

瞬时电位受体通道 TRPA1/TRPV1 在烟草致气道上皮细胞损伤中的作用

王沐昀¹, 徐蒙蒙¹, 李 锋², 张 海², 陈宇清², 闫雪波¹, 张妍蓓¹

摘要 目的 探讨瞬时电位受体离子通道 (TRP) TRPA1 和 TRPV1 在香烟烟雾提取物 (CSE) 诱导的气道上皮细胞损伤模型中的作用及机制。方法 支气管上皮细胞 (Beas-2b 细胞) 与 10% CSE 共培养, 使用 A967079 (100 $\mu\text{mol/ml}$, TRPA1 抑制剂)、AMG9810 (100 $\mu\text{mol/ml}$, TRPV1 抑制剂)、A967079 (100 $\mu\text{mol/ml}$ + AMG9810 (100 $\mu\text{mol/ml}$) 三种方式进行预处理。检测细胞内 Ca^{2+} 水平、氧化应激、抗氧化酶 mRNA 水平 [血红素加氧酶 1 (HO-1)、醌氧化还原酶 1 (NQO1)、锰超氧化物歧化酶 (MnSOD)、过氧化氢酶 (CAT)]、炎症因子 [白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-8、IL-18、IL-33] mRNA 水平、线粒体分裂蛋白 [动力相关蛋白 1 (DRP1)、线粒体裂变因子 (MFF)]、线粒体融合蛋白 [视神经萎缩蛋白 1 (OPA1)、线粒体融合蛋白 2 (MFN2)]、核苷结合寡聚结构域类似受体 3 (NLRP3) 炎症小体和半胱氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1)。结果 10% CSE 诱导 Ca^{2+} 内流, 增加氧化应激, 减少抗氧化酶 mRNA 表达, 增加炎症因子 mRNA 表达, 增加 DRP1、MFF 蛋白表达, 减少 OPA1 蛋白表达, 上调 NLRP3 炎症小体。A967079、AMG9810 单独使用与联合使用均可以阻断 Ca^{2+} 内流, 抑制氧化应激, 增加抗氧化酶 mRNA 表达, 减少炎症因子 mRNA 表达, 预防线粒体分裂/融合蛋白的失衡, 下调 NLRP3 炎症小体, 其中联合使用的效应好于单独使用。结论 TRPA1 和 TRPV1 通过调控氧化应激、炎症反应和线粒体损伤而参与 CSE 诱导的气道上皮细胞损伤。

关键词 TRPA1; TRPV1; 烟草暴露; 氧化应激; 线粒体损伤

中图分类号 R 563.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)06-0874-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.06.009

氧化应激是慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstruc-

tive pulmonary disease, COPD) 的重要发病机制之一^[1]。活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 可能来自香烟烟雾, 是 COPD 最重要的危险因素^[2]。瞬时电位受体离子通道 (transient receptor potential, TRP) 是一类离子通道蛋白, 位于细胞膜。TRP 通道是 Ca^{2+} 渗透性阳离子通道, 它通过直接允许 Ca^{2+} 流入细胞以应对各种刺激, 或使膜电位去极化来调节细胞功能^[3]。其中, TRPA1 和 TRPV1 在炎症形成和组织损伤中发挥主要作用^[4-5]。线粒体是细胞内 ROS 的主要来源, 参与 COPD 的发病机制^[6]。线粒体的结构和功能受其分裂/融合过程的调控^[7]。线粒体分裂由动力相关蛋白 1 (dynamitin-related protein 1, DRP1) 和线粒体裂变因子 (mitochondrial fission factor, MFF) 蛋白调控, 而线粒体融合由线粒体融合蛋白 1 (mitofusions 1, MFN1) 和线粒体融合蛋白 2 (mitofusions 2, MFN2) 及视神经萎缩蛋白 1 (optic atrophy 1, OPA1) 蛋白调控^[8]。线粒体的功能除了产生 ROS, 还可以调节细胞氧化还原信号通路、细胞增殖和凋亡、先天和适应性免疫应答包括核苷结合寡聚结构域类似受体 3 [nucleotide-binding oligomerization domain (Nod)-like receptor 3, NLRP3] 炎症小体^[5]。NLRP3 炎症小体含有 NLRP3 受体、适配器蛋白即凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing, ASC) 和半胱氨酸蛋白酶-1 (cysteine aspartate-specific proteinases, Caspase-1)。该研究拟通过建立香烟烟雾提取物 (cigarette smoke extract, CSE) 诱导的气道上皮损伤模型, 探讨 TRPA1/TRPV1 在该模型中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人支气管上皮细胞系 Beas-2b 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院; 1640 培养基购自美国 Hyclone 公司; 胎牛血清购自以色列 BioInd 公司; 100 U/ml 青霉素和链霉素 100 $\mu\text{g/ml}$ 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 万宝路香烟购自龙岩烟草工业有限公司; TRPA1 抑制剂 (A967079、AMG9810) 购自美国 Abcam 公司; 细胞增殖/毒性检

2019-02-01 接收

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目 (编号: KJ2018A0208); 国家自然科学基金 (编号: 81870031)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院老年呼吸科, 合肥 230022

²上海交通大学附属胸科医院呼吸科, 上海 200030

作者简介: 王沐昀, 女, 硕士研究生;

张妍蓓, 女, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zhangyanbei1963@126.com

测试试剂盒 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 购自日本东仁公司; DCFH-DA (D6883) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; MitoSOX Red 购自美国 Invitrogen 公司; 蛋白浓度测定试剂盒、Fluo-4 AM (钙离子荧光探针, 2 mg/ml) 和蛋白裂解液 RIPA 购自南京碧云天公司; TRIzol 试剂、Prime Script™ RT Master Mix Kit、Power Green qPCR Mix 购自大连 TaKaRa 公司; DRP1、MFF、OPA1、MFN2、NLRP3、Caspase-1 和 β -Tubulin 抗体、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗购自美国 Cell signaling Technology 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Beas-2b 细胞接种于无菌培养瓶中, 将培养瓶置于 37 °C、5% CO₂、95% 相对湿度的培养箱中孵育, 细胞单层贴壁生长。实验取生长状态良好的对数生长期细胞, 以 0.25% 胰酶消化传代收集。

1.2.2 CSE 的制备 采用万宝路香烟, 去除过滤嘴后点燃, 用气体采样管 (大包氏管) 采集香烟主流烟雾 2 个串联的大包氏管内各装有 5 ml 无血清的 DMEM 培养基作为吸收液, 端连接香烟, 另一端连接 50 ml 注射器, 以 50 ml/min 的速度抽吸香烟 2 支、每支烟抽吸 10 次, 然后将该溶液调整 pH 值为 7.40 并用直径 0.22 μ m 滤膜过滤, 去除细菌和颗粒, 制备成 100% CSE, 30 min 内用于实验。

1.2.3 细胞分组 体外培养支气管上皮细胞 Beas-2B 细胞, 分为空白组、CSE 组、A967079 (100 μ mol/ml) + CSE 组、AMG9810 (100 μ mol/ml) + CSE 组、A967079 (100 μ mol/ml) + AMG9810 (100 μ mol/ml) + CSE 组。

1.2.4 细胞增殖实验 取对数生长期的 Beas-2B 细胞, 调整细胞浓度至 5×10^4 个/ml, 取 100 μ l 种于 96 孔板, 每组设 6 个复孔。待细胞贴壁后, 分别在每孔加入 CSE、CSE + 抑制剂, 96 孔板四周孔用培养基填充, 96 孔板置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养 24 h 后, 每孔加入 10% CCK-8 溶液, 继续培养 2 h 后, 用酶标仪测定 96 孔板在 450 nm 处的光密度 (optical density, OD) 值即 OD_{450 nm}。

1.2.5 Ca²⁺ 检测实验 细胞接种到 96 孔的黑色板中, 密度为 5×10^4 /ml, 每组 6 个复孔。抑制剂实验组是使用抑制剂预处理 1 h 后, 所有实验组接受 CSE 处理 2 min。PBS 清洗后加入 5 μ m Fluo-4, 避光孵育 30 min。PBS 清洗 3 次, 使用 Flexstation ② 2 fluorescence plate reader 在 OD_{488/516 nm} 检测 OD 值, 并使用荧光显微镜拍照。

1.2.6 氧化应激检测 使用 DCFH-DA 检测细胞内 ROS 的生成, 细胞接种到 96 孔的黑色板中, 密度为 5×10^4 /ml, 每组 6 个复孔。分别在每孔加入 CSE、CSE + 抑制剂 24 h 后, 加入 10 μ m DCFH-DA 在 37 °C 温箱中避光孵育 15 min, 无血清 1640 清洗 3 次, 在 488/525 nm 测定 OD。使用 Mito SOX RED 检测线粒体氧化应激, 细胞接种到 96 孔的黑色板中, 密度为 5×10^4 /ml, 每组 6 个复孔。分别在每孔加入 CSE、CSE + 抑制剂 24 h 后, 加入 5 mmol/L MitoSOX Red 探针, 在 37 °C 温箱中避光孵育 10 min, PBS 清洗 3 次, 在 OD_{510/580 nm} 处测定 OD 值和荧光显微镜拍照。

1.2.7 qRT-PCR 实验 检测抗氧化酶 [血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HO-1); 醌氧化还原酶 1 (NAD (P) H: quinone oxidoreductase NQO1; EC1.6.99.2, NQO1); 锰超氧化物歧化酶 (manganese superoxide dismutase, MnSOD); 过氧化氢酶 (catalase, CAT)] 和炎症因子 [白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8)、IL-1 β 、IL-18、IL-33] 的 mRNA 水平。将各组细胞 1×10^7 , 取 1 ml TRIzol 抽提细胞总 RNA。利用 TAKARA Prime Script 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA。实时定量 PCR 按 SYBR II Premix Ex Taq™ (TAKARA) 试剂盒说明书操作。引物序列见表 1。

表 1 抗氧化酶和炎症因子的引物序列

基因	引物序列 (5'-3')
IL-8	F: ACTGAGACTGATGAGACTGGAC R: AACCTCTGCACCCAGTTTCF
IL-1 β	F: ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA R: GTGGGAGATTCCTAGCTGGA
IL-18	F: TCTTCATTGACCAAGGAAATCGG R: TCCGGGGTGCATTATCTCTAC
IL-33	F: GTGACGGTGTGATGCTAAGAT R: AGCTCCACAGAGTGTTCCTTG
HO-1	F: CTGCCCCAACCACTTCTGTT R: ATAAGAAGGCCTCGGTGGAT
NQO1	F: CAGTGGCATGCACCCAGGGAA R: GCATGCCCTTTTAGCCTTGGCA
MnSOD	F: ACAGGCCTTATCCACTGCT R: CAGCATAACGATCGTGCTTT
CAT	F: TAAGACTGACCAGGGCATC R: CAAACCTTGCTGAGATCGAA
β -actin	F: ACCGAGCGCGGCTACA R: CAGCCGTGCCATCTCTT

1.2.8 Western blot 实验 将各组细胞 1×10^7 加入蛋白裂解液, BCA 定量法计算蛋白的浓度。取 30 μ g 总蛋白进行凝胶电泳 (恒压 100 V), 检测细胞

中、线粒体分裂蛋白(DRP1 和 MF1)、线粒体融合蛋白(OPA1 和 MFN2)、NLRP3、Caspase-1 的蛋白表达情况,以 β -tubulin 作为内参,用 Image J 软件进行相关灰度值分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,多组间比较采用单因素方差分析。统计、制图使用 GraphPad Prism 6.0 软件。假设检验水准按 $\alpha = 0.05$ 判定, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抑制剂预处理可减轻 CSE 对细胞增殖和细胞内 Ca^{2+} 水平的影响 与空白对照、5% CSE、10% CSE 相比,15% CSE 刺激导致细胞增殖明显降低,因此选择 10% CSE 进行后续试验(98.31 ± 36.44 , $F = 32.48$)。在 10% CSE 与细胞共培养的情况下,A967079、AMG9810、A967079 + AMG9810 对细胞增殖无明显的影响,各指标每组间差异无统计学意义($F = 2.034$, $P > 0.05$)。10% CSE 刺激对细胞内 Ca^{2+} 内流的影响具有时间依赖性,并且在 2 min 达

到峰值。表明 CSE 刺激可以激活细胞内钙通道,显著增强细胞内 Ca^{2+} 内流,A967079(98.45 ± 8.17)、AMG9810(96.72 ± 8.17)、A967079 + AMG9810(92.77 ± 9.95) 显著降低细胞内 Ca^{2+} 水平($F = 14.99$, $P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$),各指标每组间差异有统计学意义。见图 1。

2.2 抑制剂预处理可减轻 CSE 对细胞内 ROS 和线粒体 ROS 的影响 10% CSE 刺激导致细胞内 ROS 水平升高(164.64 ± 4.89 , $P < 0.001$)。A967079(113.37 ± 5.89)、AMG9810(118.02 ± 4.99)、A967079 + AMG9810(103.69 ± 7.53) 抑制细胞内 ROS 水平($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$),各指标每组间差异有统计学意义($F = 78.77$)。10% CSE 刺激增加线粒体 ROS 水平(137.88 ± 8.64 , $P < 0.001$)。A967079(122.79 ± 3.17)、AMG9810(121.79 ± 4.61)、A967079 + AMG9810(118.44 ± 4.99) 均可抑制细胞内线粒体 ROS 水平($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.001$),各指标每组间差异有统计学意义($F = 25.84$)。见图 2。

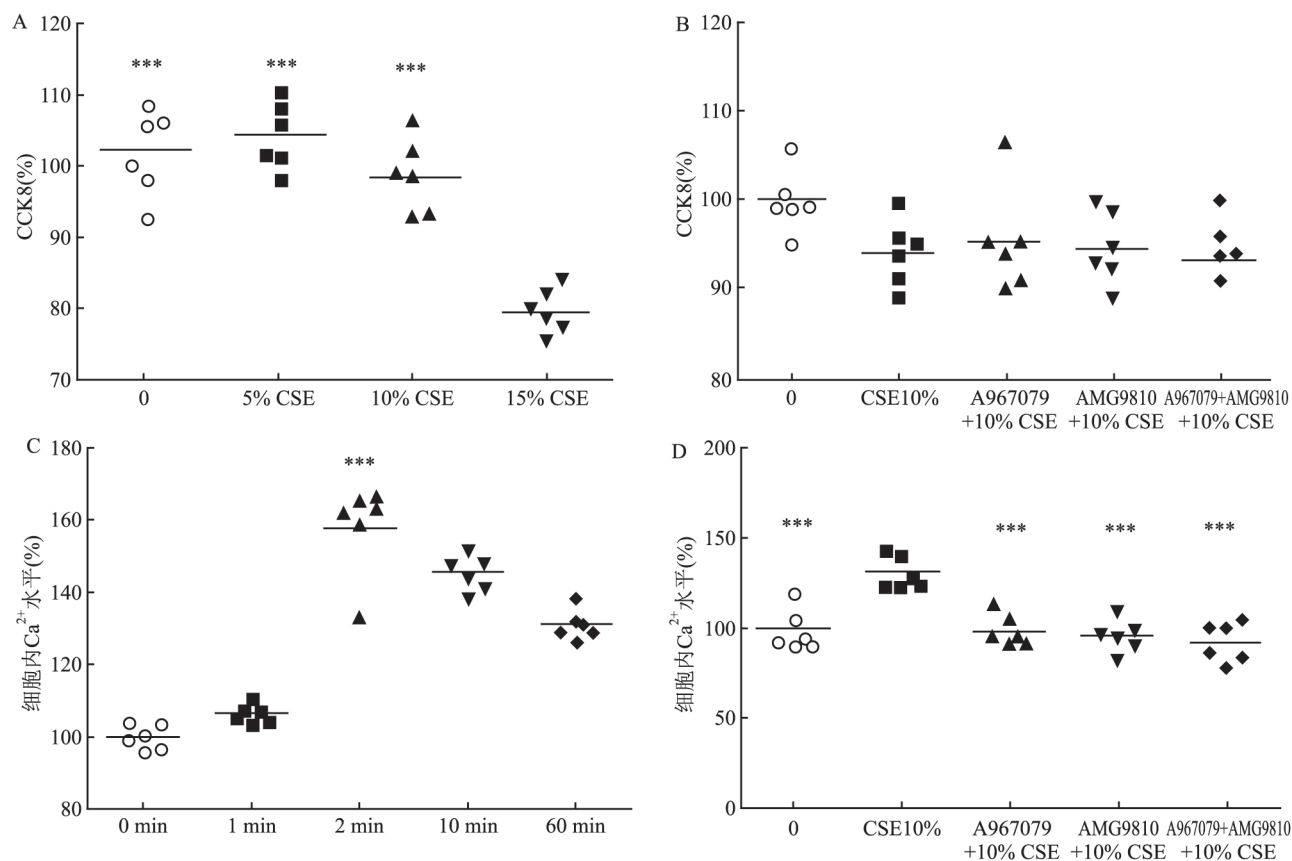


图1 抑制剂预处理可减轻 CSE 对细胞增殖和细胞内 Ca^{2+} 水平的影响

A: 不同浓度 CSE 刺激对细胞增殖的影响;与 15% CSE 组比较: *** $P < 0.001$; B: 10% CSE、抑制剂对细胞增殖的影响; C: 10% CSE 引起不同时间点 Beas-2b 细胞内 Ca^{2+} 浓度变化;与 0 min 组比较: *** $P < 0.001$; D: 抑制剂对 10% CSE 诱导的 2 min 时细胞内 Ca^{2+} 水平的影响;与 10% CSE 组比较: *** $P < 0.001$

2.3 抑制剂预处理可减轻 CSE 对抗氧化酶 mRNA 表达的影响 10% CSE 刺激降低细胞的 HO-1、NQO1 和 CAT 的 mRNA 表达($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。A967079 增加 NQO1 和 CAT mRNA 表达($P < 0.001$, $P < 0.001$)。AMG9810 增加 CAT mRNA

NA($P < 0.001$)。A967079 + AMG9810 增加 HO-1、NQO1、MnSOD mRNA 表达($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$)。各指标每组间差异有统计学意义($F_{HO-1} = 28.72$, $F_{NQO1} = 57.41$, $F_{MnSOD} = 35.4$, $F_{CAT} = 31$)。见图 3。

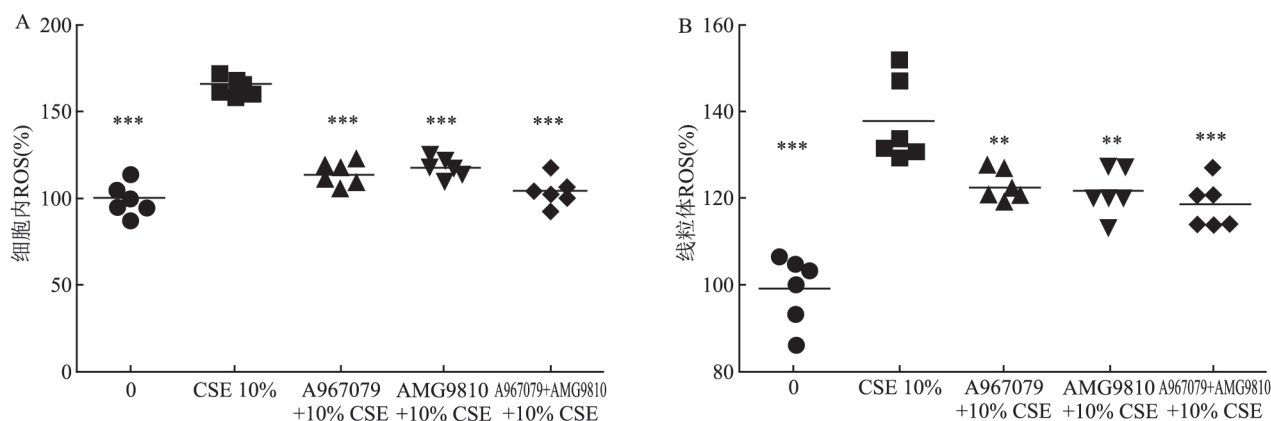


图2 抑制剂预处理可减轻 CSE 对细胞内 ROS 和线粒体 ROS 的影响

A: 10% CSE 对细胞内 ROS 水平的影响及抑制剂的干预效应; B: 10% CSE 对线粒体 ROS 水平的影响及抑制剂的干预效应; 与 10% CSE 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

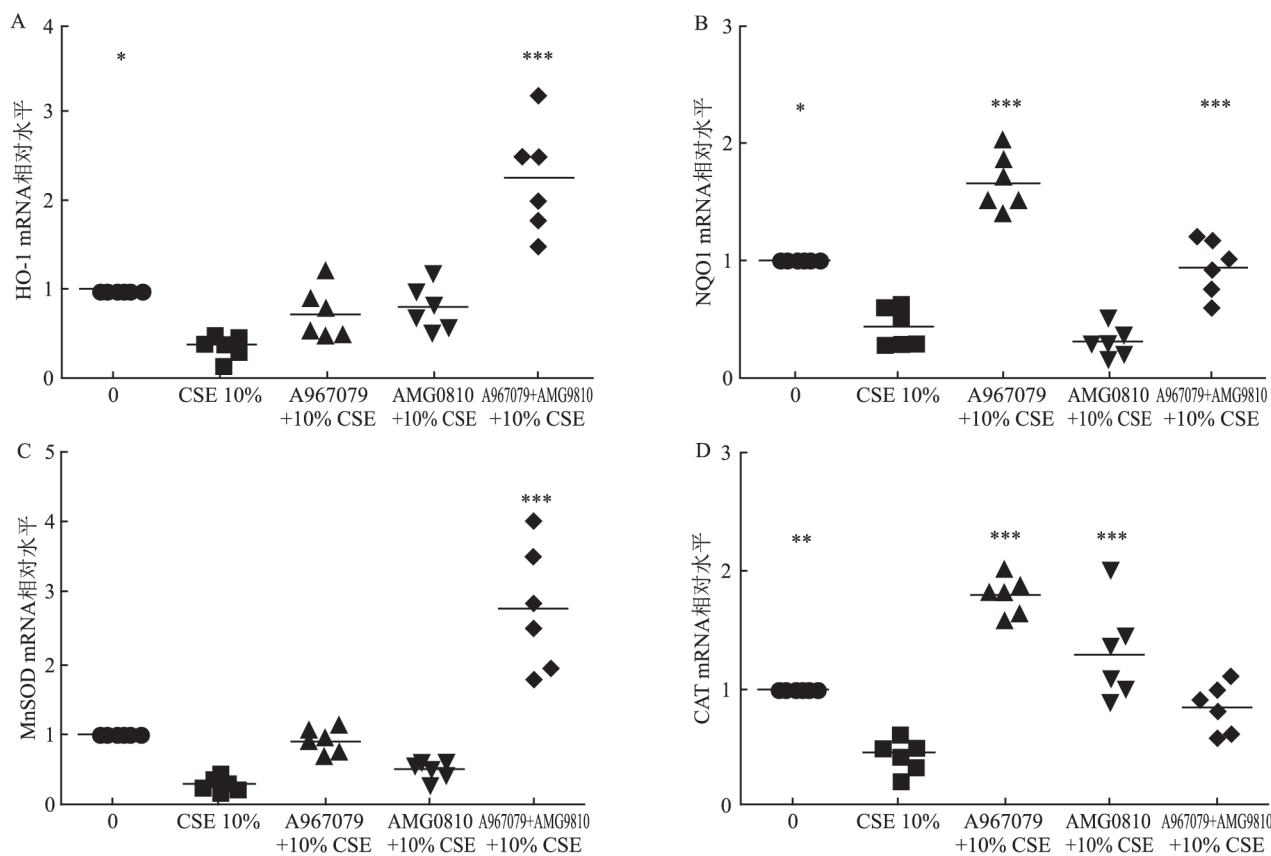


图3 抑制剂预处理可减轻 CSE 对抗氧化酶 mRNA 表达的影响

A: 10% CSE 对细胞 HO-1 的 mRNA 表达的影响及抑制剂的干预效应; B: 10% CSE 对细胞 NQO1 的 mRNA 表达的影响及抑制剂的干预效应; C: 10% CSE 对细胞 MnSOD 的 mRNA 表达的影响及抑制剂的干预效应; D: 10% CSE 对细胞 CAT 的 mRNA 表达的影响及抑制剂的干预效应; 与 10% CSE 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.4 抑制剂预处理可减轻 CSE 对炎症因子 mRNA 表达的影响 10% CSE 刺激增加细胞的 IL-8、IL-1 β 、IL-18、IL-33 mRNA 表达 ($P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.001$)。A967079 降低细胞的 IL-1 β 、IL-18、IL-33 的 mRNA 表达 ($P < 0.001$, $P < 0.05$, $P < 0.05$)。AMG9810 降低细胞的 IL-8、IL-18、IL-33 的 mRNA 水平 ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$)。A967079 + AMG9810 降低细胞的 IL-1 β 、IL-18、IL-33 的 mRNA 表达 ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$)，各指标每组间差异有统计学意义 ($F_{IL-8} = 28.72$, $F_{IL-1\beta} = 57.41$, $F_{IL-18} = 35.4$, $F_{IL-33} = 31$)，见图 4。

2.5 抑制剂预处理可减轻 CSE 对线粒体分裂/融合蛋白表达的影响 线粒体分裂/融合蛋白的代表性图见图 5。10% CSE 刺激增加 DRP1、MFF 的蛋白表达，减少 OPA1 蛋白表达 (1.38 ± 0.20 , 1.67 ± 0.33 , 0.80 ± 0.07 , $P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.01$)。A967079 减少 DRP1、MFF 蛋白 (0.81 ± 0.07 , 0.74

± 0.19 , $P < 0.01$, $P < 0.001$)，增加 MFN2 蛋白 (1.45 ± 0.41 , $P < 0.05$)，AMG9810 减少 MFF 蛋白 (0.75 ± 0.23 , $P < 0.001$)，增加 MFN2 蛋白 (1.38 ± 0.30 , $P < 0.05$)，A967079 + AMG9810 减少 DRP1、MFF 蛋白 (0.86 ± 0.12 , 0.68 ± 0.13 , $P < 0.05$, $P < 0.001$)，增加 OPA1、MFN2 蛋白 (1.46 ± 0.38 , 1.43 ± 0.29 , $P < 0.05$, $P < 0.05$)，各指标每组间差异有统计学意义，见图 5。

2.6 抑制剂预处理可减轻 CSE 对 NLRP3 炎症小体的影响 10% CSE 刺激增加 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达 ($P < 0.001$, $P < 0.05$)。A967079 降低 NLRP3 蛋白 (0.89 ± 0.06 , $P < 0.05$)，AMG9810 降低 Caspase-1 蛋白 (1.08 ± 0.16 , $P < 0.05$)。A967079 + AMG9810 降低 NLRP3、Caspase-1 蛋白 ($P < 0.001$, $P < 0.01$)。各指标每组间差异有统计学意义 (0.81 ± 0.07 , 0.99 ± 0.19 , $F_{NLRP3} = 11.08$, $F_{Caspase-1} = 5.629$)，见图 6。

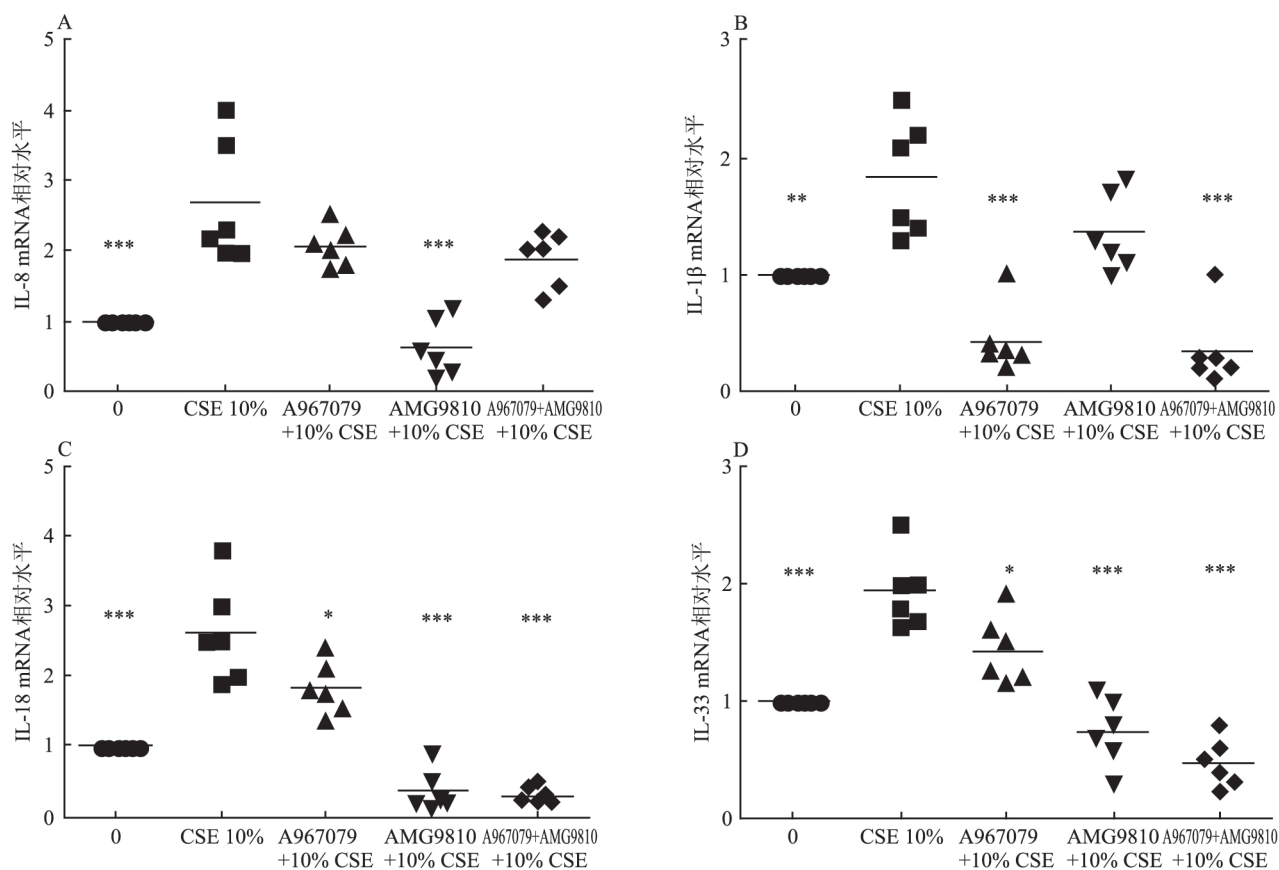


图4 抑制剂预处理可减轻 CSE 对炎症因子 mRNA 表达的影响

A: 10% CSE 对细胞 IL-8 的 mRNA 表达的影响及抑制剂的干预效应; B: 10% CSE 对细胞 IL-1 β 的 mRNA 表达的影响及抑制剂的干预效应; C: 10% CSE 对细胞 IL-18 的 mRNA 表达的影响及抑制剂的干预效应; D: 10% CSE 对细胞 IL-33 的 mRNA 表达的影响及抑制剂的干预效应; 与 10% CSE 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

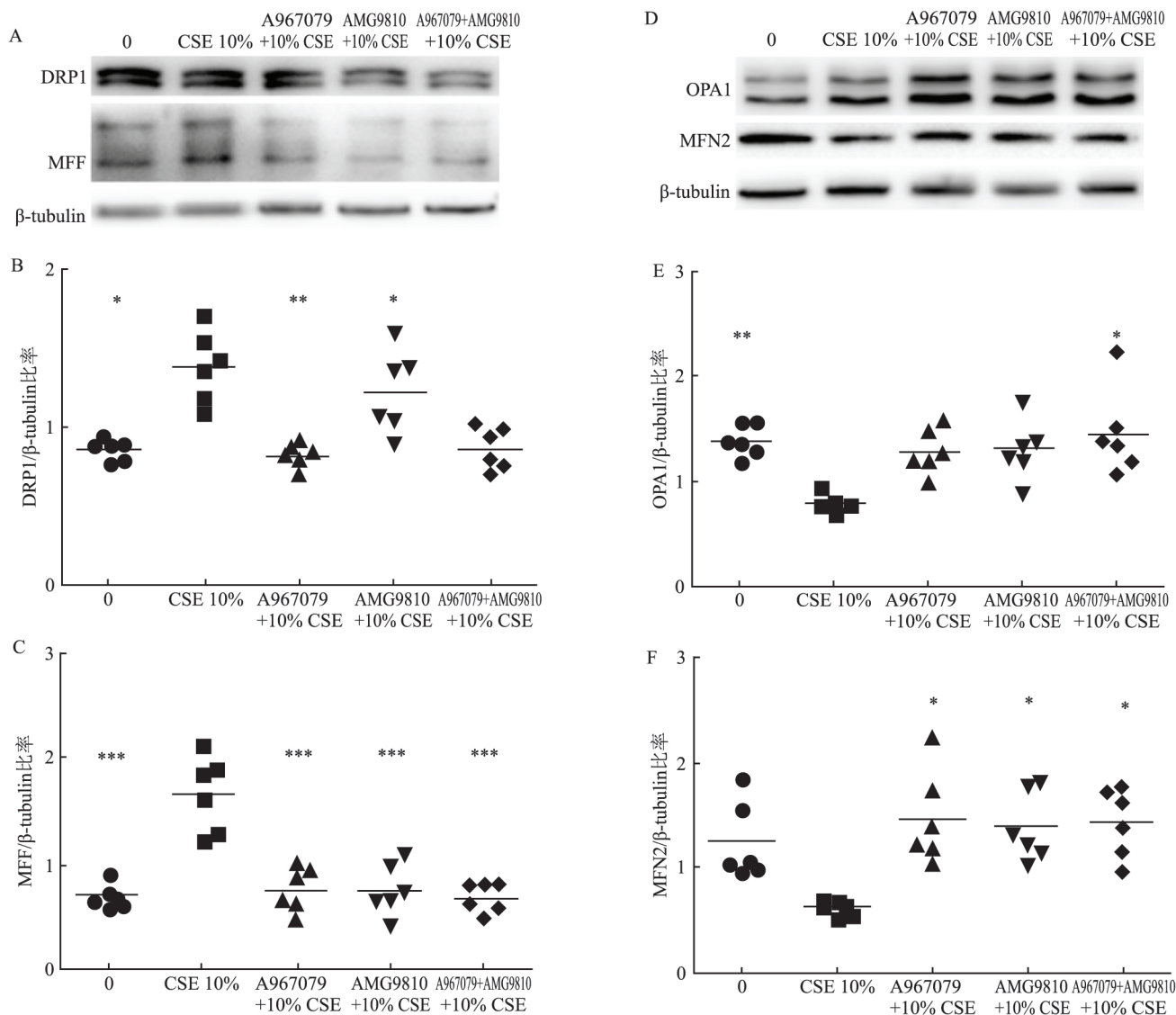


图5 10% CSE 对细胞 DRP1、MFF、OPA1、MFN2 的蛋白表达的影响及抑制剂的干预效应

A: 10% CSE 对细胞 DRP1、MFF 蛋白表达的影响及抑制剂的干预效应蛋白应激图; B: 10% CSE 对细胞 DRP1 蛋白表达的影响及抑制剂的干预效应; C: 10% CSE 对细胞 MFF 蛋白表达的影响及抑制剂的干预效应; D: 10% CSE 对细胞 OPA1、MFN2 蛋白表达的影响及抑制剂的干预效应蛋白应激图; E: 10% CSE 对细胞 OPA1 蛋白表达的影响及抑制剂的干预效应; F: 10% CSE 对细胞 MFN2 蛋白表达的影响及抑制剂的干预效应; 与 10% CSE 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3 讨论

本研究证实烟雾暴露引起气道上皮细胞的损伤,表现为细胞内氧化应激、线粒体损伤和炎症反应。在 Beas-2b 细胞中,CSE 培养诱导 Ca^{2+} 内流,增加细胞内和线粒体 ROS,降低抗氧化酶 mRNA 表达,增加炎症因子 mRNA 表达,介导线粒体分裂/融合蛋白的失衡,即线粒体分裂蛋白增加,线粒体融合蛋白减少。同时 CSE 增加 NLRP3 和 Caspase-1 的表达水平。单独应用或联合 TRPA1、TRPV1 抑制剂可以减少细胞内氧化应激、线粒体损伤以及下游炎

症反应,预防线粒体分裂/融合蛋白的失衡,下调 NLRP3 炎症小体,其中联合使用效应好于单独使用。以上结果表明 TRPA1 和 TRPV1 通路在烟雾诱导气道上皮细胞损伤模型中发挥重要的作用。

氧化应激反应是烟雾暴露诱导上皮细胞损伤的主要机制之一。它是细胞中氧化还原平衡相对于抗氧化状态转移到促氧化状态的一种情况,可能是与氧化剂种类的增加或自由基清除剂以及抗氧化酶水平的降低有关^[9]。在 Beas-2b 细胞中,CSE 共培养诱发线粒体 ROS 和细胞内 ROS 产生过量,这一现象与 CSE 共培养降低 Beas-2b 细胞中抗氧化酶

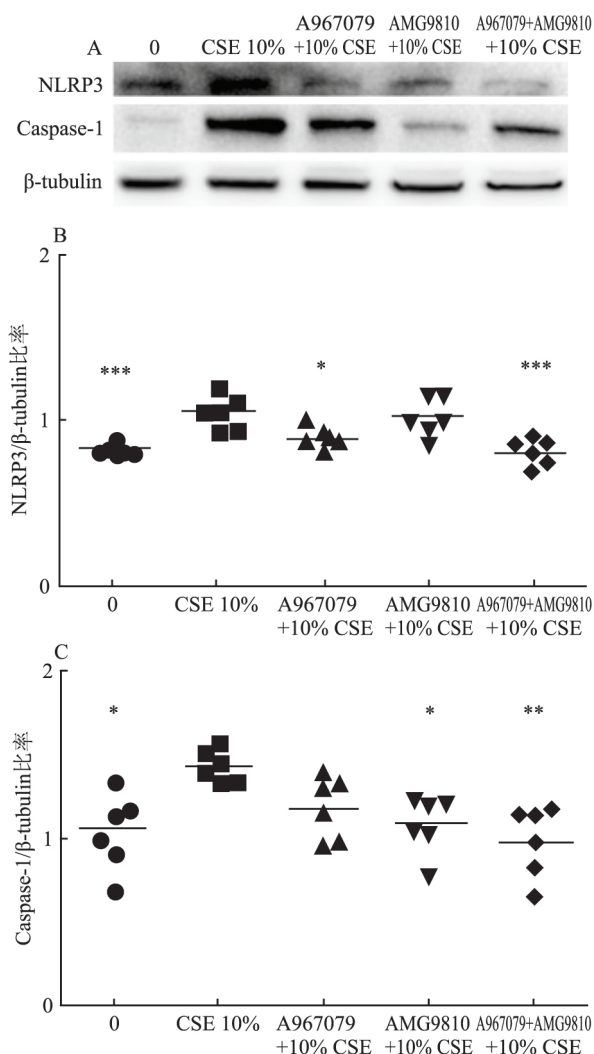


图6 10% CSE对细胞NLRP3、caspase-1的蛋白表达的影响及抑制剂的干预效应

A: 10% CSE对细胞NLRP3、Caspase-1蛋白表达的影响及抑制剂的干预效应蛋白应激图; B: 10% CSE对细胞NLRP3蛋白表达的影响及抑制剂的干预效应; C: 10% CSE对细胞Caspase-1蛋白表达的影响及抑制剂的干预效应; 与10% CSE组比较: $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

mRNA水平有关。A967079、AMG9810、A967079 + AMG9810均可降低CSE引起的细胞内和线粒体ROS升高。同时, A967079、AMG9810、A967079 + AMG9810可以增加细胞内抗氧化酶表达mRNA水平。本研究表明TRPA1和TRPV1通道在烟雾暴露诱导肺部细胞的氧化应激反应过程中发挥重要的作用。这一过程可能与CSE诱导的细胞内 Ca^{2+} 内流增加有关,抑制TRPA1/TRPV1通道可抑制细胞内的 Ca^{2+} 内流。

COPD^[10]和哮喘^[11]患者均存在气道上皮细胞线粒体功能异常,进而导致线粒体外膜渗透,凋亡蛋白释放,最终导致细胞死亡。在本研究中,CSE使

Beas-2b细胞内的线粒体分裂/融合蛋白失衡,这种获得性线粒体功能障碍可能在COPD的发展中发挥重要作用,而A967079、AMG9810、A967079 + AMG9810可以部分或完全地预防CSE诱导的线粒体分裂/融合蛋白失衡。表明烟草暴露会通过TRPA1/TRPV1通路影响线粒体结构,进而损害气道上皮细胞的线粒体功能。本研究表明,CSE介导细胞内和线粒体氧化应激、诱发线粒体结构和功能障碍,这两者之间可能互为因果,相互影响。

体外研究^[12]显示,在肺泡上皮细胞(A549细胞)和支气管上皮细胞中,ROS导致炎症介质基因表达增加。ROS作用于TRPA1和TRPV1通道激活NLRP3,刺激Caspase-1激活,从而导致IL-1 β 和IL-18分泌^[13]。另外,NLRP3炎症小体在COPD的发病机制过程中发挥关键作用^[14]。本研究中,CSE暴露增加Beas-2b细胞的炎症因子mRNA水平,增加NLRP3和Caspase-1蛋白的表达,A967079、AMG9810、A967079 + AMG9810均可以部分或完全地抑制炎症因子水平,部分或完全地抑制NLRP3炎症小体通路。这表明CSE通过TRPA1/TRPV1-NLRP3炎症小体通路诱导细胞内炎症反应。抑制TRPA1/TRPV1可以抑制NLRP3炎症小体,抑制细胞内炎症反应。

本研究表明,TRPA1和TRPV1通过调控氧化应激、炎症反应和线粒体损伤而参与CSE诱导的气道上皮细胞损伤。靶向抑制TRPA1、TRPV1具有预防CSE诱导的气道上皮细胞损伤的作用。与单独抑制TRPA1或TRPV1相比,同时抑制TRPA1和TRPV1能更好地抑制CSE诱导的气道上皮损伤。

参考文献

- [1] Kirkham P A, Barnes P J. Oxidative stress in COPD[J]. Chest, 2013, 144(1): 266-73.
- [2] Domej W, Oetl K, Renner W. Oxidative stress and free radicals in COPD-implications and relevance for treatment[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2014, 9: 1207-24.
- [3] Colsoul B, Nilius B, Vennekens R. On the putative role of transient receptor potential cation channels in asthma[J]. Clin Exp Allergy, 2009, 39(10): 1456-66.
- [4] Zhou R, Yazdi A S, Menu P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation[J]. Nature, 2011, 469(7329): 221-5.
- [5] Kang M J, Shadel G S. A mitochondrial perspective of chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis[J]. Tuberc Respir Dis (Seoul), 2016, 79(4): 207-13.
- [6] Piantadosi C A, Suliman H B. Mitochondrial dysfunction in lung

- pathogenesis[J]. *Annu Rev Physiol* ,2017 ,79: 495 –515.
- [7] Aravamudan B ,Thompson M A ,Pabelick C M , et al. Mitochondria in lung diseases[J]. *Expert Rev Respir Med* ,2013 ,7(6) : 631 –46.
- [8] Aravamudan B ,Thompson M ,Sieck G C , et al. Functional effects of cigarette smoke-induced changes in airway smooth muscle mitochondrial morphology[J]. *J Cell Physiol* ,2017 ,232(5) : 1053 –68.
- [9] Ovreivik J ,Refsnes M ,Lag M , et al. Activation of proinflammatory responses in cells of the airway mucosa by particulate matter: oxidant-and non-oxidant-mediated triggering mechanisms[J]. *Biomolecules* ,2015 ,5(3) : 1399 –440.
- [10] Wiegman C H ,Michaeloudes C ,Haji G , et al. Oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction drives inflammation and airway smooth muscle remodeling in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *J Allergy Clin Immunol* ,2015 ,136(3) : 769 –80.
- [11] Bhatraju N K ,Agrawal A. Mitochondrial dysfunction linking obesity and asthma[J]. *Ann Am Thorac Soc* ,2017 ,14(Supplement _5) : S368 –73.
- [12] Barnes P J ,Adcock I M ,Ito K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases[J]. *Eur Respir J* ,2005 ,25(3) : 552 –63.
- [13] Cassel S L ,Eisenbarth S C ,Iyer S S et al. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* ,2008 ,105(26) : 9035 –40.
- [14] Lee S ,Suh G Y ,Ryter S W , et al. Regulation and function of the nucleotide binding domain leucine-rich repeat-containing receptor ,pyrin domain-containing-3 inflammasome in lung disease[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol* ,2016 ,54(2) : 151 –60.

The role of transient potential receptor channel TRPA1/TRPV1 in cigarette induced airway epithelial cell injury

Wang Muyun¹ , Xu Mengmeng¹ , Li Feng² , et al.

(¹*Dept of Geriatric Respiratory , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022;*

²*Dept of Pulmonary Medicine , Chest Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University , Shanghai 200030)*

Abstract Objective To elucidate the role and mechanism of TRPA1 and TRPV1 in cigarette smoke extract (CSE) induced airway epithelial cell injury model. **Methods** Bronchial epithelial cells(Beas-2b cells) were co-cultured with 10% CSE and pretreated with A967079(100 μm , TRPA1 inhibitor) , AMG9810(100 μm , TRPV1 inhibitor) , and A967079(100 μm) + AMG9810(100 μm) . Intracellular Ca^{2+} level , oxidative stress , the mRNA level of antioxidant(HO-1 , NQO1 , MnSOD , CAT) and inflammatory cytokines(IL-1 β , IL-8 , IL-18 , IL-33) , mitochondrial fission protein(DRP1 MFF) and fusion protein(OPA1 MFN2) , NLRP3 inflammasome and Caspase-1 protein were examined. **Results** In Beas-2b cells , 10% CSE induced the Ca^{2+} inflow and increased intracellular and mitochondrial oxidative stress , reduced antioxidants mRNA expression and increased inflammatory cytokines mRNA expression. 10% CSE increased the protein expression of MFF and DRP1 , decreased the protein expression of OPA1 , and up-regulated NLRP3 inflammasome and Caspase-1. Pretreatment with A967079 or AMG9810 or combined use of A967079 and AMG9810 could block Ca^{2+} influx , reduce oxidative stress , increase antioxidants mRNA expression , reduce inflammatory cytokines mRNA expression , prevent the imbalance of mitochondrial fission/fusion protein , and down-regulate NLRP3 inflammasome and Caspase-1. The effects of combined use were better than those of single use. **Conclusion** Both TRPA1 and TRPV1 mediate CSE-induced airway epithelial cell injury by regulating oxidative stress , inflammatory response and mitochondrial damage , and co-inhibition of TRPA1/TRPV1 channels may better inhibit CSE induced bronchial epithelial cell injury.

Key words TRPA1; TRPV1; cigarette exposure; oxidative stress; mitochondrial damage