

氰酸盐对肺上皮细胞及小鼠肺气道阻力的影响*

徐航¹, 胡玲^{1,2}, 姜蓉², 张滔¹, 何爽², 卢睿瑾², 何家明², 吴梦娜¹, 孙悦²,
李静², 冉建华^{1,2}

(1. 重庆医科大学基础医学院解剖教研室神经科学研究中心, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学基础医学院干细胞工程与干细胞研究室, 重庆 400016)

【摘要】 目的: 观察氰酸盐对 C57/BL6N 小鼠肺气道阻力和肺组织结构的影响, 以及对人肺 A549 细胞系细胞活性和蛋白表达水平的影响。方法: 选取 40 只雄性 C57/BL6N 小鼠随机分为两组: 正常对照组 (20 只)、氰酸盐组 (20 只), 适应性喂养一周后, 氰酸盐组是在小鼠饮水中添加 100 mmol/L 氰酸盐喂养 4 周, 并分别在实验开始与结束时测定小鼠肺气道阻力 (Raw)。第 4 周实验结束时处死小鼠, 取肺组织采用 HE 与 Masson 染色法进行病理观察。另取生长良好的对数生长期 A549 细胞经 0、0.25、0.5、1 mmol/L 浓度的氰酸盐处理 24 h 后, 采用 CCK8 法检测细胞活力; 活性氧 ROS 荧光探针 (DCFH-DA) 检测细胞 ROS 水平变化; 蛋白免疫印迹法检测肺组织与细胞 E-Cadherin 与 Fibronectin 表达情况。结果: 实验开始前, 正常对照组与氰酸盐组小鼠肺气道阻力值分别为 (1.82 ± 0.76) cm H₂O/(L·s) 与 (1.85 ± 0.78) cm H₂O/(L·s), 差异无显著性; 实验结束后, 氰酸盐组小鼠肺气道阻力值增高至 (4.86 ± 0.87) cm H₂O/(L·s) ($P < 0.01$)。HE 染色结果显示: 与正常对照组相比, 氰酸盐组小鼠肺泡结构破坏, 气管壁增厚, 肺间质组织增生明显。Masson 染色结果显示: 氰酸盐组小鼠气管周围弹力纤维沉积。CCK8 法测定 A549 细胞活力结果显示: 0.5 mmol/L 及以上浓度的氰酸盐暴露可引起 A549 细胞活力下降。免疫荧光结果显示: 0.25 mmol/L 氰酸盐即可刺激 A549 细胞内 ROS 增加而出现绿色荧光, 细胞内绿色荧光强度随氰酸盐浓度增加而增强。蛋白免疫印迹法结果显示: 0.5 mmol/L 的氰酸盐处理即可使 A549 细胞中 E-Cadherin 的表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 并随浓度增加降低更加显著。A549 细胞中 Fibronectin 的表达水平随氰酸盐浓度增加而上升, 在 1 mmol/L 浓度氰酸盐时其表达水平显著上升 ($P < 0.01$)。小鼠肺组织蛋白免疫印迹结果显示, 与正常对照组相比, 氰酸盐组小鼠 E-Cadherin 表达水平显著减少 ($P < 0.01$), Fibronectin 的表达水平显著增加 ($P < 0.01$)。结论: 病理浓度的氰酸盐可以引起小鼠肺间质组织增生、纤维沉积, 导致肺气道阻力增加; 其机制可能与氰酸盐损伤肺上皮细胞活力、促进 ROS 增加, 诱导细胞外基质成分的病理改变有关。

【关键词】 氰酸盐; 肺泡上皮细胞; 细胞外基质; C57/BL6N 小鼠

【中图分类号】 Q591.2, R393

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-6834(2024)01-165-006

【DOI】 10.12047/j.cjap.6324.2022.102

Effects of cyanate on pulmonary epithelial cells and pulmonary function in mice

XU Hang¹, HU Ling^{1,2}, JIANG Rong², ZHANG Tao¹, HE Shuang², LU Rui-jing²,
HE Jia-ming¹, WU Meng-na¹, SUN Yue², LI Jing², RAN Jian-hua^{1,2}

(1. Neuroscience Research Center, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; 2. Lab of Stem Cell and Tissue Engineering, Department of Histology and Embryology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

【ABSTRACT】 Objective: To investigate the injury of cyanate on the pulmonary function and morphology of C57/BL6N mice. **Methods:** Forty male C57/BL6N mice were randomly divided into two groups: normal control group (20 mice) and cyanate group (20 mice). Mice were exposed to 100 mmol/L cyanate feeding for 4 weeks, and pulmonary Raw (Resistance in Air Way) was measured at the beginning and end of the experiment. The mice were sacrificed at the end of the fourth week of the experiment, and the lung tissues were collected for pathological observation and molecular detection of E-Cadherin and Fibronectin. Well-growing A549 cells in logarithmic growth phase were treated with cyanate at the concentrations of 0, 0.25, 0.5 and 1 mmol/L for 24 h, and the cell viability was detected by CCK8 method; reactive oxygen species ROS fluorescent probe (DCFH-DA) was used to detect the changes of ROS levels, and expressions of E-Cadherin and Fibronectin in cells and pulmonary tissues were detected by Western blot. **Results:** At the beginning of the experiment, the pulmonary airway resistance values of the mice in the normal control group and the cyanate group were (1.82 ± 0.76) cmH₂O/(L·s) and (1.85 ± 0.78) cmH₂O/(L·s), respectively, with no significant difference. Four weeks later, the pulmonary airway resistance value of mice in the cyanate group was increased to (4.86 ± 0.87) cmH₂O/(L·s) ($P < 0.01$). The HE staining showed that, compared with the normal control group, the injured alveolar structure, the thickened tracheal wall and the signif-

ificantly proliferated pulmonary interstitial tissue were observed in the cyanate group. The Masson staining showed that elastic fibers were deposited around the trachea of mice in the cyanate group. The results of CCK8 assay for the viability of A549 cells showed that 0.5 mmol/L cyanate exposure could reduce the viability ($P < 0.01$). The immunofluorescence staining showed that cyanate could increase ROS level in A549 cells by producing green fluorescence in a concentration-dependent manner. The results of Western blotting showed that 0.5 mmol/L of cyanate treatment on A549 cells could reduce the expression of E-Cadherin ($P < 0.01$) with increasing concentration of cyanate. The expression level of Fibronectin in A549 cells was increased with the increasing cyanate concentration, and there was a significant difference ($P < 0.01$) on 1 mmol/L cyanate. Western blot results of lung showed the decreasing expression of E-Cadherin ($P < 0.01$) and increasing expression of Fibronectin ($P < 0.01$) in cyanate mice. **Conclusion:** Pathological concentrations of cyanate can induce the proliferation of pulmonary interstitial tissue, fibrous deposition, and increased pulmonary airway resistance in mice, which may be related to damaged pulmonary epithelial cell viability, enhanced ROS production, and induced pathologic changes of extracellular matrix by cyanate.

【KEY WORDS】 cyanate; pulmonary epithelium; extracellular matrix; C57/BL6N mice

氰酸盐 (cyanate) 是由尿毒症患者体内高浓度的尿素自发水解产生,其迅速生成反应型异氰酸 ($\text{HN}=\text{C}=\text{O}$) 通过氨基甲酰化修饰与氨基、硫醇和苯酚基或羧基相互作用,导致激素、酶活性的改变以及蛋白质功能异常,这些改变与慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD)、动脉粥样硬化等多种疾病的发生密切相关^[1]。慢性肾脏病中,氨基甲酰化低密度脂蛋白可通过诱导内皮细胞凋亡促进动脉粥样硬化的发生,氨基甲酰化白蛋白促进肾小管肾小球增殖,故有学者提出,将蛋白质氨基甲酰化作为慢性肾脏病的生物标志物。而近期研究发现,氰酸盐还可直接刺激脐静脉内皮细胞氧化应激损伤、促发肾小管上皮细胞上皮间充质转化^[2,3]。由此可见,氰酸盐作为一种内源性毒性物质,可通过多种机制参与慢性肾脏病并发症的病理过程。肺功能减退是慢性肾脏病的常见并发症,慢性肾脏病或终末期肾脏病 (end stage renal disease, ESRD) 患者随病程的延长、体内尿素浓度的增加出现限制性通气障碍,但病因和病理机制不清^[4]。此外,氰酸盐也可由大气污染与香烟烟雾中吸入血中的硫氰酸盐 (Thiocyanate) 通过髓过氧化物酶氧化形成;环境中异硫氰酸所引发的肺功能损伤也以限制性通气障碍为主要表现^[5]。由此可见,氰酸盐可能是导致两类不同人群肺功能损伤的共同病理因素,但其对肺组织的病理作用及相关机制鲜有报道。本研究通过体内与体外实验探讨氰酸盐对肺功能、肺组织结构的影响及相关机制,为临床慢性肾脏病并发肺功能损伤以及大气污染物致肺功能障碍的治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 试剂

C57/BL6N 小鼠 (重庆医科大学实验动物中心); HE 染色试剂盒、Masson 染色试剂盒 (北京索莱宝试剂有限公司); 人肺上皮细胞 A549 (北纳生物公司); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 澳洲 BIO-AGRIO 公司); DMEM 培养基 (Hyclone 公司); 氰酸盐 (Sigma 公司); 胰蛋白酶消化液、青/链霉素溶液、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、CCK8 试剂盒 (MCE 公司)、ROS 测定试剂盒、DAPI 抗荧光猝灭封片液 (上海碧云天生物技术有限公司) E-Cadherin、FN1 抗体 (沈阳万类生物技术有限公司)。

1.2 实验动物的处理

自重庆医科大学实验动物中心购入 6~8 周龄 C57/BL6N 小鼠 40 只,以每笼 5 只随机分置于 8 笼内,实验室温控于 20~25℃ 之间,相对湿度为 (50±5)%,并处于 12 h 光暗交替之下,提供标准饲料与洁净饮水适应性培养一周。随后将小鼠随机分为 2 组:正常对照组 (20 只) 与氰酸盐组 (20 只),并测定小鼠肺气道阻力。实验开始后,在氰酸盐组小鼠饮水中添加 100 mmol/L 氰酸盐充分溶解并每 24 h 更换一次,氰酸盐组提供标准饲料,正常对照组提供标准饲料与洁净饮水,每日记录小鼠体重与饮水量。第 4 周测定两组小鼠肺气道阻力后,处死小鼠并于无菌环境中分离肺组织用于病理观察和免疫印迹检测。

1.3 HE 染色法与 Masson 染色法染色检测小鼠肺组织形态学变化

取出多聚甲醛灌流固定的小鼠肺组织,切成大小一致的方块,经梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后切成 4 μm 组织切片,烤箱烤片,二甲苯浸泡脱蜡后分别进行 HE 与 Masson 染色,并于光学显微

*【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81770738)

【收稿日期】 2022-05-12 【修回日期】 2022-09-28

△【通讯作者】 Tel: +86 15086814824; E-mail: ranjianhua@cqmu.edu.cn

镜下观察。

1.4 全身呼吸体积描记系统检测小鼠肺气道阻力

实验动物肺功能检测采用 DSI Buxco 公司 Fine-Pointe 全身呼吸体积描记系统 (Whole Body Plethysmography), 监测清醒自由活动、非束缚、非麻醉状态下实验动物的呼吸功能, 小鼠置于 DSI Buxco 呼吸仪测定腔体中, 用卡片固定小鼠头部并密封腔体, 于小鼠清醒条件下测定小鼠肺气道阻力 (resistance in air way, RAW) 数值。

1.5 细胞培养

人肺泡上皮细胞 A549 细胞复苏后, 采用 Hyclone 公司 DMEM 培养基配置成含 10% FBS、1% 青/链霉素的细胞培养液, 在 37℃、含 5% CO₂ 恒温孵箱中培养, 细胞生长至 80% 融合用 0.25% 胰酶 37℃ 消化 3 min 后混匀用于后续实验。

1.6 CCK8 法检测细胞活力

将对数生长期的细胞接种于 96 孔板中, 每孔接种 1×10^4 个细胞, 设置氰酸盐浓度梯度为 0、0.25、0.5、1、2、4 mmol/L, 对照组加入不含氰酸盐的培养基培养 24 h 后取出, 每孔加入总体积为 10 μ l CCK8 试剂与 100 μ l DMEM 培养基在 37℃ 孵箱中孵育 2 h 后在 450 nm 测定吸光度, 根据公式计算细胞活力。

1.7 DCHA-DA 法检测细胞 ROS 水平

将对数生长期的细胞按照每孔 1×10^4 个细胞接种于 6 孔板中, 采用含 0、0.25、0.5、1、2 mmol/L 氰酸盐的培养基孵育 24 h, 吸出培养基后每孔加入稀释后的 DCFH-DA 溶液 1 ml, 37℃ 避光摇床孵育 30 min, 随后用 PBS 液洗涤 3 次, 去除多余 DCFH-DA 并在显微镜下观察荧光强度。

1.8 Western blot 检测蛋白表达水平

A549 细胞加入浓度为 0、0.25、0.5、1、2 mmol/L 的氰酸盐培养液, 恒温培养 24 h 后 PBS 洗涤, 刮下细胞离心 5 min 收集细胞沉淀后提取蛋白。采用碧云天 BCA 蛋白试剂盒测定细胞蛋白浓度, 并加入 loading buff 将蛋白质 95℃ 煮沸 5 min 用于后续检测。SDS-PAGE 凝胶配置后将蛋白样品上样、电泳后电转于 PVFC 膜上, 脱脂牛奶封闭后分别至于稀释后一抗 E-Cadherin (1 : 1 000)、Fibronectin (1 : 1 000) 孵育过夜, TBST 缓冲液洗涤 3 \times 10 min 后放入稀释后二抗 (1 : 1 0000) 中室温孵育 1 h, TBST 缓冲液洗涤 3 \times 10 min 后于暗室滴加发光液检测蛋白表达, 结果图像采用 Image Lab 软件进行灰度分析。

1.9 统计学处理

计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 所有统计学分析使用 SPSS 23.0 统计软件进行分析, 两样本

均数使用独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 氰酸盐暴露对 C57/BL6N 小鼠肺气道阻力的影响

分别在实验开始前、实验结束时测定小鼠肺气道阻力。实验开始时, 两组小鼠肺气道阻力率分别为 (1.82 ± 0.76) cmH₂O/(L · s) 与 (1.85 ± 0.78) cmH₂O/(L · s), 差异无显著性 ($P > 0.05$)。氰酸盐饮水 4 周后, 对照组小鼠肺气道阻力为 (1.82 ± 0.18) cmH₂O/(L · s), 与对照组比较, 氰酸盐组小鼠肺气道阻力显著增加至 (4.86 ± 0.87) cmH₂O/(L · s) ($P < 0.01$)。

2.2 氰酸盐暴露对 C57/BL6N 小鼠肺结构的影响

小鼠肺组织切片 HE 染色结果显示, 氰酸盐组小鼠肺泡结构破坏明显, 肺间质增生并伴有气道壁增厚 (图 1A)。为进一步探究小鼠气道壁结构改变进行 Masson 染色, 可见小鼠气道壁周围出现明显的蓝色弹力纤维沉积 (图 1B)。

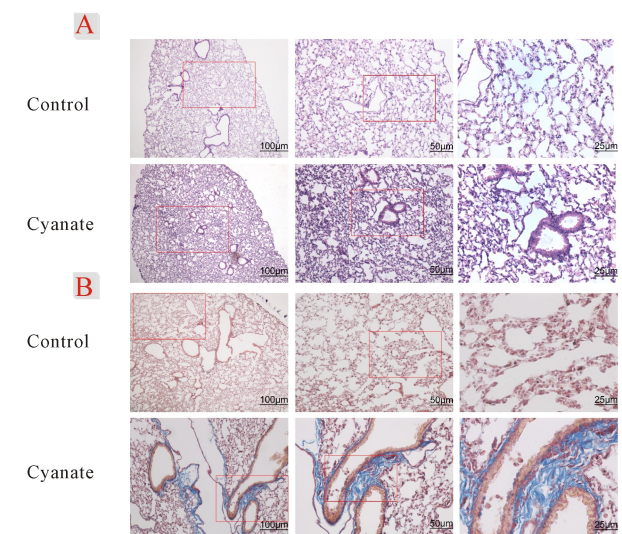


Fig. 1 Histological staining of lungs in mice (Magnification: \times 100, \times 200, \times 400)

A: Hematoxylin-Eosin staining; B: Masson staining

2.3 氰酸盐暴露对肺 A549 细胞活力的影响

将 A549 细胞置于浓度为 0、0.5、1、2、4 mmol/L 的含氰酸盐 DMEM 培养基培养 24 h, 使用 CCK8 法检测细胞存活率。结果显示, 随着氰酸盐浓度的增加, A549 细胞的活力逐渐下降。与对照组比较, 氰酸盐作用浓度为 0.25 mmol/L 时 A549 细胞活力为对照组的 94.78%, 氰酸盐作用浓度为 0.5 mmol/L 时 A549 细胞活力为对照组的 82.35%, 氰酸盐作用浓度为 1 mmol/L 时 A549 细胞活力为对照组的 74.14% ($P < 0.01$), 氰酸盐作用浓

度为 2 mmol/L 时 A549 细胞活力为对照组的 66.26% ($P < 0.01$), 氰酸盐作用浓度为 4 mmol/L 时, A549 细胞活力仅有对照组的 55.56% ($P < 0.01$)。

2.4 氰酸盐暴露对肺 A549 细胞 ROS 水平的影响

用荧光探针 DCFH-DA 检测细胞内 ROS 水平, DCFH-DA 探针与被细胞内活性氧 ROS 氧化为 DCF 并发出绿色荧光, 荧光强度的变化反映细胞内 ROS 水平。不同浓度的氰酸盐作用 24 h 后 (0、0.25、0.5、1 mmol/L), 荧光显微镜下观察细胞荧光。如图 2 所示, 无氰酸盐组镜下未见绿色荧光; 0.25 mmol/L 氰酸盐浓度下可见部分细胞的绿色荧光较强, 0.5 mmol/L 氰酸盐浓度下发出绿色荧光的细胞数量增多、荧光强度增加; 而在 1 mmol/L 氰酸盐浓度下绿色荧光最强。

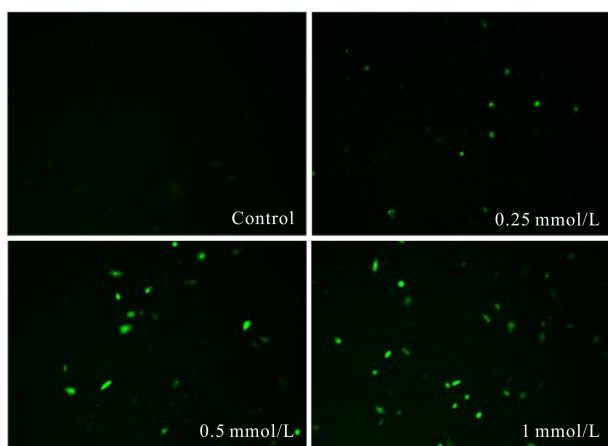


Fig. 2 Effects of cyanate on the expression of ROS in A549 (Magnification: $\times 200$)

2.5 氰酸盐暴露对细胞外基质蛋白表达的影响

由于 Masson 染色观察到气管壁弹力纤维的沉积, 为明确氰酸盐对肺间质中细胞外基质蛋白的影响, 分别对体内、体外细胞外基质的标志物蛋白进行检测。使用含不同浓度的氰酸盐 (0、0.25、0.5、1 mmol/L) DMEM 培养基培养 A549 细胞 24 h 后, 收集细胞进行蛋白免疫印迹测定, 结果如图 3A 所示, 与正常对照组相比, 氰酸盐组 E-Cadherin 的表达水平随着浓度增加而降低, 0.5 mmol/L 和 1 mmol/L 的氰酸盐可显著降低 E-Cadherin 的表达 ($P < 0.01$, 表 1)。随着氰酸盐浓度的增加, A549 细胞中 Fibronectin 的表达逐渐升高, 在 1 mmol/L 浓度氰酸盐时具有显著性差异 ($P < 0.01$, 表 1)。图 3B 显示正常对照组与氰酸盐组小鼠肺组织蛋白免疫印迹结果, 与正常对照组相比, 氰酸盐组小鼠 E-Cadherin 表达显著减少 ($P < 0.01$), Fibronectin 的表达显著增加 ($P < 0.01$, 表 2)。

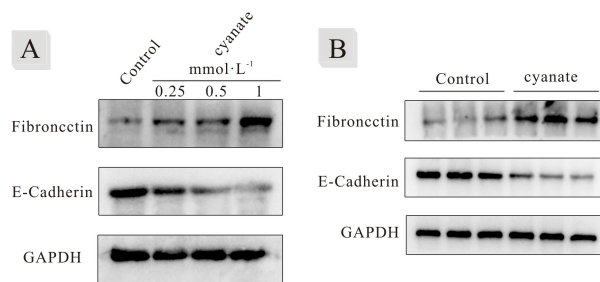


Fig. 3 Effects of cyanate on the expressions of E-Cadherin and Fibronectin *in vivo* and *in vitro* ($n = 3$)

Tab. 1 Effects of cyanate on the expressions of E-Cadherin and Fibronectin *in vitro* ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

| Group | E-Cadherin (Fold change) | Fibronectin (Fold change) |
|-------------|--------------------------|---------------------------|
| Control | 1.08 ± 0.04 | 1.01 ± 0.05 |
| 0.25 mmol/L | 0.81 ± 0.18 | 1.36 ± 0.31 |
| 0.5 mmol/L | 0.63 ± 0.17* | 1.49 ± 0.23 |
| 1 mmol/L | 0.50 ± 0.06** | 2.32 ± 0.46** |

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

Tab. 2 Effects of cyanate on the expressions of E-Cadherin and Fibronectin *in vivo* ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

| Group | E-Cadherin (Fold change) | Fibronectin (Fold change) |
|---------|--------------------------|---------------------------|
| Control | 1.36 ± 0.25 | 0.40 ± 0.06 |
| Cyanate | 0.56 ± 0.01** | 0.90 ± 0.05** |

** $P < 0.01$ vs control

3 讨论

氰酸盐是尿毒症患者体内高浓度尿素水解产生的致病因素, 同时也可由香烟烟雾与大气污染物进入体内的硫氰酸盐氧化形成^[6, 7]。体内氰酸盐的毒理作用已被广泛认识, 其不仅可以直接损伤血管内皮细胞刺激 ICAM-1 表达增加以及上调 Nrf2 通路诱导上皮细胞氧化应激^[2]; 还可通过改变肝脏脂质代谢模式来诱导氧化应激损伤^[8, 9]。此外, 氰酸盐亦可通过氨甲酰化蛋白质影响蛋白结构和功能而发挥致病作用, 如氨甲酰化的白蛋白可引起肾纤维化, 因而被看作慢性肾衰的生物标志物^[10-13]。尽管慢性肾脏病患者常伴肺功能减退, 但氰酸盐对于肺组织的损伤作用却未见报道。因此, 本研究通过体内与体外实验观察病理浓度的氰酸盐对小鼠肺功能及组织结构的病理作用, 以及氰酸盐对人肺上皮细胞活力、ROS 水平及细胞外基质成分的影响, 探讨氰酸盐致肺功能减退的病理机制。

慢性肾脏病患者并发肺功能减退的风险不可忽视。Anees M 等通过肺通气功能研究发现, 几乎半

数(44.3%)的慢性肾脏病患者并发肺功能下降,肺容量减少,存在限制性通气功能障碍^[14]。尽管研究者认为慢性肾脏病全身的高炎症状态可能影响肺功能^[15],然而CKD诱发肺顺应性下降的具体原因尚不明确。本研究通过给C57/BL6N小鼠饮用氰酸盐溶液造成体内高浓度氰酸盐的疾病状态,模拟氰酸盐在慢性肾脏病患者体内的病理进程;在实验结束时观察到小鼠的肺气道阻力上升明显,并且通过HE染色观察到气管壁增厚、肺间质增生的病理改变,Masson染色进一步证实肺间质的纤维沉积,提示氰酸盐可能是导致肺间质病理改变的重要因素。众所周知,肺纤维化的主要体现为限制性通气功能障碍;而田宽等发现氰酸盐可以刺激肾小管上皮通过上皮-间充质转化导致肾纤维化发生;氰酸盐如何促进小鼠肺间质纤维沉积需要进一步证实。本研究随后选取人肺泡上皮A549细胞进行体外实验的验证,CCK8实验发现0.5 mmol/L的氰酸盐24 h便可损伤肺上皮细胞活力,这与氰酸盐组小鼠肺泡结构破坏明显的结果相符;而慢性肾脏病患者的血液氰酸盐浓度约为0.8 mmol/L左右,长期高氰酸盐负荷可能造成肺上皮的损伤。

肺上皮细胞的损伤以及ECM的沉积是肺纤维化的主要病理进程^[16-18],而肺纤维化的起因也被认为是与慢性炎症相关^[19-21]。长期的炎症状态刺激了肺上皮细胞的损伤以及成纤维细胞的活化,进而引发ECM的沉积^[22-25],最终导致肺组织不可逆的病理性重塑^[26,27],其中细胞内高水平的活性氧被认为与炎症密切相关^[15]。本研究使用含氰酸盐的DMEM培养细胞24 h后,在细胞内观察到明显增高的活性氧水平,0.25 mmol/L的氰酸盐即可刺激细胞内活性氧水平升高,这远远低于疾病状态中常常达到0.8~1 mmol/L的氰酸盐浓度^[7],因此肾病患者体内的氰酸盐水平可能刺激肺上皮细胞生成活性氧与引发炎症。同样的,氰酸盐改变了A549细胞的细胞外基质蛋白表达水平,梯度浓度氰酸盐的DMEM培养细胞24 h后A549细胞E-Cadherin表达水平减少($P<0.01$),而纤连蛋白Fibronectin表达水平上调($P<0.01$)。E-Cadherin蛋白作为上皮细胞的分子标志,其表达水平的减少意味着氰酸盐通过损伤肺上皮细胞破坏肺上皮屏障,而纤连蛋白的表达水平增加与Masson染色下观察到的胶原明显沉积相关,提示氰酸盐具有诱发纤维化的趋势。因此,减少氰酸盐暴露可以在肺间质损伤的早期阻止肺结构的不可逆改变,为临床上逆转慢性肾脏病患者肺功能损伤,以及香烟与大气重度污染存在的氰

酸盐暴露所诱发的肺纤维化提供重要的分子靶点。

综上所述,本研究通过体内外实验证实,长期的氰酸盐暴露可以引起小鼠肺气道阻力下降、肺组织结构损伤和肺间质弹力纤维沉积;低浓度的氰酸盐即可造成A549细胞活力下降,ROS水平提升,伴随着细胞外基质蛋白E-Cadherin表达水平的减少和Fibronectin表达水平的增加。本研究结果表明,氰酸盐可能是诱发肺功能损伤的重要病理因素,从而为临床治疗提供新的途径。然而,本研究也存在局限性,氰酸盐对肺上皮细胞氧化应激与炎症的具体机制,以及氰酸盐如何通过改变蛋白构象刺激肺上皮细胞的间质化改变还需要深入研究。

【参考文献】

- [1] Gorisse L, Jaisson S, Piétrement C, et al. Carbamylated proteins in renal disease: Aggravating factors or just biomarkers? [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(1): 574-608.
- [2] 樊春华, 田宽, 何菲, 等. 氰酸盐诱导人脐静脉内皮细胞氧化应激损伤[J]. *中国细胞生物学学报*, 2017, 39(12): 1550-1555.
- [3] 田宽, 袁德智, 胡玲, 等. 氰酸盐诱导氧化应激促进肾小管上皮细胞上皮-间充质转化[J]. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(2): 228-234.
- [4] Sumida K, Kwak L, Grams ME, et al. Lung function and incident kidney disease: The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study[J]. *Am J Kidney Dis*, 2017, 70(5): 675-685.
- [5] Leslie MD, Ridoli M, Murphy JG, et al. Isocyanic acid (HNCO) and its fate in the atmosphere: a review[J]. *ESPI*, 2019, 21(5): 793-808.
- [6] Himmelfarb J. Urea: surrogate or toxin? [J]. *Kidney Int*, 1999, 56(2): 754-755.
- [7] GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2020, 395(10225): 709-733.
- [8] 胡玲, 田宽, 张滔, 等. 氰酸盐诱导人正常肝细胞HL-7702氧化应激损伤[J]. *中华肝脏病杂志*, 2020, 28(5): 446-449.
- [9] Hu L, Tian K, Zhang T, et al. Cyanate induces oxidative stress injury and abnormal lipid metabolism in liver through Nrf2/HO-1 [J]. *Molecules*, 2019, 24(18): 3231-3261.
- [10] Kalim S, Berg AH, Karumanchi SA, et al. Protein carbamylation and chronic kidney disease progression in the Chronic Renal Insufficiency Cohort Study[J]. *Nephrol Dial Transpl*, 2021, 37(1): 139-147.

- [11] Ok E, Basnakian AG, Apostolov EO, *et al.* Carbamylated low-density lipoprotein induces death of endothelial cells: a link to atherosclerosis in patients with kidney disease[J]. *Kidney Int*, 2005, 68 (1): 173-178.
- [12] Kraus LM, Garber L, Handorf CR, *et al.* Carbamoylation of glomerular and tubular proteins in patients with kidney failure: a potential mechanism of ongoing renal damage[J]. *SMW*, 2001, 131(11-12): 139-147.
- [13] Chetan R, Shobhit G, Syed AM, *et al.* Biochanin A alleviates unilateral ureteral obstruction-induced renal interstitial fibrosis and inflammation by inhibiting the TGF- β 1/Smad2/3 and NF-kB/NLRP3 signaling axis in mice [J]. *Life Sci*, 2022; 298: 520-527.
- [14] Anees M, Akbar H, Ibrahim M, *et al.* Pulmonary functions and factors affecting them in patients with chronic kidney disease[J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2020, 30(10): 1082-1085.
- [15] Kwon EJ, Ju JH. Impact of posttranslational modification in pathogenesis of rheumatoid arthritis: Focusing on citrullination, carbamylation, and acetylation[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10576-10631.
- [16] Sakai N, Tager AM. Fibrosis of two: epithelial cell-fibroblast interactions in pulmonary fibrosis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1832(7): 911-921.
- [17] Chioma OS, Drake WP. Role of microbial agents in pulmonary fibrosis [J]. *Yale J Biol Med*, 2017, 90 (2): 219-227.
- [18] Case AH. Clinical overview of progressive fibrotic interstitial lung disease[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2022, 9: 839-858.
- [19] Conese M, Di Gioia S. Pathophysiology of lung disease and wound repair in cystic fibrosis[J]. *Pathophysiology*, 2021, 28(1): 155-188.
- [20] Estornut C, Milara J, Bayarri MA, *et al.* Targeting oxidative stress as a therapeutic approach for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 794-797.
- [21] Caldeira D, Weiss D, Rocco P, *et al.* Mitochondria in focus: From function to therapeutic strategies in chronic lung diseases[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 782074.
- [22] Shaykh M, Pegoraro AA, Mo W, *et al.* Carbamylated proteins activate glomerular mesangial cells and stimulate collagen deposition[J]. *J Lab Clin Med*, 1999, 133(3): 302-308.
- [23] Musaelyan A, Lapin S, Nazarov V, *et al.* Vimentin as antigenic target in autoimmunity: A comprehensive review [J]. *Autoimmun Rev*, 2018, 17(9): 926-934.
- [24] Rockey DC, Bell PD, Hill JA. Fibrosis-a common pathway to organ injury and failure [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(12): 1138-1149.
- [25] Sgalla G, Iovene B, Calvello M, *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and management [J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 32-68.
- [26] Barratt SL, Creamer A, Hayton C, *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF): an overview [J]. *J Clin Med*, 2018, 7(8): 201-235.
- [27] Katoh M. Molecular genetics and targeted therapy of WNT-related human diseases[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(3): 587-606.

(上接第 164 页)

- [16] Zhu N, Xiang YJ, Zhao XY, *et al.* Thymoquinone suppresses platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation, migration and neointimal formation[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(12): 8482-8492.
- [17] Neijssen J, Herberts C, Drijfhout JW, *et al.* Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions[J]. *Nature*, 2005, 434(7029): 83-88.
- [18] Grimmer B, Krauszman A, Hu X, *et al.* Pannexin 1-a novel regulator of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction[J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 118(11): 2535-2547.
- [19] Freeman TJ, Sayedyahosseini S, Johnston D, *et al.* Inhibition of Pannexin 1 reduces the tumorigenic properties of human melanoma Cells[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(1): 102-126.
- [20] Furlow PW, Zhang S, Soong TD, *et al.* Mechanosensitive pannexin-1 channels mediate microvascular metastatic cell survival[J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(7): 943-949.
- [21] Liu HF, Yuan M, Yao YX, *et al.* *In vitro* effect of Pannexin 1 channel on the invasion and migration of I-10 testicular cancer cells via ERK1/2 signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109090.
- [22] 邹呈雨, 宋关斌. 骨桥蛋白促细胞迁移作用及其分子机理[J]. *生命的化学*, 2009, 29(04): 543-546.
- [23] 宋楠萌, 桑建利, 徐恒. 增殖细胞核抗原(PCNA)的分子结构及其生物学功能研究进展[J]. *自然科学进展*, 2006, 10(1): 1201-1209.
- [24] Ramos JW. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(12): 2707-2719.
- [25] Peng LQ, Chen YW, Li Y, *et al.* Chemerin regulates the proliferation and migration of pulmonary arterial smooth muscle cells via the ERK1/2 signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 767705.