

中图分类号: R962; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)20-0073-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.20.016



青蒿琥酯对香烟烟雾诱导气道上皮屏障损伤的防护作用及机制*

宋韵, 王斌[△]

(复旦大学附属华山医院, 上海 200040)

摘要:目的 探讨青蒿琥酯(ART)对气道上皮屏障损伤的防护作用及其机制。方法 细胞实验, 将人支气管上皮细胞(HBEC)分为对照组(A组, 常规培养), 香烟烟雾提取物(CSE)组(B组, 2.5% CSE处理24h), ART低、中、高剂量组(C₁组、C₂组、C₃组, 1, 10, 100 μmol/L, 予2.5% CSE刺激前1h加入ART共孵育), 制备上清液, 采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测细胞肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白细胞介素6(IL-6)水平, 采用流式细胞术检测细胞凋亡水平, 通过测定跨上皮细胞电阻(TEER)考察上皮屏障完整性, 采用免疫印迹法检测细胞间连接蛋白ZO-1、E-cadherin、表皮生长因子受体(EGFR)的表达水平。动物实验, 将25只BALB/c小鼠随机分为对照组(a组, 等体积生理盐水), 香烟烟雾(CS)组(b组, 等体积生理盐水), ART低、中、高剂量组(c₁组、c₂组、c₃组, 25, 50, 100 mg/kg)。使小鼠持续暴露于CS环境(每天2次, 每次1h, 持续8周), 以建立气道上皮屏障损伤小鼠模型。各组小鼠每日首次CS刺激前1h腹腔注射相应药物或生理盐水。采用免疫组化染色观察肺组织中细胞连接蛋白ZO-1、E-cadherin和EGFR的表达情况。结果 与B组比较, C₂、C₃组细胞TNF-α和IL-6水平显著降低(P<0.05), C₁、C₂、C₃组细胞凋亡率显著降低(P<0.05), C₂、C₃组细胞TEER值显著升高(P<0.05), ZO-1和E-cadherin蛋白表达水平显著升高, EGFR表达水平显著降低(P<0.05)。与b组比较, c₃组小鼠肺组织结构明显改善, ZO-1和E-cadherin蛋白表达水平显著升高, EGFR表达水平显著降低。结论 ART能抑制CSE诱导的气道炎症反应和上皮细胞凋亡, 改善气道上皮屏障损伤。其作用机制可能与抑制EGFR表达有关。

关键词: 青蒿琥酯; 香烟烟雾; 气道上皮屏障; 表皮生长因子受体; 小鼠; 细胞实验; 动物实验

Protective Effect and Mechanism of Artesunate on Airway Epithelial Barrier Dysfunction Induced by Cigarette Smoke

SONG Yun, WANG Bin

(Huashan Hospital Fudan University, Shanghai, China 200040)

Abstract: Objective To investigate the protective effect and mechanism of artesunate (ART) on the airway epithelial barrier dysfunction. **Methods** In the cell experiment, human bronchial epithelial cells (HBECs) were divided into the control group (group A, conventional culture), the cigarette smoke extract (CSE) group [group B, 2.5% CSE treatment for 24 h], the ART low-, medium- and high-dose groups (groups C₁, C₂ and C₃, 1, 10, 100 μmol/L, adding ART for co-incubation 1 h before 2.5% CSE stimulation). Supernatant was prepared to detect the cellular tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) levels by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Cell apoptosis was detected by the flow cytometry, epithelial barrier integrity was investigated by the determination of trans-epithelial electrical resistance (TEER), expression levels of intercellular junction proteins ZO-1, E-cadherin and epidermal growth factor receptor (EGFR) were detected by the Western blot. In the animal experiment, 25 BALB/c mice were randomly divided into the control group (group a, equal volume physiological saline), the cigarette smoke (CS) group (group b, equal volume physiological saline), the ART low-, medium- and high-dose groups (groups c₁, c₂ and c₃, 25, 50, 100 mg/kg). The mice were exposed to CS for eight weeks (twice a day, 1 h each time) to establish models of airway epithelial barrier dysfunction. Each group was intraperitoneally injected with corresponding drugs or physiological saline 1 h before the first CS stimulation everyday. The expression of intercellular junction proteins ZO-1, E-cadherin and EGFR in lung tissue were observed by the immunohistochemistry staining method. **Results** Compared with those in the group B, the TNF-α and IL-6 levels in the groups C₂ and C₃ significantly decreased (P<0.05); the apoptosis rate in the groups C₁, C₂ and C₃ significantly decreased (P<0.05); the TEER in the groups C₂ and C₃ significantly increased (P<0.05); the expression levels of ZO-1 and E-cadherin proteins significantly increased, and the EGFR expression level significantly decreased (P<0.05). Compared with those in the group b, the lung tissue structure in the group c₃ significantly improved, the expression levels of ZO-1 and E-cadherin proteins significantly increased, and the EGFR expression level significantly decreased. **Conclusion** ART can inhibit CSE-induced airway inflammatory response and epithelial cell apoptosis, improve airway epithelial barrier dysfunction, and its mechanism may be related to the inhibition of EGFR expression.

Key words: artesunate; cigarette smoke; airway epithelial barrier; epidermal growth factor receptor; mice; cell experiment; animal experiment

*基金项目: 上海青年药学会人才能力提升项目[沪药会字[2023]04号]。

第一作者: 宋韵, 女, 博士, 主管药师, 研究方向为呼吸药理学, (电子信箱)songwany@126.com。

[△]通信作者: 王斌, 女, 硕士, 主任药师, 研究方向为呼吸药理学、肿瘤药理学, (电子信箱)hsbinwang@163.com。

慢性阻塞性肺疾病(COPD)为死亡率较高的慢性肺病,且带来沉重的社会经济负担^[1]。COPD的主要危险因素是吸入有毒物质和病原体,如香烟烟雾(CS),其可引起肺部持续的炎性反应,进而驱动气道和肺组织重塑^[2]。气道上皮细胞连接形成的上皮屏障是抵御外界有害因素的第一道防线,上皮屏障的破坏使上皮下层组织暴露于有害物质,是导致COPD发生、发展的初始因素^[3]。青蒿琥酯(ART)为半合成水溶性青蒿素衍生物,临床主要用于抗疟治疗,具有高药理活性和低毒性。研究发现,ART可显著抑制炎性反应^[4]及癌细胞增殖^[5],预防缺血和再灌注损伤^[6],抑制新型冠状病毒(SARS-CoV-2)复制^[7]。治疗呼吸系统疾病时,ART可与糖皮质激素联用,通过抑制气道平滑肌细胞增殖缓解气道壁重塑^[8],能抑制肺癌细胞表皮生长因子受体(EGFR)的表达从而抑制肺癌进展^[9],而EGFR也是CS破坏气道上皮紧密连接和引起屏障功能损害的靶点蛋白之一^[10]。但尚未见ART在保护气道上皮屏障中的作用和机制的报道。在此,以CSE刺激的人支气管上皮细胞和CS诱导的小鼠为研究模型,探讨ART对气道上皮屏障损伤的防护作用及其机制,以期为ART用于COPD治疗提供新的基础理论依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

仪器:1379型细胞生物安全柜、3111型二氧化碳培养箱、Multifuge X1R型高速冷冻离心机(美国Thermo Fisher公司);FACSCanto II型流式细胞仪(美国BD公司);ChemiDoc XRS+型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);Spark型全波长多功能酶标仪(瑞士Tecan公司);DS-Ri2型荧光倒置显微镜(日本Nikon公司);ERS-2 V-Ohmmeter型电阻测量仪(美国Millipore公司);DK-420型电热恒温水槽(上海森信实验仪器有限公司)。

试剂:ART(美国Sigma公司,货号为A3731);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号分别为JL10208,JL14113);角质形成细胞培养基,1 \times 角质形成细胞生长补充剂(美国ScienCell公司,批号分别为2111,2162);青霉素和链霉素(美国Gibco公司,批号为15140148);Annexin V-FITC/PI试剂盒(美国BD公司,货号为556547);ZO-1(货号为13663)、E-cadherin(货号为14472)、EGFR(货号为4757)、GAPDH(货号为97166S)一抗,辣根过氧化物酶标记的二抗(兔抗、鼠抗,货号分别为8889S,4408S),均购自美国Cell Signaling Technology公司;红双喜香烟(硬盒,焦油量11 mg,烤烟型,上海烟草集团有限责任公司)。

动物:SPF级BALB/c小鼠25只,6~8周龄,雌雄兼用,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,实验动

物生产许可证号为SCXK(沪)2022-0004。饲养于温度25 $^{\circ}$ C、相对湿度60%、自然光源的环境中,自由进食饮水。动物实验经复旦大学动物实验伦理委员会批准,符合《实验动物使用规范》。

细胞:人支气管上皮细胞(HBEC,美国ScienCell公司,货号为ZQ0001)。

1.2 方法

1.2.1 细胞实验

CSE的制备^[8]:以10 mL培养基吸收1支香烟的烟雾,调培养基pH至7.4,经0.22 μ m过滤器进行无菌过滤,将滤液定义为100% CSE。进一步以培养基稀释至所需体积分数。

细胞培养:取HBEC细胞,加入含100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素和角质形成细胞生长补充剂的角质形成细胞培养基,置37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的湿润培养箱中培养,当细胞融合度超过90%时,进行消化传代;新传代细胞培养24 h后,取细胞融合度约60%时的细胞进行后续实验。

分组:实验分为对照组(A组),CSE组(B组),ART低、中、高剂量组(C₁组、C₂组、C₃组)。A组细胞常规培养;B组细胞予2.5% CSE处理24 h;C₁组、C₂组、C₃组细胞同B组操作,在予2.5% CSE刺激前1 h加入ART共孵育,ART终浓度分别为1,10,100 μ mol/L,培养24 h。

观察指标:1)气道上皮屏障功能。使用表面电阻测量仪检测支气管上皮细胞层的完整性,计算跨上皮电阻(TEER), $TEER(\Omega/cm^2) = (R_{\text{样本}} - R_{\text{空白}}) \times \text{有效膜面积}(cm^2)$ 。重复操作3次(下同)。2)炎性因子。取各组细胞适量,置离心管中,4 $^{\circ}$ C下以13 000 g离心10 min,分离,得上清液,采用ELISA法测定细胞IL-6和TNF- α 水平,按试剂盒说明书操作。3)细胞凋亡率。各组细胞消化悬浮后,使用流式细胞仪上机检测并计算凋亡率。4)蛋白质免疫印迹分析。采用Western blot法,使用RIPA裂解细胞,提取总蛋白,经BCA法测定蛋白浓度,进行SDS-PAGE分离,转移至PVDF膜,加入EGFR、ZO-1、E-cadherin、GAPDH一抗(1:1 000, V/V)在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜,加入二抗(1:1 000, V/V)室温孵育1 h,用显色液显色,成像,使用Image J软件分析。

1.2.2 动物实验

分组和建模:将25只小鼠随机分为对照组(a组,等体积生理盐水),CS组(b组,等体积生理盐水),ART低、中、高剂量组(c₁组、c₂组、c₃组,ART 25,50,100 mg/kg),各5只。将小鼠持续暴露于4支香烟的烟雾中1 h,每天2次,持续8周,以建立气道上皮屏障损伤小鼠模型^[3]。对照小鼠暴露于空气中。各组小鼠每日首次CS刺激前1 h腹腔注射相应药物或生理盐水。

观察指标:小鼠左肺用4%多聚甲醛固定48 h,石

蜡包埋,切片(4 μm厚),加入EGFR,ZO-1,E-cadherin,GAPDH一抗(1:200,V/V)在4℃下孵育过夜,加入二抗(1:5 000,V/V)室温孵育,然后进行细胞核的DAB染色和苏木精再染色,脱水和密封后,显微镜下观察分析上述两指标表达情况。

1.3 统计学处理

采用GraphPad Prism 6.0软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间两两比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 炎症因子

与A组比较,B组细胞TNF- α 和IL-6水平显著升高($P < 0.01$);与B组比较,C₂组、C₃组细胞两指标水平显著降低($P < 0.05$)。详见图1。

2.2 细胞凋亡情况

与A组比较,B组细胞凋亡率显著升高($P < 0.01$);

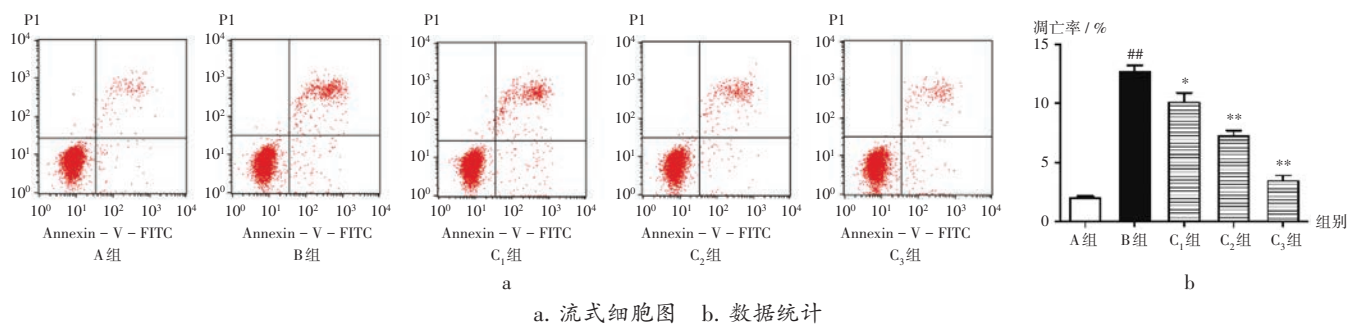


图1 细胞炎症因子水平

A. IL-6 B. TNF- α

Note: Compared with those in the group A, ^{##} $P < 0.01$; Compared with those in the group B, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ (for Fig. 1 - 4).

Fig. 1 Levels of cellular inflammatory factors

与B组比较,C₁组、C₂组、C₃组细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$)。详见图2。

图2 细胞凋亡情况

a. Results of flow cytometry detection b. Data statistics

Fig. 2 Cell apoptosis

2.3 气道上皮屏障功能

与A组比较,B组细胞TEER值显著降低($P < 0.01$);与B组比较,C₂组、C₃组细胞TEER值显著升高($P < 0.05$)。详见图3。

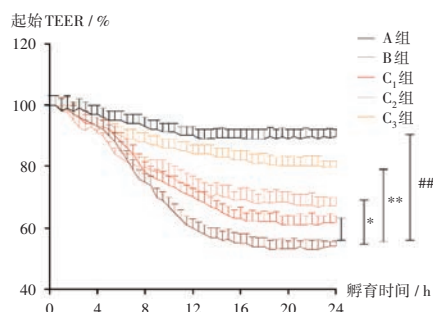


图3 气道上皮细胞连接完整情况

Fig. 3 Integrity of airway epithelial cell junction

2.4 气道上皮细胞表面连接蛋白和EGFR表达水平

与A组比较,B组细胞ZO-1和E-cadherin蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$),EGFR表达水平显著升高($P < 0.01$);与B组比较,C₂组、C₃组细胞ZO-1和E-cadherin蛋白表达水平显著升高,EGFR表达水平显

著降低($P < 0.05$)。详见图4。

2.5 免疫组化

与a组比较,b组小鼠的肺部结构发生明显改变,肺组织中E-cadherin和ZO-1蛋白表达水平显著降低,而EGFR表达水平显著升高;与b组比较,c₁组小鼠肺部结构明显改善,E-cadherin和ZO-1蛋白表达明显增加,而EGFR表达明显减少。详见图5。

3 讨论

COPD的主要诱因之一是长期直接或间接接触CS。CS由气体和颗粒组成,其中含7 000多种化学物质,如氧化气体和重金属,以及至少70种致癌物质,是导致COPD肺功能不可逆损害的最重要原因^[3]。已有研究表明,CSE诱导支气管上皮中屏障功能相关蛋白ZO-1、Occludin或E-cadherin的分解^[11-12],是COPD发生发展的初始机制,本研究结果与之一致。上皮屏障的结构和功能损害是呼吸道慢性炎症的常见标志,其中TNF- α 和IL-6被认为是CSE所致持续炎症反应和气道屏障功能障碍的重要炎症因子,COPD患者静脉血中TNF- α

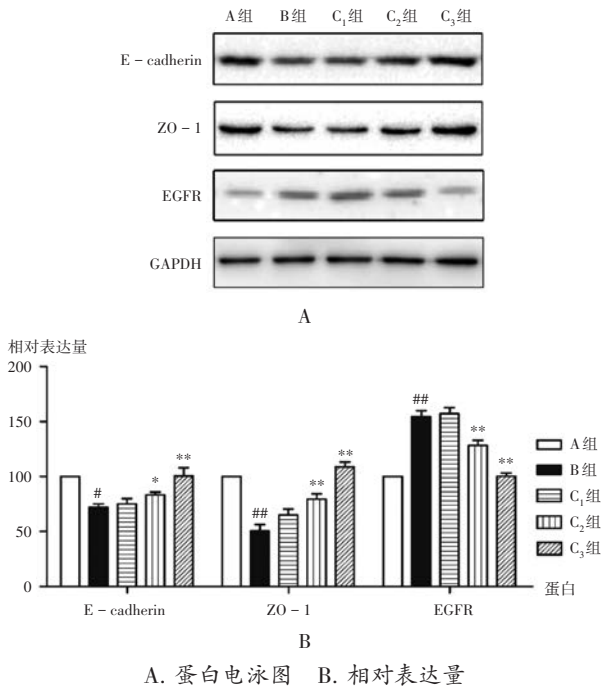


图4 气道上皮细胞胞间连接蛋白和EGFR表达

A. Protein electropherogram B. Relative expression level

Fig. 4 Expression of intercellular junction proteins and EGFR in airway epithelial cells

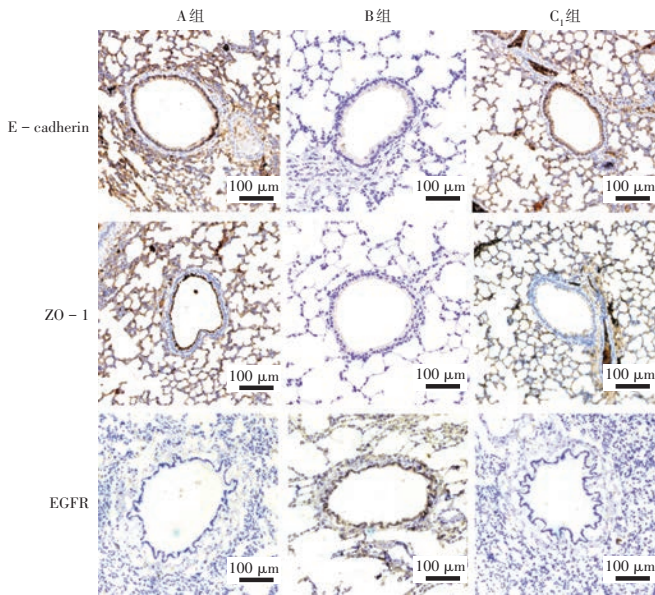


图5 小鼠肺组织胞间连接蛋白和EGFR表达

Fig. 5 Expression of intercellular junction proteins and EGFR in lung tissue

和IL-6的浓度与其疾病严重程度呈显著正相关^[13]。本研究结果也显示,CSE所致持续炎症反应会引起上皮细胞凋亡,这可能也是导致气道上皮屏障功能障碍的直接原因。

ART因其经济价值、安全性为广泛的药理作用受到关注。大量体内和体外实验证实,ART可通过多种途径改善实验性过敏性气道炎症、气道平滑肌细胞增殖、

氧化性肺损伤和肥大细胞脱颗粒^[14]。本研究结果显示,经ART干预后支气管上皮细胞TNF- α 和IL-6水平显著下降,细胞凋亡比例降低,同时改善了胞间连接蛋白表达水平和TEER值,证实了ART的抗炎、抗凋亡和保护气道上皮屏障的作用。类似研究发现,ART对CS诱导的肺损伤具有抗炎和抗氧化特性,可能通过抑制PI3K和p42/22 MAPK信号通路实现,具有治疗COPD的潜力^[15]。

有研究认为,CS通过激活EGFR-ERK1/2信号通路,诱导支气管上皮的损伤及ZO-1蛋白的分解,从而损害气道上皮屏障功能^[16],本研究结果与之一致。EGFR在COPD的病程进展中发挥了重要的调控作用,研究发现COPD患者的气道中,异常升高的EGFR活性增加了PI3K/Akt介导的FoxO3A磷酸化,从而促进趋化因子的表达,诱导炎症反应^[17]。上皮细胞中的ADAM17/EGFR轴作为传入管腔应力信号的受体,负责将信号传递给邻近细胞,是控制肺损伤和炎症的重要机制^[18]。本研究在细胞和动物层面证实,ART干预均能显著抑制EGFR表达,推测ART具有保护气道上皮屏障的药理活性,其作用可能通过抑制EGFR表达介导。

综上所述,本研究中通过细胞和动物实验证明,ART能抑制CSE诱导的气道炎症反应和气道上皮细胞凋亡,防护CS所致气道上皮屏障损伤,其作用机制可能与抑制EGFR表达有关。

参考文献

- [1] VIEGI G, MAIO S, FASOLA S, et al. Global burden of chronic respiratory diseases[J]. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv, 2020, 33(4): 171-177.
- [2] ADELOYE D, SONG P, ZHU Y, et al. Global, regional, and national prevalence of, and risk factors for, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in 2019: a systematic review and modelling analysis[J]. Lancet Respir Med, 2022, 10(5): 447-458.
- [3] AGHAPOUR M, RAEE P, MOGHADDAM SJ, et al. Airway epithelial barrier dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: role of cigarette smoke exposure[J]. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2018, 58(2): 157-169.
- [4] LEI X, TAN R, JIA J, et al. Artesunate relieves acute kidney injury through inhibiting macrophagic Mincle-mediated necroptosis and inflammation to tubular epithelial cell[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(18): 8775-8788.
- [5] HUANG Z, GAN S, ZHUANG X, et al. Artesunate Inhibits the Cell Growth in Colorectal Cancer by Promoting ROS-Dependent Cell Senescence and Autophagy[J]. Cells, 2022, 11(16): 2472.
- [6] CHEN Y, WU J, ZHU J, et al. Artesunate Provides Neuroprotection against Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury via the TLR-4/NF- κ B Pathway in Rats[J]. Biol