· 实验研究 ·

N－乙酰半胱氨酸对矽尘诱导肺泡巨噬细胞自噬影响*

王晓艳，宋瑞瑞，张晓雪，沈福海，蒋守芳，佟俊旺，李清钊，田珍榛，金玉兰

摘　要：目的　探讨抗氧化剂 N－乙酰半胱氨酸（NAC）对大鼠肺泡巨噬细胞 NR8383 在染尘不同时间的自噬活动影响。**方法**　常规培养 NR8383 细胞，染尘 3、6、12、20、24 h，并给予 NAC，分别收集细胞上清液，采用双抗体夹心酶联免疫吸附法检测肿瘤坏死因子－α（TNF-α）、转化生长因子－βⅠ（TGF-βⅠ）表达水平，自噬水平检测采用蛋白免疫印迹法和细胞免疫荧光法。**结果**　体外巨噬细胞染尘模型最佳时间为 20 h；NAC＋矽尘组 NR8383 细胞 TNF-α 表达［（116.82 ± 8.98）pg/mL］低于矽尘组［（1823.58 ± 764.85）pg/mL］（$P < 0.05$）；NAC＋矽尘组 NR8383 细胞 TGF－βⅠ表达［（8.27 ± 3.62）pg/mL］与矽尘组［（14.28 ± 5.71）pg/mL］比较差异无统计学意义（$P > 0.05$）；NAC＋矽尘组与矽尘组 NR8383 细胞 LC3 蛋白表达［分别为（3.52 ± 0.57）、（3.84 ± 0.53）pg/mL］高于对照组［（2.24 ± 0.56）pg/mL］；免疫荧光结果显示，矽尘组 NR8383 细胞在 20 h 荧光信号强于对照组；NAC＋矽尘组 NR8383 细胞荧光强度与矽尘组无明显差异。**结论**　矽尘刺激使 NR8383 细胞自噬表达增强；NAC 可降低细胞上清液中 TNF-α 分泌水平，NAC 可能参与染尘肺泡巨噬细胞的炎症反应过程。

关键词：N－乙酰半胱氨酸（NAC）；自噬；肿瘤坏死因子－α（TNF-α）；转化生长因子－βⅠ（TGF-βⅠ）
中图分类号：R 332　**文献标志码：**A　**文章编号：**1001-0580(2017)05-0743-04　DOI：10.11847/zgggws2017-33-05-15

Effect of N-acetyl-L-cysteine on expression of autophagy in rat NR8383 cells exposed to silicon dioxide

WANG Xiao-yan, SONG Rui-rui, ZHANG Xiao-xue, et al (*School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei Province* 063000, China)

Abstract: Objective　To assess the role of N-acetyl-L-cysteine (NAC) on the expression of autophagy in rat NR8383 cells exposed to silicon dioxide (SiO_2). **Methods**　NR8383 cells were cultured routinely and exposed to SiO_2 dust (50 mg/L) for 3, 6, 12, 20, and 24 hours, respectively, and then tumor necrosis factor-α (TNF-α) and transforming growth factor-βⅠ (TGF-βⅠ) in culture supernatant were detected with double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determined the optimal time for following NAC treatment (10 mmol/L). Light chain 3 (LC3) level in NR8383 cells was determined with Western blot and immunofluorescence with confocal microscopy. **Results**　The optimal exposure time to SiO_2 dust was 20 hours in the rat NR8383 cell model. The TNF-α level in the silica exposure group with NAC treatment was significantly lower than that in the group without NAC treatment (116.82 ± 8.98 vs. 1 823.58 ± 764.85 pg/mL, $P < 0.05$) but the level of TGF-βⅠ was not significantly different between the two groups (8.27 ± 3.62 vs. 14.28 ± 5.71 pg/mL, $P > 0.05$). The LC3 protein levels in both the silica exposure groups with and without NAC treatment (3.52 ± 0.57 and 3.84 ± 0.53 pg/mL) were higher than that in the control group (2.24 ± 0.56 pg/mL). Immunofluorescence confocal microscopy analysis demonstrated that LC3 expression in NR8383 cells with silica exposure for 20 hours was stronger than that of the control group but was not different from that of the exposure group with NAC treatment. **Conclusion**　SiO_2 can enhance autophagy in rat NR8383 cells and NAC can reduce TNF-α in cell culture supernatant, suggesting that NAC might be involved in the inflammatory response of the cells exposed to SiO_2.

Key words: N-acetyl-L-cysteine; autophagy; tumor necrosis factor-α; transforming growth factor-βⅠ

肺泡巨噬细胞是矽尘作用的主要靶细胞，细胞吞噬矽尘颗粒后，可引起细胞膜发生脂质过氧化及损伤，从而产生大量氧自由基，游离 SiO_2 粉尘使以肺泡巨噬细胞膜为主的生物膜损伤是矽肺发病的主要原因[1-2]。N-乙酰半胱氨酸（N-acetyl-L-cysteine，NAC）是被广泛使用的抗氧化剂，能干扰活性氧，清除已经生成的自由基[3]。本研究采用游离 SiO_2 粉尘离体刺激大鼠肺泡巨噬细胞珠 NR8383 细胞，NAC 干预染尘 NR8383 细胞，通过观察细胞自噬蛋白表达，探讨 NAC 在染尘大鼠肺泡巨噬细胞 NR8383 自噬中的作用，旨在为矽肺纤维化的机制研究提供参考依据。结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　主要试剂与仪器　大鼠肺泡巨噬细胞（NR8383）购于美国 ATCC 细胞库；大鼠肿瘤坏死因子

* **基金项目：**国家自然科学基金（81202161）
作者单位：华北理工大学公共卫生学院，河北 唐山 063000
作者简介：王晓艳（1989－），女，内蒙古人，硕士在读，研究方向：劳动卫生与环境卫生学。
通讯作者：金玉兰，E-mail：13932579151@163.com
数字出版日期：2016－6－21 14:49
数字出版网址：http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20160621.1449.070.html

－α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、转化生长因子－βⅠ(transforming growth factor-βⅠ, TGF-βⅠ)试剂盒(杭州联科生物技术有限公司)，F－12K 培养基(美国 GIBCO 公司)，胎牛血清、青链霉素双抗(美国 MP 公司)，Alexa Fluor® 488 标记羊抗兔 IgG 抗体(美国 Life Technologies 公司)，微管相关蛋白 1 轻链 3(light chain 3, LC3)多克隆抗体(美国 Sigma 公司)，山羊抗兔辣根过氧化物酶 IgG 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司)，甘油醛－3－磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(美国 Affinity 生物技术有限公司)，磷酸氯喹(chloroquine diphosphate, CDP)(日本 TCI 公司)；游离 silicon dioxide (SiO_2)粉尘(美国 Sigma 公司)粒径范围在 0.50～10 μm，80% 粒子直径在 1～5 μm 之间，用生理盐水配制成 0.5 g/L 混悬液，高压蒸汽灭菌，使用前充分混匀；N－乙酰半胱氨酸(美国 Sigma 公司)用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)配制成 100 mmol/L 母液，4 ℃冷藏备用。FV1000 激光扫描共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司)，SpectraMax(r) M5 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)，FluorChem™ HD2 高灵敏化学发光凝胶成像系统(美国 Protein Simple 公司)，Eppendorf 5424 离心机(德国 Eppendorf 公司)。

1.2　指标与方法

1.2.1　染尘不同时间点细胞上清液中 TNF－α 和 TGF－βⅠ检测　将 NR8383 细胞置于含有 15% 胎牛血清、1% 青链霉素的 F－12K 培养液中培养。以 1×10^6 个/mL 浓度将细胞接种到 6 孔板中，实验设对照组和矽尘组(50 mg/L)，每组 4 个平行样，分别孵育 3、6、12、20、24 h 收集细胞上清液，1 500 r/min，离心 10 min，－20 ℃保存备用。实验步骤严格按照试剂盒要求进行，30 min 内用酶标仪测定 450 nm 波长吸光度(A)值，参考波长设定为 630 nm。根据细胞因子表达，选择最佳时间点，给予 NAC 进行干预，NAC 剂量为 10 mmol/L，检测 NR8383 细胞上清液中 TNF－α 和 TGF－βⅠ含量。

1.2.2　NR8383 细胞中 LC3 蛋白表达检测(激光共聚焦显微镜观察)　将细胞分为 3 组，即对照组、矽尘组(50 mg/L)和 NAC(10 mmol/L)＋矽尘(50 mg/L)组，共聚焦小皿培养 20 h 后，磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤，4% 多聚甲醛固定细胞，PBS 清洗，0.2% Trion X－100 处理细胞 15 min 后加入 5% 羊血清封闭，加入 LC3 抗体(1∶200)4 ℃孵育过夜，PBS 洗涤 3 次，滴加荧光二抗(1∶400)室温孵育 1 h，PBS 洗涤 3 次，于激光扫描共聚焦显微镜(激发波长：495 nm，发射波长：519 nm)下观察。

1.2.3　NR8383 细胞中 LC3 蛋白表达检测(Western blot 法)　将细胞分为 3 组，即对照组、矽尘组、NAC＋矽尘组，每组 3 个平行样，收集各组细胞，加入 radioimmunoprecipitation assay (RIPA)细胞裂解液，冰浴放置 30 min，4 ℃，12 000 g，离心 10 min，收集上清，采用 BCA 法蛋白定量试剂盒按照说明书步骤进行蛋白定量。12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl-polyacryl gradient gel electrophoresis, SDS-PAGE)，转膜，5% 脱脂牛奶封闭 1 h，一抗 4 ℃孵育过夜，二抗室温孵育 2 h，Tris-buffered saline/Triton-X100 (TBST)洗膜 3 次，5 min/次，electrogenerated chemiluminescence (ECL)化学发光，采用高灵敏化学发光凝胶成像系统分析蛋白表达量。

1.3　统计分析　计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析，样本均数 2 组比较采用 t 检验，多组间均数比较采用单因素方差分析，当差异有统计学意义时，用最小显著差法进行两两比较，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　矽尘对 NR8383 细胞上清液中 TNF-α 和 TGF-βⅠ表达影响(表 1)　与对照组比较，染尘 12、20、24 h 时，矽尘组 NR8383 细胞上清液中 TNF-α 表达量明显升高，差异有统计学意义($P<0.05$)；呈时间效应关系。与对照组比较，在染尘 20、24 h 时，矽尘组 NR8383 细胞上清液中 TGF-βⅠ表达升高，差异有统计学意义($P<0.05$)，染尘 6 h 后，随着时间延长，细胞上清液中 TGF-βⅠ表达量逐渐升高。

2.2　NAC 干预对 NR8383 细胞上清液中 TNF-α 和 TGF-βⅠ表达影响　结果显示，对照组、矽尘组、NAC＋矽尘组 NR8383 细胞上清中 TNF-α 含量分别为(152.79 ± 47.53)、(1 823.58 ± 764.85)、(116.82 ± 8.98) pg/mL；与对照组比较，矽尘组 NR8383 细胞上清中 TNF-α 含量明显升高($P<0.01$)；与矽尘组比较，NAC＋矽尘组 NR8383 细胞上清中 TNF-α 含量下降，差异有统计学意义($P<0.05$)。对照组、矽尘组、NAC＋矽尘组 NR8383 细胞上清中 TGF-βⅠ含量分别为(6.28 ± 2.37)、(14.28 ± 5.71)、(8.27 ± 3.62) pg/mL；与对照组比较，矽尘组 NR8383 细胞上清中 TGF-βⅠ含量升高，差异有统计学意义($P<0.05$)。

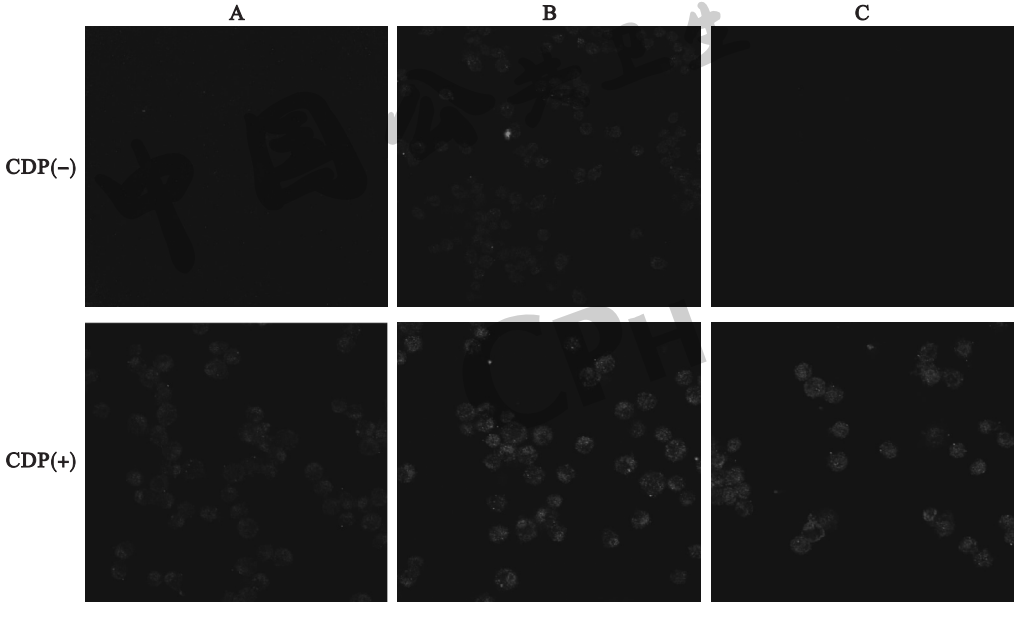
2.3　NAC 干预对 NR8383 细胞 LC3 蛋白表达影响(图 1)　结果显示，与对照组比较，矽尘组 NR8383 细胞 LC3 蛋白荧光信号增强；与矽尘组比较，NAC＋矽尘组胞内荧光信号无明显变化；加入溶酶体抑制剂 CDP 阻断自噬降解后，各组 NR8383 细胞 LC3 蛋白表达均增强。

中国公共卫生 Chin

表 1　染尘对 NR8383 细胞上清液中 TNF-α 及 TGF-β Ⅰ 含量影响($\bar{x} \pm s$, pg/mL, $n = 4$)

指标	组别	染尘时间(h)				
		3	6	12	20	24
TNF-α	对照组	131.91 ± 40.83	155.29 ± 56.68	138.03 ± 22.74	152.79 ± 47.53	240.66 ± 82.94[abcd]
	矽尘组	115.99 ± 46.19	155.55 ± 30.77	281.31 ± 35.24	1 823.58 ± 764.85[abc]	1 975.23 ± 391.86[abc]
	t 值	0.52	0.01	6.83	4.36	8.66
	P 值	0.62	0.99	0.00	0.01	0.00
TGF-βⅠ	对照组	18.93 ± 6,99	5,64 ± 0.47[a]	5.05 ± 1.07[a]	6.28 ± 2.37[a]	9.13 ± 3.59[a]
	矽尘组	11.68 ± 4.78	4.45 ± 1.13[a]	5.09 ± 0.97[a]	14.28 ± 5.71[bc]	20.11 ± 5.79[abc]
	t 值	1.71	1.94	0.05	2.59	3.23
	P 值	0.14	0.10	1.00	0.04	0.02

注：与 3 h 比较，a $P < 0.05$；与 6 h 比较，b $P < 0.05$；与 12 h 比较，c $P < 0.05$；与 20 h 比较，d $P < 0.05$。



注：A：对照组；B：矽尘组；C：NAC + 矽尘组。绿色代表 LC3 的表达。

图 1　NAC 干预对巨噬细胞 LC3 表达影响(染尘 20 h，免疫荧光，×400)

2.4　NAC 干预对 NR8383 细胞 LC3 蛋白表达影响(图 2)　结果显示，在染尘 20 h 时各组均未检测到 LC3 蛋白，表明在染尘 20 h 时，NR8383 细胞 LC3 蛋白已经降解；加入溶酶体抑制剂 CDP 后，对照组、矽尘组、NAC + 矽尘组 NR8383 细胞 LC3 蛋白表达量分别为(2.24 ± 0.56)、(3.84 ± 0.53)、(3.52 ± 0.57) pg/mL：与对照组比较，矽尘组 NR8383 细胞 LC3 蛋白表达升高，差异有统计学意义($P < 0.05$)；与矽尘组比较，NAC + 矽尘组 NR8383 细胞 LC3 表达呈降低趋势，但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

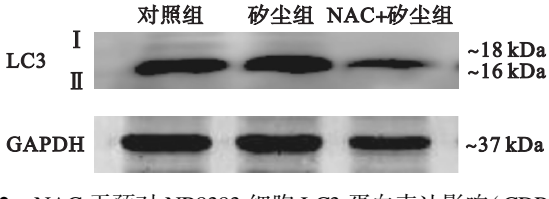


图 2　NAC 干预对 NR8383 细胞 LC3 蛋白表达影响(CDP +)

3　讨　论

游离二氧化硅粉尘引起肺泡巨噬细胞损伤是矽肺发生的初始环节，粉尘进入机体后，肺泡巨噬细胞将其吞噬，活化后的巨噬细胞可以合成和分泌大量细胞因子，这些细胞因子是调控肺部炎症和矽肺进展的重要活性物质[4]，其中 TNF-α 和 TGF-β Ⅰ 是最关键细胞因子[5-7]。TNF-α 和 TGF-β Ⅰ 在肺泡巨噬细胞致炎和致纤维化中起着核心作用，TGF-β Ⅰ 被认为是迄今最强的细胞外基质沉淀剂[8-9]，在博来霉素诱导的大鼠肺纤维化模型中，肺部纤维化的炎症反应、胶原含量及前炎症因子 TNF-α、IL1β 表达显著升高[10]。本研究结果显示，染尘肺泡巨噬细胞中，TNF-α 和 TGF-β Ⅰ 表达在染尘 20 和 24 h 时表达量无明显差异，且 20 h 细胞状态较好，因此，本研究选择染尘 20 h 为细胞模型的染尘时间。给予

抗氧化剂 NAC 干预后,结果显示,NAC + 矽尘组 NR8383 细胞上清中 TNF-α 表达低于矽尘组,而 TGF-βⅠ表达量在 NAC + 矽尘组与矽尘组 NR8383 细胞上清中无明显差异,提示 NAC 可能在 20 h 对染尘肺泡巨噬细胞中 TNF-α 的表达影响更大。

自噬具有保护细胞和引起细胞损伤的双重作用,是真核细胞降解胞内多余或损伤的细胞器和蛋白质的已知唯一途径[11],活性氧(reactive oxygen species, ROS)是调控自噬的重要信号分子之一。ROS 在细胞内正常代谢过程中产生,包括羟自由基、超氧阴离子、过氧化氢等,过多 ROS 可损害细胞内蛋白质、脂肪、核酸及细胞器。矽肺发生过程中产生大量自由基[12]。自噬被诱导之后在激光共聚焦显微镜下可清晰的观测到 LC3 染色信号呈点状聚集增多[13],微管相关蛋白 LC3 是自噬的一个标志蛋白[14]。本研究结果显示,矽尘组 NR8383 细胞自噬的荧光信号强于对照组,NAC + 矽尘组与矽尘组比较荧光信号无明显差异,提示在 20 h SiO_2 诱导肺泡巨噬细胞自噬增强,而抗氧化剂 NAC 的抗氧化、清除自由基作用可能在染尘 20 h 时与自噬的发生机制关联较弱,或虽可能参与矽尘诱导的自噬过程,但在染尘 20 h 时作用不明显。LC3 有 2 种形式即Ⅰ型和Ⅱ型,LC3-Ⅰ散在分布于胞浆中,自噬被诱导之后,胞浆中均匀分布的 LC3-Ⅰ与 PE 结合形成脂质化形式的 LC3-Ⅱ,LC3-Ⅱ定位于自噬体膜上[15],LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值在某种程度上反映了细胞的自噬强弱[16]。Western blot 结果显示,与对照组比较,NAC + 矽尘组 NR8383 细胞中 LC3 蛋白表达升高,与矽尘组比较无明显差异,这与激光共聚焦观察结果相吻合。

通常评估自噬活动水平是观察自噬体的数量或者检测 LC3-Ⅱ含量,然而自噬体的累积也有可能由其他原因引起如自噬体成熟、降解途径受阻。因此,区别自噬的增加是由于诱导增强还是自噬过程受阻所致十分必要,自噬通量分析便是基于自噬动态检测的方法,通过比较溶酶体抑制剂存在与否情况下自噬的表达便是一种自噬通量分析方法[17]。自噬发生过程中首先形成双层膜自噬体,自噬体中包含有细胞溶质和受损细胞器自噬体,随后自噬体和溶酶体融合形成自噬溶酶体,包裹物经溶酶体中多种蛋白酶消化和降解[18],实现细胞物质代谢和细胞器更新[19]。本研究结果表明加入溶酶体抑制剂后,各组 NR8383 细胞中 LC3-Ⅱ蛋白表达均增强,提示自噬增强的现象是自噬本身被激活所致,并非是自噬降解途径受阻的假象。

参考文献

[1] Park EJ, Park K. Oxidative stress and pro-flammatory responses induced by silica nanoparticles *in vivo* and *in vitro*[J]. Toxicol Lett, 2009, 184(1): 18 – 25.

[2] 吴秋云,唐萌,谢彦昕,等. 不同粒径纳米二氧化硅的体外细胞膜毒性作用[J]. 中国生物医学工程学报, 2010(3): 437 – 445.

[3] 刘婷,孙莹,柳明坤,等. N-乙酰半胱氨酸对大鼠肺纤维化模型中 TGF-β1 表达影响的研究[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(11): 1508 – 1511.

[4] 周效宝,王瑞. 细胞因子在矽肺发生发展中作用研究进展[J]. 中国公共卫生, 2011, 27(12): 1630 – 1632.

[5] 王欣. CD36 短发夹 RNA 干扰重组慢病毒抑制大鼠肺泡巨噬细胞 L-TGF-β1 活化及其阻抑矽肺纤维化的研究[D]. 沈阳: 中国医科大学博士学位论文, 2009.

[6] 张立英,刘绍霞,赵国强,等. TNF-α 基因 siRNA 真核表达载体的构建及其对 A549 细胞 TNF-α 和 TGF-β1 表达的影响[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2012, 47(5): 629 – 632.

[7] 李颖. 转化生长因子-β1 和肿瘤坏死因子-α 在尘肺病中的表达及其意义[D]. 长沙: 中南大学硕士学位论文, 2011.

[8] Scarfi M, Magnone M, Ferraris C, et al. Ascorbic acid pre-treated quartz stimulates TNF-α release in RAW264. 7 murine macrophages through ROS production and membrane lipid peroxidation[J]. Respiratory Research, 2009, 10(25): 1 – 16.

[9] 乔俊华. 大鼠煤工尘肺动物模型的研究[D]. 吉林: 吉林大学博士学位论文, 2006.

[10] Nikbakht J, Hemmati AA, Arzi A, et al. Protective effect of gallic acid against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats[J]. Pharmacol Rep, 2015, 67(6): 1061 – 1067.

[11] 王宇琦,蒋卓勤,邓颖勋,等. 自噬与非酒精性脂肪肝关系研究进展[J]. 中国公共卫生, 2015, 31(9): 1230 – 1233.

[12] 顾春晖,刘移民. 粉尘致肺纤维化机制研究现状[J]. 热带医学杂志, 2009, 9(5): 582 – 589.

[13] 李红园,魏丽娟,魏占勇,等. 细胞自噬的研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2015, (05): 143 – 146.

[14] Teng YC, Tai YI, Huang HJ, et al. Melatonin ameliorates arsenite-induced neurotoxicity: involvement of autophagy and mitochondria[J]. Mol Neurobiol, 2015, 52(2): 1015 – 1022.

[15] Jia G, Sowers JR. Autophagy: a housekeeper in cardiorenal metabolic health and disease[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852(2): 219 – 224.

[16] Karim MR, Kanazawa T, Daigaku Y, et al. Cytosolic LC3 ratio as a sensitive index of macroautophagy in isolated rat hepatocytes and H4-II-E cells[J]. Autophagy, 2007, 3(6): 553 – 560.

[17] Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research[J]. Cell, 2010, 140(3): 313 – 326.

[18] 马泰,孙国平,李家斌. 细胞自噬的研究方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39(03): 204 – 209.

[19] 秦永刚,李晨旭,李雷,等. 自噬在镉致大鼠肾脏损伤中的作用[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2015, 41(2): 213 – 217.

收稿日期: 2015-10-26　　(解学魁编辑　韩仰欢校对)