

中图分类号: R135.2

学校代码: 10081

U D C:

密 级: 公开



硕 士 学 位 论 文

PPAR γ -LXR-ABCA1 信号通路对矽肺 巨噬细胞泡沫化作用的研究

论文作者: 徐秋敏

学生类别: 全日制学术型

学科专业: 公共卫生与预防医学

学位类别: 医学硕士

指导教师: 刘和亮 教授

唐山 华北理工大学

2020 年 6 月

**Study of PPAR γ -LXR-ABCA1 Signaling
Pathway on Foaming of Silicosis
Macrophages**

Dissertation Submitted to

North China University of Science and Technology

in partial fulfillment of the requirement

for the degree of

Master of Medicine

by

Xu Qiumin

(Public Health and Preventive Medicine)

Supervisor: Professor Liu Heliang

June, 2020

摘 要

目的 探讨 PPAR γ -LXR-ABCA1 在游离 SiO $_2$ 诱导的 U937 细胞泡沫化中的作用及机制。

方法 第一阶段实验, 将处于对数生长期的人淋巴组织瘤细胞 (U937 细胞), 使用 100 ng/mL 的豆蔻酸佛波醇乙酸酯 (PMA) 经过 48 小时诱导分化为 U937 源性巨噬细胞, 实验分为 5 个组: 空白对照组, 细胞不进行任何的处理; 25 μ g/mL SiO $_2$ 组, 给予 25 μ g/mL SiO $_2$ 组的培养基含终浓度为 25 μ g/mL 的 SiO $_2$ 培养基; 50 μ g/mL SiO $_2$ 组, 给予 50 μ g/mL SiO $_2$ 组的培养基含终浓度为 50 μ g/mL 的 SiO $_2$ 培养基; 100 μ g/mL SiO $_2$ 组, 给予 100 μ g/mL SiO $_2$ 组的培养基含终浓度为 100 μ g/mL 的 SiO $_2$ 培养基; 200 μ g/mL SiO $_2$ 组, 给予 200 μ g/mL SiO $_2$ 组的培养基含终浓度为 200 μ g/mL 的 SiO $_2$ 培养基, 培养 24、48 小时后, 通过蛋白质印迹法检测细胞中 LXR、ABCA1 表达的情况。第二阶段实验, 建立巨噬细胞泡沫化模型, 分为 4 个实验组: 空白对照组不给予任何的处理, SiO $_2$ 组给予终浓度为 50 mg/L 的 SiO $_2$ 悬液, ox-LDL 组给予终浓度为 50 mg/L 的 ox-LDL 的悬液, 50 mg/L SiO $_2$ 和 ox-LDL 的混悬液组给予终浓度 50 mg/L 的 SiO $_2$ 和 ox-LDL 的混悬液, 培养 48 h 后, 油红 O 染色法和胆固醇试剂盒观察肺泡巨噬细胞脂质蓄积情况; 蛋白质印迹法检测细胞中 LXR、ABCA1 的表达情况。第三阶段实验, 采用同样的方法建立泡沫细胞模型, 用基因沉默的方式使 LXR、ABCA1 低表达, 设立组别为对照组 (NC 组), SiLXR 组(沉默 LXR), 阴性对照组 (NC+50 mg/L SiO $_2$ 和 ox-LDL 的混悬液), SiLXR 实验组 (SiLXR+NC+50 mg/L SiO $_2$ 和 ox-LDL 的混悬液), 对于 ABCA1 同样设立为这四个组对照组 (NC 组)、SiABCA1 组(沉默 ABCA1)、阴性对照组 (NC+50 mg/L SiO $_2$ 和 ox-LDL 的混悬液)、SiABCA1 实验组 (SiABCA1+NC+50 mg/L SiO $_2$ 和 ox-LDL 的混悬液), 培养 48 h, 采用第二阶段的实验方法检测 LXR、ABCA1 表达变化及泡沫化情况。第四阶段实验, 采用激动剂的方法, 使 LXR 过表达, 设立组别为对照组 (DMSO 组), T0901317 组 (激动组), 模型组 (DMSO+50 mg/L SiO $_2$ 和 ox-LDL 的混悬液), 实验组 (T0901317+50 mg/L SiO $_2$ 和 ox-LDL 的混悬液), 每个组培养 48 h。使用与第二阶段相同的检测方法观察细胞泡沫化情况以及 LXR、ABCA1 的表达情况。

结果 1 蛋白印迹结果显示: 与对照组比较, SiO $_2$ 质量浓度为 50 μ g/mL 且刺激 48h 时, LXR、ABCA1 的表达最高 ($P<0.01$)。2 油红 O 染色结果显示, 与空白

对照组相比, 50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 混悬液组泡沫样变显著。3 与空白对照组比较, ox-LDL 对照组、50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 混悬液组细胞内 TC、FC 表达水平均升高 ($P < 0.01$), 且 CE 比重增加 ($P < 0.01$)。4 巨噬细胞 LXR 沉默后, 与 NC 组相比, 细胞中 LXR 的表达降低 ($P < 0.01$); 实验组 (SiLXR+NC+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 混悬液) 脂滴明显增加, 与阴性对照组 (NC+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 混悬液) 相比, 实验组细胞内 TC、FC 表达水平均升高 ($P < 0.01$) 且 CE 比重增加 ($P < 0.01$)。巨噬细胞 ABCA1 沉默后, 与 NC 组相比, 细胞中 ABCA1 的表达降低 ($P < 0.01$); 实验组 (SiABCA1+NC+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 混悬液) 脂滴明显增加, 与阴性对照组 (NC+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液) 相比, 实验组细胞内 TC、FC 表达水平均升高 ($P < 0.01$) 且 CE 比重增加 ($P < 0.01$)。5 激动 LXR 后, 与对照组 (DMSO 组) 相比, 细胞内 LXR 表达明显增加 ($P < 0.01$), 油红 O 染色结果显示, 实验组 (T0901317+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 混悬液) 细胞橘红色脂滴明显减少; 与模型组相比, 实验组细胞内 TC、FC 表达水平均降低 ($P < 0.01$) 且 CE 比重减少 ($P < 0.01$)。

结论 1 LXR、ABCA1 在巨噬细胞泡沫化过程中的表达发生变化。

2 LXR、ABCA1 参与巨噬细胞泡沫化过程且发挥一定的作用。

3 PPAR γ -LXR-ABCA1 参与调控矽肺巨噬细胞泡沫化。

图 20 幅; 表 19 个; 参 130 篇。

关键词: 泡沫细胞; LXR; ABCA1; 脂质代谢

分类号: R135.2

Abstract

Objective To investigate the role and mechanism of PPAR γ -LXR-ABCA1 in the foaming of U937 cells induced by free SiO $_2$.

Methods In the first phase of the experiment, human lymphoid histoma cells (U937 cells) in the logarithmic growth phase were induced to differentiate into U937-derived macrophages using 100 ng/ml phorbol myristate (PMA) over 48 hours. The experiment was divided into 5 groups: blank control group, without any treatment of the cells; 25 μ g/ml SiO $_2$ group, the medium of 25 μ g/ml SiO $_2$ group was given SiO $_2$ medium with a final concentration of 25 μ g/ml; 50 μ g/ml SiO $_2$ group, Give 50 μ g/ml SiO $_2$ group medium containing SiO $_2$ medium with a final concentration of 50 μ g/ml; 100 μ g/ml SiO $_2$ group, give 100 μ g/ml SiO $_2$ group medium containing SiO $_2$ medium with a final concentration of 100 μ g/ml; 200 μ g/ml SiO $_2$ group, the medium of 200 μ g/ml SiO $_2$ group contains SiO $_2$ medium with a final concentration of 200 μ g/ml. After 24 and 48 hours of culture, the expression of LXR and ABCA1 in the cells was detected by Western blotting. In the second stage of the experiment, a cell foam model was established and divided into 4 experimental groups: the blank control group was not given any treatment, the SiO $_2$ group was given a final concentration of 50 mg/L SiO $_2$ suspension, and the ox-LDL group was given a final concentration of 50 mg/L of ox-LDL suspension, 50 mg/L of SiO $_2$ and ox-LDL suspension group was given a final concentration of 50 mg/L of SiO $_2$ and ox-LDL suspension, after 48 h of culture, oil red O Staining method and cholesterol kit were used to observe the lipid accumulation of alveolar macrophages. Western blot was used to detect the expression of LXR and ABCA1 in the cells. In the third stage of the experiment, the same method was used to establish a foam cell model. LXR and ABCA1 were underexpressed by gene silencing. The groups were set as control group (NC group), SiLXR group (silent LXR), and negative control group (NC+50 mg/L SiO $_2$ and ox-LDL suspension), SiLXR experimental group (SiLXR+NC+50 mg/L SiO $_2$ and ox-LDL suspension), ABCA1 was also set up as a control group for these four groups (NC group), SiABCA1 group (silent ABCA1), negative control group (NC+50 mg/L SiO $_2$ and ox-LDL suspension), SiABCA1 experimental group (SiABCA1+NC+50 mg/L SiO $_2$ and ox-LDL (Suspension), cultured for 48 hours, and the second-stage experimental method was used to detect the changes in LXR and ABCA1 expression and foaming. In the fourth stage of the experiment, the agonist method was used to overexpress LXR. The control groups (DMSO group), T0901317 group (agonal group), and model group (DMSO+50 mg/L SiO $_2$ and ox-LDL mixed Suspension), experimental group (T0901317+50 mg/L SiO $_2$ and ox-LDL suspension), each group was cultured for 48h. The same detection method as in the second stage was used to observe the cellular foaming and the expression of LXR and ABCA1.

Results 1 Western blot results showed that compared with the control group, the expressions of LXR and ABCA1 were highest when the concentration of SiO $_2$ was 50 μ g/ml and stimulated for 48 hours ($P<0.01$). 2 The result of oil red O staining showed that compared with the blank control group, the foaming of the 50 mg/L SiO $_2$ and ox-LDL suspension groups became more significant. 3 Compared with the blank control group, the levels of TC and FC in cells in the ox-LDL control group and the 50 mg/L SiO $_2$ and ox-LDL suspension group increased ($P<0.01$), and the proportion of CE increased ($P<0.01$). 4 After LXR silencing of macrophages, compared with the NC group, the expression of LXR in the cells was reduced ($P <0.01$); in the experimental group (SiLXR+NC+50 mg

/ L SiO₂ and ox-LDL suspension), lipid droplets were obvious Compared with the negative control group (NC+50 mg/L SiO₂ and ox-LDL suspension), the levels of TC and FC expression in the experimental group increased ($P<0.01$) and the proportion of CE increased ($P<0.01$). After ABCA1 silencing of macrophages, compared with the NC group, ABCA1 expression in the cells decreased ($P<0.01$); in the experimental group (SiABCA1 +NC+50 mg/L SiO₂ and ox-LDL suspension), lipid droplets significantly increased Compared with the negative control group (NC + 50 mg / L SiO₂ and ox-LDL suspension), the levels of TC and FC expression in the experimental group increased ($P<0.01$) and the proportion of CE increased ($P<0.01$).). 5 After LXR activation, compared with the control group (DMSO group), the expression of LXR in the cells was significantly increased ($P<0.01$). Oil Red O results showed that the experimental group (T0901317+50 mg/L SiO₂ and ox-LDL suspension Liquid) cell orange lipid droplets were significantly reduced; compared with the model group, the levels of TC and FC expression in the cells of the experimental group were reduced ($P<0.01$) and the proportion of CE was reduced ($P<0.01$).

Conclusions 1 The expression of LXR and ABCA1 during the foaming process of macrophages changes. 2 LXR and ABCA1 participate in the foaming process of macrophages and play a certain role. 3 PPAR γ -LXR-ABCA1 is involved in the regulation of silicosis macrophage foaming.

Figure 20; Table 19; Reference 130

Keywords: Foam cells; LXR; ABCA1; fat metabolism

Chinese books catalog: R135.2

目 次

引 言	1
第 1 章 实验研究	3
1.1 材料与方法	3
1.1.1 实验材料	3
1.1.2 试验方法与步骤	5
1.2 结果	10
1.2.1 LXR、ABCA1 在 U937 细胞中的表达最明显的刺激浓度及时间	10
1.2.2 LXR、ABCA1 在泡沫细胞中的表达情况	13
1.2.3 LXR、ABCA1 在巨噬细胞中的调控作用	15
1.2.4 LXR、ABCA1 上下游关系	21
1.3 讨论	23
1.3.1 PPAR γ (过氧化物酶体增殖物激活型受体 γ)	24
1.3.2 LXR (肝 X 受体)	24
1.3.3 ABCA1 (巨噬细胞 ATP 结合转运体 A1)	25
1.4 结论	27
参考文献	27
结 论	31
第 2 章 综述	32
PPAR γ -LXR-ABCA1 信号通路与矽肺脂质代谢的关系	32
2.1 矽肺的国内外研究现状	32
2.2 矽肺的发病机制的学说	32
2.3 脂质代谢	33
2.4 与脂质代谢相关的受体	34
2.4.1 PPAR (过氧化物酶体增殖物激活受体)	34
2.4.2 LXR (肝 X 受体)	34
2.4.3 ABCA1 (三磷酸腺苷结合盒转运体 A1)	35
2.5 LXR-ABCA1 与矽肺泡沫细胞的关系	35
2.6 矽肺治疗的研究进展	36
2.6.1 抗纤维化的治疗	36

2.6.2 中药治疗	38
2.6.3 矽肺并发症及其治疗	39
2.6.4 其他方面的治疗	39
2.6.5 矽肺病防治的应用意义	41
参考文献	41
致 谢	48
在学期间研究成果	49

英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文全称
U937	Human lymphoma cells	人淋巴组织瘤细胞
FBS	Fetal calf serum	胎牛血清
LXR	Liver X receptor	肝 X 受体
ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1	三磷酸腺苷结合盒转运体 A1
Ox-LDL	Oxidized low density lipoprotein	氧化低密度脂蛋白
T0901317	Liver X receptor (LXR) agonist	肝 X 受体激动剂
Cocktail	Cocktail	蛋白酶抑制剂
PVC	Polyvinyl chloride	聚氯乙烯
LipofectamineTM2000	LipofectamineTM 2000	脂质体 LipofectamineTM2000
TC	Total cholesterol	总胆固醇
FC	Free cholesterol	游离胆固醇
CE	Cholesterol ester	胆固醇酯
AM	Macrophages	巨噬细胞
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay	放射免疫沉淀实验
AP	Ammonium persulfate	过硫酸胺
NC	Nitrocellulose filter membrane	硝酸纤维素膜
SDS	Dodecyl sulfate sodium salt	十二烷基硫酸钠
WB	Western blotting	蛋白质印迹技术
KDa	Kilodalton	千道尔顿
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺

引 言

矽肺是尘肺病的一种，其临床表现主要以慢性纤维化为主，是由于长期接触含游离二氧化硅（ SiO_2 ）粉尘所引起的全身性疾病。由于其发病机制不是十分清楚，目前临床上尚无确切的治愈方法。到目前为止，还没有发现可以延缓或逆转二氧化硅(SiO_2)造成的肺损伤的药物，也没有在降低其致残率和死亡率的药物方面取得突破，矽肺的防治仍是国际上的难题^[1]。因此，从更深入的层次去探究矽肺的发病机制，对于阻断或延缓矽肺发展的进程，具有十分重要的意义及应用价值。

由单核细胞分化而来的巨噬细胞吞噬大量氧化低密度脂蛋白(Oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)，使脂质聚集形成泡沫细胞，这一过程称为巨噬细胞泡沫化^[2]。巨噬细胞因脂质代谢紊乱产生的泡沫细胞在矽肺的炎症以及纤维化过程中扮演重要角色^[3]。有研究表明，控制泡沫细胞的形成可减少细胞自噬与凋亡，从而减缓矽肺病程进展^[4-5]。说明在矽肺的发生发展中，泡沫细胞的形成以及聚集占有重要的作用。

PPAR γ -LXR-ABCA1 信号通路代表了一种刺激胆固醇外流的方法^[6]，通过减少细胞内过多脂质的积累，有效缓解了矽肺发展进程，进而对探究矽肺的发病机制有重要的意义。肝 X 受体（Liver X receptor, LXR）是对胆固醇敏感的核受体而且在巨噬细胞胆固醇稳态中起关键作用。有研究表明激活 LXR 可改善巨噬细胞泡沫化中脂质蓄积并减慢动脉粥样硬化的进展^[7-8]。LXR 可以上调三磷酸腺苷结合盒转运体 A1（ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1）的表达，进而使胆固醇的排出增加，减少脂质的积累^[9]。下调 LXR 表达，胆固醇排出受损且促进了动脉粥样硬化的进展。LXR 对于细胞内胆固醇的调控主要是通过其下游的靶基因所实现的，其靶基因包括 ABCA1 以及 ABCG1，LXR 通过上调 ABCA1 基因的表达促使胆固醇外排，促进胆固醇逆向转运^[10]。巨噬细胞摄取或吸入过多的以 ox-LDL 为代表的胆固醇进而成为泡沫细胞，泡沫细胞在主动脉内膜中的积累是动脉粥样硬化发生和发展中的关键^[11]。通过血液循环将肝外细胞内的胆固醇转运到肝，在肝细胞中用于合成脂蛋白、胆汁酸、类固醇激素以及脂溶性维生素这一过程称为胆固醇逆向转运，是人体清除胆固醇的关键调节机制^[12-13]，ABCA1 和 ABCG1 是此过程中的关键角色。ABCA1 或 ABCG1 在巨噬细胞中表达增加会促进胆固醇外流并减少泡沫细胞中胆固醇的积累，上调 ABCA1 的表达可以减少泡沫细胞脂质的积累，从而减慢胆固醇促进动脉粥样硬化的进程^[14-17]。通过抑制 LXR 表达降低 ABCA1 的

表达，使细胞内胆固醇流出受阻，进而加重脂质的蓄积^[16]。有研究发现，在动脉粥样硬化疾病模型中，通过激活 PPAR γ -LXR-ABCA1 信号通路，可以减少泡沫化细胞的形成^[6]。最新的一些研究也发现激活这个通路可以使胆固醇外流^[9]。因此，我们推测 PPAR γ -LXR-ABCA1 可能通过影响肺泡巨噬细胞泡沫化来参与调节矽肺的发病进程。本文以游离 SiO₂ 诱导的 U937 细胞为实验材料，以通路上的不同受体为切入点，探讨 PPAR γ -LXR-ABCA1 在游离 SiO₂ 诱导的 U937 细胞泡沫化中的作用及机制，以期找到抑制泡沫细胞形成的关键作用靶点，从而延缓矽肺的发病进程，为矽肺治疗提供新的思路。

第 1 章 实验研究

1.1 材料与方法

1.1.1 实验材料

1) 细胞

实验所用的细胞为人淋巴组织瘤细胞 (Human lymphoma cells, U937) 经 PMA 诱导为巨噬细胞, U937 细胞为器官与纤维化组徐洪老师所赠与购自于中国科学院上海细胞库, 将事先配备好的含谷氨酸盐 (Glutamin)、丙酮酸钠 (Sodium Pyruvate) 两种盐的 1640 培养基, 恢复于室温, 将所用于复苏细胞的工具置于超净台里, 进行半个小时的紫外消毒, 提前打开水浴锅, 置于 37℃ 恒温, 然后将复苏好的细胞放置于细胞培养瓶中, 将复苏好的细胞置于显微镜下进行观察其是否为圆形、透亮且全悬浮于细胞培养基当中, 判断其细胞是否抱团、碎裂、形状变异、附着于细胞培养瓶的现象, 若细胞的状态良好, 则用 75% 的酒精在其瓶口处进行喷洒, 然后将其放入 37℃、体积分数为 5% 二氧化碳培养箱中孵育 48 h 后, 待细胞长满细胞培养瓶 3/4-4/5, 对细胞进行分瓶和冻存。

2) 使用试剂与来源

表 1 使用试剂与来源

试剂	公司名称
1640 培养基和胎牛血清	美国 Gibco 公司
Glutamin (谷氨酸盐)	中国赛默飞世尔科技有限公司
Sodium Pyruvate (丙酮酸钠)	中国赛默飞世尔科技有限公司
油红染液	北京普利莱基因技术有限公司
细胞固定液	北京普利莱基因技术有限公司
结晶型二氧化硅 (SiO ₂)	美国 sigma 公司
Ox-LDL	中国广州奕源生物有限公司
总胆固醇试剂盒	北京普利莱基因技术有限公司
游离胆固醇试剂盒	北京普利莱基因技术有限公司
LXR 抗体	英国 Abcam 公司
Gly	美国 Sigma-VE TEC
Tween-20	美国 Sigma-VE TEC
SDS	美国 Sigma-VE TEC
PBS 缓冲液	北京索莱宝科技有限公司
ECL 化学发光检测试剂盒	美国 affinity 公司

表 1 (续)

试剂	公司名称
ABCA1 抗体	美国 sigma 公司
聚氰基丙烯酸正丁酯 (BCA) 法蛋白定量试剂盒	中国联科生物技术有限公司
PMA	中国上海碧云天生物技术公司
RIPA	赛默飞世尔科技中国有限公司
苏木素染液 (Harris)	北京索莱宝科技有限公司
山羊抗兔二抗	中国上海碧云天生物技术公司
山羊抗鼠二抗	中国上海碧云天生物技术公司
辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白 (Immunoglobulin, IgG) 的二抗	中国上海碧云天生物技术公司
RFect 小核酸转染试剂	常州百代生物科技有限公司
小干扰 RNA	苏州吉玛基因有限公司
T0901317 (LXR 激动剂)	美国 sigma 公司
Marker	中国赛默飞世尔科技有限公司
NC 膜	上海爱必信生物科技有限公司
TEMED	美国 Sigma-VETEC
Tris-base	美国 Sigma-VETEC

3) 使用仪器与来源

表 2 使用仪器与来源

使用仪器	配制方法
二氧化碳恒温培养箱	美国 Thermo 公司
4℃冰箱	中国海尔集团
-80℃超低温冰箱	美国 Thermo 公司
电热恒温水浴锅	苏州江东精密仪器有限公司
自动制冰机	无锡杰瑞安仪器设备有限公司
常温低速离心机	德国艾本德仪器设备有限公司
4℃离心机	德国 Eppendorf 公司
电泳仪	美国 BIO-RAD 公司
倒置显微镜	上海蔡康仪器厂

4) 实验使用溶液配制方法

(1) 培养基成分: ①1640 培养基体积分数为 87.00%; ②Glutamin (谷氨酸盐) 体积分数为 1.00%; ③Sodium Pyruvate (丙酮酸钠) 1.00%; ④FBS 5 mL ⑤双抗 1.00%。

(2) 1×TBST 缓冲: 量取 100 mL 10×TBS 缓冲液和 900 mL 超纯水, 完全混匀后加 500 μL Tween-20, 震荡均匀, 室温存放。

(3) 1%丽春红染液: 丽春红粉末 0.1 g, 5%乙酸 5 mL, 然后用纯水定容为

100 mL。

(4) PBS 溶液：将 PBS 粉末（2 L/袋）溶于 2 L 超纯水中，置于自动压力蒸汽灭菌器中灭菌后 4℃冰箱保存备用。

(5) 10×TBS 缓冲液（PH=7.6）：称取 12.19 g Tris 粉末，88g NaCl 粉末溶于 800 mL 超纯水中，调节 PH 至 7.6，定容至 1000 mL，储存在 4℃冰箱中以备用。

(6) 5×电泳缓冲液：称取 93.8 Gly 粉末、15.1 g Tris base 粉末，5 g SDS 粉末于 800 mL 超纯水中完全溶解后，定容至 1000 mL，4℃冰箱保存备用。

(7) 4×电转液：称取 57.6 Gly 粉末、12.1 g Tris base 粉末，超纯水定容至 1000 mL，用时配为 1×电转：100 mL 4×+80 mL 甲醇+220 mL 超纯水，现用。

(8) 1×电泳缓冲液：称取 14.4 Gly 粉末、3.03 g Tris base 粉末，1 g SDS 粉末于 800 mL 超纯水中完全溶解后，定容至 1000 mL，4℃冰箱保存备用。

(9) 质量分数为 10%的 SDS：称取 5 g SDS 粉末，加入 40 mL 的超纯水，68℃高温完全溶解后定容到 50 mL，室温保存备用。

(10) 质量分数 7.5%的封闭液：称取 7.5 g Skim Milk 固体粉末，溶于 100 mL TBST 中，震荡混匀，现用现配。

(11) 质量分数为 10% 的 AP：1 mL 超纯水和 0.1 g AP 粉末完全溶解后置于 4℃冰箱保存 1 周，-20℃可保存一个月。

(12) 4×上样缓存液：1 M Tris-HCl 为 2 mL，甘油 4 ml，SDS 0.8 g，水 2 mL，溴酚蓝 0.04 g，使用之前加入 DTT 2 mL。

1.1.2 试验方法与步骤

1) 细胞培养

(1) U937 细胞诱导：将浓度为 100 微克每毫升（ μM ）的 PMA 与培养基以 1:1000 的比例加入到六孔板里进行诱导，时间为 48 小时。U937 细胞正常形态为圆形，经 PMA 诱导后细胞贴壁，并长出伪足。

(2) U937 细胞换液：将用于换液的工具如细胞培养瓶、无菌枪头、一次性移液管、封口膜等提前放入超净台中，紫外照射 30 分钟。打开 37℃恒温水浴锅将完全培养基置于其中孵育数分钟，再将细胞从孵育箱中拿出来，瓶口周围用酒精进行消毒，然后放置在倒置显微镜下观察细胞形态是否为圆形且透亮，培养基是否混浊，有无细胞成团聚集、变形等异常现象，在超净台中，用无菌 1 mL 枪头轻轻吹打细胞培养瓶瓶底，使细胞均匀悬浮于培养基中，用一次性无菌移液管将含有

细胞的培养基吸入到 15 mL 无菌离心管，盖好瓶盖放在离心机里以恒定 800 转速，离心 5 min 后，将离心好的培养基上清倒掉，将新配好的 4 mL 培养基加入到离心管里，使细胞在离心管中充分混匀，用无菌的枪头吸入至细胞培养瓶，于 37℃，5%CO₂ 孵育箱中进行培养。

(3) U937 传代：将用于传代的工具如细胞培养瓶、无菌枪头、一次性移液管、封口膜等提前放入超净台中，紫外照射 30 分钟。在显微镜下观察从恒温孵育箱中拿出的细胞，待细胞铺满培养瓶瓶底的 3/4-4/5 时，在超净台里将装有细胞的培养瓶充分混匀后倒入至 50 mL 无菌离心管，离心机以恒定 800 转速，离心 5 min 后，将离心好的培养基上清倒掉，加入 3 mL 1640 完全培养基，使细胞在离心管充分混匀，将混匀的细胞均分至 3 个培养瓶，每个培养瓶补培养基 3 mL，于 37℃，5%CO₂ 孵育箱中进行培养。

(4) U937 细胞保存：将用于传代的工具如细胞培养瓶、无菌枪头、一次性移液管、封口膜等提前放入超净台中，紫外照射 30 分钟。从孵育箱中拿出的细胞，倒置显微镜下观察细胞长满培养瓶瓶底的 3/4-4/5 时，在超净台里将装有细胞的培养瓶充分混匀后倒入 15 mL 无菌离心管，离心机以恒定 800 转速，离心 5 min 后，将离心好的培养基上清倒掉，充分混匀，放入到存放细胞的管里，将小管的瓶口封好，避免冻存污染，将细胞的名称、日期、代数依次写在瓶体上。置于存放在负 80℃ 的橙色冻存盒，24 h 后放进液氮罐保存。

(5) U937 细胞复苏：将用于传代的工具如细胞培养瓶、无菌枪头、一次性移液管、封口膜等提前放入超净台中，紫外照射 30 分钟。在 37℃ 恒温水浴锅里快速转动在液氮里储放的细胞，使细胞充分混匀后加入 1 mL 完全培养基，以恒定的转速离心，放入到细胞培养瓶当中，两天后换新的培养基。

2) 实验分组

取对数生长期人淋巴组织瘤细胞 (U937)，根据实验不同的要求进行接板，用浓度为 100 微克每毫升 (μM) 的 PMA 诱导分化为巨噬细胞，培养 48 h 后，实验主要分为以下四个阶段：

(1) 最佳的刺激浓度及刺激时间分为 5 组：空白对照组，细胞不进行任何的处理；25 μg/mL SiO₂ 组，给予 25 μg/mL SiO₂ 组的培养基含终浓度为 25 μg/mL 的 SiO₂ 培养基；50 μg/mL SiO₂ 组，给予 50 μg/mL SiO₂ 组的培养基含终浓度为 50 μg/ml 的 SiO₂ 培养基；100 μg/mL SiO₂ 组，给予 100 μg/mL SiO₂ 组的培养基含终浓度为 100 μg/mL 的 SiO₂ 培养基；200 μg/mL SiO₂ 组，给予 200 μg/mL SiO₂ 组的培养基含终浓度为 200 μg/mL 的 SiO₂ 培养基。分别培养 24 和 48 h。

(2) 泡沫细胞中 LXR、ABCA1 的表达变化分为 4 个组：空白对照组不给予任何的处理，SiO₂ 组给予终浓度为 50 mg/L 的 SiO₂ 悬液，ox-LDL 组给予终浓度为 50 mg/L 的 ox-LDL 的悬液，50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组给予终浓度 50 mg/L 的 SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液，分别培养 48 h。

(3) LXR、ANCA1 基因沉默分为 4 个组：对照组（NC 组），SiLXR 组（沉默 LXR），阴性对照组（NC+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液），SiLXR 实验组（SiLXR+NC+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液），对于 ABCA1 同样设立为这四个组对照组（NC 组）、SiABCA1 组（沉默 ABCA1）、阴性对照组（NC+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液）、SiABCA1 实验组（SiABCA1+NC+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液），培养 48 h。

(4) 激动 LXR 分为 4 各组：对照组（DMSO 组）巨噬细胞予以等体积 DMSO，T0901317 组（激动组），模型组（DMSO+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液），实验组（T0901317+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液），每个组培养 48 h。

3) 油红 O 染色

将肺泡巨噬细胞以密度为 2×10^{10} /L 接种于预先放有无菌盖玻片的 24 孔板内，按照实验分组（2）（3）（4）组别施加不同处理后，弃去旧培养基，用 PBS 洗 3 次，每次 1 min，加入细胞固定液，固定 20 min；PBS 洗 3 次，每次 1 min；以体积分数为 0.50% 油红 O 工作液染色 20 min；以体积分数为 0.50% 油红 O 工作液染色 40 min；PBS 洗 3 次，每次 1 min；苏木素染 3 min，体积分数 1.00% 的盐酸酒精分化 10 s，水洗返蓝 30 min；甘油明胶封片。将封好的载玻片置于显微镜下观察，肺泡巨噬细胞细胞核染为蓝色，脂质染为橘红色。

4) 总胆固醇、游离胆固醇以及胆固醇酯的检测

(1) 将肺泡巨噬细胞以密度为 2×10^{11} /L 接种于 6 孔板内，按照实验分组（2）（3）（4）进行分组处理后，弃上清，PBS 漂洗 2 次，在孔板内加入 100 μ L 的细胞裂解液，在无菌的实验台上静置 10 min 后收集细胞；以恒定 2000 离心力（离心半径为 10 cm），离心 5 min 后；将澄清的上清液吸走，用 BCA 蛋白定量试剂盒检测总蛋白表达水平，按照胆固醇试剂盒说明书检测细胞内总胆固醇（Total Cholesterol, TC）和游离胆固醇（Free Cholesterol, FC）表达水平，计算细胞内胆固醇酯（cholesteryl ester, CE）比重 $[CE\% = (TC - FC) / TC]$ ；若 $CE\% > 50.00\%$ ，则认为细胞发生泡沫化，有泡沫细胞产生^[18]。

(2) BCA 法蛋白定量对胆固醇含量进行校正：将标准蛋白原液，稀释为以下

梯度 500 $\mu\text{g/mL}$ 、400 $\mu\text{g/mL}$ 、300 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 、0 $\mu\text{g/mL}$ 为标准蛋白。将浓度为 20 $\mu\text{L/孔}$ 的标准蛋白、目的蛋白加入到 96 孔板，两种不同的工作液 A 与 B 以 50:1 充分混合，200 $\mu\text{L/孔}$ 加入到孔板中，每组做 3 个副孔，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min，选取波长为的 562 nm OD 值；用 Excel 表格绘制标准蛋白曲线，求出目的样品的校正蛋白浓度。

(3) TC (或 FC) 表达水平 ($\mu\text{g/mg}$) = TC (或 FC) 浓度 ($\mu\text{M/mL}$) / 细胞蛋白浓度 (mg/ml) $\times 386$ (g/Mol)； $\text{CE}\% = (\text{TC}-\text{FC}) / \text{TC} \times 100\%$ ，若 $\text{CE}\% > 50\%$ ，则认为巨噬细胞转变为泡沫细胞^[19]。

5) 免疫印迹法检测 LXR、ABCA1 蛋白在细胞内的表达水平

准备无菌的 6 孔板，每孔接种密度为 2×10^{11} 个/L 的巨噬细胞，按照实验分组 (1) (2) (3) (4) 处理后，弃上清，PBS 漂洗 2 次，加入 100 $\mu\text{L/孔}$ 的 RIPA 细胞裂解液在冰上裂解 30 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min (离心半径为 10 cm) 离心 15 min，取含有总蛋白的上清液。总蛋白提取物定量后，不同蛋白浓度用裂解液稀释为相同浓度，加入 5 \times 上样缓冲液，混匀并煮沸 5 min，-40 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

(1) 制备 SDS-PAGE 凝胶：向用夹子固定好的玻璃板里注入超纯水观看是否有水从缝隙里流出，若无水从缝隙间流出，用吸水纸将粘在玻璃板壁的水滴吸干。

(2) 根据表 3 中的配方以及目的蛋白分子量要求制备分离胶，将表中所需的各种制胶成分充分混匀，防止凝结及时注入夹好的玻璃板中，约占整版玻璃的 3/4；然后用纯水补齐玻璃板口充分将分离胶压齐，放至常温 15 min 后，观察随之的胶是否凝结，若凝结将用压齐分离胶的水倒出，将粘壁的水珠吸干。

表 3 分离胶和浓缩胶的配制方法

试剂名称	8%分离胶 (10 mL)	10%分离胶 (10 mL)	15%分离胶 (8 mL)	5%浓缩胶 (4 mL)
超纯水 (mL)	4.6	4.0	1.8	2.7
30%Acr-Bis (mL)	2.7	3.3	4.0	0.67
1.5MTris-HCl (mL)	2.5	2.5	2.0	0
1.0MTris-HCl (mL)	0	0	0	0.5
10%SDS (mL)	0.1	0.1	0.08	0.04
10%AP (mL)	0.1	0.1	0.08	0.04
TEMED (mL)	0.008	0.007	0.0032	0.004

(3) 将根据需求配置好的 5%浓缩胶充分混匀补齐至上方空出的玻璃板，快速插入干净的齿梳。常温放置约 15-30 分钟后，等浓缩的凝胶完全凝结。

(4) 蛋白上样：根据不同的实验分组将算好的上样体积的蛋白加入到不同的齿梳中，首先上好 Marker，在其旁边依次上好目的蛋白，体积控制均匀，避免上

样过多。

(5) 蛋白电泳：提前检查电泳仪并设置好所需要的电压，在恒定电压 90 V 的条件下进行电泳，样品在浓缩胶与分离胶交界处更换 120 V 继续电泳，在电泳的过程中及时观察是否跑齐，根据是否成一条直线及时调整时间以及电压。根据自己待测蛋白分子量观察蛋白标准品彩色条带分离情况决定终止时间，时间约 90 min，将电泳仪的开关关掉。不同蛋白所示位置不同，根据标准品留取好自己所需要的目的蛋白。

(6) 转膜：将转膜好的整片胶放入到提前配好的电转液中，用直尺量好长宽裁取相应的 NC 膜并同样将其浸湿在电转液当中。其他工具同样浸湿在电转液中，将浸湿的湿转夹放入湿式转印槽，在槽中加满电转液且及时给外槽进行降温。连接转印槽的正负极，设置工作条件为恒流 220 mA，时间 90 min。

(7) 膜的密封和丽春红染色：在湿转夹中取出整片的 NC 膜放置于配置好的丽春红染液中，待染液全覆盖整片膜后用超纯水及时清洗膜，根据不同的目的蛋白剪裁好条带，放置于用 TBST 制备的 7.5% 脱脂奶粉封闭溶液中在摇床上缓慢摇动 3-4 小时，以便去掉蛋白的背景，使蛋白条带染色效果达到最佳。

(8) 抗体孵育：待封闭完成后用 TBST 洗 3 次，每次 10 min。将裁好的不同的条带用封膜机器四周封好留有一小口用枪头将提前稀释好的一抗 LXR、ABCA1、GAPDH 分别稀释为 1:2000、1:1000、和 1:6000 注入里，用封膜机器将小口及时封好。将封好的条带放一个小盒子里放入冰箱 4 °C 冰箱过夜。第二天回收膜里的一抗，将条带加入到装有 TBST 溶液的孵育盒中清洗 3 次，每次 10 min。吸干净 TBST 溶液后把山羊抗兔 IgG (1: 6000) 二抗加入到孵育盒中，在常温条件下摇床孵育 50 min。摇床孵育完毕后重复清洗三次。

(9) 显色：将显色剂 ECL 试剂盒里两种液体以 1:1 混匀配成显色液，即配即用，注意避光保存。用镊子夹住膜甩掉上面残留的 TBST 溶液，放置在凝胶成像仪的显色板上，在显色的条带上均匀涂抹显色液进行显影，及时调整好曝光的时间，终止显影，保存结果并进行分析。Image J 软件检测 LXR、ABCA1 的相对表达量。实验重复 3 次。

6) 统计分析

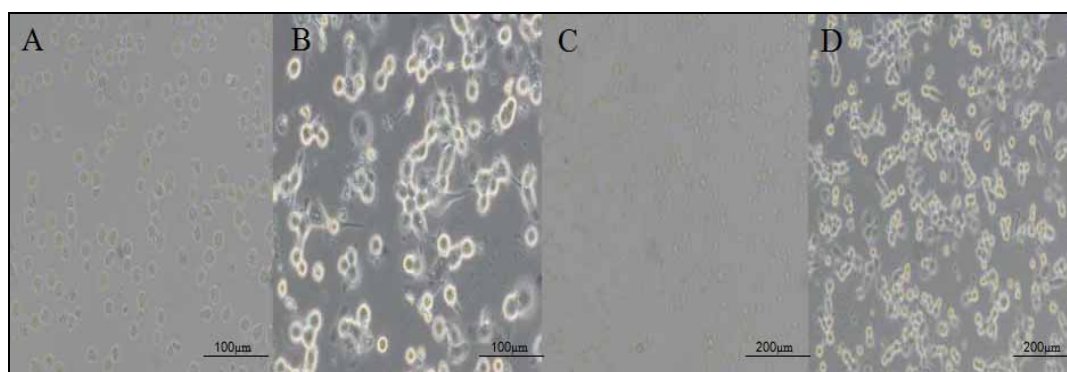
应用 SPSS 22 统计软件进行统计分析，实验结果以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 形式表示。多组样本均数的比较采用单因素方差分析 (one way ANOVA)；每两组间进行两两比较，检测的数据经方差齐性检验方差齐则采用 LSD 方法，方差不齐则采用 Games-Howell 进行检验。 $P < 0.05$ ，可认为各组组间的比较具有统计学意

义；检验水准 $\alpha=0.05$ 。

1.2 结果

1.2.1 LXR、ABCA1 在 U937 细胞中的表达最明显的刺激浓度及时间

1) 正常 U937 细胞形态为圆形且全悬浮于培养基中，经 PMA 诱导 48 h 后，细胞贴壁，并长出伪足。见图 1



注：A-常规培养 x200；B-诱导 48 h x200；C-常规培养 x100；D-诱导 48 h x100。

图 1 不同倍镜下巨噬细胞正常及诱导情况

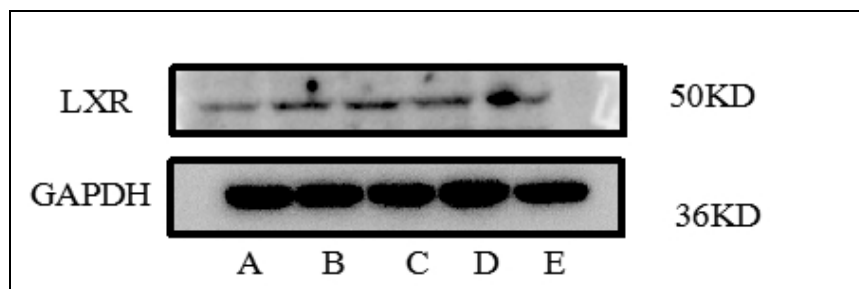
2) 在不同浓度的二氧化硅刺激后，25 $\mu\text{g/mL}$ SiO_2 组、50 $\mu\text{g/mL}$ SiO_2 组、100 $\mu\text{g/mL}$ SiO_2 组以及 200 $\mu\text{g/mL}$ SiO_2 组的蛋白表达情况具有统计学意义，其中与对照组相比 50 $\mu\text{g/mL}$ SiO_2 组细胞表达最高 ($P<0.05$)，100 $\mu\text{g/mL}$ SiO_2 组蛋白相对表达水平降低。结合本课题组前期实验结果，用于后续实验的 SiO_2 的质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 。结果见表 4-7 图 2-5。

表 4 不同浓度 SiO_2 刺激 24 h 细胞中 LXR 的表达情况

组别	实验次数	细胞中 LXR 的表达情况
空白对照组	3	0.36 \pm 0.07
25 $\mu\text{g/mL}$ SiO_2 组	3	0.69 \pm 0.07
50 $\mu\text{g/mL}$ SiO_2 组	3	0.72 \pm 0.16 ^a
100 $\mu\text{g/mL}$ SiO_2 组	3	0.60 \pm 0.05
200 $\mu\text{g/mL}$ SiO_2 组	3	0.78 \pm 0.02
<i>F</i>		11.229
<i>P</i>		0.001

注：a：与对照组相比， $P<0.05$ 。

Western blot 结果如图 2 显示，通过筛选不同浓度的 SiO₂ 刺激 U937 细胞 24 h 后与对照组相比，50 μg/mL SiO₂ 组 LXR 表达增多，且差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。



注：A-空白对照组；B-25 μg/mL SiO₂ 组；C-50 μg/mL SiO₂ 组；D-100 μg/mL SiO₂ 组；E-200 μg/mL SiO₂ 组。

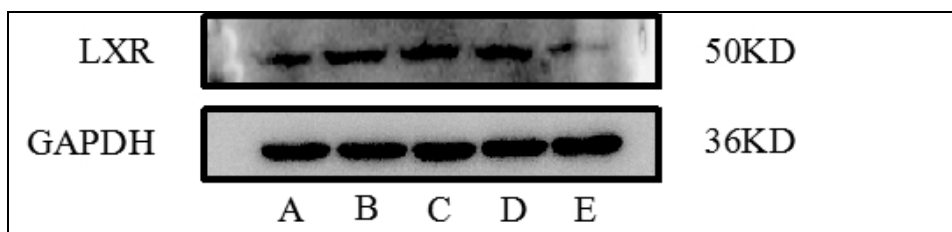
图 2 LXR 在 U937 细胞中表达的情况

表 5 不同浓度 SiO₂ 刺激 48 h 细胞中 LXR 的表达情况

组别	实验次数	细胞中 LXR 的表达情况
空白对照组	3	0.79 ± 0.04
25 μg/mL SiO ₂ 组	3	1.01 ± 0.06
50 μg/mL SiO ₂ 组	3	1.19 ± 0.08 ^a
100 μg/mL SiO ₂ 组	3	1.11 ± 0.02
200 μg/mL SiO ₂ 组	3	0.52 ± 0.13
<i>F</i>		39.440
<i>P</i>		0.000

注：a: 与对照组相比， $P < 0.05$ 。

Western blot 结果如图 3 显示，在用不同浓度的 SiO₂ 刺激 U937 细胞 48 h 后与对照组相比，50 μg/mL SiO₂ 组 LXR 蛋白相对表达水平升高，且差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。与用不同浓度的 SiO₂ 刺激细胞 24 h 相比，在对细胞进行刺激 48 h 蛋白的相对效果最佳，LXR 的表达相对明显且差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。后续实验用于刺激的最佳时间都选为 48 h，SiO₂ 浓度为 50 μg/mL。



注：A-空白对照组；B-25 μg/mL SiO₂ 组；C-50 μg/mL SiO₂ 组；D-100 μg/mL SiO₂ 组；E-200 μg/mL SiO₂ 组。

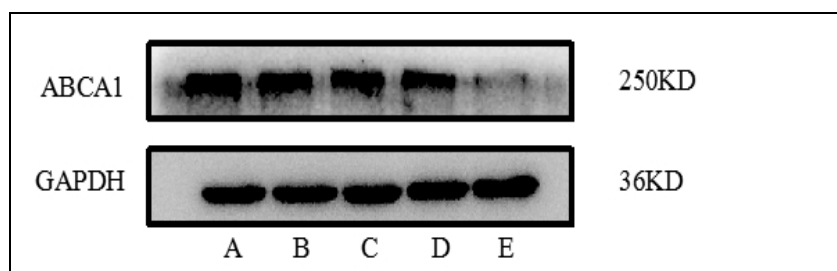
图 3 LXR 在 U937 细胞中表达的情况

表 6 不同浓度 SiO₂ 刺激 24 h 细胞中 ABCA1 的表达情况

组别	实验次数	细胞中 ABCA1 的表达情况
空白对照组	3	1.05±0.02
25 μg/mL SiO ₂ 组	3	0.92±0.02
50 μg/mL SiO ₂ 组	3	0.91±0.04 ^a
100 μg/mL SiO ₂ 组	3	0.75±0.02
200 μg/mL SiO ₂ 组	3	0.19±.046
<i>F</i>		349.533
<i>P</i>		0.000

注: a: 与对照组相比, $P < 0.05$ 。

Western blot 结果如图 4 显示, 在用不同浓度的 SiO₂ 刺激 U937 细胞 24 h 后与对照组相比, 50 μg/mL SiO₂ 组 ABCA1 表达增多, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。



注: A-空白对照组; B-25 μg/mL SiO₂ 组; C-50 μg/mL SiO₂ 组; D-100 μg/mL SiO₂ 组; E-200 μg/mL SiO₂ 组

图 4 ABCA1 在 U937 细胞中表达的情况

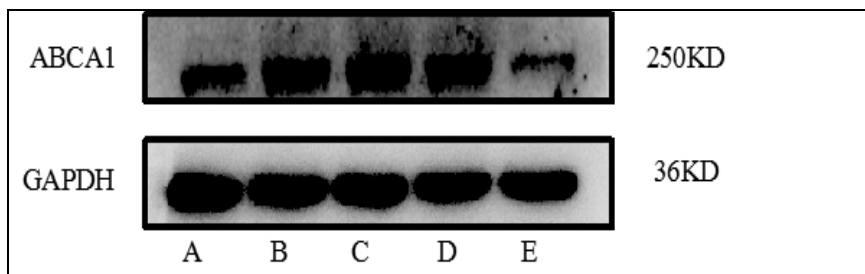
表 7 不同浓度 SiO₂ 刺激 48 h 细胞中 ABCA1 的表达情况

组别	实验次数	细胞中 ABCA1 的表达情况
空白对照组	3	0.61±0.01
25μg/mL SiO ₂ 组	3	0.93±0.02
50μg/mL SiO ₂ 组	3	1.02±0.01 ^a
100μg/mL SiO ₂ 组	3	1.09±0.00 ^a
200μg/mL SiO ₂ 组	3	0.50±0.02
<i>F</i>		987.750
<i>P</i>		0.000

注: a: 与对照组相比, $P < 0.05$ 。

Western blot 结果如图 5 显示, 在用不同浓度的 SiO₂ 对 U937 细胞进行刺激 48 h 后与对照组相比, 50 μg/mL SiO₂ 组 ABCA1 蛋白相对表达水平增多, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。与用不同浓度的 SiO₂ 刺激细胞 24 h 相比, 在对 U937

细胞进行刺激 48 h 时的蛋白相对表达水平最佳，ABCA1 的表达相对明显且差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。后续实验用于刺激的最佳时间皆选为 48 h，SiO₂ 浓度为 50 μg/mL。



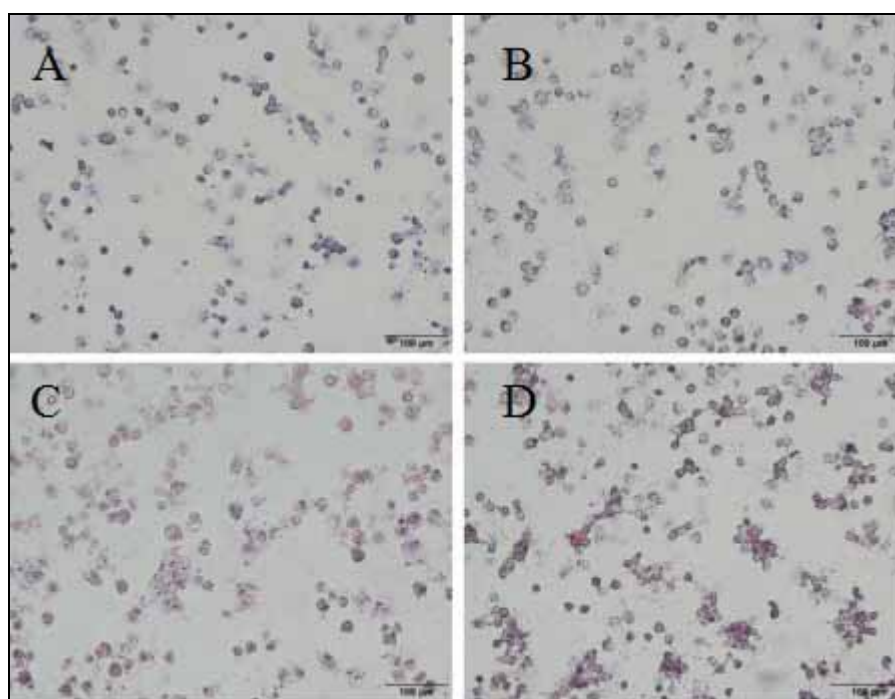
注：A-空白对照组；B-25 μg/mL SiO₂ 组；C-50 μg/mL SiO₂ 组；D-100 μg/mL SiO₂ 组；E-200 μg/mL SiO₂ 组。

图 5 ABCA1 在 U937 细胞中表达的情况

1.2.2 LXR、ABCA1 在泡沫细胞中的表达情况

1) 巨噬细胞的油红 O 染色情况和脂质表达情况

与空白对照组相比较，50 mg/L SiO₂ 组、ox-LDL 组、50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组 TC、FC 和 CE 增多 ($P < 0.05$) 50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组 CE% > 50.00%，细胞内橘色脂滴蓄积明显，提示泡沫细胞形成，且 SiO₂ 加剧了细胞泡沫化。见图 6。



注：A-空白对照组；B-50 mg/L SiO₂ 组；C-ox-LDL 组；D-50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组。

图 6：各组肺泡巨噬细胞油红 O 染色情况 (x200)

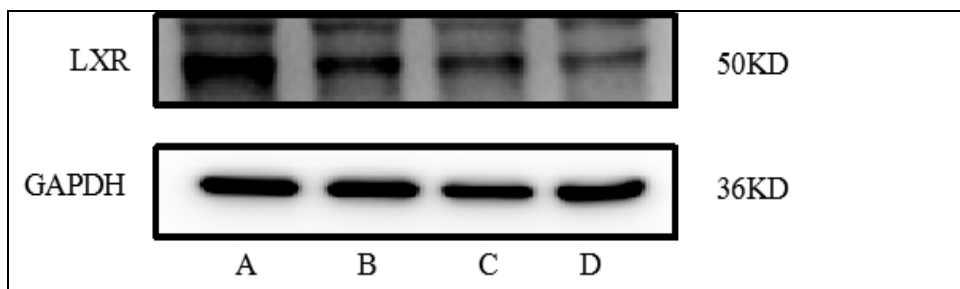
表 8 细胞内 TC、FC 以及 CE 表达变化水平 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	TC 值 (mg/g)	FC 值 (mg/g)	CE 值	CE 值/TC 值
空白对照组	73.80±1.69	61.79±1.45	12.01±0.25	16.27
50 mg/L SiO ₂ 组	114.89±3.39	77.97±1.28	36.93±2.22	32.12
ox-LDL 组	171.63±2.93 ^a	94.42±0.84 ^a	77.21±3.77 ^a	44.97 ^a
SiO ₂ 和 ox-LDL 的 混悬液组	222.99±4.40 ^{ab}	113.95±1.74 ^{ab}	109.04±3.38 ^{ab}	48.89 ^{ab}
<i>F</i>	1205.67	802.542	723.509	735.771
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: a: 与对照组比, $P<0.01$; b: 与 ox-LDL 对照组比, $P<0.05$ 。

2) 肺泡巨噬细胞中 LXR、ABCA1 的表达情况

50 mg/L SiO₂ 组、ox-LDL 组、50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组肺泡巨噬细胞中 LXR、ABCA1 的均低于空白对照组, 50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组均低于 ox-LDL 组, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。见图 7、图 8。



注: A-空白对照组; B-50 mg/L SiO₂ 组; C-ox-LDL 组; D-50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组。

图 7 LXR 在 U937 细胞中表达的情况



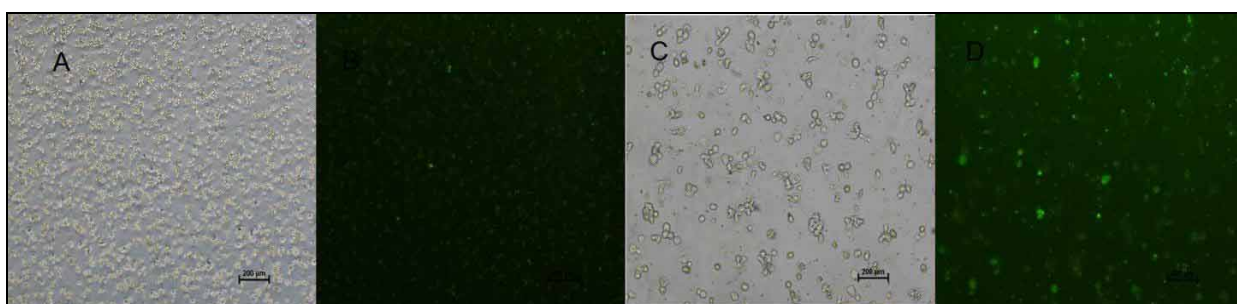
注: A-空白对照组; B-50 mg/L SiO₂ 组; C-ox-LDL 组; D-50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组。

图 8 LXR 在 U937 细胞中表达的情况

1.2.3 LXR、ABCA1 在巨噬细胞中的调控作用

1) U937 细胞转染效率

将带有荧光信号的小干扰 RNA 转染到细胞中，通过荧光显微镜进行观察可以对转染试剂的效率以及细胞对转染试剂的耐受能力做一下初步的评估。见图 9。

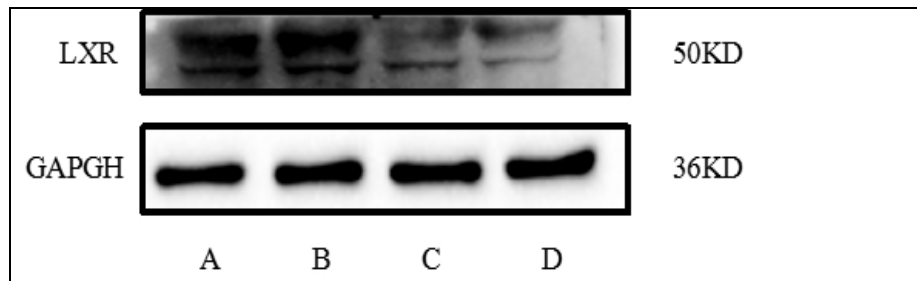


注：A/C-不同视野为完全培养基所培养的正常状态下细胞； C/D-不同视野下转染后荧光信号进入细胞里的程度。

图 9 U937 细胞的转染效率

2) LXR 基因沉默模型的建立

(1) LXR 不同基因位点的沉默情况如图 10。



注：A-NC 组； B-LXRSiRNA1； C-LXRSiRNA2； D-LXRSiRNA3。

图 10 LXR 不同基因位点沉默情况

表 9 LXR 不同基因位点的沉默情况

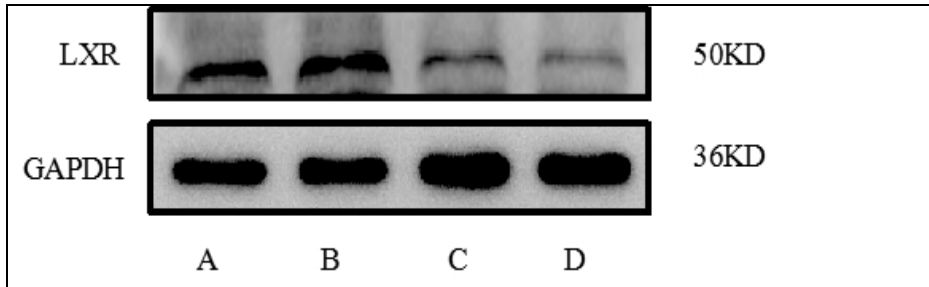
分组	n	LXR 基因沉默情况
阴性对照组 (NC 组)	3	1.40±0.04
LXRSiRNA1 组	3	1.45±0.05
LXRSiRNA2 组	3	0.97±0.06 ^a
LXRSiRNA3 组	3	0.67±0.06 ^b
<i>F</i>		139.467
<i>P</i>		<0.01

注：a：与对照组比， $P < 0.05$ ； b：与对照组相比， $P < 0.05$ 。

通过对比分析 LXR 不同基因位点的沉默情况，得出 LXR 基因的最佳沉默位

点，后续的实验研究均选用 LXR 沉默最佳为研究对象（LXRSiRNA3）。

(2) 沉默巨噬细胞 LXR 基因（SiLXR）Western blot 结果如图 11。与阴性对照组相比，SiLXR+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组的蛋白表达明显减少，且差异具有统计学意义（ $P<0.01$ ），说明 SiLXR 基因沉默的巨噬细胞模型建立成功。



注：AB-阴性对照组； BD-SiLXR+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组。

图 11 U937 细胞中 LXR 的表达

表 10 U937 细胞中 LXR 的表达

分组	n	SiLXR 的表达
NC+50 mg/L SiO ₂ 和 ox-LDL 的混悬液组	3	1.14±0.12
SiLXR+50 mg/L SiO ₂ 和 ox-LDL 的混悬液组	3	0.47±0.11 ^a
<i>F</i>		50.525
<i>P</i>		<0.01

注：a：与阴性对照组比， $P<0.01$ 。

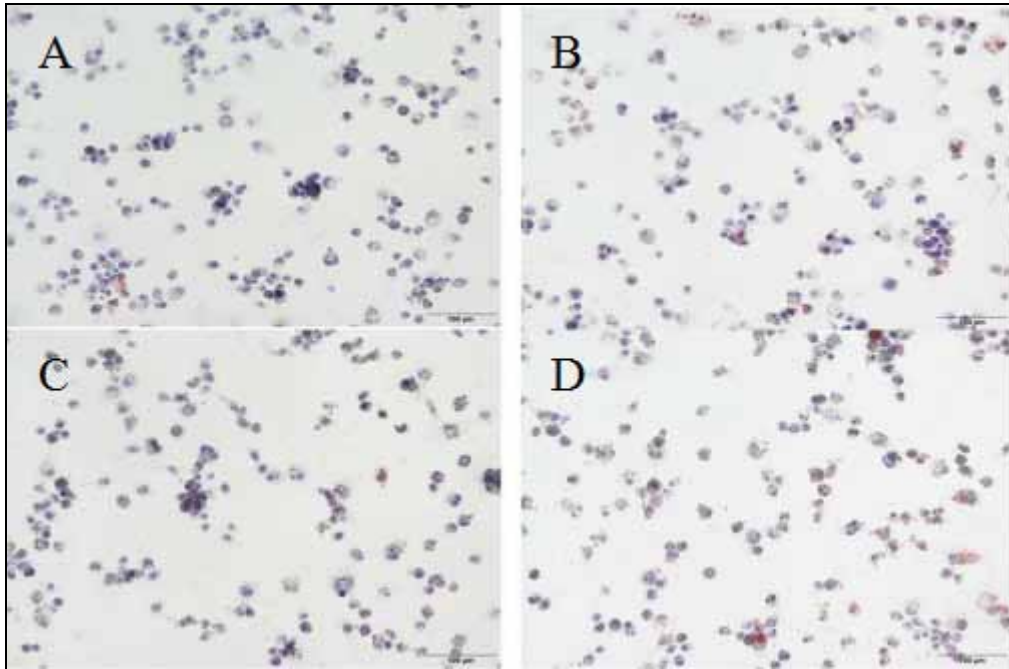
(3) 沉默 LXR 基因巨噬细胞模型中脂质的表达水平及油红 O 染色情况如图 12，与 NC 组相比，LXR 基因沉默组巨噬细胞中橘红色脂质增多，与 NC+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组相比，SiLXR+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组巨噬细胞中橘红色脂质明显增多，表 11 结果显示，LXRSiRNA 组和 SiLXR+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组 TC、FC、CE 含量明显增多，并且差异具有统计学意义（ $P<0.01$ ），SiLXR+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组 CE%比 NC+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组升高，高于 50%，差异明显（ $P<0.05$ ）。

表 11 细胞内 TC、FC 以及 CE 表达变化水平（ $n=3, \bar{x} \pm s$ ）

组别	TC 值(mg/g)	FC 值(mg/g)	CE 值	CE 值/TC
NC 组	93.11±4.19	78.84±1.49	14.27±5.50	15.17±5.20
LXRSiRNA 组	161.37±8.43	102.09±0.31	59.28±8.71	36.61±3.57 ^a
NC+50 mg/L SiO ₂ 和 ox-LDL 的混悬液组	252.017±4.26	122.75±4.30	129.27±7.04	51.27±2.14
SiLXR+50 mg/L SiO ₂ 和 ox-LDL 的混悬液组	382.086±5.86	161.19±4.79	220.90±9.13	61.64±2.51 ^b

<i>F</i>	1328.087	335.218	407.24	96.155
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: a: 与对照组比, $P<0.01$; b: 与模型对照组比, $P<0.05$ 。

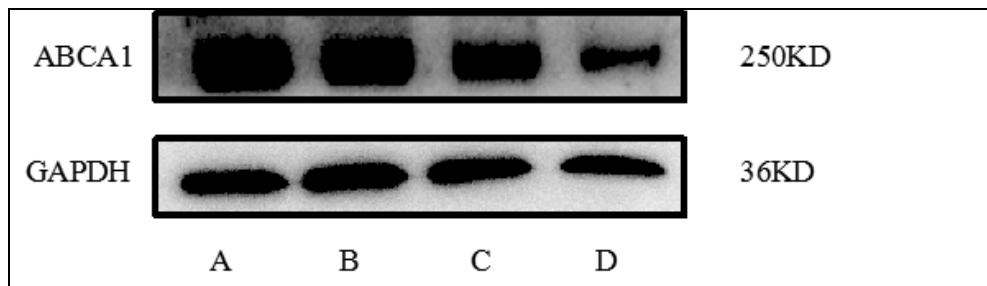


注: A-NC 组; B-LXRSiRNA 组; C-NC+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组; D-SiLXR+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组。

图 12 各组巨噬细胞油红 O 染色情况

3) ABCA1 基因沉默模型的建立

(1) ABCA1 不同基因位点的沉默情况如图 13。



注: A-NC 组; B-ABCA1SiRNA1; C-ABCA1SiRNA2; D-ABCA1SiRNA3。

图 13 ABCA1 不同基因位点沉默情况

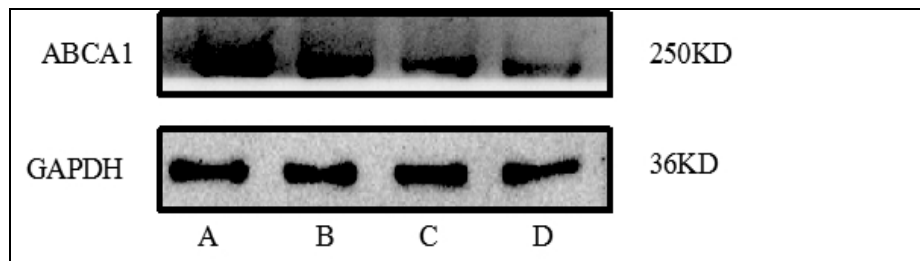
表 12 ABCA1 不同基因位点的沉默情况

分组	n	ABCA1 基因沉默情况
阴性对照组 (NC 组)	3	1.20±0.01
ABCA1SiRNA1	3	0.93±0.03
ABCA1SiRNA2	3	0.86±0.05 ^a
ABCA1SiRNA3	3	0.58±0.04 ^b

注：a：与对照组比， $P<0.05$ ；b：与对照组相比， $P<0.05$ 。

通过对比分析 ABCA1 不同基因位点的沉默情况，得出 ABCA1 基因的最佳沉默位点，后续的实验研究均选用 ABCA1 沉默最佳为研究对象（ABCA1SiRNA3）。

（2）沉默巨噬细胞 ABCA1 基因（SiABCA1）Western blot 结果如图 14。与阴性对照组相比，SiABCA1+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组的蛋白表达水平明显减少，且差异具有统计学意义（ $P<0.01$ ），说明 SiABCA1 基因沉默的巨噬细胞模型建立成功。



注：AB-阴性对照组； BD-SiABCA1+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组。

图 14 U937 细胞中 ABCA1 的表达

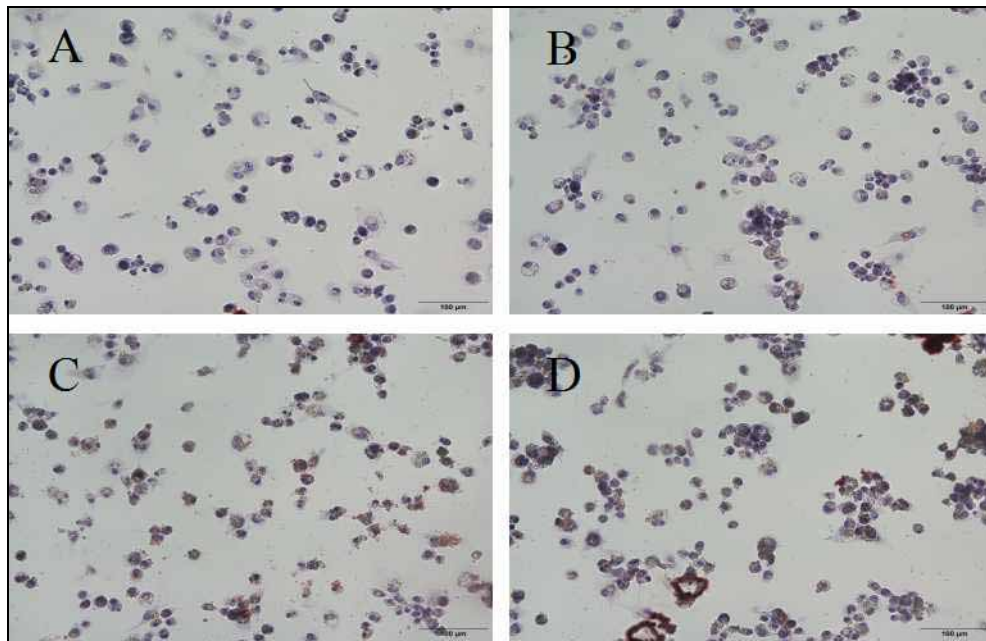
表 13 U937 细胞中 ABCA1 的表达

分组	n	SiABCA1 的表达
NC+50 mg/L SiO ₂ 和 ox-LDL 的混悬液组	3	1.36±0.18
SiABCA1+50 mg/L SiO ₂ 和 ox-LDL 的混悬液组	3	0.64±0.12 ^a
<i>F</i>		32.548
<i>P</i>		<0.01

注：a：与阴性对照组比， $P<0.01$ 。

（3）沉默 ABCA1 基因巨噬细胞模型中脂质的表达水平及油红 O 染色情况如图 15，与 NC 组相比，LXR 基因沉默组巨噬细胞中橘红色脂质增多，与 NC+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组相比，SiABCA1+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组巨噬细胞中橘红色脂质蓄积明显增多，表 14 结果显示，ABCA1SiRNA 组和 SiLXR+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组 TC、FC、CE 含量明显增多，并且差异具有统计学意义（ $P<0.01$ ），SiABCA1+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组 CE%比 NC+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组升高，高于 50%，差异明显（ $P<$

0.05)。



注：A-NC 组； B: ABCA1SiRNA 组； C-NC+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组； D-SiABCA1+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组。

图 15 各组巨噬细胞油红 O 染色情况

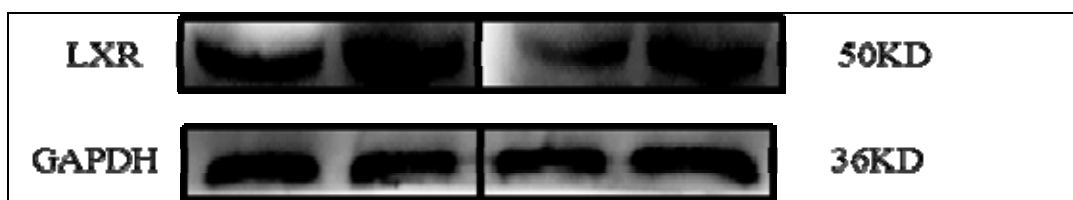
表 14 细胞内 TC、FC 以及 CE 表达变化水平 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	TC 值 (mg/g)	FC 值 (mg/g)	CE 值	CE 值/TC
NC 组	93.11±4.19	81.17±3.29	11.93±2.60	12.78
ABCA1 SiRNA 组	148.02±12.67	112.98±2.36	35.04±10.36	23.37 ^a
NC+50 mg/L SiO ₂ 和 ox-LDL 的混悬液组	252.02±15.80	126.08±9.02	125.94±8.38	49.98
SiABCA1+50 mg/L SiO ₂ 和 ox-LDL 的混悬液组	385.83±1.76	151.25±7.42	234.58±6.31	60.80 ^b
<i>F</i>	462.334	66.740	548.691	152.998
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注：a: 与阴性对照组比, $P<0.01$; b: 与模型组相比, $P<0.01$ 。

4) 激动 LXR 模型的建立

(1) 选用 LXR 激动剂 T0901317, 激动 LXR, 建立过表达模型, T0901317 为 LXR 特异性激动剂, 在激动蛋白 LXR 的同时同样激动蛋白 ABCA1, 因此蛋白 LXR 过表达的同时蛋白 ABCA1 的表达也随之增加。Western blot 结果如图 16、表 15, 与 DMSO 组比, 蛋白 LXR 组表达增多, 且差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。与模型组相比, 实验组的蛋白的相对表达同样增多, 且差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。说明 LXR 过表达巨噬细胞模型建立成功。



注：A-DMSO 组； B-激动组； C-模型组； D-实验组。

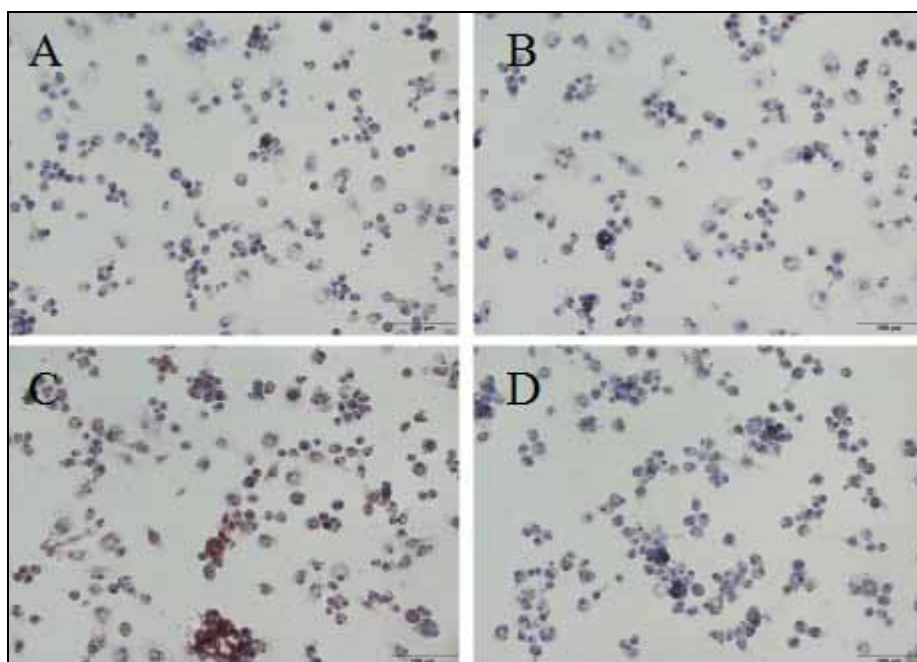
图 16 U937 细胞中 LXR 的表达

表 15 U937 细胞中 LXR 的表达

分组	n	LXR 基因表达情况
DMSO 组	3	0.74±0.01
LXR 激动组	3	1.24±0.04 ^a
模型组	3	0.56±0.05
实验组	3	1.02±0.02 ^b
<i>F</i>		242.534
<i>P</i>		<0.01

注：a: 与阴性对照组比, $P<0.01$; b: 与模型组相比, $P<0.01$ 。

(2) 激动蛋白 LXR 巨噬细胞模型中脂质的表达水平及油红的染色情况如图 17、表 16, 与 DMSO 组相比, LXR 激动组巨噬细胞中橘红色脂质减少, 与模型组相比, 实验组巨噬细胞中橘红色脂质明显减少, 表 16 结果显示, 实验组 TC、FC、CE 含量明显减少, 并且差异具有统计学意义 ($P<0.01$), 实验组 CE%比模型组降低, 低于 50%, 差异明显 ($P<0.05$)。



注：A-DMSO 组； B-T0901317 组； C-模型组； D-实验组。

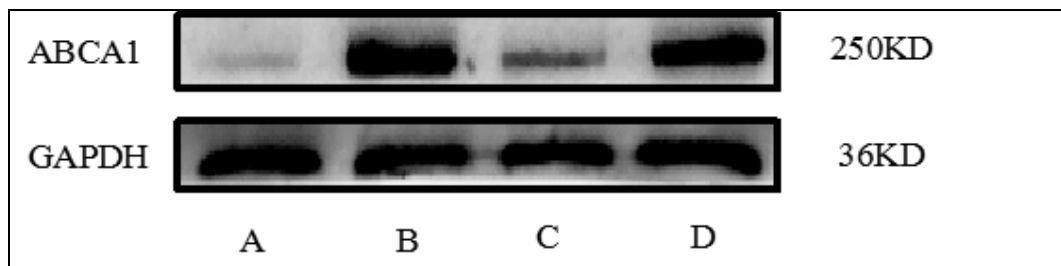
图 17 各组巨噬细胞油红 O 染色情况

表 16 细胞内 TC、FC 以及 CE 表达变化水平 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	TC 值 (mg/g)	FC 值 (mg/g)	CE 值	CE 值/TC (%)
模型组	319.80±6.81	158.65±7.30	161.15±13.75	50.35
实验组	110.94±5.00	83.46±9.44	27.48±5.15	24.90 ^a
<i>F</i>	1833.613	119.084	248.766	46.483
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: a: 与阴性对照组比, $P<0.01$ 。

5) 激动剂 T0901317 激动蛋白 LXR 后, 蛋白 ABCA1 的表达也随之增加, Western blot 结果如图 18。与 DMSO 组相比, 激动组的蛋白相对表达明显增高, 且差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。与模型组相比, 实验组的表达也同样增多且差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。说明激动剂 T0901317 激动成功后, ABCA1 的表达也随之增加, T0901317 激动剂可导致 ABCA1 基因表达受到 LXR 依赖性上调。



注: A-DMSO 组; B-T0901317 组; C-模型组; D-实验组。

图 18 U937 细胞中 ABCA1 的表达

表 17 U937 细胞中 ABCA1 的表达

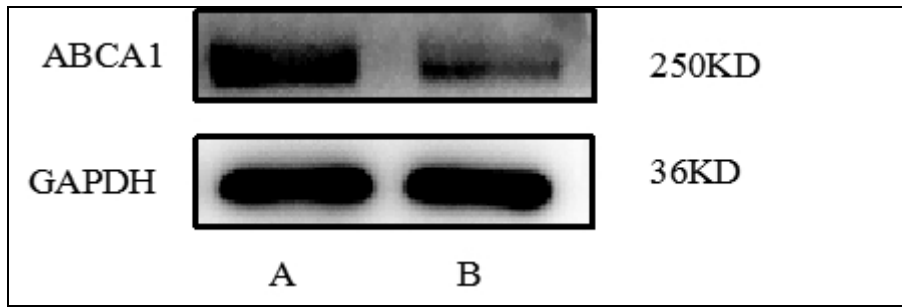
分组	n	ABCA1 基因表达情况
DMSO 组	3	0.13±0.00
激动组	3	1.16±0.06 ^a
模型组	3	0.46±0.03
实验组	3	0.92±0.02 ^b
<i>F</i>		479.617
<i>P</i>		<0.01

注: a: 与对照组比, $P<0.01$; b: 与模型组相比, $P<0.01$ 。

1.2.4 LXR、ABCA1 上下游关系

1) 沉默 LXR3 基因, 基因 ABCA1 的表达情况

沉默 LXR3 基因后, Western blot 结果如图 19、表 18。蛋白 ABCA1 的表达也随蛋白 LXR3 的沉默而表达降低, 且差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。



注：A-NC 组； B-L3XRSiRNA 组

图 19 U937 细胞中 ABCA1 的表达

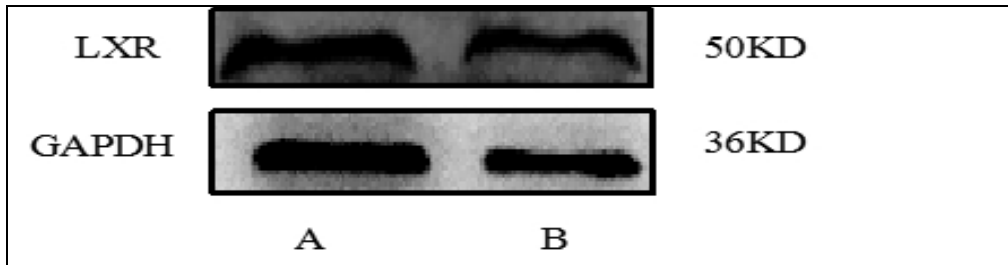
表 18 U937 细胞中 ABCA1 的表达

分组	n	ABCA1 基因表达情况
NC 组	3	0.84±0.02
L3XRSiRNA	3	0.46±0.01 ^a
<i>F</i>		1342.143
<i>P</i>		<0.01

注：a：与阴性对照组比， $P < 0.01$ 。

2) 沉默 A3BCA1 基因，LXR 基因的表达情况

沉默 ABCA1 基因后，Western blot 结果如图 20、表 19。蛋白 LXR 的相对表达几乎不发生变化，且差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注：A-NC 组； B-A3BCA1SiRNA 组

图 20 U937 细胞中 LXR 的表达

表 19 U937 细胞中 LXR 的表达

分组	n	LXR 基因表达情况
NC 组	3	0.92±0.03
A3BCA1SiRNA 组	3	0.81±0.07 ^a
<i>F</i>		6.393
<i>P</i>		0.065

注：a：与阴性对照组比， $P > 0.05$ 。

由 1) 和 2) 的结果得出 LXR 与 ABCA1 的上下游关系是基因 LXR 是基因

ABCA1 的上游，而且基因 ABCA1 的变化是随着基因 LXR 的变化而变化。

1.3 讨论

泡沫细胞是体内脂质代谢异常的产物，在多种疾病的发病机制中起重要作用，如在动脉粥样硬化斑块的发病过程中巨噬细胞吞噬脂质形成泡沫细胞沉积在血管壁，造成血管壁的损伤，通过改变脂质代谢的途径，可以有效的延缓疾病的进展^[20-21]。脂质的沉积、泡沫细胞的形成可以参加动脉粥样硬化炎症反应^[22-23]。有研究表明，SiO₂可以促进 ox-LDL 诱导巨噬细胞脂质的积累^[24]。U937 利用 PMA 诱导为巨噬细胞的方法已经被国内外相关研究广泛应用^[25-27]。因此本研究用 SiO₂和 ox-LDL 联合刺激 U937 源巨噬细胞，研究 PPAR γ -LXR-ABCA1 信号通路在泡沫化过程中的作用及其机制，以期找到抑制泡沫细胞形成的关键作用靶点，从而延缓矽肺的发病进程，为治疗矽肺提供新的思路。

巨噬细胞泡沫化的调控是一个复杂的过程，在泡沫细胞发生发展的各个环节均存在着信号通路。有研究发现 ABCA1 是最早发现的 LXR α 目标基因之一，它能促进巨噬细胞排除胆固醇的作用并维持细胞甾醇的内稳态^[28]。此外，Ranzun Zhao 等人研究发现，通过 MicroRNA-613 对 LXR 和 ABCA1 进行下行表达发现抑制了由 PPAR 激活的 THP-1 巨噬细胞的胆固醇的外流^[28]。Jianmei Yu 等人研究发现 Salvianolic acid B 通过 abca1/ppar- γ /lxra 途径，促进了 THP-1 巨噬细胞中的胆固醇含量增加。Xin Ma^a 等人研究结果提供的证据表明丙泊酚通过 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞中的 PPAR γ /LXR α 途径上调了 ABCA1, ABCG1 和 SR-B1 的表达。Xin-Wei He 等人研究发现黄芩苷可能通过 PPAR γ -LXR α -ABCA1 / ABCG1 途径发挥抗动脉粥样硬化作用，并通过促进胆固醇从巨噬细胞流出延迟了泡沫细胞的形成。Souade Ikhlef¹ 等人研究发现 PON1 通过涉及氧化磷脂水解的机制刺激胆固醇流出。这些结果揭示了 PPAR γ 调控的另一种机制，并为治疗胆固醇代谢疾病提供了一个潜在的目标^[28]。因此利用这条通路探索对矽肺巨噬细胞泡沫化的作用，为今后矽肺防治提供了新的研究方向。本研究首先体外培养 U937 细胞（人淋巴瘤细胞），经过 PMA 处理 48 h 后，诱导分化为巨噬细胞，然后分别用 ox-LDL 和 SiO₂+ox-LDL 处理 48 h，观察 SiO₂对 ox-LDL 提供的富含丰富脂质的情况下巨噬细胞转化为泡沫细胞的过程是否有促进作用，实验结果证明证实了这一设想。实验各组给予不同的处理后 SiO₂和 ox-LDL 混悬液组脂质测定结果显示 CE 比重明显大于空白对照组和 ox-LDL 组，且大于 50%；油红 O 染色结果显示 SiO₂和 ox-LDL 混悬液组中橘红色脂滴的数量明显高于空白对照组和 ox-LDL 组。基于此结果说明

SiO₂ 能促进细胞内脂滴的聚集，促进泡沫细胞的形成。此外，western blot 结果显示 LXR、ABCA1 在 SiO₂ 和 ox-LDL 混悬液组细胞内表达明显减少，与其余组比较差异有统计学意义。

1.3.1 PPAR γ (过氧化物酶体增植物激活型受体 γ)

过氧化物酶体增植物激活型受体 γ (PPAR γ) 是一类由配体激活的核转录因子^[29]，是核受体家族中最重要的成员之一，属 II 型核激素受体超家族成员，包括 α 、 β 和 γ 三种亚型，具有调节细胞分化^[30]、过氧化物酶体增殖、能量代谢^[31]、糖类和脂肪代谢、泡沫细胞形成以及炎症反应等作用^[32]。PPAR γ 激动剂主要包括，抗糖尿病药物：噻唑烷二酮类 (TZDS)，环格列酮、罗格列酮、吡格列酮、曲格列酮。拮抗剂包括 GW9662、L-764406、BADGE 等^[33]。Moore 等人证实，在动脉粥样硬化中，PPAR 信号通路是调节 CD36 表达的关键因素。各种信号通路最终通过 PPAR 信号通路调控 CD36 的表达，敲除 PPAR 信号很难检测到 CD36 的表达^[34]。因此，PPAR 蛋白在大量研究中的重要作用使得 PPAR 受体功能和配体筛选的研究成为生物医学和药理学研究的前沿。大量研究表明 PPAR γ 与多种疾病有密切的关联，使得 PPAR γ 有望成为治疗疾病的新的药物靶标^[35]。PPAR γ 因子本课题组前期证实参与调控泡沫化，因此，在本实验中不做重点研究。

1.3.2 LXR (肝 X 受体)

LXR 是核受体超家族的一员，该家族以 1995 年首次从人类肝脏 cDNA 文库中筛选出并命名^[36]。LXR 有两种亚型：LXR α 和 LXR β 。LXR α 主要在胆固醇代谢高的组织中表达，如肝脏、小肠和巨噬细胞。LXR β 广泛分布于体内。两者在与胆固醇代谢相关的 DNA 和配体结合域中具有约 77% 的氨基酸同源性。LXR 是维持细胞内胆固醇相对稳定的主要“感受器”，胆固醇衍生物可以激活细胞内的胆固醇。如氧化甾醇 24(s)-羟基胆固醇、22(r)-羟基胆固醇(肾上腺)、27-羟基胆固醇(人巨噬细胞)和 24, 25-环氧胆固醇(肝)，也可被合成激动剂 GW3965 和 T0901317 激活^[37]。LXR 可能通过以下机制来调节胆固醇的逆向转运：首先，LXR 诱导细胞中 ABCG1 的再分布，以促进胆固醇从细胞向细胞膜的转移，从而增加胆固醇的细胞外转运并与高密度脂蛋白(high densitylipoprotein, HDL)结合^[38]。巨噬细胞通过清道夫受体途径摄取大量胆固醇，并可通过 ABCA1 和 ABCG1 介导的过程分泌细胞内胆固醇，然后被肝脏摄取^[39]。此外，LXR 可以抑制肠道对食物中胆固醇的吸收，从而降低体内外源性胆固醇的水平，在一定程度上降低体内总胆固醇的水平，

并防止高胆固醇血症、胆结石等的形成。结合上一实验结果得出 LXR 参与矽肺进程中的泡沫化的过程。基于目前的该实验结果，我们采取了基因沉默的方法建立 LXR 蛋白基因沉默 (SiLXR) 巨噬细胞模型，与阴性对照组相比，SiLXR+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组的表达明显减少，且差异具有统计学意义，说明 SiLXR 基因沉默的巨噬细胞模型建立成功。SiLXR+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组 TC、FC 和 CE 表达水平均增加，CE% 远高于 50%；油红 O 染色结果亦显示 SiLXR+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组橘红色脂滴增多。使用激动剂的方法建立 LXR 蛋白过表达的巨噬细胞模型，与 DMSO 组比，LXR 组表达增多，且差异具有统计学意义。与模型组相比，实验组的表达同样增多，且差异具有统计学意义。说明 LXR 过表达巨噬细胞模型建立成功。胆固醇试剂盒结果显示，实验组 TC、FC 和 CE 表达水平均减少，CE% 远低于 50%；油红 O 染色结果亦显示实验组橘红色脂质聚集减少明显。这一结果与 A Zhi Sha Ma^[40] 等人研究胆固醇流出的机制研究中结果相一致，他们研究发现 T0901317 激动 LXR 后，可以介导胆固醇的流出，当通过基因沉默的方式，将 LXR 基因沉默后，发现胆固醇的流出明显减少。

1.3.3 ABCA1 (巨噬细胞 ATP 结合转运体 A1)

巨噬细胞 ATP 结合转运体 A1 (ABCA1) 介导胆固醇外流、促进 HDL 形成，从而刺激胆固醇逆向转运(RCT)、抑制泡沫细胞形成与粥样硬化发展。此外，抑制巨噬细胞对胞外胆固醇的摄取也能降低其泡沫化水平，从而抑制动脉粥样硬化的发展^[41]。最近的研究发现，以 ABCA1 为靶基因的多种 microRNA 可以直接调控 ABCA1 的表达。同时，还发现一些微核糖核酸通过作用于调节 ABCA1 基因的转录因子而间接发挥作用，如肝 X 受体 α (LXR α)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)、视黄醇核受体 α (RXR α) 等。间接调控 ABCA1 的表达，从而达到影响胆固醇流出的目的^[42]。ABCA1 最初在载脂蛋白 A 的脂化中起着关键作用，它会产生循环的高密度脂蛋白胆固醇。而众所周知，ABCA1 的表达上调促进了 HDL 的形成和逆转胆固醇的运输 (RCT)，但是我们不知道 ABCA1 蛋白降解的抑制是如何影响 HDL 的功能的^[43]。通过 ABCA1 运输的游离胆固醇(FC)是由 ABC 家族的跨膜转运蛋白家族介导的主要通路，在巨噬细胞中大约占到 ChE 的三分之二。进一步的研究表明，细胞内的游离胆固醇 (FC) 通过 ABCA1 排出，主要与 apo A1 结合，而游离胆固醇 (FC) 通过 ABCG1 的排出优先与 HDL 结合，进入 RCT 的下一个步骤^[44]。鉴于 ABCA1 蛋白在介导 ChE 中的重要性，近年来广泛研究了 ABCA1

的转录和转录后调控^[44]。Yuanbin Li^a 等人研究发现核仁素通过增强 ABCA1 mRNA 的稳定性并随后增加胆固醇流出来抑制泡沫细胞形成。ABCA1 的转录通过激活依赖于配体的核受体，如过氧化物增殖体激活受体(PPAR)和肝 X 受体(LXR)而得到增强。结合 ABCA1 参与矽肺进程中的泡沫化的过程。根据目前的该实验结果，我们采取了基因沉默的方法建立 ABCA1 蛋白基因沉默 (SiABCA1) 巨噬细胞模型，与阴性对照组相比，SiABCA1+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组的表达明显减少，且差异具有统计学意义，说明 SiABCA1 基因沉默的巨噬细胞模型建立成功。SiABCA1+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组 TC、FC 和 CE 表达水平均增加，CE%远高于 50%；油红 O 染色结果亦显示 SiABCA1+50 mg/L SiO₂ 和 ox-LDL 的混悬液组橘红色脂滴增多。LXR 激动剂 T0901317 激动 LXR 的同时也增加 ABCA1 的表达介导巨噬细胞中的胆固醇外流。

这一结果 A Zhi Sha Ma^[40]等人研究胆固醇流出的机制研究中结果相一致，他们研究发现 T0901317 激动 LXR 后，可以介导胆固醇的流出，且 LXR 激动剂 T0901317 激动 LXR 的同时，也激动了 ABCA1 的表达。激动剂 T0901317 激动 LXR 后，ABCA1 的表达也随之增加，本研究结果显示，与 DMSO 组相比，激动组的表达明显增高，且差异具有统计学意义。与模型组相比，实验组的表达也同样增多且差异具有统计学意义。说明激动剂 T0901317 激动成功后，ABCA1 的表达也随之增加，T0901317 激动剂可导致 ABCA1 基因表达受到 LXR 依赖性上调。

矽肺的发病机制复杂且多样化，目前就矽肺发病机制的学说就有很多种。如机械刺激学说、自由基学说、巨噬细胞作用机制、细胞因子学、氧化应激学说等等，脂质代谢仅仅是矽肺所有学说中探究点之一。对于矽肺机制的深层次研究都是为了以后更好的治疗以及预防矽肺的发生发展。针对细胞因子学说和氧化应激学说，目前出现中药及其提取物可以对抗这两种机制的引起的肺损伤，有效的延缓矽肺纤维化的发展^[45]。有研究通过大鼠矽肺模型，通过 HE、Masson 染色的方法，发现随着暴露于 SiO₂ 的时间增加，肺损伤的严重性增加。在模型大鼠中，特别是在 30 天组中，对肺部炎症有明显的反应。随着矽肺病的发展，炎症，纤维化以及与纤维化相关基因的表达表现出不同的时间依赖性变化，并且它们之间存在许多因果关系^[46]。Du Sitong 等人通过建立小鼠矽肺模型，发现薯蓣素可促进巨噬细胞自噬，薯蓣素触发的肺泡巨噬细胞的自噬限制了结晶二氧化硅刺激的线粒体活性氧 (mtROS) 的质量，减少了线粒体依赖性细胞凋亡途径的活化并促进了细胞存活，减轻的氧化应激导致炎症因子和趋化因子的分泌减少^[47]。这为矽肺病的治疗提供了机制的可能。Sai Linlin 等人通过 Wistar 大鼠矽肺模型，暴露于二氧化硅的大鼠肺组织中

lncRNAs 表达的变化，并使用微阵列与对照组中的大鼠进行了比较。结果表明，暴露于二氧化硅可导致 682 个 lncRNA（300 个上调和 382 个下调）的表达谱发生改变，lncRNA 的改变可能通过调节大鼠肺中功能基因的表达在二氧化硅诱导的肺纤维化中发挥作用^[48]。因此，矽肺的发病机制需要进一步研究与探讨。

综上所述，本研究初步探讨了 LXR、ABCA1 在 SiO₂ 诱导的泡沫细胞中的调节作用。在由 SiO₂ 诱导的泡沫细胞的生产过程中，通过基因沉默的方式抑制 LXR、ABCA1 两种蛋白的表达，结果导致 ox-LDL 在细胞内过多积聚，脂质代谢紊乱，由此泡沫细胞形成。通过激动剂的方式使 LXR 蛋白表达增加，发现脂质在细胞内的蓄积减少，泡沫化情况明显减轻。由于泡沫细胞的形成对矽肺作用机制的研究需要进一步的探讨。

1.4 结论

- 1) LXR、ABCA1 在巨噬细胞源性泡沫细胞中表达减少。
- 2) 游离 SiO₂ 可通过改变 LXR、ABCA1 表达加剧 ox-LDL 诱导的细胞脂质代谢紊乱，产生泡沫细胞，参与矽肺脂质代谢。
- 3) 基因 LXR 为上游，基因 ABCA1 通过基因 LXR 起作用。
- 4) PPAR γ -LXR-ABCA1 信号通路参与调控矽肺巨噬细胞泡沫化。

参考文献

- [1] 李玉洁, 贾晓民. 矽肺的治疗进展[J]. 临床肺科杂志, 2017, 22(6):1119-1122.
- [2] 李雪岩, 杨玉玉, 陈君. 中药抗巨噬细胞泡沫化的研究进展[J]. 药学与临床研究, 2017, 25(05):431-434.
- [3] ROMERO F, SHAH D, DUONG M, et al. A pneumocyte-macrophage paracrine lipid axis drives the lung toward fibrosis[J]. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2015, 53(1):74-86.
- [4] GU HF, LI HZ, TANG YL, et al. Nicotinate-curcumin impedes foam cell formation from THP-1 cells through restoring autophagy flux[J]. PLoS ONE, 2016, 11(4).
- [5] NI J, LI Y, LI W, et al. Salidroside protects against foam cell formation and apoptosis, possibly via the MAPK and AKT signaling pathways[J]. Lipids Health Dis, 2017, 16(1):198-208.
- [6] YANNI X, FANG F, LAI, et al. Mycophenolic acid induces ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) expression through the PPAR γ -LXR-ABCA1 pathway[J]. Biochemical and

- Biophysical Research Communications, 2011:779–782.
- [7] BOBRY SHEV YV, IVANOVA EA, CHISTI AKOV DA, et al. Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis[J]. BioMed Research International, 2016, 2016:1-13.
- [8] BARANOWSKI M, ZABIELSKI P, BLACHNIO ZAU, et al. LXR activation prevents exhaustive exercise-induced hypoglycaemia and spares muscle glycogen but does not enhance running endurance in untrained rats[J]. Acta Physiologica, 2011, 201(3):373-379.
- [9] JIN P, BIAN YT, WANG K, et al. Homocysteine accelerates atherosclerosis via inhibiting LXR α -mediated ABCA1/ABCG1-dependent cholesterol efflux from macrophages[J]. Life Sci, 2018, 214:41-50.
- [10] 付育, 李霓. 靶向肝 X 受体的抗动脉粥样硬化药物研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(03):254-263.
- [11] 甘诗泉, 王声全, 张光琼, 等. 艳山姜挥发油通过调控巨噬细胞 CD36 和 ABCA1 表达抑制泡沫细胞的形成[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(04):64-69.
- [12] YU XH, FU YC, ZHANG DW, et al. Foam cells in atherosclerosis[J]. Clinica Chimica Acta, 2013, 424:245-252.
- [13] 徐文静. 胆固醇逆向转运和动脉粥样硬化[J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2018, 2(09):195-198.
- [14] YU XH, ZHANG DW, ZHENG XL, et al. Cholesterol transport system: An integrated cholesterol transport model involved in atherosclerosis[J]. Progress in Lipid Research, 2019, 73:65-91.
- [15] TSOU CY, CHEN CY, ZHAO JF, et al. Activation of soluble guanylyl cyclase prevents foam cell formation and atherosclerosis[J]. Acta Physiologica, 2014, 210(4):799-810.
- [16] 葛檣檣, 王雪芬, 宗磊, 等. 绞股蓝总皂苷对 ApoE $^{-/-}$ 动脉粥样硬化小鼠血管 PPAR- γ /LXR- α /ABCA1 信号通路的影响[J]. 浙江医学教育, 2019, 18(04):47-50.
- [17] 欧翔, 陈凌燕, 周志姣, 等. 血管生成素 1 通过 LXR α 途径调节 THP-1 源性泡沫细胞 ABCA1/ABCG1 表达及胆固醇流出[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(11):1081-1087.
- [18] 白玲, 刘平, 马爱群, 等. 抗磷脂抗体促进 ox-LDL 诱导 U937 细胞泡沫化进程及对 VEGF 分泌的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2014, 35(04):429-432.
- [19] 林韬琦, 卢德赵, 沃兴德. 巨噬细胞内胆固醇平衡机制研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(11):919-921.
- [20] 陈羽斐, 沈伟, 施海明. 巨噬细胞免疫代谢与动脉粥样硬化的研究进展[J]. 中国动脉硬

- 化杂志, 2020, 28(01):74-80.
- [21] 王波, 余珊, 俞华, 等. 熊果酸抑制动脉粥样硬化巨噬细胞吞噬脂质作用[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(24):6060-6062.
- [22] 邓倩, 李小雪, 方延廷, 等. ATP 结合 ABCA1 在动脉粥样硬化性疾病发生发展中的作用机制研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(01):65-69.
- [23] 戎光, 周庆兵, 李婧, 等. 化浊通脉方对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 来源泡沫细胞胆固醇逆转运相关基因表达作用研究[J]. 陕西中医, 2019, 40(12):1664-1668.
- [24] GUO C, MA R, LIU X, et al. Silica nanoparticles promote oxLDL-induced macrophage lipid accumulation and apoptosis via endoplasmic reticulum stress signaling[J]. Science of The Total Environment, 2018, 631-632:570-579.
- [25] 刘流, 刘琳, 梁力川, 等. IL-1 β 预处理脂肪间充质干细胞促进 VEGF 蛋白分泌和巨噬细胞 M₂ 型极化的研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2019, 50(02):171-176.
- [26] 张璇. LIPUS 对 LPS 诱导的巨噬细胞系 U937 炎症反应的抑制作用及其机制研究[D]. 重庆医科大学, 2017.
- [27] 曹林林, 杜珍武, 杨麒巍, 等. 血清对 U937 细胞分化成熟及细胞周期的影响[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(08):1324-1327.
- [28] RANZUN Z. MiR-613 regulates cholesterol efflux by targeting LXR α and ABCA1 in PPAR γ activated THP-1 macrophages[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 448:329-334.
- [29] 刘红利, 孙颖, 郎艳松, 等. 单核/巨噬细胞脂质代谢和炎症在动脉粥样硬化中的作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(11):1224-1228.
- [30] 杨智. PPAR γ 在脂肪细胞分化和糖脂代谢中的作用[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2008, 28(1):14-18.
- [31] SILVERSTEIN RL, FEBBRAIO M. CD36, scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior[J]. SciSignal, 2009, 2(72).
- [32] 莫中成, 陈欣, 尹小波. PPAR γ 反义寡核苷酸对 THP-1 巨噬细胞 CD36 表达的影响[J]. 2011, 39(5):493-496.
- [33] 马晶晶, 章涛. PPAR γ 功能与疾病关系研究进展[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(5):601-605.
- [34] MOORE KJ, ROSEN ED, FITZGERALD ML, et al. The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake[J]. NatMed, 2001, 7(1):41-47.
- [35] YU J, SHEN B, CHU ES, et al. Inhibitory role of peroxisome proliferator-activated receptor

- gamma in hepatocarcinogenesis in mice and in vitro[J]. *Hepatology*, 2010, 51(6):2008-2019.
- [36] 陈裕, 范晓飞, 郑忠清, 等. 肝 X 受体在胆固醇代谢过程中的作用机制[J]. *临床肝胆病杂志*, 2016, 32(05):1013-1017.
- [37] REPA JJ, MANGELSDORF DJ. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000, 16(1):459-481.
- [38] WANG N, RANALLETTA M, MATSUURA F, et al. LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(6):1310-316.
- [39] VON ECKARDSTEIN A, HERSBERGER M, ROHRER L. Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2005, 8(2):147-152.
- [40] MA AZS, SONG ZY, ZHANG Q. Cholesterol efflux is LXR α isoform-dependent in human macrophages[J]. *Bmc Cardiovascular Disorders*, 2014, 14(1).
- [41] 陈元利. LXR 配体与 MEK1/2 抑制剂组合药物防治动脉粥样硬化的作用与机理研究[D]. 南开大学, 2014.
- [42] 唐蕙, 刘益洲, 肖文超, 等. ABCA1 表达的 microRNA 转录后水平调控[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(05):517-523.
- [43] LIN ZH. Inhibition of ABCA1 protein degradation promotes HDL cholesterol efflux capacity and RCT and reduces atherosclerosis in mice[J]. *Lipid Res*, 2015. 56:986-997.
- [44] LIMEI W. Piperine inhibits ABCA1 degradation and promotes cholesterol efflux from THP-1-derived macrophages[J]. *Nutr Food Res*, 2017, 61(4).
- [45] 孙雪鹏. 中药及其提取物干预矽肺发病机制的研究进展[J]. *环球中医药*, 2018, 11(12):2057-2060.
- [46] ZHANG ZQ, Shao B, Han GZ, et al. in vivo Location and dynamic changes of inflammation, fibrosis, and expression levels of related genes in SiO₂-induced pulmonary fibrosis in rats[J]. *J Toxicol Pathol*, 2019, 32:253-260.
- [47] DU ST, Li C, LU YP, et al. Dioscin Alleviates Crystalline Silica-Induced Pulmonary Inflammation and Fibrosis through Promoting Alveolar Macrophage Autophagy[J]. *Theranostics*, 2019, 9:1878-1892.
- [48] SAI LL, YU GC, Bo C, et al. Profiling long non-coding RNA changes in silica-induced pulmonary fibrosis in rat[J]. *Toxicol. Lett*, 2019, 310:7-13.

结 论

- 1 LXR、ABCA1 在巨噬细胞源性泡沫细胞中表达减少。
- 2 游离 SiO₂ 可通过改变 LXR、ABCA1 表达加剧 ox-LDL 诱导的细胞脂质代谢紊乱，产生泡沫细胞，参与矽肺脂质代谢。
- 3 基因 LXR 为上游，基因 ABCA1 通过基因 LXR 起作用。
- 4 PPAR γ -LXR-ABCA1 信号通路参与调控矽肺巨噬细胞泡沫化。

第 2 章 综述

PPAR γ -LXR-ABCA1 信号通路与矽肺脂质代谢的关系

2.1 矽肺的国内外研究现状

尘肺病是由于长期吸入带电尘粒而引起的一系列肺损伤疾病。这一系列损伤包括肺直接损伤、产生细胞因子和化学因子的活性化学物质的形成、肺纤维化的诱导、细胞凋亡的诱导等^[1]。近几年,根据《我国卫生健康事业发展统计公报》显示职业性尘肺病新病例 19 468 例,2017 年报告的职业性尘肺病 22 701 例,相较于 17 年相比下调 27.46%,2017 年相较于 2016 年下降了 14.89%,从显示的数据上来看矽肺的患病人数有所下降,但每年仍有成千上万的人饱受尘肺病的困扰^[2]。不仅在我国,在世界上的其他国家仍有大部分的矽肺患者。

2.2 矽肺的发病机制的学说

矽肺是危害最为严重的一种职业病,也是发病率和致残率极高的一种职业病^[3]。其发病机制尚为复杂,无法用单一的机制对其进行详细的阐述。有研究表明,在二氧化硅粉尘摄入的过程中,巨噬细胞或被激活或被破坏,在被破坏的过程中,巨噬细胞会释放一些如 TNF- α 的炎性因子导致炎症的发生。发生重要的炎性反应是矽肺发生发展的第一步也是发生矽肺的开始。巨噬细胞表面存在着天然低密度脂蛋白受体(LDLR),是脂质代谢的正常途径。巨噬细胞的脂质代谢在整个矽肺发生发展过程中起至关重要的作用。这种脂质代谢的平衡被破坏掉会导致释放如白细胞介素 1(IL-1)、白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 8(IL-8)等多种炎症细胞因子,而这些炎性因子会进一步加重炎症反应导致脂质代谢紊乱。

矽肺的发生发展是受多种因素相互影响的复杂过程,对于矽肺的形成机制存在很多学说,目前主要有机械刺激学说^[4]、自由基学说^[5]、免疫因子学说^[6-8]、巨噬细胞作用机制^[9]、硅酸聚合学说、细胞因子学说、表面活性学说等,但仍尚未完全清楚,且缺乏有效的治疗。

在近几年的研究中,Xiao-Long Lin,1,2,*^[10]等人用高效液相色谱法、Western blot、PCR,等手段发现了 FGF21 可以通过 ERK1/2-PPAR γ -LXR α 信号通路,下调 ABCA1 的表达使胆固醇外流,这对减少泡沫细胞的形成,治疗由脂质代谢紊乱

所引起的矽肺病的治疗, 提供了一个潜在的可能。

近几年来, 关于矽肺发病机制的研究越来越全面且详细。有研究通过大鼠矽肺模型, 通过 HE、Masson 染色的方法, 发现随着暴露于 SiO_2 的时间增加, 肺损伤的严重性增加。在模型大鼠中, 特别是在 30 天组中, 对肺部炎症有明显的反应。随着矽肺病的发展, 炎症, 纤维化以及与纤维化相关基因的表达表现出不同的时间依赖性变化, 并且它们之间存在许多因果关系^[11]。Du Sitong 等人通过建立小鼠矽肺模型, 发现薯蓣素可促进巨噬细胞自噬, 薯蓣素触发的肺泡巨噬细胞的自噬限制了结晶二氧化硅刺激的线粒体活性氧 (mtROS) 的质量, 减少了线粒体依赖性细胞凋亡途径的活化并促进了细胞存活, 减轻的氧化应激导致炎症因子和趋化因子的分泌减少^[12]。这为矽肺病的治疗提供了机制的可能。Sai Linlin 等人通过 Wistar 大鼠矽肺模型, 暴露于二氧化硅的大鼠肺组织中 lncRNAs 表达的变化, 并使用微阵列与对照组中的大鼠进行了比较。结果表明, 暴露于二氧化硅可导致 682 个 lncRNA (300 个上调和 382 个下调) 的表达谱发生改变, lncRNA 的改变可能通过调节大鼠肺中功能基因的表达在二氧化硅诱导的肺纤维化中发挥作用^[13]。Xu Tiantian 等人通过建立小鼠矽肺模型和 SiO_2 处理的肺上皮细胞 (HBE 和 A549) 和 TGF- β 1 刺激的肺成纤维细胞 (MRC-5 和 NIH / 3T3) 的细胞模型用于研究 miR-326 的机制, 用免疫荧光以及蛋白印迹等方法得出 miR-326 在二氧化硅处理的小鼠的纤维化肺组织中被下调, 而 miR-326 的表达增加则减轻了二氧化硅诱导的肺纤维化^[14]。Li Nannan 等人通过研究黄芪甲苷 (ASV) 对矽肺成纤维细胞的作用, 并进一步研究其对 TGF- β 1/ Smad3 信号通路的调控机制, 建立矽肺大鼠模型, 用 RT-qPCR 的方法检测 α -SMA, 胶原 I, 胶原 III, Smad2, Smad3 和 Smad7 表达。进行免疫荧光检测 α -SMA, I 型胶原, III 型胶原和 p-Smad3 蛋白以及 p-Smad3 的核质分布; 蛋白质印迹法检测 Smad2, p-Smad2, Smad3, p-Smad3 和 p-Smad3 的蛋白。最终得出 ASV 可以通过 TGF- β 1/ Smad3 信号通路抑制二氧化硅诱导的肺成纤维细胞纤维化, 从而抑制矽肺的形成^[15]。总而言之, 在矽肺的发病机制中, 二氧化硅刺激的以巨噬细胞为主的靶细胞, 在矽肺的炎症中占有重要的作用。

2.3 脂质代谢

说到脂质代谢比较公认的说法就是它是引发或造成动脉粥样硬化的主要原因, 脂质的沉积导致动脉管腔壁的狭窄甚至破裂形成斑块^[16]。脂质包括脂肪和类脂, 脂肪被相应的水解酶水解成短链、中链、长链不等脂肪酸, 这些长短不等的小分子经过小肠的吸收, 循环如血。

巨噬细胞是早期泡沫细胞的重要来源之一。巨噬细胞表面存在着天然低密度脂蛋白受体 (LDLR), 是脂质代谢的正常途径。LDL 修饰后不能与天然 LDLR 结合, 进入正常的代谢途径, 而被细胞表面的清道夫受体识别。清道夫受体不受细胞内脂质浓度的减量调节^[17], 因而胆固醇的流入及酯化增加而流出相对减少导致脂质大量蓄积, 形成泡沫细胞^[18]。当巨噬细胞内胆固醇酯的含量占总胆固醇含量的 50%以上, 则标志泡沫细胞形成^[19]。巨噬细胞在泡沫化过程中, 还产生各种细胞因子、自由基、蛋白酶和补体因子来参与局部的炎症反应, 如白细胞介素 1 (IL-1)、白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 8 (IL-8) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等多种炎症细胞因子, 促进细胞凋亡^[20]。而且, IL-6 与 TNF- α 导致动脉粥样硬化形成与巨噬细胞表面的清道夫受体上调密切相关^[21]。综上, 可以得出巨噬细胞吞噬氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 形成泡沫细胞, 产生炎性细胞因子, 而炎症又可 ox-LDL, 进一步加强泡沫细胞的形成^[22]。

2.4 与脂质代谢相关的受体

2.4.1 PPAR (过氧化物酶体增植物激活受体)

核受体家族中最重要的成员, 分为 PPAR α , PPAR β 和 PPAR γ 三种亚型, PPAR β 在肝外器官中大大促进脂肪酸 β -氧化, PPAR γ 在脂肪细胞中存储三酰基甘油且 (PPAR γ) 是调节脂质代谢的重要转录调节因子^[23-26]。PPAR γ 在调节巨噬细胞脂质代谢、抑制促炎基因和促进 M2 型巨噬细胞的极化起到重要的作用。PPAR γ 被抑制可能对 M2 型巨噬细胞的极化产生负面影响, PPAR γ 的表达或者活性激活为巨噬细胞调节^[27-28]。PPAR 基因为本课题组师姐前期完成相关研究, 在这里仅做简要的描述, 不做过多的赘述。

2.4.2 LXR (肝 X 受体)

有两种异构体 LXR α 和 LXR β 。LXR α 主要在肝、肾、小肠、脂肪组织、巨噬细胞、脾和肺中表达; LXR β 则在所有器官以及组织中表达^[29]。LXR 是胆固醇敏感的核受体且在巨噬细胞胆固醇的稳态中起关键作用。有研究表明激活 LXR 可改善巨噬细胞泡沫细胞中脂质蓄积并减慢动脉粥样硬化的进展^[30-31]。下调 LXR 表达, 胆固醇排出受损且促进了动脉粥样硬化的进展。LXR 对于细胞内胆固醇的调控主要是通过其下游的靶基因所实现的, 其靶基因包括 ABCA1 以及 ABCG1, LXR 通过上调 ABCA1 基因的表达促使胆固醇外排, 促进胆固醇逆向转运^[32]。

2.4.3 ABCA1（三磷酸腺苷结合盒转运体 A1）

ABCA1 是一种细胞膜结合蛋白，是 ABC 转运蛋白超家族成员，负责促进胆固醇外流至成熟高密度脂蛋白，对于在巨噬细胞中防止胆固醇的积聚起着相对关键重要的作用^[33]。ABCG1 缺乏可导致泡沫细胞形成、内皮细胞功能紊乱和炎症反应等，进而影响动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)的形成与发展。以 ATP 为能源促进细胞内胆固醇流出至载脂蛋白 A-1 (apolipoprotein, apo A-1)，最终形成高密度脂蛋白，抑制泡沫细胞的形成^[34]。巨噬细胞摄取或吸入过多的以 ox-LDL 为代表的胆固醇进而成为泡沫细胞，泡沫细胞在主动脉内膜中的积累是动脉粥样硬化的发生和发展中的关键^[35]。通过血液循环将肝外细胞内的胆固醇转运到肝，在肝细胞中用于合成脂蛋白、胆汁酸、类固醇激素以及脂溶性维生素这一过程称为胆固醇逆向转运是从人体清除胆固醇的关键调节机制^[36-37]，ABCA1 和 ABCG1 是此过程中的关键角色。ABCA1 或 ABCG1 在巨噬细胞中的表达增加会促进胆固醇外流并减少泡沫细胞中胆固醇的积累，上调 ABCA1 的表达可以减少泡沫细胞脂质的积累，从而减慢胆固醇的进程动脉粥样硬化^[38-41]。通过抑制 LXR 的表达降低 ABCA1 的表达，使细胞内的胆固醇流出受阻，进而加重脂质的蓄积^[40]。

2.5 LXR-ABCA1 与矽肺泡沫细胞的关系

巨噬细胞不受限制的摄取或吸入 ox-LDL 为代表的胆固醇进而成为泡沫细胞^[42-43]，若巨噬细胞内检测到的总胆固醇中含胆固醇酯的比例超过 50%，则可视为泡沫细胞产生^[44-45]。在矽肺的发生发展中，Zhao Youliang 等人研究发现在早期的矽肺病进程中，M1 巨噬细胞被在引起炎症中起主要作用。在晚期的矽肺病，M2 巨噬细胞促进组织修复。炎症细胞因子如肿瘤坏死因子- α 和白介素 (IL) -1 β 和 IL-6 在炎症阶段表达增加，而抗炎细胞因子 IL-10 在纤维化表达也增加。此外，研究发现 STAT（信号转导和转录激活剂）和 IRF（干扰素调节因子）信号通路参与了矽肺病巨噬细胞极化的调节。总而言之，说明巨噬细胞极化与矽肺病的发生和发展密切相关，肺巨噬细胞在矽肺中起重要作用^[46-47]。Zhang Zhao-Qiang 等人通过建立大鼠矽肺模型，收集肺泡巨噬细胞进行研究，在矽肺发生发展的过程中巨噬细胞的不仅在数量有所增加以及巨噬细胞的活性也有不同程度的增加，脂质过氧化程度增加，线粒体融合和裂变基因的表达异常。最终得出矽肺病发展过程中巨噬细胞线粒体的形态和功能发生了变化，这与融合基因和裂变基因的异常表达有关^[46]。通过很多矽肺动物模型发现经过二氧化硅刺激之后，收集肺泡灌洗液，发现肺泡巨噬细

胞在数量上发生了变化。总的来说巨噬细胞在矽肺病的进展过程中起到了重要的角色。Chen S 等人以及本课题组的前期实验结果发现在肺泡巨噬细胞中 ox-LDL 和胆固醇水平随矽肺期别增高呈增加趋势，细胞泡沫化程度相应增加，但尚未阐明具体的机制^[48-49]。有研究结果显示 SiO₂ 能促进泡沫细胞的成核效率^[50]。这与本实验前一段实验结果研究一致。转录因子肝 X 受体 (LXR) 的激活对巨噬细胞脂质代谢和炎症具有有益作用，能发挥抗炎的作用，使其成为治疗心脏代谢性疾病的潜在候选者^[51-52]。Venosa Alessandro 等人研究发现，通过诱导了脂质负载的泡沫巨噬细胞的形成。他们的研究表明 NM 诱导的脂质处理和代谢改变驱动巨噬细胞泡沫细胞形成，可能导致了肺纤维化的发展^[53]。Xu Yanyong 等人研究发现，microRNA-34a (miR-34a) 是巨噬细胞胆固醇外流和通过调节 ATP 结合盒转运蛋白 ATP 结合盒亚家族 A 成员 1 (ABCA1) 和 ATP 结合盒亚家族 G 成员 (ABCG1) 而逆向胆固醇转运的关键调节剂，miR-34a 还通过肝 X 受体 α 调节 M1 和 M2 巨噬细胞极化，这些结果证明 LXR-ABCA1 在胆固醇的流出中起到了重要的作用^[54]。Gungor Burcin 等人通过研究发现，HSP70 (热休克蛋白) 与巨噬细胞 LXR 启动子相互作用，增加 LXR 及其靶 mRNA 的水平，并导致有助于胆固醇外流的关键蛋白水平升高，包括 ATP 结合盒转运蛋白 A1 和 G1^[55]。以上这些研究结果为我们研究 LXR-ABCA1 信号通路对矽肺巨噬细胞泡沫化作用的研究提供了很好的思路。

巨噬细胞或是已吞噬脂质变为泡沫细胞的巨噬细胞源性细胞，在动脉粥样硬化的发生发展中起重要作用。发生脂质代谢紊乱时，过多的胆固醇外流会受到抑制。ATP 结合盒转运蛋白 A1 (ABCA1) 通过利用 ATP 水解的能量提高胆固醇向载脂蛋白 AI (apoAI) 的流出。

2.6 矽肺治疗的研究进展

无论是从本实验的研究结果角度出发，还是从以上综述的实验结果角度出发，从哪一学说的启迪去探究矽肺的发病机制，都是为了更好了去预防矽肺的发生，延缓矽肺病的发展进程或是给予已发病的矽肺病人在治疗上提供一些方法或是启发。

2.6.1 抗纤维化的治疗

Feng Feifei 等人通过建立矽肺大鼠模型研究发现丹参酮 IIA 给药显著抑制了二氧化硅诱导的上皮-间质转化 (EMT) 和转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) / Smad 信号通路，起到了抗纤维化的作用^[56-57]。Zhou Qiang 等人通过二氧化硅滴注的方式建

立小鼠矽肺模型，研究发现 PolyG（聚鸟苷酸钾盐）可以有效地降低 γ -H2AX 的蛋白表达，并降低二氧化硅处理的小鼠肺中与纤维化相关的基因（例如 Col1a1 和 Col3a1）的水平，以及与纤维化相关的蛋白 α -SMA 和波形蛋白的水平，起到了抗纤维化的作用，为矽肺的治疗提供了新的靶点^[58]。我们知道矽肺的特征性改变是由于二氧化硅的刺激引发炎症和纤维化，其中吸入到肺部的二氧化硅被肺泡巨噬细胞吞噬是炎症形成的源头，He Xiu 等人研究发现转录因子 EB（TFEB）核易位诱导自噬和溶酶体生物发生可以挽救纤维化疾病，巨噬细胞中自噬的药理学抑制作用和 TFEB 敲低都显著消除了 TFEB 过表达或 Tre（TFEB 激活剂海藻糖）治疗引起的抗凋亡和抗炎作用，为治疗矽肺提供了新的策略^[59]。Chen Yingying 等人通过体外实验选取了几种不同来源的细胞，最终研究得出抗 miR-155-5p 处理可提高二氧化硅诱导的小鼠中的甲胎蛋白 α 含量，减轻的巨噬细胞和成纤维细胞活化，并减轻肺纤维化^[60]。Xu Tiantian 等人从 microRNA 的角度出发研究发现 miR-326 的表达增加则减轻了二氧化硅诱导的肺纤维化，为二氧化硅诱导的肺纤维化的治疗策略提供新的思路^[61]。Li Nannan 等人研究发现黄芪甲苷（ASV）对矽肺成纤维细胞的作用，通过建立矽肺大鼠模型，得出 ASV 可抑制成纤维细胞中胶原蛋白的表达和成肌纤维细胞的转化，并具有抗矽肺纤维化的作用，可能与 TGF- β 1/ Smad 信号通路中 Smad3 的持续磷酸化有关，为矽肺的治疗研究又提供了新的思路^[15]。Burmeister Rachel 等人从二氧化硅的毒性出发，通过研究发现羟氯喹可以阻断 LMP，并可以显著降低 cSiO 诱导的毒性^[62]。这样可以使我们不仅是从机制上去规避矽肺的发生或是在矽肺已发生的病例中去延缓病人病情的进展，我们也可以从源头上控制，使二氧化硅的致毒性降低，可以对矽肺病人的肺部损伤降到最小。Liu Hangqi 等人通过已被证明具有抗炎和抗纤维化的功能的天然植物与水果中发现了 Kaempferol（Kae）类黄酮，建立矽肺模型，从模型中得出 Kae 抑制了二氧化硅诱导的肺纤维化的进展，为抗纤维化的治疗又提供了新有利的证据^[63]。很多矽肺的治疗机制我们是通过体内外的实验获得，为我们提供了很多丰富的理论依据。有很多作者像 Sun Jianling 等人，通过收集 40 到 70 岁的 196 例矽肺病患者。根据不同的治疗方法将患者分为两组，对照组 108 例接受抗炎，止咳，平喘等常规治疗，观察组 88 例在常规治疗的基础上联合粉防己碱和 N-乙酰半胱氨酸治疗，最终发现粉防己碱联合乙酰半胱氨酸可有效提高矽肺病的临床治疗效果，减轻矽肺患者的炎症反应程度。外周血中 IL-6 和 TNF- α 的水平对于矽肺病的临床治疗很有价值^[64]。以上这些实验结果都是针对于矽肺纤维化方面的治疗。

2.6.2 中药治疗

在很多的研究中发现，用中药对于矽肺的治疗产生了和明显的效果，孙学鹏等人通过研究发现用黄芪及其提取物在矽肺的纤维化过程的过程中得到了很好的防治效应，用手掌参有效的抑制了胶原的合成，延缓了矽肺的肺间质纤维化^[65]。冬虫夏草在我国为很名贵的中药，提起它都会想起冬虫夏草可以补气，止咳化痰，增强机体的免疫力，有人通过研究发现冬虫夏草可以抑制矽肺炎性因子及其下游的表达，进而有效的延缓了矽肺纤维化的发生，改善了肺功能，对矽肺的治疗产生了明显的效果。袁妃妃等人通过研究发现在建立矽肺纤维化模型当中，运用丹参的治疗可以有效地减少肺组织中的羟脯氨酸含量同时在清除自由基方面也得到了很明显的效果，在整体的氧化与抗氧化状态中起到了很好的平衡作用，有效地延缓了矽肺纤维化的发展进程^[66]。也有人通过实验证实五味子使谷胱甘肽的含量增多，在提高抗氧化能力方面做出了巨大的贡献，对矽肺起到了很好的保护作用。经研究证实不仅单纯的中药可以在矽肺的发生发展以及预防等方面起到作用，一些中药汤剂以及复方制剂同样可以起到很好的疗效，例如参麦注射液，可以通过提高超氧化物歧化酶的含量来改善矽肺病患者的抗氧化能力，有效的延缓了西非的发生发展。不同矽肺病患者有不同的临床症状，贝母瓜蒌汤通过改善矽肺病患者的肺泡通气量，血样分压等有效的缓解肺组织呼吸功能，防治了矽肺纤维化的形成。在矽肺的发生发展的进程中无时无刻都伴随着矽肺纤维化的发生，郭敬文等人通过研究发现天然的药物同样可以在矽肺的发生发展中做出巨大的贡献，大黄素可以减少肺组织胶原的含量，使平滑肌肌动蛋白的表达降低，改善肺组织的损伤，有效的防止矽肺肺纤维化的进程^[67]。Yu 等人研究发现，人参皂苷可以在淋巴循环方面起到积极作用，通过降低血管内皮生长因子及受体的表达，有效的缓解了矽肺模型中对二氧化硅的负荷能力来延缓矽肺病的发展进程。黄芩苷可以通过降低一些炎症因子的表达来改善矽肺模型中肺纤维化。刘楠等人通过研究发现槲皮素可以通过降低羟脯氨酸的含量，增加谷胱甘肽的表达在矽肺氧化与抗氧化中发挥了巨大作用，有效的延缓了矽肺纤维化的发展进程。很多人用中药治疗矽肺病，首先最先考虑的是中药安全，副作用小，不会对人体机能产生更大的损伤。也会有一部分人认为中药可以治本，而西药更多治标，不能从根源上实现药到病除。无论从哪一面进行考虑或是探究，都是为了更好制止疾病的发生发展。综合来考量或许两种办法的综合治疗会事半功倍，传统中药虽治愈率高，副作用小，但是往往进展缓慢，很难尽快去看到疗效，像病程相对危重的人，相对不适用于缓慢的治疗方法。西药虽可尽快减轻病人的痛

苦，在症状上有效缓解病人的疼痛，但随之而来的负面影响如副作用大，是本来未治愈的机体又增添了新的疾病。因此将两种治疗方法结合可以是疾病的治疗达效果达到最佳。周艳峰等人通过研究发现通过中药联合西药的治疗，从肺的通气功能上有效改善了矽肺患者的呼吸功能，延缓矽肺的发生发展^[68]。谭烽等人通过加味贝母瓜蒌汤结合临床治疗手法，通过改善患者的血氧饱和度以及氧分压等指标有效的延缓了矽肺的发生发展^[69]。

2.6.3 矽肺并发症及其治疗

比较公认的说法且从实验中印证得出的是矽肺疾病引起肺部弥漫性纤维化，因此，很多人都致力于不仅从表象甚至是机制方面去探究矽肺纤维化，而往往忽略了矽肺的并发症及其治疗对于矽肺的研究同样有着不可或缺的意义。目前都知道矽肺的主要并发症有慢性支气管炎、肺结核、自发性气胸、肺部感染、肺源性心脏病、呼吸衰竭以及肾功能衰竭等。这些并发症的发生发展同样使我们在对矽肺患者进行治疗的同时起到阻碍的作用，因此，在临床中，我们不仅要治疗矽肺本身的病症，治疗并发症尤其防治并发症的发生对于我们来说同等重要。赵磊等人总结了一些常用的护理方法对日后临床中矽肺并发症的治疗有很大的借鉴意义。当矽肺病人并发有慢性支气管炎的时候，可以使用超声雾化以及体位引流等措施将患者的痰液排出，也可针对特定的致病菌选用抗生素敏感性相对较低的药物进行联合治疗，有效缓解病人的痛苦^[70-71]。当矽肺病人并发阻塞性肺气肿时，同样可以通过引流的方式将胸腔内的积液排出，采取适当的体位，注意给病人保持吸氧可以有效缓解病人的苦痛。当矽肺病人并发肺源性心脏病时，首先要保证病人充分休息，其次随时要借助一些影像学手段密切观察病人的病程进展情况，以便随时采取应对措施。最后要注重的呼吸道通畅以及出现呼吸困难时要采取正确的体位。肺结核是通过飞沫核可以进行传播的疾病，也是我们在入学前会进行筛查的一种疾病。近年来结核病患者的人数在不断攀升，矽合并肺结核的人数也在不断增长，我们要针对病原菌采取措施，防止疾病的进一步发展，同样也要注意休息与防护。

2.6.4 其他方面的治疗

从矽肺的机制着手，是为了更好从根源上控制矽肺病的发生，若是已发病的病人，只能从延缓疾病的角度出发。郭介飞等人通过将矽肺病患者分成两组，用苦参素注射液治疗矽肺，通过治疗发现血清超氧化物歧化酶、第一秒用力呼气容积、用力肺活量、胸部 X 线片改变等情况得出明显好转^[72]。这样通过中药疗法，改变矽

肺患者呼吸功能，能明显延缓会减轻患者的病痛。矽肺的早期病变主要是炎症和纤维化，很多研究或是质量都是从这两点入手。若矽肺不及时治疗，会引起严重的并发症。赵玉珂等人将矽肺患者分为对照和实验两组，用参多酚酸盐联合无创通气治疗矽肺合并肺心病，通过测量分析实际最大通气量/预计值、肺活量/预计值、1 秒用力呼气容积/预计值等指标，发现用参多酚酸盐联合无创通气治疗能够显著提高临床效果^[73]。陈至佳等人收集矽肺合并肺部感染患者 100 例，将病例分为两组，采用氧气雾化吸入治疗的方法，明显改善了患者的临床状态^[74]。为我们课题组的岩盐疗法将来广泛用于临床做好铺垫。在众多矽肺的并发症中，慢性肺阻塞性疾病较为常见。李鸣等人收集确诊为矽肺合并慢性阻塞性肺疾病稳定期的 60 例患者并将其分为两组，用噻托溴铵联合沙美特罗替卡松吸入治疗矽肺并发慢性阻塞性肺疾病，观察并分析用力肺活量（FVC）、第 1 秒用力呼气量（FEV1）、FEV1/FVC、第 1 秒用力呼气容积占正常预计值百分比（FEV1%）等指标，发现患者肺功能恢复较好^[75]。戚静等人收集矽肺患者并将其分为两组，通过汉防己甲素联合乙酰半胱氨酸泡腾片的治疗，发现矽肺患者肺部功能有所改善，其不良反应发生率也相对较低^[76]。以上这些实验结果为解决患者的临床状态提供了很好的思路。黄福林等人通过收集矽肺患者并将其分为两组，用沙美特罗替卡松联合噻托溴铵进行治疗，发现能够降低患者的气促指数，改善患者的肺功能状况，提高临床效果^[77-78]。Zhang Jing 等人通过对章丘区妇幼保健院收治的 149 例矽肺病患者进行回顾性分析，在 149 例患者中，对照组为乙酰半胱氨酸治疗的患者为 70 例，粉防己碱为治疗的 79 例结合乙酰半胱氨酸组成研究组，通过分析得出粉防己碱联合乙酰半胱氨酸可通过抑制 TGF- β 1 和 MMP-7 的表达来改善矽肺患者的肺功能和运动耐量，从而提高临床疗效^[79-80]。Liu 等人将患有肺部矽肺病的患者（这些患者先前已被含有人 HGF cDNA 的载体（MSCs（间充质干细胞）/HGF（肝细胞生长因子））转染），每周连续三周静脉内注射 MSCs / HGF，剂量为 2×10^6 细胞/kg，治疗后六个月，咳嗽和胸部不适等症状逐渐改善，并伴有肺功能的明显改善，CT 扫描显示，在至少 12 个月的随访期间，肺中的结节和网状结节病灶被部分吸收^[81]。这些临床方法有效的缓解了矽肺患者的临床状态。

综上所述，目前临床上针对于矽肺的治疗方法如抗纤维化的治疗、中药治疗、中药联合西药、中药联合临床疗法、并发症的治疗如针对慢性支气管炎、肺结核、自发性气胸、肺部感染、肺源性心脏病、呼吸衰竭以及肾功能衰竭等。还有诸如一些支气管肺泡灌洗术以及间充质干细胞的转移等。对矽肺的治疗有一定的积极意义^[82]。在后续对矽肺的临床治疗当中不仅可以继续采取以上的临床治疗方式，

更可以在原有方式方法的基础之上进一步去更新或是进行改进以更好的治疗方法去治疗矽肺及其并发症。

2.6.5 矽肺病防治的应用意义

无论从本文机制研究的角度出发还是通过研读大量的参考文献临床矽肺病例的层面出发，我们不仅想要在治愈矽肺患者的方式方法上寻求新的突破点，更想要的是从根源上去解决矽肺病的发生。因为想要到了我们做实验，做科学研究的应用价值与意义。因此针对本文的研究为矽肺病的防治做一个简单的分析。在答辩以及盲审过程中有专家会提问你的研究的应用价值是什么，因此，在论文中对本研究的应用价值作一阐述。本文是通过 PPAR γ -LXR-ABCA1 信号通路调控泡沫化参与矽肺脂质代谢，脂质代谢是矽肺众多机制学说中的一个，本课题组前期实验结果，从不同期别的矽肺患者中检测出过高的胆固醇酯以及通过油红 O 染色，同样在镜下观察到泡沫细胞，说明脂质代谢参与矽肺患的发生发展。从机制的角度去探究脂质代谢的发生发展，为从根源上解决矽肺病的进程提供了很好的思路。对临床上矽肺患者的血液标本进行检测若发现过高的胆固醇可以采取及时有效的措施对病人的治疗都可以起到良好的治疗效果。从根源上防止矽肺的发生，也从脂质代谢的角度去延缓矽肺病的发展进程。PPAR γ -LXR-ABCA1 信号通路上的受体有不同的沉默剂或是激动剂，这一点可以激发我们大胆的想法，可以根据这些激动剂或是沉默剂的效应原理，去制成临床上治疗矽肺的药物。临床药物的应用首先要经历动物实验到临床的实验的研究才能外推到人的应用，经历一个相当漫长的过程。虽经历各种临床的实验才能得以实现，但是为矽肺的防治提供了新的想法。本课题组的岩盐气溶胶对矽肺大鼠的防治，从形态学的结果得出有了一定的疗效，从肺泡灌洗液以及血液中一些炎症因子或是纤维化的因子结果得出表达下调，说明岩盐气溶胶对矽肺的预防与治疗起到了一定的作用。在新冠疫情的防控中，我校将岩盐治疗仪器捐赠武汉，用于武汉一线的防疫与治疗。现在虽不知反馈结果，相信会对病人在呼吸功能方面的有一定的积极作用。

参考文献

- [1] 张永红, 张晨宁, 郑涛, 等. 尘肺病的发病机制与药物治疗研究进展[J]. 中南药学, 2019, 17(7):1051-1055.
- [2] 2017 年全国职业病报告情况[J]. 中国职业医学, 2018, 45(3):296.
- [3] 孙雪鹏. 中药及其提取物干预矽肺发病机制的研究进展[J]. 环球中医药, 2018,

11(12):2057-2060.

- [4] 高衍新, 王瑞. 矽尘致肺纤维化机制及细胞因子在矽肺纤维化中的作用[J]. 中国工业医学杂志, 2008, 01:31-35.
- [5] WILLIS BC, LIEBLER JM, LUBY PK al. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 2005, 166(5):1321-32.
- [6] 吕丽娜, 王欣, 陈莹, 等. CD36 功能肽段对小鼠实验性矽肺组织内, III型胶原表达的影响[J]. 中国工业医学杂志, 2009, 03:171-174.
- [7] 史瑾, 陈莹, 陈杰. γ -干扰素对染矽尘大鼠肺脏成纤维生长因子-b 和转化生长因子- β 1 蛋白表达的影响[J]. 工业卫生与职业病, 2004, 06:346-348.
- [8] 陈莹, 董静, 陈杰. γ -干扰素对矽肺大鼠肺脏白介素-4 和转化生长因子- β 1 蛋白表达的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2004, 05:36-39.
- [9] FUBINI B, HUBBARD A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2003 Jun 15; 34(12):1507-1516.
- [10] XIAO-LL. FGF21 Increases Cholesterol Efflux by Upregulating ABCA1 Through the ERK1/2-PPAR γ -LXR α Pathway in THP-1 Macrophage-Derived Foam Cells[J]. *DNA AND CELL BIOLOGY*, 2014(33):514-521.
- [11] ZHANG ZQ SHAO B, HAN GZ et al. in vivo Location and dynamic changes of inflammation, fibrosis, and expression levels of related genes in SiO₂-induced pulmonary fibrosis in rats[J]. *Toxicol Pathol*, 2019, 32:253-260.
- [12] DU ST, LI C, LU YP et al. Dioscin Alleviates Crystalline Silica-Induced Pulmonary Inflammation and Fibrosis through Promoting Alveolar Macrophage Autophagy[J]. *Theranostics*, 2019, 9:1878-1892.
- [13] SAI LL, YU GC, BO CX, et al. Profiling long non-coding RNA changes in silica-induced pulmonary fibrosis in rat[J]. *Toxicol Lett*, 2019, 310:7-13.
- [14] XU TT, YAN WW, WU QY, et al. MiR-326 Inhibits Inflammation and Promotes Autophagy in Silica-Induced Pulmonary Fibrosis through Targeting TNFSF14 and PTBP1[J]. *Chem Res Toxicol*, 2019, 32:2192-2203.
- [15] LI NN, FENG FF, WU KE, et al. Inhibitory effects of astragaloside IV on silica-induced pulmonary fibrosis via inactivating TGF- β 1/Smad3 signaling[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 119:109387-109396.

- [16] 翟科峰, 段红, 李洁, 等. 涉及脂质代谢的 miRNA 及其对动脉粥样硬化发展和治疗的进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(12):5692-5698.
- [17] 倪敬年, 时晶, 田金洲. LDL 的化学修饰及其致动脉粥样硬化作用[J]. 中国老年学杂志, 2016(11):1586-1588.
- [18] TSUI L, CHANG SF, HUANG HP. YC-1 induces lipid droplet formation in RAW 264.7 macrophages[J]. Journal of Biomedical Science, 2016, 23:2-11.
- [19] 林韬琦, 卢德赵, 沃兴德. 巨噬细胞内胆固醇平衡机制研究进展[J]. 中国动脉粥样硬化杂志, 2010, 18(11):919-921.
- [20] 靳文英, 陈红. CD 36 与动脉粥样硬化 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(7):582-585.
- [21] HASHIZUME M, MIHARA M. Atherogenic effects of TNF- α and IL-6 via up-regulation of scavenger receptors[J]. Cytokine, 2012, 58(3):424-430.
- [22] 王竹, 高永翔. 动脉粥样硬化与巨噬细胞源性泡沫细胞的相关研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志 2015, 31(06):853-855.
- [23] 丁萍萍, 张陆勇. 过氧化物酶体增殖物激活受体 α 在脂质代谢中的作用研究进展[J]. 临床合理用药杂志, 2019, 12(04):177-179.
- [24] 魏鹏歌, 黄健.PPAR γ 对胆固醇代谢及代谢相关基因的影响[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(26):110-111.
- [25] WANG YP, NAKAJIMA T, GONZALEZ FJ, et al. PPARs as Metabolic Regulators in the Liver: Lessons from Liver-Specific PPAR-Null Mice[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(6).
- [26] 王乐. PPAR γ 新型配体对巨噬细胞脂质代谢的影响[D]. 大连大学, 2014.
- [27] 盛蒙许滔, 于红红, 赵立凤, 等. 黄连解毒汤含药血清激活 PPAR γ 诱导 RAW264.7 源性泡沫细胞向 M2 表型极化 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(03):277-288.
- [28] 石天娇. 基于 PPARs 通路的丹七片调控心肌缺血脂质代谢紊乱的机制研究[D]. 北京中医药大学, 2016.
- [29] 陈元利. LXR 配体与 MEK1/2 抑制剂组合药物防治动脉粥样硬化的作用与机理研究[D]. 南开大学, 2014.
- [30] BOBRY SHEV YV, IVANOVA EA, CHISTI AKOV DA, et al. Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis[J]. BioMed Research International, 2016, 2016:1-13.
- [31] BARANOWSKI M, ZABIELSKI P, BLACHNIO ZAU, et al. LXR activation prevents exhaustive exercise-induced hypoglycaemia and spares muscle glycogen but does not enhance running endurance in untrained rats[J]. Acta Physiologica, 2011, 201(3):373-379.

- [32] 付育, 李霓. 靶向肝 X 受体的抗动脉粥样硬化药物研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(03):254-263.
- [33] 付洁琦, 张晓璐, 娄宪芝, 等. ATP 结合盒转运体 G1 与动脉粥样硬化的关系[J]. 沈阳医学院学报, 2020, 22(01):73-76.
- [34] 张敏. AIBP 对 ABCA1 介导的胆固醇流出和动脉粥样硬化的影响及机制[D]. 南华大学, 2017.
- [35] 甘诗泉, 王声全, 张光琼, 等. 艳山姜挥发油通过调控巨噬细胞 CD36 和 ABCA1 表达抑制泡沫细胞的形成[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(04):64-69.
- [36] YU XH, FU YC, ZHANG DW, et al. Foam cells in atherosclerosis[J]. Clinica Chimica Acta, 2013, 424:245-252.
- [37] 徐文静. 胆固醇逆向转运和动脉粥样硬化[J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2018, 2(09):195-198.
- [38] YU XH, ZHANG DW, ZHANG XL, et al. Cholesterol transport system: An integrated cholesterol transport model involved in atherosclerosis[J]. Progress in Lipid Research, 2019,73:65-91.
- [39] TSOU CY, CHEN CY, ZHAO JF, et al. Activation of soluble guanylyl cyclase prevents foam cell formation and atherosclerosis[J]. Acta Physiologica, 2014, 210(4):799-810.
- [40] 葛樯樯, 王雪芬, 宗磊, 等. 绞股蓝总皂苷对 ApoE^{-/-}动脉粥样硬化小鼠血管 PPAR- γ /LXR- α /ABCA1 信号通路的影响[J]. 浙江医学教育, 2019, 18(04):47-50.
- [41] 欧翔, 陈凌燕, 周志姣, 等. 血管生成素 1 通过 LXR α 途径调节 THP-1 源性泡沫细胞 ABCA1, ABCG1 表达及胆固醇流出[J].中国动脉硬化杂志, 2017, 25(11):1081-1087.
- [42] PHANG SW, OOI BK, AHMAD N, et al. Maslinic acid suppresses macrophage foam cells formation: Regulation of monocyte recruitment and macrophage lipids homeostasis[J]. Vascul Pharmacol, 2020,19:106675.
- [43] ROY A, SAQIB U, WARY K, et al. Macrophage neuronal nitric oxide synthase (NOS1) controls the inflammatory response and foam cell formation in atherosclerosis[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 83:106382-106392.
- [44] 白玲, 刘平, 马爱群, 等. 抗磷脂抗体促进 ox-LDL 诱导 U937 细胞泡沫化进程及对 VEGF 分泌的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2014, 35(04):429-432.
- [45] CHEN CH, ZHAO JF, HSU CP, et al. The detrimental effect of asymmetric dimethylarginine on cholesterol efflux of macrophage foam cells: Role of the NOX/ROS signaling[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 143:354-365.

- [46] ZHANG ZQ, ZHANG CZ, SHAO B, et al. Effects of abnormal expression of fusion and fission genes on the morphology and function of lung macrophage mitochondria in SiO₂-induced silicosis fibrosis in rats in vivo[J]. *Toxicol Lett*, 2019, 312:181-187.
- [47] ZHAO YL, HAO CF, BAO L, et al. Silica particles disorganize the polarization of pulmonary macrophages in mice[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 193:110364.
- [48] CHEN S, YUAN J, YAO S, et al. Lipopolysaccharides may aggravate apoptosis through accumulation of autophagosomes in alveolar macrophages of human silicosis[J]. *Autophagy*, 2015, 11(12):2346-2357.
- [49] 张秀峰. 矽肺患者肺泡巨噬细胞中脂质代谢的变化[D]. 华北理工大学, 2017.
- [50] LIU S, EIJKELINKAMP R, DUVIGENAU J, et al. Silica assisted nucleation of polymer foam cells with nanoscopic dimensions: impact of particle size, line tension and surface functionality[J]. *Acs Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(43):37929-37940.
- [51] SMITH TKT, KAHIEL Z, LEBNICHOLAS D, et al. Characterization of Redox-Responsive LXR-Activating Nanoparticle Formulations in Primary Mouse Macrophages[J]. *Molecules*, 2019, 24(20).
- [52] KAORI EU, MAKISHIMA M. Liver X Receptors Regulate Cholesterol Metabolism and Immunity in Hepatic Nonparenchymal Cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20):5045-5421.
- [53] VENOSA A, SMITH LC, MURRAY A, et al. Regulation of Macrophage Foam Cell Formation During Nitrogen Mustard (NM)-Induced Pulmonary Fibrosis by Lung Lipids[J]. *Toxicol Sci*, 2019, 172:344-358.
- [54] XU YY, XU Y, ZHU YD, et al. Macrophage miR-34a Is a Key Regulator of Cholesterol Efflux and Atherosclerosis[J]. *Mol Ther*, 2020, 28:202-216.
- [55] GUNGOR B, VANHARANTA L, MAARIT HV, et al. HSP70 induces liver X receptor pathway activation and cholesterol reduction in vitro and in vivo[J]. *Mol Metab*, 2019, 28:135-143.
- [56] FENG FF, CHENG P, XU SH, et al. Tanshinone IIA attenuates silica-induced pulmonary fibrosis via Nrf2-mediated inhibition of EMT and TGF- β 1/Smad signaling[J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 319:109024.
- [57] FENG FF, CP, ZHANG HN, et al. The Protective Role of Tanshinone IIA in Silicosis Rat Model via TGF- β 1/Smad Signaling Suppression, NOX4 Inhibition and Nrf2/ARE Signaling Activation[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13:4275-4290.
- [58] ZHOU Q, GUAN Y, HOU RY, et al. PolyG mitigates silica-induced pulmonary fibrosis by

- inhibiting nucleolin and regulating DNA damage repair pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125:109953-109962.
- [59] HE X, CHEN S, Li C, et al. Trehalose Alleviates Crystalline Silica-Induced Pulmonary Fibrosis via Activation of the TFE3-Mediated Autophagy-Lysosomal System in Alveolar Macrophages[J]. *Cells*, 2020, 9(1):122-127.
- [60] CHEN YY, XU DJ, YAO JX, et al. Inhibition of miR-155-5p Exerts Anti-Fibrotic Effects in Silicotic Mice by Regulating Meprin α [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19:350-360.
- [61] XU TT, YAN WW, WU QY, et al. MiR-326 Inhibits Inflammation and Promotes Autophagy in Silica-Induced Pulmonary Fibrosis through Targeting TNFSF14 and PTBP1[J]. *Chem Res Toxicol*, 2019, 32:2192-2203.
- [62] BURMEISTER R, RHODERICK JF, HOLIAN A. Prevention of crystalline silica-induced inflammation by the anti-malarial hydroxychloroquine[J]. *Inhal Toxicol*, 2019, 31:274-284.
- [63] LIU HQ, YU H, CAO ZJ, et al. Kaempferol Modulates Autophagy and Alleviates Silica-Induced Pulmonary Fibrosis[J]. *DNA Cell Biol*. 2019, 38:1418-1426.
- [64] SUN JL, SONG PP, WANG Y, et al. Clinical efficacy of acetylcysteine combined with tetrandrine tablets in the treatment of silicosis and the effect on serum IL-6 and TNF- α [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18:3383-3388.
- [65] 孙雪鹏. 单味中药及其提取物治疗矽肺的研究进展[J]. *中医药学报*, 2018, 46(04):127-130.
- [66] 袁妃妃, 敖素华, 杨峰. 中医药治疗矽肺的研究进展[J]. *内蒙古中医药*, 2016, 35(01):152-153.
- [67] 郭敬文, 张振玲, 邵华. 矽肺肺纤维化治疗药物的研究进展[J]. *中国工业医学杂志*, 2018, 31(02):120-123.
- [68] 周艳峰. 中药穴位贴敷联合西药治疗矽肺临床研究[J]. *新中医*, 2020, 52(05):179-182.
- [69] 谭烽. 加味贝母瓜蒌汤治疗矽肺的临床分析[J]. *深圳中西医结合杂志*, 2015, 25(05):62-63.
- [70] 赵磊. 矽肺病人常见并发症的护理[J]. *当代临床医刊*, 2015, 28(01):1266.
- [71] 郭晓琴. 浅析矽肺的临床症状、并发症及治疗[J]. *全科口腔医学电子杂志*, 2018, 5(33):189.
- [72] 郭介飞. 苦参素注射液治疗矽肺的临床疗效及其安全性[J]. *临床合理用药杂志*, 2020, 13(03):136-137.
- [73] 赵玉珂. 丹参多酚酸盐联合无创通气治疗矽肺合并肺心病的临床效果[J]. *慢性病学杂志*,

- 2020, 21(01):28-34.
- [74] 陈至佳. 氧气雾化与超声雾化吸入对矽肺合并肺部感染应用价值比较[J]. 中外女性健康研究, 2020(01):103-178.
- [75] 李鸣, 张祖华. 噻托溴铵联合沙美特罗替卡松吸入治疗矽肺并发慢性阻塞性肺疾病的临床效果[J]. 中国当代医药, 2019, 26(27):47-50.
- [76] 戚静. 汉防己甲素联合乙酰半胱氨酸泡腾片治疗矽肺临床效果评价探究[J]. 中国社区医师, 2019, 35(22):86-88.
- [77] 黄福林. 沙美特罗氟替卡松联合噻托溴铵在矽肺治疗中的应用价值分析[J]. 中国医药指南, 2018, 16(08):152-153.
- [78] WANG X, JIANG H, YU HT, et al. Nursing intervention for respiratory function exercise in patients with silicosis complicated by stable chronic obstructive pulmonary disease[J]. Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi, 2018, 36:844-846.
- [79] ZHANG J, WANG YC, ZHANG SJ, et al. Effects of tetrandrine combined with acetylcysteine on exercise tolerance, pulmonary function and serum TNF- β 1 and MMP-7 in silicosis patients[J]. Exp Ther Med, 2020, 19:2195-2201.
- [80] SUN JL, SONG PP, WANG Y, et al. Clinical efficacy of acetylcysteine combined with tetrandrine tablets in the treatment of silicosis and the effect on serum IL-6 and TNF- α [J]. Exp Ther Med, 2019, 18:3383-3388.
- [81] LIU WW, WANG HX, YU W, et al. Treatment of silicosis with hepatocyte growth factor-modified autologous bone marrow stromal cells: a non-randomized study with follow-up[J]. Genet Mol Res, 2015, 14:10672-10681.
- [82] 周笑云, 刘桂桃. 矽肺的治疗进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(A5):134-135.

致 谢

3 年的时光悄然已过，现在浮现在脑海里的总是刚入学的场景，那是 2017 年，我怀揣着对研究生生活的向往与追求迈进了研究生学校的大门。回想这三年研究生的生活我有很多想要表达的话对在这三年帮助过我的人说说。

首先我要感谢的是我的导师刘和亮老师，在我做科研的三年里您不仅从实验、生活以及做人方面都教会了我很多，以前的我总是喜欢按部就班的去学习他人，尤其在实验上去复制别人的模式，按照他人的方式方法去解决自己实验中所遇到的问题。往往遇到了很多的阻碍，使实验处于停滞不前。是您及时告诉我要学会思考，学会发现新的突破点，尤其在科研方面一定要多动脑、勤问、勤思考，这样才能及时发现并改正实验中所遇到的问题，做实验要有自己的想法。感谢您在自己很忙的工作情况下依旧认真的去修改我的论文以及在这三年中对我的所有帮助，您治学严谨的态度、精益求精的作风以及平易近人的人格都对我影响深远。

其次我要感谢的就是我们课题组郝晓慧以及郭灵丽老师，在我的实验遇到瓶颈期的时候，不知道如何进展下去的时候，是郝晓慧老师及时帮我找到了解决的办法让我的实验顺利的进行下去，在实验中我也收获了很多想法，更多的是一些创新的思维。郝老师经常和我们探讨实验中的各种问题甚至亲自手把手去教我们，而且郝老师经常关心我们的生活状况，有问题都及时帮助。郭灵丽老师有着渊博的学识，当我对自己的课题迷惑时，郭老师以及帮我分析，解决了我实验中的困惑，让我对实验有了深层次的理解。

最后我要感谢的是我们课题组的同学，感谢田盈师姐教会我基本的实验技术，在我实验遇到问题的时候，无论她忙不忙都会耐心帮助我解决，让我及时纠正实验中的错误操作。不仅实验方面，在生活上师姐也给予我足够的关心，让我感受到温暖。感谢张劲松师弟和李欣颖师妹的帮助，感谢师妹在我实验忙的不可开胶的时候给予我的帮助；感谢江天师妹，给予我以及教会我实验中一写分析软件的应用。感谢刘超、刘肖、王苗苗我的三位室友，每次我实验遇到问题垂头丧气，丧失信心的时候，都是他们及时开导我，让我又有了信心；感谢我的闺蜜贾春影同学，感谢她分享我的忧愁与快乐；我最感谢的是我的父母，是父母给予我经济上和精神上的支持，让我没有后顾之忧的学习。是父母无条件的付出才让我有了现在的成绩。

衷心感谢各位专家在百忙之中参加我的答辩，谢谢你们们的指导与帮助，你们的指导使我的答辩更加锦上添花。

在学期间研究成果

在学期间发表论文和著作:

- [1] 徐秋敏, 崔洁, 王爽, 等. LXR-ABCA1 信号通路介导游离二氧化硅诱导巨噬细胞泡沫化[J]. 中国职业医学 (已录用, 未见刊)
- [2] 田盈, 徐秋敏, 王爽, 等. 亲环素 A 在二氧化硅诱导巨噬细胞泡沫化中的表达[J]. 中国职业医学, 2018, 45(06): 681-685.
- [3] 马景景, 江天, 崔洁, 等. 矽肺患者肺泡灌洗液中 sRAGE 表达的变化及其意义[J]. 环境与职业医学, 2019, 36(02): 170-174.
- [4] 崔洁, 陈紫莺, 马景景, 等. 丹参酮 II A 磺酸钠对大鼠矽肺早期的干预作用[J]. 环境与职业医学, 2019, 36(01): 79-83.

科研成果和奖励:

在校期间获得三等学业奖学金以及三好研究生的称号。

联系方式: