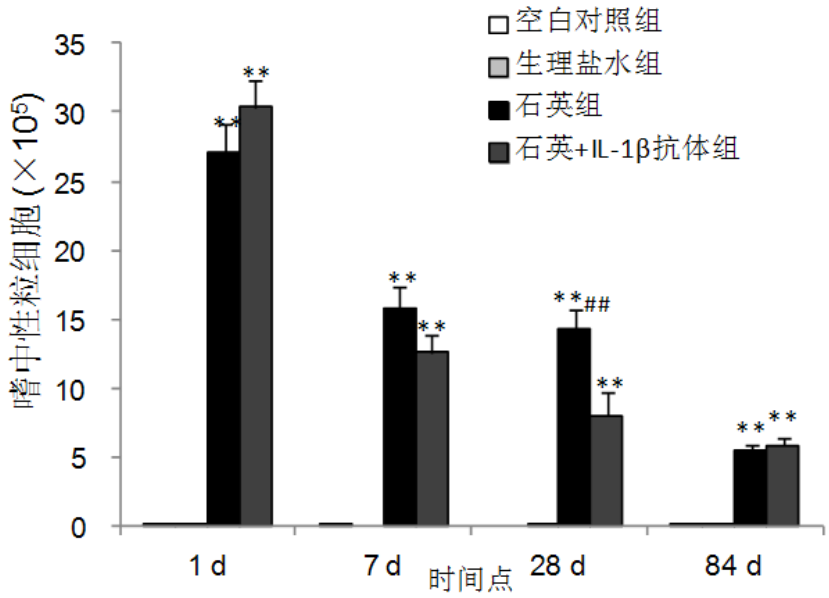


注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{**}P<0.01$；与石英组比较，$^{\#\#}P<0.01$。

图 2.7 各组小鼠肺泡灌洗液中巨噬细胞数目

2.3 嗜中性粒细胞计数

与空白对照组或者生理盐水组相比，石英组和石英+IL-1β 抗体组肺泡灌洗液中的嗜中性粒细胞数目在染尘后第 1、7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（P<0.01）。与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组小鼠肺泡灌洗液中的巨噬细胞数目在染尘后第 7、28 d 有所降低，但仅在第 28 d 时差异有统计学意义（P<0.01）。见图 2.8。

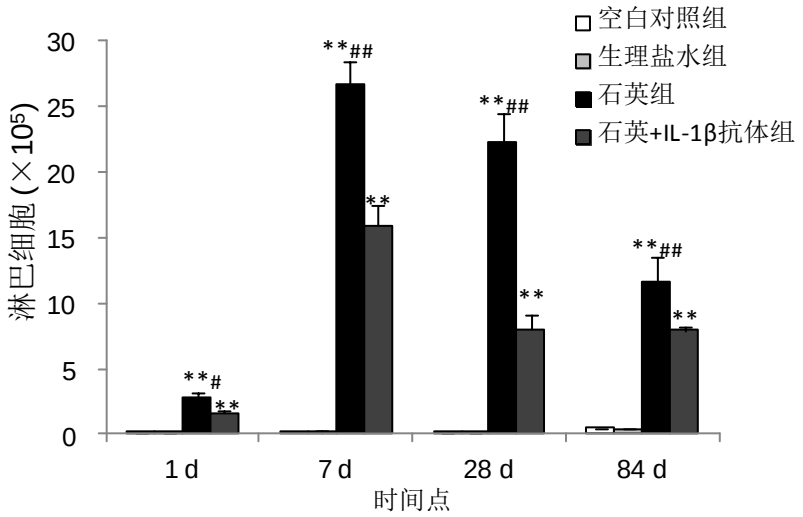


注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{**}P$<0.01；与石英组比较，$^{\#\#}P$<0.01。

图 2.8 各组小鼠肺泡灌洗液中嗜中性粒细胞数目

2.4 淋巴细胞计数

与空白对照组或者生理盐水组相比，石英组和石英+IL-1β 抗体组肺泡灌洗液中的淋巴细胞数目在染尘后第 1、7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（P<0.01）。与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组小鼠肺泡灌洗液中的淋巴细胞数目在染尘后第 1、7、28、84 d 有所降低，差异有统计学意义（P<0.05）。见图 2.9。

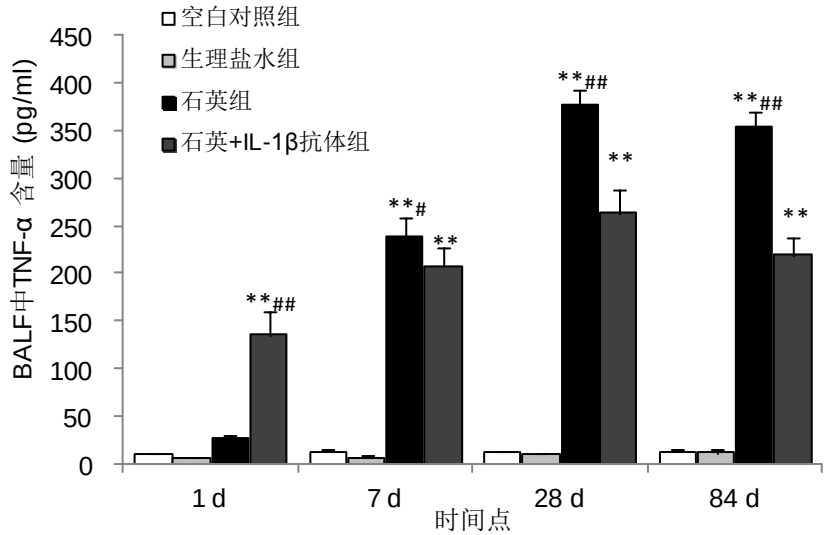


注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{**}P<0.01$；
与石英组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

图 2.9 各组小鼠肺泡灌洗液中淋巴细胞数目

3. 肺泡灌洗液中炎性因子测定结果

3.1 肺泡灌洗液中 TNF-α 的检测结果



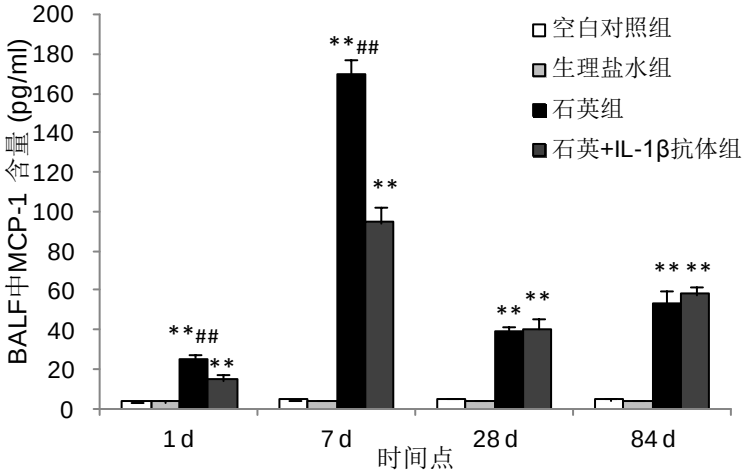
注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{**}P<0.01$；
与石英组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

图 2.10 各组小鼠肺泡灌洗液 TNF-α 含量

由图 2.10 可见，与空白对照组或者生理盐水组相比，石英组和石英+IL-1β 抗体组肺泡灌洗液中的 TNF-α 浓度在染尘后 7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（*P*<0.01）。与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组小鼠肺泡灌洗液中的 TNF-α 浓度在上述 3 个时间点上有所降低，差异有统计学意义（*P*<0.05）。此外，我们还观察到在染尘后第 1 d，石英组肺泡灌洗液中 TNF-α 浓度较对照组并未显著升高，但是石英+IL-1β 抗体组 TNF-α 浓度较对照组升高显著，差异有统计学意义（*P*<0.01）；并且与石英组相比，该升高有统计学意义（*P*<0.01）。

3.2 肺泡灌洗液中 MCP-1 的检测结果

与空白对照组或者生理盐水组相比，石英组和石英+IL-1β 抗体组肺泡灌洗液中的 MCP-1 浓度在染尘后 1、7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（*P*<0.01）。与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组小鼠肺泡灌洗液中的 MCP-1 浓度在染尘后第 1、7 d 均显著降低，差异有统计学意义（*P*<0.01）。此外，我们发现在染尘后第 7 d，石英组和石英+IL-1β 抗体组肺泡灌洗液中 MCP-1 浓度达到高峰。见图 2.11。



注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{**}P$<0.01；与石英组比较，$^{\#\#}P$<0.01。

图 2.11 各组小鼠肺泡灌洗液中 MCP-1 含量

讨 论

本节研究结果表明：石英肺暴露可以导致明显的肺部炎性反应，主要表现在病理切片炎性反应增强；肺泡灌洗液中总细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞以及淋巴细胞数目增加；肺泡灌洗液中 TNF-α、MCP-1 含量升高。使用 IL-1β 抗体中和 IL-1β 可以显著减轻该炎性反应，主要表现在石英+IL-1β 抗体组病理切片炎性反应减轻，炎性评分显著降低；肺泡灌洗液中总细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞数目在染尘后第 1、7、28、84 d 均显著降低；肺泡灌洗液中 TNF-α、MCP-1 含量有效降低；上述结果均这说明 IL-1β 在石英导致的肺部炎性反应中发挥了重要的作用。

矽肺发病的病理改变主要包括炎性和纤维化两个阶段。大量的人群、动物以及细胞实验均证明炎性反应在矽肺发病过程中发挥了重要的作用[17, 27, 71-73]。由各类炎性细胞如巨噬细胞、嗜中性粒细胞和淋巴细胞等介导的长期的炎性反应，可以导致大量炎性因子以及生长因子释放，这些因子可以促进成纤维细胞分化为成熟的肌成纤维细胞，后者可以分泌细胞外基质成分，最后促进肺纤维化形成[13, 74]。因此有观点认为，炎性反应是矽肺发病的基础，也是导致后期肺纤维化形成的基础[75]。控制石英暴露导致的炎性反应，有可能对控制后期肺纤维化形成具有有利作用。IL-1β 是一种经典的前致炎性因子。干预 IL-1β 已经成为临床治疗多种炎性相关疾病如糖尿病，关节炎等的有效方法[76-78]。Srivastava 等人的研究表明 IL-1β 基因敲除的小鼠对石英导致的炎性病理改变有明显的抵抗作用[25]。本研究进一步发现，阻断 IL-1β 可以显著降低肺部炎性细胞数目以及肺内炎性因子含量。

矽肺的发病机理包括不可控制的固有免疫应答和适应性免疫应答。淋巴细胞是一种经典的适应性免疫系统的细胞[11]。在本节研究中，肺泡灌洗液中炎性细胞分类计数的结果显示，石英暴露可以导致肺部淋巴细胞数目显著上升，抑制 IL-1β 可以有效减少淋巴细胞的数目。目前，关于淋巴细胞是否可以对石英暴露产生应答仍然存在争议。以往细胞实验表明石英暴露对 T 淋巴细胞不产生作用[79]；但是，动物实验表明石英的肺暴露可以使肺泡灌洗液中的淋巴细胞显著升高，这与我们的研究结果是一致的[14, 43]。最近，Beamer 的研究结果进一步指出，淋巴细胞可以通过 Nalp3 炎性体调控石英

导致的肺部炎性反应[36]。有观点认为，适应性免疫系统的活化是可以连接固有免疫系统与适应性免疫系统的某些固有免疫细胞和适应性免疫细胞活化的结果[11-12, 80]。我们的研究表明在矽肺发病过程中，IL-1β 和淋巴细胞可能具有连接固有免疫系统和适应性免疫系统的作用。

已有的小鼠矽肺模型研究表明，IL-1β 和 TNF-α 与石英诱导的炎性反应密切相关[74, 81-82]。我们的研究结果显示，抑制 IL-1β 可以在染尘后 7、28、84 d 显著降低石英导致的 TNF-α。Cardell 等人的研究表明将小鼠气管与重组合成的小鼠 IL-1β 纯品共同培养，可以导致由 TNF-α 升高为标志的炎性反应[83]。另外，Cassel 等人认为石英诱导的 TNF-α 是继石英诱导的 IL-1β 之后产生的，TNF-α 很有可能是由石英诱导的 IL-1β 刺激产生[27]。综合来看，上述研究结果表明 IL-1β 和 TNF-α 均为矽肺发病过程中的重要炎性因子，在此过程中，TNF-α 可能受 IL-1β 调节[84]。

值得注意的是，在染尘后第 1 d，石英组小鼠肺泡灌洗液中 TNF-α 含量反而显著低于石英+IL-1β 抗体组（图 2.10）。这说明在染尘后第 1 d 中和 IL-1β 并不能抑制 TNF-α 表达。关于这个现象，我们主要有如下两方面解释：

① IL-1β 是维持石英导致炎性反应的重要的细胞因子。在我们的动物模型中，IL-1β 抗体的使用在短时间内导致 IL-1β 急剧降低。由于 IL-1β 与 TNF-α 同样为重要的前致炎性因子。因此，我们推测，大量的 TNF-α 有助于代偿 IL-1β 的缺失，从而维持正常的炎性反应。

② TNF-α 可能由多条路径产生，因而抗 IL-1β 不能在短时间内即发挥对 TNF-α 的抑制作用。并且我们观察到，石英+IL-1β 抗体组肺泡灌洗液中 TNF-α 第 1 d 的升高并不影响 IL-1β 抗体后期对肺部炎性反应的抑制作用。

在本节研究中我们也发现，小鼠肺泡灌洗液中 MCP-1 含量的时间变化曲线并不同于 IL-1β 或 TNF-α。主要表现在，MCP-1 含量在染尘后第 28 d 较前期降低，而 IL-1β 或 TNF-α 含量在染尘后第 28 d 后仍然持续升高。MCP-1 含量的降低说明 MCP-1 可能主要在石英导致的急性炎性反应阶段发挥作用[85]，而长期的炎性反应仍然需要由 IL-1β 和 TNF-α 介导。MCP-1 在炎性反应过程中主要发挥诱导白细胞迁移聚集的作用

[17, 86-88]。我们发现，在染尘后第 1、7 d，抗 IL-1β 可以显著降低 MCP-1 的含量。而肺泡灌洗液中细胞计数的结果显示，抗 IL-1β 也可以显著降低肺泡灌洗液中细胞总数以及巨噬细胞和淋巴细胞数目，这就表明，IL-1β 有可能通过调节 MCP-1 表达来介导炎性细胞的浸润聚集现象。

综上所述，本节研究结果表明，中和 IL-1β 可能会通过降低其他炎性因子如 TNF-α、MCP-1 的表达，从而减轻石英导致的肺部炎性反应。IL-1β 可能是临床干预矽肺炎性反应的一个靶点，IL-1β 抗体具有抵抗矽肺发病过程中炎性反应的潜能。

第三节 IL-1β 在石英导致肺部纤维化中的作用

本节研究的主要目的是观察小鼠矽肺发病过程中纤维化指标的改变以及 IL-1β 在此变化过程中的作用。我们在小鼠染尘后第 1、7、28、84 d 对小鼠肺组织切片进行 Masson 染色，对肺组织纤维化程度进行评分；对肺组织中致纤维化因子 TGF-β 以及胶原主要成分Ⅰ型胶原、纤维粘连素 mRNA 水平进行实时荧光定量 PCR 检测，对肺泡灌洗液中 Th1 型免疫应答代表性细胞因子 IFN-γ 和 Th2 型免疫应答代表性细胞因子 IL-4 进行 ELISA 检测。

材料和方法

1. 粉尘样本

中国标准石英粉尘。

2. 主要仪器

2.1-2.8 同于第一部分；

2.9 LKBV 超薄切片机：瑞典 LKB 公司；

2.10 光学显微镜：日本 OLYMPUS 公司；

2.11 生物组织包埋仪：浙江金华科迪仪器设备有限公司；

2.12 核酸测定仪：美国 Thermo Fisher NanoDrop 公司；

2.13 普通 PCR 仪：德国 eppendorf 公司；

2.14 实时荧光定量 PCR 仪（7900HT Fast Real-time PCR System）：美国 ABI 公司。

3. 主要试剂

3.1-3.4 同于第一部分；

3.5 氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、盐酸、氢氧化钠（分析纯）：天津恒兴化学试剂制造有限公司。

3.6 Masson 染液：南京建成生物工程研究所；

3.7 DEPC：美国 Sigma 公司；

3.8 Trizol：美国 Invitrogen 公司；

3.9 小鼠 IFN-γ、IL-4 ELISA 试剂盒：深圳达科为生物技术有限公司；

3.10 总 RNA 提取试剂盒：日本 TOYOBO 公司；

3.11 Rever Tra Ace® qPCR RT 试剂盒：日本 TOYOBO 公司；

3.12 SYBR® Green Realtime PCR Master Mix 试剂盒：日本 TOYOBO 公司；

3.13 RNA 储存液：北京百泰克生物技术有限公司。

4. 主要试剂的配制

4.1-4.3 同于第一部分；

4.4 4%多聚甲醛

称取 16 g 多聚甲醛粉末（美国，Sigma 公司），置于 200 ml 三蒸水中。水浴加热至 60 ℃，滴加 5-7 滴 1 M NaOH 溶液，使之完全溶解。然后加入 160 ml 0.2 M Na_2HPO_4 溶液以及 40 ml 0.2 M KH_2PO_4 溶液。混匀后于 4 ℃密封保存。

4.5 DEPC 水

1 000 ml 三蒸水中加入 1 ml DEPC，混匀后在 1 000 ml 容量瓶中静置过夜，于 120℃高压 1 h。

4.6 75%乙醇

将高压后的 DEPC 水，与无水乙醇按照 1:3 比例混合摇匀，4 ℃保存，备用。

5. 实验动物分组

同于第一部分。

6. 粉尘暴露

同于第一部分。

7. 动物处死以及肺泡灌洗液收集

同于第一部分。肺泡灌洗结束后，将右肺组织切成小块，置于 RNA 储存液中，于-20 ℃保存；将左肺组织置于 4%多聚甲醛中固定，待做病理。

8. 肺组织切片制作

同于第二部分第二节。

9. 组织切片 Masson 染色

选用 Masson 染色试剂盒（南京建成生物工程研究所），严格按照其说明书，对肺组织切片进行 Masson 染色。然后光学显微镜下观察，进行纤维化评分，并拍照。

10. 肺组织纤维化评分

纤维化按照 Ashcroft 的方法分为 4 级：正常肺组织，记为 0 分；轻度纤维化，肺泡壁或/和支气管壁有轻度的纤维性增厚，不伴有肺泡构的明显破坏，记为 1 分；中度纤维化，肺泡壁或/和支气管壁的中度纤维性增厚，版有肺泡结构损伤，伴有小的纤维条带或者纤维块生成，记为 2 分；重度纤维化，肺泡结构严重损伤，大块纤维化形成，造成肺实变，记为 3 分[89]。

11. 肺泡灌洗液中 IFN-γ、IL-4 含量测定

肺泡灌洗液中 IFN-γ、IL-4 的水平采用 ELISA 试剂盒（深圳达科为生物技术有限公司）进行测定。检测过程以及注意事项同于第一部分。

12. 小鼠肺组织总 RNA 的提取

12.1 肺组织匀浆

12.1.1 将小鼠肺组织样本提前半小时从-20 ℃取出，待 RNA 储存液溶化后，将组织从 RNA 存储液中取出放在吸水纸上将液体吸干净，再放入 10 ml 去酶样品管中，置于冰上。

12.1.2 打开匀浆机，将钻头浸泡于 75％乙醇中进行清洗（钻头速度由小至最大，离心管上下移动），停机后用针头将钻头缝中的残留组织清除。再次用 75%乙醇清洗后，用 DEPC 水清洗钻头，待钻头自然晾干。

12.1.3 每 50-100 mg 肺组织加入 1 ml Trizol，样本管套入钻头，开机匀浆，直至无任何组织块残留。匀浆完成后，按照上述步骤清洗钻头，再对下一个样本进行匀浆。

12.2 总 RNA 提取

12.2.1 将样本管中的组织匀浆液移入 1.5 ml EP 管中，室温静置 5 min。

12.2.2 于 4 ℃，12 000 rpm 离心 10 min，吸取上清，转入干净的 EP 管中。

12.2.3 将 EP 管室温（15-30 ℃）静置 5-10 min，加入 0.2 ml 氯仿。紧盖样品盖管，用力剧烈摇晃 15 s，使其充分混匀。在室温下静置 8 min 左右，于 4 ℃，12 000 rpm 离心 15 min。

12.2.4 将上层水相（约 60% Trizol 体积）转移到新的 EP 管中，加入 0.5 ml 异丙醇，混匀后在室温下静置 30 min，于 4 ℃，12 000 rpm 离心 10 min。

12.2.5 小心倒掉上清，加 1 ml 现配的 75%乙醇，振荡洗涤 RNA 沉淀一次（RNA 要悬浮起来），于 4℃，7 500 rpm 离心 5 min。

12.2.6 小心倒掉上清，室温晾干 5-10 min 左右。注意不能让 RNA 沉淀完全干燥。再在管中加入 25 μl DEPC 水溶解，反复吹打混匀。

12.2.7 立即保存在-70 ℃的冰箱中，或进行逆转录。

13. 逆转录

13.1 测定 RNA 纯度与含量

取 2 μl 总 RNA，进行 10 倍稀释后，用核酸蛋白分析仪检测 RNA 纯度与含量，纯度以 OD260/OD280 表示，结果显示纯度在 1.8-2.0 之间，浓度在 2 μg/μl 左右表示 RNA 可用。

13.2 逆转录体系

首先将 3 μg 总 RNA 置于 65 ℃温浴 5 min，然后使用逆转录试剂盒，按照其说明书构建反应体系，如表 2 所示。

表 2 逆转录反应体系

反应液成分	含量

Nuclease-free water	Up to 20 μl
5×RT buffer	4 μl
RT enzyme mix	1 μl
Primer mix	1 μl
总 RNA	3 μg

将上述组分加入去酶的离心管中（冰上操作），混匀后低速离心。

13.3 逆转录反应条件

于 PCR 仪上进行逆转录反应，条件设定为：首先在 37 ℃下进行 15 min 逆转录反应；再在 98 ℃下进行 5 min 酶失活反应。逆转录所得 cDNA 产物如果不及时使用，应保存在-80 ℃。

14. 逆转录产物的实时定量 PCR

14.1 引物序列设计如表 3 所示。

表 3 实时定量 PCR 所用引物的序列

基因	类型	引物序列(5’ to 3’)
I 型胶原	Forward	CTGGCGGTTCAGGTCCAAT
	Reverse	TTCCAGGCAATCCACGAGC
纤维粘连素	Forward	CTATCTATGCTGTGGAGGAG
	Reverse	GAGTTTGGTGGTCTGTTGTG
TGF-β	Forward	GTGTGGAGCAACATGTGGAACTCTA
	Reverse	CGCTGAATCGAAAGCCCTGTA
GAPDH	Forward	AAATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC
	Reverse	CAACAATCTCCACTTTGCCACTG

将引物稀释为浓度 10 μM 分装，冻存于-20 ℃。

14.2 实时定量 PCR 反应体系

按照 SYBR® Green Realtime PCR Master Mix 试剂盒说明进行荧光定量 PCR 反应，反应液配制如表 4 所示。

表 4 荧光定量 PCR 反应体系（总体积为 10 μl）

试剂	添加量	终浓度
去酶三蒸水	3.2 μl	
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	5 μl	1×
上游引物（10 μM）	0.4 μl	0.4 μM
下游引物（10 μM）	0.4 μl	0.4 μM
样品溶液	1 μl	

14.3 实时荧光定量 PCR 反应条件如图 2.12 所示。

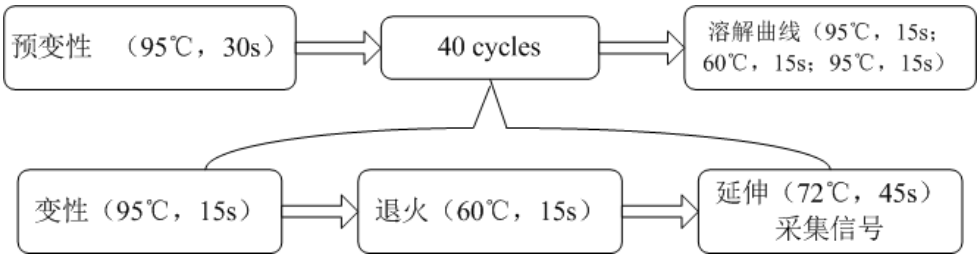


图 2.12 实时荧光定量 PCR 反应条件

选取 GAPDH 作为内参，每个样品的每个基因设 3 个平行孔。目的基因与内参在相同的条件下扩增，使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法来分析目的基因 mRNA 的相对表达。其中Δ Ct 是目的基因与内参基因阈值循环数（threshold cycle，Ct）的差值，Δ Δ Ct 为各染尘组与空白对照组Δ Ct 值之差。结果将空白对照组 mRNA 的相对表达量设为 1，目标基因

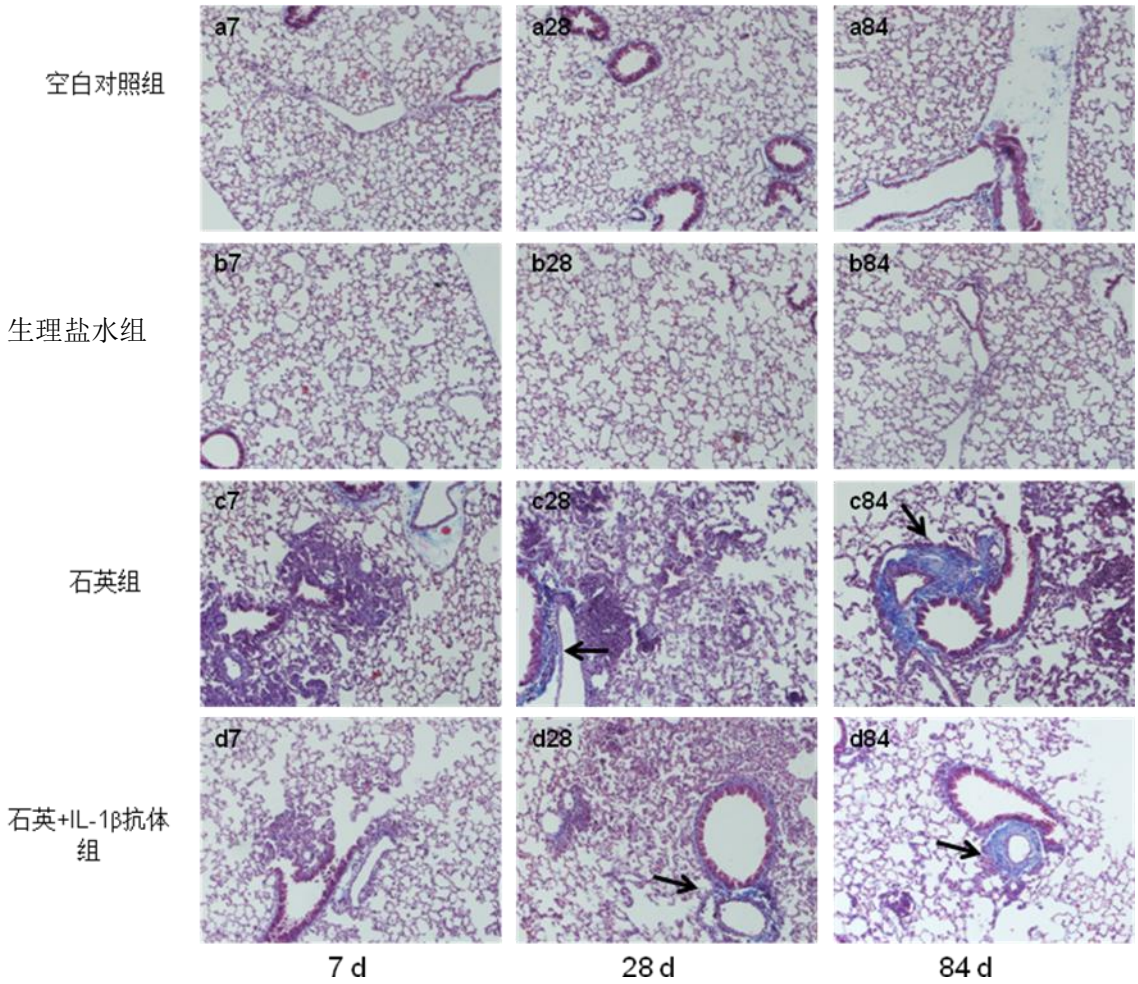
mRNA 的相对表达量即为空白对照组 mRNA 水平的相对倍数。

15. 统计学分析方法

结果均以 $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ 表示。组间差异的比较采用方差分析以及 Dunnett-t 检验，以 $P<0.05$ 为统计学差异的最低标准，数据的统计学分析采用 SAS9.1 软件。

结　果

1. 各组小鼠肺组织病理学改变



注：a7、b7、c7、d7 为染尘后第 7 d；a28、b28、c28、d28 为染尘后第 28 d；a84、b84、c84、d84 为染尘后第 84 d。

图 2.13 各组小鼠肺组织切片 Masson 染色镜下观察（200×）

肺组织病理结果显示，各组小鼠在灌肺后第 1 d 均未表现出纤维化改变，除此之外，空白对照组和生理盐水组在灌肺后第 7、28、84 d 均未表现出纤维化改变。染尘后第 7 d，石英组小鼠肺组织偶尔可见支气管纤维性增厚，但这种情况在石英+IL-1β 抗体组没有出现。染尘后第 28 d，石英组小鼠肺组织可见胶原沉积以及小的纤维带或纤维块形成，肺泡结构被破坏，并且有小面积的肺实变出现；在石英+IL-1β 抗体组，上述病变明显较石英组轻。染尘后第 84 d，石英组小鼠肺组织可见较大面积的纤维带和纤维块，石英+IL-1β 抗体组纤维化病理改变仍然轻于石英组，如图 2.13 所示。我们对上述病理改变量化评分结果如表 5 所示，石英肺暴露后，石英组和石英+IL-1β 抗体组小鼠肺组织从染尘后第 7 d 即可出现一定程度的纤维化改变，并且随着暴露时间的延长，该纤维化改变越来越严重。但 IL-1β 抗体的使用，可以从染尘后第 28 d 开始，显著抑制石英暴露导致的肺纤维化改变，差异有统计学意义（P<0.01）。

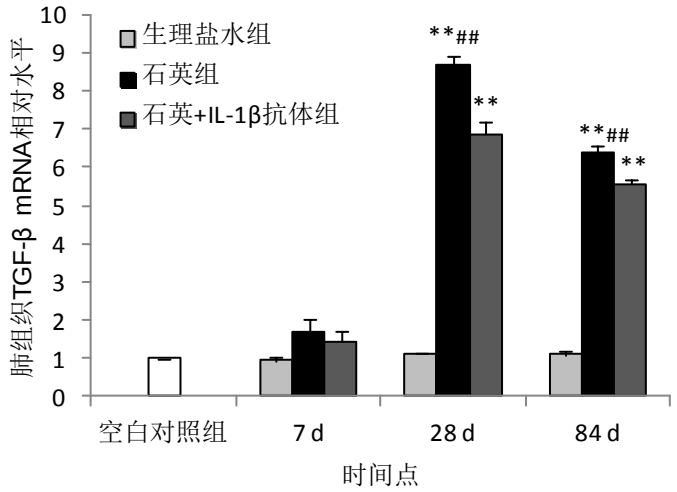
表 5 肺组织切片纤维化评分

分组 (n=8)	7 d	28 d	84 d
空白对照组	0	0	
生理盐水组	0	0	0
石英组	$0.33\pm0.06^{**}$	$1.67\pm0.11^{**}$	$2.33\pm0.16^{**}$
石英+IL-1β 抗体组	$0.28\pm0.06^{**}$	$0.8\pm0.11^{**\#\#}$	$1.67\pm0.21^{**\#\#}$

注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{**}P$<0.01；
与石英组比较，$^{\#\#}P$<0.01。

2. 各组小鼠肺组织中 TGF-β mRNA 相对表达

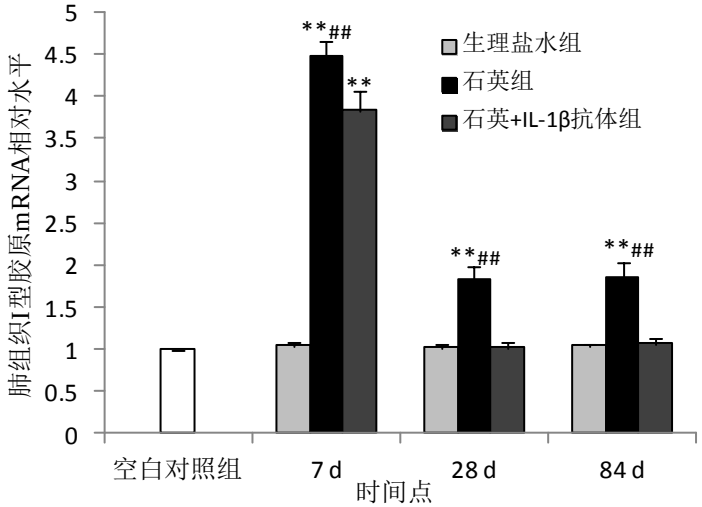
如图 2.14 所示，与空白对照组或生理盐水组相比，石英组肺组织中 TGF-β mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均有升高，并且在第 28、84 d 差异有统计学意义（P<0.01）；同时，与空白对照组或生理盐水组相比，石英+IL-1β 抗体组肺组织中 TGF-β mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均有升高，并且在第 28、84 d 差异有统计学意义（P<0.01）；另外，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组肺组织中 TGF-β mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均有所降低，并且在第 28、84 d 差异有统计学意义（P<0.01）。



注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{**}P<0.01$；
与石英组比较，$^{\#\#}P<0.01$。

图 2.14 各组小鼠肺组织中 TGF-β mRNA 水平

3. 各组小鼠肺组织中 I 型胶原 mRNA 相对表达



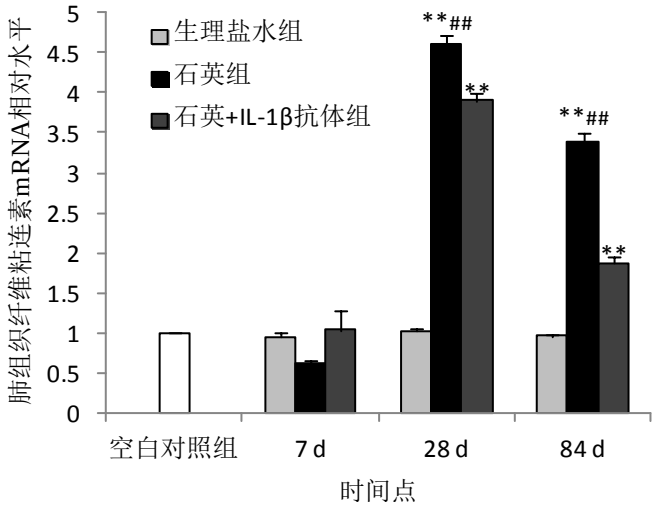
注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{**}P<0.01$；
与石英组比较，$^{\#\#}P<0.01$。

图 2.15 各组小鼠肺组织中 I 型胶原 mRNA 水平

与空白对照组或生理盐水组相比，石英组肺组织中 I 型胶原 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（P<0.01）；同时，与空白对照组或生理盐水组相比，石英+IL-1β 抗体组肺组织中 I 型胶原 mRNA 水平仅在染尘后第 7 d 显著升高，差异有统计学意义（P<0.01）；另外，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组肺组织中 I 型胶原 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均显著降低，差异有统计学意义（P<0.01）。见图 2.15。

4. 各组小鼠肺组织中纤维粘连素 mRNA 相对表达

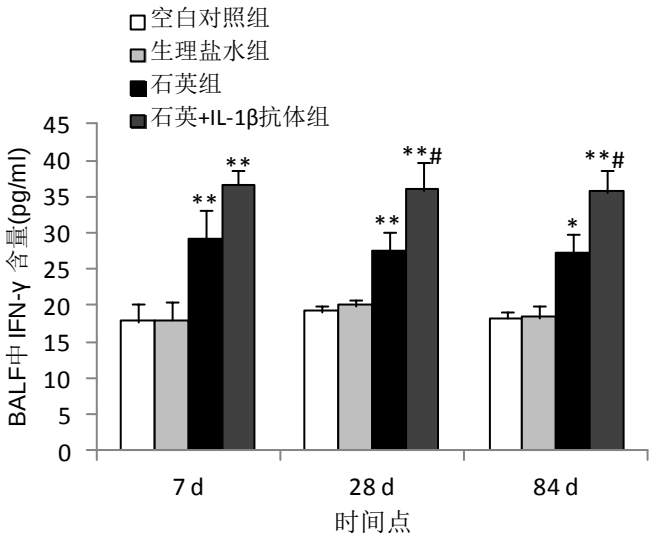
如图 2.16 所示，与空白对照组或生理盐水组相比，石英组肺组织中纤维粘连素 mRNA 水平在染尘后第 28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（P<0.01）；同时，与空白对照组或生理盐水组相比，石英+IL-1β 抗体组肺组织中纤维粘连素 mRNA 水平在染尘后第 28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（P<0.01）；另外，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组肺组织中纤维粘连素 mRNA 水平在染尘后第 28、84 d 均显著降低，差异有统计学意义（P<0.01）。



注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{**}P$<0.01；与石英组比较，$^{\#\#}P$<0.01。

图 2.16 各组小鼠肺组织中纤维粘连素 mRNA 水平

5. 各组小鼠肺泡灌洗液中 IFN-γ 含量变化



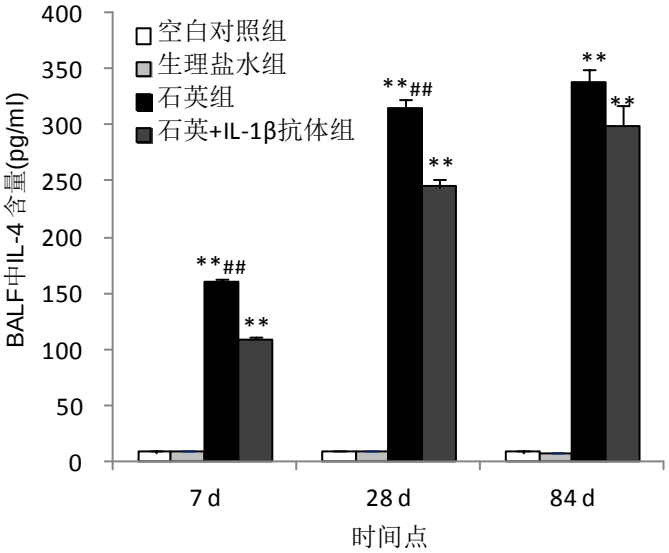
注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{**}P<0.01$；
与石英组比较，$^{\#}P<0.05$。

图 2.17 各组小鼠肺泡灌洗液中 IFN-γ 含量

与空白对照组或生理盐水组相比，石英组肺泡灌洗液中 IFN-γ 含量在染尘后第 7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（$P<0.01$）；同时，与空白对照组或生理盐水组相比，石英+IL-1β 抗体组肺泡灌洗液中 IFN-γ 含量在染尘后第 7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（$P<0.01$）；另外，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组肺泡灌洗液中 IFN-γ 含量在染尘后第 28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）。见图 2.17。

6. 各组小鼠肺泡灌洗液中 IL-4 含量变化

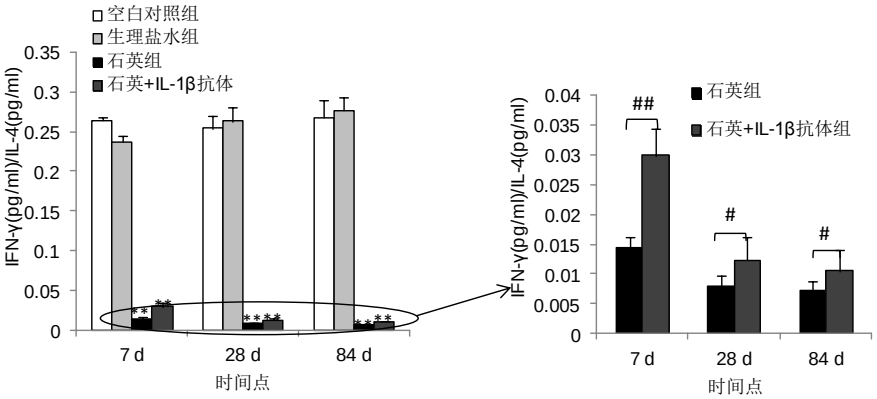
如图 2.18 所示，与空白对照组或生理盐水组相比，石英组肺泡灌洗液中 IL-4 含量在染尘后第 7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（$P<0.01$）；同时，与空白对照组或生理盐水组相比，石英+IL-1β 抗体组肺泡灌洗液中 IL-4 含量在染尘后第 7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（$P<0.01$）；另外，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组肺泡灌洗液中 IL-4 含量在染尘后第 7、28 d 均显著降低，差异有统计学意义（$P<0.01$）。



注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{**}P<0.01$；
与石英组比较，$^{\#\#}P<0.01$。

图 2.18 各组小鼠肺泡灌洗液中细胞 IL-4 含量

7. 各组小鼠肺泡灌洗液中 IFN-γ/IL-4 比值变化



注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{**}P<0.01$；
与石英组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

图 2.19 各组小鼠肺泡灌洗液中 IFN-γ/IL-4 比值

如图 2.19 所示，与空白对照组或生理盐水组相比，石英组肺泡灌洗液中 IFN-γ/IL-4

比值在染尘后第 7、28、84 d 均显著降低，差异有统计学意义（*P*<0.01）；同时，与空白对照组或生理盐水组相比，石英+IL-1β 抗体组肺泡灌洗液中 IFN-γ/IL-4 比值在染尘后第 7、28、84 d 均显著降低，差异有统计学意义（*P*<0.01）；另外，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组肺泡灌洗液中 IL-4 含量在染尘后第 7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（*P*<0.05）。

讨 论

本节研究结果表明：在石英染尘 28 d 以后，肺组织出现了明显的胶原沉积，这说明我们完整地构建了小鼠石英暴露后从炎性反应到纤维化形成的模型。我们观察了各组小鼠肺组织中 TGF-β、I 型胶原、纤维粘连素 3 个纤维化指标的 mRNA 水平，研究结果表明，IL-1β 在可以通过促进这 3 个指标的表达促进胶原沉积；此外，我们对各组小鼠肺泡灌洗液中 Th1 型免疫应答代表性细胞因子 IFN-γ 和 Th2 型免疫应答代表性细胞因子 IL-4 进行了 ELISA 测定，并利用 IFN-γ/IL-4 比值对 Th1/Th2 平衡进行了评估，研究结果显示，IL-1β 可能通过调节 Th1/Th2 平衡向 Th2 型免疫应答转化来促进石英导致的肺纤维化形成。

如第二节讨论中所述，炎性反应和纤维化是矽肺发病最显著的两个环节。有观点认为，后期纤维化形成是前期炎性反应导致的结果，并且纤维化形成反过来可以控制炎性反应[90]。因为在纤维化过程中沉积的胶原可以将炎性反应部位包裹，使炎性反应局限在肺组织局部[71, 91]。但近几年也有研究认为矽肺发病过程中的炎性反应和纤维化是两个不相互依赖的过程[92]。主要原因有以下 3 条：①部分实验结果表明，肺部炎性反应后期并不出现纤维化[93]；②另有部分实验结果显示，控制肺部炎性反应，并不能有效控制后期的肺纤维化[94-95]；③在临床试验中，控制炎性反应并未能有效控制肺纤维化改变[96]。从我们的研究中可以看出，石英肺暴露不仅可以导致肺部炎性反应，也会导致明显的肺部胶原沉积。在石英暴露早期控制 IL-1β，可以显著减轻肺部炎性反应和纤维化形成。

研究表明，当石英粉尘通过呼吸道进入机体后，首先可被肺泡巨噬细胞吞噬，激活胞内 Nalp3 炎性小体，导致 IL-1β 释放。Cassel 等人的研究表明，与野生型小鼠相

比，Nalp3 基因敲出的小鼠石英暴露后，肺组织只出现较少量的胶原沉积[27]。此外，Piguet 等人的研究表明，用 IL-1 受体拮抗剂阻断 IL-1β 的作用，也可以减轻石英导致的肺纤维化[26]。肺泡巨噬细胞被石英激活后，可以释放致纤维化因子，如 TGF-β。TGF-β 可以促进成纤维细胞分化为肌成纤维细胞，后者可以分泌大量的细胞外基质成分，如 I 型胶原、纤维粘连素等，从而加速纤维化形成[97-98]。本研究中，我们对各组小鼠肺组织中 TGF-β、I 型胶原、纤维粘连素 mRNA 水平进行了实时荧光定量 PCR 检测。结果显示，石英暴露可以导致肺内这 3 个指标的升高，尤其在石英暴露 28 d 以后，升高更为显著。而 IL-1β 抗体可以有效抑制这 3 个指标的表达。有研究显示，TGF-β 对 I 型胶原和纤维粘连素的合成起调控作用[98]。这就提示我们，IL-1β 有可能通过提高 TGF-β 表达从而促进石英暴露导致的肺纤维化形成。

另外，我们发现，IL-1β 对矽肺发病过程中肺组织 Th1/Th2 平衡具有一定的调节作用。主要表现在，石英暴露可以显著降低肺组织 IFN-γ/IL-4 比值，而 IL-1β 抗体的使用，可以使该比值较石英组有显著的回升。目前，关于 Th1/Th2 平衡在矽肺发病过程中的作用仍然存在一定争议。但已经确定的是，Th1 型免疫应答和 Th2 型免疫应答均在矽肺发病过程中发挥了必要的作用[13, 99-100]。已有研究指出，Th2 型免疫应答主要在石英导致的肺纤维化过程中发挥作用[101-102]。我们的研究一方面结果显示石英暴露后，小鼠肺泡灌洗液中 IL-4 水平大幅升高，致使 Th1/Th2 平衡向 Th2 型免疫应答转移，这与 Liu 等人的研究结果是一致的[14]。另一方面也显示，中和 IL-1β 可以从一定程度上抑制 Th1/Th2 平衡向 Th2 型免疫应答转移。该结果说明在石英导致的肺纤维化形成过程中，IL-1β 可以通过调节 Th1/Th2 平衡向 Th2 型免疫应答转移而促进肺纤维化形成。

综上所述，在石英导致的肺纤维化形成过程中，IL-1β 发挥了积极的作用。IL-1β 可能通过上调致纤维化因子 TGF-β 表达和促进 Th1/Th2 平衡向 Th2 型免疫应答转移而促进肺纤维化形成。

第三部分　石英暴露所致心肾炎性及纤维化反应和 IL-1β 在该反应中的作用

石英暴露通常和呼吸系统疾病密切相关，如矽肺。伴随着对矽肺研究的逐步深入，石英暴露导致的肺部有害作用已经得到了较好的评估与研究。但是，关于石英暴露导致肺外脏器损伤的研究仍比较缺乏。以往有流行病学研究表明，在矽肺病人中，心血管系统疾病为第一位死因[6]。我们组前期队列研究结果显示累计接尘与心血管疾病死亡率存在剂量-反应关系[32]。实验室研究表明，将石英粉尘与人脐静脉内皮细胞共同培养，可以导致一系列致炎性细胞因子产生，如 IL-6、IL-1β 和 TNF-α[8]。近几年来，有研究表明石英粉尘也可能存在一定的肾毒性。Vupputuri 等人在其流行病学研究中发现石英粉尘的职业暴露与职业工人的慢性肾脏疾病正相关[7]。细胞实验显示，石英粉尘对可以通过调节胞浆钙浓度对肾脏细胞具有直接的损伤作用[9]。另外，也有动物实验证实了纳米级石英粉尘肺暴露可以导致肺外脏器的损伤。但是关于标准石英粉尘（1-5 μm 粒径）肺暴露后能否引起肺外脏器损伤以及损伤机制仍少有研究。石英粉尘对肺脏的损伤可以特征性的分为炎性反应和纤维化形成两个过程，因此，在本节研究中，我们主要探讨心脏、肾脏组织炎性反应和纤维化反应两个方面。

本部分研究中，我们采用第二部分研究所造的小鼠矽肺以及 IL-1β 中和模型，对小鼠心脏以及肾脏组织中炎性反应指标如 IL-1β、IL-6、TNF-α、MCP-1 和纤维化反应指标如 TGF-β、I 型胶原、III 型胶原、纤维粘连素及 Th1/Th2 平衡相关指标 IFN-γ、IL-4 或者 IL-13 mRNA 水平进行了实时荧光定量 PCR 检测。

第一节 石英暴露所导致的心脏炎性及纤维化反应和 IL-1β 在该反应中的作用

本节研究的主要目的是观察石英肺暴露以后，小鼠心脏组织炎性以及纤维化反应，并且观察 IL-1β 在该反应中的作用。我们在小鼠灌肺处理后第 7、28、84 d，对小

鼠心脏组织中 IL-1β、IL-6、TNF-α、MCP-1、TGF-β、I 型胶原、III 型胶原、纤维粘连素、IFN-γ 和 IL-13 mRNA 水平进行了实时荧光定量 PCR 检测。

材料和方法

1. 粉尘样本

中国标准石英粉尘。

2. 主要仪器

2.1 核酸测定仪：美国 Thermo Fisher NanoDrop 公司；

2.2 普通 PCR 仪：德国 eppendorf 公司；

2.3 实时荧光定量 PCR 仪（7900HT Fast Real-time PCR System）：美国 ABI 公司。

3. 主要试剂

3.1 DEPC：美国 Sigma 公司；

3.2 Trizol：美国 Invitrogen 公司；

3.3 总 RNA 提取试剂盒：日本 TOYOBO 公司；

3.4 Rever Tra Ace® qPCR RT 试剂盒：日本 TOYOBO 公司；

3.5 SYBR® Green Realtime PCR Master Mix 试剂盒：日本 TOYOBO 公司；

3.6 RNA 储存液：北京百泰克生物技术有限公司。

4. 主要试剂的配制

4.1 DEPC 水

1 000 ml 三蒸水中加入 1 ml DEPC，混匀后在 1 000 ml 容量瓶中静置过夜，于 120 ℃高压 1 h。

4.2 75%乙醇

将高压后的 DEPC 水，与无水乙醇按照 1:3 比例混合摇匀，4 ℃保存，备用。

5. 实验动物分组

同于第一部分。

6. 粉尘暴露

同于第一部分。

7. 心脏组织收集

经取血后，将小鼠四肢固定。用镊子轻轻拎起剑突部位的皮肤，用剪刀向两腋下呈倒三角形剪开胸廓。轻轻取下心脏，去血，称重，于生理盐水中冲洗干净。将心脏组织切成小块，再置于 RNA 储存液中，于-20 ℃保存。

8. 小鼠心脏组织总 RNA 的提取

同于第二部分第三节肺组织总 RNA 提取方法。

9. 逆转录

同于第二部分第三节。

10. 逆转录产物的实时定量 PCR

10.1 引物序列设计如表 6 所示。

表 6 实时定量 PCR 所用引物的序列

基因	类型	引物序列(5’ to 3’)
IL-1β	Forward	TCCAGGATGAGGACATGAGCAC
	Reverse	GAACGTCACACACCAGCAGGTTA
IL-6	Forward	CCAGTTTGGTAGCATCCATCATTTC
	Reverse	CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA
TNF-α	Forward	CCTCCAGAAAAGACACCATGA
	Reverse	GGTCTGGGCCATAGAACTGAT
MCP-1	Forward	GTGCTGAAGACCTTAGGGCAGA
	Reverse	AGCAGCAGGTGTCCCAAAGA
TGF-β	Forward	GTGTGGAGCAACATGTGGAACTCTA
	Reverse	CGCTGAATCGAAAGCCCTGTA
I 型胶原	Forward	CTGGCGGTTCAGGTCCAAT
	Reverse	TTCCAGGCAATCCACGAGC
III 型胶原	Forward	ATGGTGGTTTTCAGTTCAGCTATG
	Reverse	GCCCGGCTGGAAAGAAGT
纤维粘连素	Forward	CTATCTATGCTGTGGAGGAG
	Reverse	GAGTTTGGTGGTCTGTTGTG

IFN-γ	Forward	TGGCTGTTTCTGGCTGTTACT
	Reverse	CTGATGGCCTGATTGTCTTTC
IL-13	Forward	GAGCGAATGGAGTGAAGAGG
	Reverse	GCTCAATGTGGGTTCAGGTT
GAPDH	Forward	AAATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC
	Reverse	CAACAATCTCCACTTTGCCACTG

10.2 实时定量 PCR 反应体系

同于第二部分第三节。

11. 统计学分析方法

结果均以 $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ 表示。组间差异的比较采用方差分析以及 Dunnett-t 检验，以 $P<0.05$ 为统计学差异的最低标准，数据的统计学分析采用 SAS9.1 软件。

结 果

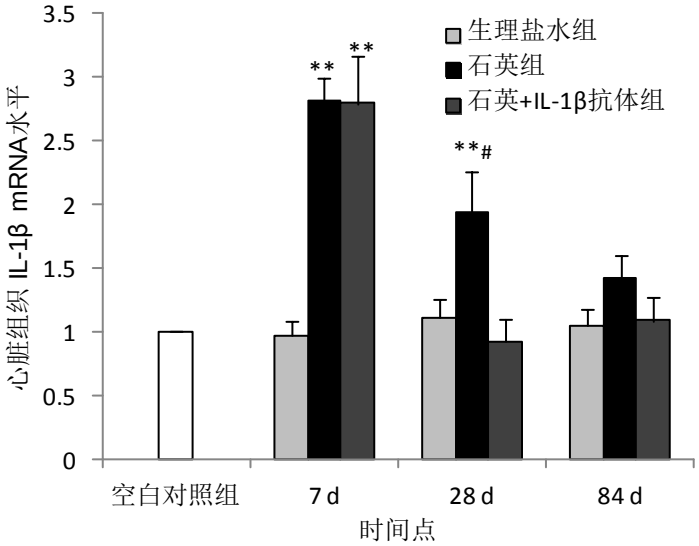
1. 各组小鼠心脏组织炎性相关指标 mRNA 水平

1.1 IL-1β mRNA 水平

如图 3.1 所示，与生理盐水组相比，石英组心脏组织中 IL-1β mRNA 水平在染尘后第 7、28 d 均显著升高，差异有统计学意义（$P<0.01$）；与生理盐水组相比，石英+IL-1β 抗体组心脏组织中 IL-1β mRNA 水平在染尘后第 7 d 显著升高，差异有统计学意义（$P<0.01$）；另外，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组心脏组织中 IL-1β mRNA 水平在染尘后第 28 d 显著降低，差异有统计学意义（$P<0.05$）。

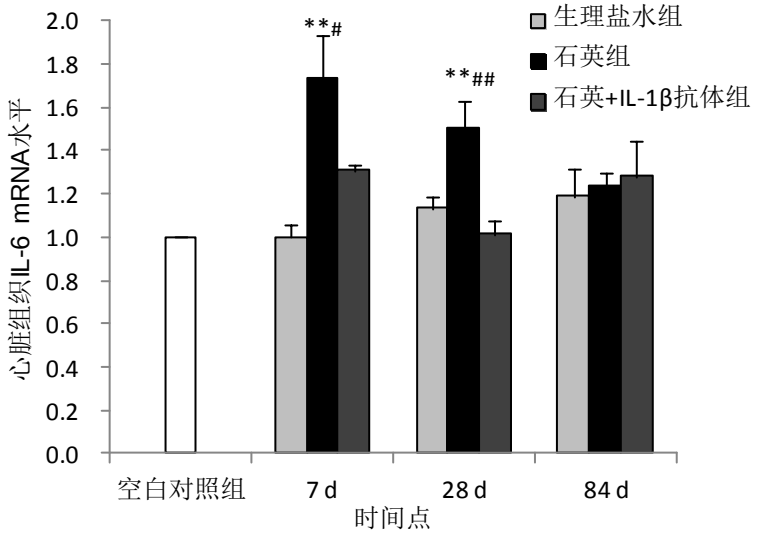
1.2 IL-6 mRNA 水平

如图 3.2 所示，与生理盐水组相比，石英组心脏组织中 IL-6 mRNA 水平在染尘后第 7、28 d 均显著升高，差异有统计学意义（$P<0.01$）；与生理盐水组相比，石英+IL-1β 抗体组心脏组织中 IL-6 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均无显著变化；另外，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组心脏组织中 IL-6 mRNA 水平在染尘后第 7、28 d 显著降低，差异有统计学意义（$P<0.05$）。



注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{**}P<0.01$；与石英组比较，$^{\#}P<0.05$。

图 3.1 各组小鼠心脏组织中 IL-1β mRNA 水平



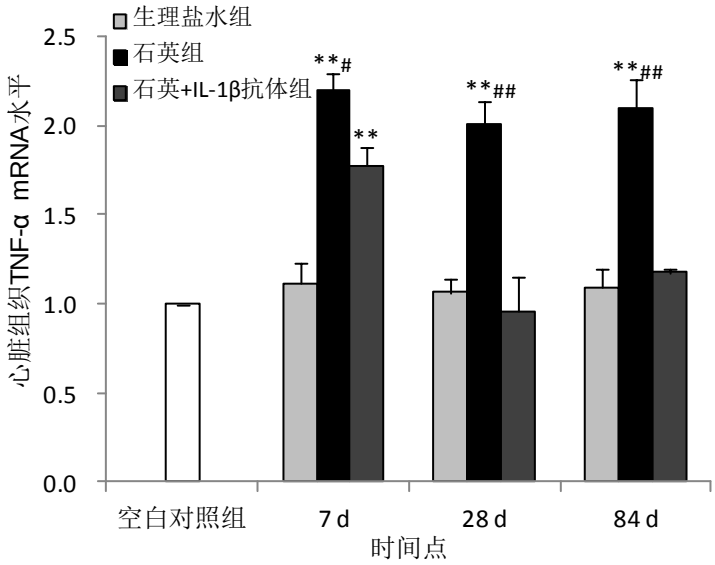
注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{**}P<0.01$；与石英组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

图 3.2 各组小鼠心脏组织中 IL-6 mRNA 水平

1.3 TNF-α mRNA 水平

如图 3.3 所示，与生理盐水组相比，石英组心脏组织中 TNF-α mRNA 水平在染尘

后第 7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（*P*<0.01）；与生理盐水组相比，石英+IL-1β 抗体组心脏组织中 TNF-α mRNA 水平在染尘后第 7 d 显著升高，差异有统计学意义（*P*<0.01）；另外，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组心脏组织中 TNF-α mRNA 水平在染尘后 7、28、84 d 均显著降低，差异有统计学意义（*P*<0.05）。

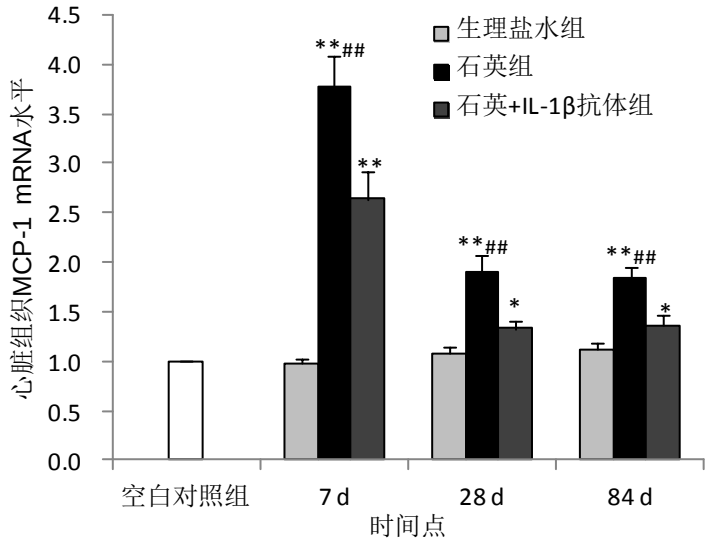


注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{**}P$<0.01；与石英组比较，$^{\#}P$<0.05，$^{\#\#}P$<0.01。

图 3.3 各组小鼠心脏组织中 TNF-α mRNA 水平

1.4 MCP-1 mRNA 水平

如图 3.4 所示，与生理盐水组相比，石英组心脏组织中 MCP-1 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（*P*<0.01）；与生理盐水组相比，石英+IL-1β 抗体组心脏组织中 MCP-1 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（*P*<0.05）；另外，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组心脏组织中 MCP-1 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均显著降低，差异有统计学意义（*P*<0.01）。



注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与石英组比较，$^{\#\#}P<0.01$。

图 3.4 各组小鼠心脏组织中 MCP-1 mRNA 水平

2. 各组小鼠心脏组织纤维化相关指标 mRNA 水平

2.1 TGF-β mRNA 水平

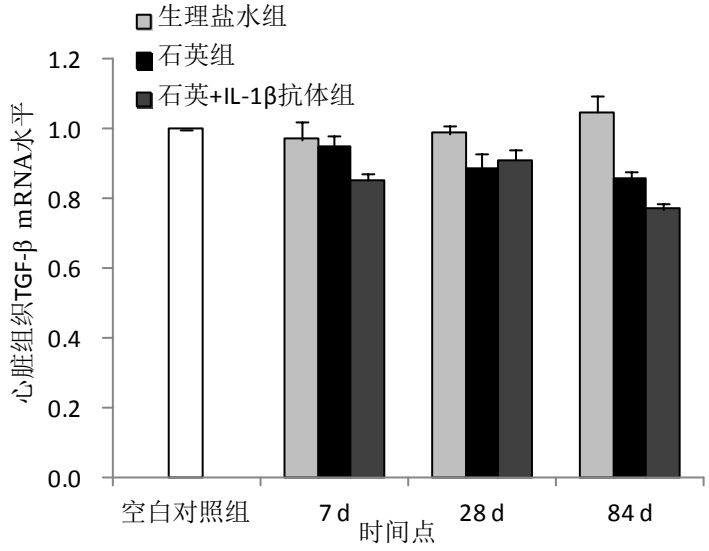
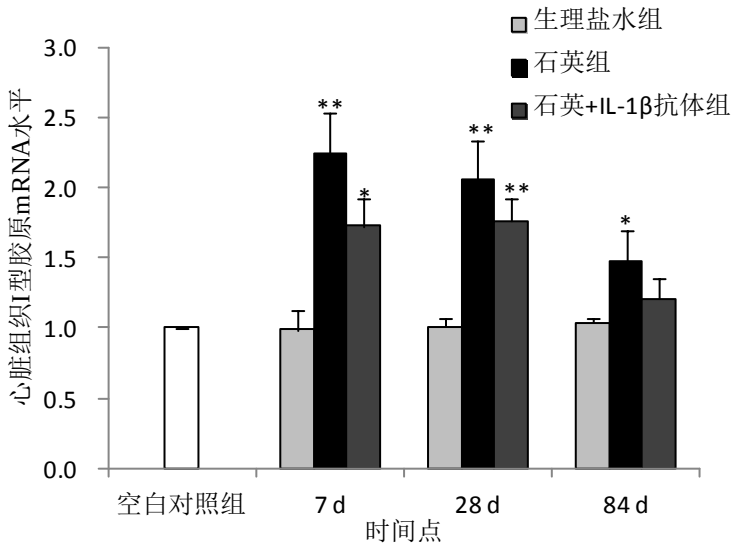


图 3.5 各组小鼠心脏组织中 TGF-β mRNA 水平

如图 3.5 所示，与生理盐水组相比，石英组心脏组织中 TGF-β mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均无显著变化；与生理盐水组相比，石英+IL-1β 抗体组心脏组织中 TGF-β mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均无显著变化；另外，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组心脏组织中 TGF-β mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均无显著差异。

2.2 I 型胶原 mRNA 水平



注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

图 3.6 各组小鼠心脏组织中 I 型胶原 mRNA 水平

如图 3.6 所示，与生理盐水组相比，石英组心脏组织中 I 型胶原 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）；与生理盐水组相比，石英+IL-1β 抗体组心脏组织中 I 型胶原 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均有所升高，并且在第 7、28 d 升高有统计学意义（$P<0.05$）；但是，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组心脏组织中型胶原 I mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 虽有降低，但差异无统计学意义。

2.3 III 型胶原 mRNA 水平

如图 3.7 所示，与生理盐水组相比，石英组心脏组织中 III 型胶原 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均无显著变化；与生理盐水组相比，石英+IL-1β 抗体组心脏组织中 III 型胶原 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均无显著变化；另外，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组心脏组织中 III 型胶原 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d

均无显著变化。

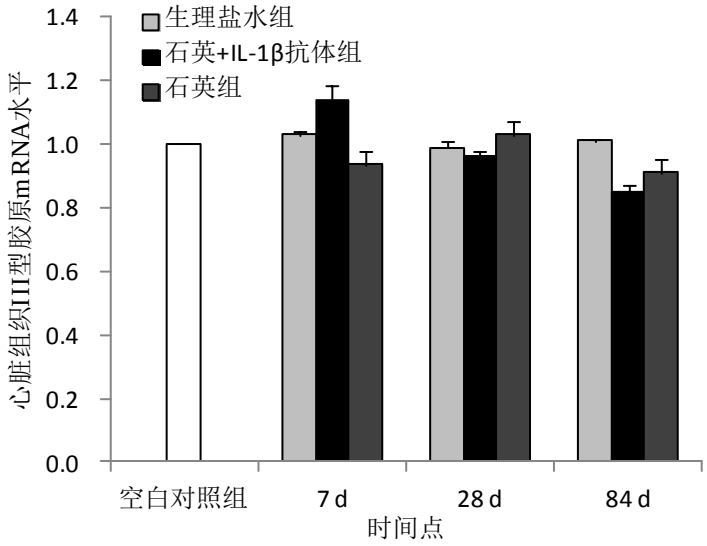


图 3.7 各组小鼠心脏组织中 III 型胶原 mRNA 水平

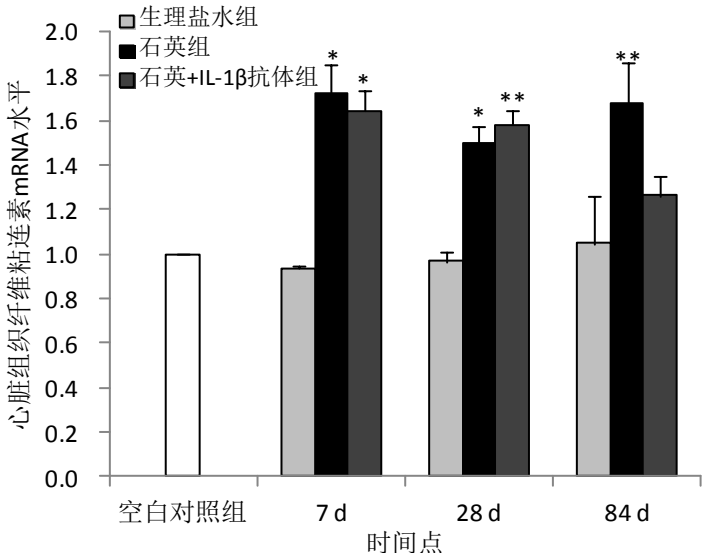
2.4 纤维粘连素 mRNA 水平

如图 3.8 所示，与生理盐水组相比，石英组心脏组织中纤维粘连素 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（P<0.05）；与生理盐水组相比，石英+IL-1β 抗体组心脏组织中纤维粘连素 mRNA 水平在染尘后第 7、28 d 均显著升高，差异有统计学意义（P<0.05）；另外，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组心脏组织中纤维粘连素 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均无显著变化。

3. 各组小鼠心脏组织 Th1/Th2 平衡相关指标 mRNA 水平

3.1 IFN-γ mRNA 水平

如图 3.9 所示，与生理盐水组相比，石英组心脏组织中 IFN-γ mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均无显著变化；与生理盐水组相比，石英+IL-1β 抗体组心脏组织中 IFN-γ mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 无显著变化；另外，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组心脏组织中 IFN-γ mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均无显著变化。



注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

图 3.8 各组小鼠心脏组织中纤维粘连素 mRNA 水平

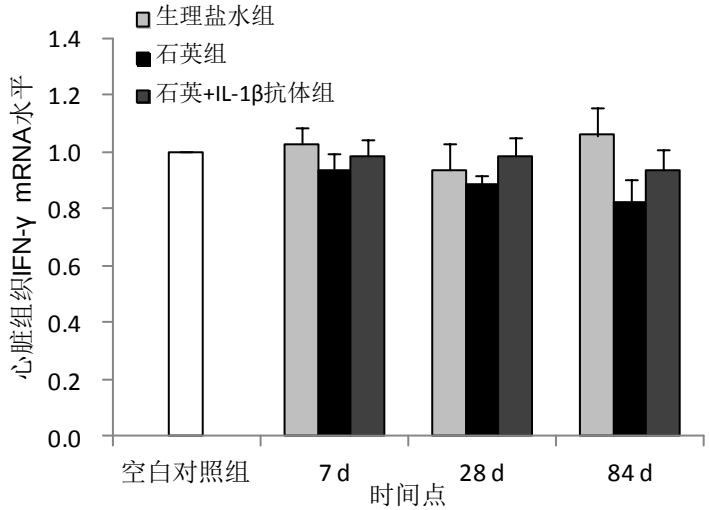


图 3.9 各组小鼠心脏组织中 IFN-γ mRNA 水平

3.2 IL-13 mRNA 水平

如图 3.10 所示，与生理盐水组相比，石英组心脏组织中 IL-13 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均无显著变化；与生理盐水组相比，石英+IL-1β 抗体组心脏组织中 IL-13 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 无显著变化；另外，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组心脏组织中 IL-13 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均无显著变化。

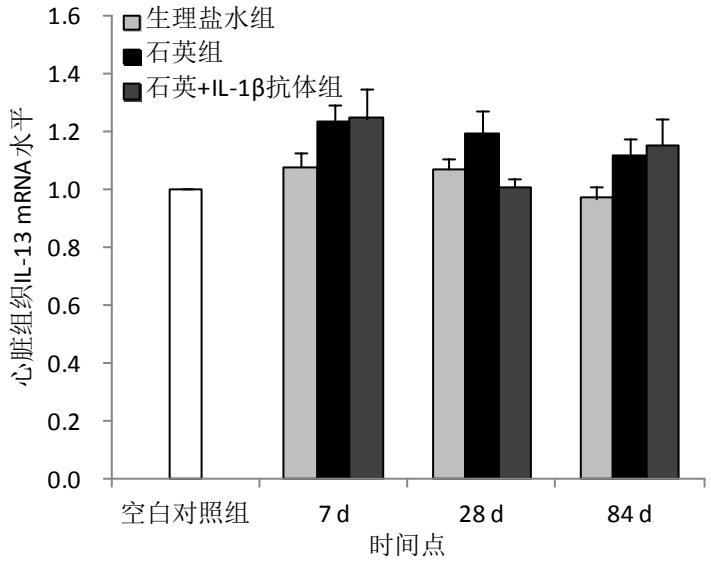


图 3.10 各组小鼠心脏组织中 IL-13 mRNA 水平

讨 论

本节研究中，我们通过构建小鼠石英肺暴露模型，观察了石英肺暴露对心脏的作用。结果显示，石英肺暴露可以导致心脏组织产生一定程度的炎性反应和纤维化反应，主要表现在石英肺暴露可以导致心脏组织炎性指标如 IL-1β、IL-6、TNF-α 和 MCP-1 mRNA 水平显著升高，也可以导致心脏组织纤维化指标如 I 型胶原、纤维粘连素 mRNA 水平显著升高。我们又通过利用 IL-1β 抗体中和小鼠肺组织中的 IL-1β，探讨了 IL-1β 在石英肺暴露导致的心脏炎性和纤维化反应中的作用。如第一部分研究结果所示，石英+IL-1β 抗体组血清中 IL-1β 水平虽然高于空白对照组或生理盐水组，但在染尘后第 1、7、28、84 d 均显著低于石英组，差异有统计学意义（P<0.01），这说明血清中 IL-1β 被有效中和。我们本节的结果表明 IL-1β 在心脏组织炎性反应中发挥了一定作用，主要表现在中和 IL-1β 可以降低心脏组织 IL-6 和 TNF-α mRNA 水平。另外，我们的研究结果提示，IL-1β 可能在石英肺暴露导致的心脏纤维化反应中不发挥作用。

经肺吸入的石英粉尘对肺外脏器损伤的作用机制仍然不清楚。目前，关于该机制有两种假说：①入肺的石英粉尘可以刺激肺组织发生一系列损伤与炎性反应，产生相应的炎性介质，这些炎性介质可以被释放到血液循环系统，进而对其他脏器发挥一定

作用，该假说目前被认为是入肺粉尘影响肺外脏器的主要作用机制；②在肺泡-气血屏障之间存在一定的微孔，入肺的石英粉尘颗粒本身或者颗粒物的某些成分可以通过这些微孔直接进入血液循环系统，进而影响其他脏器。体外实验表明，石英粉尘可以导致人脐静脉内皮细胞发生氧化损伤并产生炎性因子[29-30]。值得注意的是，在机体内，入肺的石英粉尘不论经哪种途径影响肺外脏器，均要通过血液循环系统，因此，机体内血供丰富的心脏组织成为我们本节研究的目标组织。

如第二部分研究所示，IL-1β 在矽肺发病过程中发挥了重要的作用。也有研究显示，IL-1β 在心脏损害过程中同样起到很重要的作用[103]。从本节研究结果可以看出，肺暴露的石英粉尘能够导致石英组和石英+IL-1β 抗体组小鼠心脏组织 IL-1β mRNA 水平显著升高。这个升高趋势与第一部分研究所示的血清中 IL-1β 变化趋势大体一致，但又不尽相同，主要表现在，石英+IL-1β 抗体组小鼠血清中 IL-1β 水平在染尘后第 7、28、84 d 均显著低于石英组水平，但石英+IL-1β 抗体组小鼠肺组织中 IL-1β mRNA 水平仅在染尘后第 28 d 这个时间点上显著低于石英组水平。这种现象可以说明，血清中 IL-1β 有可能部分来自心脏的直接表达，此外，也有一部分可能来自于肺组织的 IL-1β 释放入血。

细胞因子假说认为，慢性心脏疾病发病主要是由细胞因子介导的血液动力学异常改变或者细胞因子对心脏组织的直接毒性作用导致的[103]。多项流行病学研究与实验室研究已经证明，慢性心脏疾病与炎性介质如 IL-1β、IL-6、TNF-α 和 MCP-1 有很密切的关系[104-109]，具体如下：① IL-1β，被认为与特发性扩张型心肌病、心肌凋亡、心肌肥大、心律失常等有密切关系。研究表明，IL-1β 对心肌收缩力的抑制作用与 IL-1β 含量呈现剂量-效应关系[109-110]；② IL-6，被认为与心肌肥大、心肌失能、心肌萎缩等有密切关系。另一方面，IL-6 具有抑制心肌凋亡的作用，但这种对心肌的保护作用只有在短期的低剂量表达下才存在，长期的高剂量表达会导致损伤作用[111-113]；③ TNF-α， 被认为与左心室功能紊乱、左心室重建、心肌凋亡、内皮功能紊乱有密切关系，还有观点认为,慢性心脏疾病患者体内的 IL-6 是由 TNF-α 直接刺激产生的[107, 112, 114]；④ MCP-1，Collier 等人在伴有心衰症状的高血压患者体内检测到大量升高的

MCP-1[115]。MCP-1 可以介导单核细胞向心脏迁移，加速心肌损伤[116]。我们的研究结果显示，石英粉尘肺暴露可以同时导致小鼠心肌组织中 IL-1β、IL-6、TNF-α、MCP-1 mRNA 水平显著升高，这说明经肺吸入的石英粉尘具有导致心脏疾病或心脏衰竭的潜能。

上述炎性指标可能通过多种机制调节心肌功能，包括直接刺激心肌增长、刺激成纤维细胞分化为成熟的肌成纤维细胞、通过细胞内钙离子转运通路直接损伤心肌收缩能力、直接诱导心肌重建或凋亡相关的基因表达；间接导致内皮细胞异常活化等[112]。在心脏疾病发生过程中，这些炎性反应具有一定的有利作用，如促进损伤修复，斑块形成以及代偿性肥大；但是，如果上述炎性因子长期持续高度表达，则会导致不利机体的炎性反应。有动物实验数据表明，动物体内炎性因子基因表达水平与心脏梗死面积成正比[113, 117]。职业工人粉尘暴露往往是一个长期的过程，并且进入肺组织内的石英粉尘很难再被排出体外，因此，工人即使脱离粉尘暴露环境，体内仍然存在粉尘的刺激作用。流行病学研究显示，心血管系统疾病为矽肺患者死因第一位。这说明石英粉尘肺暴露导致的心脏炎性反应对工人心血管系统的影响不再停留于保护效应，而是已经导致严重的健康危害。

除炎性反应外，本研究中我们也观察了各组小鼠心脏组织纤维化相关指标的 mRNA 水平。结果显示，虽然石英组和石英+IL-1β 抗体组小鼠心脏组织中的 TGF-β 和 III 型胶原 mRNA 水平较生理盐水组并无显著变化，但 I 型胶原和纤维粘连素 mRNA 水平较生理盐水组均有显著升高，差异有统计学意义（P<0.05）。在心脏细胞外基质成分中，I 型胶原占 85%以上，是心脏纤维化最主要的胶原类型[118-121]。因此我们认为，石英粉尘肺暴露可以导致心脏组织产生一定程度的纤维化应答。

我们第二部分研究结果表明，石英粉尘导致肺纤维化产生过程中，肺组织 Th1/Th2 平衡出现了向 Th2 型免疫应答转移的现象。为了探讨石英粉尘是否在心脏纤维化发生过程中同样影响 Th1/Th2 平衡，我们测定了心脏组织中 Th1 代表性细胞因子 IFN-γ[97, 122] 和 Th2 代表性细胞因子 IL-13[123-124] mRNA 水平。结果显示，IFN-γ 在各组小鼠心脏组织中表达没有显著差异；IL-13 mRNA 水平虽然在石英组有所升高，但升高不具有统

计学意义。这说明，Th1/Th2 平衡在心脏纤维化发生过程中的作用不明显。

本节研究中，我们观察了 IL-1β 在入石英粉尘肺暴露导致心脏炎性反应过程中的作用，结果显示除 IL-1β 之外，石英+IL-1β 抗体组小鼠心肌组织中 IL-6、TNF-α、MCP-1 mRNA 水平较石英组显著降低，说明 IL-1β 在石英肺暴露导致的心脏炎性反应中发挥了重要作用。这也提示我们，IL-1β 可能具有成为临床干预矽肺患者心血管疾病靶点的潜能。另外纤维化相关指标的结果显示，IL-1β 在心脏纤维化反应过程中的作用并不明显，但我们认为并不能据此否认 IL-1β 在导致心脏疾病发生过程中的作用。关于此观点，我们主要有以下 2 方面的考虑：①我们第二部分研究表明，IL-1β 有可能通过调节 TGF-β 和 Th1/Th2 平衡而调节肺组织纤维化反应。本节研究中，石英暴露的小鼠心脏组织 I 型胶原和纤维粘连素 mRNA 水平虽然显著升高，但 TGF-β mRNA 水平和 Th1/Th2 平衡并未发生明显改变。这就提示我们，入肺的石英粉尘可能通过非 TGF-β 依赖和非 Th1/Th2 相关的通路刺激小鼠心脏组织中 I 型胶原和纤维粘连素 mRNA 水平的升高。因此，IL-1β 可能对石英粉尘肺暴露导致的心脏纤维化改变没有显著的作用。②基于现有的研究结果，在心血管系统疾病发病过程中，炎性反应发挥的作用优于纤维化反应。有观点认为，炎性因子的出现即可直接或间接损伤心血管系统。本研究中心脏组织炎性反应已经十分明显，IL-1β 抗体对这些炎性因子的抑制作用也十分明显。但 IL-1β 在矽肺患者心血管疾病中的作用仍需得到进一步验证。

第二节 石英暴露所导致的肾脏炎性及纤维化反应和 IL-1β 在该反应中的作用

本节研究的主要目的是观察石英粉尘肺暴露以后，小鼠肾脏组织炎性以及纤维化反应，并且观察 IL-1β 在该反应中的作用。我们在小鼠灌肺处理后第 7、28、84 d，对小鼠肾脏组织中 IL-1β、IL-6、TNF-α、TGF-β、I 型胶原、III 型胶原、纤维粘连素、IFN-γ 和 IL-4 mRNA 水平进行了实时荧光定量 PCR 检测。

材料和方法

1. 粉尘样本

中国标准石英粉尘。

2. 主要仪器

2.1-2.3 同于第三部分第一节；

2.4 LKBV 超薄切片机：瑞典 LKB 公司；

2.5 光学显微镜：日本 OLYMPUS 公司；

2.6 生物组织包埋仪：浙江金华科迪仪器设备有限公司。

3. 主要试剂

3.1-3.6 同于第三部分第一节；

3.7 Masson 染液：南京建成生物工程研究所。

4. 主要试剂的配制

同于第三部分第一节。

5. 实验动物分组

同于第一部分。

6. 粉尘暴露

同于第一部分。

7. 肾脏组织收集

小鼠取完心肺组织后，打开腹腔，取出肾脏，称重。将左肾切成小块，置于 RNA 储存液中，于-20 ℃保存；将右肾置于 4%多聚甲醛溶液中固定，待做病理。

8. 小鼠肾脏组织总 RNA 的提取

同于第二部分第三节肺组织总 RNA 提取方法。

9. 逆转录

同于第二部分第三节。

10. 逆转录产物的实时定量 PCR

10.1 引物序列设计除 IL-4 外，其余指标引物序列同于第三部分第二节。小鼠 IL-4 引物序列如下：Forward 5’- GAATGTACCAGGAGCCATATC -3’, Reverse 5’-CTCAGTACTACGAGTAATCCA -3’。

10.2 实时定量 PCR 反应体系

同于第二部分第三节。

11. 肾组织切片制作

同于第二部分第二节肺组织切片的制作方法。

12. 组织切片 Masson 染色

选用 Masson 染色试剂盒，严格按照其说明书，对肾组织切片进行 Masson 染色。

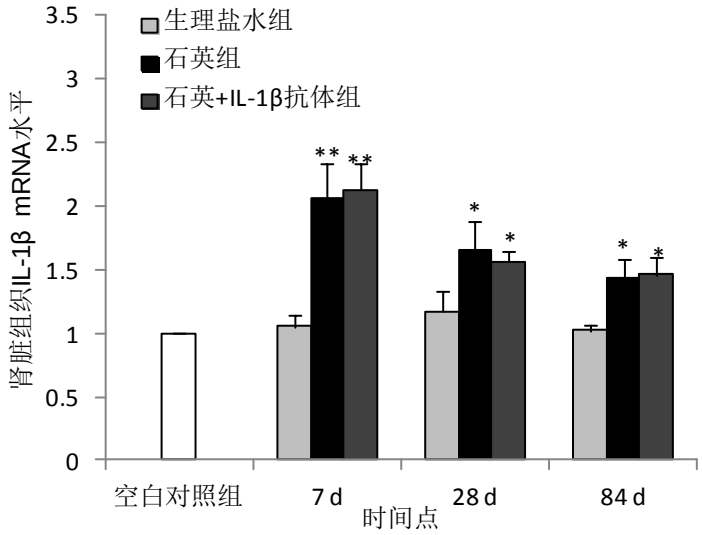
13. 统计学分析方法

结果均以 $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ 表示。组间差异的比较采用方差分析以及 Dunnett-t 检验，以 $P<0.05$ 为统计学差异的最低标准，数据的统计学分析采用 SAS9.1 软件。

结 果

1. 各组小鼠肾脏组织炎性相关指标 mRNA 水平

1.1 IL-1β mRNA 水平



注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

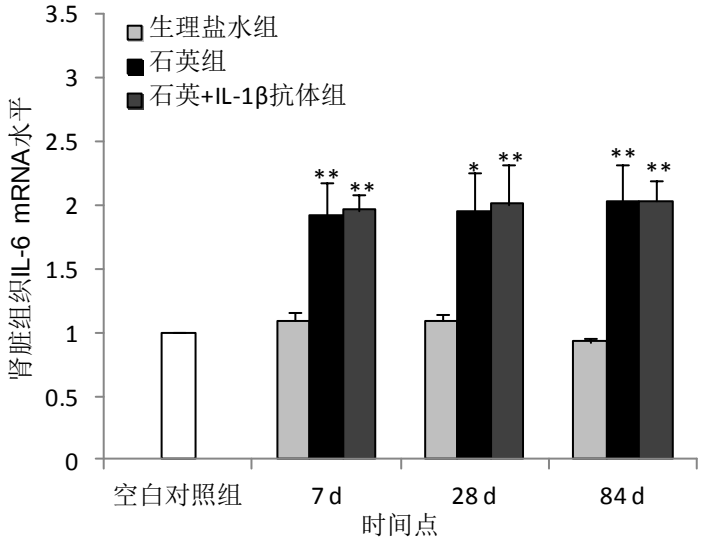
图 3.11 各组小鼠肾脏组织 IL-1β mRNA 水平

如图 3.11 所示，与生理盐水组相比，石英组肾脏组织中 IL-1β mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）；与生理盐水组相比，石

英+IL-1β 抗体组肾脏组织中 IL-1β mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（P<0.05）；另外，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组肾脏组织中 IL-1β mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均无显著变化。

1.2 IL-6 mRNA 水平

如图 3.12 所示，与生理盐水组相比，石英组肾脏组织中 IL-6 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（P<0.05）；与生理盐水组相比，石英+IL-1β 抗体组肾脏组织中 IL-6 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（P<0.01）；另外，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组肾脏组织中 IL-6 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均无显著变化。



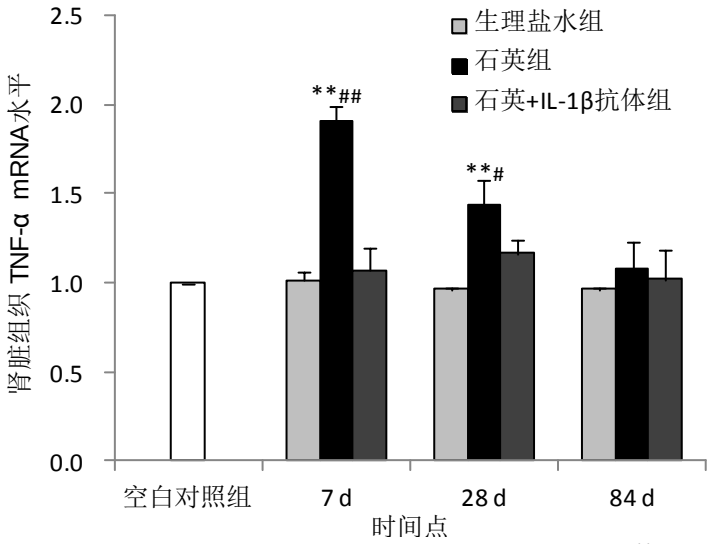
注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{*}P$<0.05，$^{**}P$<0.01。

图 3.12 各组小鼠肾脏组织 IL-6 mRNA 水平

1.3 TNF-α mRNA 水平

如图 3.13 所示，与生理盐水组相比，石英组肾脏组织中 TNF-α mRNA 水平在染尘后第 7、28 d 均显著升高，差异有统计学意义（P<0.01）；与生理盐水组相比，石英+IL-1β 抗体组肾脏组织中 TNF-α mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均无显著变化；另外，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组肾脏组织中 TNF-α mRNA 水平在染尘后第 7、

28 d 均显著降低，差异有统计学意义（P<0.05）。



注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{**}P$<0.01；与石英组比较，$^{\#}P$<0.05，$^{\#\#}P$<0.01。

图 3.13 各组小鼠肾脏组织 TNF-α mRNA 水平

2. 各组小鼠肾脏组织病理学改变

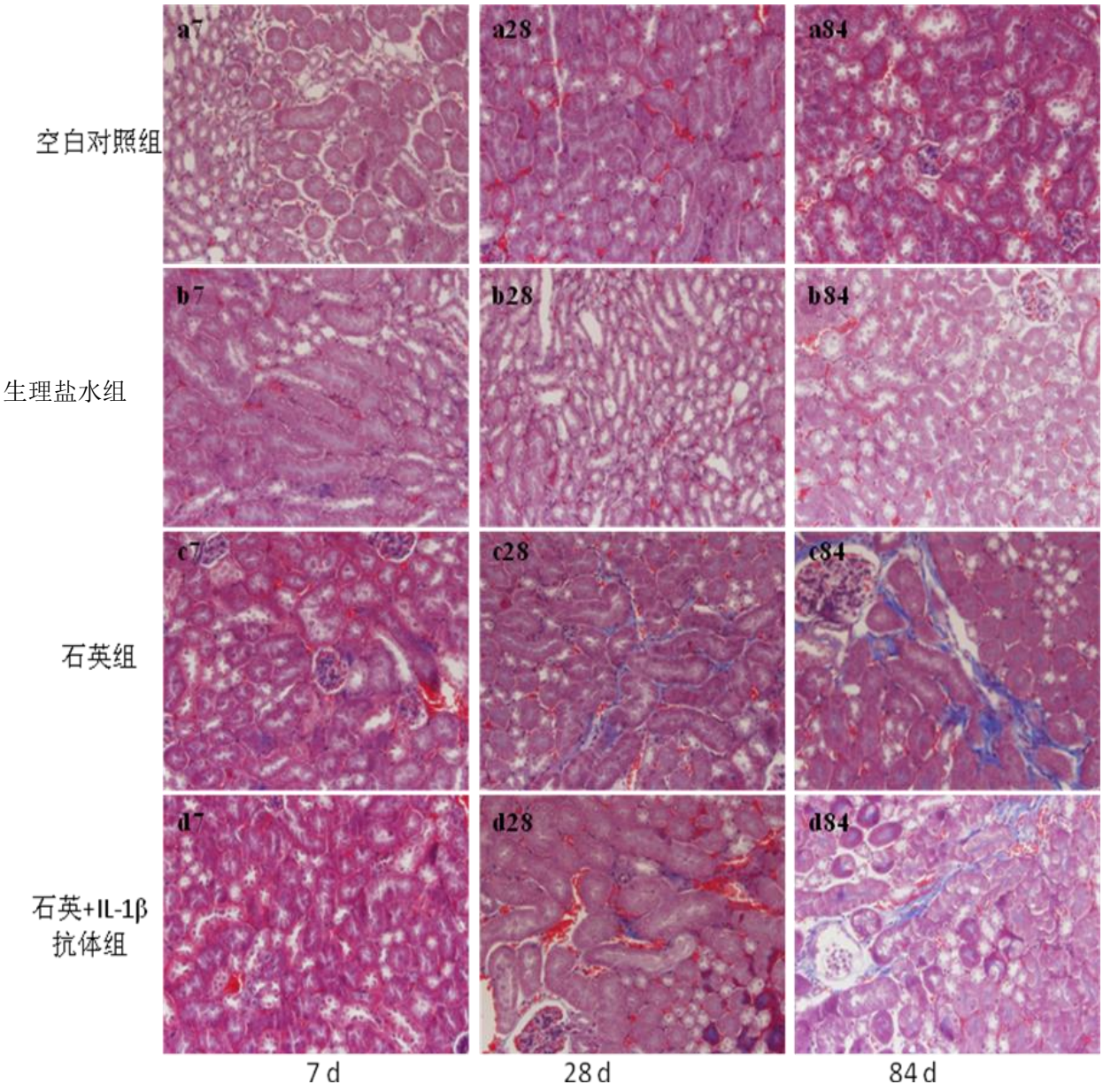
如图 3.14 所示，各组小鼠在染尘后第 7 d 均未表现出肾脏纤维化改变，除此之外，空白对照组和生理盐水组在灌肺后第 7、28、84 d 均未表现出肾脏纤维化改变。染尘后第 28 d，石英组小鼠肾脏组织偶见肾小管间质胶原沉积，但这种情况在石英+IL-1β 抗体组没有出现。染尘后第 84 d，石英组小鼠肺组织可见明显的肾小管间质胶原沉积；在石英+IL-1β 抗体组，胶原沉积现象明显较石英组轻。只有石英组小鼠在染尘后第 84 d 出现肾小球部位的胶原沉积现象。

3. 各组小鼠肾脏组织纤维化相关指标 mRNA 水平

3.1 TGF-β mRNA 水平

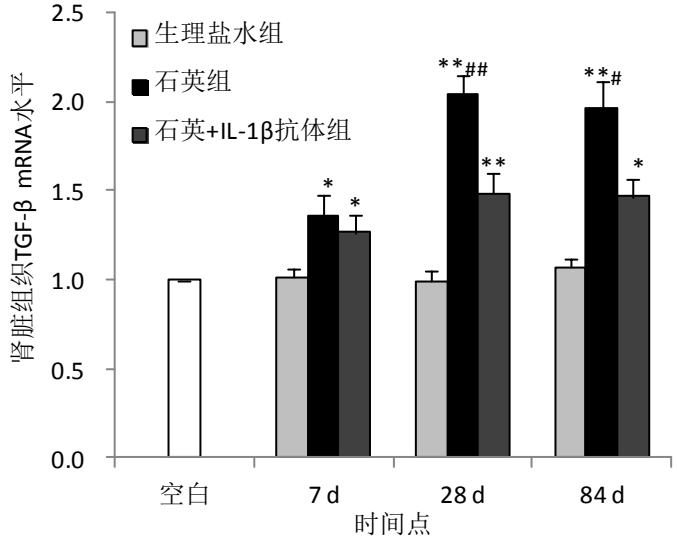
如图 3.15 所示，与生理盐水组相比，石英组肾脏组织中 TGF-β mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（P<0.05）；同样，与生理盐水组相比，石英+IL-1β 抗体组肾脏组织中 TGF-β mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（P<0.05）；另外，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组肾

脏组织中 TGF-β mRNA 水平在染尘后第 28、84 d 均显著降低，差异有统计学意义（P<0.05）。



注：a7、b7、c7、d7 为灌肺后第 7 d；a28、b28、c28、d28 为灌肺后第 28 d；a84、b84、c84、d84 为灌肺后第 84 d。

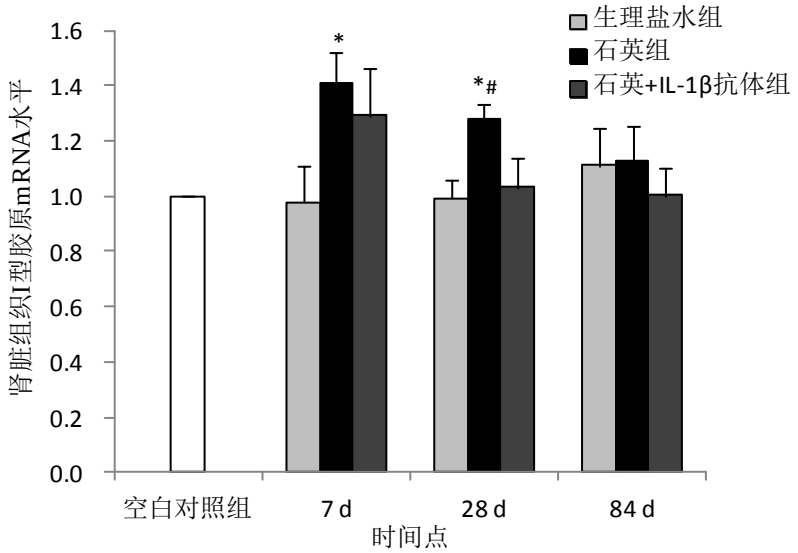
图 3.14 各组小鼠肾脏组织胶原沉积情况（Masson 染色，200×）



注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；
与石英组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

图 3.15 各组小鼠肾脏组织 TGF-β mRNA 水平

3.2 I 型胶原 mRNA 水平

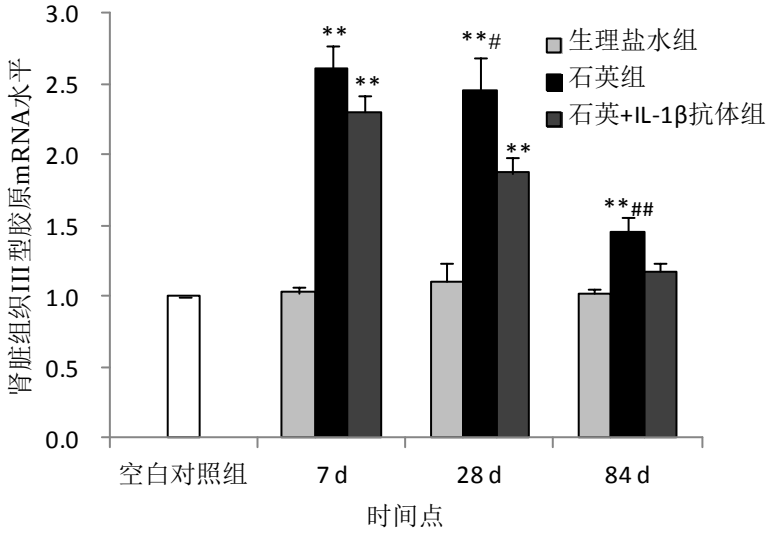


注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{*}P<0.05$；
与石英组比较，$^{\#}P<0.05$。

图 3.16 各组小鼠肾脏组织 I 型胶原 mRNA 水平

如图 3.16 所示，与生理盐水组相比，石英组肾脏组织中 I 型胶原 mRNA 水平在染尘后第 7、28 d 均显著升高，差异有统计学意义（P<0.05）；与生理盐水组相比，石英+IL-1β 抗体组肾脏组织中 I 型胶原 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均无显著变化；与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组心脏组织中 I 型胶原 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 虽有降低，但仅在第 28 d 差异有统计学意义（P<0.05）。

3.3 III 型胶原 mRNA 水平



注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{**}P$<0.01；
与石英组比较，$^{\#}P$<0.05，$^{\#\#}P$<0.01。

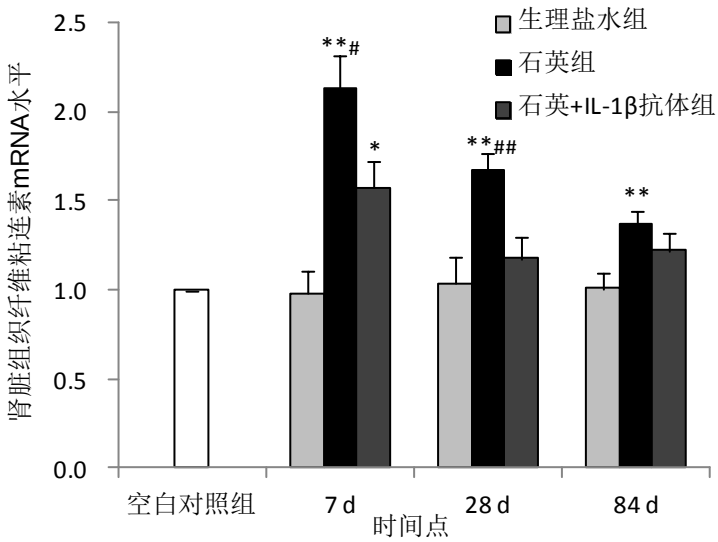
图 3.17 各组小鼠肾脏组织 III 型胶原 mRNA 水平

如图 3.17 所示，与生理盐水组相比，石英组肾脏组织中 III 型胶原 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（P<0.01）；与生理盐水组相比，石英+IL-1β 抗体组心脏组织中 III 型胶原 mRNA 水平在染尘后第 7、28 d 均显著升高，差异有统计学意义（P<0.01）；另外，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组心脏组织中 III 型胶原 mRNA 水平在染尘后第 28、84 d 均显著降低，差异有统计学意义（P<0.05）。

3.4 纤维粘连素 mRNA 水平

如图 3.18 所示，与生理盐水组相比，石英组肾脏组织中纤维粘连素 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（P<0.01）；与生理盐水组相

比，石英+IL-1β 抗体组肾脏组织中纤维粘连素 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均有升高，但只有第 7 d 升高有统计学意义（P<0.05）；另外，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组肾脏组织中纤维粘连素 mRNA 水平在染尘后第 7、28 d 均显著降低，差异有统计学意义（P<0.05）。



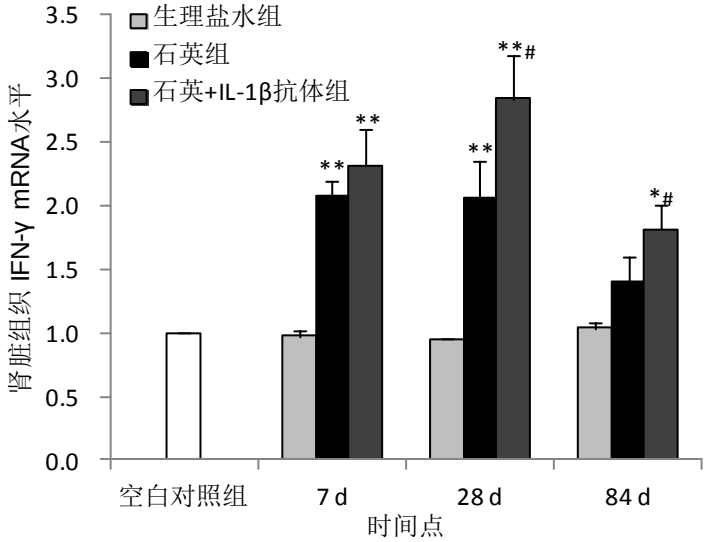
注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{**}P$<0.01；与石英组比较，$^{\#}P$<0.05，$^{\#\#}P$<0.01。

图 3.18 各组小鼠肾脏组织纤维粘连素 mRNA 水平

4. 各组小鼠肾脏组织 Th1/Th2 平衡相关指标 mRNA 水平

4.1 IFN-γ mRNA 水平

如图 3.19 所示，与生理盐水组相比，石英组肾脏组织中 IFN-γ mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均有升高，且在 28、84 d 差异有统计学意义（P<0.01）；与生理盐水组相比，石英+IL-1β 抗体组肾脏组织中 IFN-γ mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均显著升高，差异有统计学意义（P<0.05）；另外，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组肾脏组织中 IFN-γ mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均有升高，且在 28、84 d 差异有统计学意义（P<0.05）。

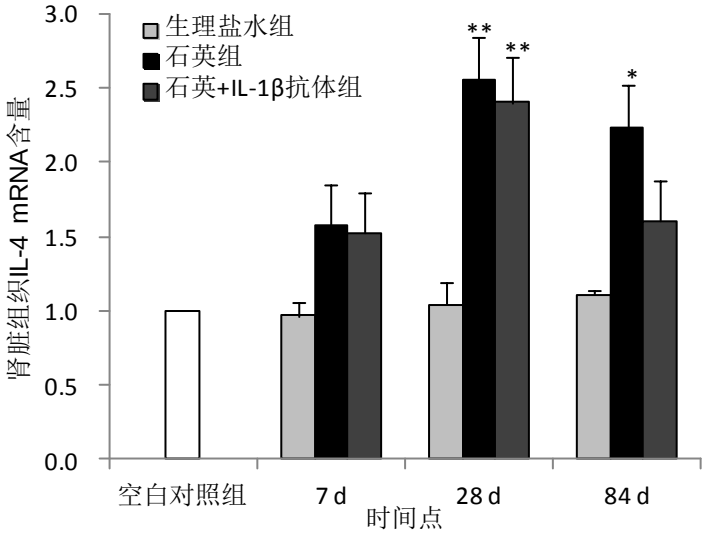


注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{**}P<0.01$；

与石英组比较，$^{\#}P<0.05$。

图 3.19 各组小鼠肾脏组织 IFN-γ mRNA 水平

4.2 IL-4 mRNA 水平



注：经方差分析及 Dunnett-t 检验，与空白对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

图 3.20 各组小鼠肾脏组织 IL-4 mRNA 水平

如图 3.20 所示，与生理盐水组相比，石英组肾脏组织中 IL-4 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均有升高，且在第 28、84 d 差异有统计学意义（P<0.05）；与生理盐水组相比，石英+IL-1β 抗体组肾脏组织中 IL-4 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均有升高，但只有在第 28 d 差异有统计学意义（P<0.01）；另外，与石英组相比，石英+IL-1β 抗体组肾脏组织中 IL-13 mRNA 水平在染尘后第 7、28、84 d 均有降低的趋势，但差异无统计学意义。

讨 论

本节研究中，我们通过构建小鼠石英肺暴露模型，观察了该模型肾脏组织中的炎性反应和纤维化反应。结果显示：① 石英肺暴露可以导致肾脏组织产生一定程度的炎性反应，主要表现在石英肺暴露可以导致肾脏组织炎性指标如 IL-1β、IL-6、TNF-α mRNA 水平显著升高；② 石英肺暴露可以导致肾脏组织产生纤维化反应，主要表现在肾脏组织病理切片显示胶原沉积现象，纤维化指标如 TGF-β、I 型胶原、III 型胶原、纤维粘连素 mRNA 水平显著升高；③ 石英肺暴露可以导致肾脏组织 Th1 和 Th2 型免疫应答均显著升高。为探讨 IL-1β 在石英肺暴露导致的肾脏炎性和纤维化反应过程中的作用。我们利用 IL-1β 抗体中和小鼠肺组织中的 IL-1β，如第一部分研究结果所示，石英+IL-1β 抗体组小鼠血清中 IL-1β 被有效中和。研究结果显示， IL-1β 在肾脏组织炎性和纤维化反应中发挥了一定作用，主要表现在中和 IL-1β 可以显著降低肾脏 TNF-α、TGF-β、III 型胶原、纤维粘连素 mRNA 水平。另外，我们的研究结果提示，IL-1β 可能对肾脏纤维化发生过程中 Th1/Th2 平衡具有一定的调控作用。

目前，石英粉尘的肾毒性越来越引起人们的关注。以往的临床散在病例报告和近期大规模的流行病学研究表明石英暴露可以引发职业工人多种肾脏相关疾病，小到尿常规的轻微变化，大到尿蛋白及慢性肾脏疾病的出现[125-128]。细胞实验研究表明，石英粉尘可以通过调节钙浓度损伤肾脏细胞；人群相关研究表明，职业工人石英暴露与慢性肾脏疾病呈现正相关趋势[7, 9, 129]。如前一节研究所述，石英粉尘肺暴露后可能会导致炎性因子释放入血，也可能会导致粉尘相关成分释放入血。肾脏作为机体重要的毒害物质清除器官，血液的异常改变会对肾脏产生一定的影响[34]。我们的研究表明，

石英粉尘肺暴露会引起小鼠肾脏组织中炎性因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α mRNA 水平显著升高。Gui 等人的研究中，通过喂食小鼠纳米级的二氧化钛颗粒，建立小鼠二氧化钛暴露模型[129]。在该模型中，小鼠肾脏组织的 IL-1β、IL-6 和 TNF-α mRNA 水平与二氧化钛暴露量呈现明显的剂量-效应关系。与此相反，Boor 等人的研究显示，工业长纤维石棉肺暴露后，不能引起肾脏组织 IL-6 和 TNF-α mRNA 水平的改变[130]。综合上述 3 项研究结果，我们认为石英粉尘肺暴露可以导致肾脏发生炎性反应；粉尘颗粒的大小和形状可能会影响粉尘颗粒的肾毒性。

从我们的研究结果可以看出，除上述炎性反应外，石英粉尘的肺暴露可以导致肾脏组织纤维化指标 TGF-β、I 型胶原、III 型胶原和纤维粘连素 mRNA 水平显著升高。细胞实验研究表明，TGF-β 在肾纤维化过程中发挥了重要的作用。TGF-β 也被证明是唯一能够刺激肾小球系膜细胞，间质成纤维细胞和肾小管上皮细胞转化为可分泌细胞外基质的纤维化细胞的因子[131-132]。I 型胶原、III 型胶原和纤维粘连素均为细胞外基质的重要成分[133]。研究显示，工业长纤维石棉肺暴露可以引起肾脏组织 I 型胶原 mRNA 水平升高，但是并不引起 TGF-β 或纤维粘连素 mRNA 水平升高。在 Liu 等人通过结扎单侧输尿管建立的肾纤维化小鼠模型中，可以观察到肾组织 TGF-β、I 型胶原和纤维粘连素 mRNA 水平的显著升高，与我们的研究结果相似[131]。这说明，石英粉尘肺暴露导致的肾脏纤维化指标的改变与已经形成纤维化的肾组织中相关指标的改变一致，提示我们，入肺的石英粉尘具有较强的导致肾脏纤维化的作用。

本节研究结果显示，中和 IL-1β 对肾脏组织中 IL-6 mRNA 水平没有明显作用。以往观点认为，IL-6 是预测晚期肾脏疾病患者死亡率的最可靠的指标[134]。但流行病学调查发现，约有 43.2%的晚期肾脏疾病患者死于心血管系统疾病[135]。实验研究表明，IL-6 是心脏冠状动脉粥样硬化发生的始动因素，血清 IL-6 水平是预测心血管系统疾病十分有效的因子[136-137]。所以我们认为，相对于肾脏，IL-6 对心血管系统疾病更有意义。前一节研究结果显示，中和 IL-1β 可以有效抑制心脏组织中 IL-6 mRNA 水平。因此，我们不可否认 IL-1β 在石英导致心肾组织炎性反应过程中的作用。另外，循证医学研究发现，对晚期肾脏疾病患者阻断 IL-1β 可以使血清中 IL-6 的平均水平降低 40%，

该结果肯定了 IL-1β 在肾脏疾病中的作用[138]。

此外，本节研究发现，中和 IL-1β 可以减轻小鼠肾脏组织胶原沉积现象，并且显著降低纤维化指标 TGF-β、I 型胶原、III 型胶原和纤维粘连素 mRNA 的水平。说明 IL-1β 在石英肺暴露导致的肾脏纤维化反应过程中发挥了重要的作用。Liu 等人认为，Th2 型免疫应答在肾脏纤维化发生过程中起主导作用[131]。本节研究中，我们同样关注了 IL-1β 在肾脏 Th1/Th2 平衡变化过程中的作用。结果显示，IL-1β 抗体虽然对肾脏 Th2 型免疫应答无明显调节作用，但可以显著提高 Th1 型免疫应答。另有研究认为，肾脏 Th1 型免疫应答可以抵抗 Th2 性免疫应答，并且抑制纤维化细胞分化从而抑制纤维化生成[139]。该观点提示我们，在石英肺暴露导致的肾脏纤维化反应过程中，IL-1β 很有可能通过下调 Th1 型免疫应答而促进肾脏纤维化的形成。结合第二部分研究结果，可见 IL-1β 对肾脏组织纤维化反应过程中 Th1/Th2 平衡的调节作用，与对肺组织纤维化形成过程中 Th1/Th2 平衡的调节作用相类似。

综合本部分第一、二节研究结果，我们发现，石英粉尘肺暴露对心肾组织均有一定程度的有害作用。除了石英粉尘及石英暴露所导致的炎性介质等对心脏和肾脏分别作用外，心脏和肾脏在生理上本身具有一定的相关性。临床上使用“心肾综合征（Cardiorenal syndromen）”这一概念反应心-肾双向作用的本质[34]。心肾综合征是指心脏或肾脏一个器官的急性或慢性功能损害，可以引起另一个器官的急性或慢性功能损害。Paolo.C 等人认为心脏、肾脏或脉管系统的慢性炎性反应均与心肾综合征密切相关[140]。所以我们可以这样理解石英粉尘肺暴露导致的心肾损害，在石英暴露的机体内，石英粉尘首先会引起肺组织内大量炎性介质释放，这些炎性介质和石英粉尘本身或其某些成分的释放入血，一方面可以分别作用于心脏和肾脏，导致心肾炎性反应或其他反应出现；另一方面，心脏或肾脏产生的炎性介质等释放入血后，反过来会加剧彼此的炎性反应等损害作用。在这样一个过程中，心脏损害或肾脏损害是否也可以反过来加剧肺脏的损害，仍需要更进一步研究。

结 论

本研究利用标准石英粉尘悬液肺灌注的方法构建了小鼠矽肺模型，并利用肺灌注IL-1β抗体的方法构建了小鼠IL-1β中和模型。通过观察小鼠肺脏、心脏和肾脏炎性及纤维化相关指标的变化，探讨石英粉尘肺暴露对肺脏、心脏和肾脏的影响；并且通过拮抗IL-1β后，观察小鼠肺脏、心脏和肾脏的炎性及纤维化相关指标的改变，评价IL-1β在石英导致小鼠肺脏、心脏和肾脏相关改变中的作用。

本研究主要结论如下：

1.石英肺暴露后，小鼠肺脏组织发生了明显的炎性和纤维化反应；IL-1β可以通过上调其他炎性介质（TNF-α、MCP-1）水平并促进炎性细胞浸润而促进肺脏炎性反应；可以通过上调其他纤维化介质（TGF-β）水平并调节Th1/Th2平衡向Th2型为主的免疫应答偏移而促进肺纤维化发生。

2. 石英暴露后，小鼠心脏组织发生了明显的炎性反应和一定程度的纤维化反应；IL-1β可以通过上调其他炎性介质（TNF-α、IL-6、MCP-1）表达而促进心脏炎性反应；IL-1β对心脏纤维化反应的作用并不明显。

3. 石英暴露后，小鼠肾脏组织发生了一定程度的炎性反应和显著的纤维化反应；IL-1β可以通过上调其他炎性介质（TNF-α）表达从一定程度上促进肾脏炎性反应；可以通过上调其他纤维化介质（TGF-β）表达并调节Th1/Th2平衡向Th2型为主的免疫应答偏移而促进肾纤维化发生。

本研究的创新之处

1. 本研究采用石英粉尘肺灌注的方法成功构建了小鼠矽肺模型，采用 IL-1β 抗体中和的方法构建了小鼠 IL-1β 抑制模型，并在此基础上系统地探讨了 IL-1β 在小鼠矽肺发病过程中损伤、炎性反应和纤维化形成阶段的作用及机制，表明了 IL-1β 在矽肺发病过程中的作用和 IL-1β 抗体在缓解矽肺发病中的价值，为矽肺的临床预防和治疗提出新的观点。

2. 本研究利用动物实验从炎性反应和纤维化两方面观察研究小鼠标准石英粉尘肺灌注后对心脏和肾脏的影响，并且探讨了 IL-1β 在石英粉尘致心肾损伤中的作用及机制。本文提出石英粉尘肺灌注后可能会引起心脏和肾脏的炎性及纤维化改变，IL-1β 在该过程中发挥了积极作用，为阐明石英暴露导致工人心脏、肾脏相关疾病的发生机制提供了理论见解。

本研究的不足之处

本研究中尽管我们对小鼠心脏和肾脏进行了比较全面的炎性和纤维化相关指标 mRNA 水平的检测，但是由于取材的限制性，未能进行这些指标蛋白水平上的检测。因此，对于这些指标的蛋白水平或者心脏组织的相关病理改变还需要进一步观察。下一步研究计划：

1. 进一步设计动物实验，建立动物矽肺模型，验证动物尿液、血液、肾脏和脉管系统中炎性因子和纤维化因子的蛋白水平。

2. 探讨 IL-1β 及其相关的正负反馈调节的信号通路上分子的基因多态性对接尘工人矽肺、心血管疾病及肾脏疾病发病的影响。

3. 利用细胞实验和动物实验，研究探讨颗粒物导致的肾脏或者心脏损伤是否可以反过来加剧肺脏损伤。

参考文献

1. Wilson M. S., Wynn T. A. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. Mucosal Immunol, 2009, 2(2): 103-121.
2. Brown T. P., Rushton L. Mortality in the UK industrial silica sand industry: 2. A retrospective cohort study. Occup Environ Med, 2005, 62(7): 446-452.
3. Micovic V., Alebic-Juretic A., Matkovic N., et al. Dustfall measurements in Primorsko-Goranska County, 1975-2008. Arh Hig Rada Toksikol, 2010, 61(1): 37-43.
4. 王振全, 王式功, 高金霞, 等. 西北地区沙尘暴降尘部分特性的分析. 环境与健康杂志, 2008, 25(12): 1053-1055.
5. Leung C. C., Yu I. T., Chen W. Silicosis. Lancet, 2012, 379(9830): 2008-2018.
6. Morozova O. A. [Gender differences in death causes and survival rate of silicosis patients]. Med Tr Prom Ekol, 2012(9): 32-36.
7. Vupputuri S., Parks C. G., Nylander-French L. A., et al. Occupational silica exposure and chronic kidney disease. Ren Fail, 2012, 34(1): 40-46.
8. Liu X., Xue Y., Ding T., et al. Enhancement of proinflammatory and procoagulant responses to silica particles by monocyte-endothelial cell interactions. Part Fibre Toxicol, 2012, 9: 36.
9. Cha S. H., Kim H. S., Kim J. Y., et al. Silica increases cytosolic calcium and causes cell injury in renal cell lines. Ind Health, 1999, 37(3): 300-306.
10. Rimal B., Greenberg A. K., Rom W. N. Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding. Curr Opin Pulm Med, 2005, 11(2): 169-173.
11. Peng Y., Martin D. A., Kenkel J., et al. Innate and adaptive immune response to apoptotic cells. J Autoimmun, 2007, 29(4): 303-309.
12. Pernis B. Silica and the immune system. Acta Biomed, 2005, 76 Suppl 2: 38-44.

13. Huaux F. New developments in the understanding of immunology in silicosis. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2007, 7(2): 168-173.

14. Liu F., Liu J., Weng D., et al. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells depletion may attenuate the development of silica-induced lung fibrosis in mice. PLoS One, 2010, 5(11): e15404.

15. Kuroda E., Ishii K. J., Uematsu S., et al. Silica crystals and aluminum salts regulate the production of prostaglandin in macrophages via NALP3 inflammasome-independent mechanisms. Immunity, 2011, 34(4): 514-526.

16. Krause K., Metz M., Makris M., et al. The role of interleukin-1 in allergy-related disorders. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2012, 12(5): 477-484.

17. Cho W. S., Choi M., Han B. S., et al. Inflammatory mediators induced by intratracheal instillation of ultrafine amorphous silica particles. Toxicol Lett, 2007, 175(1-3): 24-33.

18. Mohr C., Gemsa D., Graebner C., et al. Systemic macrophage stimulation in rats with silicosis: enhanced release of tumor necrosis factor-alpha from alveolar and peritoneal macrophages. Am J Respir Cell Mol Biol, 1991, 5(4): 395-402.

19. 孔海霞, 陈娟娟, 刘伟, 等. 肺巨噬细胞在矽肺肺纤维化发生发展中的作用. 中华劳动卫生职业病杂志, 2012, 30(4): 318-320.

20. Jagirdar J., Begin R., Dufresne A., et al. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) in silicosis. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 154(4 Pt 1): 1076-1081.

21. Todd N. W., Scheraga R. G., Galvin J. R., et al. Lymphocyte aggregates persist and accumulate in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. J Inflamm Res, 2013, 6: 63-70.

22. Alkhouri N., Morris-Stiff G., Campbell C., et al. Neutrophil to lymphocyte ratio: a new marker for predicting steatohepatitis and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Liver Int, 2012, 32(2): 297-302.

23. Yamadori I., Fujita J., Kajitani H., et al. Lymphocyte subsets in lung tissues of

non-specific interstitial pneumonia and pulmonary fibrosis associated with collagen vascular disorders: correlation with CD4/CD8 ratio in bronchoalveolar lavage. Lung, 2000, 178(6): 361-370.

24. Zhai R., Ge X., Li H., et al. Differences in cellular and inflammatory cytokine profiles in the bronchoalveolar lavage fluid in bagassosis and silicosis. Am J Ind Med, 2004, 46(4): 338-344.
25. Srivastava K. D., Rom W. N., Jagirdar J., et al. Crucial role of interleukin-1beta and nitric oxide synthase in silica-induced inflammation and apoptosis in mice. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 165(4): 527-533.
26. Piguet P. F., Vesin C., Grau G. E., et al. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra) prevents or cures pulmonary fibrosis elicited in mice by bleomycin or silica. Cytokine, 1993, 5(1): 57-61.
27. Cassel S. L., Eisenbarth S. C., Iyer S. S., et al. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(26): 9035-9040.
28. Hornung V., Bauernfeind F., Halle A., et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. Nat Immunol, 2008, 9(8): 847-856.
29. Seaton A., Macnee W., Donaldson K., et al. Particulate air pollution and acute health effects. Lancet, 1995, 345(8943): 176-178.
30. Nemmar A., Vanbilloen H., Hoylaerts M. F., et al. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 164(9): 1665-1668.
31. Oberdorster G., Sharp Z., Atudorei V., et al. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. J Toxicol Environ Health A, 2002, 65(20): 1531-1543.
32. Chen W., Liu Y., Wang H., et al. Long-term exposure to silica dust and risk of total

and cause-specific mortality in Chinese workers: a cohort study. PLoS Med, 2012, 9(4): e1001206.

33. Rosenman K. D., Moore-Fuller M., Reilly M. J. Kidney disease and silicosis. Nephron, 2000, 85(1): 14-19.

34. Napoli C., Casamassimi A., Crudele V., et al. Kidney and heart interactions during cardiorenal syndrome: a molecular and clinical pathogenic framework. Future Cardiol, 2011, 7(4): 485-497.

35. Shirakabe A., Hata N., Kobayashi N., et al. Prognostic impact of acute kidney injury in patients with acute decompensated heart failure. Circ J, 2013, 77(3): 687-696.

36. Beamer C. A., Migliaccio C. T., Jessop F., et al. Innate immune processes are sufficient for driving silicosis in mice. J Leukoc Biol, 2010, 88(3): 547-557.

37. Eisenbarth S. C., Colegio O. R., O'connor W., et al. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. Nature, 2008, 453(7198): 1122-1126.

38. Dostert C., Petrilli V., Van Bruggen R., et al. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. Science, 2008, 320(5876): 674-677.

39. Sutterwala F. S., Ogura Y., Szczepanik M., et al. Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. Immunity, 2006, 24(3): 317-327.

40. Shi F., Yang L., Kouadir M., et al. The NALP3 inflammasome is involved in neurotoxic prion peptide-induced microglial activation. J Neuroinflammation, 2012, 9: 73.

41. Herseth J. I., Refsnes M., Lag M., et al. Role of IL-1 beta and COX2 in silica-induced IL-6 release and loss of pneumocytes in co-cultures. Toxicol In Vitro, 2009, 23(7): 1342-1353.

42. Herseth J., Refsnes M., Lag M., et al. IL-1beta as a determinant in silica-induced

cytokine responses in monocyte-endothelial cell co-cultures. Hum Exp Toxicol, 2008, 27(5): 387-399.

43. Song L., Weng D., Liu F., et al. Tregs promote the differentiation of th17 cells in silica-induced lung fibrosis in mice. PLoS One, 2012, 7(5): e37286.

44. Du Z., Zhao D., Jing L., et al. Cardiovascular Toxicity of Different Sizes Amorphous Silica Nanoparticles in Rats After Intratracheal Instillation. Cardiovasc Toxicol, 2013.

45. Passagne I., Morille M., Rousset M., et al. Implication of oxidative stress in size-dependent toxicity of silica nanoparticles in kidney cells. Toxicology, 2012, 299(2-3): 112-124.

46. Nemmar A., Hoylaerts M. F., Hoet P. H., et al. Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and prothrombotic effects. Toxicol Lett, 2004, 149(1-3): 243-253.

47. Apostolakis S., Vogiatzi K., Krambovitis E., et al. IL-1 cytokines in cardiovascular disease: diagnostic, prognostic and therapeutic implications. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem, 2008, 6(2): 150-158.

48. Kolb M., Margetts P. J., Anthony D. C., et al. Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. J Clin Invest, 2001, 107(12): 1529-1536.

49. Dinarello C. A. Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade? Cancer Metastasis Rev, 2010, 29(2): 317-329.

50. Banerjee M., Saxena M. Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: role in type 2 diabetes. Clin Chim Acta, 2012, 413(15-16): 1163-1170.

51. Pauwels N. S., Bracke K. R., Dupont L. L., et al. Role of IL-1alpha and the Nlrp3/caspase-1/IL-1beta axis in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and COPD. Eur Respir J, 2011, 38(5): 1019-1028.

52. Jung J. W., Lee B. O., Lee J. H., et al. Silicosis caused by chronic inhalation of snail

shell powder. J Korean Med Sci, 2012, 27(1): 93-95.

53. Zhou T., Rong Y., Liu Y., et al. Association between proinflammatory responses of respirable silica dust and adverse health effects among dust-exposed workers. J Occup Environ Med, 2012, 54(4): 459-465.

54. 程文娟, 王海椒, 周婷, 等. 瓷厂及钨矿生产性粉尘对血管内皮细胞的损伤效应. 中华劳动卫生职业病杂志, 2010, 28(10): 735-739.

55. Yang H., Wu Q., Tang M., et al. Cell membrane injury induced by silica nanoparticles in mouse macrophage. J Biomed Nanotechnol, 2009, 5(5): 528-535.

56. Bodo M., Baroni T., Bellocchio S., et al. Bronchial epithelial cell matrix production in response to silica and basic fibroblast growth factor. Mol Med, 2001, 7(2): 83-92.

57. Bodo M., Lilli C., Calvitti M., et al. Silica particle size and shape: in vitro effects on extracellular matrix metabolism and viability of human bronchial epithelial cells. J Biol Regul Homeost Agents, 2012, 26(4): 681-692.

58. Bai R., Zhang L., Liu Y., et al. Pulmonary responses to printer toner particles in mice after intratracheal instillation. Toxicol Lett, 2010, 199(3): 288-300.

59. Muller J., Huaux F., Moreau N., et al. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 207(3): 221-231.

60. Chung Y. J., Coates N. H., Viana M. E., et al. Dose-dependent allergic responses to an extract of Penicillium chrysogenum in BALB/c mice. Toxicology, 2005, 209(1): 77-89.

61. Shvedova A. A., Kisin E., Murray A. R., et al. Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008, 295(4): L552-565.

62. Yang H., Wu Q., Tang M., et al. In vitro study of silica nanoparticle-induced cytotoxicity based on real-time cell electronic sensing system. J Nanosci Nanotechnol, 2010, 10(1): 561-568.

63. Punithavathi D., Venkatesan N., Babu M. Curcumin inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. Br J Pharmacol, 2000, 131(2): 169-172.

64. Ghosh M. C., Makena P. S., Gorantla V. K., et al. CXCR4 Regulates Migration of Lung Alveolar Epithelial Cells through Activation of Rac1 and Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2). Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012.

65. Zheng J., Zhang G., Lu Y., et al. Effect of pulmonary surfactant and phospholipid hexadecanol tyloxapol on recombinant human-insulin absorption from intratracheally administered dry powders in diabetic rats. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2010, 58(12): 1612-1616.

66. Fubini B. Surface chemistry and quartz hazard. Ann Occup Hyg, 1998, 42(8): 521-530.

67. Fubini B., Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. Free Radic Biol Med, 2003, 34(12): 1507-1516.

68. Kida Y., Kobayashi M., Suzuki T., et al. Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF-kappaB in human gingival fibroblasts. Cytokine, 2005, 29(4): 159-168.

69. Chen F., Shi X. NF-kappaB, a pivotal transcription factor in silica-induced diseases. Mol Cell Biochem, 2002, 234-235(1-2): 169-176.

70. Szapiel S. V., Elson N. A., Fulmer J. D., et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse. Am Rev Respir Dis, 1979, 120(4): 893-899.

71. Bissonnette E., Rola-Pleszczynski M. Pulmonary inflammation and fibrosis in a murine model of asbestosis and silicosis. Possible role of tumor necrosis factor. Inflammation, 1989, 13(3): 329-339.

72. Giordano G., Van Den Brule S., Lo Re S., et al. Type I interferon signaling contributes to chronic inflammation in a murine model of silicosis. Toxicol Sci, 2010, 116(2): 682-692.

73. Barrett E. G., Johnston C., Oberdorster G., et al. Silica-induced chemokine expression in alveolar type II cells is mediated by TNF-alpha-induced oxidant stress. Am J Physiol, 1999, 276(6 Pt 1): L979-988.

74. Davis G. S., Pfeiffer L. M., Hemenway D. R. Persistent overexpression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in murine silicosis. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 1998, 17(2): 99-114.

75. Ogura Y., Sutterwala F. S., Flavell R. A. The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. Cell, 2006, 126(4): 659-662.

76. Larsen C. M., Faulenbach M., Vaag A., et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. N Engl J Med, 2007, 356(15): 1517-1526.

77. Larsen C. M., Faulenbach M., Vaag A., et al. Sustained effects of interleukin-1 receptor antagonist treatment in type 2 diabetes. Diabetes Care, 2009, 32(9): 1663-1668.

78. Chevalier X., Goupille P., Beaulieu A. D., et al. Intraarticular injection of anakinra in osteoarthritis of the knee: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. Arthritis Rheum, 2009, 61(3): 344-352.

79. Hubbard A. K. Role for T lymphocytes in silica-induced pulmonary inflammation. Lab Invest, 1989, 61(1): 46-52.

80. Eisenbarth S. C., Flavell R. A. Innate instruction of adaptive immunity revisited: the inflammasome. EMBO Mol Med, 2009, 1(2): 92-98.

81. Lundblad L. K., Thompson-Figueroa J., Leclair T., et al. Tumor necrosis factor-alpha overexpression in lung disease: a single cause behind a complex phenotype. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 171(12): 1363-1370.

82. Ohe H., Takashiba S., Naruishi K., et al. Tumor necrosis factor-alpha

(TNF-alpha)-induced and interleukin-1 beta (IL-1 beta)-induced shedding of TNF receptors from gingival fibroblasts. J Interferon Cytokine Res, 2000, 20(12): 1077-1082.

83. Cardell L. O., Uddman R., Zhang Y., et al. Interleukin-1beta up-regulates tumor necrosis factor receptors in the mouse airways. Pulm Pharmacol Ther, 2008, 21(4): 675-681.

84. Saperstein S., Chen L., Oakes D., et al. IL-1beta augments TNF-alpha-mediated inflammatory responses from lung epithelial cells. J Interferon Cytokine Res, 2009, 29(5): 273-284.

85. Yadav A., Saini V., Arora S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. Clin Chim Acta, 2010, 411(21-22): 1570-1579.

86. Jiang Y., Beller D. I., Frendl G., et al. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. J Immunol, 1992, 148(8): 2423-2428.

87. Tanaka S., Choe N., Iwagaki A., et al. Asbestos exposure induces MCP-1 secretion by pleural mesothelial cells. Exp Lung Res, 2000, 26(4): 241-255.

88. Rao K. M., Porter D. W., Meighan T., et al. The sources of inflammatory mediators in the lung after silica exposure. Environ Health Perspect, 2004, 112(17): 1679-1686.

89. Ashcroft T., Simpson J. M., Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. J Clin Pathol, 1988, 41(4): 467-470.

90. Velan G. M., Kumar R. K., Cohen D. D. Pulmonary inflammation and fibrosis following subacute inhalational exposure to silica: determinants of progression. Pathology, 1993, 25(3): 282-290.

91. Lo Re 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 Immunol, 2010, 184(11): 6367-6377.

92. Rabolli V., Lo Re S., Uwambayinema F., et al. Lung fibrosis induced by crystalline silica particles is uncoupled from lung inflammation in NMRI mice. Toxicol Lett, 2011, 203(2): 127-134.

93. Huaux F., Louahed J., Hudspith B., et al. Role of interleukin-10 in the lung response to silica in mice. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998, 18(1): 51-59.

94. Thakur S. A., Beamer C. A., Migliaccio C. T., et al. Critical role of MARCO in crystalline silica-induced pulmonary inflammation. Toxicol Sci, 2009, 108(2): 462-471.

95. Beamer C. A., Holian A. Scavenger receptor class A type I/II (CD204) null mice fail to develop fibrosis following silica exposure. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 289(2): L186-195.

96. Greenberg M. I., Waksman J., Curtis J. Silicosis: a review. Dis Mon, 2007, 53(8): 394-416.

97. Wynn T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. J Pathol, 2008, 214(2): 199-210.

98. Arribillaga L., Dotor J., Basagoiti M., et al. Therapeutic effect of a peptide inhibitor of TGF-beta on pulmonary fibrosis. Cytokine, 2011, 53(3): 327-333.

99. Van Zijverden M., Van Der Pijl A., Bol M., et al. Diesel exhaust, carbon black, and silica particles display distinct Th1/Th2 modulating activity. Toxicol Appl Pharmacol, 2000, 168(2): 131-139.

100. 胡佳哲, 李云. Th1/Th2 失衡与疾病相关性的研究进展. 华西医学, 2009, 24(1): 236-237.

101. Barbarin V., Xing Z., Delos M., et al. Pulmonary overexpression of IL-10 augments lung fibrosis and Th2 responses induced by silica particles. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288(5): L841-848.

102. Chen Y., Chen J., Dong J., et al. Antifibrotic effect of interferon gamma in silicosis model of rat. Toxicol Lett, 2005, 155(3): 353-360.

103. Gullestad L., Ueland T., Vinge L. E., et al. Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers. Cardiology, 2012, 122(1): 23-35.

104. Aukrust P., Ueland T., Lien E., et al. Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. Am J Cardiol, 1999, 83(3): 376-382.

105. Torre-Amione G., Kapadia S., Benedict C., et al. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). J Am Coll Cardiol, 1996, 27(5): 1201-1206.

106. Damas J. K., Gullestad L., Ueland T., et al. CXC-chemokines, a new group of cytokines in congestive heart failure--possible role of platelets and monocytes. Cardiovasc Res, 2000, 45(2): 428-436.

107. Von Haehling S., Jankowska E. A., Anker S. D. Tumour necrosis factor-alpha and the failing heart--pathophysiology and therapeutic implications. Basic Res Cardiol, 2004, 99(1): 18-28.

108. Testa M., Yeh M., Lee P., et al. Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. J Am Coll Cardiol, 1996, 28(4): 964-971.

109. Bujak M., Frangogiannis N. G. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2009, 57(3): 165-176.

110. Anker S. D., Von Haehling S. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. Heart, 2004, 90(4): 464-470.

111. Seta Y., Shan K., Bozkurt B., et al. Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. J Card Fail, 1996, 2(3): 243-249.

112. Mann D. L. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. Circ Res, 2002, 91(11): 988-998.

113. Lecour S., James R. W. When are pro-inflammatory cytokines SAFE in heart failure? Eur Heart J, 2011, 32(6): 680-685.

114. Levine B., Kalman J., Mayer L., et al. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. N Engl J Med, 1990, 323(4): 236-241.

115. Gluba A., Bielecka A., Mikhailidis D. P., et al. An update on biomarkers of heart failure in hypertensive patients. J Hypertens, 2012, 30(9): 1681-1689.

116. Hoogeveen R. C., Morrison A., Boerwinkle E., et al. Plasma MCP-1 level and risk for peripheral arterial disease and incident coronary heart disease: Atherosclerosis Risk in Communities study. Atherosclerosis, 2005, 183(2): 301-307.

117. Ono K., Matsumori A., Shioi T., et al. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. Circulation, 1998, 98(2): 149-156.

118. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. Physiol Rev, 1999, 79(1): 215-262.

119. Weber K. T., Janicki J. S., Shroff S. G., et al. Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. Circ Res, 1988, 62(4): 757-765.

120. Weber K. T., Sun Y., Guarda E., et al. Myocardial fibrosis in hypertensive heart disease: an overview of potential regulatory mechanisms. Eur Heart J, 1995, 16 Suppl C: 24-28.

121. Medugorac I., Jacob R. Characterisation of left ventricular collagen in the rat. Cardiovasc Res, 1983, 17(1): 15-21.

122. Raetz M., Hwang S. H., Wilhelm C. L., et al. Parasite-induced TH1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN-gamma-dependent elimination of Paneth cells. Nat Immunol, 2013, 14(2): 136-142.

123. Tanaka J., Imamura M., Kasai M., et al. Th2 cytokines (IL-4, IL-10 and IL-13) and IL-12 mRNA expression by concanavalin A-stimulated peripheral blood mononuclear cells during chronic graft-versus-host disease. Eur J Haematol, 1996, 57(1): 111-113.

124. Stutz A. M., Pickart L. A., Trifilieff A., et al. The Th2 cell cytokines IL-4 and IL-13 regulate found in inflammatory zone 1/resistin-like molecule alpha gene expression by a STAT6 and CCAAT/enhancer-binding protein-dependent mechanism. J Immunol, 2003, 170(4): 1789-1796.

125. Saldanha L. F., Rosen V. J., Gonick H. C. Silicon nephropathy. Am J Med, 1975, 59(1): 95-103.

126. Rapiti E., Sperati A., Miceli M., et al. End stage renal disease among ceramic workers exposed to silica. Occup Environ Med, 1999, 56(8): 559-561.

127. Wedeen R. P. Occupational and environmental renal disease. Semin Nephrol, 1997, 17(1): 46-53.

128. Ng T. P., Ng Y. L., Lee H. S., et al. A study of silica nephrotoxicity in exposed silicotic and non-silicotic workers. Br J Ind Med, 1992, 49(1): 35-37.

129. Gui S., Zhang Z., Zheng L., et al. Molecular mechanism of kidney injury of mice caused by exposure to titanium dioxide nanoparticles. J Hazard Mater, 2011, 195: 365-370.

130. Boor P., Casper S., Celec P., et al. Renal, vascular and cardiac fibrosis in rats exposed to passive smoking and industrial dust fibre amosite. J Cell Mol Med, 2009, 13(11-12): 4484-4491.

131. Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. Kidney Int, 2006, 69(2): 213-217.

132. Schnaper H. W., Hayashida T., Hubchak S. C., et al. TGF-beta signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 284(2): F243-252.

133. Corona B. T., Wu X., Ward C. L., et al. The promotion of a functional fibrosis in skeletal muscle with volumetric muscle loss injury following the transplantation of muscle-ECM. Biomaterials, 2013, 34(13): 3324-3335.

134. Bologa R. M., Levine D. M., Parker T. S., et al. Interleukin-6 predicts

hypoalbuminemia, hypocholesterolemia, and mortality in hemodialysis patients. Am J Kidney Dis, 1998, 32(1): 107-114.

135. De Jager D. J., Grootendorst D. C., Jager K. J., et al. Cardiovascular and noncardiovascular mortality among patients starting dialysis. JAMA, 2009, 302(16): 1782-1789.

136. Muntinghe F. L., Verduijn M., Zuurman M. W., et al. CCR5 deletion protects against inflammation-associated mortality in dialysis patients. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(7): 1641-1649.

137. Elewa U., Sanchez-Nino M. D., Martin-Cleary C., et al. Cardiovascular risk biomarkers in CKD: the inflammation link and the road less traveled. Int Urol Nephrol, 2012, 44(6): 1731-1744.

138. Hung A. M., Ellis C. D., Shintani A., et al. IL-1beta receptor antagonist reduces inflammation in hemodialysis patients. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(3): 437-442.

139. Shao D. D., Suresh R., Vakil V., et al. Pivotal Advance: Th-1 cytokines inhibit, and Th-2 cytokines promote fibrocyte differentiation. J Leukoc Biol, 2008, 83(6): 1323-1333.

140. Colombo P. C., Ganda A., Lin J., et al. Inflammatory activation: cardiac, renal, and cardio-renal interactions in patients with the cardiorenal syndrome. Heart Fail Rev, 2012, 17(2): 177-190.

综 述

Toll 样受体和 NOD 样受体相关途径在矽肺炎性反应过程中的作用研究进展

郭嘉丽 综述 陈卫红 审阅

尘肺病是由于在生产过程中长期吸入生产性粉尘而引起的以肺组织弥漫性纤维化为主的全身性疾病，是我国最严重的职业病。自 2001 年以来，我国每年新增尘肺病例占新发职业病例的比例均在 75.11%以上；据我国卫生部统计资料显示：我国至 2010 年累积报告尘肺 676，541 例，占报告职业病总数的 90%以上，其中死亡 149 110 例，现患 527 431 例。2010 年共报告尘肺病新病例 23 812 例，占新发职业病的 87.42%，与 2009 年相比，同比增长了 7.46%；在 23 812 例尘肺病新病例中，矽肺病例为 9 870 例，占总尘肺病例数的 41.45%[1]。

在现有的文献报道中，矽肺是尘肺病中研究最为广泛的一种。矽肺是由于在生产过程中长期吸入含游离二氧化硅浓度较高（>10%）的粉尘（俗称石英）而引起的以肺组织弥漫性纤维化为主的全身性疾病。石英的职业暴露是导致矽肺发病的主要原因；此外，沙尘暴、火山爆发以及工业污染，均可导致生活环境中石英浓度升高。散在病例报告指出，生活环境中较高浓度的石英暴露同样可以导致矽肺发生[2]。

对于矽肺的病理特征可以从以下几方面进行认识：

（1）从病理改变上讲，矽肺主要包括肺部炎性反应和纤维化两个环节。炎性反应主要是以炎性细胞包括巨噬细胞、嗜中性粒细胞、淋巴细胞等浸润，炎性因子表达升高为特征；而纤维化主要是以肺组织胶原沉积为特征。肺部炎性反应以及肺纤维化反应是矽肺发病过程中两个不同的并且缺一不可的病变环节。研究表明，炎性反应过程中部分炎性因子如 IL-1β 和部分炎性细胞分泌的纤维化因子如 TGF-β 可以刺激成纤维细胞分化为成熟的肌成纤维细胞，后者可以大量分泌胶原成分，促进纤维化形成。

反过来，肺组织胶原沉积，可以将肺部炎性反应局限在较小范围内，所以说肺纤维化是对肺炎性损伤的抵抗和修复过程[3]。

（2）临床上根据矽肺的临床特征以及病理改变将其分为 4 类：结节型矽肺、矽性蛋白沉积、渐进性团块型矽肺、弥漫性间质纤维化型矽肺，这 4 种类型按照严重程度呈现递进关系[4]。

关于石英导致肺部炎性反应以及肺纤维化的具体机制仍然不是十分清楚。而免疫学说在一定程度上很好的解释并衔接了石英所致的肺部炎性反应和肺纤维化形成。按照免疫学说的观点，当机体暴露于石英后，固有免疫应答首先被激活，并且精确地诱导并调节后期的适应性免疫应答，矽肺的发病过程中主要有如下事件依次发生：① 石英作为病原相关分子模式被固有免疫受体识别；② 引发关键的固有免疫细胞如巨噬细胞的激活以及凋亡；③ 激活的巨噬细胞产生 IL-1 和 TNF 等细胞因子，进而激活成纤维细胞；④ 激活的巨噬细胞产生的细胞因子以及其他活性物质介导树突状细胞活化，从而激活适应性免疫；⑤ 适应性免疫全面活化并且发挥作用；⑥ 最终病变部位形成纤维-透明组织，肺纤维化发生[5]。可见，固有免疫应答为石英暴露后，机体内发生的首要应答事件。研究表明，当外界病原体侵入机体后，固有免疫系统通过一系列高度保守的模式识别受体（PRR）调节免疫应答。在所有 PRR 中，Toll 样受体（TLR）在固有免疫细胞表面广泛表达，大多属于跨膜受体；而最近发现的 NOD 样受体（NLR）则属于胞内型受体。TLR 和 NLR 在始发调节固有免疫以及精确诱导适应性免疫的过程中均发挥了重要作用，如图 1 所示[6]。下文将针对近年来关于 TLR 和 NLR 在矽肺发病过程中的作用及其研究进展做一综述。

1. TLR 与矽肺

1.1 TLR 背景知识

TLR 是一类与 IL-1R 同源的跨膜受体，在巨噬细胞、树突状细胞、B 细胞和 T 细胞中均可表达，如表 1 所示。TLR 在固有免疫应答过程中发挥了极为重要的作用，它可以识别多种内源性和外源性的危险相关分子模式（DAMP）和病原相关分子模式（PAMP），具体内容如表 2 所示[7]。由表 2 可知，TLR 一般仅识别微生物及其产物。

石英粉尘进入机体后，其表面的 Si-OH 或者硅烷基团以及与这些基团紧密结合的水分子形成复合物，该复合物也具有与细菌或真菌细胞壁糖水化合物相似的原子排列结构，从而可以作为一种病原相关分子模式（PAMP）被相应的 PRR 主要是 TLR2 和 TLR4 识别[5]。另外，王剑波等人的研究显示在石英诱导大鼠肺纤维化形成的过程中，大鼠血浆和肺组织中的热休克蛋白-70 较空白组显著升高[8]。石英粉尘刺激机体产生的热休克蛋白-70 是 TLR2、TLR4 的内源性配体[9-10]。已有研究证实石英粉尘可以通过细胞表面的 TLR 发挥一系列功能[11-12]。

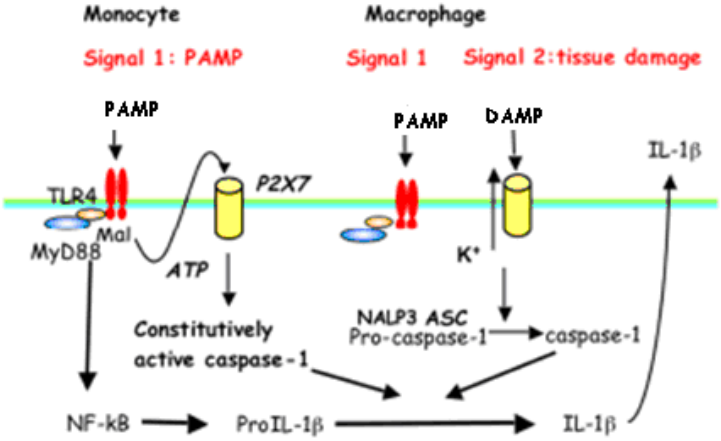


图 1 TLR 与 NLR 信号举例示意图

固有免疫细胞如巨噬细胞通过 TLR 识别 PAMP 或 DAMP 被激活后，一方面可以迅速介导炎性反应，一般并不需要经过细胞增殖的过程，这就使得固有免疫应答具有快速反应性的特点，主要表现为急性炎性反应[13]。在石英暴露的机体中，除矽肺外，还会引发多种自身免疫性疾病如系统性硬化症，风湿性关节炎，系统性红斑狼疮以及慢性肾脏疾病等。目前，仍没有确定这些疾病是否具有共同的发病机制。研究表明，由石英暴露而引发的严重的炎性反应是这些自身免疫疾病发病过程中所共有的特点[4]。大量的人群和动物研究数据表明，由炎性因子如 IL-1β、IL-6、TNF-α 介导的炎性反应在矽肺发病过程中，也发挥了极为重要的作用[14-16]。另一方面，TLR 与配体结合

后，可以刺激树突状细胞活化，进而介导适应性免疫系统的活化[17]。

1.2 TLRs 激活机制

TLRs 是 PRR 中的信号转导型受体，是机体固有免疫系统识别病原微生物及其产物的主要“感受器”[18-19]。TLRs 由Ⅰ型跨膜受体家族组成，包含胞外亮氨酸富集区域（LRR）以及胞内 Toll/IL-1 受体区域（TIR）[20-21]。不同的 TLR 在固有免疫识别过程中，采用了不完全相同的信号转导通路。目前研究表明，几乎所有的 TLRs（除 TLR3 之外），当与相应的 PAMP 或 DAMP 结合后，其胞内 TIR 区域即与髓样分化因子（MyD88）的 TIR 区域相互结合；MyD88 通过死亡结构域嗜同种受体反应与 IL-1R 相关激酶 4（IRAK-4）、IL-1R 相关激酶 1（IRAK-1）相结合，之后，首先活化的 IRAK-4 可以使 IRAK-1 磷酸化，然后与 TNFR 相关因子 6（TRAF6）结合；活化后的 TRAF6 结合 E2 泛素连接酶复合物，可以催化连接于 TRAF6 与 IKK 复合体调节亚单位 NEMO 之间的 TK63 结合的聚泛素链形成，这种泛素化作用可以激活转化生长因子-β（TGF-β）活化酶 1（TAK1）复合物。TAK1 可以使 IKK-β 和 MKK6 磷酸化，进而分别导致 NF-κB 和 MAP 激酶的活化，并最终导致大量前致炎因子前体如 pro-IL-1β、pro-IL-6、pro-TNF-α 等的表达。IL-1β、IL-6、TNF-α 等炎性因子在矽肺发病过程中的炎性反应阶段均发挥了重要的作用[13-14, 30-32]。

研究表明，除 MyD88 介导信号转导作用之外，TLR3 唯一依赖于 TRIF 激活后续的级联反应，TLR4 则可以同时依赖于 MyD88 和 TRIF 活化后续反应[33-34]。现已 TLR3 为例，介绍依赖于 TRIF 的信号通路。当 TLR3 被相应 PAMP 或 DAMP 激活后，通过胞内 TIR 区域募集 TRIF；TRIF 具有与 TRAF6 和 TBK1 结合的不同位点，可以分别与 TRAF6 和 TBK1 结合，当 TRIF 与 TRAF6 结合后，可以介导 TAK1 复合物活化，并最终导致 NF-κB 活化；当 TRIF 与 TBK1 结合后，通过 TRAF3 激活 TBK1，后者可以直接是 IFN-调节因子 3/7（IRF-3/7）磷酸化，磷酸化的 IRF3/7 通过形成同源二聚体或者异源二聚体最终诱导Ⅰ型 IFN（包括 IFN-α、IFN-β）的表达[34-36]。本文以 TLR3 和 TLR4 为例，将上述激活机制归纳为图 2 所示。

表 1 各类细胞 TLRs 表达情况

细胞类型	TLRs 种类	参考文献
巨噬细胞	TLR1-9	[22-23]
B 细胞	TLR1-4，TLR6-7	[24-25]
T 细胞	TLR1-9	[26-28]
树突状细胞	TLR1-9	[23, 29]

表 2 各类 TLRs 配体

TLR 类型	外源性配体	外源性配体来源	内源性配体
TLR1	三酰基脂肽	分支杆菌	
TLR2	脂蛋白/脂肽	革兰氏阳性菌	热休克蛋白 70、高迁移率族蛋白 1
	肽聚糖、脂磷壁酸		
TLR3	双链 RNA	病毒	双链 DNA
TLR4	脂多糖	革兰氏阴性菌	热休克蛋白 70
	融合蛋白	呼吸道合胞体病毒	纤维粘连素胞外重复区域
	包膜蛋白	小鼠乳腺肿瘤病毒	透明质酸低聚糖
TLR5	鞭毛蛋白	细菌	
TLR6	酵母聚糖	真菌	
TLR7	单链 RNA	病毒	单链 RNA
TLR8	单链 RNA	病毒	单链 RNA
TLR9	DNA 的 CpG 序列	细菌和病毒	DNA
TLR10	未确定	未确定	
TLR11	脯氨酸	大肠埃希菌	
TLR13	23 s rRNA	革兰氏阳性/阴性菌	

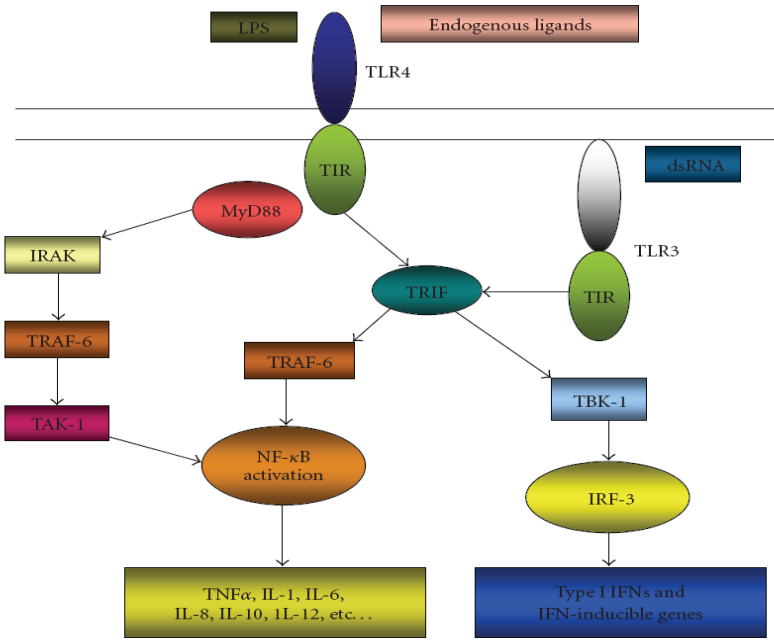


图 2 TLR3 和 TLR4 激活机制示意图

对于已经被确定的可以在矽肺发病过程中被激活的 TLR2 和 TLR4，其与 MyD88 结合需要 MyD88 连接蛋白类似物 Mal（TIRAP）介导[37]。Basith 等人的研究表明，TLR4 被配体激活后，首先形成二聚体，这种二聚体具有能够特异性识别 Mal 的支架结构，可以与 Mal 特异性结合，从而形成 TLR4-Mal 四聚体复合物，后者可以产生两个衔接分子，通过高度亲和力与两个 MyD88 结合而形成 TLR4-Mal-MyD88 六聚体复合物，进而发挥其生物学效应[38]。另外，Fitzgerald 等人认为，在 TLR4 信号通路中，Mal 与 MyD88 以同源二聚体或者异源二聚体的形式发挥作用，Mal 除了协助 MyD88 介导 TRAF-6 通路进行免疫应答之外，还可以选择性结合 IRAK-2，并最终活化 NF-κB[39-40] 。这也就解释了 Kawai 等人发现的用 LPS（TLR4 配体）刺激 MyD88 基因缺陷小鼠依然可以有延后的细胞因子表达[41]，主要是因为阻断 MyD88 后，Mal 可以通过 IRAK-2 激活 NF-κB。而 Yamamoto 等人发现，Mal 基因敲除的巨噬细胞在 LPS 刺激下，无 IL-6、TNF-α 和 IL-12 表达；Mal 基因敲除的小鼠对 LPS 的刺激也呈现完全抵抗，这说明 Mal 在 MyD88 依赖的 TLR2/TLR4 信号传导通路中发挥了极为重要的

作用[39]。

1.3 TLRs 介导由固有免疫向适应性免疫的过渡

TLRs 已经被认为和某些免疫性疾病以及炎性疾病有关，如糖尿病，哮喘和风湿性关节炎等。这也证明，免疫系统需要维持在一定的平衡状态，TLR 信号通路也需要进行精确的调控才可以发挥对机体有利的生物效应；否则，过度的炎性反应反而会导致机体产生其他病变[42]。

作为固有免疫系统中重要的 PRR，TLRs 特异性识别外源性的 PAMP 或内源性的 DAMP 后，可以精确地激活适应性免疫应答。树突状细胞在固有免疫和适应性免疫识别系统中发挥关键作用[18, 43]。未成熟的树突状细胞可以表达全套的 TLRs，当后者识别特异性的配体后，就会诱导树突状细胞成熟，进而表达高水平的 MHC 分子以及共刺激分子 CD80 和 CD86，并且迁移至淋巴结，对幼稚 T 细胞进行抗原提呈。同时，TLRs 也可以诱导树突状细胞表达包括 IL-12 在内的多种细胞因子[44-45]。IL-12 可以诱导固有免疫细胞如 NK 细胞表达 IFN-γ。IL-12 和 IFN-γ 都可以诱导幼稚 T 细胞向 Th1 效应 T 细胞转化。IFN-γ 作为 Th1 型细胞因子，可以代表机体内 Th1 型免疫应答的状态[46-47]。实验研究表明，用卵白蛋白混合完全弗氏佐剂刺激 MyD88 缺陷小鼠，可以看到机体在抗原提呈 T 细胞增殖、IFN-γ 表达等一系列反应上都呈现一种阻断效应。这就说明阻断 TLRs 介导的免疫识别对于 Th1 细胞的产生具有很重要的意义。但是，现有研究提示，TLRs 对 Th2 型细胞产生以及对体液免疫应答不具有直接作用，但并不排除 TLRs 对 Th2 型免疫应答的间接作用[48]。在矽肺发病过程中，Th1 型免疫应答和 Th2 型免疫应答都发挥着必不可少的作用[49]。主要表现为 Th1 型免疫应答可以抵抗肺纤维化形成，而 Th2 型免疫应答则主要促进肺纤维化形成[50-51]。从 Th1、Th2 型免疫应答对矽肺发病的意义上来说，TLRs 对矽肺发病后期的纤维化形成发挥了重要作用。

2. NLR 与矽肺

2.1 Nalp3 炎性体背景知识

NLR 为胞内型 PRR，是细胞内的一种多蛋白复合体。目前，研究较多的与矽肺

发病相关的 NLR 主要为 Nalp3 炎性体。Nalp3 炎性体的活化可以使 pro-IL-1β、pro-IL-18 转化为成熟的 IL-1β、IL-18，并且分泌到细胞外[52]。研究表明，IL-1β 等炎性因子在矽肺早起炎性反应和后期纤维化过程中均发挥了重要的作用。Cassel 等人的研究也表明，Nalp3 基因敲除的小鼠石英暴露后，肺部纤维化几乎不发生[13]。该炎性小体包含了 3 个结构部分，Nalp3 单体多聚体，ASC 和 caspase-1[53-54]。各部分在 Nalp3 炎性体中发挥的作用如下：

① Nalp3 单体

Nalp3 是 NLR 蛋白家族成员，是 Nalp3 炎性体的最主要结构，可以感受外界的刺激信号从而启动炎性复合体的装配[55]。Nalp3 单体含有三个结构域（如图 3 所示），热蛋白结构域（pyrin domain，PYD），NACHT 结构域，亮氨酸富集域（LRR）[56-57]。其中，PYD 能够和凋亡相关点样蛋白（ASC）的 caspase-1 募集域（CARD）产生相互作用。

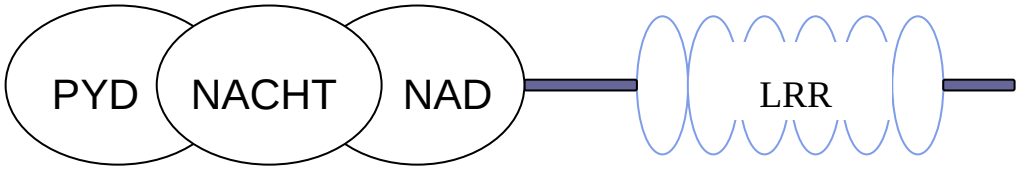


图 3　Nalp3 单体结构示意图

② ASC

在炎性体中，ASC 可通过其 CARD 结构域和 PYD 结构域介导 Nalp 对 caspase-1 的激活作用[54, 58-59]。ASC 对炎性体的意义甚至大于 Nalp3 对炎性体的意义。例如，土拉热弗朗西斯菌介导 caspase-1 和 IL-1β 的功能时，并不依赖于 Nalp3 的存在，但却依赖于 ASC 的存在。据此，有人提出构建一种“NALP free”ASC inflammasome[56]。

③ Caspase-1

Caspase-1 又称为白介素转换酶（interleukin-converting enzyme，ICE），是炎性体中的效应蛋白，它参与炎性体复合物的形成并被炎性复合物激活。Caspase-1 的激活可以使胞内的 pro-IL-1β、pro-IL-18 转化为成熟的 IL-1β、IL-18，最终使这两种炎性因子释放到细胞外[54, 60]。

2.2 Nalp3 激活机制

目前研究所示，当 Nalp3 炎性小体与相应的 PAMP 或 DAMP 识别后，主要可以通过以下三种途径被激活：

① 胞内钾离子外流

很多刺激都能激活 Nalp3 炎性体，然而他们都有一个共同的步骤，就是细胞内钾离子外流。胞内钾离子外流使胞内低钾，胞内炎性体激活所需要的物质的装配都需要低浓度的钾。有实验表明，增加胞外钾离子浓度，阻止胞内钾离子外流可抑制 caspase-1 的活化，从而减少 IL-1β 的分泌[13, 56, 61]。而生理浓度的钾离子可以起到抑制凋亡的作用。所以推测正常的钾浓度可能一道天然的防护，它调控着 caspase 活化复合物的形成，而低钾可能是为炎性体活化提供所需要的微环境。该激活机制如图 4 所示。

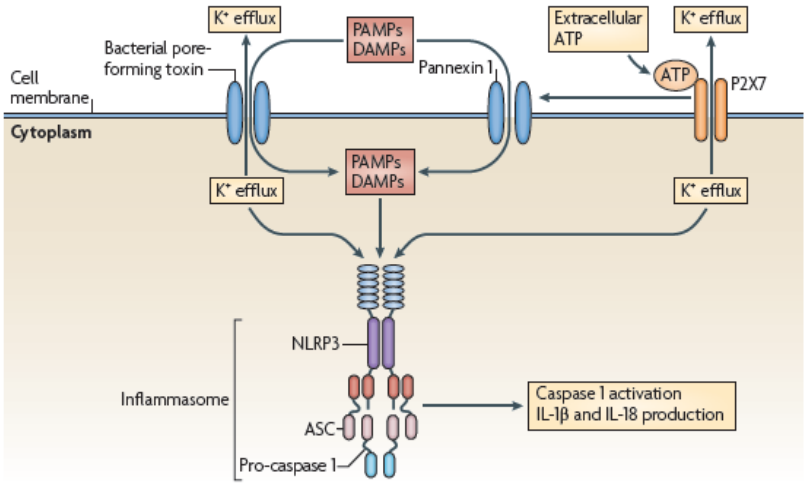


图 4 钾离子外流激活 Nalp3 炎性小体

② 溶酶体破裂

Nalp3 可以感知溶酶体的裂解，并可间接感知巨噬细胞的过度吞噬和病原体相关物质从溶酶体中释放入胞浆的过程。在尘肺发病过程中，大量石英颗粒进入机体内，被肺泡内巨噬细胞所吞噬，但绝大部分的吞噬作用是无效的。这种无效的作用使得吞噬不稳定，溶酶体裂解，溶酶体内的物质，尤其是组织蛋白酶 B 被释放入胞浆，从而激活 Nalp3 炎性体[13]。该激活机制如图 5 所示。

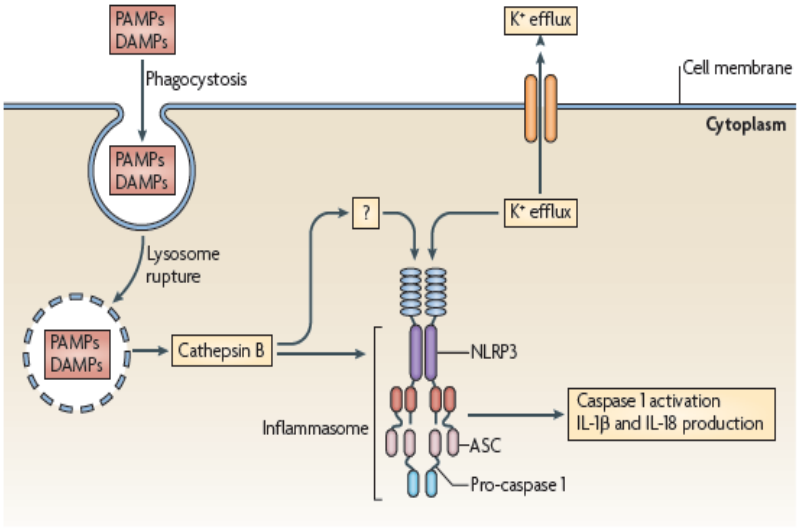


图 5 溶酶体破裂激活 Nalp3 炎性小体

③ ROS 的产生

活性氧活化 Nalp3 使细胞感受胞内应激从而使细胞能够感应外来的危险信号[62]，所以造成损伤的同时，它也参与了信号的传递。为此，很多学者对 Nalp3 与 ROS 的关系有所争论。ATP 参与 Nalp3 活化的很多环节，外来的刺激可诱导细胞内的 ATP 外流从而诱导 ROS 的产生[63]。ROS 的产生，所以 ROS 是作为一种应激的物质而存在，将刺激的信号以过氧化氢作为第二信使的形式传递。在体内，则有相关的物质作为天然的 ROS 清除剂（抗氧化系统），以保持体内 ROS 水平的相对稳定。一旦清除机制受到破坏或者 ROS 生成过多并持续存在，将导致机体因 ROS 而损伤。

正常情况下，组成 NAPDH 氧化酶的各部分在空间上被分开而不能起作用，当收到外界刺激后，这些部分聚集形成氧化酶复合物，参与电子的传递并在此过程中产生超氧离子。线粒体是最主要的活性氧的来源部位[13]。对于能够活化炎性体的 ROS 的来源，至今尚未清楚。有可能是巨噬细胞以吞噬的方式清除不当所导致的 NADPH 氧化酶的慢性活化过程而使 ROS 过量产生[64]。用 NADPH 氧化酶抑制剂阻止被石英刺激的巨噬细胞产生 ROS，可检测到 caspase-1 的活性和 IL-1β 的分泌受到抑制[13, 64]，并且，不是所有的 NADPH 氧化酶都与激活炎性体的 ROS 的产生有关，NADPH 氧化酶中的 P22PHOX 依赖的氧化酶可能是激活 Nalp3 炎性体的 ROS 的重要来源途径[64]。

该机制如图 6 所示。

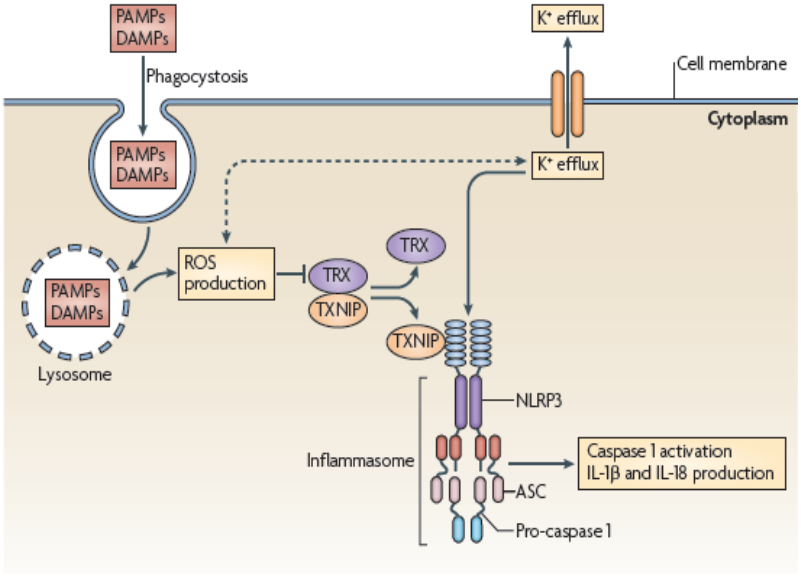


图 6　ROS 激活 Nalp3 炎性小体

通过以上三种可能的途径，失活的 Nalp3 发生构象改变，暴露 NACHT 结构域并进行寡聚化，通过 PYD-PYD 同型相互作用募集 ASC 接头分子，从而形成炎性小体（包括 NALP3、Cardinal、ASC 和 pro-caspase-1）。ASC 又通过 CARD-CARD 同型相互作用募集 pro-caspase-1，导致其构象改变，产生活性 Caspase-1，后者可裂解 pro-IL-1β 和 pro-IL-18，最终导致 IL-1β 和 IL-18 促炎因子的加工，参与后续炎症反应[57]。研究表明，Nalp3 的突变将导致 IL-1β 的分泌异常[65]。所以，IL-1β 的分泌情况可间接反映出 Nalp3 炎性体的活化水平。当外源性物质刺激巨噬细胞后，可检测到明显升高的 IL-1β 水平，而具有 Nalp3 炎性体缺陷的巨噬细胞受到相同刺激后，不能分泌 IL-1β[13]，证明机体内激活固有免疫机制中，Nalp3 炎性体是不可缺少的信号通路。

3. 机体对 TLR 和 NLR 的负性调节机制

TLR 和 NLR 在机体固有免疫应答过程中均为迅速灵敏的反应体系。适当的反应对机体具有保护作用，但是过度的反应会对机体造成损伤。机体本身对 TLR 和 NLR 途径具有一定的负性调节机制，该机制有可能在矽肺发病过程中也发挥了一定的作用。

3.1 TAM/Gas6 对 TLRs 的负性调节作用

最近有研究表明，细胞因子信号抑制蛋白（SOCS）在负性调节 TLR，抑制免疫反应扩大的过程中发挥了重要的作用。SOCS 是在 TLR 信号通路以及 TAM/Gas6 环状调节作用下产生的。

Gas6 于 1988 年首次被发现于胎鼠生长停滞的成纤维细胞中，是生长停滞特异性基因（growth arrest-specific gene，*GAS*）编码的蛋白产物中的一种，与由基因 *PROS1* 编码的抗凝蛋白 S（PS）同属于维生素 K 依赖蛋白家族。Gas6 含有 678 种氨基酸，其中 40%的氨基酸序列和 PS 具有同源性[66]。但是 Gas6 和 PS 的功能有很大不同，Gas6 主要在细胞保护和组织形成过程中发挥作用，而 PS 主要是在凝血级联反应中发挥作用[67]。Gas6 在肺，肠以及内皮表达丰富，在肝脏表达极少[68]。Gas6 和 PS 的共同配体为 TAM 受体络氨酸激酶，包括 Tyro3、Axl、Mer 三个亚群。TAM 受体均为单词跨膜受体，其结构类似，由胞外的 2 个免疫球蛋白样区和 2 个纤维连接蛋白区以及胞质络氨酸激酶区组成[69]。Gas6/TAM 被证明对 TLRs 途径具有负反馈调节作用。该负反馈调节的终效果为：TLRs 介导炎性反应的同时，通过 IFNAR-STAT1 路径激活以细胞因子信号抑制蛋白 1（SOCS1）和细胞因子信号抑制蛋白 3（SOCS3）为作用效应蛋白的炎性抑制反应，从而控制 TLRs 下行的炎性反应[36, 69]。关于负反馈调节的过程具体阐述如下。

当 TLRs 被激活后，可以诱导大量细胞因子如Ⅰ型 IFN 表达；IFN 与其受体 IFNAR 结合导致 IFNAR 活化，进而使 STAT1 磷酸化并且迁移至细胞核诱导更大量的细胞因子产生，这是一个炎性正反馈调节。但是，在这个正反馈调节的同时，也激活了另一条炎性抑制的负反馈路径。通过 STAT1 的活化，诱导 TAM 受体表达升高，TAM 受体与配体 GAS6 结合，通过转录因子 STAT1 发挥作用，诱导 SOCS1 和 SOCS3 表达，从而抑制炎性反应。所以有学者把 IFNAR/STAT1 比作一个可以先激发炎性反应，继而又可以抑制炎性反应的“信号匣”[69]。

TAM 抑制炎性反应主要通过其诱导表达的 SOCS1 和 SOCS3 来发挥作用。实验研究表明，SOCS-1 可以通过 SH2 结构域识别 Mal，并介导 Mal 发生多聚遍在蛋白化

作用；同时，Mal 在 Btk 的作用下发生络氨酸磷酸化，这些反应共同导致了 Mal 分子的降解，并且最终抑制相关的 TLR 路径下的炎性应答。另外，虽然 Mal 分子与 MyD88 分子具有高度同源性，但是 SOCS-1 对 MyD88 并不发挥作用[70]。 SOCS-3 的作用靶分子为普遍存在于各种 TLR 的 TRAF6/TRAF3。目前研究认为，SOCS-3 倾向于通过阻止 TRAF6/TRAF3 发生泛素化作用而阻断相关的 TLR 下游的炎性应答[36]。另外，在 TLR2/TLR4 通路下，TAM/Gas6-STAT1-SOCS-1/SOCS-3 抑制炎性反应的可以通过两种方式：一是通过 SOCS-1 降解 Mal 分子，从而中断 TLR2/TLR4 信号通路；二是通过 SOCS-3 作用于 TRAF6/TRAF3 而中断 TLR2/TLR4 信号通路。由于在 TLR2/TLR4 信号通路中，Mal 分子位于 TRAF6/TRAF3 上游，所以我们推断在 TAM/Gas6-STAT1-SOCS-1/SOCS-3 抑制 TLRs 炎性反应的过程中，SOCS1 发挥主要作用。

概括起来，TAM 调节下的炎性反应过程如下：首先，TLRs 活化导致大量细胞因子激增；然后，之前产生的细胞因子与相应受体作用后，通过正反馈调节环而扩大细胞因子的产生；同时，细胞因子受体 IFNAR 的活化导致 IFNAR/STAT1 依赖的 TAM 受体表达；在 TAM 受体介导下，SOCS-1、SOCS-3 表达，通过抑制 TLR 信号通路进而抑制其所诱导的炎性反应。

3.2 Nalp3 炎性体活化的负性调节机制

适量的 IL-1β 是机体抵抗病理性感染的重要因素，但过量的 IL-1β 会对机体产生有害作用甚至导致死亡。因此，炎性体的活化必须被精确调控。

目前已经鉴定出的炎性体的负性调节因子主要有两类，一类可以阻断炎性体的装配，另一类可以阻断 caspase-1 的活化[54]。而从结构上看，又可以分为如下两类[71]，一类含有 CARD 结构域，此结构域与 caspase-1 的 CARD 结构域高度相似。通过 CARD-CARD 相互作用，而阻止 caspase-1 和 ASC 之间的相互作用，最终阻断 IL-1β 的产生。这类分子如拟白介素转换酶（pseudo-interleukin-converting enzyme，Pseudo-ICE），COP（CARD-only protein）和 caspase-12。另一类含有 PYD 结构域，该类分子通过 PYD-PYD 相互作用可以干扰 ASC 和 Nalps 之间的相互作用。这类分子

如病毒热蛋白和 POP[54, 72]。

另外，蛋白酶抑制剂-9 和病毒蛋白细胞因子反应修饰物 A 均能够抑制 caspase-1 的生物活性。蛋白酶抑制剂-9 可以直接抑制 caspase-1，而病毒蛋白细胞因子反应修饰物 A 可以抑制 caspase-1 对 pro-IL-1β 的切割，进而抑制 IL-1β 的成熟分泌[73-74]。

综上所述，我们可以认为，石英粉尘进入机体后，石英粉尘本身及石英刺激机体产生的其他分子可以作为 PAMP 或 DAMP 首先被固有免疫细胞表面的 TLR2/TLR4 识别；通过活化 TLRs 信号通路而介导一系列致炎因子前体的表达，如 pro-IL-1β、pro-IL-6 和 pro-TNF-α。而被激活的 NLR 如 Nalp3 炎性体可以进一步使炎性因子前体如 pro-IL-1β、pro-IL-18 成为成熟的 IL-1β 和 IL-18 并分泌到细胞外发挥作用。在这些炎性应答过程发生的同时，相关的负性调节机制也会被激活。实验研究表明：在 TLR4 信号通路上，人为加入 Gas6 可以明显抑制致炎性因子 IL-1β、IL-6 和 IL-12 的表达[69-70]。由于这些致炎性因子在维持扩大炎性反应，诱导心血管疾病以及调节适应性免疫应答方面都具有极为重要的作用，阻断这些前炎性因子的表达，同时也会缓解矽肺的病理损伤以及健康危害。因此，深入认识石英通过固有免疫系统诱发的炎性反应以及抑制该炎性反应的机制，可为我们今后阻断或者缓解矽肺发病提供新的思路。

参考文献

1. 中华人民共和国卫生部. 卫生部通报 2010 年职业病防治工作情况和 2011 年重点工作. 2011-04-18.
2. Leung C. C., Yu I. T., Chen W. Silicosis. Lancet, 2012, 379(9830): 2008-2018.
3. Kuhlmann U. C., Chwieralski C. E., Van Den Brule S., et al. Modulation of cytokine production and silica-induced lung fibrosis by inhibitors of aminopeptidase N and of dipeptidyl peptidase-IV-related proteases. Life Sci, 2009, 84(1-2): 1-11.
4. Rimal B., Greenberg A. K., Rom W. N. Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding. Curr Opin Pulm Med, 2005, 11(2): 169-173.
5. Pernis B. Silica and the immune system. Acta Biomed, 2005, 76 Suppl 2: 38-44.
6. Eisenbarth S. C., Flavell R. A. Innate instruction of adaptive immunity revisited: the inflammasome. EMBO Mol Med, 2009, 1(2): 92-98.
7. Li J., Wang X., Zhang F., et al. Toll-like receptors as therapeutic targets for autoimmune connective tissue diseases. Pharmacol Ther, 2013.
8. 王剑波, 索炜, 战锐, 等. 二氧化硅诱导的肺纤维化大鼠肺组织及血浆中热休克蛋白 70 的变化. 中华劳动卫生职业病杂志, 2012, 30(6): 428-431.
9. Pandey A., Chandra S., Chauhan L. K., et al. Cellular internalization and stress response of ingested amorphous silica nanoparticles in the midgut of Drosophila melanogaster. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830(1): 2256-2266.
10. Mathur S., Walley K. R., Wang Y., et al. Extracellular heat shock protein 70 induces cardiomyocyte inflammation and contractile dysfunction via TLR2. Circ J, 2011, 75(10): 2445-2452.
11. Cejudo-Guillen M., Ramiro-Gutierrez M. L., Labrador-Garrido A., et al. Nanoporous silica microparticle interaction with toll-like receptor agonists in macrophages. Acta Biomater, 2012, 8(12): 4295-4303.
12. Beamer C. A., Holian A. Silica suppresses Toll-like receptor ligand-induced

dendritic cell activation. FASEB J, 2008, 22(6): 2053-2063.

13. Cassel S. L., Eisenbarth S. C., Iyer S. S., et al. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(26): 9035-9040.

14. Kolb M., Margetts P. J., Anthony D. C., et al. Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. J Clin Invest, 2001, 107(12): 1529-1536.

15. Sime P. J., Marr R. A., Gauldie D., et al. Transfer of tumor necrosis factor-alpha to rat lung induces severe pulmonary inflammation and patchy interstitial fibrogenesis with induction of transforming growth factor-beta1 and myofibroblasts. Am J Pathol, 1998, 153(3): 825-832.

16. Zhao C., Liao J., Chu W., et al. Involvement of TLR2 and TLR4 and Th1/Th2 shift in inflammatory responses induced by fine ambient particulate matter in mice. Inhal Toxicol, 2012, 24(13): 918-927.

17. Trinchieri G., Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. Nat Rev Immunol, 2007, 7(3): 179-190.

18. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol, 2001, 1(2): 135-145.

19. Kumar H., Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 388(4): 621-625.

20. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C. A., Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature, 1997, 388(6640): 394-397.

21. Rock F. L., Hardiman G., Timans J. C., et al. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(2): 588-593.

22. Mccoy C. E., O'neill L. A. The role of toll-like receptors in macrophages. Front

Biosci, 2008, 13: 62-70.

23. Szatmary Z. Molecular biology of toll-like receptors. Gen Physiol Biophys, 2012, 31(4): 357-366.

24. Pone E. J., Xu Z., White C. A., et al. B cell TLRs and induction of immunoglobulin class-switch DNA recombination. Front Biosci, 2012, 17: 2594-2615.

25. Gururajan M., Jacob J., Pulendran B. Toll-like receptor expression and responsiveness of distinct murine splenic and mucosal B-cell subsets. PLoS One, 2007, 2(9): e863.

26. Babu S., Blauvelt C. P., Kumaraswami V., et al. Cutting edge: diminished T cell TLR expression and function modulates the immune response in human filarial infection. J Immunol, 2006, 176(7): 3885-3889.

27. Tabiasco J., Devevre E., Rufer N., et al. Human effector CD8+ T lymphocytes express TLR3 as a functional coreceptor. J Immunol, 2006, 177(12): 8708-8713.

28. Song D. H., Lee J. O. Sensing of microbial molecular patterns by Toll-like receptors. Immunol Rev, 2012, 250(1): 216-229.

29. Reis E Sousa C. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. Semin Immunol, 2004, 16(1): 27-34.

30. Piguet P. F., Vesin C., Grau G. E., et al. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra) prevents or cures pulmonary fibrosis elicited in mice by bleomycin or silica. Cytokine, 1993, 5(1): 57-61.

31. Ohe H., Takashiba S., Naruishi K., et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced and interleukin-1 beta (IL-1 beta)-induced shedding of TNF receptors from gingival fibroblasts. J Interferon Cytokine Res, 2000, 20(12): 1077-1082.

32. Saperstein S., Chen L., Oakes D., et al. IL-1beta augments TNF-alpha-mediated inflammatory responses from lung epithelial cells. J Interferon Cytokine Res, 2009, 29(5): 273-284.

33. Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. Science, 2003, 301(5633): 640-643.

34. Wang J., Hu Y., Deng W. W., et al. Negative regulation of Toll-like receptor signaling pathway. Microbes Infect, 2009, 11(3): 321-327.

35. Akira S., Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol, 2004, 4(7): 499-511.

36. O'neill L. A. TAMpering with toll-like receptor signaling. Cell, 2007, 131(6): 1039-1041.

37. Sakaguchi M., Murata H., Yamamoto K., et al. TIRAP, an adaptor protein for TLR2/4, transduces a signal from RAGE phosphorylated upon ligand binding. PLoS One, 6(8): e23132.

38. Basith S., Manavalan B., Govindaraj R. G., et al. In silico approach to inhibition of signaling pathways of Toll-like receptors 2 and 4 by ST2L. PLoS One, 6(8): e23989.

39. Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., et al. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. Nature, 2002, 420(6913): 324-329.

40. Fitzgerald K. A., Palsson-Mcdermott E. M., Bowie A. G., et al. Mal (MyD88-adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. Nature, 2001, 413(6851): 78-83.

41. Kawai T., Adachi O., Ogawa T., et al. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. Immunity, 1999, 11(1): 115-122.

42. Liew F. Y., Xu D., Brint E. K., et al. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. Nat Rev Immunol, 2005, 5(6): 446-458.

43. Hou B., Reizis B., Defranco A. L. Toll-like receptors activate innate and adaptive immunity by using dendritic cell-intrinsic and -extrinsic mechanisms. Immunity,

2008, 29(2): 272-282.

44. Akira S., Takeda K., Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol, 2001, 2(8): 675-680.

45. Banchereau J., Steinman R. M. Dendritic cells and the control of immunity. Nature, 1998, 392(6673): 245-252.

46. Magram J., Connaughton S. E., Warrier R. R., et al. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. Immunity, 1996, 4(5): 471-481.

47. 胡佳哲, 李云. Th1/Th2 失衡与疾病相关性的研究进展. 华西医学, 2009, 24(1): 236-237.

48. Schnare M., Barton G. M., Holt A. C., et al. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. Nat Immunol, 2001, 2(10): 947-950.

49. Huaux F. New developments in the understanding of immunology in silicosis. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2007, 7(2): 168-173.

50. 谢妮, 陈莹, 刘万洋, 等. γ-干扰素对染石英尘大鼠肺纤维化的影响. 中国公共卫生, 2004, 20(3): 314-315.

51. Barbarin V., Xing Z., Delos M., et al. Pulmonary overexpression of IL-10 augments lung fibrosis and Th2 responses induced by silica particles. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288(5): L841-848.

52. Sutterwala F. S., Ogura Y., Szczepanik M., et al. Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. Immunity, 2006, 24(3): 317-327.

53. Petrilli V., Dostert C., Muruve D. A., et al. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. Curr Opin Immunol, 2007, 19(6): 615-622.

54. 郭强, 孔毅荣, 付玲, 等. 炎性体研究进展. 军事医学科学院院刊, 2007, 31(5): 490-493.

55. Tschopp J., Martinon F., Burns K. NALPs: a novel protein family involved in

inflammation. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(2): 95-104.

56. Petrilli V., Papin S., Dostert C., et al. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. Cell Death Differ, 2007, 14(9): 1583-1589.

57. 周芸, 周婷, 郭嘉丽, 等. Nalp3 炎性体在矽尘致机体损伤中的作用研究. 中华劳动卫生职业病杂志, 2010, 28(10): 795-798.

58. Mariathasan S., Newton K., Monack D. M., et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. Nature, 2004, 430(6996): 213-218.

59. Yamamoto M., Yaginuma K., Tsutsui H., et al. ASC is essential for LPS-induced activation of procaspase-1 independently of TLR-associated signal adaptor molecules. Genes Cells, 2004, 9(11): 1055-1067.

60. Dinarello C. A. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. Ann N Y Acad Sci, 1998, 856: 1-11.

61. Kahlenberg J. M., Lundberg K. C., Kertesy S. B., et al. Potentiation of caspase-1 activation by the P2X7 receptor is dependent on TLR signals and requires NF-kappaB-driven protein synthesis. J Immunol, 2005, 175(11): 7611-7622.

62. Stutz A., Golenbock D. T., Latz E. Inflammasomes: too big to miss. J Clin Invest, 2009, 119(12): 3502-3511.

63. Cruz C. M., Rinna A., Forman H. J., et al. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. J Biol Chem, 2007, 282(5): 2871-2879.

64. Tschopp J., Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? Nat Rev Immunol, 2010, 10(3): 210-215.

65. Mills K. H., Dunne A. Immune modulation: IL-1, master mediator or initiator of inflammation. Nat Med, 2009, 15(12): 1363-1364.

66. Fernandez-Fernandez L., Bellido-Martin L., Garcia De Frutos P. Growth arrest-specific gene 6 (GAS6). An outline of its role in haemostasis and inflammation. Thromb Haemost, 2008, 100(4): 604-610.

67. Llacuna L., Barcena C., Bellido-Martin L., et al. Growth arrest-specific protein 6 is hepatoprotective against murine ischemia/reperfusion injury. Hepatology, 52(4): 1371-1379.

68. Marcandalli P., Gostissa M., Varnum B., et al. Identification and tissue expression of a splice variant for the growth arrest-specific gene gas6. FEBS Lett, 1997, 415(1): 56-58.

69. Rothlin C. V., Ghosh S., Zuniga E. I., et al. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. Cell, 2007, 131(6): 1124-1136.

70. Mansell A., Smith R., Doyle S. L., et al. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. Nat Immunol, 2006, 7(2): 148-155.

71. Martinon F., Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. Cell Death Differ, 2007, 14(1): 10-22.

72. Poyet J. L., Srinivasula S. M., Tnani M., et al. Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. J Biol Chem, 2001, 276(30): 28309-28313.

73. Kannan-Thulasiraman P., Shapiro D. J. Modulators of inflammation use nuclear factor-kappa B and activator protein-1 sites to induce the caspase-1 and granzyme B inhibitor, proteinase inhibitor 9. J Biol Chem, 2002, 277(43): 41230-41239.

74. Van De Veerdonk F. L., Joosten L. A., Shaw P. J., et al. The inflammasome drives protective Th1 and Th17 cellular responses in disseminated candidiasis. Eur J Immunol, 2011, 41(8): 2260-2268.

附 录

硕博研究生期间工作小结

（2009.9-2013.6）

一、参与的科研项目

1. 国家自然科学基金项目：Nalp3 炎性体在石英粉尘致纤维化中的作用及机制（30972451）（2010-2012）；

2. 国家重点基础研究发展计划项目（973）：空气颗粒物致健康危害的基础研究（2011CB503800）第 4 课题：空气颗粒物致呼吸系统早期损害的机制研究（2011CB503804）（2011-2013）；

3. 自然科学基金面上项目：神经原性炎症反应在石英致机体损伤早期的作用（30571553）（2009）；

4. 香港肺尘埃沉着病补偿基金会：矽尘作业工人医学监测性能及成本效果分析评估（2009-2012）；

5. 国际合作项目：含石英混合粉尘暴露工人矽肺与肺癌危险评价（与德国同业工会职业安全卫生研究所合作 2004-2006 BIA1074）（2009-2012）；

6. 国际合作项目：过滤式呼吸防护器密闭性影响因素研究（与美国国家职业安全卫生研究所合作）（2009-2012）。

二、参加会议

1. 2012.08　银川　　中华预防医学会第十二次全国劳动卫生与职业病学术会议

2. 2013.05　加拿大　2013 年美国工业卫生大会（AIHce2013），文章已接收

三、已完成的论文

1. **Jiali Guo**, Nali Gu, Jie Chen, Tingming Shi, Yun Zhou, Yi Rong, Ting Zhou, Wenxiang

Yang, Xiuqing Cui, Weihong Chen*. Neutralization of interleukin-1 beta attenuates silica-induced lung inflammation and fibrosis in C57BL/6 mice. Archives of toxicology. (On line, DOI 10.1007/s00204-013-1063-z)（署名单位为华中科技大学）

2. **Jiali Guo**, Tingming Shi, Yi Rong, Xiuqing Cui, Yun Zhou, Ting Zhou, Yuewei Liu, Weihong Chen*. The role of interleukin-1 beta in silica-induced cardiac and renal inflammatory and fibrotic responses in C57BL/6 mice. Particle and fibre toxicology. (Submitted) （署名单位为华中科技大学）

3. Ting Zhou, Yi Rong, Yuewei Liu, Yun Zhou, **Jiali Guo**, Wenjuan Cheng, Haijiao Wang, Weihong Chen*. Association between proinflammatory responses of respirable silica dust and adverse effects among dust-exposed workers. Journal of Occupational and Environmental Medicine, 2012, 54(4): 459-465.（署名单位为华中科技大学）

4. Yi Rong, Ting Zhou, Wenjuan Cheng, **Jiali Guo**, Yuewei Liu, Weihong, Chen*. Cytokine responses to two sizes silica particles in HUVECs—the effect of THP-1—derived mediators versus particles. Cardiovascular Toxicology. (Under Review)（署名单位为华中科技大学）

5. **郭嘉丽**，崔秀青，荣怿，周婷，周芸，章志红，古娜利，陈卫红*. 白介素-1β 在石英致小鼠肺纤维化中的作用研究. 中华劳动卫生职业病杂志.（已接收）（署名单位为华中科技大学）

6. 周芸，周婷，**郭嘉丽**，陈卫红*. Nalp3 炎性体在矽尘致机体损伤中的作用研究进展. 中华劳动卫生职业病, 2010，28(10): 795-798.（署名单位为华中科技大学）

7. 陈建文，周婷，荣怿，周芸，崔秀清，**郭嘉丽**，邓菁，田峰，陈卫红*. 金属矿山和陶瓷厂生产性粉尘的致炎性反应. 华中科技大学学报(医学版), 2012，41(03): 258-263.（署名单位为华中科技大学）

致 谢

值此毕业之际，回顾过去的四年研究生生活，心情无法平静。这四年中，我在学业上和生活中的诸多收获将会让我受益终生。

衷心感谢我的恩师陈卫红教授对我学业上的谆谆教导和生活上的悉心关怀。导师广博的学识和严谨的治学态度，使我在学术上得到了系统的训练与提高；导师兢兢业业的工作态度和恭敬谦和的处世方式让我在为人处事方面得到良好的熏陶；导师无惧于困难和坚忍不拔的进取精神更为我今后坚定地追求自己的梦想树立了良好的榜样。导师在这短短四年里教给我的东西必定会成我一生用之不尽的宝贵财富。

衷心感谢公共卫生学院邬堂春院长、彭开良教授、杨磊教授、袁晶教授、鲁文清教授、陈国元教授、刘克俭教授、郭欢教授、张晓敏教授、何美安教授、王正伦老师、汪利民老师、郑红艳老师、熊伟老师等在课题实施过程中给予的帮助与指导。感谢公共卫生学院欧阳宁慧老师在学习和生活中的关怀及帮助。

衷心感谢职业流行病研究室所有的同学这四年来的帮助与陪伴。在此向王海椒、刘跃伟、周婷、王丽华、翁少凡、程文娟、余艳艳、张浩、王松松、荣怿、黄希骥、古娜丽、易婉君、孙刚涛、宋远超、崔秀青、蒋璐蔓、郭彦君、张海、周芸、章志红、罗鑫、赖汉鹏等同学在我课题实施到论文完成过程中的帮助和鼓励表示真诚的谢意；特别感谢古娜丽、易婉君和周芸在实验过程中给予的帮助；特别感谢周芸、崔秀青和荣怿在文章撰写过程中给予的帮助。

衷心感谢湖北省疾病预防控制中心史廷明所长，孙凡中主任、杨文祥主任和张丽老师在课题实施过程中给予的指导和帮助。

衷心感谢中国医科大学陈杰教授、刘芳炜博士、宋来玉博士四年来在生活上的关心和实验及文章修改过程中的指导与帮助。尤其要感谢陈杰教授在我学习实验伊始给予的帮助和教导，在课题实施过程中给予的鼓励和指导以及在生活中给予的关心和引导。在此表示对陈杰教授最诚挚的谢意和最崇高的敬意。

衷心感谢澳大利亚迪肯大学曾超博士在英文文章写作过程中给予的无私帮助。

最后也要感激我的家人，父母的爱护、关心、支持和鼓励是我生命中最大的精神支柱和力量之源；姐姐和弟弟的牵挂、理解和支持让我在逆境中能无时不刻地感受到温暖，也让我在顺境中不会忘乎所以；爱人曾巍先生任劳任怨的付出和无微不至的关心让我更加感受到了生活的美好，坚定了克服困难的信心和决心！