·论　著·

IL-37下调ET-1改善PM2.5诱导气道高反应及气道重塑

曹　敬[1],宋贝贝[1],刘泽鑫[2],徐海博[1],关继涛[1],阎锡新[1],晁灵善[1*]

(1.河北医科大学第二医院呼吸与危重症医学科一科,河北 石家庄 050000;2.河北医科大学第二医院呼吸与危重症医学科四科,河北 石家庄 050000)

[摘要] **目的**　探讨白细胞介素37(interleukin-37,IL-37)对细颗粒物(fine particulate matter,PM2.5)诱导小鼠气道高反应(airway hyperresponsiveness,AHR)的保护作用及其与内皮素1(endothelin-1,ET-1)的关系。**方法**　取野生型(wild type,WT)及IL-37转基因(IL-37 transgenic,IL-37tg)小鼠,设立野生型过滤空气(WT-FA)组、野生型PM2.5(WT-PM2.5)组、IL-37转基因过滤空气(IL-37tg-FA)组和IL-37转基因PM2.5(IL-37tg-PM2.5)组。PM2.5暴露组采用口鼻吸入方式,每日暴露4 h,持续90 d。测定气道阻力(airway resistance,Rn)、呼吸系统阻力(respiratory system resistance,Rrs)与气道弹性阻力(respiratory system elastance,Ers);行苏木精—伊红(hematoxylin-eosin,HE)及Masson染色以观察肺组织病理学改变;并进行Masson染色胶原面积半定量分析及支气管壁厚度(总管壁面积/基底膜周长,wall area/total basement membrane perimeter,WAt/Pbm)定量测量;采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)测定肺组织匀浆中ET-1及转化生长因子β1(transforming growth factor-β1,TGF-β1)含量;运用蛋白质印迹法(Western blotting)检测肺组织TGF-β1、α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)和波形蛋白(Vimentin)的蛋白表达水平。**结果**　与WT-FA组比较,WT-PM2.5组Rn、Rrs、Ers升高($P<0.05$),肺组织炎症及胶原沉积加重,胶原面积百分比、WAt/Pbm、ET-1及TGF-β1水平均升高(均$P<0.01$);IL-37tg-PM2.5组上述指标较WT-PM2.5组均降低($P<0.01$)。WT-PM2.5组TGF-β1、α-SMA及Vimentin表达较WT-FA组上调($P<0.05$),IL-37tg-PM2.5组较WT-PM2.5组降低($P<0.05$)。**结论**　IL-37过表达可降低ET-1水平,伴随TGF-β1/Smad通路相关蛋白表达下调,缓解PM2.5诱导的气道高反应与气道重塑。

[关键词] 呼吸超敏反应;内皮素1;细颗粒污染物　　doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2026.08.008

[中图分类号] R563.9　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1007-3205(2026)08-0918-10

IL-37 downregulates ET-1 to alleviate $PM_{2.5}$-induced airway hyperresponsiveness and airway remodeling

CAO Jing[1], SONG Bei-bei[1], LIU Ze-xin[2], XU Hai-bo[1], GUAN Ji-tao[1], YAN Xi-xin[1], CHAO Ling-shan[1*]

(1.*the First Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang* 050000, *China*; 2.*the Fourth Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang* 050000, *China*)

[**Abstract**] **Objective**　To investigate the protective effect of interleukin-37 (IL-37) against fine particulate matter ($PM_{2.5}$)-induced airway hyperresponsiveness (AHR) in mice and its relationship with endothelin-1 (ET-1). **Methods**　Wild-type (WT) and IL-37 transgenic (IL-37tg) mice were used to establish four groups: wild-type filtered air (WT-FA), wild-type $PM_{2.5}$ (WT-$PM_{2.5}$), IL-37 transgenic filtered air (IL-37tg-FA), and IL-37 transgenic $PM_{2.5}$ (IL-37tg-$PM_{2.5}$). The $PM_{2.5}$ exposure groups were exposed by oronasal inhalation for 4 h/day for 90 days. Airway resistance (Rn), respiratory system resistance (Rrs), and respiratory system elastance (Ers) were measured. Hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining were performed to assess histopathological changes in lung

[收稿日期]2026－06－11

[基金项目]河北省医学科学研究课题计划资助项目(20240129)

[作者简介]曹敬(1987－),女,河北石家庄人,河北医科大学第二医院副主任医师,医学博士,从事呼吸危重症与肺血管介入研究。

*通信作者。E-mail:lingshanchao@163.com

tissue. Collagen area was semi-quantitatively analyzed by Masson staining, and airway wall thickness was quantified as wall area/total basement membrane perimeter (WAt/Pbm). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure endothelin-1 (ET-1) and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) levels in lung homogenates. Western blotting was performed to detect the protein expression of TGF-β1, α-smooth muscle actin (α-SMA), and Vimentin in lung tissue. **Results** Compared with the WT-FA group, the WT-$PM_{2.5}$ group showed increased Rn, Rrs, and Ers ($P<0.05$), aggravated pulmonary inflammation and collagen deposition, and elevated collagen area percentage, WAt/Pbm, ET-1, and TGF-β1 levels (all $P<0.01$). These indicators were all reduced in the IL-37tg-$PM_{2.5}$ group compared with the WT-$PM_{2.5}$ group ($P<0.01$). The expression of TGF-β1, α-SMA, and Vimentin in the WT-$PM_{2.5}$ group was upregulated compared with the WT-FA group ($P<0.05$), whereas it was decreased in the IL-37tg-$PM_{2.5}$ group compared with the WT-$PM_{2.5}$ group ($P<0.05$). **Conclusion** IL-37 overexpression reduces ET-1 levels and downregulates proteins related to the TGF- β1/Smad pathway, thereby alleviating $PM_{2.5}$-induced airway hyperresponsiveness and airway remodeling.

[**Key words**] respiratory hypersensitivity; endothelin-1; fine particulate matter

大气细颗粒物（fine particulate matter，PM2.5）可诱发氧化应激与炎症，导致气道高反应（airway hyperresponsiveness，AHR）及气道重塑[1-4]。内皮素1（endothelin-1，ET-1）通过激活转化生长因子β1（transforming growth factor-β1，TGF-β1）/Smad通路上调α-平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）和Collagen I表达，驱动气道重塑[5-7]，PM2.5可诱导气道上皮细胞和血管内皮细胞ET-1高表达[8]。白细胞介素（interleukin，IL）-37是IL-1家族抗炎成员，可抑制气道炎症[9-11]，在PM2.5相关气道损伤中具有保护作用[2, 12-14]。然而IL-37是否通过调控ET-1改善PM2.5诱导的AHR及气道重塑尚缺乏证据。本研究拟在IL-37转基因小鼠中探讨IL-37对PM2.5诱导AHR及气道重塑的保护作用及其与ET-1的调控关系。

1　材料与方法

1.1　实验动物　本研究所用实验动物均为雄性小鼠，周龄6～8周，体重（19±3）g。动物品系涵盖两类：其一为无特定病原体（specific pathogen free，SPF）级C57BL/6野生型（wild type，WT）小鼠，由斯贝福（北京）生物技术有限公司供应；其二为人IL-37转基因小鼠（mice with transgenic expression of human IL-37 gene，IL-37tg mice），由北京百奥赛图基因生物技术有限公司提供。饲养设施为独立通风笼（individually ventilated cages，IVCs），环境参数设置如下：换气经高效过滤，温度（22±2）℃，相对湿度（55±5）%，光照条件为12 h明暗交替循环，实验动物可自由摄取饲料及饮水。

本研究方案已通过河北医科大学第二医院研究伦理委员会审查批准（批准文号：2021-AE061），全部动物操作均严格按照实验动物伦理准则执行。

1.2　主要试剂与仪器　主要试剂：小鼠ET-1酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒、小鼠TGF-β1 ELISA试剂盒（武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司）；乙酰甲胆碱（methacholine，Mch，美国Sigma公司）；兔抗小鼠TGF-β1多克隆抗体、兔抗小鼠总Smad3（total Smad3，t-Smad3）单克隆抗体、兔抗小鼠磷酸化Smad3（phospho-Smad3，p-Smad3）单克隆抗体、兔抗小鼠α-SMA单克隆抗体、兔抗小鼠波形蛋白（Vimentin）单克隆抗体、兔抗小鼠微管蛋白（Tubulin）单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白G（immunoglobulin G，IgG）二抗（中国成都正能生物技术有限责任公司）；二喹啉甲酸（bicinchoninic acid，BCA）蛋白定量试剂盒、磷酸盐缓冲盐溶液（phosphate buffered saline，PBS）、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、放射免疫沉淀法（radioimmunoprecipitation assay，RIPA）裂解液、苏木精—伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色试剂盒、增强化学发光（enhanced chemiluminescence，ECL）显影试剂盒、Masson三色染色试剂盒（北京索莱宝科技有限公司）；聚偏氟乙烯（polyvinylidene fluoride，PVDF）膜（美国Millipore公司）。

主要仪器：小动物肺功能测量系统（FlexiVent，SCIREQ Scientific Respiratory Equipment Inc.，Montreal，Canada）；荧光显微镜（日本Olympus公司，型号H-7500）、光学显微镜（德国Zeiss公司）；酶标仪（美国Bio-Tek公司）；蛋白电泳仪及转膜仪、凝胶成像系统（美国

Bio-Rad ChemiDoc XRS+，美国Bio-Rad公司）；高速冷冻离心机（美国Thermo Scientific公司）；电子分析天平（赛多利斯科学仪器北京有限公司，型号BSA124S-CW）；恒温烘箱（上海一恒科学仪器有限公司，型号DHG-9070A）；小动物手术台（苏州赛奥仪器有限公司，型号SA-Ⅲ）。

1.3　实验分组与PM2.5暴露方案　小鼠适应性饲养1周后，依据基因型与暴露因素，将小鼠随机分配为4组（n=12）：①WT-FA组：C57BL/6野生型小鼠，暴露于过滤空气（filtered air，FA）；②IL-37tg-FA组：IL-37转基因纯合子小鼠，暴露于过滤空气；③WT-PM2.5组：C57BL/6野生型小鼠，暴露于PM2.5；④IL-37tg-PM2.5组：IL-37转基因纯合子小鼠，暴露于PM2.5。

PM2.5暴露采用北京慧荣和科技有限公司研制的口鼻吸入暴露装置，该系统整合了PM2.5多功能气溶胶浓缩富集模块与小鼠专用口鼻暴露舱，可实时从环境空气中捕获并浓缩PM2.5颗粒物，使暴露舱内浓度达环境水平的10倍。暴露时段为2021年11月1日—2022年1月29日，除雨雪及沙尘暴天气外，每日暴露4 h。暴露期间PM2.5浓度监测结果为226～994 μg/m^3，均值597.25 μg/m^3。对照组（FA组）小鼠同步置于口鼻暴露系统中，吸入经高效过滤的清洁空气。动物分组与暴露方案见图1。

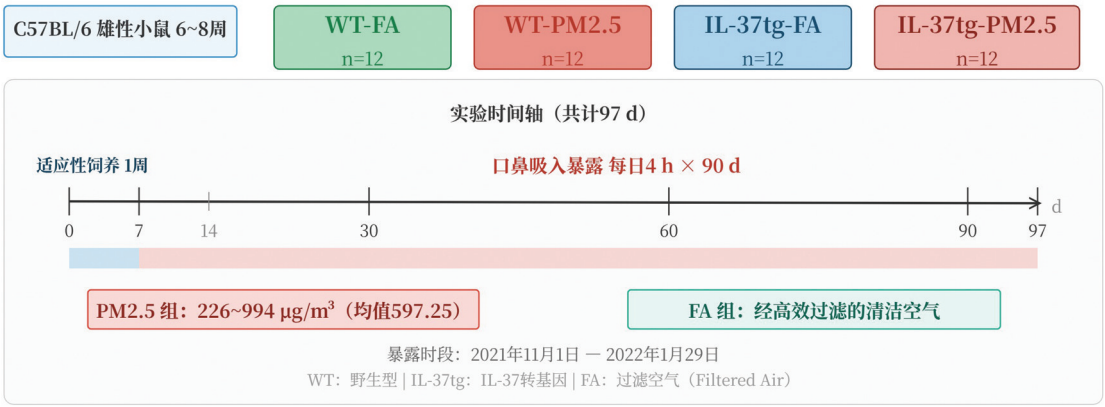


图1　动物分组与暴露方案

Figure 1　Animal grouping and exposure protocol

1.4　检测指标与方法

1.4.1　肺功能检测　末次暴露结束24 h后，每组随机抽取6只小鼠，利用有创小动物肺功能测量系统（FlexiVent）评估气道反应性。以戊巴比妥钠（40 mg/kg）腹腔注射麻醉，固定四肢与牙齿，逐层分离颈部皮肤、肌及筋膜以显露气管，行气管切开插管术。连接小动物呼吸机，参数设定：潮气量10 mL/kg，呼吸频率150次/min。经雾化装置递送梯度浓度Mch进行激发，浓度依次为0、3.125、6.25、12.5、25、50 g/L，各浓度记录3 min。基于强迫振荡技术获取以下参数：中央气道阻力（airway resistance，Rn）、呼吸系统阻力（respiratory system resistance，Rrs）及气道弹性阻力（respiratory system elastance，Ers）。

1.4.2　肺组织病理染色　末次暴露24 h后，每组取6只小鼠进行肺组织取材。戊巴比妥钠（40 mg/kg）腹腔注射麻醉，确认角膜反射消失、痛觉消失后，颈椎脱臼法处死。迅速取出左肺，预冷生理盐水冲净表面血污，无菌滤纸吸干后置入4%多聚甲醛固定48 h。右肺剔除结缔组织和血管，装入预冷冻存管，液氮速冻后转存于-80 ℃，留作后续组织匀浆液ELISA实验及蛋白质印迹法（Western blotting）分析。固定后的左肺组织依次经梯度乙醇脱水、二甲苯进行透明、石蜡包埋，最后制备5 μm连续切片。

HE染色：切片脱蜡水化后行HE染色，光学显微镜下观察肺泡结构破坏及炎症细胞浸润状况。在光学显微镜×100放大倍数下，每一切片随机选取5个视野进行观察。损伤程度以半定量评分法评价，包括4项指标：①肺泡充血；②出血；③肺泡腔/血管壁中性粒细胞浸润；④肺泡壁增厚/透明膜形成。各指标按无病变、轻度、中度、重度、极重度分别计0～4分，总分即为各分项之和。

每张HE染色切片于光学显微镜下（×200）随机选取5个视野观察，应用Image Pro Plus软件进行形态学参数量化。测量支气管基底膜周长（perimeter of the basement membrane，Pbm）及支气管总管壁面积（total area of airway wall，

WAt），以WAt/Pbm比值反映气道壁厚度，单位记为$\mu m^2/\mu m$。每只小鼠取所有测量气道的平均值作为该样本的代表值。

Masson三色染色：切片经二甲苯Ⅰ、Ⅱ各脱蜡10 min后，依次以无水乙醇、95%乙醇、70%乙醇水化。烘干后苏木精染5 min，乙醇分化，放入丽春红酸性复红工作液中染色5 min，取出后用冰醋酸水溶液漂洗；经磷钼酸水溶液分化处理后，再用苯胺蓝溶液复染5 min。后依次用95%乙醇、无水乙醇快速梯度脱水，二甲苯透明处理3次，最后用中性树胶完成封固。采用光学显微镜观察气道与肺泡区域的胶原纤维沉积状态，并采集对应视野的图像。采用Image J软件对Masson染色阳性区域（蓝色胶原纤维）进行半定量分析，每一切片随机选取5个放大倍数为×200的视野，计算胶原面积占总面积的百分比，取平均值作为该样本的胶原沉积评分。

1.4.3 ELISA检测　每组取6只小鼠的右肺组织进行检测。冻存右肺中叶组织以预冷PBS（0.01 mol/L，pH 7.4）漂洗3次除去残余血液，剪碎后与匀浆液（PBS＋蛋白酶抑制剂，1 mL/100 mg组织）混合，于冰上研磨至完全匀浆，4 ℃、5 000×g离心10 min，上清液于-80 ℃冻存待测。采用BCA法完成蛋白浓度测定后，参照ELISA试剂盒操作说明，对肺组织匀浆液中的ET-1与TGF-β1表达水平进行检测。具体操作流程如下：每孔分别加入100 μL标准品或待测样本，置于37 ℃环境孵育90 min；完成洗板操作后每孔添加100 μL生物素化抗体工作液，37 ℃条件下继续孵育60 min；再次完成洗板后每孔加入100 μL辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素，37 ℃避光孵育30 min；随后每孔加入90 μL四甲基联苯胺显色液，37 ℃避光条件下显色15 min，最后每孔添加50 μL终止液结束显色反应。使用酶标仪在450 nm波长处检测各孔的吸光度数值，结合标准曲线计算对应的目标因子浓度。其中TGF-β1检测前，需先将样本用1 mol/L盐酸酸化处理10 min，使潜伏态TGF-β1充分活化，再用1.2 mol/L碳酸氢钠溶液中和后再进行后续检测操作。

1.4.4 肺组织ET-1蛋白的免疫组织化学检测　石蜡包埋的肺组织切片完成脱蜡与水化处理后，采用pH 6.0的柠檬酸钠缓冲液开展抗原修复，于121 ℃高压高温条件下处理2 min。后续使用3%过氧化氢溶液，在室温避光环境中孵育15 min，以此消除组织内源性过氧化物酶的活性；再用5%牛血清白蛋白封闭非特异性结合位点，封闭时长为30 min。滴加稀释比例为1∶200的兔抗小鼠ET-1一抗，将切片放置于4 ℃湿盒内孵育过夜。次日使用PBS冲洗切片后，加入辣根过氧化物酶标记的二抗（稀释比例1∶500），在室温条件下孵化30 min，采用二氨基联苯胺进行显色反应，显色过程在光学显微镜下监控，时长控制在3～5 min，经苏木素复染后完成封片操作。在光学显微镜下采集视野图像，使用Image J软件对阳性染色区域的平均光密度值开展半定量分析，每一切片随机选取5个放大倍数为×200的视野，计算所得平均值即为该切片的免疫组织化学检测评分。

1.4.5 肺组织蛋白表达检测　取每组各6只小鼠低温保存的右肺组织样本约50 mg，添加含有蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液，经研磨仪充分匀浆后置于冰浴静置裂解30 min，随后在4 ℃环境下以12 000×g转速离心15 min，吸取上层清液备用。使用BCA蛋白定量试剂盒检测样本的蛋白浓度，取等质量蛋白样品（40 μg/孔）置于沸水浴中加热变性10 min，经10%十二烷基硫酸钠（sodium dodecyl sulfate，SDS）-聚丙烯酰胺凝胶电泳完成蛋白分离，采用湿转印技术将凝胶上的蛋白质转移至PVDF膜。使用5%脱脂乳溶液在室温条件下封闭1 h，分别加入下述一抗进行孵育：兔抗小鼠TGF-β1多克隆抗体（稀释比例1∶1 000）、兔抗小鼠t-Smad3单克隆抗体（稀释比例1∶800）、兔抗小鼠p-Smad3单克隆抗体（稀释比例1∶1 000）、兔抗小鼠α-SMA单克隆抗体（稀释比例1∶1 000）、兔抗小鼠Vimentin单克隆抗体（稀释比例1∶1 000）、兔抗小鼠Tubulin单克隆抗体（稀释比例1∶5 000），置于4 ℃环境孵化过夜。次日使用含Tween-20的Tris缓冲盐溶液（Tris buffered saline with Tween-20，TBST）缓冲液洗膜后，加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗（稀释比例1∶5 000），在室温条件下孵化1 h。采用ECL化学发光试剂进行显色反应，通过凝胶成像系统获取蛋白条带图像。以Tubulin作为内参蛋白，使用Image J图像分析软件对各组条带的灰度值进行定量统计分析。

1.5 统计学方法　应用SPSS 27.0统计软件分析数据。正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，比较采用单因素方差分析、LSD-t检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 IL-37改善PM2.5诱导的小鼠气道高反应　造模90 d后行FlexiVent强迫振荡肺功能检测，随Mch激发浓度升高，各组Rn、Rrs、Ers均呈上升趋势。与WT-FA组比较，WT-PM2.5组Rn在25、50 g/L时升高（$P<0.05$），Rrs在12.5、25、50 g/L时升高（$P<0.05$），Ers在6.25、12.5、25、50 g/L时升高（$P<0.05$）；与WT-PM2.5组比较，IL-37tg-PM2.5组Rn、Rrs、Ers在25、50 g/L时均降低，差异有统计学意义（均$P<0.05$）；IL-37tg-FA组与WT-FA组各指标比较差异均无统计学意义（均$P>0.05$）。见表1。

表1　各组小鼠肺功能指标比较

Table 1　Comparison of pulmonary function parameters of mice among the groups

（$n=6,\bar{x}\pm s$）

组别	Rn（$cmH_2O\cdot s/mL$）					
	乙酰甲胆碱激发浓度0 g/L	乙酰甲胆碱激发浓度3.125 g/L	乙酰甲胆碱激发浓度6.250 g/L	乙酰甲胆碱激发浓度12.500 g/L	乙酰甲胆碱激发浓度25.000 g/L	乙酰甲胆碱激发浓度50.000 g/L
WT-FA组	0.29±0.09	0.34±0.11	0.42±0.19	0.50±0.22	0.54±0.24	0.66±0.28
IL-37tg-FA组	0.25±0.04	0.32±0.07	0.29±0.15	0.46±0.13	0.49±0.14	0.53±0.21
WT-PM2.5组	0.28±0.02	0.36±0.03	0.41±0.05	0.73±0.30	1.09±0.15*	1.47±0.20*
IL-37tg-PM2.5组	0.34±0.07	0.41±0.10	0.47±0.12	0.60±0.15	0.75±0.10#	1.03±0.30#
F值	2.144	1.471	1.927	1.925	16.414	16.590
P值	0.126	0.253	0.158	0.158	<0.001	<0.001
组别	Rrs（$cmH_2O\cdot s/mL$）					
	乙酰甲胆碱激发浓度0 g/L	乙酰甲胆碱激发浓度3.125 g/L	乙酰甲胆碱激发浓度6.250 g/L	乙酰甲胆碱激发浓度12.500 g/L	乙酰甲胆碱激发浓度25.000 g/L	乙酰甲胆碱激发浓度50.000 g/L
WT-FA组	0.54±0.05	0.59±0.07	0.67±0.20	0.78±0.16	0.82±0.20	0.95±0.19
IL-37tg-FA组	0.54±0.04	0.64±0.09	0.69±0.13	0.89±0.25	0.93±0.26	0.94±0.22
WT-PM2.5组	0.55±0.06	0.70±0.07	0.85±0.10	1.68±0.71*	2.21±0.65*	3.29±0.59*
IL-37tg-PM2.5组	0.55±0.07	0.64±0.06	0.83±0.23	1.05±0.29	1.17±0.37#	1.65±0.61*#
F值	0.117	1.812	1.777	5.749	14.488	36.699
P值	0.949	0.177	0.184	0.005	<0.001	<0.001
组别	Ers（cmH_2O/mL）					
	乙酰甲胆碱激发浓度0 g/L	乙酰甲胆碱激发浓度3.125 g/L	乙酰甲胆碱激发浓度6.250 g/L	乙酰甲胆碱激发浓度12.500 g/L	乙酰甲胆碱激发浓度25.000 g/L	乙酰甲胆碱激发浓度50.000 g/L
WT-FA组	19.99±2.55	20.49±2.58	20.83±2.62	21.80±1.86	23.22±2.96	27.84±4.07
IL-37tg-FA组	20.69±1.12	22.45±1.93	22.66±1.69	23.82±3.63	24.71±3.32	26.63±3.90
WT-PM2.5组	21.25±1.51	21.81±1.84	26.88±3.36*	31.02±5.91*	45.30±5.46*	68.62±3.98*
IL-37tg-PM2.5组	21.86±1.52	23.05±1.79	25.25±1.80	27.59±2.13	31.77±4.63#	38.88±7.95*#
F值	1.242	1.701	7.130	7.144	34.299	82.679
P值	0.321	0.199	0.002	0.002	<0.001	<0.001

*P值<0.05与WT-FA组比较　#P值<0.05与WT-PM2.5组比较（LSD-t检验）

2.2 IL-37减轻PM2.5诱导的肺组织病理损伤　HE染色显示，WT-FA组与IL-37tg-FA组肺泡结构清晰规整，支气管周围未见明显炎性细胞浸润；WT-PM2.5组肺泡壁增厚、肺泡结构破坏，部分肺泡腔内可见炎性渗出，支气管及血管周围可见大量以中性粒细胞和淋巴细胞为主的炎症细胞浸润；IL-37tg-PM2.5组上述病理损伤较WT-PM2.5组减轻（图2）。Masson染色显示，WT-FA组仅在支气管壁及肺间质可见少量蓝色胶原纤维沉积，WT-PM2.5组支气管壁增厚、管壁及周围肺间质可见大量胶原沉积，IL-37tg-PM2.5组胶原沉积较WT-PM2.5组减少，IL-37tg-FA组与WT-FA组相似（图3）。4组肺组织病理损伤评分、WAt/Pbm及胶原面积百分比差异均有统计学意义（均$P<0.01$）：WT-PM2.5组上述3项指标均高于WT-FA组（均$P<0.01$），IL-37tg-PM2.5组均较WT-PM2.5组降低（均$P<0.01$），IL-37tg-FA组与WT-FA组差异均无统计学意义（均$P>0.05$），见表2。

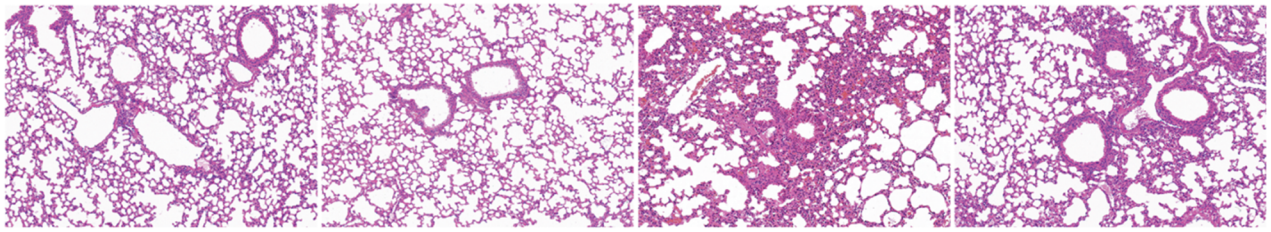


图2　各组小鼠肺组织HE染色结果(×100)

Figure 2　Representative HE staining of lung tissue of mice in each group (×100)

表2　各组小鼠肺组织病理损伤评分、支气管壁厚度及胶原纤维面积比较

Table 2　Comparison of lung histopathological injury scores, bronchial wall thickness, and collagen fiber area of mice among the groups

(n=6, $\bar{x}\pm s$)

组别	病理损伤评分	WAt/Pbm ($\mu m^2/\mu m$)	胶原纤维面积(%)
WT-FA组	0.67±0.52	13.80±4.11	5.59±0.58
IL-37tg-FA组	0.67±0.52	12.10±0.74	5.44±0.79
WT-PM2.5组	9.00±1.41*	28.60±1.35*	24.94±5.00*
IL-37tg-PM2.5组	4.83±0.75#	18.66±1.34#	15.32±2.10#
F值	123.208	62.735	68.297
P值	<0.001	<0.001	<0.001

*P值<0.05与WT-FA组比较　#P值<0.05与WT-PM2.5组比较(LSD-t检验)。

表3　各组小鼠肺组织匀浆液ET-1和TGF-β1水平比较

Table 3　Comparison of ET-1 and TGF-β1 levels in lung tissue homogenates of mice among the groups

(n=6, $\bar{x}\pm s$, ng/L)

组别	ET-1	TGF-β1
WT-FA组	1.38±0.40	123.93±12.02
IL-37tg-FA组	1.20±0.32	116.94±10.80
WT-PM2.5组	2.61±0.29*	455.54±48.11*
IL-37tg-PM2.5组	1.54±0.20#	286.11±37.27#
F值	24.559	155.503
P值	<0.001	<0.001

*P值<0.05与WT-FA组比较　#P值<0.05与WT-PM2.5组比较(LSD-t检验)

2.3　IL-37降低PM2.5诱导的ET-1和TGF-β1高表达

2.3.1　ELISA定量检测　4组肺组织匀浆液ET-1和TGF-β1水平比较差异均有统计学意义(均P<0.001)。WT-PM2.5组ET-1、TGF-β1水平高于WT-FA组，差异有统计学意义(均P<0.01)；IL-37tg-PM2.5组低于WT-PM2.5组，差异有统计学意义(均P<0.01)；IL-37tg-FA组与WT-FA组比较差异均无统计学意义(均P>0.05)。见表3。

2.3.2　ET-1免疫组织化学定位检测　免疫组织化学染色显示，WT-FA组支气管上皮细胞仅见散在棕黄色阳性着色；WT-PM2.5组支气管上皮细胞及邻近肺间质可见大量棕黄色阳性着色；IL-37tg-PM2.5组阳性着色面积较WT-PM2.5组减少；IL-37tg-FA组与WT-FA组相近(图4)。4组ET-1免疫组织化学评分比较差异有统计学意义(P<0.001)：WT-PM2.5组高于WT-FA组，IL-37tg-PM2.5组低于WT-PM2.5组，差异有统计学意义(P<0.05)，IL-37tg-FA组与WT-FA组差异无统计学意义(P>0.05)。见表4。

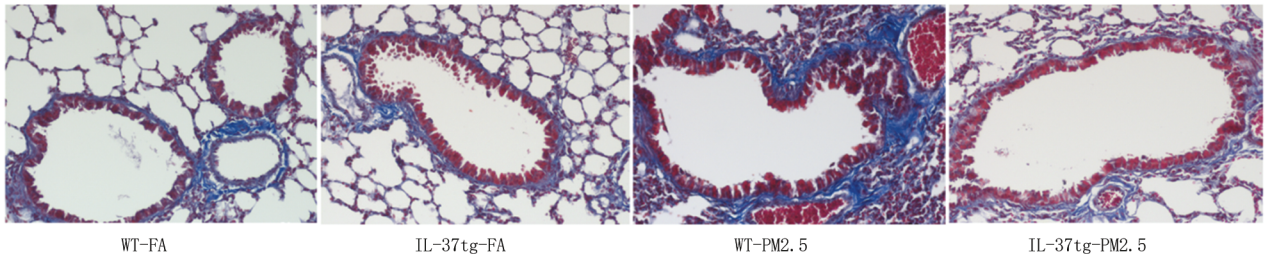


图3　各组小鼠肺组织Masson染色(×200)

Figure 3　Representative Masson staining of lung tissue of mice in each group (×200)

2.4　IL-37抑制PM2.5诱导的气道重塑相关蛋白表达

Western blot检测显示，4组肺组织TGF-β1、p-Smad3、α-SMA及Vimentin蛋白表达水平比较差异均有统计学意义(均P<0.001)，t-Smad3表达水平比较差异无统计学意义(P>0.05)。WT-PM2.5组TGF-β1、p-Smad3、

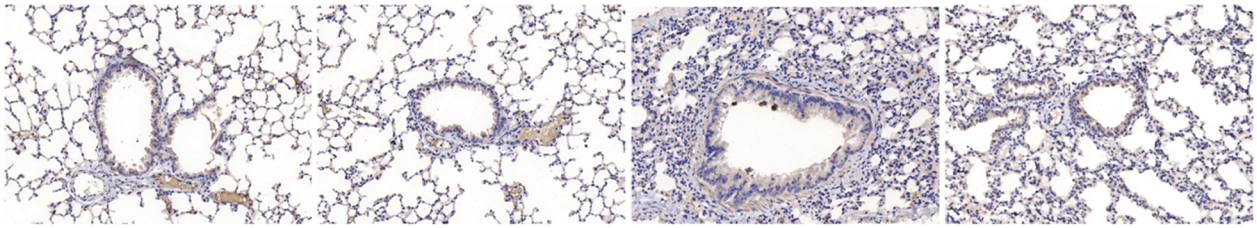


图4　各组小鼠肺组织ET-1免疫组化表达(×200)

Figure 4　Immunohistochemical expression of ET-1 in lung tissue of mice in each group (×200)

表4　各组小鼠肺组织ET-1免疫组化评分比较

Table 4　Comparison of ET-1 immunohistochemical scores in lung tissue of mice among the groups

(n=6,$\bar{x}\pm s$)

组别	ET-1表达
WT-FA组	13.49±1.26
IL-37tg-FA组	13.54±1.81
WT-PM2.5组	29.67±3.15*
IL-37tg-PM2.5组	18.80±1.49#
F值	81.687
P值	<0.001

*P值<0.05与WT-FA组比较　#P值<0.05与WT-PM2.5组比较(LSD-t检验)

α-SMA及Vimentin表达均高于WT-FA组(均P<0.05)，IL-37tg-PM2.5组均较WT-PM2.5组降低(均P<0.05)，IL-37tg-FA组与WT-FA组差异均无统计学意义(均P>0.05)。见图5、表5。

3　讨　论

PM2.5是指空气动力学直径≤2.5 μm的悬浮颗粒，主要来源于工业排放、机动车尾气和化石燃料燃烧。因其粒径微小，PM2.5可随呼吸深入肺泡并沉积，其携带的重金属、多环芳烃等毒性成分可直接诱发氧化应激和炎症级联反应，破坏气道上皮屏障[1, 3, 15-16]。长期或高浓度暴露可引起

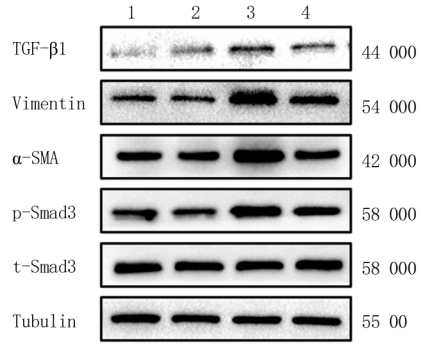


图5　各组小鼠肺组织TGF-β1/Smad通路及气道重塑相关蛋白表达

1. WT-FA组；2. IL-37tg-FA组；3. WT-PM2.5组；4. IL-37tg-PM2.5组；Tubulin为内参蛋白

Figure 5　Expression of TGF-β1/Smad pathway proteins and airway remodeling-related proteins in lung tissue of mice in each group

气道壁增厚、胶原沉积、平滑肌增生等结构性改变，最终导致气道重塑和气道高反应的发生[4, 17-18]。目前PM2.5相关肺损伤的分子调控网络尚不完全清楚，寻找关键干预靶点对临床防治有重要意义。本研究结果表明，PM2.5暴露能够显著上调ET-1及其下游TGF-β1的表达，进而诱发气道高反应及气道重塑病理改变；而IL-37过表达伴随ET-1水平下调、TGF-β1/Smad信号通路活化抑制以及降低α-SMA、Vimentin等重塑标志物的表达，有效缓解了PM2.5所致的气道损伤。

表5　各组小鼠肺组织TGF-β1/Smad通路及气道重塑相关蛋白表达比较

Table 5　Comparison of TGF-β1/Smad pathway proteins and airway remodeling-related protein expression in lung tissue of mice among the groups

(n=6,$\bar{x}\pm s$)

组别	TGF-β1	Vimentin	α-SMA	p-Smad3	t-Smad3
WT-FA组	1	1	1	1	1
IL-37tg-FA组	0.98±0.05	1.01±0.08	1.00±0.04	1.03±0.07	1.03±0.10
WT-PM2.5组	3.02±0.32*	4.02±0.14*	3.64±0.43*	3.87±0.47*	1.06±0.14
IL-37tg-PM2.5组	1.57±0.14#	1.95±0.09#	1.61±0.22#	1.79±0.18#	1.06±0.08
F值	90.435	704.065	79.845	85.490	0.250
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.860

*P值<0.05与WT-FA组比较　#P值<0.05与WT-PM2.5组比较(LSD-t检验)

PM2.5诱导气道重塑的分子机制涉及多条信号通路的激活。李章紊等[17]报道PM2.5通过激活p38丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）/核因子-κB（nuclear factor-κB，NF-κB）通路加重哮喘小鼠气道重塑，刘健[18]指出TGF-β1/Smad通路激活是驱动气道重塑的核心环节。本研究中PM2.5暴露组小鼠Rn、Rrs及Ers均升高，肺组织病理损伤评分增加；HE染色可见肺泡结构破坏伴炎性细胞浸润，Masson染色示支气管壁增厚及胶原沉积。上述结果表明口鼻吸入暴露成功模拟了PM2.5诱导的气道高反应及重塑过程。ET-1由气道上皮和血管内皮合成，通过内皮素A/B型受体（endothelin A/B receptor，ETA/ETB）介导平滑肌痉挛，并激活TGF-β1/Smad通路参与纤维化[5, 19-20]；PM2.5可通过氧化应激增强ET-1分泌[6-8]。本研究PM2.5暴露组肺组织匀浆液ET-1及其下游TGF-β1水平同步升高，免疫组化亦显示ET-1在支气管上皮细胞中表达增强，与文献报道一致[21-22]。由此推断，ET-1高表达与PM2.5诱导的气道损伤密切相关。

本研究采用PM2.5浓缩富集系统，暴露期间PM2.5浓度监测结果为226～994 μg/m^3，均值597.25 μg/m^3。毒理学研究中采用高浓度短期暴露较为常见，其依据在于较高浓度急性暴露可在较短实验周期内模拟长期低剂量暴露的累积损伤效应，这一策略在PM2.5肺损伤研究中已有较多应用[23]。同时，本研究补充了Masson染色胶原面积半定量分析和WAt/Pbm标准化管壁厚度测量，从胶原沉积量和管壁增厚程度两个维度定量证实了IL-37对气道重塑的改善作用。

IL-37是IL-1细胞因子家族的新成员，具有广谱抗炎和免疫调节作用[9-10, 17]。IL-37与IL-18受体α（IL-18 receptor α，IL-18Rα）结合后招募IL-1受体8（IL-1 receptor 8，IL-1R8，又称单免疫球蛋白白细胞介素1相关受体，single immunoglobulin IL-1-related receptor，SIGIRR）形成受体复合物，抑制MAPK、NF-κB等促炎通路[9, 23]。在呼吸系统疾病中，IL-37的保护作用已有较多报道[24-25]，但其能否通过调控ET-1改善PM2.5诱导的气道高反应及重塑尚缺乏直接证据。本研究显示IL-37转基因小鼠PM2.5暴露后肺组织ET-1和TGF-β1水平均降低，病理损伤评分和ET-1免疫组化评分均较WT-PM2.5组下降，Rn、Rrs降低，Ers下降，炎症浸润和胶原沉积减轻。此外，本研究通过Masson染色半定量分析证实IL-37tg-PM2.5组胶原沉积面积百分比显著低于WT-PM2.5组，WAt/Pbm标准化管壁厚度亦显著下降，进一步从定量角度支撑了IL-37对气道重塑的改善效应。Huang等[7]研究证实IL-37可抑制TGF-β1诱导的平滑肌细胞增殖和上皮—间充质转化。Feng等[3]显示IL-37经白细胞介素24（interleukin-24，IL-24）通路逆转上皮—间充质转化减轻哮喘重塑。这些研究从不同角度说明了IL-37对气道重塑的干预作用，本研究在此基础上进一步将IL-37的保护机制与ET-1这一上游靶点联系起来，提出IL-37过表达与ET-1/TGF-β1/Smad通路相关蛋白表达降低显著相关，具体调控机制有待深入研究验证。

PM2.5暴露不仅会诱发急性气道高反应，还会激活TGF-β1/Smad信号通路，进而驱动结构性气道重塑。本研究通过蛋白印迹（Western blot）分析证实，PM2.5处理显著上调了小鼠肺组织中TGF-β1、磷酸化Smad3（p-Smad3）以及气道重塑标志物（α-SMA和波形蛋白Vimentin）的表达水平；而IL-37的过表达则有效逆转了上述异常上调。具体而言，肌成纤维细胞标志物α-SMA的升高提示气道平滑肌层增厚，而间充质标志物Vimentin的高表达则暗示上皮细胞可能发生了上皮—间充质转化，表现为黏附性减弱及迁移能力增强。值得注意的是，各组间总Smad3（t-Smad3）蛋白表达量差异无统计学意义（P=0.86），表明PM2.5主要通过诱导Smad3的磷酸化修饰，而非改变总蛋白合成来激活该通路。这一结果与既往关于TGF-β1/Smad信号转导以磷酸化为核心调控节点的认知相符[26-30]。在分子机制层面，ET-1与TGF-β1之间存在相互促进的正反馈关系。ET-1可激活TGF-β1/Smad通路并上调α-SMA和Vimentin，而升高的TGF-β1又会刺激ET-1释放，形成自我放大的恶性循环[5, 7]。本研究显示，IL-37过表达伴随ET-1水平的降低，该变化与TGF-β1/Smad通路活化程度的下降显著相关，并引发下游p-Smad3、α-SMA和Vimentin的级联抑制。最终，这一机制不仅缓解了平滑肌痉挛，还减轻了胶原沉积，从而在功能与结构双重维度上改善了PM2.5诱导的气道高反应。WAt/Pbm定量结果亦显示支气管壁厚度增厚在IL-37过表达后显著减轻，为IL-37保护气道上皮结构和功能完整性提供了形态学定量依据。

前期研究已证实IL-37对PM2.5气道损伤具有多方面保护作用：Wang等[31]在气道高反应小

鼠模型中显示，IL-37tg小鼠可降低气道阻力、减轻气道炎性反应，该效应依赖IL-1R8介导；Cao等[2]报道IL-37经蛋白激酶B（protein kinase B，AKT）/雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）通路抑制自噬减轻PM2.5肺损伤；曲芳芳等[32]在支气管上皮细胞中证实IL-37通过下调无翅型MMTV整合位点家族成员5a（wingless-type MMTV integration site family member 5A，Wnt5a）减少细胞外基质沉积。这些工作未涉及ET-1调控，而本研究新显示，IL-37过表达可降低ET-1水平并伴随TGF-β1/Smad通路活化受抑，将保护机制与ET-1这一潜在调控节点相关联，提出IL-37-ET-1/TGF-β1/Smad-气道重塑的关联假说，其确切调控关系有待后续回复实验进一步验证[28]。

需要指出的是，本研究观察到IL-37过表达、ET-1水平降低与TGF-β1/Smad通路抑制同步发生，上述结果仅能提示三者之间存在相关性，尚不足以确立因果关系。ET-1的下调既可能是IL-37直接调控的结果，也可能是IL-37减轻气道炎症与氧化应激后内皮细胞活化程度降低的继发性改变；同时，IL-37本身具有广谱抗炎效应，其对MAPK、NF-κB等信号通路的抑制亦可能不依赖ET-1而直接参与气道保护；而TGF-β1/Smad通路活化的下降与气道重塑的缓解之间亦可能互为因果。因此，本研究提出的IL-37/ET-1/TGF-β1调控假说仍需通过ET-1受体拮抗剂干预、外源性ET-1回补及ET-1条件性基因敲除等回复实验加以验证，以明确ET-1下调在IL-37保护效应中的因果地位。

综上所述，本研究显示IL-37过表达可下调肺组织ET-1水平，伴随TGF-β1/Smad通路活化受抑及下游气道重塑标志物表达降低，从功能与结构两方面缓解PM2.5诱导的气道损伤。上述结果揭示了IL-37与ET-1的负向关联，提示IL-37可能通过下调ET-1发挥保护效应，据此提出的IL-37/ET-1/TGF-β1调控假说，为PM2.5相关呼吸疾病的防治提供了潜在干预线索。

[参考文献]

[1] Du Y, Xu X, Chu M, et al. Air particulate matter and cardiovascular disease: the epidemiological, biomedical and clinical evidence[J]. J Thorac Dis, 2016, 8(1): e8-e19.

[2] Cao J, Hou S, Chen Z, et al. Interleukin-37 relieves PM2.5-triggered lung injury by inhibiting autophagy through the AKT/mTOR signaling pathway in vivo and in vitro[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2024, 269: 115816.

[3] Feng KN, Meng P, Zou XL, et al. IL-37 protects against airway remodeling by reversing bronchial epithelial-mesenchymal transition via IL-24 signaling pathway in chronic asthma[J]. Respir Res, 2022, 23(1): 244.

[4] Kang JY, Choi H, Oh JM, et al. PM2.5 induces pyroptosis via activation of the ROS/NF-κB signaling pathway in bronchial epithelial cells[J]. Medicina (Kaunas), 2024, 60(9): 1434.

[5] Wermuth PJ, Li Z, Mendoza FA, et al. Stimulation of transforming growth factor- β1-induced endothelial-to-mesenchymal transition and tissue fibrosis by endothelin-1 (ET-1): A novel profibrotic effect of ET-1[J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0161988.

[6] Wang R, Xiao X, Cao L, et al. Airborne fine particulate matter induces an upregulation of endothelin receptors on rat bronchi[J]. Environ Pollut, 2016, 209: 11-20.

[7] Huang N, Liu K, Liu J, et al. Interleukin-37 alleviates airway inflammation and remodeling in asthma via inhibiting the activation of NF- κB and STAT3 signalings[J]. Int Immunopharmacol, 2018, 55: 198-204.

[8] Krittanawong C, Qadeer YK, Hayes RB, et al. PM2.5 and cardiovascular diseases: State-of-the-art review[J]. Int J Cardiol Cardiovasc Risk Prev, 2023, 19: 200217.

[9] Nold-Petry CA, Lo CY, Rudloff I, et al. IL-37 requires the receptors IL-18Rα and IL-1R8 (SIGIRR) to carry out its multifaceted anti-inflammatory program upon innate signal transduction[J]. Nat Immunol, 2015, 16(4): 354-365.

[10] Nold MF, Nold-Petry CA, Zepp JA, et al. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity[J]. Nat Immunol, 2010, 11(11): 1014-1022.

[11] Wang CC, Zhong J, Hu JQ, et al. IL-37 protects against house dust mite-induced airway inflammation and airway epithelial barrier dysfunction via inhibiting store-operated calcium entry[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 138: 112525.

[12] Gu M, Jin Y, Gao X, et al. Novel insights into IL-37: An anti-inflammatory cytokine with emerging roles in anti-cancer process[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1278521.

[13] Cui L, Qin X, Fu T, et al. Attenuated airways inflammation and remodeling in IL-37a and IL-37b transgenic mice with an ovalbumin-induced chronic asthma[J]. Cell Immunol, 2023, 391/392: 104759.

[14] Cao J, He K, Chen Z, et al. Interleukin-37 in respiratory diseases: Molecular mechanisms and immune modulation[J]. Front Immunol, 2025, 16: 1675791.

[15] Ma J, Han Z, Jiao R, et al. Irisin ameliorates PM2.5-induced acute lung injury by regulation of autophagy through AMPK/mTOR pathway[J]. J Inflamm Res, 2023, 16: 1045-1057.

[16] Cheng PP, Yu F, Chen SJ, et al. PM2.5 exposure-induced senescence-associated secretory phenotype in airway smooth muscle cells contributes to airway remodeling[J]. Environ Pollut, 2024, 347: 123674.

[17] 李章紊，高洁，刘健玲，等.PM2.5对哮喘小鼠气道重塑的作

用机制研究[J].临床误诊误治,2023,36(7):32-37.
[18] 刘健.支气管哮喘气道重塑机制的研究进展[J].中国现代医学杂志,2022,32(12):51-54.
[19] Kowalczyk A,Kleniewska P,Kolodziejczyk M,et al. The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in inflammatory response and sepsis[J]. Arch Immunol Ther Exp(Warsz),2015,63(1):41-52.
[20] Kim TY,Yeo H,Jung E,et al. EGR1 interacts with p-SMAD at the endothelin-1 gene promoter to regulate gene expression in TGFβ1-stimulated IMR-90 fibroblasts[J]. Biochem Biophys Res Commun,2024,739:150567.
[21] Hua HS,Wen HC,Lee HS,et al. Endothelin-1 induces connective tissue growth factor expression in human lung fibroblasts by disrupting HDAC2/Sin3A/MeCP2 corepressor complex[J]. J Biomed Sci,2023,30(1):40.
[22] Duangrat R,Parichatikanond W,Likitnukul S,et al. Endothelin-1 induces cell proliferation and myofibroblast differentiation through the ETAR/Gαq/ERK signaling pathway in human cardiac fibroblasts[J]. Int J Mol Sci,2023,24(5):4475.
[23] Li S,Neff CP,Barber K,et al. Extracellular forms of IL-37 inhibit innate inflammation in vitro and in vivo but require the IL-1 family decoy receptor IL-1R8[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2015,112(8):2497-2502.
[24] 王君灵,何韶衡.IL-37在过敏性气道疾病中作用的研究进展[J].现代免疫学,2024,44(5):454-458.
[25] 顾静雯,朴香,傅伟,等.疏肝平喘方通过转化生长因子-β1/Smad信号通路对哮喘小鼠免疫平衡的影响[J].世界中医药,2023,18(14):1974-1978,1985.
[26] Mottais A,Riberi L,Falco A,et al. Epithelial-mesenchymal transition mechanisms in chronic airway diseases: A common process to target?[J]. Int J Mol Sci,2023,24(15):12412.
[27] Lunding L,Webering S,Vock C,et al. IL-37 requires IL-18Rα and SIGIRR/IL-1R8 to diminish allergic airway inflammation in mice[J]. Allergy,2015,70(4):366-373.
[28] Zhao T,Su Y. Mechanisms and therapeutic potential of myofibroblast transformation in pulmonary fibrosis[J]. J Respir Biol Transl Med,2025,2(1):10001.
[29] Bhattarai P,Lu W,Hardikar A,et al. TGFβ1,SMAD and β-catenin in pulmonary arteries of smokers,patients with small airway disease and COPD: Potential drivers of EndMT[J]. Clin Sci(Lond),2024,138(17):1055-1070.
[30] Brake SJ,Lu W,Chia C,et al. Transforming growth factor-β1 and SMAD signalling pathway in the small airways of smokers and patients with COPD: Potential role in driving fibrotic type-2 epithelial mesenchymal transition[J]. Front Immunol,2023,14:1216506.
[31] Wang M,Hou SJ,Lu X,et al. Interleukin-37 inhibits inflammation activation and disease severity of PM2.5-induced airway hyperresponsiveness[J]. Ecotoxicol Environ Saf,2021,227:112890.
[32] 曲芳芳,徐海博,齐天杰,等.重组人IL-37通过调控Wnt5a减少细颗粒物诱导的支气管上皮细胞外基质沉积[J].中国病理生理杂志,2025,41(1):46-53.

(本文编辑:何祯)