

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research熊去氧胆酸改善甲苯二异氰酸酯诱导的
支气管上皮细胞损伤的作用

Effects of ursodeoxycholic acid on bronchial epithelial cell injury induced by toluene diisocyanate

倪衍平, 苏健斌

(泉州市第一医院 药剂科, 福建 泉州 362000)

NI Yan - ping, SU Jian - bin

(Department of Pharmacy, Quanzhou
First Hospital, Quanzhou 362000, Fujian
Province, China)

摘要:目的 探讨熊去氧胆酸改善甲苯二异氰酸酯(TDI)诱导的支气管上皮细胞损伤的作用及机制。方法 将 BEAS - 2B 细胞随机分为对照组(常规培养)、TDI - 人血清白蛋白(HSA)组($120.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDI - HSA)、低剂量组($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 熊去氧胆酸 + $120.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDI - HSA)、高剂量组($200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 熊去氧胆酸 + $120.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDI - HSA)、西罗莫司组($25 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 西罗莫司 + $120.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDI - HSA)。用实时荧光定量聚合酶链反应、酶联免疫吸附试验法检测细胞炎症因子的表达,用 DCFH - DA 法检测活性氧(ROS)水平,用蛋白质印迹实验检测各细胞蛋白的相对表达水平。结果 对照组、TDI - HSA 组、低剂量组和高剂量组的白细胞介素(IL) - 6 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.13 、 2.20 ± 0.24 、 1.87 ± 0.12 和 1.48 ± 0.14 , IL - 8 水平分别为 (22.65 ± 1.96)、(81.42 ± 6.35)、(56.36 ± 5.88) 和 (38.28 ± 3.25) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, ROS 水平分别为 (100.00 ± 3.47)%、(351.25 ± 22.52)%、(312.80 ± 26.59)% 和 (242.15 ± 13.60)%, 线粒体动力相关蛋白 1 (DRP1) 蛋白相对表达水平分别为 0.23 ± 0.03 、 0.82 ± 0.08 、 0.69 ± 0.10 和 0.55 ± 0.05 , 苧氯素 1 (Beclin1) 蛋白相对表达水平分别为 0.23 ± 0.04 、 0.60 ± 0.07 、 0.44 ± 0.04 和 0.37 ± 0.03 , 磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(p - AMPK)蛋白相对表达水平分别为 0.20 ± 0.05 、 0.49 ± 0.05 、 0.40 ± 0.03 和 0.34 ± 0.04 ;高剂量组和西罗莫司组的 Beclin1 蛋白相对表达水平分别为 0.35 ± 0.04 和 0.69 ± 0.07 , IL - 6 水平分别为 (17.63 ± 1.36) 和 (29.52 ± 3.49) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, IL - 18 水平分别为 (65.22 ± 5.30) 和 (95.58 ± 6.80) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。TDI - HSA 组的上述指标与对照组比较,低、高剂量组的上述指标分别与 TDI - HSA 组比较,西罗莫司组的上述指标与高剂量组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 熊去氧胆酸可能介导 ROS/AMPK/自噬通路改善 TDI - HSA 诱发的炎症反应和线粒体功能障碍。

关键词:熊去氧胆酸;哮喘;甲苯二异氰酸酯;支气管上皮细胞;炎症反应;自噬

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.05.011

中图分类号:R975.5

文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2025)05-0654-06

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of ursodeoxycholic acid on bronchial epithelial cell injury induced by toluene diisocyanate (TDI). **Methods** BEAS - 2B cells were randomly divided into control group (conventional culture), TDI - human serum albumin (HSA) group ($120.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDI - HSA), low - dose group ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ursodeoxycholic acid + $120.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDI - HSA), high - dose group ($200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ursodeoxycholic acid + $120.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDI - HSA) and rapamycin group ($25 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ rapamycin + $120.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDI - HSA). The expression of inflammatory factors was

作者简介:倪衍平(1983 -),男,主管药师,主要从事临床药理、基础药理学方面的研究

通信作者:倪衍平

MP:13559510402

E - mail:123752179@qq.com

detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the level of reactive oxygen species (ROS) was detected by DCFH-DA; and the protein expression of each cell was detected by Western blot. **Results** The mRNA levels of interleukin (IL)-6 in control group, TDI-HSA group, low-dose group and high-dose group were 1.00 ± 0.13 , 2.20 ± 0.24 , 1.87 ± 0.12 , 1.48 ± 0.14 , respectively; IL-8 levels were (22.65 ± 1.96) , (81.42 ± 6.35) , (56.36 ± 5.88) , (38.28 ± 3.25) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; ROS levels were $(100.00 \pm 3.47)\%$, $(351.25 \pm 22.52)\%$, $(312.80 \pm 26.59)\%$, $(242.15 \pm 13.60)\%$, respectively; the protein levels of dynamic associated protein 1 (DRP1) were 0.23 ± 0.03 , 0.82 ± 0.08 , 0.69 ± 0.10 , 0.55 ± 0.05 , respectively; benzyl chloride 1 (Beclin1) protein expression levels were 0.23 ± 0.04 , 0.60 ± 0.07 , 0.44 ± 0.04 , 0.37 ± 0.03 , respectively; phosphorylated adenylyl activates protein kinase (p-AMPK) protein expression levels were 0.20 ± 0.05 , 0.49 ± 0.05 , 0.40 ± 0.03 , 0.34 ± 0.04 , respectively. Beclin1 protein expression levels in high-dose group and rapamycin group were 0.35 ± 0.04 and 0.69 ± 0.07 , respectively; IL-6 levels were (17.63 ± 1.36) and (29.52 ± 3.49) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; IL-18 levels were (65.22 ± 5.30) and (95.58 ± 6.80) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The above indexes: TDI-HSA group was compared with control group, low-dose group and high-dose group were compared with TDI-HSA group, rapamycin group compared with high dose group, the differences were significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** Ursodeoxycholic acid may mediate ROS/AMPK/autophagy pathway to improve the inflammatory response and mitochondrial dysfunction induced by TDI-HSA.

Key words: ursodeoxycholic acid; asthma; toluene diisocyanate; bronchial epithelial cells; inflammatory response; autophagy

职业性哮喘因其沉重的社会经济负担和高患病率已成为重大的公共卫生问题,甲苯二异氰酸酯(toluene diisocyanate, TDI)是职业性哮喘的主要致病因子^[1]。随着 TDI 在商业和日常生活中的广泛应用,职业和环境中的 TDI 暴露已严重威胁人们的健康,因此寻找治疗 TDI 相关职业性哮喘的有效治疗策略具有重要意义。熊去氧胆酸是一种亲水性二羟基胆汁酸,可用于治疗各种肝胆淤积性疾病^[2],随着研究的进展熊去氧胆酸已被证实在多种病理生理模型中具有非肝作用^[3],然而其在 TDI 诱导的气道炎症中是否具有治疗作用还未可知。气道上皮细胞在保护气道黏膜免受各种损伤源中发挥作用,其结构和功能改变使其能够快速适应局部环境变化或修复损伤后的上皮^[4]。本研究旨在通过体外实验探究熊去氧胆酸对 TDI 诱导的支气管上皮细胞抑炎作用及其潜在机制。

材料与方法

1 材料

细胞 BEAS-2B(人支气管上皮细胞),购自美国 ATCC 公司。

药品、试剂与仪器 熊去氧胆酸,规格:每瓶 20 mg,含量:98%,批号:20240225,上海源叶生物科技有限公司生产;西罗莫司,规格:每瓶 10 g,纯度:99%,批号:20240423,武汉东康源科技有限公司生

产。2,4-TDI,人血清白蛋白(human serum albumin, HSA),均为美国 Sigma Aldrich 公司生产;细胞计数试剂盒 8(cell counting kit 8, CCK-8)及引物,均购于上海碧云天生物技术有限公司;TRIzol 试剂、逆转录试剂盒,均购自上海联祖生物科技有限公司;DCFH-DA 活性氧(reactive oxygen species, ROS)荧光探针,均购自南京沃博生物科技有限公司;自噬相关的微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3) II、LC3I、死骨片 1(sequestosome 1, SQSTM1/p62)、苯氯素 1(benzyl chloride 1, Beclin1)、单磷酸腺苷活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activates protein kinase, AMPK)、磷酸化(phosphorylation, p)-AMPK、线粒体动力相关蛋白 1(mitochondrial dynamic associated protein 1, DRP1)、视神经萎缩蛋白 1(optic atrophy protein 1, OPA1)、线粒体融合蛋白 2(mitochondrial fusion protein 2, MFN2)、LC3B 一抗及二抗试剂,均购自美国 Abcam 公司;白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-8、IL-18、IL-1 β 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒,均购自上海化邦生物科技有限公司。

仪器 EnVision 多功能酶标仪,芬兰瑞孚迪公司产品;AxioVert5 倒置荧光显微镜,德国蔡司公司产品;StepOne TM 实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)仪,美国应用生物系统公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养^[5]

将 BEAS-2B 细胞培养在 DMEM 培养基中(含有 10% 胎牛血清),并置于培养箱中培养,每隔 1 d 更换 1 次培养液。

2.2 TDI-HSA 制备^[6]

将浓度为 $1.21 \times 10^6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TDI 35 μL 加入含 HSA 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS) 15 mL 中(HSA 质量分数为 1.00%),摇床下反应 30 min(室温);加入等体积的 $2.00 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸铵溶液,摇床下反应 15 min(室温),离心收集上清液;将上清液放入透析袋中并置于含有碳酸铵缓冲液的烧杯中进行透析,每隔 8 h 换液 1 次,共透析 3 d;然后滴加质量分数为 20.00 % 的三氯乙酸,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min,离心弃上清液,加入 $1.00 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 30 mL 溶解沉淀,然后将溶解后的沉淀放入透析袋并置于装有去离子水的烧杯中透析,每隔 8 h 换液 1 次,共透析 2 d;吸出透析袋中的 TDI-HSA 进行无菌过滤后保存,并用 Gutmann 法^[6]检测 TDI-HSA 中 TDI 的浓度,得出 HSA 质量浓度为 $1\,650.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,TDI 质量浓度为 $18.30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,其中终浓度为 $120.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDI-HSA 中 TDI 浓度为 $1.34 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (TDI-HSA 的质量浓度以 HSA 的质量浓度表示)。

2.3 细胞分组与处置方法

将 BEAS-2B 细胞随机分为对照组、TDI-HSA 组、低剂量组、高剂量组和西罗莫司组。对照组细胞进行常规培养;TDI-HSA 组细胞用终浓度为 $120.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDI-HSA(用 DMEM 培养基稀释)处理细胞 12 h;低、高剂量组细胞先分别用 100、200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 熊去氧胆酸处理细胞 12 h,然后用 $120.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDI-HSA 继续共同处理 12 h;西罗莫司组细胞先用 $25 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的西罗莫司处理细胞 12 h,然后加入 $120.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDI-HSA 继续共同处理 12 h。

2.4 CCK-8 实验检测细胞存活率^[7]

培养箱培养细胞 24 h 后用熊去氧胆酸(终浓度分别为 0、1、10、100、200、400 和 800 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理细胞 24 h,每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL ,培养箱培养 60 min,用酶标仪检测光密度值(450 nm)计算存活率。

2.5 RT-qPCR 实验检测细胞炎症因子 mRNA 相对表达水平^[8]

提取细胞总 RNA(TRIzol 法),检测浓度和质量后将 RNA 逆转为 cDNA,然后以 cDNA 为模板进行扩增,并以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde -

3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参,用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 IL-6、IL-8、IL-1 β 、IL-18 mRNA 相对表达水平。

2.6 ELISA 法检测炎症因子表达^[5]

收集处理后的各细胞,离心($3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min)后取上清液,将标准品与样品分别放入反应孔中进行孵育,并严格按照试剂盒说明方法检测 IL-6、IL-8、IL-1 β 、IL-18 水平。

2.7 DCFH-DA 法检测 ROS 水平^[9]

收集各组处理后的细胞,加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DCFH-DA 试剂在 37°C 下孵育 20 min,清洗后进行核染[4',6-联脒-2'-苯基吲哚(4',6-diaminidine 2'-phenylindole, DAPI)],用显微镜观察细胞着色情况。

2.8 蛋白质印迹实验检测各细胞蛋白相对表达水平^[5]

裂解各组细胞后离心提取总蛋白,测定总蛋白浓度后进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,转膜后在室温下封闭 2 h(5 % 脱脂奶粉),进行一抗孵育[LC3 II、LC3 I、p62、Beclin1、AMPK、p-AMPK、DRP1、OPA1、MFN2(稀释比均为 1:1 000)],4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜,次日洗膜后进行二抗孵育(稀释比为 1:5 000),显影后曝光,分析灰度值。

2.9 细胞免疫荧光检测 LC3B 表达^[8]

收集处理过的各组细胞,用多聚甲醛固定 25 min,清洗后用 Triton X-100 试剂在室温下孵育 30 min,然后加入 1% BSA 封闭 30 min,滴加 LC3B 一抗试剂(1:200),4 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,加入荧光二抗稀释液(1:500)在室温下孵育 60 min 后清洗干净,用 DAPI 试剂进行复染细胞核(室温,15 min),然后用显微镜观察、拍照。

3 统计学处理

用 SPSS23.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较用独立样本 t 检验,多组间比较用单因素方差分析。

结 果

1 熊去氧胆酸对 BEAS-2B 细胞存活率的影响

对照组细胞进行常规培养;TDI-HSA 组细胞用 $120.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TDI-HSA 处理细胞 12 h;低、高剂量组细胞分别用 100 和 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 熊去氧胆酸处理细胞 12 h 后用 $120.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDI-HSA 继续共

同处理 12 h;西罗莫司组细胞用 $25 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的西罗莫司处理细胞 12 h 后用 $120.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDI-HSA 继续共同处理 12 h。

用浓度为 0、1.00、10.00、100.00、200.00、400.00 和 $800.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的熊去氧胆酸处理细胞 24 h, 检测细胞存活率分别为 $(100.00 \pm 2.99)\%$ 、 $(101.48 \pm 5.93)\%$ 、 $(102.39 \pm 7.73)\%$ 、 $(103.91 \pm 8.83)\%$ 、 $(97.43 \pm 7.57)\%$ 、 $(92.52 \pm 8.21)\%$ 和 $(62.81 \pm 7.62)\%$; 1.00、10.00、100.00、200.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的熊去氧胆酸处理细胞后的细胞存活率与 $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较, 在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 400.00 和 $800.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 熊去氧胆酸处理细胞后, 细胞存活率均显著降低 (均 $P < 0.05$), 熊去氧胆酸剂量在 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下对细胞无毒性, 因此本研究确定以 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为熊去氧胆酸的最高处理剂量, 以 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为熊去氧胆酸的最低处理剂量。

2 熊去氧胆酸对 TDI-HSA 介导的炎症损伤的影响

由表 1 可见, TDI-HSA 组细胞促炎因子 (IL-6、

IL-8、IL-1 β 、IL-18) 表达水平和 mRNA 相对表达水平相比对照组均显著升高 (均 $P < 0.001$); 低、高剂量组细胞促炎因子 (IL-6、IL-8、IL-1 β 、IL-18) 表达水平和 mRNA 相对表达水平相比 TDI-HSA 组均显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.001$); 各指标 (IL-6、IL-8、IL-1 β 、IL-18) 表达水平和 mRNA 相对表达水平在低、高剂量组间比较, 在统计学上差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)。

3 熊去氧胆酸对 TDI-HSA 介导的 BEAS-2B 细胞线粒体功能的影响

由表 2 可见, TDI-HSA 组与对照组比较, 细胞 ROS 水平及 DRP1 蛋白水平均显著升高, OPA1、MFN2 蛋白表达水平均显著降低 (均 $P < 0.001$); 低剂量组、高剂量组细胞 ROS 及 DRP1 蛋白水平均较 TDI-HSA 组显著下降, OPA1、MFN2 蛋白表达水平均较 TDI-HSA 组显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.001$); 高剂量组 ROS 水平和 DRP1 水平较低剂量组均显著降低, OPA1 和 MFN2 蛋白均较低剂量组显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。

表 1 各组细胞炎症因子表达的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Table 1 Comparison of the expression of inflammatory factors in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Group	mRNA			
	IL-6	IL-8	IL-1 β	IL-18
Control	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.12
TDI-HSA	$2.20 \pm 0.24^{***}$	$1.85 \pm 0.11^{***}$	$2.33 \pm 0.16^{***}$	$1.83 \pm 0.19^{***}$
Low-dose	$1.87 \pm 0.12^{##}$	$1.51 \pm 0.06^{###}$	$2.08 \pm 0.19^{##}$	$1.50 \pm 0.12^{###}$
High-dose	$1.48 \pm 0.14^{####\Delta\Delta\Delta}$	$1.25 \pm 0.12^{####\Delta\Delta\Delta}$	$1.73 \pm 0.11^{####\Delta\Delta\Delta}$	$1.34 \pm 0.13^{####\Delta\Delta\Delta}$
Group	ELISA ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)			
	IL-6	IL-8	IL-1 β	IL-18
Control	4.91 ± 0.26	22.65 ± 1.96	6.56 ± 0.96	49.51 ± 5.48
TDI-HSA	$32.35 \pm 4.13^{***}$	$81.42 \pm 6.35^{***}$	$26.38 \pm 2.48^{***}$	$124.02 \pm 13.19^{***}$
Low-dose	$27.11 \pm 2.56^{###}$	$56.36 \pm 5.88^{###}$	$18.94 \pm 1.76^{###}$	$94.55 \pm 10.62^{###}$
High-dose	$18.01 \pm 2.43^{####\Delta\Delta\Delta}$	$38.28 \pm 3.25^{####\Delta\Delta\Delta}$	$15.03 \pm 1.47^{####\Delta\Delta\Delta}$	$65.93 \pm 8.66^{####\Delta\Delta\Delta}$

Control group: Routine culture; TDI-HSA group: $120.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ toluene diisocyanate (TDI)-human serum albumin (HSA) (TDI-HSA) treated cells; Low-dose group: $120.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDI-HSA and $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ursodeoxycholic acid treated cells; High-dose group: $120.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDI-HSA and $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ursodeoxycholic acid treated cells; IL: Interleukin; ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay; Compared with control group, $^{***} P < 0.001$; Compared with TDI-HSA group, $^{##} P < 0.01$, $^{###} P < 0.001$; Compared with low-dose group, $^{\Delta} P < 0.05$, $^{\Delta\Delta\Delta} P < 0.001$.

表 2 各组细胞活性氧 (ROS) 水平及线粒体功能障碍相关指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of reactive oxygen species (ROS) levels and related indicators of mitochondrial dysfunction in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	ROS level	DRP1	OPA1	MFN2
Control	100.00 ± 3.47	0.23 ± 0.03	0.66 ± 0.05	0.87 ± 0.06
TDI-HSA	$351.25 \pm 22.52^{***}$	$0.82 \pm 0.08^{***}$	$0.35 \pm 0.04^{***}$	$0.37 \pm 0.04^{***}$
Low-dose	$312.80 \pm 26.59^{##}$	$0.69 \pm 0.10^{##}$	$0.42 \pm 0.04^{##}$	$0.53 \pm 0.04^{###}$
High-dose	$242.15 \pm 13.60^{####\Delta\Delta\Delta}$	$0.55 \pm 0.05^{####\Delta\Delta\Delta}$	$0.62 \pm 0.05^{####\Delta\Delta\Delta}$	$0.76 \pm 0.05^{####\Delta\Delta\Delta}$

Dose and n refer to table 1; DRP1: Mitochondrial dynamic associated protein 1; OPA1: Optic atrophy protein 1; MFN2: Mitochondrial fusion protein 2; Compared with control group, $^{***} P < 0.001$; Compared with TDI-HSA group, $^{##} P < 0.01$, $^{###} P < 0.001$; Compared with low-dose group, $^{\Delta} P < 0.01$, $^{\Delta\Delta\Delta} P < 0.001$.

4 熊去氧胆酸对 TDI - HSA 介导的 BEAS - 2B 细胞自噬及 AMPK 通路的影响

由表 3 可见,TDI - HSA 组细胞自噬蛋白 LC3 II / LC3 I、Beclin1 及 p - AMPK 蛋白水平相比对照组均显著升高,p62 蛋白表达水平较对照组显著降低(均 $P < 0.001$);低剂量组、高剂量组细胞

LC3 II / LC3 I、Beclin1、p - AMPK 蛋白水平均较 TDI - HSA 组显著下降,p62 蛋白表达水平均较 TDI - HSA 组显著升高(均 $P < 0.01$);高剂量组 LC3 II / LC3 I、Beclin1、p - AMPK 蛋白水平较低剂量组均显著降低,p62 蛋白较低剂量组显著升高(均 $P < 0.01$)。

表 3 各组细胞自噬相关蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of autophagy related protein expression in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	LC3 II / LC3 I	p62	Beclin1	AMPK	p - AMPK
Control	0.35 ± 0.04	0.85 ± 0.06	0.23 ± 0.04	0.82 ± 0.06	0.20 ± 0.05
TDI - HSA	1.21 ± 0.01***	0.50 ± 0.08***	0.60 ± 0.07***	0.84 ± 0.03	0.49 ± 0.05***
Low - dose	0.93 ± 0.09###	0.63 ± 0.07##	0.44 ± 0.04###	0.85 ± 0.10	0.40 ± 0.03###
High - dose	0.66 ± 0.07###△△△	0.77 ± 0.05###△△△	0.37 ± 0.03###△△	0.85 ± 0.07	0.34 ± 0.04###△△

Dose and n refer to table 1;LC3:Microtubule associated protein 1light chain 3;p62;Sequestosome 1;Beclin1;Benzyl chloride 1;p - AMPK;Phosphorylation adenosine monophosphate activates protein kinase;Compared with control group,*** $P < 0.001$;Compared with TDI - HSA group,### $P < 0.01$,### $P < 0.001$;Compared with low - dose group,△△ $P < 0.01$;△△△ $P < 0.001$.

5 自噬诱导剂对熊去氧胆酸介导的自噬的影响

高剂量组和西罗莫司组的 LC3 II / LC3 I 蛋白相对表达水平分别为 0.69 ± 0.10 和 0.89 ± 0.08 ,p62 蛋白相对表达水平分别为 0.79 ± 0.05 和 0.45 ± 0.07 ,Beclin1 蛋白相对表达水平分别为 0.35 ± 0.04 和 0.69 ± 0.07 ,IL - 6 含量分别为 (17.63 ± 1.36) 和 (29.52 ± 3.49) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,IL - 8 含量分别为 (38.16 ± 3.15) 和 (57.52 ± 5.69) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,IL - 1 β

含量分别为 (14.54 ± 0.66) 和 (21.84 ± 1.74) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,IL - 18 含量分别为 (65.22 ± 5.30) 和 (95.58 ± 6.80) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。西罗莫司组与高剂量组比较,细胞 LC3 II / LC3 I、Beclin1 蛋白水平及 IL - 6、IL - 8、IL - 1 β 、IL - 18 水平均显著升高,p62 蛋白表达水平显著降低(均 $P < 0.05$),见图 1。

讨 论

气道上皮细胞是与外源性化学物质直接接触的靶细胞,气道上皮细胞被认为是哮喘炎症反应发生和发展的关键调控者^[10],当气道上皮细胞受到 TDI 刺激后,其氧化代谢过程被破坏,细胞的线粒体过度分裂会打破 ROS 产生和消除间的动态平衡,且过量的线粒体分裂会进一步加速 ROS 的释放,过量的 ROS 水平可激活炎症相关信号诱发炎症反应,研究表明 TDI 刺激后会破坏气道细胞线粒体功能,诱发氧化应激^[11]。本研究中观察到 TDI - HSA 可增加细胞中 ROS 水平并上调 DRP1 蛋白表达,而 OPA1、MFN2 表达受到抑制;其中 DRP1 是促进线粒体分裂的关键蛋白,OPA1、MFN2 作为调控线粒体动力学的重要蛋白主要参与调控线粒体融合、自噬^[12-13];本研究结果提示 TDI - HSA 可通过调节线粒体分裂与融合,破坏线粒体功能障碍,释放大量的 ROS 刺激炎症反应,这与前人的研究结果一致^[11],而熊去氧胆酸处理可抑制 BEAS - 2B 细胞中 ROS 水平及 DRP1 蛋白水平,并上调 OPA1、MFN2 表达,这说明熊去氧胆酸可通过调控

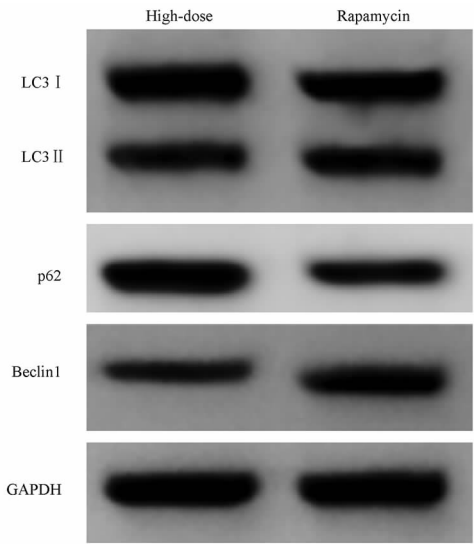


图 1 各组细胞自噬相关指标蛋白质印迹图

Figure 1 Western blot of autophagy related indexes in each group

Rapamycin group: $25 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ rapamycin; GAPDH: Glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase.

线粒体动力学平衡,清除过量 ROS,维持线粒体功能障碍,改善 TDI-HSA 刺激的炎症反应。

自噬是一种关键的自我降解过程,在此过程中,细胞质物质(例如受损的蛋白质和细胞器)在溶酶体中被运送和降解,可能对多种疾病的病因产生积极或消极影响,包括炎症性疾病、癌症等^[14]。有研究表明,自噬异常会诱发过度的免疫反应,导致炎症和组织损伤,自噬可能通过加剧功能障碍和气道重塑,使气道炎症疾病恶化,在某些病理条件下,相对过多的 ROS 积累可导致自噬被激活,而去除 ROS 可以减轻 TDI-HSA 诱导的气道上皮细胞炎症反应,降低自噬相关蛋白的表达^[15]。本研究发现,TDI-HSA 刺激后 BEAS-2B 细胞中自噬相关蛋白 LC3 II/LC3 I、Beclin1 及 p-AMPK 蛋白水平均明显上调,p62 表达降低,熊去氧胆酸可明显下调 TDI-HSA 诱导的 LC3 II/LC3 I、Beclin1 及 p-AMPK 蛋白的表达,并上调 p62 的表达,其中 AMPK 是调控细胞自噬的重要信号,其可通过激活自噬蛋白 Beclin1 启动自噬体的形成^[16]。本研究结果提示,熊去氧胆酸可能通过 AMPK 信号抑制 TDI-HSA 诱导的自噬,缓解炎症反应。此外,本研究还用自噬诱导药西罗莫司(可以诱导自噬并调节自噬体的生成)刺激 BEAS-2B 细胞,发现西罗莫司用后可显著恢复熊去氧胆酸与自噬和炎症反应的抑制作用。

本研究提示,熊去氧胆酸可降低 TDI 诱发的炎症和自噬的激活,这可能与介导 ROS/AMPK 信号相关,本研究为熊去氧胆酸在 TDI 相关哮喘的治疗中提供了参考思路。

参考文献:

- [1] TIOTIU A I,NOVAKOVA S,LABOR M,et al. Progress in occupational asthma[J]. *Int J Environ Res Public Health*,2020,17(12):4553.
- [2] THUY P X,BAO T D D,MOON E Y. Ursodeoxycholic acid ameliorates cell migration retarded by the SARS-CoV-2 spike protein in BEAS-2B human bronchial epithelial cells[J/OL]. *Biomed Pharmacother*,2022,150:113021. 2022-04-25 [2024-08-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35658221/>.
- [3] MROZ M S,HARVEY B J. Ursodeoxycholic acid inhibits ENaC and Na/K pump activity to restore airway surface liquid height in cystic fibrosis bronchial epithelial cells [J/OL]. *Steroids*,2019,151:108461. 2019-07-22 [2024-08-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31344409/>.
- [4] 张锦涛,董亮. 气道上皮及其源性细胞因子与哮喘:思考与展望[J]. *山东大学学报(医学版)*,2024,62(5):1-6.
- [5] 肖心儒. *LincRNA00612* 通过增强 p-STAT3 和 A2M 启动子之间的相互作用影响 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞的凋亡和炎症反应[D]. 辽宁 大连:大连医科大学,2023.
- [6] 陈昱君,张玉,于功昌,等. 甲苯二异氰酸酯诱导人支气管上皮细胞炎症反应及自噬[J]. *中国职业医学*,2019,46(1):1-7.
- [7] 陈桂美,毛娟. 茯苓酸对具核梭杆菌诱导的肠上皮细胞炎症反应的抑制作用及机制的研究[J]. *中国临床药理学杂志*,2024,40(4):544-548.
- [8] 李政. MEBO 对高糖培养的成纤维细胞增殖及自噬相关基因 LC3、Beclin-1、p62 的调控作用[D]. 广西 百色:右江民族医学院,2021.
- [9] 罗鸿. 增食欲素 A 通过 SIRT1/NLRP3/ROS 信号通路改善成骨细胞线粒体功能治疗 2 型糖尿病合并骨质疏松的机制研究[D]. 辽宁 沈阳:中国医科大学,2023.
- [10] 张妙芬,王婷,詹少锋,等. 射麻止喘液通过调控 NF- κ B/VEGFA 信号通路抑制气道上皮细胞 EMT 改善哮喘气道重塑的机制研究[J]. *中华中医药杂志*,2024,39(5):2569-2575.
- [11] 张晓霞,杨晓涵,董双燕,等. 线粒体分裂对甲苯二异氰酸酯诱导人支气管上皮细胞 NLRP3 炎性小体活化的影响[J]. *中国工业医学杂志*,2023,36(2):99-104,110.
- [12] 文富强,申永春. 基于线粒体动力学的慢性阻塞性肺疾病发病机制与保护策略[J]. *西南医科大学学报*,2022,45(5):369-372.
- [13] 高赛,余红春,贾洪峰. 右美托咪定通过调节线粒体分裂和耗氧量减轻细支气管炎小鼠肺损伤的机制[J]. *临床和实验医学杂志*,2022,21(2):113-117.
- [14] 秦鹏,冯玲,马元. 自噬与哮喘中气道平滑肌细胞表型转化关系的研究进展[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2024,44(3):435-439.
- [15] MENG X,GUO S,ZHANG X,et al. HMGB1 inhibition reduces TDI-induced occupational asthma through ROS/AMPK/autophagy pathway [J/OL]. *Ecotoxicol Environ Saf*,2023,266:115575. 2023-11-01 [2024-08-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37839183/>.
- [16] 雷佳慧,祝贺,肖亚丽,等. AMPK 在支气管哮喘中的作用及其研究进展[J]. *中国呼吸与危重监护杂志*,2022,21(12):893-898.

(收稿日期 2024-10-24)