

# 抗氧化剂超氧化物歧化酶对大鼠肺巨噬细胞二氧化硅条件上清介导的肺成纤维细胞增殖及 c-myc 表达的影响

https://doi.org/10.12307/2022.484 阚泉<sup>1</sup>, 张岩<sup>2</sup>, 王海涛<sup>1</sup>, 李冉<sup>1</sup>, 田艳霞<sup>1</sup>, 吕翠平<sup>1</sup>

投稿日期: 2020-11-30

送审日期: 2020-12-04

采用日期: 2021-03-30

在线日期: 2021-09-28

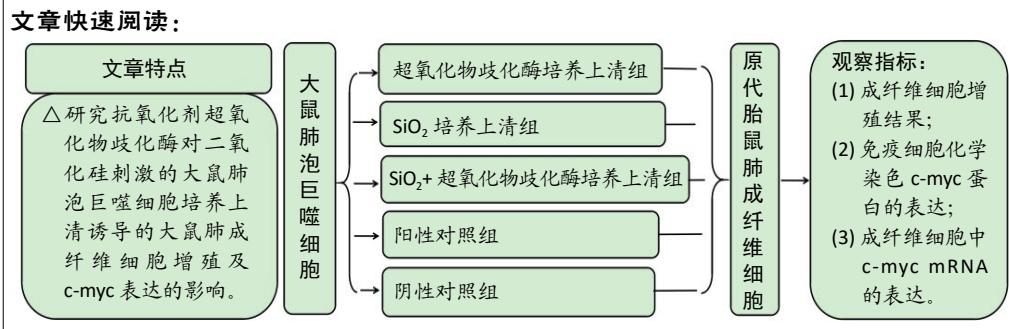
中图分类号:

R446; R496; R318

文章编号:

2095-4344(2022)14-02202-05

文献标识码: B



## 文题释义:

**超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD):** 是能清除超氧阴离子自由基的抗氧化金属酶, 它能够催化超氧阴离子自由基歧化生成氧和过氧化氢, 在机体氧化与抗氧化平衡中起到重要的作用。有研究显示超氧化物歧化酶和肿瘤有着密切的关系。

**肺泡巨噬细胞 (alveolar macrophages, AM):** 依赖于粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子由胚胎单核细胞发育而来, 在维持肺部免疫系统稳态以及宿主防御的过程中扮演着重要的角色。

## 摘要

**背景:** c-Myc是一种众所周知的致癌基因, 在许多癌症中过表达。肺泡巨噬细胞是肺脏重要的功能细胞, 它不但参与肺脏的免疫防御, 吞噬侵入肺脏的细菌颗粒, 还可分泌大量生物活性物质, 维持肺脏和机体正常的生理功能。超氧化物歧化酶和肿瘤有着密切的关系。

**目的:** 观察抗氧化剂超氧化物歧化酶对二氧化硅(SiO<sub>2</sub>)刺激的大鼠肺泡巨噬细胞培养上清诱导的大鼠肺成纤维细胞增殖及c-myc表达的影响。

**方法:** 采用肺泡原位灌注技术获取肺泡巨噬细胞, ①制备条件培养上清: 超氧化物歧化酶培养上清(超氧化物歧化酶+肺泡巨噬细胞+不加血清DMEM)、二氧化硅培养上清(二氧化硅+肺泡巨噬细胞+不加血清DMEM)、二氧化硅+超氧化物歧化酶培养上清(二氧化硅+超氧化物歧化酶+肺泡巨噬细胞+不加血清DMEM); 分别在培养1, 2, 4, 8, 16, 32 h不同时间点收取上清; ②肺成纤维细胞诱导培养: 取第3代肺成纤维细胞, 将条件上清与含体积分数5%FBS的DMEM按照1:1比例配制进行诱导, 实验分组为: 阴性对照组(体积分数2.5%FBS-DMEM培养), 阳性对照组(体积分数10%FBS-DMEM培养); 超氧化物歧化酶培养上清组; 二氧化硅培养上清组; 二氧化硅+超氧化物歧化酶培养上清组; 培养时间与上述时间点同步进行。采用MTT法、免疫细胞化学法和RT-PCR法分别检测肺成纤维细胞增殖、c-myc蛋白和mRNA的表达情况。实验方案经华北理工大学动物实验伦理委员会批准。

**结果与结论:** ①与对照组相比较, 二氧化硅培养上清组能够显著促进成纤维细胞增殖, 使c-myc蛋白及mRNA表达水平上调; 与二氧化硅培养上清组相比较, 二氧化硅+超氧化物歧化酶培养上清组成纤维细胞增殖减少, c-myc蛋白及mRNA表达水平下调(P < 0.05); ②结果说明, 超氧化物歧化酶能够抑制二氧化硅刺激的肺泡巨噬细胞培养上清介导的肺成纤维细胞增殖和c-myc表达水平的上调。

**关键词:** 肺纤维化; 超氧化物歧化酶; 肺成纤维细胞; 肺泡巨噬细胞; c-myc; 免疫细胞化学法; 反转录聚合酶链式反应; 大鼠

**缩略语:** 超氧化物歧化酶: superoxide dismutase, SOD

## Effects of superoxide dismutase on proliferation and c-myc expression of lung fibroblasts activated by supernatant of silicon dioxide-induced rat lung macrophages

Kan Quan<sup>1</sup>, Zhang Yan<sup>2</sup>, Wang Haitao<sup>1</sup>, Li Ran<sup>1</sup>, Tian Yanxia<sup>1</sup>, Lyu Cuiping<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Histology and Embryology, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, Hebei Province, China; <sup>2</sup>Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Kan Quan, Master, Lecturer, Department of Histology and Embryology, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, Hebei Province, China

**Corresponding author:** Kan Quan, Department of Histology and Embryology, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, Hebei Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** c-Myc is a well-known oncogene overexpressed in many cancers. Alveolar macrophages are important functional cells of the lungs, not only involved in the immune defense of the lungs, swallowing bacterial particles that invade the lungs, but also secreting large amounts of biologically active substances to maintain the normal physiological functions of the lungs and the body. Superoxide dismutase has a close relationship with tumors.

<sup>1</sup>华北理工大学组胚教研室, 河北省唐山市 063000; <sup>2</sup>华北理工大学附属医院, 河北省唐山市 063000

第一作者: 阚泉, 女, 1978年生, 安徽省明光市人, 汉族, 2005年华北煤炭医学院毕业, 硕士, 讲师, 主要从事肺纤维化发病机制的研究。

通讯作者: 阚泉, 硕士, 讲师, 华北理工大学组胚教研室, 河北省唐山市 063000

https://orcid.org/0000-0001-5545-2352 (阚泉)

基金资助: 河北省卫生计生厅医学科学研究课题计划(20130380), 项目负责人: 阚泉; 唐山市科技局科学技术研究与发展计划(13130291z), 项目负责人: 阚泉

引用本文: 阚泉, 张岩, 王海涛, 李冉, 田艳霞, 吕翠平. 抗氧化剂超氧化物歧化酶对大鼠肺巨噬细胞二氧化硅条件上清介导的肺成纤维细胞增殖及 c-myc 表达的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(14):2202-2206.



**OBJECTIVE:** To observe the effects of superoxide dismutase on cell proliferation and c-myc expression in lung fibroblasts activated by supernatants of silicon dioxide (SiO<sub>2</sub>)-induced rat alveolar macrophages.

**METHODS:** Alveolar macrophages were obtained by in situ alveolar lavage technique to prepare conditional culture supernatant: superoxide dismutase culture supernatant (superoxide dismutase+alveolar macrophages+serum-free DMEM), SiO<sub>2</sub> supernatant (SiO<sub>2</sub>+alveolar macrophages+serum-free DMEM), SiO<sub>2</sub>+superoxide dismutase culture supernatant (SiO<sub>2</sub>+superoxide dismutase+alveolar macrophages+serum-free DMEM). The supernatant was collected at 1, 2, 4, 8, 16, and 32 hours after culture. Induced culture of lung fibroblasts: passage 3 lung fibroblasts were taken and induced by the combination of conditional supernatant and 5% fetal bovine serum-DMEM in a 1:1 ratio. There were five groups in the experiment: negative control group (2.5% fetal bovine serum-DMEM culture), positive control group (10% fetal bovine serum-DMEM culture), superoxide dismutase supernatant group, SiO<sub>2</sub> supernatant group, and SiO<sub>2</sub>+superoxide dismutase supernatant group. Culture time was synchronized with the above time points. MTT, immunocytochemistry and RT-PCR methods were used to detect lung fibroblast proliferation, c-myc protein and mRNA expression. The study protocol was approved by the Animal Experiment Ethics Committee of North China University of Science and Technology.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Compared with the control group, cell proliferation and expression of c-myc protein and mRNA in lung fibroblasts were significantly increased in the SiO<sub>2</sub> supernatant group. Treatment with SiO<sub>2</sub> and superoxide dismutase could inhibit the elevation of cell proliferation, protein and mRNA levels of c-myc ( $P < 0.05$ ). To conclude, superoxide dismutase can attenuate fibroblast proliferation and high expression of c-myc in rat lung fibroblasts induced by supernatant of SiO<sub>2</sub>-treated lung macrophages.

**Key words:** pulmonary fibrosis; superoxid dismutase; lung fibroblast; alveolar macrophage; c-myc; immunocytochemistry; reverse transcription-polymerase chain reaction; rat

**Funding:** the Medical Science Research Project of Hebei Provincial Department of Health, No. 20130380 (to KQ); the Science and Technology Research and Development Plan of Tangshan Municipal Science and Technology Bureau, No. 13130291z (to KQ)

**How to cite this article:** KAN Q, ZHANG Y, WANG HT, LI R, TIAN YX, LYU CP. Effects of superoxide dismutase on proliferation and c-myc expression of lung fibroblasts activated by supernatant of silicon dioxide-induced rat lung macrophages. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(14):2202-2206.

## 0 引言 Introduction

矽肺是由于长期吸入大量游离二氧化硅 (SiO<sub>2</sub>) 粉尘所引起, 以矽结节的形成和弥漫性肺间质纤维化为主要病理表现的疾病<sup>[1]</sup>, 其发病机制尚未完全阐明。目前认为, 肺泡巨噬细胞 (alveolar macrophage, AM) 和成纤维细胞是矽肺发生、发展的主要效应细胞<sup>[2-3]</sup>。肺泡巨噬细胞吞噬 SiO<sub>2</sub> 粉尘后, 一方面发生呼吸爆发和脂质过氧化, 另一方面释放活性因子和炎性递质, 通过复杂的细胞网络和信号转导, 从而促进肺成纤维细胞增殖和胶原沉积, 导致肺纤维化的形成<sup>[4]</sup>。c-myc 是一类“立刻早期反应”基因, 其下游靶基因与 G<sub>1</sub> 期调控有关, 在调控细胞周期中具有关键作用<sup>[5]</sup>。在一些增殖性疾病如原代浆细胞样树突状细胞瘤、动脉粥样硬化和乳腺癌、宫颈鳞癌中 c-myc 基因均有高表达<sup>[6-10]</sup>。因此, 该研究拟通过体外实验, 观察超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 对 SiO<sub>2</sub> 刺激的肺泡巨噬细胞条件培养上清诱导的肺成纤维细胞和 c-myc 蛋白及基因表达水平的调节作用。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**1.1 设计** 体外细胞学实验分组对照, 方差分析结合 SNK 检验。

**1.2 时间及地点** 实验于 2019 年 3-12 月在华北理工大学组胚教研室实验室完成。

**1.3 材料**

**1.3.1 主要试剂** SiO<sub>2</sub> 粉尘 (中国预防医学科学院劳卫所), SOD 和 MTT (Sigma 公司), 胰蛋白酶、DAB、引物 (北京华美生物工程公司), 胎牛血清 (Heclony 公司), c-myc 抗体、免疫组化试剂盒 (美国 SANTA CRUZ 公司), 反转录试剂盒 (Takara 公司), PCR 试剂盒、DNA marker (上海生物工程公司)。

**1.3.2 实验动物** 1.5 月龄 Wistar 大鼠, 雌性 25 只, 雄性 75 只, 体质量 200 g 左右, 购置于北京华阜康生物技术有限公司, 许可证号: SYXK(冀)2015-0038, 饲养于华北理工大学动物屏障实验室。实验前饲养于科室动物房大塑料笼中, 阳

光温度适宜, 食水充足自取, 将雌 1 只与雄 3 只合笼后取孕 Wistar 大鼠。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 大鼠肺泡巨噬细胞的获取与富集** 用支气管肺泡原位灌注术获取大鼠肺泡巨噬细胞。将肺泡巨噬细胞用体积分数 10% 胎牛血清 DMEM 培养液稀释至 5×10<sup>5</sup> 浓度, 接种于 24 孔培养板。

**1.4.2 SiO<sub>2</sub> 粉尘悬液和肺泡巨噬细胞条件培养上清的制备** 将 SiO<sub>2</sub> 粉尘用 PBS 配制成 1 g/L 悬液, 灭菌后备用。弃去培养板中的培养液, 加入无血清 DMEM 培养液, 分别加入 SiO<sub>2</sub>、SOD 和 SiO<sub>2</sub>+SOD 各 1 mL, 获取培养上清液。① SiO<sub>2</sub> 培养上清: SiO<sub>2</sub> (终浓度为 50 mg/L) 与 5×10<sup>5</sup> 浓度肺泡巨噬细胞不加血清的 DMEM 培养液共同孵育; ② SiO<sub>2</sub>+SOD 培养上清: SiO<sub>2</sub> (终浓度为 50 mg/L) 和 SOD (终浓度为 1 000 U/mL) 与 5×10<sup>5</sup> 浓度肺泡巨噬细胞不加血清的 DMEM 培养液共同孵育; ③ SOD 培养上清: SOD (终浓度为 1 000 U/mL) 与 5×10<sup>5</sup> 浓度肺泡巨噬细胞不加血清的 DMEM 培养液共同孵育。以上各组分别在 1, 2, 4, 8, 16, 32 h 不同时间点收取上清, 针式滤器滤过除菌, 4 ℃ 保存备用。

### 大鼠肺泡巨噬细胞的培养及鉴定

**细胞来源:** 用支气管肺泡原位灌注术获取大鼠肺泡巨噬细胞

**培养基介绍:** 无血清 DMEM 培养液

**添加材料:** 阴性对照组: 体积分数 2.5% FBS-DMEM 培养液;

阳性对照组: 体积分数 10% FBS-DMEM 培养液;

SOD 培养上清组: 加入 SOD 与无血清 DMEM 培养液;

SiO<sub>2</sub> 培养上清组: 加入 SiO<sub>2</sub> 与无血清 DMEM 培养液

SiO<sub>2</sub>+SOD 培养上清组: 加入 SiO<sub>2</sub> 和 SOD 与无血清的 DMEM 培养液

**培养时间:** 各组分别在 1, 2, 4, 8, 16, 32 h 不同时间点收取上清

**细胞传代:** 原代细胞

**细胞鉴定:** 倒置相差显微镜形态学鉴定<sup>[11]</sup>

**伦理学批准:** 实验方案经华北理工大学动物实验伦理委员会批准, 批准号为 LX2019056

1.4.3 大鼠成纤维细胞的获取和分组 取孕 Wistar 大鼠腹中的胎鼠,按尹红玲<sup>[12]</sup>结合消化分散法分离肺成纤维细胞。取第3代肺成纤维细胞,更换为含体积分数5%FBS的DMEM,将条件上清与含体积分数5%FBS的DMEM按照1:1比例配制进行诱导。实验分组为:阴性对照组(2.5%FBS-DMEM培养)、阳性对照组(10%FBS-DMEM培养)、SOD培养上清组、SiO<sub>2</sub>培养上清组、SiO<sub>2</sub>+SOD培养上清组。

1.4.4 MTT法测定成纤维细胞增殖<sup>[13]</sup> 实验分组同1.4.3。将肺成纤维细胞按5×10<sup>3</sup>/孔接种于96孔板内,每孔分别加条件培养上清与等量含5%FBS-DMEM培养液混合液100 μL,每组设6个复孔,同步化培养。分别于干预1,2,4,8,16,32 h倒掉上清,每孔加100 μL DMEM培养液和10 μL 5 g/L MTT溶液,37 °C条件下孵育4 h,弃去培养基,加入100 μL 二甲基亚砜。用酶标仪在595 nm处测各孔A值,每次测重复3次。

1.4.5 免疫细胞化学法检测成纤维细胞c-myc蛋白的表达 实验分组同1.4.3。取第3代细胞做成纤维细胞爬片,将条件上清与等量含5%FBS-DMEM培养液混合,分别孵育1,2,3,4,5,6,7 h。按SP试剂盒进行免疫细胞化学操作,自动图像分析系统进行半定量分析,取其积分吸光度值为量化指标。

1.4.6 RT-PCR法测定成纤维细胞中c-myc mRNA的表达<sup>[14-15]</sup> 用Trizol试剂提取肺成纤维细胞总RNA,进行反转录和PCR反应。引物序列为:c-myc(548 bp):(forward primer)5'-AGT GCA TTG ATC CCT AGT GGT CTT TCC CTA-3';(reverse primer)5'-CAG CTC GGT TCC TCC TCT GAC GTT CCA AGA CGT T-3'; GAPDH(389 bp)5'-CTT CTG AGT GGC AGT GAT GG-3'; 5'-TGG CAC AGT CAA GGC TGA GA-3'。①反转录反应:反应条件:42 °C 15 min,95 °C 2 min;②PCR反应:c-myc扩增反应条件:94 °C 20 s,58 °C 45 s,72 °C 45 s,31个循环;最后72 °C延伸7 min;内参照GAPDH扩增反应条件为:94 °C 50 s,57 °C 50 s,72 °C 1 min,24个循环;最后72 °C延伸8 min。PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳。使用图像分析系统对电泳条带进行分析,以目的条带和GAPDH条带吸光度比值表示c-myc的相对表达。

1.5 主要观察指标 ①成纤维细胞增殖结果;②免疫细胞化学染色c-myc蛋白的表达;③成纤维细胞中c-myc mRNA的表达。

1.6 统计学分析 采用SPSS 11.0软件进行统计学分析,所有计量资料数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同组之间均数比较用方差分析,组间比较采用SNK检验。各时间点条件培养上清样本数用n表示。

## 2 结果 Results

2.1 MTT法测定成纤维细胞增殖结果 SiO<sub>2</sub>培养上清可促进大鼠成纤维细胞增殖,其中以4 h促增殖作用最强。SiO<sub>2</sub>+SOD培养上清促成纤维细胞增殖能力主要于8 h时最高,

SOD培养上清促成纤维细胞增殖能力主要于16 h时最高,见表1。

表1 | 肺泡巨噬细胞体外培养条件上清干预不同时间点对成纤维细胞增殖作用 ( $\bar{x} \pm s, n=6, A$ 值)

Table 1 | The effect of conditioned supernatant of alveolar macrophages *in vitro* on the proliferation of fibroblasts at different time points

时间	SOD 培养上清组	SiO <sub>2</sub> 培养上清组	SiO <sub>2</sub> +SOD 培养上清组	阳性对照组	阴性对照组
1 h	0.539±0.012 <sup>a</sup>	0.650±0.009 <sup>bc</sup>	0.615±0.010 <sup>abd</sup>	0.836±0.059	0.533±0.043
2 h	0.566±0.005 <sup>a</sup>	0.771±0.014 <sup>bc</sup>	0.632±0.016 <sup>abd</sup>		
4 h	0.584±0.008 <sup>a</sup>	0.786±0.002 <sup>bc</sup>	0.655±0.005 <sup>abd</sup>		
8 h	0.586±0.015 <sup>a</sup>	0.712±0.017 <sup>bc</sup>	0.693±0.008 <sup>abd</sup>		
16 h	0.612±0.012 <sup>a</sup>	0.670±0.019 <sup>bc</sup>	0.647±0.007 <sup>abd</sup>		
32 h	0.542±0.005 <sup>a</sup>	0.643±0.006 <sup>bc</sup>	0.606±0.016 <sup>abd</sup>		

表注:与阴性对照组比较,<sup>a</sup>P<0.01;与SOD培养上清组比较,<sup>b</sup>P<0.05,<sup>c</sup>P<0.01;与SiO<sub>2</sub>培养上清组比较,<sup>d</sup>P<0.05。SOD:超氧化物歧化酶

实验将MTT法检测的A值与阴性对照A值的比值算出A值增长率。各组干预1,2,4,8,16,32 h的A值增长率,SiO<sub>2</sub>培养上清组分别为122%,145%,147%,134%,126%,121%;SiO<sub>2</sub>+SOD培养上清组分别为115%,119%,123%,130%,121%,113%;SOD培养上清组分别101%,106%,109%,110%,115%,102%。以上各实验组与阴性对照组比较均有显著性差异,说明大鼠肺泡巨噬细胞条件培养上清均可促成纤维细胞增殖。

2.2 免疫细胞化学法检测c-myc蛋白的表达结果 取各组促成纤维细胞增殖能力最强时间点的肺泡巨噬细胞培养上清,分别是培养4 h的SiO<sub>2</sub>培养上清、培养8 h的SiO<sub>2</sub>+SOD培养上清及培养16 h的SOD培养上清,分别用其作用于肺成纤维细胞不同时间点,各组c-myc蛋白的表达高峰均在3 h。见表2。

表2 | 体外培养条件上清干预不同时间点对成纤维细胞中c-myc蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ ,积分吸光度值)

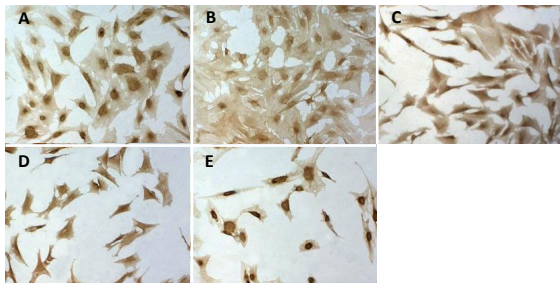
Table 2 | The effect of *in vitro* conditioned supernatant intervention at different time points on the expression of c-myc protein in fibroblasts

时间	SiO <sub>2</sub> 培养上清组	SiO <sub>2</sub> +SOD 培养上清组	SOD 培养上清组	阳性对照组	阴性对照组
1 h	21.102±1.551 <sup>ab</sup>	15.891±0.715 <sup>abd</sup>	5.254±0.402 <sup>ab</sup>	3.446±0.343	19.015±1.370
2 h	23.278±1.348 <sup>ab</sup>	17.556±1.012 <sup>abd</sup>	10.535±0.565 <sup>ab</sup>	10.020±0.403	28.313±2.294
3 h	35.783±1.895 <sup>abc</sup>	22.368±1.218 <sup>abd</sup>	13.992±0.716 <sup>abc</sup>	10.691±0.592	49.220±2.146
4 h	31.256±1.572 <sup>ab</sup>	17.383±0.949 <sup>abd</sup>	11.752±0.518 <sup>ab</sup>	9.793±0.502	36.725±1.487
5 h	20.182±0.926 <sup>ab</sup>	13.341±0.823 <sup>abd</sup>	8.476±0.493 <sup>ab</sup>	6.005±0.413	26.547±1.053
6 h	19.535±0.834 <sup>ab</sup>	7.913±0.756 <sup>abd</sup>	6.308±0.412 <sup>ab</sup>	3.693±0.322	24.731±0.842
7 h	10.241±0.623 <sup>ab</sup>	7.461±0.503 <sup>abd</sup>	6.223±0.385 <sup>ab</sup>	2.698±0.213	10.572±0.631

表注:与阴性对照组比较,<sup>a</sup>P<0.01;与阳性对照组比较,<sup>b</sup>P<0.01;与SiO<sub>2</sub>培养上清组比较,组内比较,<sup>c</sup>P<0.01;与SiO<sub>2</sub>培养上清组和SOD培养上清组比较,<sup>d</sup>P<0.05。SOD:超氧化物歧化酶

免疫细胞化学染色c-myc阳性染色颗粒呈黄褐色,主要分布于细胞核内及核膜上,胞浆内也有少量的分布。SiO<sub>2</sub>培养上清组培养4 h时对肺成纤维细胞c-myc表达有较强的促进作用,细胞核染色成棕黑色,见图1A;SiO<sub>2</sub>+SOD培养上清组培养8 h时对肺成纤维细胞c-myc表达的促进作用明显减弱,细胞核呈棕褐色,见图1B。SOD培养上清组对肺成纤维细胞c-myc的表达也有微弱影响,细胞核呈棕黄色,见图1C。图像分析的积分吸光度值显示,在对应的各个时间点上

SiO<sub>2</sub>+SOD 培养上清组对肺成纤维细胞培养后肺成纤维细胞的 c-myc 表达量明显低于 SiO<sub>2</sub> 培养上清组 ( $P < 0.05$ )。

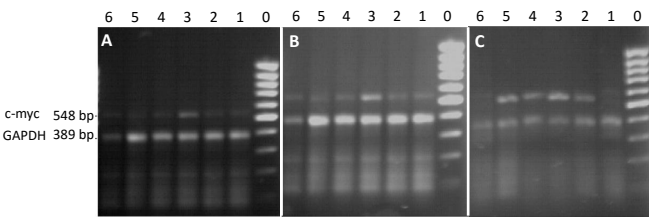


图注：图 A 为培养 4 h 的 SiO<sub>2</sub> 培养上清组；B 为培养 8 h 的 SiO<sub>2</sub>+SOD 培养上清组；C 为培养 16 h 的 SOD 培养上清组；D 为阴性对照组；E 为阳性对照组。SOD：超氧化物歧化酶

图 1 | 条件培养上清诱导肺成纤维细胞不同时间 c-myc 蛋白免疫细胞化学染色结果 (SP 法 DAB 显色, ×400)

Figure 1 | Immunocytochemical staining of c-myc protein in lung fibroblasts after 3 hours of induction (SP method, DAB, ×400)

2.3 RT-PCR 法测定成纤维细胞中 c-myc mRNA 表达结果 GAPDH 内参条带扩增均匀, 条带位于 389 bp 处, 于大约 548 bp 处可见扩增的 c-myc 单一条带, 条带清晰可见, 见图 2。



图注：图 A 为培养 4 h 的 SiO<sub>2</sub> 培养上清组；B 为培养 8 h 的 SiO<sub>2</sub>+SOD 培养上清组；C 为培养 16 h 的 SOD 培养上清组。0：Marker；1-6：分别为孵育 1-6 h。SOD：超氧化物歧化酶

图 2 | 条件培养上清诱导肺成纤维细胞不同时间 c-myc 基因 RT-PCR 产物凝胶图

Figure 2 | Gel images of RT-PCR product of c-myc gene in lung fibroblasts induced by conditioned culture supernatant at different times

结果用 Quantity One 软件分析, 计算出 c-myc/GAPDH 比值。可以看出肺成纤维细胞内 c-myc mRNA 在 1 h 时已有表达, 3 h 达到高峰, 随后又有所下降。将其每组数据两两相比差异有显著性意义 ( $P < 0.01$ ), 说明 3 组间存在差异, 在总体趋势上讲, SiO<sub>2</sub>+SOD 培养上清组刺激肺成纤维细胞中 c-myc 表达的作用强于 SOD 培养上清组, 而弱于 SiO<sub>2</sub> 培养上清组, 见表 3。

表 3 | SiO<sub>2</sub> 培养上清组、SiO<sub>2</sub>+SOD 培养上清组和 SOD 组的 c-myc/GAPDH 比值 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ , c-myc/GAPDH)

Table 3 | c-myc /GAPDH ratio of SiO<sub>2</sub> supernatant group, SiO<sub>2</sub>+superoxide dismutase supernatant group and superoxide dismutase supernatant group

时间	SiO <sub>2</sub> 培养上清组	SiO <sub>2</sub> +SOD 培养上清组	SOD 培养上清组
1 h	0.216±0.034	0.141±0.016 <sup>a</sup>	0.085±0.002 <sup>ab</sup>
2 h	0.514±0.042	0.246±0.019 <sup>a</sup>	0.125±0.003 <sup>ab</sup>
3 h	1.153±0.062	0.523±0.028 <sup>a</sup>	0.486±0.011 <sup>ab</sup>
4 h	0.926±0.031	0.203±0.020 <sup>a</sup>	0.107±0.007 <sup>ab</sup>
5 h	1.048±0.053	0.098±0.008 <sup>a</sup>	0.027±0.002 <sup>ab</sup>
6 h	0.338±0.027	0.024±0.005 <sup>a</sup>	0.009±0.001 <sup>ab</sup>

表注：与 SiO<sub>2</sub> 培养上清组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与 SiO<sub>2</sub>+SOD 培养上清组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。SOD：超氧化物歧化酶

### 3 讨论 Discussion

1967 年, HEPPLESTON 发现 SiO<sub>2</sub> 诱导的肺泡巨噬细胞培养上清可促进成纤维细胞生长, 之后对巨噬细胞和成纤维细胞这两种细胞间关系进行了大量研究, 结果不尽相同 [16-17]。此次实验将 MTT 法检测的 A 值与阴性对照 A 值的比值算出 A 值增长率, 说明大鼠肺泡巨噬细胞条件培养上清均可促成纤维细胞增殖。MTT 法提示, 加入 SOD 后再由 SiO<sub>2</sub> 刺激的肺泡巨噬细胞培养上清促成纤维细胞增殖能力明显低于单纯由 SiO<sub>2</sub> 刺激肺泡巨噬细胞培养上清, 而高于单纯由 SOD 刺激肺泡巨噬细胞培养上清。推测大鼠肺泡巨噬细胞加入 SiO<sub>2</sub> 刺激被激活后, 肺泡巨噬细胞释放氧自由基功能加强, 而加入 SOD 预处理后再加入 SiO<sub>2</sub> 刺激, SOD 部分阻断了氧自由基的产生, 肺泡巨噬细胞释放氧自由基量减少, 因此, 由 SiO<sub>2</sub> 刺激要比加入 SOD 预处理再由 SiO<sub>2</sub> 刺激肺泡巨噬细胞培养上清促成纤维细胞增殖作用提前达到高峰, 而由 SOD 刺激肺泡巨噬细胞培养上清没有 SiO<sub>2</sub> 刺激的情况下最晚才达到增殖高峰。这提示外源性 SOD 早期或部分阻断肺泡巨噬细胞产生的氧自由基, 可使 SiO<sub>2</sub> 刺激导致的成纤维细胞增殖减弱, 可能氧自由基与成纤维细胞增殖有一定关系, 它可促进成纤维细胞增殖, 而外源性 SOD 可抑制氧自由基从而抑制成纤维细胞增殖。

此次实验取各组促成纤维细胞增殖能力最强的时间点的肺泡巨噬细胞培养上清作用于肺成纤维细胞, 各组 c-myc 蛋白的表达高峰均为 3 h。有研究显示 c-myc mRNA 在成纤维细胞中只有很短的半衰期, c-myc mRNA 的表达高峰为 3 h [18]。从总的变化趋势上看 SiO<sub>2</sub> 培养上清组的变化幅度最大, SiO<sub>2</sub>+SOD 培养上清组次之, 最后为 SOD 培养上清组。SiO<sub>2</sub>+SOD 培养上清组的 c-myc 蛋白表达在各个时间点上都低于 SiO<sub>2</sub> 培养上清组, 而高于 SOD 培养上清组, 提示 SOD 对 SiO<sub>2</sub> 刺激大鼠肺泡巨噬细胞体外培养上清促成纤维细胞内 c-myc 蛋白水平增高起抑制作用。推测, SiO<sub>2</sub> 刺激大鼠肺泡巨噬细胞体外培养上清产生的氧自由基可促成纤维细胞内 c-myc 蛋白水平增高, 从而促成纤维细胞增殖。SOD 可能通过早期阻断肺泡巨噬细胞中氧自由基的产生使 c-myc 蛋白水平表达减弱, 从而抑制成纤维细胞增殖 [19]。

c-myc 是一类“立刻早期反应”基因, 其基因产物都是在 G<sub>1</sub> 期调控中发挥重要作用的分子 [20], c-myc 基因在细胞周期调控中具有关键作用 [5]。此次实验推测 SiO<sub>2</sub> 刺激大鼠肺泡巨噬细胞体外培养上清可促成纤维细胞内 c-myc mRNA 水平增高, 而 SOD 对 SiO<sub>2</sub> 刺激大鼠肺泡巨噬细胞体外培养上清促成纤维细胞内 c-myc mRNA 水平增高有抑制作用。推测 SiO<sub>2</sub> 刺激大鼠肺泡巨噬细胞所产生的氧自由基对 c-myc mRNA 表达起调控作用, 当加入氧自由基清除剂 SOD 后 c-myc mRNA 表达明显减弱, 提示氧自由基在矽肺形成过程中有一定作用。由以上结果推测可能在矽肺形成过程中, SiO<sub>2</sub> 刺激大鼠肺泡巨噬细胞所产生的氧自由基对 c-myc 表达起调控作用, 使 c-myc 表达增高, 从而促成纤维细胞增殖, 最终导致肺纤维化。

**作者贡献:** 阙泉第一作者设计实验、进行实施和撰写论文, 张岩第二作者负责实验动物操作, 王海涛第三作者进行实验评估, 李冉第四作者负责图片采集, 田艳霞第五作者对实验整体过程进行评估。盲法评估。

**经费支持:** 该文章接受了“唐山市科技局科学技术研究与发展计划(13130291z)”和“河北省卫生厅医学科学研究课题计划(20130380)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案经华北理工大学动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经华北理工大学统计学专家李云教授审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

[1] YANG X, WANG J, ZHOU Z, et al. Silica-induced initiation of circular ZC3H4 RNA/ZC3H4 pathway promotes the pulmonary macrophage activation. *FASEB J.* 2018;32(6):3264-3277.

[2] LI C, LU Y, DU S, et al. Dioscin Exerts Protective Effects Against Crystalline Silica-induced Pulmonary Fibrosis in Mice. *Theranostics.* 2017;7(17):4255-4275.

[3] CAO Z, XIAO Q, DAI X, et al. circHIPK2-mediated  $\sigma$ -1R promotes endoplasmic reticulum stress in human pulmonary fibroblasts exposed to silica. *Cell Death Dis.* 2017;8(12):3212.

[4] MOSSMAN BT, CHURG A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(5):1666-1680.

[5] BARSYTE-LOVEJOY D, LAU SK, BOUTROS PC, et al. The c-Myc oncogene directly induces the H19 noncoding RNA by allele-specific binding to potentiate tumorigenesis. *Cancer Res.* 2006;66(10):5330-5337.

[6] KUBOTA S, TOKUNAGA K, UMEZU T, et al. Lineage-specific RUNX2 super-enhancer activates MYC and promotes the development of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Nat Commun.* 2019;10(1):1653.

[7] XU L, HAO H, HAO Y, et al. Aberrant MFN2 transcription facilitates homocysteine-induced VSMCs proliferation via the increased binding of c-Myc to DNMT1 in atherosclerosis. *J Cell Mol Med.* 2019;23(7):4611-4626.

[8] CAO L, XU C, XIANG G, et al. AR-PDEF pathway promotes tumour proliferation and upregulates MYC-mediated gene transcription by promoting MAD1 degradation in ER-negative breast cancer. *Mol Cancer.* 2018;17(1):136.

[9] 李雪, 伍艳平, 周铁军, 等. 宫颈鳞癌组织中 miRNA-451、c-myc、E-cadherin、Vimentin 的表达变化及其意义 [J]. *山东医药*, 2020, 60(36):50-53.

[10] 熊敏涵, 秦恩杰, 袁炜, 等. C-myc 过表达促进宫颈上皮内瘤变的 Meta 分析 [J]. *中国医药生物技术*, 2020, 15(6):89-93.

[11] 陈玉惠, 周伟光, 高晶, 等. 牛外周血单核巨噬细胞的分离、培养与鉴定 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2013, 34(5):21-22.

[12] 尹红玲. 肥大细胞与肺成纤维细胞共育的形态学观察 [J]. *解剖学报*, 1998, 29(1):81-84.

[13] 陈非, 邓鸿业, 龙振洲. 肺泡巨噬细胞因子与肺纤维母细胞 [J]. *国外医学. 免疫学分册*, 1991, 14(2):82-85.

[14] BARLUCCHI L, LERI A, DOSTAL DE, et al. Canine ventricular myocytes possess a renin-angiotensin system that is upregulated with heart failure. *Circ Res.* 2001;88(3):298-304.

[15] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术 [M]. 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999:458-481.

[16] HOU J, SHI J, CHEN L, et al. M2 macrophages promote myofibroblast differentiation of LR-MSCs and are associated with pulmonary fibrogenesis. *BioMed Central.* 2018;16(1):89.

[17] 张元元, 薄存香, 张放. 肺泡巨噬细胞在矽肺发病机制中的研究进展 [J]. *中国职业医学*, 2020, 47(1):110-113.

[18] ACQUAVIVA C, FERRAVA P, BOSSIS G, et al. Degradation of cellular and viral Fos proteins. *Biochimie.* 2001;83(3-4):357-362.

[19] 孙镜洁, 肖敏, 周志祥. 锰超氧化物歧化酶 (MnSOD) 表达与活性调控及其与肿瘤的关系 [J]. *生理科学进展*, 2019, 50(2):117-121.

[20] LIU J, FENG W, LIU M, et al. Stomach-specific c-Myc overexpression drives gastric adenoma in mice via AKT/mTOR signaling. *Bosn J Basic Med Sci.* 2020 Nov 19. doi: 10.17305/bjbmms.

(责任编辑: WZH, ZN, SX)