DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20240411

肌炎相关ILD中TLR9信号参与NETs诱导的肺泡上皮间质转化

冯映月[1]，禚萃[1]，苏其燕[1]，崔曦[1]，郭瑾[1]，朱嘉睿[2]，张思功[3]*

［1.兰州大学第二医院（第二临床医学院），甘肃 兰州 730030；
2.兰州大学第二医院萃英生物医学研究中心，甘肃 兰州 730030；
3.兰州大学第二医院（第二临床医学院）风湿免疫科，甘肃 兰州 730030］

【摘要】目的 旨在阐明中性粒细胞胞外诱捕网（NETs）是否通过Toll样受体9（TLR9）信号促进肺泡上皮细胞间质转化（EMT）促进特发性肌炎相关间质性肺病（IIM-ILD）的发生。**方法** 采用实验性自身免疫性肌炎（EAM）小鼠模型，使用组织病理学、血清学方法明确IIM-ILD中是否存在NETs浸润、EMT表型及TLR9激活；采用NETs体外干预A549细胞，转录组测序、免疫荧光、蛋白质印迹法等方法，探究NETs诱导EMT的机制。**结果** EAM小鼠肺组织存在NETs浸润、EMT现象及TLR9信号激活。体外实验中NETs影响A549细胞活力及形态，激活TLR9信号通路，诱导EMT的发生，并诱导促炎和促纤维化相关基因上调，其中*TLR9*基因显著高表达，而TLR9抑制剂减轻了EMT。**结论** NETs诱导的EMT可能是IIM-ILD的重要致病机制，其中TLR9信号起关键作用，靶向TLR9信号可能是IIM-ILD的治疗方向。

【关键词】中性粒细胞胞外诱捕网；特发性肌炎；间质性肺病；上皮间质转化；Toll样受体9

中图分类号：R593.2 **文献标识码：**A **文章编号：**2096−8965（2024）04−0087−09

Involvement of Toll -like receptor 9 signaling in neutrophil extracellular traps-induced epithelial-to-mesenchymal transition in myositis-associated interstitial lung disease

Feng Yingyue[1], Zhuo Cui[1], Su Qiyan[1], Cui Xi[1], Guo Jin[1], Zhu Jiarui[2], Zhang Sigong[3]*

(1. The Second Hospital & Clinical Medical School, Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu, China;
2. Cuiying Biomedical Research Center, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, Gansu, China;
3. Department of Rheumatology and Immunology, the Second Hospital & Clinical Medical School, Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu, China)

【Abstract】Objective The study aims to elucidate whether neutrophil extracellular traps (NETs) promote epithelial-mesenchymal transition (EMT) in alveolar epithelial cells via Toll-like receptor 9 (TLR9) signaling,

收稿日期：2024-10-30；**修回日期：**2024-11-19

基金项目：国家自然科学基金地区基金项目（82060302，82260325）；甘肃省自然科学基金联合基金项目（24JRRA923）；兰州大学医学创新与发展优秀青年人才项目（lzuyxcx-2022-168）；兰州大学“中央高校基本科研业务费专项资金”杰出青年支持计划项目（lzujbky-2024-oy03）；甘肃省中医药科研项目（GZKZ-2024-29）

通信作者：张思功（1981-），男，甘肃临夏人，主任医师，教授，博士研究生导师，主要从事中性粒细胞胞外诱捕网在特发性肌炎相关间质性肺病中的致病机制研究，E-mail：zhangsg@lzu.edu.cn

thereby contributing to the development of idiopathic inflammatory myopathy-associated interstitial lung disease (IIM-ILD). **Methods** An experimental autoimmune myositis (EAM) mouse model was used, using histological and serological methods to clearly define the presence of NETs infiltration, EMT phenotypes, and TLR9 activation in IIM-ILD. In vitro, A549 cells were treated with NETs, and methods such as transcriptome sequencing, immunofluorescence, and Western blotting were used to investigate the mechanisms underlying NETs-induced EMT. **Results** Lung tissues from EAM mice exhibited NETs infiltration, EMT, and activation of TLR9 signaling. In vitro experiments demonstrated that NETs affected A549 cell viability and morphology, activated the TLR9 signaling pathway, and induced EMT. Moreover, NETs upregulated genes associated with inflammation and fibrosis. Notably, TLR9 gene expression was significantly elevated, and the use of a TLR9 inhibitor alleviated EMT. **Conclusion** NETs-induced EMT may serve as a key pathogenic mechanism in IIM-ILD, with TLR9 signaling playing a key role. Targeting TLR9 signaling may offer a promising therapeutic approach for IIM-ILD.

【Keywords】 Neutrophil extracellular traps; Inflammatory myopathy; Interstitial lung disease; Epithelial-mesenchymal transition; Toll-like receptor 9

间质性肺疾病（Interstitial Lung Disease，ILD）是特发性肌炎（Idiopathic Inflammatory Myopathy，IIM）的常见并发症之一，不同类型IIM-ILD发病率为20%~86%[1-2]。IIM-ILD常进展为肺纤维化导致患者呼吸循环衰竭，甚至危及生命，但其发病机制仍不明确[3]。研究[4-6]发现，IIM患者血清中，中性粒细胞胞外诱捕网（Neutrophil Extracellular Traps，NETs）异常增多，NETs干预可直接诱导实验性自身免疫性肌炎（Experimental Autoimmune Myositis，EAM）小鼠ILD的发生发展，提示NETs可能在IIM-ILD的发生发展中起重要作用。

Toll样受体9（Toll-Like Receptor 9，TLR9）是天然免疫系统识别胞内单链DNA的关键模式识别受体，可识别微生物模式分子和损伤相关模式分子[7-8]。研究[9-10]发现，在肺纤维化中，TLR9表达水平显著上调，诱导肌成纤维细胞的分化并加重肺纤维化程度。鉴于TLR9在ILD中的重要作用，研究[8]发现，NETs通过TLR9-miR-7-Smad2信号通路促进肺纤维母细胞增殖及向肌成纤维细胞分化，进而诱导多发性肌炎相关的间质性肺病。此外，研究[7,11]表明，TLR9通路可能参与组织损伤过程中NETs的形成。因此，推测NETs与TLR9通路在IIM-ILD的发生发展中相互影响，其具体作用机制需进一步探索。肺泡上皮细胞作为慢性呼吸系统疾病急性加重的主要前哨细胞，其损伤和功能障碍可能是疾病风险起始的核心[12-13]。肺泡上皮细胞在多种损伤因素、炎症、病原微生物感染等刺激下可转化为间充质细胞表型，即发生上皮间质转化（Epithelial-to-Mesenchymal Transition，EMT）[14]。近年来，EMT逐渐成为治疗慢性呼吸系统疾病的新靶点[15]，NETs是否通过诱导肺上皮细胞发生EMT而参与IIM-ILD的发生发展值得进一步研究。

本研究拟使用EAM小鼠模型进行体内机制验证；采用体外分离的NETs干预A549细胞，通过转录组测序、免疫荧光、蛋白质印迹法等方法，探究NETs能否诱导EMT及其作用机制；使用TLR9抑制剂及激动剂干预A549细胞，探究TLR9是否在EMT中发挥作用。

1 材料与方法

1.1 EAM小鼠模型及治疗

6~8周龄BALB/c野生型小鼠，购自兰州兽医研究所。所有实验鼠均在兰州大学第二医院SPF级实验室饲养，不限制水和食物的供应。EAM模型组（6只）：0.25 mL的大鼠骨骼肌匀浆（30 mg/mL）与等体积完全弗氏佐剂（Complete Freund's Adjuvant，CFA）混匀后皮下注射5次；百日咳毒素2 μg腹腔注射2次。具体造模方法见课题组前期研究[16-17]。阴性对照组（NC组，6只）：健康小鼠在同期以相同方式给予相同体积的生理盐水。第35天麻醉后处死小鼠，取肺组织行组织病理学研究，所有动物实验均经兰州大学第二医院动物伦理委员会（编号：D2022-061）批准。

1.2 EAM小鼠模型ILD评估

取小鼠肺组织（左肺）于4%多聚甲醛固定，脱水、石蜡包埋后制成4 μm的切片，苏木素染细胞核、伊红染胞质，评定EAM小鼠肺组织结构是否发生ILD及肺纤维化。

1.3 免疫组织化学染色

制备好的肺组织切片经抗原修复后，与一抗在4℃下孵育12 h。一抗为抗NE抗体（Abcam，美国，1∶200）、抗MPO抗体（Abcam，美国，1∶1 000）、抗citH3抗体（Abcam，美国，1∶1 000）、抗α-SMA抗体（Abcam，美国，1∶500）、抗E-Ca抗体（武

汉三鹰生物技术有限公司，中国，1∶500）、抗vimentin抗体（武汉三鹰生物技术有限公司，中国，1∶500）、抗CK7抗体（武汉三鹰生物技术有限公司，中国，1∶200）、抗TLR9抗体（华安生物技术有限公司，中国，1∶300）、抗MYD88抗体（华安生物技术有限公司，中国，1∶300）。辣根过氧化物酶偶联二抗孵育后，用二氨基联苯胺显色，封片后显微镜下观察有无阳性表达。

1.4 中性粒细胞分离和NETs提取

中性粒细胞分离：采用密度梯度离心法分离健康人外周血中性粒细胞，研究方案经兰州大学第二医院医学伦理委员会（编号：2022A-78）批准。志愿者签署书面知情同意后，用EDTA抗凝管抽取健康志愿者全血15 mL。10~15 min内在15 mL离心管内按体积5∶2∶7的比例依次加入Histopaque-1119（Sigma，美国）、Histopaque-1077（Sigma，美国）和全血，750 g离心30 min。取中性粒细胞层至含有10 mL磷酸盐缓冲液的离心管，吹打混匀，450 g离心10 min，用含有10%胎牛血清（Gibco，10099-141，美国）的1640培养基重悬中性粒细胞，细胞计数仪计数。

NETs提取：6孔细胞培养板中加入含有1×10^6个中性粒细胞的1640培养基，在37℃、5% CO_2条件下孵育30 min后，加入终浓度100 nmol/L的丙二醇甲醚醋酸酯（佛波酯）（Solarbio，P6741-1 mg，中国），继续在细胞培养箱培养4 h，用2 mL无钙镁磷酸盐缓冲液冲洗，450 g离心10 min，取不含细胞碎片的NETs上清，测cfDNA浓度，并于-80℃保存。

1.5 细胞培养和处理

原代A549细胞购自上海富衡生物公司，第二代或第三代细胞用于以下实验：NC组A549细胞使用1640培养基（Gibco，Grand Island，美国）培养24 h；NETs组使用100 ng/mL的NETs刺激A549细胞24 h；NETs+羟氯喹组使用50 μg/mL的羟氯喹（TLR9抑制剂）预处理30 min后，100 ng/mL的NETs与A549细胞共培养24 h；NETs+OND2395组使用10 μg/mL的OND2395（TLR9激动剂）预处理30 min后，100 ng/mL的NETs与A549细胞共培养24 h；NETs+羟氯喹+OND2395组使用50 μg/mL的羟氯喹及10 μg/mL的OND2395共同预处理30 min后，100 ng/mL的NETs与A549细胞共培养24 h；羟氯喹+OND2395组使用50 μg/mL羟氯喹及10 μg/mL的OND2395与A549细胞共培养24 h。

1.6 转录组测序

NC组A549细胞使用1640培养基培养24 h；NETs组使用100 ng/mL的NETs刺激A549细胞24 h。使用TRIzol试剂（Invitrogen，美国）从细胞中提取总RNA，并于-80℃冰箱保存。3次独立实验的样本送至上海欧易生物医学科技有限公司进行转录组测序及分析。

1.7 细胞免疫荧光

A549细胞按3×10^4/mL在圆形玻片上接种，待细胞贴壁后，用羟氯喹、NETs刺激适宜时间后，用4%多聚甲醛固定，用0.1%Triton X-100进行通透，Quick Block免疫染色封闭液室温封闭1 h，抗α-SMA抗体（Abcam，美国，1∶500）、抗E-Ca抗体（Proteintech，中国，1∶500）、抗TLR9抗体（Huabio，中国，1∶500）、抗MYD88抗体（Huabio，中国，1∶500）滴加于玻片上4℃湿盒孵育过夜，采用对应源荧光二抗（Proteintech，中国，1∶1 000）进行标记，用含4,6-二脒基-2-苯基吲哚的抗荧光淬灭剂封片，荧光显微镜及共聚焦显微镜观察采集图像。Image J软件测量相关指标荧光强度。

1.8 蛋白质印迹法

收集各组细胞，提取细胞总蛋白，二喹啉甲酸法测定各组蛋白浓度，与上样缓冲液混合后高温煮10 min。在聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE）中电泳，使用湿转的方法将蛋白质转移至激活的PVDF膜上，5%脱脂牛奶室温封闭1 h。按照目标蛋白的分子量裁膜，加入一抗后4℃摇床过夜。所有一抗浓度为0.05%~0.10%。TBST洗膜后分别加入羊抗兔（Proteintech，SA00001-2，中国，1∶10 000）、羊抗鼠（Proteintech，SA00001-1，中国，1∶10 000）二抗，室温孵育1 h，洗膜后加入ECL显色液后曝光拍照。Image J软件测量相关蛋白灰度值。

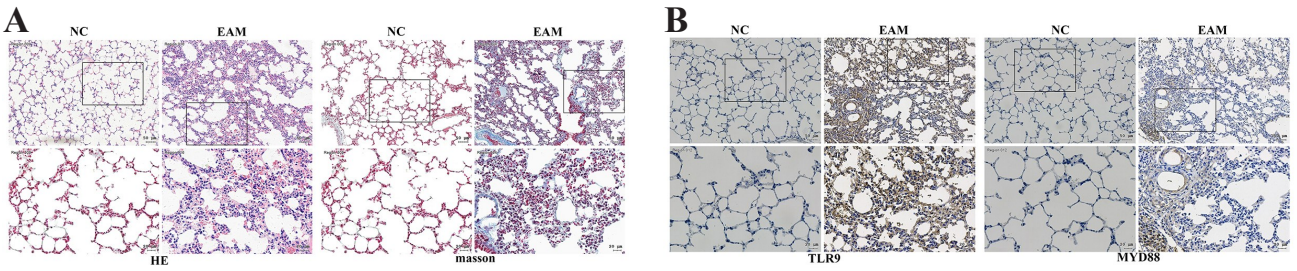
1.9 统计分析

使用GraphPad Prism 8进行组间比较并制图，计量资料测定值来自3个独立的实验。*t*检验或单因素方差分析组间差异，$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 EAM小鼠肺组织存在TLR9信号激活

对EAM小鼠肺组织进行HE染色及masson染色，结果与NC组小鼠相比，EAM组小鼠肺中肺泡间隔存在大量炎性细胞浸润，肺泡结构不明显，间质部分增多，蓝色胶原明显增多（见图1A），提示EAM小鼠发生ILD。此外，在连续切片的肺组织中，免疫组织化学染色结果显示EAM小鼠肺间质病变中发现了TLR9及MYD88表达阳性，提示存在TLR9信号激活（见图1B）。因此，推测TLR9信号通路可能参与了EAM小鼠模型ILD的发生。



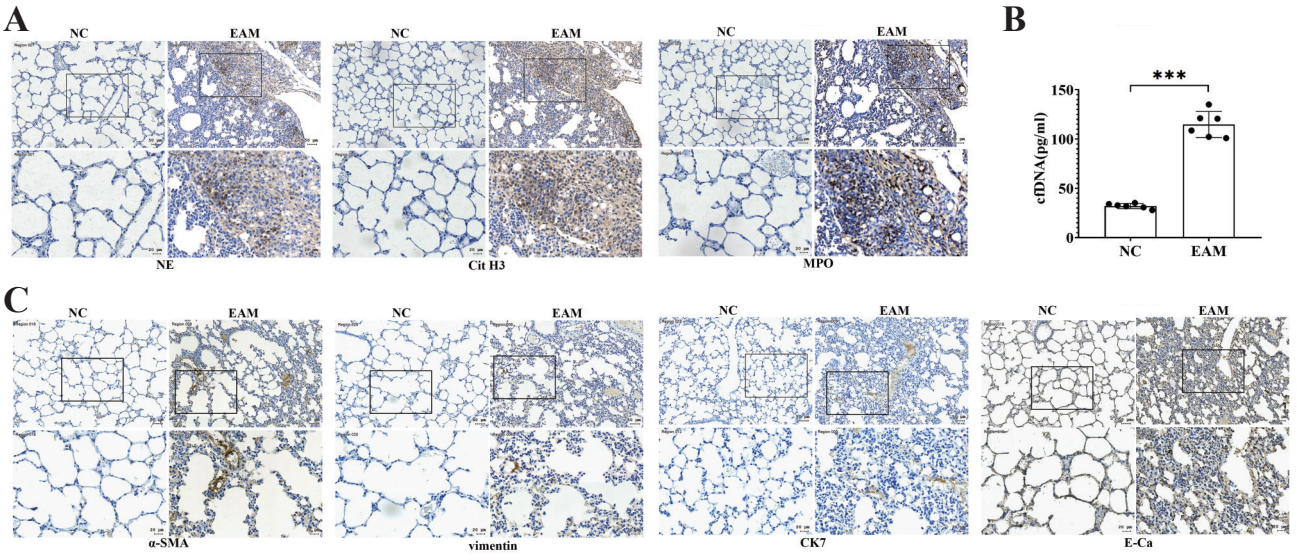
A：小鼠肺组织HE染色及masson染色，NC组小鼠肺叶结构完整，肺泡间隔正常，无明显炎性细胞浸润及蓝色胶原染色，EAM模型小鼠肺泡间隔部分炎性细胞浸润，肺泡结构不明显，间质部分增多，蓝色胶原染色明显；B：小鼠肺组织免疫组织化学染色，EAM模型小鼠肺中TLR9表达阳性，MYD88表达阳性。

图1　EAM小鼠肺组织存在TLR9信号激活

Figure 1　TLR9 signaling activation in lung tissue of EAM mice

2.2　EAM小鼠肺组织存在NETs浸润及EMT过程

在连续切片的肺组织中，免疫组织化学染色结果显示MPO、NE、Cit-H3共定位表达阳性（见图2A），表明EAM小鼠肺组织存在NETs浸润。为了进一步明确EAM小鼠体内NETs形成情况，采用小鼠血清测定NETs形成标记物cfDNA，与NC组相比，EAM小鼠中cfDNA的含量显著升高（P<0.05）（见图2B），提示EAM小鼠体内存在NETs过度形成。此外，与NC组相比，EAM小鼠肺组织间质中α-SMA、vimentin、CK7表达增多，胞质中E-Ca表达部分缺失（见图2C），提示EAM小鼠ILD病变中发生了EMT。



A：小鼠肺组织免疫组织化学染色，NC组小鼠MPO、NE、Cit-H3未见阳性染色，EAM模型小鼠MPO、NE、Cit-H3阳性染色明显（棕色）；B：小鼠血清学测定，EAM模型小鼠血清中cfDNA含量升高；C：小鼠肺组织免疫组织化学染色，NC组小鼠α-SMA、vimentin、CK7未见明显表达，E-Ca表达明显，EAM模型小鼠α-SMA、vimentin、CK7表达增多，E-Ca表达部分缺失。***P<0.001

图2　EAM小鼠肺组织存在NETs浸润和EMT过程

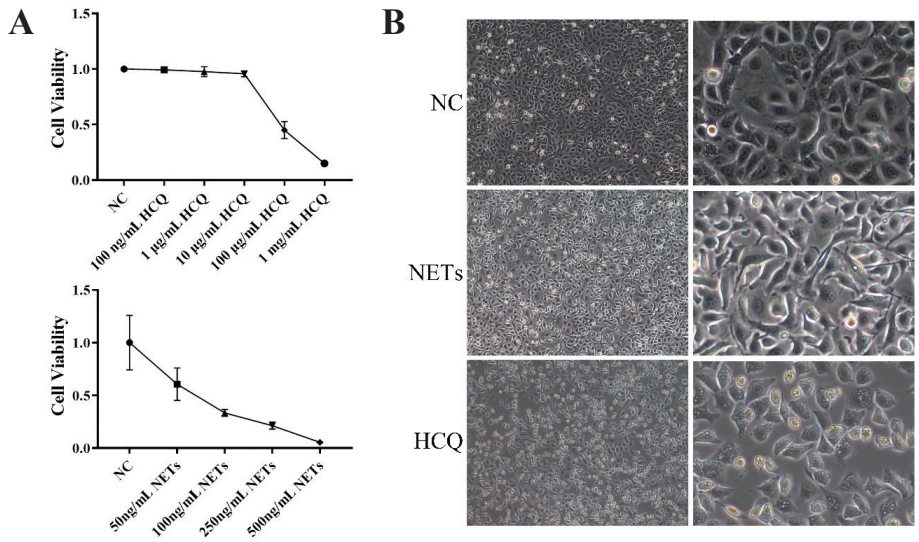
Figure 2　NETs infiltration and the EMT process in lung tissue of EAM mice

2.3　NETs影响A549细胞活力及形态

为了验证NETs是否影响肺泡上皮细胞，进行了细胞实验。使用不同浓度的NETs及羟氯喹刺激A549细胞4 h后，通过CCK8试剂测定细胞活力（见图3A）。结果显示，随着NETs质量浓度升高，A549细胞活力逐渐降低，在500 ng/mL质量浓度刺激下，A549细胞几乎无活力（P<0.05）。随着羟氯喹浓度升高，A549细胞活力逐渐降低，在100 μg/mL浓度刺激下，A549细胞活力显著下降（P<0.05）。此外，显微镜明场下观察发现，A549细胞在100 ng/mL的NETs刺激24 h后，细胞形态发生了明显改变，由三角形或多角形变为纺锤形或椭圆形；而50 μg/mL羟氯喹与100 ng/mL NETs共同刺激24 h后，上述细胞形态改变有所减轻（见图3B），提示羟氯喹对NETs刺激的A549细胞具有保护作用。

2.4　NETs激活A549细胞炎症及纤维化基因上调

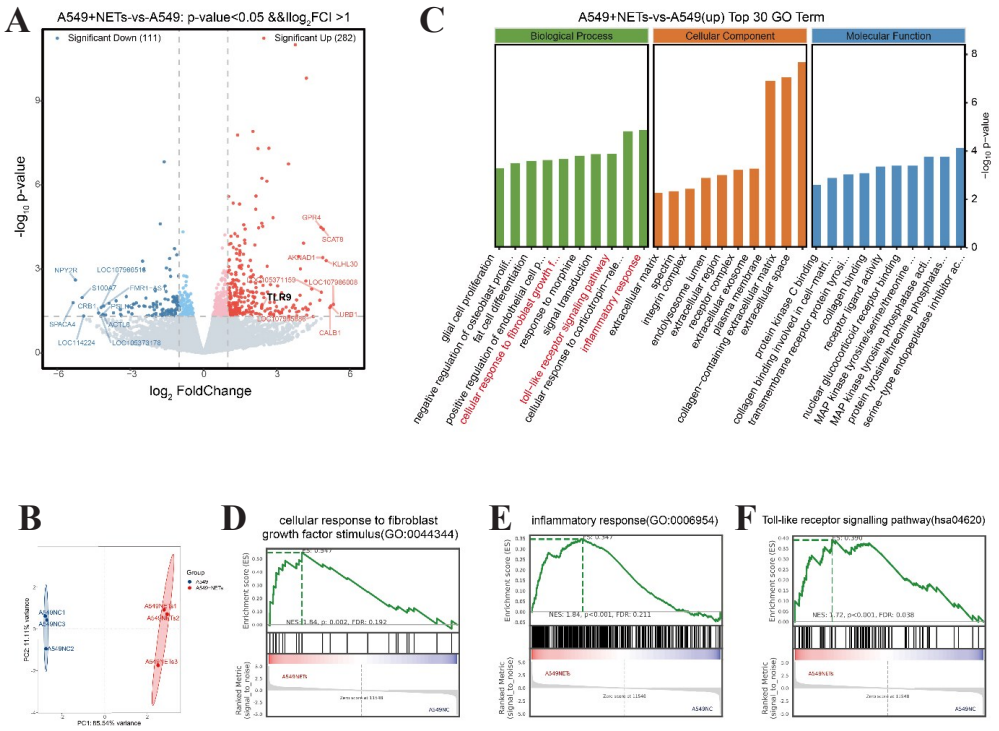
为了探究NETs刺激A549细胞后形态改变的原因，进行了转录组测序。发现NETs刺激A549细胞24 h后，282个基因表达显著上调，111个基因显著下调，并且同时激活天然免疫相关通路、促炎和促纤维化通路，差异具有统计学意义（见图4A）。



A：不同质量浓度的NETs和羟氯喹刺激A549细胞，采用CCK8测定A549细胞活力；B：NETs诱导A549细胞形态改变，选用2~3代的A549细胞，10×及40×显微镜明场下观察细胞形态，NC组为未特殊处理的A549细胞，呈三角形或多角形，NETs组为100 ng/mL的NETs刺激24 h后的A549细胞，呈纺锤形或椭圆形，HCQ组为50 μg/mL羟氯喹与100 ng/mL NETs共同刺激24 h后的A549细胞，形态改变减轻。

图3　NETs影响A549细胞活力及形态

Figure 3　Effects of NETs on A549 cell viability and morphology



A：GO富集分析显示top30的条目，其中与炎症和纤维化相关的条目在GO富集分析中高表达，P<0.05（红色表示）；B：PCA降维提示3次实验具有可重复性；C：GO的GSEA分析显示纤维化和炎症相关信号高表达，P<0.05；D~F：GSEA分析显示纤维化、炎症和Toll-like信号通路显著上调，P<0.05。

图4　NETs刺激A549细胞后的RNA-seq结果

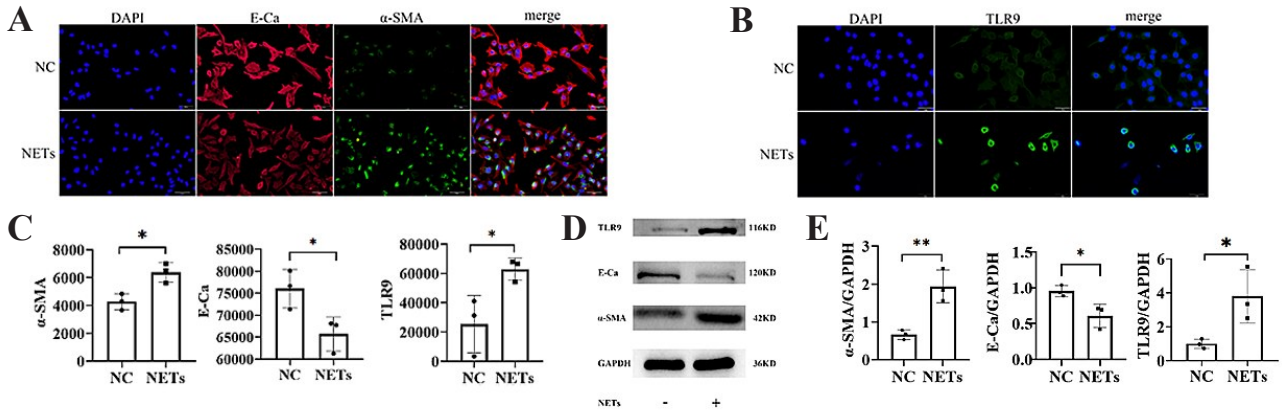
Figure 4　RNA-seq results following NETs stimulation of A549 cells

PCA降维图提示3次独立实验具有可重复性（见图4B）。GSEA分析显示纤维化和炎症相关信号高表达，与天然免疫相关的Toll-like信号通路显著上调，且差异具有统计学意义（见图4C~4F），因此推测NETs刺激A549细胞后，*TLR9*可能参与了纤维化和炎症相关过程。

2.5　NETs激活A549细胞中TLR9信号并刺激A549细胞发生EMT

为了进一步验证NETs与A549细胞中TLR9信号及EMT的关系，用100 ng/mL NETs刺激A549

细胞24 h，免疫荧光染色结果显示，与NC组相比，实验组α-SMA及TLR9的表达水平显著升高，而E-Ca的表达水平显著降低（见图5A~5C）。Western blotting结果显示，NETs刺激A549细胞后，α-SMA和TLR9的表达水平显著升高，而E-Ca表达水平显著降低（P<0.05）（见图5D~5E）。研究提示，NETs可能激活A549细胞中TLR9信号，并刺激A549细胞发生EMT。



A：α-SMA和E-Ca免疫荧光染色，40×，与NC组相比，NETs刺激组α-SMA（绿色）表达水平显著升高，E-Ca（红色）表达水平显著降低，且与细胞核（蓝色）共定位；B：TLR9免疫荧光染色，40×，NETs刺激组TLR9（绿色）表达水平显著升高，且与细胞核（蓝色）共定位；C：荧光强度的统计分析；D：NETs对A549细胞EMT及TLR9相关标志蛋白表达量的影响。与NC组相比，NETs组α-SMA表达水平显著显升高，E-Ca表达显著降低，TLR9表达明显升高；E：标志蛋白表达量的统计分析。*P<0.05，**P<0.01。

图5 NETs激活A549细胞中TLR9信号并诱发EMT

Figure 5 NETs activate TLR9 signaling and induce EMT in A549 cells

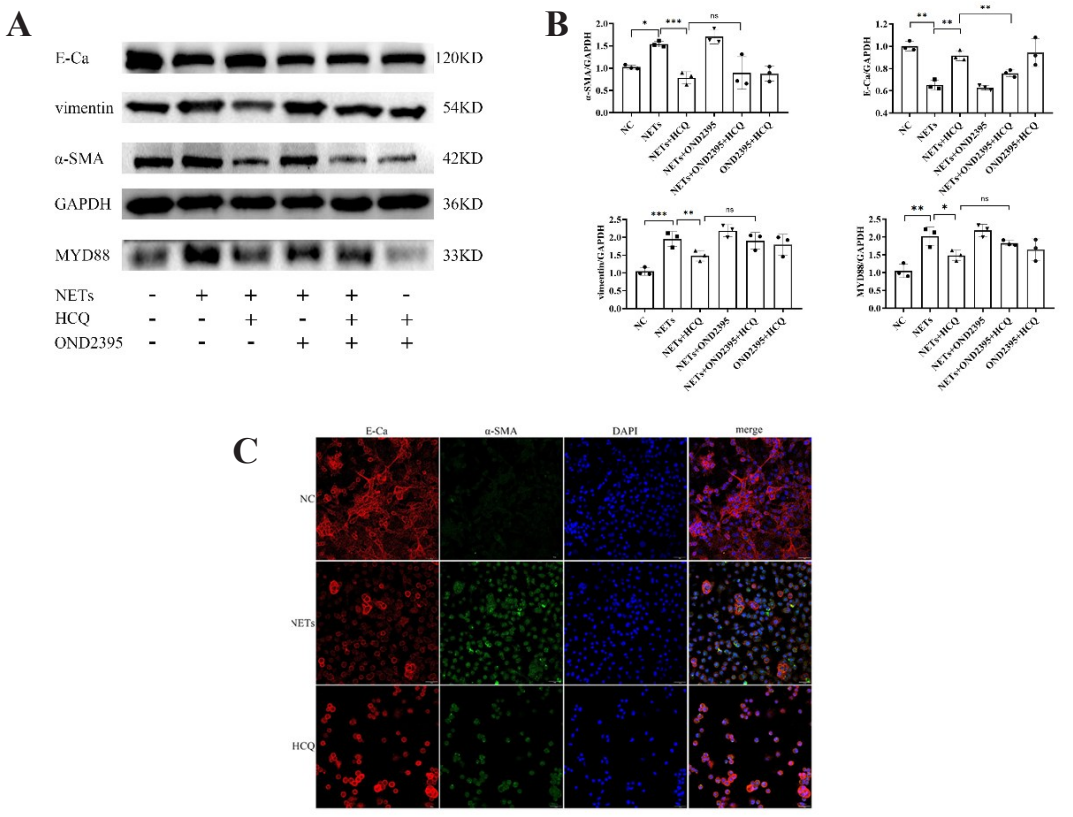
2.6 TLR9抑制剂可减轻肺泡上皮细胞中NETs诱发的EMT过程

为了进一步验证NETs、EMT与TLR9信号三者之间的关系，以及在IIM-ILD发病中的致病作用，用50 μg/mL羟氯喹、10 μg/mL OND2395、100 ng/mL NETs刺激A549细胞24 h后，进行免疫荧光及蛋白质印迹法检测EMT及TLR9相关指标。蛋白质印迹法实验显示，与NC组相比，NETs组α-SMA表达增加，E-Ca表达减少，TLR9下游蛋白MYD88表达增加（P<0.05）；与NETs组相比，NETs+羟氯喹组的α-SMA表达有所减弱，E-Ca表达有所增加，MYD88表达减少（P<0.05）；而与NETs+羟氯喹组相比，NETs+羟氯喹+OND2395组的α-SMA表达有所增加，E-Ca表达减弱，vimentin表达有所增加，MYD88表达有所增加（P>0.05）（见图6A，6B）。免疫荧光实验结果与蛋白质印迹法结果相似，相较于NC组，NETs组α-SMA表达增加，E-Ca表达减少；与NETs组相比，NETs+羟氯喹组的α-SMA表达有所减弱，E-Ca表达有所增加（见图6C）。上述实验提示TLR9抑制剂羟氯喹可抑制A549细胞中NETs激活的EMT过程，TLR9激动剂OND2395可能增强NETs诱导的EMT效果。

3 讨论

本研究发现，EAM小鼠肺组织中存在TLR9信号激活、NETs浸润及EMT过程。同时，细胞实验发现，NETs可激活A549细胞中TLR9信号及刺激A549细胞发生EMT，羟氯喹可抑制A549细胞中NETs激活的EMT过程，TLR9激动剂OND2395可增强NETs诱导的EMT效果。上述体内、外实验结果提示，IIM-ILD发病中NETs可能通过诱发EMT起关键作用，TLR9可能是IIM-ILD潜在的治疗靶点。

EMT是允许分化完成的上皮细胞去分化并获得间充质特征的一种发育途径，在先天免疫反应中发挥关键作用，参与炎症的发生和消退，是炎症的结果[18-20]。大量研究[12-15]证实，EMT与ILD等肺部疾病密切相关，是纤维化的重要途径之一。肌成纤维细胞作为肺纤维化过程中主要的效应细胞，其来源主要有3种，EMT即为其中的一个重要来源。受损的肺泡上皮修复失败、成纤维细胞持续存在和细胞外基质过度沉积，导致肺部结构发生不可逆性损伤，从而引发ILD[21]。在呼吸系统疾病中，炎症过程释放的细胞因子可诱导EMT和随后的气道重塑与肺纤维化进程。研究[22]表明，草药配方、特定草药化合物、细胞因子、氨基酸或蛋白质抑制剂和维生素都可能通过抑制EMT相关途径抑制气道重塑，靶向EMT治疗可以抑制哮喘和慢性阻塞性肺疾病的气道重塑和肺纤维化进展，且副作用较少。此外，来自mMSCs的外泌体miR-466f-3p可能具有抗纤维化特性，并通过间质-上皮转化抑制AKT/GSK3β预防辐射诱导的EMT，为辐射诱导的肺纤



A~B：NETs、羟氯喹、OND2395对A549细胞EMT及TLR9相关标志蛋白表达量的影响。与NC组相比，NETs组α-SMA表达增加，E-Ca表达减少，TLR9下游蛋白MYD88表达增加，PAD4表达增加（$P<0.05$）；与NETs组相比，NETs+羟氯喹组的α-SMA表达有所减弱，E-Ca表达有所增加，MYD88表达减少（$P<0.05$），与NETs+羟氯喹组相比，NETs+羟氯喹+OND2395组的α-SMA表达有所增加，E-Ca表达减弱，vimentin表达有所增加，MYD88表达有所增加（$P>0.05$）；C：免疫荧光染色，×20，与NC组相比，NETs刺激组α-SMA（绿色）表达升高，E-Ca（红色）表达减少，且与细胞核（蓝色）共定位，HCQ组为NETs+羟氯喹共同刺激A549细胞，与NETs组相比，α-SMA表达有所减弱，E-Ca表达有所增加。

图6　TLR9抑制剂可减轻A549细胞中NETs诱发的EMT

Figure 6　TLR9 inhibitor alleviates NETs-induced EMT in A549 cells

维化治疗带来了希望[23]。因此，减缓、抑制或逆转EMT过程对IIM-ILD的治疗至关重要[24-25]。

研究[17,26-27]表明，NETs作为一种潜在的DAMPs，可以激活多种天然免疫通路，从而诱发一系列损伤或改变。为了探究NETs对肺上皮细胞的影响，本研究进行了细胞转录组测序，发现NETs刺激A549细胞24 h后激活了天然免疫相关通路，其中TLR9相关信号通路显著上调，提示NETs刺激A549细胞后*TLR9*可能参与了相关的炎症反应。研究[28]表明，NETs通过TLR9受体相互作用转移到成纤维细胞中，导致核P-NF-κB的增加，从而启动成纤维细胞中IL-6的表达和增加。IL-6通过自分泌和旁分泌信号通路促进成纤维细胞α-SMA表达和胶原生成，导致瘢痕增生。本研究发现，EAM-ILD小鼠体内同时存在NETs浸润、TLR9激活及EMT表达，三者间是否存在某种联系值得进一步探究。合理推测NETs诱发EMT从而促进ILD，且TLR9发挥了一定的作用。体外实验部分印证了上述假设，NETs刺激A549细胞后，出现了EMT及TLR9激活。

羟氯喹作为一种已知的TLR9抑制剂，研究[29]验证了羟氯喹可有效阻断TLR9信号通路从而抑制NETs形成。为了证实NETs是否通过TLR9信号通路诱发EMT，采用羟氯喹及TLR9激动剂OND2395与NETs共同刺激上皮细胞，探究TLR9对肺泡上皮细胞的影响。体外实验证明，羟氯喹可抑制A549细胞中NETs诱发的EMT过程，即NETs可能通过激活TLR9信号诱导肺泡上皮细胞EMT的发生。而TLR9作为中性粒细胞的模式识别受体介导损伤相关模式分子诱发的NETs形成[11]，也许阻断TLR9能够从起始阶段减少NETs诱发的IIM-ILD。NETs诱导的EMT可能是IIM-ILD的重要致病机制，其中TLR9信号起关键作用，虽然尚不能完全明确TLR9在IIM-ILD中的具体分子机制，但靶向TLR9信号似乎是治疗IIM-ILD的一个有希望的策略。

本研究也有一些局限性，A549细胞系并不能完全代替人正常肺上皮细胞。此外，并未进行体内

实验验证TLR9抑制剂对IIM-ILD的治疗作用，因此，仍需更多的体内数据来阐明TLR9在IIM-ILD中的致病机制。

4 结论

NETs可能作为一种新型的DAMPs通过介导肺泡上皮EMT参与IIM-ILD的进展，TLR9可能在此过程中发挥重要作用。本研究将NETs与肺泡上皮EMT及TLR9信号通路联系起来，丰富了NETs在IIM-ILD致病机制领域的研究，靶向TLR9可能是治疗IIM-ILD的新策略。

参考文献

[1] TILLIE-LEBLOND I, WISLEZ M, VALEYRE D, et al. Interstitial lung disease and anti-jo-1 antibodies: Difference between acute and gradual onset[J]. Thorax, 2008, 63(1):53-59.

[2] YE S, CHEN X X, LU X Y, et al. Adult clinically amyopathic dermatomyositis with rapid progressive interstitial lung disease: A retrospective cohort study[J]. Clinical Rheumatology, 2007, 26(10):1647-1654.

[3] SAKETKOO L A, ASCHERMAN D P, COTTIN V, et al. Interstitial lung disease in idiopathic inflammatory myopathy[J]. Current Rheumatology Reviews, 2010, 6 (2): 108-119.

[4] ZHANG S, SHU X, TIAN X, et al. Enhanced formation and impaired degradation of neutrophil extracellular traps in dermatomyositis and polymyositis: A potential contributor to interstitial lung disease complications[J]. Clinical and Experimental Immunology, 2014, 177(1): 134-141.

[5] MA W, ZHU J, BAI L, et al. The role of neutrophil extracellular traps and proinflammatory damage-associated molecular patterns in idiopathic inflammatory myopathies [J]. Clinical and Experimental Immunology, 2023, 213 (2): 202-208.

[6] ZHANG S, SHEN H, SHU X, et al. Abnormally increased low-density granulocytes in peripheral blood mononuclear cells are associated with interstitial lung disease in dermatomyositis[J]. Modern Rheumatology, 2017, 27(1): 122-129.

[7] LIU L, MAO Y, XU B, et al. Induction of neutrophil extracellular traps during tissue injury: Involvement of STING and Toll-like receptor 9 pathways[J]. Cell Proliferation, 2019, 52(3): e12579.

[8] ZHANG S, JIA X, ZHANG Q, et al. Neutrophil extracellular traps activate lung fibroblast to induce polymyositis-related interstitial lung diseases via tlr9-mir-7-smad2 pathway[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2020, 24(2): 1658-1669.

[9] HOGABOAM C M, MURRAY L, MARTINEZ F J. Epigenetic mechanisms through which toll-like receptor-9 drives idiopathic pulmonary fibrosis progression[J]. Proceedings of the American Thoracic Society, 2012, 9 (3):172-176.

[10] KIRILLOV V, SILER J T, RAMADASS M, et al. Sustained activation of toll-like receptor 9 induces an invasive phenotype in lung fibroblasts: Possible implications in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. The American Journal of Pathology, 2015, 185(4): 943-957.

[11] PASTOREK M, KONEČNÁ B, JANKO J, et al. Mitochondria-induced formation of neutrophil extracellular traps is enhanced in the elderly via toll-like receptor 9[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2023,114(6):651-665.

[12] KROPSKI J A, LAWSON W E, YOUNG L R, et al. Genetic studies provide clues on the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Disease Models & Mechanisms, 2013, 6(1): 9-17.

[13] YOUNG L R, GULLEMAN P M, BRIDGES J P, et al. The alveolar epithelium determines susceptibility to lung fibrosis in hermansky-pudlak syndrome[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2012, 186(10): 1014-1024.

[14] KROPSKI J A, PRITCHETT J M, ZOZ D F, et al. Extensive phenotyping of individuals at risk for familial interstitial pneumonia reveals clues to the pathogenesis of interstitial lung disease[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2015, 191(4): 417-426.

[15] LIANG X, HE X, LI Y, et al. Lyn regulates epithelial-mesenchymal transition in cs-exposed model through smad2/3 signaling[J]. Respiratory Research, 2019, 20(1): 201.

[16] BAI L, ZHU J, MA W, et al. Neutrophil extracellular traps are involved in the occurrence of interstitial lung disease in a murine experimental autoimmune myositis model[J]. Clinical and Experimental Immunology, 2024, 215(2): 126-136.

[17] ZHAO P, ZHU J, BAI L, et al. Neutrophil extracellular traps induce pyroptosis of pulmonary microvascular endothelial cells by activating the nlrp3 inflammasome [J]. Clinical and Experimental Immunology, 2024, 217 (1): 89-98.

[18] DUCHEMANN B, ANNESI-MAESANO I, JACOBE DE NAUROIS C, et al. Prevalence and incidence of interstitial lung diseases in a multi-ethnic county of greater paris[J]. The European Respiratory Journal, 2017, 50(2): 1602419.

[19] COLLARD H R, RYERSON C J, CORTE T J, et al. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: An international working group report[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2016, 194(3): 265-275.

[20] DRAKE T M, DOCHERTY A B, HARRISON E M, et al.

Outcome of hospitalization for covid-19 in patients with interstitial lung disease: An international multicenter study [J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2020, 202(12): 1656-1665.

[21] DONGRE A, WEINBERG R A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2019, 20(2): 69-84.

[22] HE H, JI X, CAO L, et al. Medicine targeting epithelial-mesenchymal transition to treat airway remodeling and pulmonary fibrosis progression[J]. Canadian Respiratory Journal , 2023, 2023: 3291957.

[23] LI Y, SHEN Z, JIANG X, et al. Mouse mesenchymal stem cell-derived exosomal mir-466f-3p reverses EMT process through inhibiting akt/gsk3β pathway via c-MET in radiation-induced lung injury[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research , 2022, 41(1): 128.

[24] BECERRIL C, MONTAÑO M, CISNEROS J, et al. Mesenchymal-epithelial transition in fibroblasts of human normal lungs and interstitial lung diseases[J]. Biomolecules, 2021, 11(3): 378.

[25] HEWLETT J C, KROPSKI J A, BLACKWELL T S. Idiopathic pulmonary fibrosis: Epithelial-mesenchymal interactions and emerging therapeutic targets[J]. Matrix Biology, 2018, 71-72: 112-127.

[26] CHENG O Z, PALANIYAR N. NET balancing: A problem in inflammatory lung diseases[J]. Frontiers in Immunology, 2013, 4: 1.

[27] 赵佩佩, 朱嘉睿, 李飞飞, 等. 中性粒细胞胞外诱捕网通过激活 nlrp3 炎症小体诱导人肺微血管内皮细胞焦亡[J]. 兰州大学学报(医学版), 2024, 50(5):6-13.

[28] SHAO Y, GUO Z, YANG Y, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to myofibroblast differentiation and scar hyperplasia through the toll-like receptor 9 / nuclear factor kappa-b/interleukin-6 pathway[J]. Burns & Trauma, 2022, 10: tkac044.

[29] ZHANG S, ZHANG Q, WANG F, et al. Hydroxychloroquine inhibiting neutrophil extracellular trap formation alleviates hepatic ischemia/reperfusion injury by blocking tlr9 in mice[J]. Clinical Immunology, 2020, 216: 108461.

（上接第86页）

[7] 国家药典委员会. 9101分析方法验证指导原则（2020版）[M]. 北京: 中国医药科技出版社，2020: 49-51.

[8] ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of analytical procedures Q2(R2)[EB/OL]. (2023-11)[2024-02-23]. https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2%28R2%29_Guideline_2023_1130. pdf

[9] MAHLER H C, FRIESS W, GRAUSCHOPF U, et al. Protein aggregation: Pathways, induction factors and analysis[J]. J Pharm Sci, 2009, 98(9): 2909-2934.

[10] PHAM N B, MENG W S. Protein aggregation and immunogenicity of biotherapeutics[J]. Int J Pharm, 2020, 585:119523.

[11] RAHBAN M, AHMAD F, PIATYSZEK M A, et al. Stabilization challenges and aggregation in protein-based therapeutics in the pharmaceutical industry[J]. RSC Adv, 2023, 13(51): 35947-35963.

[12] GUPTA S, JISKOOT W, SCHÖNEICH C, et al. Oxidation and deamidation of monoclonal antibody products: Potential impact on stability, biological activity, and efficacy[J]. J Pharm Sci, 2022,111(4): 903-918.

[13] LUNDAHL M L E, FOGLI S, COLAVITA P E, et al. Aggregation of protein therapeutics enhances their immunogenicity: Causes and mitigation strategies[J]. RSC Chem Biol, 2021, 2(4): 1004-1020.

[14] KIBRIA M G, AKAZAWA-OGAWA Y, RAHMAN N, et al. The immunogenicity of an anti-EGFR single domain antibody(VHH) is enhanced by misfolded amorphous aggregation but not by heat-induced aggregation[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2020, 152: 164-174.

[15] THORLAKSEN C, SCHULTZ H S, GAMMELGAARD S K, et al. In vitro and in vivo immunogenicity assessment of protein aggregate characteristics[J]. Int J Pharm, 2023, 631: 122490.

[16] SWANSON M D, RIOS S, MITTAL S, et al. Immunogenicity risk assessment of spontaneously occurring therapeutic monoclonal antibody aggregates[J]. Front Immunol, 2022, 13: 915412.

[17] NING W, ZHAO Y. Characterization of ADCs by capillary electrophoresis[J]. Methods Mol Biol, 2020, 2078: 251-262.

[18] WAGNER E, COLAS O, CHENU S, et al. Determination of size variants by CE-SDS for approved therapeutic antibodies: Key implications of subclasses and light chain specificities[J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 184: 113166.

[19] CERNOSEK T, JAIN N, DALPHIN M, et al. Accelerated development of a SEC-HPLC procedure for purity analysis of monoclonal antibodies using design of experiments[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2024, 1235: 124037.

[20] KAUR H. Stability testing in monoclonal antibodies[J]. Crit Rev Biotechnol, 2021, 41(5): 692-714.

[21] NUPUR N, JOSHI S, GULLIARME D, et al. Analytical similarity assessment of biosimilars: Global regulatory landscape, recent studies and major advancements in orthogonal platforms[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2022, 10: 832059.

[22] 徐刚领, 杜加亮, 付志浩, 等. 单抗药物还原毛细管电泳法方法学验证研究[J]. 山西医科大学学报, 2024, 55(7): 916-921.