

· 论著 ·

基于转录组学分析尼古丁诱导气道上皮细胞炎症反应的机制

扫描二维码
查看更多李倩^{1,2}, 李婧娥², 李媛², 高笑宇², 孙德俊²

【摘要】 目的 基于转录组学分析尼古丁诱导气道上皮细胞炎症反应的机制。方法 本实验时间为2021年6月至2022年10月。取对数生长期的BEAS-2B细胞, 将其随机分为A组(空白对照)、B组(1 nmol/L尼古丁处理24 h)、C组(10 nmol/L尼古丁处理24 h)、D组(100 nmol/L尼古丁处理24 h)、E组(1 μmol/L尼古丁处理24 h)、F组(10 μmol/L尼古丁处理24 h)、G组(100 μmol/L尼古丁处理24 h)、H组(1 mmol/L尼古丁处理24 h)、I组(5 mmol/L尼古丁处理24 h)、J组(10 mmol/L尼古丁处理24 h)、K组(15 mmol/L尼古丁处理24 h), 采用细胞计数试剂盒8(CCK-8)检测各组细胞增殖活性。取对数生长期的BEAS-2B细胞, 将其随机分为空白对照组与5 mmol/L尼古丁组(5 mmol/L尼古丁处理24 h), 采用实时荧光定量PCR检测各组IL-1β、IL-8 mRNA表达水平。取对数生长期的BEAS-2B细胞, 将其随机分为空白对照组与5 mmol/L尼古丁组(5 mmol/L尼古丁处理24 h), 采用ELISA检测各组IL-1β、IL-8蛋白表达水平。取对数生长期的BEAS-2B细胞, 将其随机分为空白对照组与5 mmol/L尼古丁组(5 mmol/L尼古丁处理24 h), 收集各组细胞后进行转录组学测序。采用实时荧光定量PCR验证差异表达基因。采用clusterProfiler工具包对差异表达基因进行GO功能富集分析和KEGG通路富集分析。**结果** I组、J组、K组细胞增殖活性低于A组、B组、C组、D组($P<0.05$); J组、K组细胞增殖活性低于E组、F组、G组、H组、I组($P<0.05$); K组细胞增殖活性低于J组($P<0.05$)。5 mmol/L尼古丁组IL-1β、IL-8 mRNA表达水平高于空白对照组($P<0.05$)。5 mmol/L尼古丁组IL-1β、IL-8蛋白表达水平高于空白对照组($P<0.05$)。转录组学测序结果显示, 共检出24 751个基因, 其中7 539个差异表达基因(3 771个基因表达上调, 占50.02%; 3 768个基因表达下调, 占49.98%)。选出P值最小的19个差异表达基因, 实时荧光定量PCR检测结果显示, EGR3、IL-24、NOV、CXCL8、CXCL2、JUN、FASN、HSPA5、AXL、IGFBP4、FADS1、ANXA3、TUBA1A、ACSS2、EZR、STMN3、CPA4、HMGCS1、UCP2表达水平与转录组学检测结果一致。GO功能富集分析结果显示, 在生物过程(BP)方面, 上述19个差异表达基因主要与DNA复制、辅因子生物合成过程、粒细胞激活等相关; 在细胞组分(CC)方面, 上述19个差异表达基因主要与黏着斑、细胞-基质黏附、细胞基质结等相关; 在分子功能(MF)方面, 上述9个差异表达基因主要与钙黏着蛋白结合、细胞黏附分子结合、单链RNA结合等相关。KEGG通路富集分析结果显示, 共富集到322条KEGG通路, 前5条分别为肌动蛋白细胞骨架调节、癌症中miRNA、细胞周期、碳代谢、溶酶体。**结论** 尼古丁诱导气道上皮细胞炎症反应的机制可能与EGR3、IL-24、NOV、CXCL8、CXCL2、JUN、FASN、HSPA5、AXL、IGFBP4、FADS1、ANXA3、TUBA1A、ACSS2、EZR、STMN3、CPA4、HMGCS1、UCP2的异常表达有关, 涉及粒细胞激活、中性粒细胞脱颗粒与相关免疫、细胞-基质黏附、肌动蛋白结合等细胞功能及肌动蛋白细胞骨架调节、癌症中miRNA、细胞周期等通路。

【关键词】 炎症; 上皮细胞; 尼古丁; 转录组学**【中图分类号】** R 364.5 **【文献标识码】** A DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2023.00.117

Analysis of the Mechanism of Nicotine-Induced Airway Epithelial Cell Inflammation Based on Transcriptomics LI Qian^{1,2}, LI Jing'e², LI Yuan², GAO Xiaoyu², SUN Dejun²

1. Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science & Technology, Baotou 014000, China

2. People's Hospital of Inner Mongolia Autonomous Region/Key Laboratory of COPD Diagnosis and Treatment of the National Health Commission/Key Laboratory of Respiratory Diseases of Inner Mongolia, Hohhot 010017, China

Corresponding author: SUN Dejun, E-mail: nmg_sdj@163.com

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81960013); 中央引导地方科技发展资金项目(ZYZ20200486); 中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(2019PT350001); 内蒙古自治区自然科学基金项目(2021MS08165); 内蒙古自治区科技计划项目(内财科【2022】662号)

作者单位: 1.014000内蒙古自治区包头市, 内蒙古科技大学包头医学院 2.010017内蒙古自治区呼和浩特市, 内蒙古自治区人民医院 国家卫生健康委员会慢阻肺诊治重点实验室 内蒙古自治区呼吸疾病重点实验室

通信作者: 孙德俊, E-mail: nmg_sdj@163.com

【 Abstract 】 Objective To analyze the mechanism of nicotine-induced airway epithelial cell inflammation based on transcriptomics. **Methods** This experiment was conducted from June 2021 to October 2022. BEAS-2B cells at logarithmic growth stage were randomly divided into group A (blank control), group B (treated with 1 nmol/L nicotine for 24 hours), group C (treated with 10 nmol/L nicotine for 24 hours), group D (treated with 100 nmol/L nicotine for 24 hours), group E (treated with 1 μ mol/L nicotine for 24 hours), group F (treated with 10 μ mol/L nicotine for 24 hours), group G (treated with 100 μ mol/L nicotine for 24 hours), group H (treated with 1 mmol/L nicotine for 24 hours), group I (treated with 5 mmol/L nicotine for 24 hours), group J (treated with 10 mmol/L nicotine for 24 hours) and group K (treated with 15 mmol/L nicotine for 24 hours), and cell proliferation activity of each group was detected by cell counting kit 8 (CCK-8). BEAS-2B cells at logarithmic growth stage were randomly divided into blank control group and 5 mmol/L nicotine group (treated with 5 mmol/L nicotine for 24 h), and real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect mRNA expression levels of IL-1 β and IL-8 in each group. BEAS-2B cells at logarithmic growth stage were randomly divided into blank control group and 5 mmol/L nicotine group (treated with 5 mmol/L nicotine for 24 h), and the expression levels of IL-1 β and IL-8 protein in each group were detected by ELISA. BEAS-2B cells at logarithmic growth stage were randomly divided into blank control group and 5 mmol/L nicotine group (treated with 5 mmol/L nicotine for 24 h), and cells from each group were collected for transcriptomic sequencing. The differentially expressed genes were verified by real-time quantitative PCR. GO functional enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes were performed using clusterProfiler toolkit. **Results** The cell proliferation activity of groups I, J and K was lower than that of groups A, B, C and D ($P < 0.05$). The cell proliferation activity of groups J and K was lower than that of groups E, F, G, H and I ($P < 0.05$). The cell proliferation activity of group K was lower than that of group J ($P < 0.05$). The mRNA expression levels of IL-1 β and IL-8 in 5 mmol/L nicotine group were higher than those in blank control group ($P < 0.05$). The expression levels of IL-1 β and IL-8 protein in 5 mmol/L nicotine group were higher than those in blank control group ($P < 0.05$). Transcriptomic sequencing results showed that a total of 24 751 genes were detected, including 7 539 differentially expressed genes (3 771 genes were upregulated, accounting for 50.02%; 3 768 genes were downregulated, accounting for 49.98%). The 19 differentially expressed genes with the smallest P value were selected, and the real-time quantitative PCR detection results showed that, the expression levels of EGR3, IL-24, NOV, CXCL8, CXCL2, JUN, FASN, HSPA5, AXL, IGFBP4, FADS1, ANXA3, TUBA1A, ACSS2, EZR, STMN3, CPA4, HMGCS1 and UCP2 were consistent with the results of transcriptomic detection. GO functional enrichment analysis showed that in terms of biological processes (BP), the 19 differentially expressed genes were mainly related to DNA replication, cofactor biosynthesis, granulocyte activation, etc; in terms of cell components (CC), the 19 differentially expressed genes were mainly related to adhesion plaques, cell-matrix adhesion junctions, cell matrix junctions, etc; in terms of molecular function (MF), the 19 differentially expressed genes were mainly related to calcium adhesion protein binding, cell adhesion molecule binding, single stranded RNA binding, etc. The results of KEGG pathway enrichment analysis showed that 322 KEGG pathways were enriched, and the first 5 pathways were actin cytoskeleton regulation, miRNA in cancer, cell cycle, carbon metabolism, and lysosome. **Conclusion** The mechanism of nicotine-induced inflammatory response in airway epithelial cells may be related to the abnormal expression of EGR3, IL-24, NOV, CXCL8, CXCL2, JUN, FASN, HSPA5, AXL, IGFBP4, FADS1, ANXA3, TUBA1A, ACSS2, EZR, STMN3, CPA4, HMGCS1 and UCP2, involving cellular functions such as granulocyte activation, neutrophilic granulocyte degranulation and associated immunity, cell-matrix adhesion junctions and actin binding, and pathways such as actin cytoskeleton regulation, miRNA in cancer, and cell cycle.

【 Key words 】 Inflammation; Epithelial cells; Nicotine; Transcriptomics

2017年全球疾病负担研究显示,我国是世界上最大的烟草生产国和消费国,也是最大的烟草受害国,中国吸烟人群已超过3.71亿人,二手烟(secondhand smoke, SHS)暴露人群超3.402亿人,还有12.60万电子烟使用者^[1]。2018年中国疾病预防控制中心中国成人烟草调查报告显示,15岁及以上的吸烟人群高达26.6%,其中50.5%为成年男性^[2]。香烟中含有多种有害成分,如烟焦油、尼古丁、一氧化碳、丙酮、砷、烟碱等^[3],其不仅是导致慢性阻塞性肺疾病和肺癌等常见呼吸系统疾病的首要因素^[4-5],而且会增加急性呼吸窘迫综合征的

发生风险^[6]。其中尼古丁是烟草烟雾中最主要的成瘾性成分,长期接触尼古丁会促进多巴胺释放,降低大脑对烟碱乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)的反应性,导致成瘾和依赖^[7-8]。尼古丁与炎症反应的关系一直受到广泛关注。吸烟时,尼古丁等有害物质通过气道进入肺部,然后通过血液到达全身各个组织器官,造成不同程度的损伤^[9]。长期暴露于这些有害成分会引起气道上皮细胞抗菌防御能力以及肺屏障保护作用下降、DNA修复功能障碍,导致炎症细胞渗透到黏膜、黏膜下和腺组织,造成细胞基质破坏、血液供

应不足和上皮细胞凋亡^[10-12]。近年来,生物信息学分析被广泛用于确定可靠和关键的疾病生物标志物。本研究旨在基于转录组学分析尼古丁诱导气道上皮细胞炎症反应的机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验时间 本实验时间为2021年6月至2022年10月。

1.2 实验材料

1.2.1 实验细胞 气道上皮细胞BEAS-2B细胞购自中国科学院细胞库。

1.2.2 主要实验试剂 细胞计数试剂盒8 (cell counting kit-8, CCK-8) 溶液购自苏州宇恒生物科技有限公司,反转录试剂盒、TB GreenPremix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 购自TaKaRa, DEME细胞培养液和胎牛血清购自Gibco。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 以 2×10^5 个/孔的密度将BEAS-2B细胞接种于六孔板中,加入含10%胎牛血清的DEME细胞培养液,于含5% CO₂的37 °C细胞培养箱中培养。

1.3.2 CCK-8检测细胞增殖活性 取对数生长期的BEAS-2B细胞,使用血球计数板进行细胞计数,以 5×10^3 /ml的密度将细胞接种于96孔板(100 μ l/孔),将其随机分为A组(空白对照)、B组(1 nmol/L尼古丁处理24 h)、C组(10 nmol/L尼古丁处理24 h)、D组(100 nmol/L尼古丁处理24 h)、E组(1 μ mol/L尼古丁处理24 h)、F组(10 μ mol/L尼古丁处理24 h)、G组(100 μ mol/L尼古丁处理24 h)、H组(1 mmol/L尼古丁处理24 h)、I组(5 mmol/L尼古丁处理24 h)、J组(10 mmol/L尼古丁处理24 h)、K组(15 mmol/L尼古丁处理24 h),每组3个复孔,置于含5% CO₂的37 °C细胞培养箱中培养24 h,每孔加入10 μ l CCK-8溶液,继续孵育2 h;取出96孔板,用酶标仪检测样本在450 nm处的吸光度(A值),计算细胞存活率。

1.3.3 实时荧光定量PCR检测IL-1 β 、IL-8 mRNA表达水平 取对数生长期的BEAS-2B细胞,使用血球计数板进行细胞计数,以 5×10^3 /ml的密度将细胞接种于96孔板(100 μ l/孔),将其随机分为空白对照组与5 mmol/L尼古丁组(5 mmol/L尼古丁处理24 h),采用实时荧光定量PCR检测各组IL-1 β 、IL-8 mRNA表达水平;使用RNAiso提取总RNA,使用反转录试剂盒将RNA反转录成cDNA,使用TB GreenPremix Ex TaqII (Tli RNaseH Plus) 试剂盒进行实时荧光定量PCR,引物序列见表1。具体步骤按照说明书进行操作。实验独立重复3次。

1.3.4 ELISA检测IL-1 β 、IL-8蛋白表达水平 取对数生长期的BEAS-2B细胞,使用血球计数板进行细胞计数,以 5×10^3 /ml的密度将细胞接种于96孔板(100

表1 实时荧光定量PCR检测IL-1 β 、IL-8 mRNA表达水平的引物序列
Table 1 Primer sequence of IL-1 β and IL-8 mRNA expression levels detected by real-time quantitative PCR

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTGTCTACTTCTCATGG
IL-1 β	AGCTACGAATCTCCGACCAC	CGTTATCCCATCTGTGCAAGAA
IL-8	ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC	AACCTCTGCACCCAGTTTTTC

μ l/孔),将其随机分为空白对照组与5 mmol/L尼古丁组(5 mmol/L尼古丁处理24 h),采用ELISA检测各组IL-1 β 、IL-8蛋白表达水平,具体步骤按照说明书进行操作。实验独立重复3次。

1.3.5 转录组学测序 取对数生长期的BEAS-2B细胞,将其随机分为空白对照组与5 mmol/L尼古丁组(5 mmol/L尼古丁处理24 h),收集各组细胞(每组3个复孔,共6个样品)后送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行转录组学测序。用featureCounts计算映射到每个基因的读数,根据基因的长度计算每个基因的FPKM(每百万碱基对测序的转录本序列片段的每千碱基片段的预期数量),并计算映射到该基因的读数。使用R语言DESeq2包比较空白对照组与5 mmol/L尼古丁组各基因的表达差异,以 $P < 0.05$ 且 $|\log_2FC| \geq 1$ 为标准筛选差异表达基因。

1.3.6 实时荧光定量PCR验证差异表达基因 根据差异表达基因的P值对其进行排序,筛选出P值最小的20个差异表达基因。取对数生长期的BEAS-2B细胞,将其分为空白对照组与5 mmol/L尼古丁组(5 mmol/L尼古丁处理24 h),采用实时荧光定量PCR检测各组差异表达基因的表达水平,以验证转录组学测序结果的可靠性,具体操作步骤同1.3.3,引物序列见表2。

1.3.7 GO功能、KEGG通路富集分析 采用clusterProfiler工具包对差异表达基因进行GO功能富集分析和KEGG通路富集分析,修正其中的基因长度偏差。

1.4 统计学方法 采用GraphPad Prism 9软件进行数据分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-t检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞增殖活性 A组、B组、C组、D组、E组、F组、G组、H组、I组、J组、K组细胞增殖活性分别为(1.00 \pm 0)、(1.03 \pm 0.05)、(1.00 \pm 0.06)、(1.02 \pm 0.07)、(0.96 \pm 0.02)、(0.95 \pm 0.02)、(0.97 \pm 0.01)、(0.94 \pm 0.03)、(0.89 \pm 0.05)、(0.68 \pm 0.02)、(0.39 \pm 0.03)。11组细胞增殖活性比较,差异有统计学意义($F=126.52, P < 0.001$)。其中I组、J组、K组细胞增殖活性低于A组、B组、C组、D组,差异有统计学意义($P < 0.05$);J组、K组细胞增殖活性低于E组、F组、G组、H组、I组,差异有统计学

意义 ($P < 0.05$)；K组细胞增殖活性低于J组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 IL-1 β 、IL-8 mRNA表达水平 5 mmol/L尼古丁组 IL-1 β 、IL-8 mRNA表达水平高于空白对照组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，见表3。

2.3 IL-1 β 、IL-8蛋白表达水平 5 mmol/L尼古丁组 IL-1 β 、IL-8蛋白表达水平高于空白对照组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，见表4。

2.4 转录组学测序结果 共检出24 751个基因，其中7 539个差异表达基因 (3 771个基因表达上调，占50.02%；3 768个基因表达下调，占49.98%)。

2.5 差异表达基因验证结果 P 值最小的20个差异表达基因分别为EGR3、IL-24、NOV、CXCL8、CXCL2、JUN、FASN、HSPA5、AXL、IGFBP4、FADS1、ANXA3、TUBA1A、ACSS2、EZR、STMN3、CPA4、HMGCS1、UCP2、TRIM16L，其中TRIM16L由于引物设计失败未完成验证。实时荧光定量PCR检测结果显示，EGR3、IL-24、NOV、CXCL8、CXCL2、JUN、FASN、HSPA5、AXL、IGFBP4、FADS1、ANXA3、TUBA1A、ACSS2、EZR、STMN3、CPA4、HMGCS1、UCP2表达水平与转录组学检测结果一致，见图1。

2.6 GO功能、KEGG通路富集分析结果 GO功能富集分析结果显示，共富集到7 619个GO功能条目，其中5 825个涉及生物过程 (biological process, BP)、731个涉及细胞组分 (cellular component, CC)、1 063个涉及分子功能 (molecular function, MF)；在BP方面，上述19个差异表达基因主要与DNA复制、辅因子生物合成过程、粒细胞激活、中性粒细胞激活、依赖DNA的DNA复制、中性粒细胞脱颗粒、中性粒细胞介导免疫、中性粒细胞活化参与免疫反应、有丝分裂细胞周期相变、辅酶生物合成过程等相关；在CC方面，上述19个差异表达基因主要与黏着斑、细胞-基质黏附结、细胞基质结、线粒体基质、核被膜、细胞皮层部分、肌动蛋白细胞骨架、皮层细胞骨架、空泡部分、细胞皮层部分等相关；在MF方面，上述19个差异表达基因主要与钙黏着蛋白结合、细胞黏附分子结合、单链RNA结合、鸟嘌呤二核苷酸磷酸 (guanine dinucleotide phosphate, GDP) 结合、肌动蛋白结合、依赖DNA的ATP酶活性、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) 结合、单链DNA结合、辅酶结合、GTPase抑制剂活性等相关，见图2。

KEGG通路富集分析结果显示，共富集到322条KEGG通路，前20条分别为肌动蛋白细胞骨架调节，癌症中miRNA，细胞周期，碳代谢，溶酶体，小细胞肺癌，糖尿病患者糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGE)-糖基化终末产物受体 (receptor

表2 实时荧光定量PCR验证差异表达基因的引物序列

Table 2 Primer sequences of differentially expressed genes verified by real-time fluorescent quantitative PCR

基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTGTCTACTTCTCATCG
EGR3	GACATCGGTCTGACCAACGAG	GGCGAACTTCCCAAGTAGGT
IL-24	TGTGAAAGACACTATGCAAGCTC	GTGACACCATGAGAACAAGTTC
NOV	CACGGCGGTAGAGGGAGATAA	TGGGCCACAGATCCACTTTTC
CXCL8	ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC	AACCCTCTGCACCCAGTTTTC
CXCL2	GCTTGTCTCAACCCCGCATC	TGGATTTCACATTTTTCAGCATCTT
JUN	TGTGTGGAATCAAGCACCTTC	AGGGCTCATCAAAAACCTGTTTC
FASN	CCGAGACACTCGTGGGCTA	CTTCAGCAGGACATTGATGCC
HSPA5	CACGGTCTTTGACCGCAAG	CCAAATAAGCCCTCAGCGGTTT
AXL	GTGGGCAACCCAGGGAATATC	GTACTGTCCCGTGTGCGAAAG
IGFBP4	GGTGACCACCCCAACAACAG	GAATTTTGGCGAAGTCTTCTG
FADS1	CTACCCCGGCTACTTCAC	CGGTGATCACTAGCCACC
ANXA3	TTAGCCCATCAGTGGATGCTG	CTGTGCATTTGACCTCTCACT
TUBA1A	TCGATATTGAGCGTCCAACCT	CAAAGGCACGTTTGGCATACA
ACSS2	AAAGGAGCAACTACCAACATCTG	GCTGAAGTACACACTTGGAC
EZR	ACCAATCAATGTCCGAGTTACC	GCCGATAGTCTTTACCACCTGA
STMN3	CGCACCCCAATACCGTCTAC	GGACAGGTCAGAAGGGGACTT
CPA4	AGGTGGATACTGTTCAATGGGG	TTGCTCATCTCGTCTCCATTTC
HMGCS1	GATGTGGGAATTGTTGCCCTT	ATTGTCTCTGTCCAACCTCCAG
UCP2	GGAGCTGCTCGGAGATACCAA	ACAATGGCATTACGACCAACAT

表3 空白对照组与5 mmol/L尼古丁组IL-1 β 、IL-8 mRNA表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Comparison of mRNA expression levels of IL-1 β and IL-8 between blank control group and 5 mmol/L nicotine group

组别	IL-1 β mRNA	IL-8 mRNA
空白对照组	1.00 \pm 0	1.00 \pm 0
5 mmol/L尼古丁组	1.31 \pm 0.01	1.86 \pm 0.21
t 值	57.250	7.003
P 值	<0.001	<0.001

表4 空白对照组与5 mmol/L尼古丁组IL-1 β 、IL-8蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Comparison of expression levels of IL-1 β and IL-8 protein between blank control group and 5 mmol/L nicotine group

组别	IL-1 β 蛋白	IL-8蛋白
空白对照组	23.14 \pm 3.92	542.59 \pm 59.92
5 mmol/L尼古丁组	36.29 \pm 7.86	1 032.71 \pm 6.05
t 值	3.055	14.100
P 值	<0.001	<0.001

for advanced glycation endproducts, RAGE) 信号通路，细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)-受体相互作用，甘油代谢，缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的降解，核苷酸切除修复，DNA复制，丙酮酸代谢障碍，三羧酸循环，错配修复，乙醛酸盐和二羧酸盐代谢，果糖和甘露

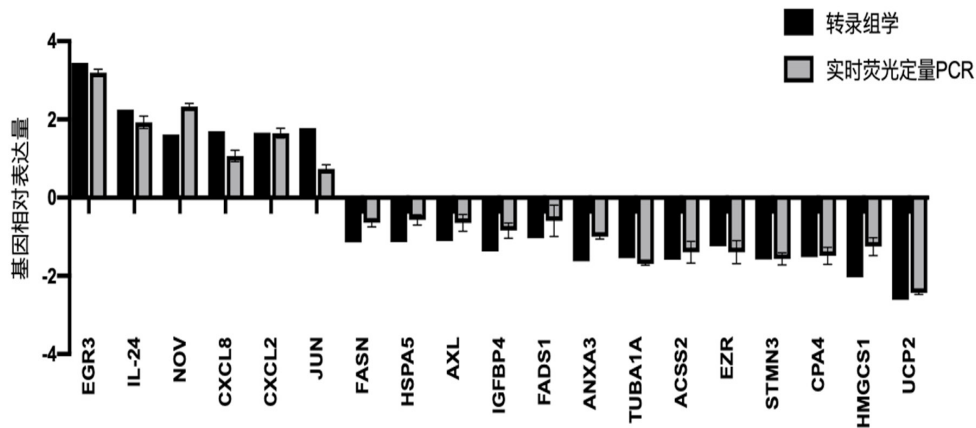
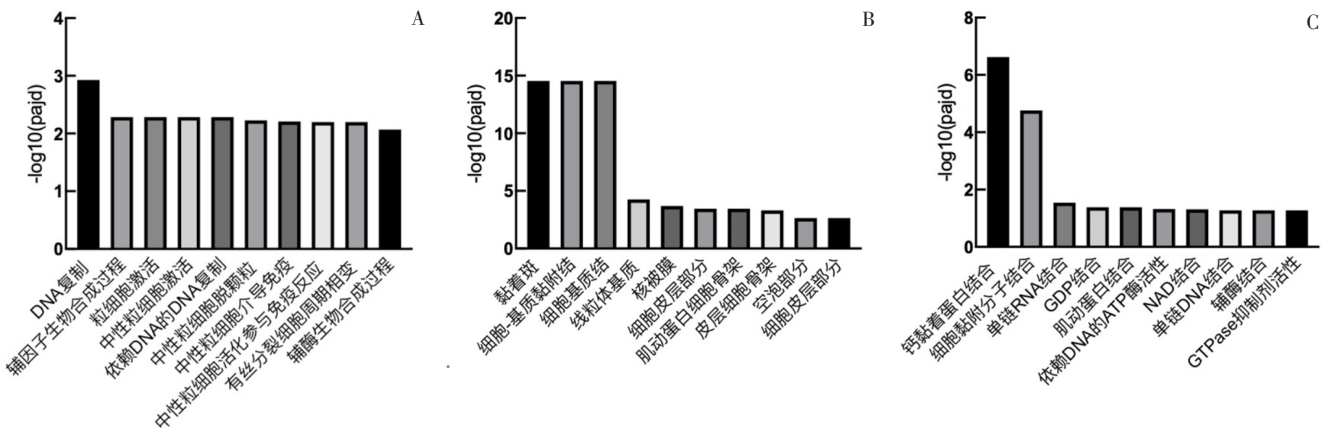


图1 实时荧光定量PCR验证差异表达基因

Figure 1 Verification of differentially expressed genes by real-time fluorescent quantitative PCR



注: A为生物过程, B为细胞组分, C为分子功能; GDP=鸟嘌呤二核苷酸磷酸, NAD=烟酰胺腺嘌呤二核苷酸

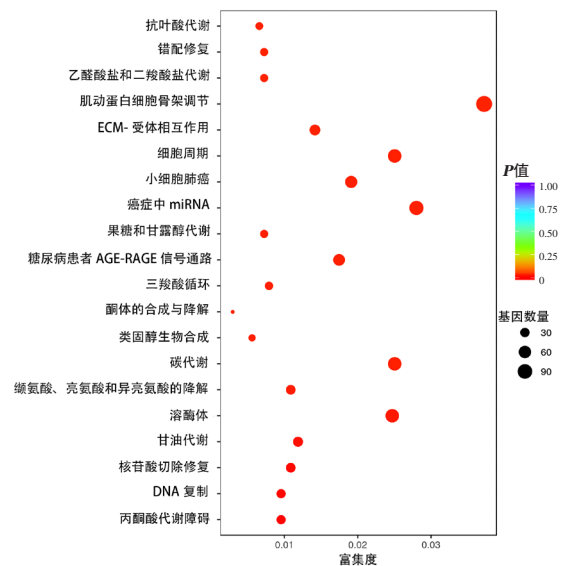
图2 差异表达基因GO功能富集分析结果

Figure 2 Results of GO function enrichment analysis of differentially expressed genes

糖代谢, 抗叶酸代谢, 类固醇生物合成, 酮体的合成与降解, 见图3。

3 讨论

近年来, 尼古丁与炎症反应的关系受到广泛关注, 而炎症是一个涉及多个基因和信号通路的复杂过程。气道上皮细胞作为呼吸道的首要防线, 能很好地抵抗外界有害气体的侵入, 但机体长期暴露于烟草烟雾中, 会使呼吸道承受高浓度尼古丁的浸润。尼古丁不仅是nAChR的激动剂, 可作用于多种生物体中枢和外周神经系统、肌肉以及其他组织^[13], 还是一种亲脂剂, 可以穿透细胞直接影响线粒体呼吸、细胞自噬和细胞信号分子等BP^[14]。尼古丁不断积聚可损坏呼吸道黏膜屏障, 破坏气道上皮细胞的完整性, 造成气道表面纤毛的损伤和倒伏, 气道黏液分泌增多, 最终导致一系列呼吸系统疾病。FENG等^[15]研究发现, 在人牙龈成纤维细胞中, 尼古丁(5 mmol/L)和脂多糖(1 g/ml)可通过蛋白激酶C (protein kinase C, PKC)、磷脂酰肌醇三羟基激酶 (phosphoinositide-3 kinase, PI3K)、有丝分裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)



注: ECM=细胞外基质, AGE=糖基化终末产物, RAGE=糖基化终末产物受体

图3 差异表达基因KEGG通路富集分析结果

Figure 3 Results of enrichment analysis of KEGG pathway of differentially expressed genes

和核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 信号通路抑制多种细胞外基质分子 (I型胶原蛋白、弹性蛋白和纤维连接蛋白), 上调活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-1 β 、IL-6、IL-8等的mRNA和蛋白表达。总的来说, 尼古丁调节炎症反应的信号网络是复杂的, 其可通过信号通路介导迷走神经、T淋巴细胞、单核细胞及中性粒细胞而产生促炎因子或抗炎因子, 还可直接调节免疫细胞介导的细胞因子如IL-8、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、CXCL2等的水平, 因此, 研究尼古丁相关差异表达基因是非常必要的。

本研究结果显示, I组、J组、K组细胞增殖活性低于A组、B组、C组、D组, J组、K组细胞增殖活性低于E组、F组、G组、H组、I组, K组细胞增殖活性低于J组, 提示5 mmol/L为尼古丁的最佳干预浓度。本研究结果还显示, 5 mmol/L尼古丁组IL-1 β 、IL-8 mRNA及其蛋白表达水平均高于空白对照组, 提示尼古丁可诱导气道上皮细胞炎症反应。本研究转录组学测序结果显示, 共检出7 539个差异表达基因, 其中3 771个基因表达上调、3 768个基因表达下调; 且差异表达基因验证结果显示, 实时荧光定量PCR检测的EGR3、IL-24、NOV、CXCL8、CXCL2、JUN、FASN、HSPA5、AXL、IGFBP4、FADS1、ANXA3、TUBA1A、ACSS2、EZR、STMN3、CPA4、HMGCS1、UCP2表达水平与转录组学检测结果一致, 提示这些基因可能是造成气道上皮细胞损伤的重要因子。本研究GO功能富集分析结果显示, 在BP方面, 各基因主要与粒细胞激活、中性粒细胞脱颗粒与相关免疫、细胞有丝分裂等相关; 在CC方面, 各基因主要与黏着斑、细胞-基质黏附结、线粒体基质、肌动蛋白细胞骨架、细胞皮层等相关; 在MF方面, 各基因主要与钙黏着蛋白结合、细胞黏附分子结合、肌动蛋白结合等相关。本研究KEGG通路富集分析结果显示, 共富集到322条KEGG通路, 前4条分别为肌动蛋白细胞骨架调节、癌症中miRNA、细胞周期、碳代谢。

在这些差异表达基因中, IL-24、CXCL8、CXCL2与粒细胞激活、中性粒细胞脱颗粒与免疫反应等相关, 能够介导细胞炎症, 参与呼吸系统疾病的发生与发展。其中IL-24由T淋巴细胞产生, 其除了能通过信号转导和转录激活因子3 (signal transduction and transcription activator 3, STAT3) 和细胞外信号调节激酶1和2 (extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, ERK1/2) 信号通路促进支气管上皮细胞中IL-17A的产生、加剧中性粒细胞气道炎症外, 还在免疫反应、组织稳态、宿主防御和癌基因生成中起重要调节作用^[16-17]。CXCL8由单核巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、T淋巴细胞、上皮细胞和成纤维细胞分泌, 可引导中性粒细胞进入感染部位, 在下呼吸道感染支

气管炎的发病机制中发挥重要作用^[18]。CXCL2与急性肺损伤相关, 其能促进气道平滑肌细胞迁移, 在哮喘气道重塑的发病机制中发挥重要作用^[19-20]。JUN可参与多种细胞过程, 能够调控细胞增殖、分化、迁移和凋亡, 并与Fos蛋白异二聚化或同二聚化而形成活化蛋白1 (activated protein-1, AP-1) 复合物, 其在许多癌症中表达上调^[21]。HSPA5也称GRP78, 可能通过增加坏死性凋亡和激活NF- κ B、AP-1通路来促进香烟烟雾提取物诱导的气道上皮细胞炎症反应^[22]。研究表明, AXL与严重哮喘患者气道上皮细胞炎症反应密切相关, 抑制AXL表达可增加粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) mRNA、蛋白表达水平^[23]。EZR是一种蛋白质编码基因, 作为细胞骨架蛋白的一员, 与细胞-基质黏附结、细胞黏附分子结合、肌动蛋白结合等多种生物学过程密切相关, 是参与肌动蛋白丝交联的关键膜成分之一, 在细胞黏附、迁移、凋亡和表面结构的形成方面发挥作用。同时, EZR通过肌动蛋白细胞骨架调节通路介导信号转导, 通过与黏附分子和各种生长因子受体相互作用来协调动态细胞过程, 保持上皮细胞的细胞骨架和正常形状^[24-25]。另外, EZR还与小细胞肺癌和癌症中miRNA通路相关, 在病理条件下, EZR蛋白被上调和激活, 可促进各种类型上皮癌 (乳腺癌、肺癌和前列腺癌) 的癌症进展和转移^[26]。18 β -甘油酸可通过UCP2抑制线粒体ROS的产生, 从而减轻BEAS-2B细胞中的炎症反应^[27]。限于相关文献较少, 本研究并未进一步分析其余差异表达基因。

综上所述, 尼古丁诱导气道上皮细胞炎症反应的机制可能与EGR3、IL-24、NOV、CXCL8、CXCL2、JUN、FASN、HSPA5、AXL、IGFBP4、FADS1、ANXA3、TUBA1A、ACSS2、EZR、STMN3、CPA4、HMGCS1、UCP2的异常表达有关, 涉及粒细胞激活、中性粒细胞脱颗粒与相关免疫、细胞-基质黏附结、肌动蛋白结合等细胞功能及肌动蛋白细胞骨架调节、癌症中miRNA、细胞周期等通路。本研究通过转录组学对尼古丁引起气道上皮细胞炎症反应的差异表达基因进行了初步验证及相关机制分析, 但没有对差异基因的相关通路做进一步研究, 后续应在细胞和动物模型中通过RNA干扰、过表达或通路抑制进一步验证这些差异表达基因和相关通路在气道上皮细胞炎症反应中的作用, 以期对气道上皮损伤所引起的呼吸系统疾病的诊断与治疗提供新思路。

作者贡献: 李倩进行文章的构思与设计、研究的可行性分析, 撰写论文; 李婧娥、李媛进行样本的收集和处理; 高笑宇进行文章校对; 孙德俊负责文章的质量控制及审核, 并对文章整体负责、监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] WEN H Y, XIE C, WANG F, et al. Trends in disease burden attributable to tobacco in China, 1990–2017: findings from the global burden of disease study 2017 [J]. *Front Public Health*, 2020, 8: 237. DOI: 10.3389/fpubh.2020.00237.
- [2] 王辰, 肖丹, 池慧. 《中国吸烟危害健康报告2020》概要 [J]. *中国循环杂志*, 2021, 36 (10): 937–952.
- [3] 文志高. 香烟中毒物与有害元素对人体的危害 [J]. *世界元素医学*, 2013 (3): 49–52.
- [4] LEE P N, FOREY B A, COOMBS K J. Systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence in the 1900s relating smoking to lung cancer [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 385. DOI: 10.1186/1471-2407-12-385.
- [5] WEN H Y, XIE C, WANG L, et al. Difference in long-term trends in COPD mortality between China and the U.S., 1992–2017: an age-period-cohort analysis [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2019, 16 (9): 1529. DOI: 10.3390/ijerph16091529.
- [6] ROUNDS S, LU Q, SIAMWALA J. Cigarette smoking increases the risk of acute respiratory distress syndrome [J]. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 2022, 132: 224–235.
- [7] BRUNZELL D H, STAFFORD A M, DIXON C I. Nicotinic receptor contributions to smoking: insights from human studies and animal models [J]. *Curr Addict Rep*, 2015, 2 (1): 33–46. DOI: 10.1007/s40429-015-0042-2.
- [8] MCGRATH-MORROW S A, GORZKOWSKI J, GRONER J A, et al. The effects of nicotine on development [J]. *Pediatrics*, 2020, 145 (3): e20191346. DOI: 10.1542/peds.2019-1346.
- [9] LU B, KWAN K, LEVINE Y A, et al. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor signaling inhibits inflammasome activation by preventing mitochondrial DNA release [J]. *Mol Med*, 2014, 20 (1): 350–358. DOI: 10.2119/molmed.2013.00117.
- [10] HOU W, HU S, LI C, et al. Cigarette smoke induced lung barrier dysfunction, EMT, and tissue remodeling: a possible link between COPD and lung cancer [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 2025636. DOI: 10.1155/2019/2025636.
- [11] HERR C, TSITOURAS K, NIEDERSTRAßER J, et al. Cigarette smoke and electronic cigarettes differentially activate bronchial epithelial cells [J]. *Respir Res*, 2020, 21 (1): 67. DOI: 10.1186/s12931-020-1317-2.
- [12] MORRIS A M, LEONARD S S, FOWLES J R, et al. Effects of E-cigarette flavoring chemicals on human macrophages and bronchial epithelial cells [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 18 (21): 11107. DOI: 10.3390/ijerph182111107.
- [13] LU B, KWAN K, LEVINE Y A, et al. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor signaling inhibits inflammasome activation by preventing mitochondrial DNA release [J]. *Molecular Medicine*, 2014, 20 (1): 350. DOI: 10.2119/molmed.2013.00117.
- [14] MALINSKA D, WIECKOWSKI M R, MICHALSKA B, et al. Mitochondria as a possible target for nicotine action [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2019, 51 (4): 259–276. DOI: 10.1007/s10863-019-09800-z.
- [15] FENG K N, MENG P, ZHANG M, et al. IL-24 contributes to neutrophilic asthma in an IL-17A-dependent manner and is suppressed by IL-37 [J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2022, 14 (5): 505–527. DOI: 10.4168/aaair.2022.14.5.505.
- [16] SELVARAJ N, BUDKA J A, FERRIS M W, et al. Extracellular signal-regulated kinase signaling regulates the opposing roles of JUN family transcription factors at ETS/AP-1 sites and in cell migration [J]. *Mol Cell Biol*, 2015, 35 (1): 88–100. DOI: 10.1128/MCB.00982-14.
- [17] MECHTA-GRIGORIOU F, GERALD D, YANIV M. The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity [J]. *Oncogene*, 2001, 20 (19): 2378–2389. DOI: 10.1038/sj.onc.1204381.
- [18] JACOBI H H, POULSEN L K, REIMERT C M, et al. IL-8 and the activation of eosinophils and neutrophils following nasal allergen challenge [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1998, 116 (1): 53–59. DOI: 10.1159/000023925.
- [19] ZHANG H W, WANG Q, MEI H X, et al. RvD1 ameliorates LPS-induced acute lung injury via the suppression of neutrophil infiltration by reducing CXCL2 expression and release from resident alveolar macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 76: 105877. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105877.
- [20] AL-ALWAN L A, CHANG Y, MOGAS A, et al. Differential roles of CXCL2 and CXCL3 and their receptors in regulating normal and asthmatic airway smooth muscle cell migration [J]. *J Immunol*, 2013, 191 (5): 2731–2741. DOI: 10.4049/jimmunol.1203421.
- [21] WESTON C R, DAVIS R J. The JNK signal transduction pathway [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19 (2): 142–149. DOI: 10.1016/j.ceb.2007.02.001.
- [22] WANG Y, ZHOU J S, XU X C, et al. Endoplasmic reticulum chaperone GRP78 mediates cigarette smoke-induced necroptosis and injury in bronchial epithelium [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2018, 13: 571–581. DOI: 10.2147/COPD.S150633.
- [23] ITAKURA K, FUJINO N, KAMIDE Y, et al. Decreased expression of airway epithelial Axl is associated with eosinophilic inflammation in severe asthma [J]. *Allergol Int*, 2022, 71 (3): 383–394. DOI: 10.1016/j.alit.2022.02.010.
- [24] HUNTER K W. Ezrin, a key component in tumor metastasis [J]. *Trends Mol Med*, 2004, 10 (5): 201–204. DOI: 10.1016/j.molmed.2004.03.001.
- [25] POMAZNOY M, HA B, PETERS B. GOnet: a tool for interactive Gene Ontology analysis [J]. *BMC Bioinformatics*, 2018, 19 (1): 470. DOI: 10.1186/s12859-018-2533-3.
- [26] SONG Y N, MA X K, ZHANG M, et al. Ezrin mediates invasion and metastasis in tumorigenesis: a review [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 588801. DOI: 10.3389/fcell.2020.588801.
- [27] KIM Y H, KIM D E, LEE S H. Effects of 18 β -glycyrrhetic acid on fungal protease-induced airway inflammatory responses [J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018: 6461032. DOI: 10.1155/2018/6461032.

(收稿日期: 2022-12-19; 修回日期: 2023-02-14)

(本文编辑: 崔丽红)