

论著·基础研究

内质网应激通路需肌醇酶 1 α /X 盒结合蛋白 1 在中性粒细胞弹力蛋白酶诱导的气道黏液分泌中的作用李 琪¹, 周向东¹, 曾 曼¹, Victor P. KOLOSOV², Juliy M. PERELMAN²

1. 海南医学院第一附属医院呼吸内科, 海口 570102; 2. 俄罗斯医学科学院远东呼吸生理与病理研究中心, 布拉戈维申斯克 675000

[摘要] **目的**·探讨内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 反应在中性粒细胞弹力蛋白酶 (neutrophil elastase, NE) 诱导人气道上皮细胞黏蛋白 5AC (mucin 5AC, MUC5AC) 分泌中的作用及机制。**方法**·培养人气道上皮细胞 HBE16, 分别给予活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 抑制剂 N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC)、ERS 抑制剂 4-苯基丁酸 (4-phenylbutyrate, 4-PBA) 预处理, 或分别转染需肌醇酶 1 α (inositol-requiring kinase 1 α , IRE-1 α) 小干扰 RNA (siRNA)、X 盒结合蛋白 1 (X-box binding protein 1, XBP-1) siRNA, 再予以 NE 刺激; 同时设单纯 NE 组和空白对照组。试剂盒检测 ROS 的生成水平; Western blotting 检测干预后 ERS 相关信号分子葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78)、磷酸化蛋白激酶 R 样内质网激酶 (phosphorylated protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, pPERK)、活化转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6)、磷酸化 IRE-1 α (pIRE-1 α) 及 XBP-1 蛋白表达量的变化; 实时荧光定量 PCR 检测剪切的 XBP-1 (*XBP-Is*) mRNA 水平; ELISA 和免疫荧光检测 MUC5AC 在各组细胞中的蛋白表达情况。**结果**·与空白对照组相比, NE 刺激 24 h 后细胞 ROS 含量增加, GRP78、ATF6、pPERK 及 pIRE-1 α 蛋白水平均显著升高 (均 $P < 0.05$), *XBP-Is* mRNA 及蛋白表达也明显增加 (均 $P < 0.05$), 同时 MUC5AC 蛋白表达增加 (均 $P < 0.05$); NAC 及 4-PBA 预处理后均使上述 ERS 相关蛋白表达较单纯 NE 组降低 (均 $P < 0.05$), MUC5AC 蛋白水平降低 (均 $P < 0.05$); 转染 IRE-1 α siRNA 或 *XBP-1* siRNA, 细胞中 MUC5AC 蛋白表达也较单纯 NE 组明显降低, 同时 *XBP-Is* mRNA 及蛋白表达也有明显下降 (均 $P < 0.05$)。**结论**·NE 通过产生 ROS 引起 ERS 反应, 诱导 MUC5AC 蛋白表达及分泌增加, ERS 通路 IRE-1 α /XBP-1 在其中发挥着一定的作用。

[关键词] 内质网应激; 需肌醇酶 1 α ; X 盒结合蛋白 1; 中性粒细胞弹力蛋白酶; 活性氧; 黏蛋白 5AC

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.01.005 **[中图分类号]** R562.2 **[文献标志码]** A

Role of inositol-requiring kinase 1 α /X-box binding protein 1 in airway mucus secretion induced by neutrophil elastaseLI Qi¹, ZHOU Xiang-dong¹, ZENG Man¹, Victor P. KOLOSOV², Juliy M. PERELMAN²

1. Division of Respiratory Medicine, First Affiliated Hospital, Hainan Medical College, Haikou 570102, China; 2. Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Blagoveshchensk 675000, Russia

[Abstract] **Objective**·To explore the effect of endoplasmic reticulum stress (ERS) on neutrophil elastase (NE) induced mucin 5AC (MUC5AC) production in human airway epithelial cells. **Methods**·HBE16 airway epithelial cells were cultured and pretreated with reactive oxygen species (ROS) inhibitor N-acetylcysteine (NAC) or ERS inhibitor 4-phenylbutyrate (4-PBA), or transfected with small interfering RNA (siRNA) against inositol-requiring kinase 1 α (IRE-1 α) or X-box binding protein 1 (XBP-1), respectively before incubation with NE. NE group and blank control group were also set up. ROS production was assayed by detection kit; expression of glucose-regulated protein 78 (GRP78), phosphorylated protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (pPERK), activating transcription factor 6 (ATF6), phosphorylated IRE-1 α (pIRE-1 α), and XBP-1 protein was detected by Western blotting; spliced XBP-1 (*XBP-Is*) mRNA was measured by real-time PCR; levels of MUC5AC protein in culture supernatant and cytoplasm were assayed by ELISA and immunofluorescence. **Results**·There was an obvious increase of ROS production with strong elevation of GRP78, ATF6, pPERK, and pIRE-1 α protein in NE group cells after 24 h, compared with blank control group ($P < 0.05$). The protein and mRNA of XBP-1s, and MUC5AC production also increased obviously ($P < 0.05$). NAC and 4-PBA reduced ERS-related protein expression and MUC5AC production and secretion ($P < 0.05$). Further studies showed that MUC5AC secretion was also blunted by IRE-1 α siRNA or *XBP-1* siRNA, accompanied with decreased expression of *XBP-Is* mRNA and protein ($P < 0.05$). **Conclusion**·NE induces ERS by producing ROS, and increases MUC5AC protein production and secretion; IRE-1 α /XBP-1 play a certain role in this process.

[Key words] endoplasmic reticulum stress (ERS); inositol-requiring kinase 1 α (IRE-1 α); X-box binding protein 1 (XBP-1); neutrophil elastase (NE); reactive oxygen species (ROS); mucin 5AC (MUC5AC)

[基金项目] 国家自然科学基金地区科学基金项目 (31660329, 81660010, 81860001); 国家自然科学基金中俄合作项目 (81811530063, 81811530115); 海南省自然科学基金 (817322); 海南省科协青年科技英才创新计划项目 (QCXM201702) (Regional Scientific Project of National Natural Science Foundation of China, 31660329, 81660010, 81860001; NSFC-RFBR Cooperation Project, 81811530063, 81811530115; Natural Science Foundation of Hainan Province, 817322; Innovation Project of Hainan Science and Technology Association for Talent Youth, QCXM201702)。

[作者简介] 李 琪 (1982—), 女, 副主任医师, 博士; 电子信箱: lqlq198210@sina.com。

[通信作者] 周向东, 电子信箱: zxd999@263.net。

人气道黏液中最主要的分泌型黏蛋白成分为黏蛋白 5AC (mucin 5AC, MUC5AC), 对呼吸道起着重要的润滑和保湿作用; 但在慢性气道炎症性疾病尤其是急性加重期时, 气道黏液分泌行为有别于疾病缓解期或稳定期, 常常以“速发相”模式分泌大量酸化、黏稠的黏液^[1-2]。受促黏液分泌因素刺激后, 气道杯状细胞内 *MUC5AC* 基因转录及蛋白合成会急剧增加, 细胞质短时间内出现大量需进一步折叠修饰的 MUC5AC 雏形肽。目前对 *MUC5AC* 基因转录及蛋白合成的分子机制已有大量研究报道^[3-4], 但杯状细胞内质网是怎样提高承载能力并在短时间内顺利完成对大量 MUC5AC 雏形肽复杂的加工, 目前尚不明确。

黏蛋白过度生成需要增加蛋白质折叠和上调分泌能力, 这都可以由内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 引起的未折叠蛋白反应调节^[5]。ERS 是细胞内质网对适度负性刺激的一种“代偿性扩容”机制, 使得内质网处理靶蛋白的能力提升。但促使 MUC5AC 分泌增加的刺激因素能否引起 ERS, ERS 信号分子对 MUC5AC 蛋白合成的影响如何, 目前相关报道仍较少。研究^[5-6]显示白细胞介素 13 (IL-13)、过敏原能通过 ERS 诱导 MUC5AC 生成, 但未涉及具体分子。有报道^[7-8]称, ERS 通路需肌醇酶 1 α (inositol-requiring kinase 1, IRE-1 α) 参与正常分泌性蛋白代谢及炎症因子生成。本研究选择中性粒细胞弹力蛋白酶 (neutrophil elastase, NE) 这一重要的 MUC5AC 促动剂作为诱导因素, 探讨 ERS 在 NE 诱导 MUC5AC 生成中的作用, 以期进一步认识气道黏液高分泌的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

人支气管上皮样细胞株 HBE16 (美国 ATCC 细胞库), *IRE-1 α* 小干扰 RNA (siRNA)、X 盒结合蛋白 1 (X-box binding protein 1, *XBP-1*) siRNA、对照 siRNA、鼠抗人 β -肌动蛋白 (β -actin) 单克隆抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG、HRP 标记的羊抗鼠 IgG (美国 Santa Cruz 公司), 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒、兔抗人磷酸化蛋白激酶 R 样内质网激酶 (phosphorylated protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, pPERK) (Thr980) 单克隆抗体、噻唑蓝 (MTT) 检测试剂盒 (北京碧云天生物技术公司), 兔抗人葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78) 多克隆抗体 (ab230508)、兔抗人蛋白激酶 R 样内质网激酶 (PERK) 多克隆抗体 (ab77654)、兔抗人活化转录

因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6) 多克隆抗体 (ab37149)、兔抗人 IRE-1 α 多克隆抗体 (ab37073)、兔抗人磷酸化 IRE-1 α (pIRE-1 α) (Ser724) 多克隆抗体 (ab48187)、兔抗人 XBP-1 多克隆抗体 (ab37152) [该抗体可同时识别剪切的 XBP-1 (spliced XBP-1, XBP-1s) 和未剪切的 XBP-1 (unspliced XBP-1, XBP-1u) 蛋白] (英国 Abcam 公司), 人 MUC5AC ELISA 试剂盒 (美国 R&D 公司), 小鼠抗人 MUC5AC 单克隆抗体 (美国 Neomarkers 公司), NE、ERS 抑制剂 4-苯基丁酸 (4-phenylbutyrate, 4-PBA)、ROS 抑制剂 N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC) (美国 Sigma-Aldrich 公司), X-tremeGENE siRNA 转染试剂 (瑞士 Roche 公司)。自动酶标仪 F039300 (奥地利 TECAN 公司), 激光共聚焦显微镜平台 (德国 Leica 公司), 荧光酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司)。

1.2 MTT 比色法检测细胞增殖活力

参照文献 [9] 行 MTT 比色法以选取合适的 NE 浓度。96 孔板中每孔加入 200 μ L 细胞悬液 (1×10^4 /mL), 分别用 25、50、100、200 ng/mL NE 处理细胞, 每个处理组 6 个复孔, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度培养箱孵育, 分别于 8、12、24、36、48 h 行 MTT 检测。吸除各孔培养液, 加入无血清的 RPMI 1640 培养液 (200 μ L/孔) 及 MTT 溶液 (20 μ L/孔), 放入培养箱继续培养 4 h。吸除各孔培养液, 加入二甲基亚砜 (150 μ L/孔), 室温下微量振荡器上振荡 15 min, 在自动酶标仪上以 570 nm 波长测定各孔吸光度值 [$D(570 \text{ nm})$]。

1.3 细胞的处理及分组

HBE16 细胞以 RPMI 1640 培养液常规培养, 分组如下。①空白对照组: 细胞正常培养, 不予任何处理。②单纯 NE 组: 细胞予以 100 ng/mL NE 处理。③ NE+4-PBA 组: 在加入 NE 前 30 min 加入 10 mmol/L 4-PBA^[10]。④ NE+NAC 组: 在加入 NE 前 30 min 加入 3 mmol/L NAC^[11]。⑤ NE+对照 siRNA 组: 细胞转染对照 siRNA 后加入 NE。⑥ NE+*IRE-1 α* siRNA 组: 细胞转染 *IRE-1 α* siRNA 后加入 NE。⑦ NE+*XBP-1* siRNA 组: 细胞转染 *XBP-1* siRNA 后加入 NE。继续孵育 24 h 后行相关检测。

1.4 ROS 的检测

细胞予以不同浓度的 NE 刺激 (25、50、100 ng/mL) 24 h, 采用 ROS 试剂盒测定, 按操作说明进行。收集细胞, 悬浮于无血清培养液稀释的 DCFH-DA 荧光探针溶

液 (1:1 000 稀释, 终浓度 10 μ mol/L), 调整细胞浓度至 5×10^5 /mL, 经细胞培养箱孵育 20 min, 充分混匀, 无血清培养液洗涤细胞 3 次, 酶标仪检测。

1.5 细胞转染

细胞接种至 24 孔板 (细胞密度 1.5×10^5 /mL), 每孔加入 0.45 mL 无血清 RPMI 1640 培养液。5 μ L siRNA 转染试剂加入 45 μ L 无血清培养液中混匀, 1 μ g 的 IRE-1 α siRNA、XBP-1 siRNA 或阴性对照 siRNA 分别加入 50 μ L 无血清培养液中稀释混匀。将这 2 种溶液混合均匀后室温孵育 20 min, 逐滴加入各孔细胞中, 轻柔振荡混匀, 孵育 16 h 后吸弃上清, PBS 轻柔洗涤细胞 3 次, 换用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液继续培养以待后续操作。

1.6 ELISA 检测 MUC5AC 蛋白含量

分别收集细胞培养上清液和细胞, 裂解细胞后提取细胞总蛋白, 测定并调整蛋白浓度备用。采用人 MUC5AC ELISA 试剂盒分别测定细胞培养上清液和细胞总蛋白中 MUC5AC 的含量, 加入待检样品、标准品于酶标包被板, 按说明书操作进行, 终止反应后测 $D(450 \text{ nm})$ 值, 与标准品比较得到 MUC5AC 的相对含量。

1.7 Western blotting 检测各蛋白含量

以含苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 的细胞裂解液冰上裂解细胞, 提取细胞总蛋白, 测定并调整蛋白浓度备用。样品经 5% ~ 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 250 mA 电转 1 h 至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 于 PBS (含 0.05% 吐温-20 和 5% 脱脂牛乳) 中封闭 1 h 后, 分别加入兔抗人 GRP78、pPERK、PERK、ATF6、pIRE-1 α 、IRE-1 α 、XBP-1 多克隆抗体, 鼠抗人 β -actin 单克隆抗体 (均为 1:500 稀释) 室温孵育 2 h, 洗膜后分别加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 或羊抗鼠 IgG (1:1 000 稀释), 室温下不断摇动孵育 2 h。彻底洗涤后经增强化学发光法 (ECL) 显色, BioRad 图像采集仪成像, 以 Quantity one 软件进行灰度值分析, 将各组目的蛋白与内参 β -actin 的比值作为目的蛋白的相对含量。

1.8 实时荧光定量 PCR 检测 XBP-1s mRNA

采用 TRIzol 法分别提取各组细胞内的总 RNA, 初步定量后保存于 -20°C 备用。随后以两步法行实时荧光定量 PCR。反转录按试剂盒说明书操作。甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (*GAPDH*) 上、下游引物序列分别为 5'-GGGAAGGTGAAGGTGGGAGTG-3' 和 5'-AGCAGAGG-

GGGCAGAGATGAT-3'。参照文献 [12] 合成 XBP-1s 的引物, 上、下游引物序列分别为 5'-GGAGTTAAGACA-GCGCTTGG-3' 和 5'-GTCAATACCGCCAGAATCC-3'。反应条件: 95°C 预变性 10 min; 95°C 35 s, 56°C 55 s, 72°C 30 s, 共 40 个循环; 72°C 延伸 3 min。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法分析目的基因 mRNA 相对表达量。

1.9 免疫荧光检测细胞 MUC5AC 蛋白表达

贴壁生长良好的 HBE16 细胞经消化后, 制成细胞悬液, 调整细胞密度至 1×10^5 /mL, 接种于铺有 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 细胞爬片的 24 孔板中, 按前述分组处理及培养。取出已有细胞贴壁的爬片用 PBS 洗涤 3 次, 4% 多聚甲醛室温固定 30 min; 再用 PBS 洗涤 3 次, 以 0.1% Triton X-100 通透 15 min; PBS 洗涤 3 次, 以山羊血清封闭液封闭 45 min, 加入小鼠抗人 MUC5AC 单克隆抗体 150 μ L (1:200 稀释) 并 4°C 孵育过夜。次日 PBS 洗片 3 次, 加入羊抗鼠异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 荧光二抗 (1:200 稀释), 避光孵育 1 h。洗片 3 次, 加入 5% 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染核 5 min, 经 PBS 洗片 5 次, 50% 甘油封片。激光共聚焦显微镜下观察, 以 Image Pro Plus 软件分析细胞相对荧光强度。

1.10 统计学方法

应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 根据数据正态性及方差齐性与否分别采用参数检验和非参数检验, 符合正态分布及方差齐性的资料采用单因素方差分析, 组间多重比较行 SNK- q 检验; 不符合条件的资料采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

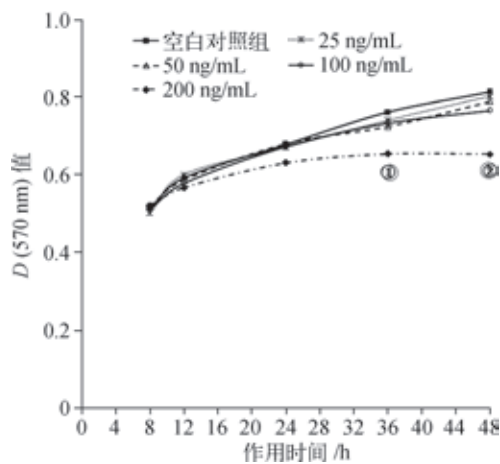
2.1 细胞增殖活力检测

25 ng/mL ~ 100 ng/mL NE 组在 8 ~ 48 h 的时间范围与空白对照组相比, $D(570 \text{ nm})$ 值差异无统计学意义, 表明此时间和浓度范围内的 NE 对细胞增殖活力没有明显影响。200 ng/mL NE 组在 36 h 和 48 h 的 $D(570 \text{ nm})$ 值与空白对照组相比显著降低 (均 $P < 0.05$) (图 1), 故将 100 ng/mL 作为本实验适宜的 NE 刺激浓度。

2.2 NE 诱导细胞 ROS 生成增加

ROS 检测结果显示: NE 刺激后细胞 ROS 生成增加, 且随 NE 浓度增加, ROS 含量逐渐增多。与空白对照组相比, 100 ng/mL NE 组升高最为显著 ($P = 0.000$) (图 2)。

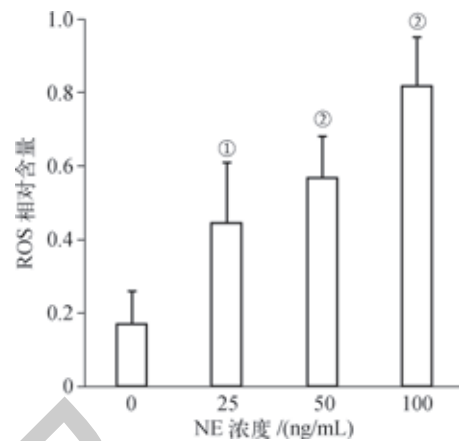




注: ^① $P=0.031$, ^② $P=0.025$, 与相应时间点的空白对照组比较。

图1 不同浓度 NE 对细胞增殖活力的影响

Fig 1 Effect of NE at different concentrations on cell proliferation



注: ^① $P=0.005$, ^② $P=0.000$, 与空白对照组 (0 ng/mL) 比较。

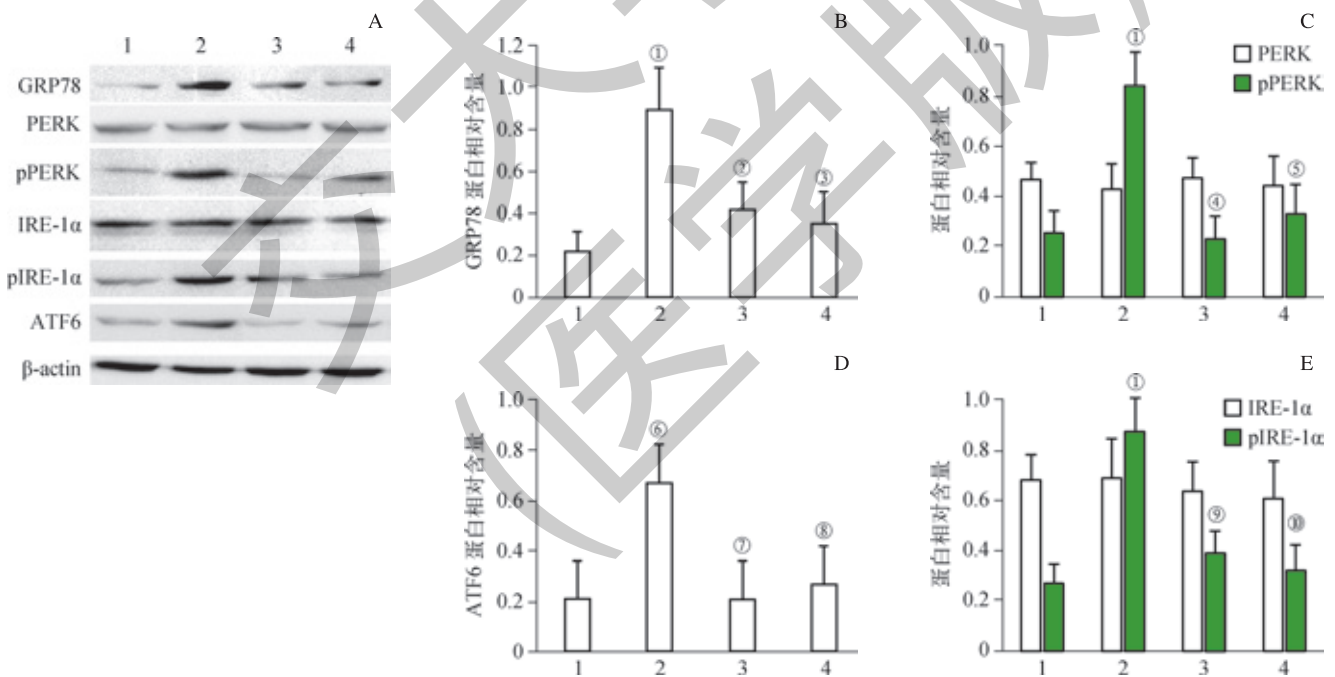
图2 不同浓度 NE 对细胞 ROS 生成的影响

Fig 2 Effect of NE at different concentrations on ROS production

2.3 NE 通过 ROS 诱导细胞 ERS 相关蛋白表达增加

Western blotting 结果显示: 100 ng/mL NE 刺激细胞 24 h 后, GRP78 蛋白合成增加, pPERK、pIRE-1 α 、ATF6 蛋白含量较空白对照组均显著增加 (均 $P<0.05$)。ROS 抑制剂

NAC 预处理细胞后, GRP78、pPERK、pIRE-1 α 、ATF6 蛋白表达较单纯 NE 组均明显减少 (均 $P<0.05$) (图 3)。说明 NE 通过 ROS 的生成诱导了细胞 ERS 反应。予以 4-PBA 处理的细胞组中, 显示出与 NAC 组相似的结果。



注: A. 蛋白条带; B. GRP78 蛋白相对含量; C. PERK、pPERK 蛋白相对含量; D. ATF6 蛋白相对含量; E. IRE-1 α 、pIRE-1 α 蛋白相对含量。1 为空白对照组, 2 为单纯 NE 组, 3 为 NE+NAC 组, 4 为 NE+4-PBA 组。① $P=0.000$, ② $P=0.002$, 与空白对照组比较; ③ $P=0.009$, ④ $P=0.006$, ⑤ $P=0.000$, ⑥ $P=0.007$, ⑦ $P=0.002$, ⑧ $P=0.004$, ⑨ $P=0.007$, ⑩ $P=0.005$, 与单纯 NE 组比较。

图3 各组 ERS 相关蛋白分子的表达情况

Fig 3 Expression of ERS-related proteins in each group

2.4 NE 诱导 XBP-1s 蛋白及 mRNA 表达增加

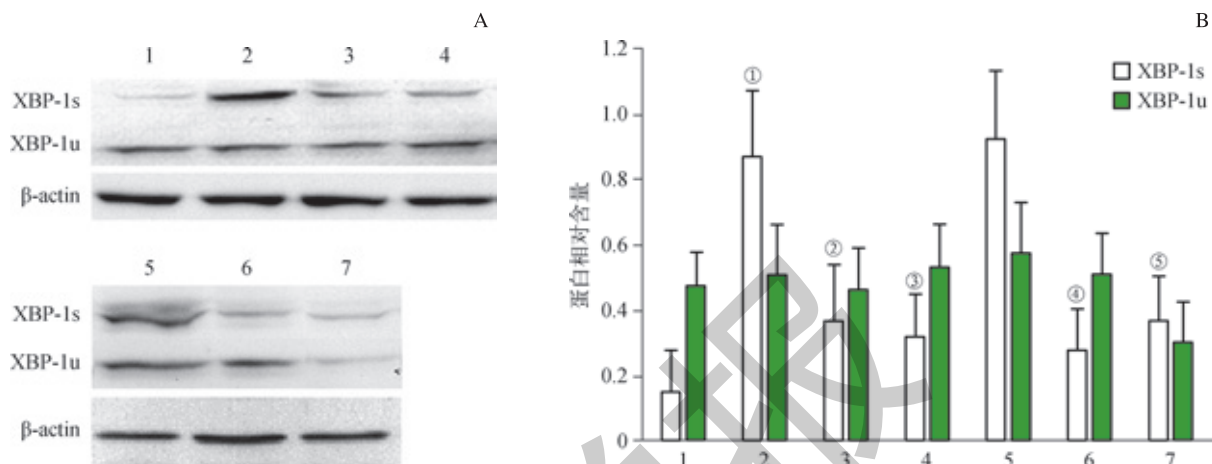
Western blotting 结果显示: 与空白对照组相比, NE 刺激后细胞中 XBP-1s 蛋白水平显著增加 ($P=0.000$);

NAC、4-PBA 预处理组中, XBP-1s 蛋白水平较单纯 NE 组明显降低 (均 $P<0.05$); NE+IRE-1 α siRNA 组、NE+XBP-1 siRNA 组的 XBP-1s 蛋白水平也较单纯 NE 组

显著降低 (均 $P<0.05$) (图 4)。

PCR 结果显示: 与空白对照组相比, 单纯 NE 组细胞中 *XPB-1s* mRNA 水平显著增加 ($P=0.000$); NAC、

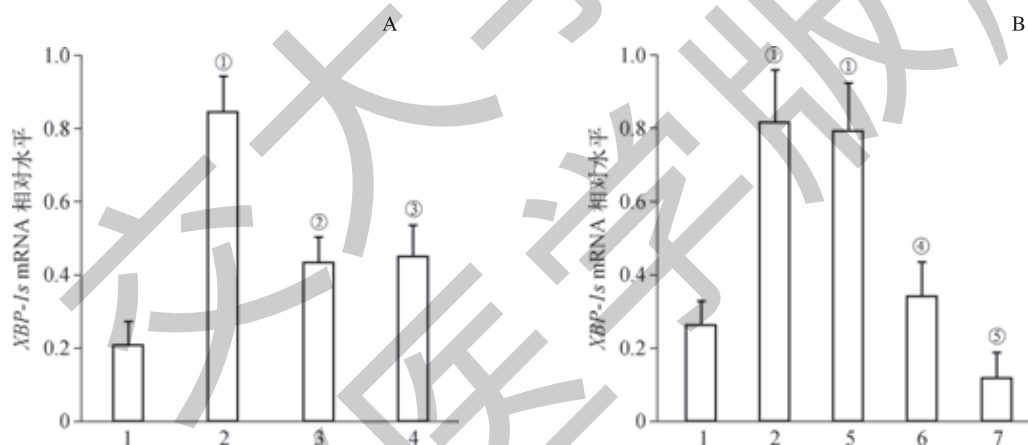
4-PBA 预处理组及 NE+*IRE-1α* siRNA 组、NE+*XPB-1* siRNA 组的 *XPB-1s* mRNA 水平均较单纯 NE 组明显降低 (均 $P<0.05$) (图 5)。



注: A. 蛋白条带; B. *XPB-1s*、*XPB-1u* 蛋白相对表达水平。1 为空白对照组, 2 为单纯 NE 组, 3 为 NE+NAC 组, 4 为 NE+4-PBA 组, 5 为 NE+ 对照 siRNA 组, 6 为 NE+*IRE-1α* siRNA 组, 7 为 NE+*XPB-1* siRNA 组。^① $P=0.000$, 与空白对照组比较; ^② $P=0.009$, ^③ $P=0.006$, ^④ $P=0.000$, ^⑤ $P=0.007$, 与单纯 NE 组比较。

图 4 不同干预因素对 *XPB-1* 蛋白表达的影响

Fig 4 Expression of *XPB-1* protein in different treated groups



注: A. NAC、4-PBA 干预后 *XPB-1s* mRNA 相对表达水平; B. siRNA 转染后 *XPB-1s* mRNA 相对表达水平。1 为空白对照组, 2 为单纯 NE 组, 3 为 NE+NAC 组, 4 为 NE+4-PBA 组, 5 为 NE+ 对照 siRNA 组, 6 为 NE+*IRE-1α* siRNA 组, 7 为 NE+*XPB-1* siRNA 组。^① $P=0.000$, 与空白对照组比较; ^② $P=0.011$, ^③ $P=0.014$, ^④ $P=0.006$, ^⑤ $P=0.000$, 与单纯 NE 组比较。

图 5 不同干预因素对 *XPB-1s* mRNA 表达的影响

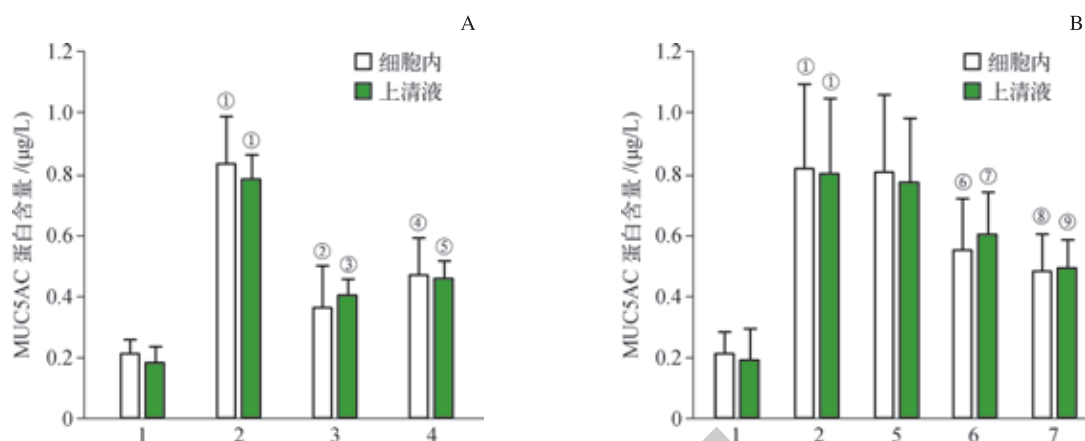
Fig 5 Expression of *XPB-1s* mRNA in different treated groups

2.5 *IRE-1α*/*XPB-1* 参与 NE 诱导的 MUC5AC 分泌

ELISA 结果显示: 单纯 NE 组细胞及培养上清液中的 MUC5AC 蛋白均较空白对照组显著增加; 而经 NAC 或 4-PBA 预处理后, 细胞及培养上清液中的 MUC5AC 蛋白均较单纯 NE 组显著减少 (均 $P<0.05$), 表明 ERS 参与了 NE 诱导的 MUC5AC 分泌。进一步试验结果显示, 细胞分别转染 *IRE-1α* siRNA 或 *XPB-1* siRNA 后, 细胞及培养

上清液中的 MUC5AC 蛋白水平均较单纯 NE 组明显降低 (均 $P<0.05$) (图 6)。

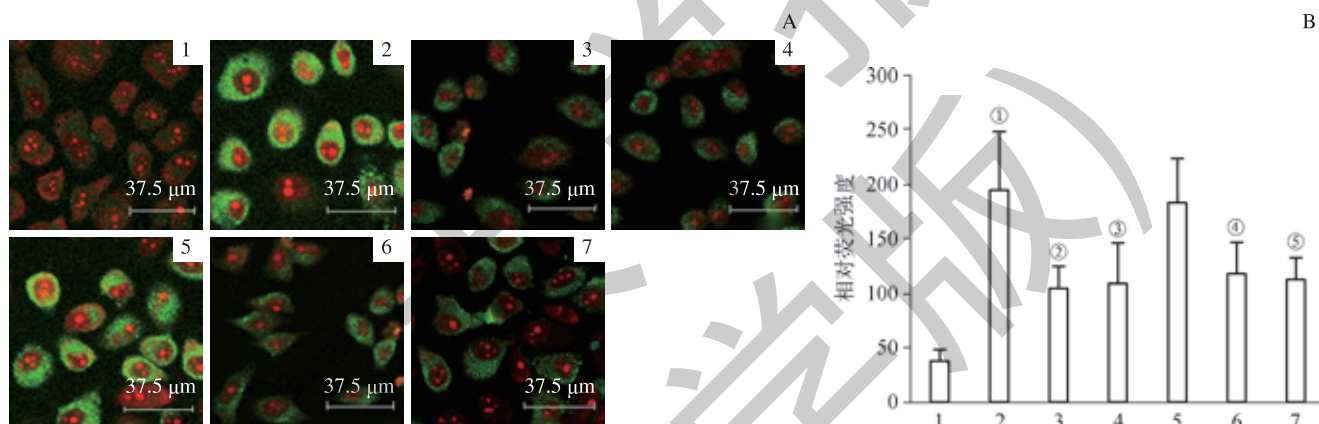
细胞免疫荧光结果显示: NE+NAC 组、NE+4-PBA 组、NE+*IRE-1α* siRNA 组、NE+*XPB-1* siRNA 组中的 MUC5AC 荧光强度均较单纯 NE 组降低 (均 $P<0.05$), 表明 ERS 信号因子 *IRE-1α*、*XPB-1* 参与了 NE 诱导的 MUC5AC 分泌 (图 7)。



注: A. NAC、4-PBA 干预后的 MUC5AC 蛋白含量; B. siRNA 转染后的 MUC5AC 蛋白含量。1 为空白对照组, 2 为单纯 NE 组, 3 为 NE+NAC 组, 4 为 NE+4-PBA 组, 5 为 NE+ 对照 siRNA 组, 6 为 NE+IRE-1 α siRNA 组, 7 为 NE+XBP-1 siRNA 组。^① $P=0.000$, 与空白对照组比较; ^② $P=0.006$, ^③ $P=0.008$, ^④ $P=0.012$, ^⑤ $P=0.010$, ^⑥ $P=0.022$, ^⑦ $P=0.025$, ^⑧ $P=0.011$, ^⑨ $P=0.015$, 与单纯 NE 组比较。

图 6 不同干预因素对 MUC5AC 蛋白含量的影响

Fig 6 MUC5AC protein in different treated groups



注: A. 激光共聚焦显微镜下的各组细胞; B. 各组细胞 MUC5AC 蛋白相对荧光强度。1 为空白对照组, 2 为单纯 NE 组, 3 为 NE+NAC 组, 4 为 NE+4-PBA 组, 5 为 NE+ 对照 siRNA 组, 6 为 NE+IRE-1 α siRNA 组, 7 为 NE+XBP-1 siRNA 组。^① $P=0.000$, 与空白对照组比较; ^② $P=0.002$, ^③ $P=0.006$, ^④ $P=0.007$, ^⑤ $P=0.004$, 与单纯 NE 组比较。绿色荧光示 MUC5AC 蛋白, 红色荧光示细胞核。

图 7 各组 MUC5AC 蛋白的免疫荧光表达情况

Fig 7 Detection of MUC5AC protein by immunofluorescence in different treated groups

3 讨论

气道黏液高分泌现象是呼吸系统慢性炎症性疾病的主要病理特征, 目前公认中性粒细胞炎症反应所释放的 NE 是导致气道黏液高分泌的最重要因素^[13]。NE 在诱导 MUC5AC 基因转录及蛋白合成方面已有大量研究报道, 其能通过蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 等多种信号途径诱导 MUC5AC 基因转录增强、蛋白生成增多^[14]。本研究从 ERS 角度出发, 进一步探讨慢性炎症刺激形成的 ERS 在促气道上皮细胞黏液“速发相”分泌状态的分子机制, 以期对气道黏液高分泌的发生机制作一

定的补充, 同时也可能为其防治提供有效的干预靶点。

ERS 是气道上皮细胞面对外界刺激时的重要反应, 可诱导炎症反应及多种疾病发生^[15-16]。低氧、氧化应激、感染、香烟烟雾^[17]、高血糖^[18]等均可导致内质网内未折叠蛋白或错误的折叠蛋白聚积, 出现 ERS; 细胞为了适应应激, 从而激活未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR), 以维持内质网稳态^[19]。ERS 引发的 UPR 主要涉及 3 个跨膜蛋白及其信号通路, 分别为 PERK、IRE-1 和 ATF6。在正常状态下, PERK、IRE-1 和 ATF6 与 GRP78 结合; 当 ERS 发生时, GRP78 从 PERK、IRE-1、ATF6 上解离, 激活 UPR。PERK 发生自身磷酸化, 同时激活翻译起始因子 -2 α 亚基, 活化的 IRE-1 α 能在 XBP-1 mRNA 的 2 个位点对其进行剪切, 产生一种功能性 XBP-1 转录因子, 即 XBP-1s, 从而激活下游效应因子^[20-21]。

ROS 是诱发 ERS 的重要因素之一^[22]。本实验中 NE 刺激后检测到 ROS 含量、GRR78 蛋白水平显著增加, pPERK、pIRE-1 α 、ATF6 及 XBP-1s 蛋白水平显著增加, 说明 NE 刺激后细胞发生了 ERS, 而予以 ROS 抑制剂 NAC 处理后能抑制 ERS 相关蛋白的生成及活化, 表明 NE 可能是通过 ROS 诱导了 ERS。既往研究^[7]显示, IRE-1 α 通路参与正常分泌性蛋白代谢; Park 等^[23]报道在正常人正常肺上皮细胞 BEAS-2B 中, 山柰酚能通过 IRE-1 α 、JNK 抑制卵清蛋白诱导的气道黏液高分泌。故我们推测 IRE-1 α 及 XBP-1 可能也参与了 MUC5CA 的合成分泌。本实验采用 RNA 干扰技术沉默细胞中 *IRE-1 α* 及 *XBP-1* 的表达, 结果显示抑制 *IRE-1 α* 及 *XBP-1* 的表达均能使 *XBP-1s* mRNA 及蛋白合成水平降低, MUC5AC 蛋白生成及分泌减少。而有报道^[5]在杯状细胞 Calu3 及小鼠气道上皮中, 另一亚型

IRE-1 β 能 not 通过 ERS 而直接诱导气道黏液分泌, 这也与后续 *XBP-1* mRNA 的剪切活化有关; 实验中我们也检测到 IRE-1 α 依赖的 *XBP-1* mRNA 剪切参与了 MUC5AC 的分泌, 表明 XBP-1 在 IRE 通路中可能起着至关重要的作用。

本实验研究发现 ERS 抑制剂 4-PBA 使 MUC5AC 生成明显降低, *IRE-1 α* siRNA 也能减少 MUC5AC 生成但未完全抑制其生成, 意味着其他内质网信号分子也可能起着一定促黏液分泌作用。而据报道^[24]ERS 的 UPR 3 条信号通路可能存在交互作用, 如 ATF6 能诱导 *XBP-1* mRNA 转录增强, PERK 能使 ATF6 表达增加。在对 MUC5AC 高表达的健康非吸烟人群的研究中发现, *XBP-1* 可能是参与黏液分泌的 ERS 相关基因之一^[25]。故我们推测 PERK、ATF6 可能也参与了 MUC5AC 分泌, 但是否也与 XBP-1 转录和剪切有关, 后续研究将对此做进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Bonser LR, Erle DJ. Airway mucus and asthma: the role of MUC5AC and MUC5B[J]. J Clin Med, 2017, 6(12). DOI: 10.3390/jcm6120112.
- [2] Thornton DJ, Rousseau K, McGuckin MA. Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus[J]. Annu Rev Physiol, 2008, 70: 459-486.
- [3] Bae CH, Na HG, Choi YS, et al. Clusterin induces MUC5AC expression via activation of NF- κ B in human airway epithelial cells[J]. Clin Exp Otorhinolaryngol, 2018, 11(2): 124-132.
- [4] Song KS, Yoon JH, Kim KS, et al. c-Ets1 inhibits the interaction of NF- κ B and CREB, and downregulates IL-1 β -induced MUC5AC overproduction during airway inflammation[J]. Mucosal Immunol, 2012, 5(2): 207-215.
- [5] Martino MB, Jones L, Brighton B, et al. The ER stress transducer IRE1 β is required for airway epithelial mucin production[J]. Mucosal Immunol, 2013, 6(3): 639-654.
- [6] Wang X, Yang XQ, Li Y, et al. Lyn kinase represses mucus hypersecretion by regulating IL-13-induced endoplasmic reticulum stress in asthma[J]. EBioMedicine, 2017, 15: 137-149.
- [7] Safra M, Ben-Hamo S, Kenyon C, et al. The IRE-1 ER stress-response pathway is required for normal secretory-protein metabolism in *C. elegans*[J]. J Cell Sci, 2013, 126(Pt 18): 4136-4146.
- [8] Kim S, Joe Y, Kim HJ, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced IRE1 α activation mediates cross-talk of GSK-3 β and XBP-1 to regulate inflammatory cytokine production[J]. J Immunol, 2015, 194(9): 4498-4506.
- [9] Deo SH, Jenkins NT, Padilla J, et al. Norepinephrine increases NADPH oxidase-derived superoxide in human peripheral blood mononuclear cells via α -adrenergic receptors[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2013, 305(10): R1124-R1132.
- [10] Basseri S, Lhoták S, Sharma AM, et al. The chemical chaperone 4-phenylbutyrate inhibits adipogenesis by modulating the unfolded protein response[J]. J Lipid Res, 2009, 50(12): 2486-2501.
- [11] Halasi M, Wang M, Chavan TS, et al. ROS inhibitor N-acetyl-L-cysteine antagonizes the activity of proteasome inhibitors[J]. Biochem J, 2013, 454(2): 201-208.
- [12] Ling SC, Lau EK, Al-Shabeeb A, et al. Response of myeloma to the proteasome inhibitor bortezomib is correlated with the unfolded protein response regulator XBP-1[J]. Haematologica, 2012, 97(1): 64-72.
- [13] Shao MX, Nadel JA. Neutrophil elastase induces MUC5AC mucin production in human airway epithelial cells via a cascade involving protein kinase C, reactive oxygen species, and TNF- α -converting enzyme[J]. J Immunol, 2005, 175(6): 4009-4016.
- [14] Park JA, Sharif AS, Shiomi T, et al. Human neutrophil elastase-mediated goblet cell metaplasia is attenuated in TACE-deficient mice[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013, 304(10): L701-L707.
- [15] Cao SS, Luo KL, Shi L. Endoplasmic reticulum stress interacts with inflammation in human diseases[J]. J Cell Physiol, 2016, 231(2): 288-294.
- [16] Mijošek V, Lasitschka F, Warth A, et al. Endoplasmic reticulum stress is a danger signal promoting innate inflammatory responses in bronchial epithelial cells[J]. J Innate Immun, 2016, 8(5): 464-478.
- [17] Wang Y, Wu ZZ, Wang W. Inhibition of endoplasmic reticulum stress alleviates cigarette smoke-induced airway inflammation and emphysema[J]. Oncotarget, 2017, 8(44): 77685-77695.
- [18] 王恒, 王宏英, 李继斌, 等. 内质网应激在高血糖致微血管损伤过程中的作用[J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2016, 36(3): 328-333.
- [19] Peñaranda Fajardo NM, Meijer C, Krut FA. The endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response in gliomagenesis, tumor progression and as a therapeutic target in glioblastoma[J]. Biochem Pharmacol, 2016, 118: 1-8.
- [20] Cao SS, Kaufman RJ. Unfolded protein response[J]. Curr Biol, 2012, 22(16): R622-R626.
- [21] Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(2): 89-102.
- [22] Liu ZW, Zhu HT, Chen KL, et al. Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) signaling pathway plays a major role in reactive oxygen species (ROS)-mediated endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in diabetic cardiomyopathy[J]. Cardiovasc Diabetol, 2013, 12: 158.
- [23] Park SH, Gong JH, Choi YJ, et al. Kaempferol inhibits endoplasmic reticulum stress-associated mucus hypersecretion in airway epithelial cells and ovalbumin-sensitized mice[J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0143526.
- [24] Yoshida H, Okada T, Haze K, et al. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(18): 6755-6767.
- [25] Wang G, Xu Z, Wang R, et al. Genes associated with MUC5AC expression in small airway epithelium of human smokers and non-smokers[J]. BMC Med Genomics, 2012, 5: 21.

[收稿日期] 2018-07-04

[本文编辑] 瞿麟平

