·基础论著·

SPP1 通过 M1/M2 型巨噬细胞活化调控矽肺纤维化的作用机制

陈新春[1]， 杨新月[1]， 孙文灿[1]， 王佳烁[1]， 孙欣如[1]， 金苏皖[1]，
毛 娜[1,2]， 蔡文臣[1,2*]

[1]华北理工大学公共卫生学院，河北 唐山 063210；[2]河北省器官纤维化重点实验室，河北 唐山 063210

摘要 目的 研究分泌型磷蛋白 1（SPP1）通过激活巨噬细胞活化及炎症因子进而调控矽肺纤维化的可能机制。**方法** 采用 HOPE-MED8050 动式染尘系统构建矽肺大鼠模型，其中对照组吸入纯净气，染尘组吸入 50 μg/m^3 二氧化硅（SiO_2），①对照组：吸入纯净气 0、4、12、16 和 24 周；②染尘组：染尘 0、4、12、16 和 24 周。C57BL/6J 小鼠分为对照组和矽肺组，矽肺模型采用支气管一次性灌注 SiO_2 悬液（50 mg·kg^{-1}，50 μL），对照组灌注等量的生理盐水。体外培养 RAW264.7 单核/巨噬细胞系，分组 1 如下①对照组：常规培养；②不同浓度 SiO_2 诱导组：分别给予巨噬细胞 50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL 的 SiO_2 培养基诱导 12 h；分组 2 如下①对照组：常规培养；②不同时间 SiO_2 诱导组：100 μg/mL SiO_2 培养基诱导 12、24 h；分组 3 如下①对照组：常规培养；②*Spp1*-siRNA 干预组；③SiO_2 诱导组；④SiO_2 诱导＋*Spp1*-siRNA 干预组。免疫组织化学染色和免疫组织荧光染色方法检测矽肺大鼠、矽肺小鼠肺组织中 SPP1、肿瘤坏死因子 α（TNF-α）和白介素-10（IL-10）表达；免疫印迹法检测 SPP1 以及巨噬细胞活化因子 TNF-α、IL-10 和单核细胞趋化蛋白-1（MCP-1）的表达；Co-IP 钓取 SPP1 相互作用蛋白，并进行质谱鉴定 SiO_2 诱导的 RAW264.7 细胞中 SPP1 潜在结合蛋白。**结果** 免疫组织化学染色结果显示，随染尘时间增加，矽肺大鼠肺组织中 SPP1 阳性表达逐渐增多，且主要定位于巨噬细胞；免疫组织荧光染色结果显示，与对照组比较，矽肺小鼠肺组织中 SPP1、TNF-α 和 IL-10 均呈阳性表达；免疫印迹结果显示，与对照组比较，100 μg/mL 和 200 μg/mL SiO_2 诱导巨噬细胞中 SPP1 均表达上调（$P<0.05$）；与对照组比较，SiO_2 诱导巨噬细胞 12 h 时 SPP1 表达显著升高（$P<0.05$）；与对照组比较，SiO_2 诱导组中 TNF-α、IL-10、MCP-1 的表达均上调（$P<0.05$）；与 SiO_2 诱导组比较，*Spp1* 沉默组中 TNF-α、IL-10、MCP-1 的表达均下调（$P<0.05$）。质谱结果显示，SPP1 潜在主要结合蛋白为表皮转谷氨酰胺酶（TGM3），且与 SiO_2 诱导巨噬细胞组比较，沉默 *Spp1* 后显著降低 TGM3 的表达（$P<0.05$）。**结论** SPP1 可通过激活巨噬细胞活化因子调控矽肺纤维化。

关键词 矽肺；分泌型磷蛋白 1；肿瘤坏死因子 α；巨噬细胞
中图分类号 R135.2 **文献标识码** A **文章编号** 1007-9564（2026）01-0001-08
DOI **编码** 10.11723/mtgyyx 1007-9564 202601001

Potential mechanisms of SPP1 in regulating silicosis via activation of M1/M2 macrophages

CHEN Xinchun[1], *YANG Xinyue*[1], *SUN Wencan*[1], *WANG Jiashuo*[1], *SUN Xinru*[1], *JIN Suwan*[1], *MAO Na*[1,2], *CAI Wenchen*[1,2*]. ([1]*School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210*; [2]*Hebei Key Laboratory of Organ Fibrosis, Tangshan 063210, China*)

Abstract Objective To investigate the potential mechanism by which secreted phosphoprotein 1 (SPP1) regu-

基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（C 类）（编号：82504381）；河北省自然科学基金资助项目（编号：H2024209059）；河北省高等学校科学技术研究项目（编号：QN2022170）；2025 年河北省博士在读研究生创新能力培养资助项目（编号：CXZZBS2025160）

作者简介：陈新春，女，硕士研究生，副主任医师。研究方向：矽肺纤维化发生机制与防治研究。E-mail：wancxc.123@163.com
* 通信作者：蔡文臣，女，博士研究生，讲师。研究方向：矽肺纤维化发生机制与防治研究。E-mail：caiwenchen@ncst.edu.cn

中国知网 https://www.cnki.net

lates silicosis through activating macrophage activation and inflammatory factors. **Methods** A silicosis rat model was established using the HOPE-MED8050 dynamic dust exposure system. The control group was exposed to purified air, while the model group was exposed to silicon dioxide (SiO_2) at a concentration of 50 μg/m^3. ① Control group: Exposed to purified air for 0, 4, 12, 16, and 24 weeks. ② Model group: Exposed to SiO_2 for 0, 4, 12, 16, and 24 weeks. C57BL/6J mice were divided into control and model groups. The silicosis model was induced by a single intratracheal instillation of an SiO_2 suspension (50 mg·kg^{-1}, 50 μL), while the control group received an equal volume of sterile physiological saline. The RAW264.7 monocyte/macrophage cell line was cultured in vitro and divided as follows. Group 1 ① Control group: Standard culture conditions. ② SiO_2-induced groups (varying concentrations): Macrophages were treated with culture medium containing 50 μg/mL, 100 μg/mL, or 200 μg/mL SiO_2 for 12 hours. Group 2 ① Control group: Standard culture conditions. ② SiO_2- induced groups (varying durations): Macrophages were treated with 100 μg/mL SiO_2-containing medium for 12 or 24 hours. Group 3 ① Control group: Standard culture conditions. ② *Spp1*-siRNA intervention group. ③ SiO_2-induced group. ④ SiO_2-induced+*Spp1*-siRNA intervention group. Immunohistochemical staining and immunofluorescence staining were used to detect the expression of SPP1, tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), and interleukin-10 (IL-10) in lung tissues of silicotic rats and silicotic mice. Western blot was employed to analyze the expression of SPP1 and macrophage activation factors, including TNF-α, IL-10, and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Co-immunoprecipitation (Co-IP) followed by mass spectrometry (MS) was conducted to pull down SPP1-interacting proteins and identify potential SPP1-binding partners in SiO_2-induced RAW264.7 cells. **Results** The immunohistochemical staining results revealed that the positive expression of SPP1 in the lung tissues of silicosis rats gradually increased with prolonged dust exposure duration and was primarily localized within macrophages. Immunofluorescence staining demonstrated that, compared with the control group, the lung tissues of silicotic mice exhibited positive expression of SPP1, TNF-α, and IL-10. Western blot analysis showed that, relative to the control group, the expression of SPP1 was significantly upregulated in macrophages induced by both 100 μg/mL and 200 μg/mL SiO_2 ($P<0.05$). Furthermore, SPP1 expression was markedly elevated in macrophages induced by SiO_2 for 12 hours compared to the control group ($P<0.05$). Compared to the control group, the expressions of TNF-α, IL-10, and MCP-1 were all upregulated in the SiO_2-induced group ($P<0.05$). In contrast, compared to the SiO_2-induced group, the expressions of TNF-α, IL-10, and MCP-1 were downregulated in the *Spp1*-silenced group ($P<0.05$). Mass spectrometry results indicated that the primary potential binding protein for SPP1 was epidermal transglutaminase (TGM3). Moreover, compared to the SiO_2-induced group, silencing *Spp1* significantly reduced the expression of TGM3 ($P<0.05$). **Conclusion** SPP1 contributes to the regulation of silicosis through the activation of macrophage-derived factors.

【Key words】 Silicosis; Secretory phosphoprotein 1; Tumor necrosis factor-alpha; Macrophages

矽肺(Silicosis)是一种由于长期吸入二氧化硅(Silicon dioxide, SiO_2)粉尘而引起的以肺部弥漫性纤维化为主要特征的全身性疾病[1-2],发病机制复杂,涉及多种细胞相互作用,其中巨噬细胞在启动和持续推动矽肺的炎症与纤维化进程中扮演着核心角色。巨噬细胞具有高度的可塑性,可根据微环境信号极化为促炎(M1)或抗炎/促纤维化(M2)等不同类型;肿瘤坏死因子-α(Tumor necrosis factor-alpha, TNF-α)和白细胞介素-10(Interleukin-10, IL-10)分别是 M1 和 M2 型活化的关键标志因子[3-4]。巨噬细胞吞噬 SiO_2颗粒后,导致巨噬细胞活化,释放促炎性细胞因子,引起炎症反应,最终促进成纤维细胞活化和细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)过度沉积,加剧肺纤维化进展[5-6]。

分泌型磷蛋白 1(Secreted phosphoprotein 1, SPP1)是一种具有多种生物学功能的磷酸化糖蛋白。研究表明,SPP1 在多种纤维化疾病中表达上调,并参与调控炎症细胞浸润、成纤维细胞增殖及胶原合成[3-4,7]。课题组前期研究显示,在矽肺模型实验中 SPP1 表达升高[8],但其在 SiO_2诱导的巨噬细胞应答中的具体功能,特别是对 M1 和 M2 型巨噬细胞活化、下游炎症因子网络的调控作用,尚未被完全阐明。

因此本研究拟通过构建矽肺动物模型和 SiO_2诱导的细胞模型,探究 SPP1 对 M1 和 M2 型巨噬细胞活化因子单核细胞趋化蛋白-1(Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、TNF-α 和 IL-10 表达的调控作用,同时通过蛋白质质谱技术寻找 SPP1 的潜在相互作用蛋白,以期为揭示 SPP1 在矽肺发病中的新机制提供实验依据。

中国知网 https://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 HOPE-MED8050 动式染尘系统(天津开发区合普工贸有限公司);化学发光成像系统(Chemi Scope 6200,上海勤翔科学仪器有限公司);小鼠单核/巨噬细胞 RAW264.7(中国科学院上海细胞库);SiO_2(纯度为 99.00%,80.00% 粒径为 1~5 pm,美国 Sigama 公司);SPP1 抗体(AF0227,Affinity,美国,1:1 000);α-微管蛋白抗体(alpha-tubulin antibody,α-Tubulin,ab48389,Abcam,英国,1:20 000);MCP-1 抗体(A7277,Abclonal,中国,1:1 000);TNF-α 抗体(GTX110520,Gene Tex,美国,1:1 000);IL-10 抗体(ab9969,Abcam,英国,1:1 000);荧光二抗(山羊抗兔 S2002-100,河北瑞帕特生物科技有限公司,中国);4′,6-二脒基-2-苯基吲哚(4′,6-diamidino 2-phenylindole,DAPI)(RP8961,河北瑞帕特生物科技有限公司,中国);免疫印迹二抗(山羊抗小鼠 S1001-100,山羊抗兔 S1002-100,河北瑞帕特生物科技有限公司,中国,1:5 000);超敏 ExPlus Ecl 化学发光检测试剂(ZD310A-2,北京庄盟国际生物基因科技有限公司);小鼠/兔聚合物法检测系统通用型试剂盒(PV6000,北京中杉金桥公司,中国);二氨基联苯胺(Diaminobenzidine,DAB)显色试剂盒 20×(ZL1-9018,北京中彬金桥公司,中国)。

1.2 矽肺动物模型建立 SPF 级雄性 Wistar 大鼠,平均体重(180±10)g,3 周龄,于华北理工大学实验动物中心屏障实验室[SYXK(冀)2020-007]适应性饲养 1 周后随机分组,每组 10 只。采用动式染尘构建矽肺大鼠模型,分为对照组(吸入纯净气)及染尘组(50 μg/m^3 SiO_2),分别染尘 4、12、16、24 周后停止染尘,分别于 4、12、16、24 周处理动物[9]。

C57BL/6J 小鼠,平均体重(20±5)g,8 周龄,于华北理工大学实验动物中心屏障实验室[SYXK(冀)2020-007]适应性饲养 1 周后随机分组,每组 10 只。采用气管内一次性灌注 SiO_2 粉尘的方法构建小鼠矽肺模型(50 μL 100 mg/mL SiO_2 悬液),对照组灌注等量的生理盐水[10],饲养 14 d 后处理动物。

1.3 细胞模型建立 在恒温 37 ℃、5%CO_2 培养箱中使用含 20% 胎牛血清的 Ham's F-12K 培养基培养小鼠单核/巨噬细胞 RAW264.7 细胞,Ham's F-12K 空白培养基同步处理 24 h 之后,实验分组如下:

分组 1(1)对照组(C):无血清培养基培养;(2)不同浓度 SiO_2 诱导组(SiO_2, S):无血清培养条件下,分别给予 50 μg/mL(S50)、100 μg/mL(S100)、200 μg/mL(S200)的 SiO_2 培养基诱导 12 h;

分组 2(1)对照组(C):无血清培养基培养;(2)不同时间 SiO_2 诱导组:100 μg/mL SiO_2 培养基诱导 12、24 h;

分组 3(1)对照组(C):无血清培养基培养;(2)单纯沉默 *Spp1* 组(si-*Spp1*):无血清培养条件下,给予 si-*Spp1* 诱导 RAW264.7 细胞;(3)SiO_2 处理组(S):无血清培养条件下,100 μg/mL SiO_2 培养基诱导 12 h;(4)SiO_2+si-*Spp1* 处理组(S+si-*Spp1*):无血清培养条件下,先给予 100 μg/mL SiO_2 培养基诱导 12 h,再给予 si-*Spp1*。

1.4 免疫印迹法 蛋白酶抑制剂和放射免疫沉淀分析缓冲液(Radio immuno precipitation assay buffer,RIPA)配细胞裂解液。将细胞置于冰上,弃去皿中培养基,生理盐水从侧边滴入冲洗 3 次,倾斜放置于冰上,吸出皿中残余生理盐水,每皿均匀滴入 200 μL 细胞裂解液之后平放于冰上静置 20 min,细胞刮刮下细胞置于 Ep 管中(冰上操作),高速离心机离心 12 000 r,4 ℃,20 min,取上清液。二喹啉甲酸(Bicinchoninic acid,BCA)法测定蛋白浓度,后续取 13 μg 蛋白/孔进行常规电泳和电转,孵育一抗 SPP1、MCP-1、TNF-α、IL-10 4 ℃过夜;山羊抗小鼠或山羊抗兔二抗室温孵育 30 min,化学发光成像系统中使用超敏 ExPlus Ecl 化学发光检测试剂进行显色。Image-Pro-Plus 6.0 软件测算图像光密度,目标蛋白与内参蛋白光密度比值作为目的蛋白相对表达量。

1.5 免疫组织化学染色 60 ℃烤箱中烤片 6 h,石蜡切片分别置于二甲苯Ⅰ、Ⅱ中各 20 min,无水乙醇Ⅰ、Ⅱ中各 10 min,90%、80%、70% 乙醇中各 5 min,自来水中 15 min。将切片置于柠檬酸钠修复液中,高压修复 80 s 暴露抗原,内源性过氧化物酶阻断剂Ⅰ封闭切片 15 min,孵育一抗 SPP1(稀释比 1:200),冰箱内 4 ℃孵育过夜,次日用酶标山羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物 37 ℃恒温箱孵育 20 min,DAB 显色,苏木素染核,70%、80%、90% 乙醇各 3 min,无水乙醇Ⅰ、Ⅱ各 5 min,二甲苯Ⅰ、Ⅱ各脱水 10 min,中性树胶封片,观察 SPP1 阳性细胞染色。

1.6 免疫荧光染色 60 ℃烤箱中烤片 6 h,石蜡切片分别置于二甲苯Ⅰ、Ⅱ中各 20 min,无水乙醇Ⅰ、Ⅱ中各 10 min,90%、80%、70% 乙醇中各 5 min,自来水中 20 min。切片置于柠檬酸盐修复液中,高压修复 80 s 暴露抗原,孵育一抗 SPP1、TNF-α、IL-10(稀释比为 1:100),4 ℃孵育过夜,次日荧光二抗孵育组织,置于 37 ℃恒温箱 1.5 h,DAPI 染核,观察阳性细胞染色。

1.7 免疫共沉淀(Co-immunoprecipitation,Co-IP)实验结合质谱检测 提取 SiO_2 诱导的 RAW264.7 细胞总蛋白(input 组),IgG 组用 Protein A 琼脂糖珠和阴性对照 IgG 抗体与蛋白提取液混合,Anti-SPP1

中国知网 https://www.cnki.net

组用 Protein A 琼脂糖珠和 SPP1 抗体与蛋白提取液混合，分别将两组于 4 ℃孵育过夜，1 000 g 离心 20 s，弃上清，向两组沉淀中加入 50 μL 1×蛋白上样缓冲液进行洗脱，振荡混匀后瞬离，95 ℃加热 5～10 min；进行 SDS 电泳检测，通过考马斯亮蓝染色显示出所有蛋白条带，将具有差异目的胶带切下进行质谱检测，通过免疫印迹验证相互作用蛋白。

1.8 统计学分析 使用 SPSS 22.0 统计软件进行分析，计量资料以均数±标准差表示，两组间比较采用独立样本 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较方差齐性采用最小显著性差异法（Least significant difference，LSD）检验，方差不齐则采用 Tamhane's 检验。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 SPP1 在不同时间染尘大鼠肺组织的表达 免疫组织化学染色结果显示，与对照组比较，染尘组大鼠肺组织 SPP1 阳性表达增多；且 4、12 周染尘组大鼠肺组织中 SPP1 主要表达于聚集的巨噬细胞中；16 周染尘组大鼠中 SPP1 主要表达于已形成的矽结节内部；24 周染尘组大鼠中 SPP1 于矽结节中阳性表达增多。见图 1、表 1。

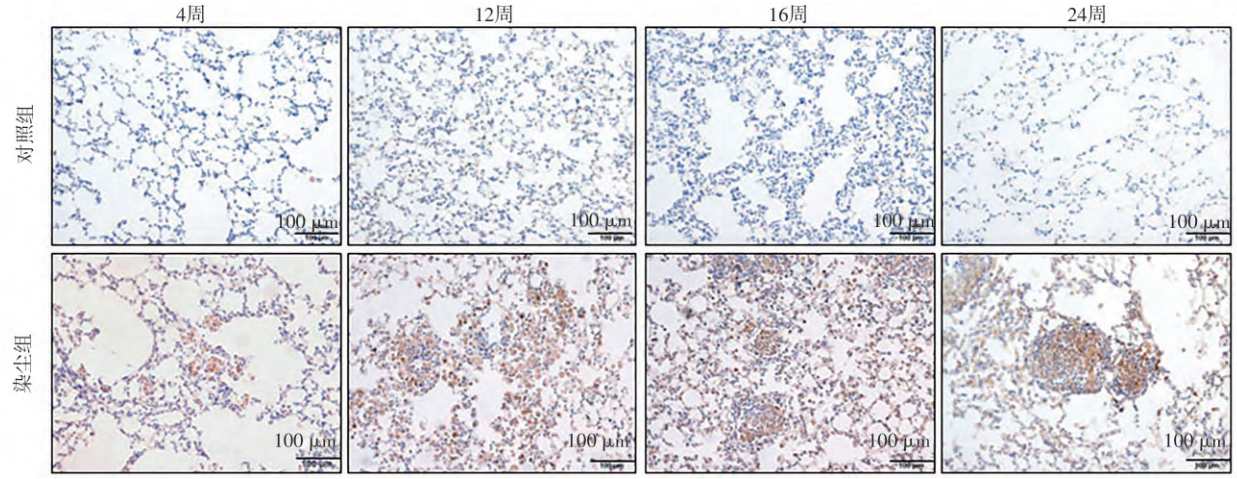
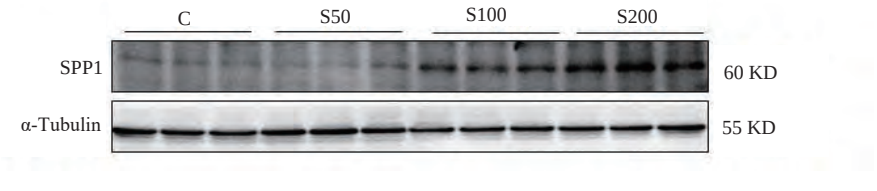


图 1 SPP1 在大鼠矽肺病变演进过程中的表达分布

表 1 SPP1 在大鼠矽肺病变演进过程中的分布水平（$\bar{x}\pm s$）

组别	例数	4 周	12 周	16 周	24 周
对照组	10	19.33±4.51	24.67±3.51	23.67±2.52	25.33±3.51
染尘组	10	95.95±4.98	165.33±22.00	218.67±12.22	398.67±35.08
t 值		-19.746	-10.932	-27.071	-18.343
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 SiO_2 介导的 RAW264.7 细胞中 SPP1 的表达 采用不同浓度 SiO_2 诱导 RAW264.7 细胞。免疫印迹法结果显示，与对照组比较，100 μg/mL SiO_2 诱导组中 SPP1 的蛋白表达水平显著上调（$P<0.05$）。见图 2。采用 100 μg/mL SiO_2 诱导 RAW264.7 细胞不同的时间。免疫印迹法结果显示，与对照组比较，100 μg/mL SiO_2 诱导 RAW264.7 单核/巨噬细胞 12 h，SPP1 的蛋白表达水平显著上调（$P<0.05$）。见图 3。



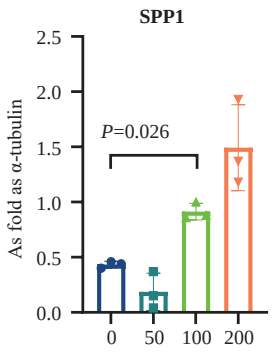


图 2 SPP1 在不同浓度 SiO_2 刺激 RAW264.7 细胞中的表达（$n=3$）

中国知网 https://www.cnki.net

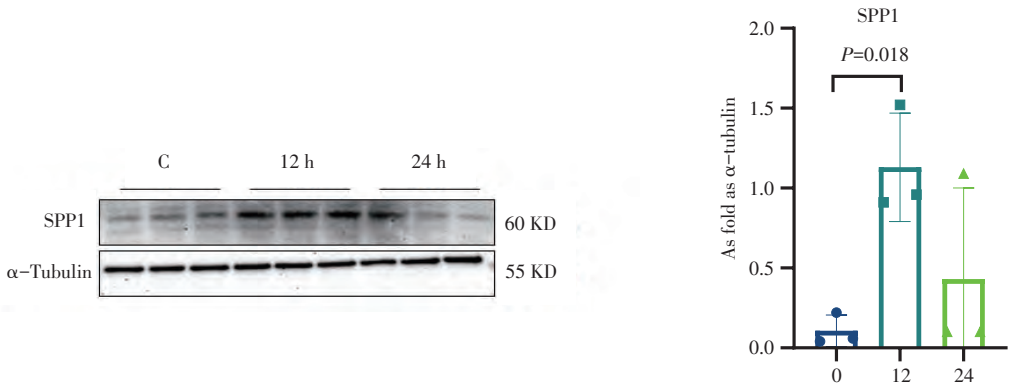


图 3　SPP1 在 SiO_2 刺激 RAW264.7 细胞不同时间的表达（n=3）

2. 3　矽肺小鼠模型中 SPP1、TNF-α 和 IL-10 的表达　免疫组织荧光染色结果显示，与对照组相比，矽肺小鼠模型肺组织 SPP1 阳性表达增多。与对照组相比，矽肺小鼠模型肺组织 TNF-α 阳性表达增多。与对照组相比，矽肺小鼠模型肺组织 IL-10 阳性表达增多。以上差异均有统计学意义（P<0. 05）。见图 4、表 2。

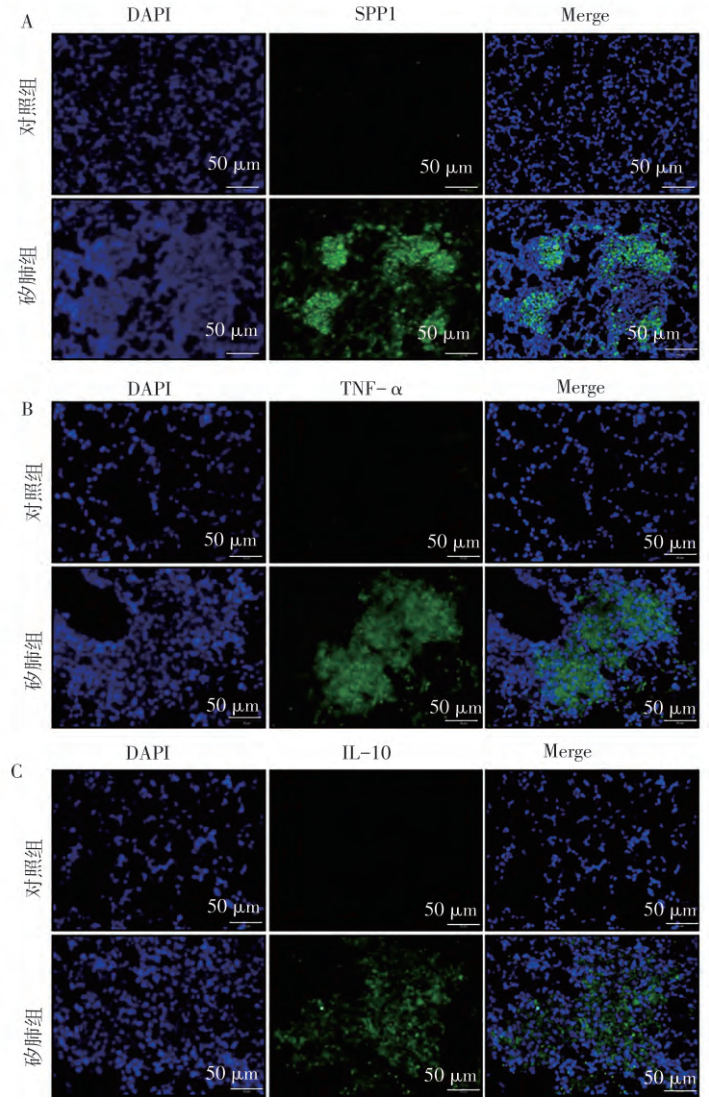


图 4　SPP1、TNF-α 和 IL-10 在矽肺小鼠肺组织中的表达

中国知网　https://www.cnki.net

表 2 SPP1、TNF-α 和 IL-10 在矽肺小鼠肺组织中的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	SPP1	TNF-α	IL-10
对照组	10	5.26±0.36	11.40±1.16	18.37±1.72
矽肺组	10	108.65±10.90	68.65±8.09	52.45±3.39
t 值		-16.421	-12.127	-15.517
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.4 M1/M2 型巨噬细胞活化因子 TNF-α、MCP-1、IL-10 在沉默 *Spp1* 的 RAW264.7 细胞中的表达 免疫印迹法结果显示，与对照组相比，沉默 *Spp1* 组中，MCP-1、TNF-α 和 IL-10 的蛋白表达水平无显著差异（$P>0.05$）；SiO_2 诱导组中 MCP-1、TNF-α 和 IL-10 的蛋白表达水平显著上调（$P<0.05$）；与 SiO_2 诱导组相比较，沉默 *Spp1* 后，MCP-1、TNF-α 和 IL-10 的蛋白表达水平显著下调（$P<0.05$）。见图 5、表 3。

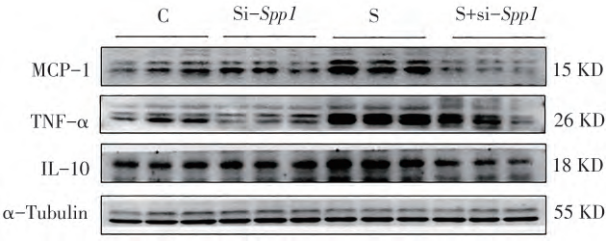


图 5 TNF-α、MCP-1、IL-10 在沉默 *Spp1* 的 RAW264.7 细胞中的表达（*n*=3）

表 3 TNF-α、MCP-1、IL-10 在沉默 *Spp1* 的 RAW264.7 细胞中的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TNF-α	MCP-1	IL-10
C	3	0.13±0.04	0.49±0.34	0.64±0.06
si-*Spp1*	3	0.21±0.10	0.68±0.25	0.78±0.11
S	3	1.11±0.11[a]	1.60±0.29[a]	1.44±0.24[a]
S+si-*Spp1*	3	0.55±0.26[b]	0.11±0.11[b]	0.40±0.23[b]
F 值		25.691	17.323	18.696
P 值		<0.001	0.001	0.001

注：与 C 组比较，[a]$P<0.05$；与 S 组相比，[b]$P<0.05$

2.5 SiO_2 诱导 RAW264.7 细胞中与 SPP1 潜在结合的蛋白 如表 4 所示，通过 Co-IP 实验钓取 SPP1 结合蛋白，进一步通过质谱鉴定 SiO_2 诱导 RAW264.7 细胞组 SPP1 潜在结合蛋白，并通过 Co-IP 结合免疫印迹进一步验证表明 SPP1 与 TGM3 高度结合。进一步通过在 RAW264.7 细胞沉默 *Spp1* 发现，与对照组相比，SiO_2 诱导组中 TGM3 的蛋白表达水平显著上调（$P<0.05$）；与 SiO_2 诱导组相比较，沉默 *Spp1* 后，TGM3 的蛋白表达水平显著下调（$P<0.05$）。见图 6。

表 4 质谱检测与 SPP1 潜在结合蛋白

Accession	Description	Specific Value
A0A075B5X6	Immunoglobulin heavy variable V1-67 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ighv1-67 PE=4 SV=1	766.92
X5J4W9	IgA heavy chain VDJ region (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 PE=2 SV=1	85.68
A0A140T8P5	Immunoglobulin kappa chain variable 8-24 (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=Igkv8-24 PE=4 SV=2	27.75
Q08189	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tgm3 PE=1 SV=2	15.01
B0V2N8	Annexin (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=Anxa2 PE=1 SV=1	11.16
Q5R3X8	CH2-domain (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 PE=4 SV=1	9.99
B5UB61	CP1-5 light chain variable region (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=CP1-5VL PE=2 SV=1	7.58
Q7M754	Try10-like trypsinogen OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gm5409 PE=2 SV=1	5.01

中国知网 https://www.cnki.net

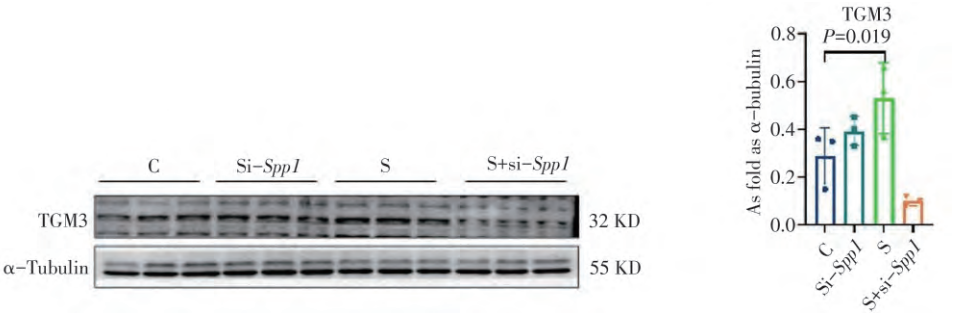


图 6　TGM3 在沉默 *Spp1* 的 RAW264.7 细胞中的表达（*n*=3）

3　讨论

矽肺是我国最常见的职业性疾病之一，其主要是在职业性活动中长期吸入游离 SiO_2 粉尘颗粒并潴留于肺部，接触 SiO_2 浓度越高，疾病进展速度越快，即使脱离接尘环境，病情仍继续发展并恶化[11]。近年随着矽肺工作环境中机械化进程不断推进、防治措施逐渐加强，矽肺总体发生率有所下降，但在特定职业群体中矽肺的流行现状仍十分严峻，且呈现出发病年龄年轻化的特点[1]。矽肺是没有医疗终结期的慢性疾病，因此深入探索矽肺纤维化发生、发展机制及其治疗靶点，是矽肺病防治研究的关键环节。

巨噬细胞作为矽肺的重要效应细胞在矽肺发生发展过程中发挥着重要作用。研究表明，接触 SiO_2 颗粒后，巨噬细胞吞噬 SiO_2，引起巨噬细胞活化，分泌促炎性细胞因子和趋化因子，导致炎症反应。随着炎症反应的加剧，进而释放多种细胞因子刺激成纤维细胞增殖、上皮细胞及内皮细胞的转化等。此外，成纤维细胞的增殖能够导致肺部内 ECM 和胶原蛋白的过度沉积，促进肺纤维化形成，影响肺部的正常功能[12-14]。

SPP1 作为可溶性细胞因子，能够通过激活调节细胞增殖、黏附和迁移的信号通路，参与炎症、免疫反应等生理与病理反应过程[15-16]，在组织重塑中发挥关键作用。近年来研究发现，肺、肝、肾、心脏等器官纤维化的组织中均有相对较高水平 SPP1 的表达[6]。尤其是在肺纤维化模型中，纤维化区域内的巨噬细胞均高表达 SPP1[17]。进一步研究发现，在多种实验性肺纤维化模型中 SPP1 均高表达于巨噬细胞[18-19]。以上研究提示，SPP1 的表达增加与肺部的炎症反应和胶原沉积现象密切相关。此外，肺纤维化患者血清中 SPP1 的含量变化可以作为用于评估临床抗纤维化治疗有效性的关键指标[20]。临床 Meta 分析也显示，SPP1 作为肺纤维化的一个潜在诊断标志和预后标志物[21]，课题组前期研究显示，吸入性染尘大鼠模型肺组织基因中 *Spp1* 基因的差异倍数和表达丰度均较对照组显著上调。本研究进一步验证发现，在矽肺大鼠和矽肺小鼠肺组织中 SPP1 呈现出显著的阳性表达，并主要表达于矽结节区域，同时伴随着巨噬细胞活化因子 TNF-α 和 IL-10 的阳性表达；体外研究显示，不同浓度、不同时间 SiO_2 诱导的 RAW264.7 细胞中 SPP1 蛋白表达水平显著上调。本研究体外结果表明，沉默 *Spp1* 基因后，巨噬细胞活化、炎症因子 MCP-1、TNF-α 和 IL-10 均表达显著下调。SPP1 是巨噬细胞活化的关键调节因子，影响巨噬细胞的几乎所有核心功能，它并不简单地推动巨噬细胞走向 M1 或 M2 极化，而是能够诱导出一种独特的、高度活化的巨噬细胞表型，沉默 *Spp1* 后，不仅 SPP1 本身的表达缺失，其下游调控的整张基因网络（包括促炎和抗炎基因）的表达水平也普遍降低[22]。为了进一步筛选 *Spp1* 如何引起下游活化、炎症因子的变化，进一步采用质谱分析 Co-IP 钓取与 SPP1 潜在结合的蛋白，结果显示，TGM3 可能与 SPP1 出现高度结合区域。有研究表明，SPP1 是 TGM3 的生理底物[23]，TGM3 能够通过催化蛋白质交联，直接参与 ECM 的稳定和沉积，是纤维化形成的效应分子[24]，细胞外基质中固相 SPP1 作为巨噬细胞的强力催化剂和激活剂，延长和放大炎症信号，促进炎症细胞的浸润和存活，从而在慢性炎症性疾病中发挥核心作用[25]，除此之外，SPP1 与 TGM3 在其他病理过程中存在功能上的互作关联[26-27]。因此，本研究中，沉默 *Spp1* 后能够抑制巨噬细胞活化及炎症因子释放、极化可能是通过减少与 TGM3 结合引起的，这可能是发挥其功能的潜在机制，在今后的研究中将进一步证实。

综上所述，本研究首先证实了在实验性矽肺模型和体外 SiO_2 诱导巨噬细胞模型中，SPP1 均高表达。其次发现沉默 *Spp1* 基因能够抑制 M1/M2 型巨噬细胞活化因子 MCP-1、TNF-α 和 IL-10 的表达。最后通过质谱分析发现 SPP1 的促纤维化机制可能与其和 TGM3 的相互作用有关。以上发现表明，靶向 *Spp1* 基因的调节可能为干预矽肺纤维化进程提供新的策略。

中国知网　https://www.cnki.net

利益冲突声明

本文无利益冲突。

参考文献

[1] Leung CC, Yu ITS, Chen W. Silicosis[J]. Lancet, 2012, 379(9830): 2008-2018.

[2] Liu X, Jiang Q, Wu P, et al. Global incidence, prevalence and disease burden of silicosis: 30 years' overview and forecasted trends[J]. BMC Public Health, 2023, 23(1): 1366.

[3] Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity[J]. ANNU REV PATHOL-MECH, 2020, 15(1): 123-147.

[4] Murray PJ. Macrophage Polarization[J]. Annu. Rev. Physiol., 2017, 79(1): 541-566.

[5] Pardo A, Gibson K, Cisneros J, et al. Up-Regulation and Profibrotic Role of Osteopontin in Human Idiopathic Pulmonary Fibrosis[J]. PLoS Medicine, 2005, 2(9): e251.

[6] Tang Z, Xia Z, Wang X, et al. The critical role of osteopontin (OPN) in fibrotic diseases[J]. Cytokine Growth Factor Rev., 2023, 74: 86-99.

[7] Jia Q, Ouyang Y, Yang Y, et al. Osteopontin: A Novel Therapeutic Target for Respiratory Diseases[J]. Lung, 2023, 200(2): 129-139.

[8] 蔡文臣, 张诗汇, 魏中秋, 等. Ac-SDKP 抑制 SPP1/TGF-β1 信号拮抗实验性矽肺的机制[J]. 实用医学杂志, 2021, 37(2): 159-163.

[9] Jin F, Li Y, Li T, et al. Establishing a Silicosis Rat Model via Exposure of Whole-Body to Respirable Silica[J]. J. Vis. Exp., 2022, (188): 64467.

[10] Li T, Mao N, Xie Z, et al. Paeoniflorin mitigates MMP-12 inflammation in silicosis via Yang-Yin-Qing-Fei Decoction in murine models[J]. Phytomedicine, 2024, 129: 155616.

[11] 毛翎, 彭莉君, 王焕强, 等. 尘肺病治疗中国专家共识(2024年版)[J]. 环境与职业医学, 2024, 41(1): 1-21.

[12] You Y, Yuan H, Min H, et al. Fibroblast-derived CXCL14 aggravates crystalline silica-induced pulmonary fibrosis by mediating polarization and recruitment of interstitial macrophages[J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 460: 132489.

[13] Wang J, Zhang X, Long M, et al. Macrophage-derived GPNMB trapped by fibrotic extracellular matrix promotes pulmonary fibrosis[J]. Communications Biology, 2023, 6(1): 136.

[14] Zhou X, Zhang C, Yang S, et al. Macrophage-derived MMP12 promotes fibrosis through sustained damage to endothelial cells[J]. J Haz Mat, 2024, 461: 132733.

[15] Clemente N, Raineri D, Cappellano G, et al. Osteopontin Bridging Innate and Adaptive Immunity in Autoimmune Diseases[J]. J. Immunol. Res, 2016, 2016: 1-15.

[16] Icer MA, Gezmen-karadag M. The multiple functions and mechanisms of osteopontin[J]. Clin. Biochem, 2018, 59: 17-24.

[17] Papazoglou A, Huang M, Bulik M, et al. Epigenetic Regulation of Profibrotic Macrophages in Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease[J]. Arthritis & Rheumatology, 2022, 74(12): 2003-2014.

[18] Sabo-attwood T, Ramos-nino ME, EUGENIA-ARIZA M, et al. Osteopontin Modulates Inflammation, Mucin Production, and Gene Expression Signatures After Inhalation of Asbestos in a Murine Model of Fibrosis[J]. Am. J. Pathol., 2011, 178(5): 1975-1985.

[19] Dadrich M, Nicolay NH, Flechsig P, et al. Combined inhibition of TGFβ and PDGF signaling attenuates radiation-induced pulmonary fibrosis[J]. OncoImmunology, 2016, 5(5): e1123366.

[20] Adegunsoye A, Alqalyoobi S, Linderholm A, et al. Circulating Plasma Biomarkers of Survival in Antifibrotic-Treated Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis[J]. Chest, 2020, 158(4): 1526-1534.

[21] Liao Y, Wang R, Wen F. Diagnostic and prognostic value of secreted phosphoprotein 1 foridiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review and meta-analysis[J]. Biomarkers, 2023, 28(1): 87-96.

[22] Rittling SR. Osteopontin in macrophage function[J]. Expert Rev. Mol. Med., 2011, 13: e15.

[23] Chermnykh ES, Alpeeva EV, Vorotelyak EA. Transglutaminase 3: The Involvement in Epithelial Differentiation and Cancer[J]. Cells, 2020, 9(9): 1996.

[24] Soltani F, Kaartinen MT. Transglutaminases in fibrosis—overview and recent advances[J]. AM J PHYSIOL-CELL PH, 2023, 325(4): 885-894.

[25] Castello LM, Raineri D, Salmi L, et al. Osteopontin at the Crossroads of Inflammation and Tumor Progression[J]. Mediators of Inflammation, 2017, 2017: 1-22.

[26] Liu C, Wu K, Li C, et al. SPP1^{+} macrophages promote head and neck squamous cell carcinoma progression by secreting TNF-α and IL-1β[J]. J. Exp. Clin. Cancer Res., 2024, 43(1): 332.

[27] Rosmus DD, Lange C, Ludwig F, et al. The Role of Osteopontin in Microglia Biology: Current Concepts and Future Perspectives[J]. Biomedicines, 2022, 10(4): 840.

[2025-10-09 收稿]

中国知网 https://www.cnki.net