

引用本文:徐晨,王胜,李春颖.基于Toll样受体4/核因子 κ B通路观察香烟烟雾溶液刺激对人支气管上皮样细胞相关基因表达的影响[J].安徽医药,2022,26(12):2416-2421.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.12.018.

◇临床医学◇



基于Toll样受体4/核因子 κ B通路观察香烟烟雾溶液刺激对人支气管上皮样细胞相关基因表达的影响

徐晨¹,王胜²,李春颖²

作者单位:¹安徽中医药大学研究生院,安徽 合肥230000;²安徽中医药大学第一附属医院老年病中心呼吸内科,安徽 合肥230000

通信作者:王胜,男,教授,博士生导师,研究方向为中西医结合防治呼吸疾病,Email:ahzyws@163.com

基金项目:安徽省自然科学基金项目(1908085MH288)

摘要: **目的** 观察Toll样受体4(TLR4)基因沉默或过表达后香烟烟雾溶液(CSE)对人支气管上皮样细胞(16HBE)相关基因表达的影响。**方法** 2020年8—12月,用常规培养的人支气管上皮样细胞16HBE作为空白对照组,实验设干扰小RNA(siRNA)TLR4-1组(hs-TLR4-si-1+16HBE)、siRNA TLR4-2组(hs-TLR4-si-2+16HBE)、siRNA TLR4-3组(hs-TLR4-si-3+16HBE),另设阴性对照组(NC+16HBE),实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)筛选TLR4基因最佳沉默效果;自制CSE作用于16HBE,实验设常规培养的16HBE作为空白对照组、CSE组(CSE+16HBE)、siRNA TLR4组(CSE+hs-TLR4-si-2+16HBE)、siRNA TLR4-NC组(CSE+NC+16HBE)、Lv-TLR4组(CSE+Lv-TLR4+16HBE)、Lv-TLR4-NC组(CSE+Lv-TLR4-NC+16HBE),qRT-PCR检测TLR4、核因子 κ B(NF- κ B)以及黏蛋白MUC5AC、MUC7、MUC8基因mRNA的表达。**结果** 与空白对照组相比,siRNA TLR4-2组TLR4 mRNA表达显著降低(1.00 ± 0.22 比 0.47 ± 0.04 , $P < 0.05$),因此选择hs-TLR4-si-2作为TLR4基因沉默的最佳siRNA。与空白对照组相比,CSE组TLR4(1.00 ± 0.09 比 1.81 ± 0.18)、NF- κ B(1.00 ± 0.04 比 1.65 ± 0.11)、MUC5AC(1.00 ± 0.12 比 2.09 ± 0.24)、MUC7(1.00 ± 0.20 比 2.21 ± 0.26)、MUC8(1.00 ± 0.11 比 1.75 ± 0.06)mRNA表达均升高(均 $P < 0.05$);与CSE组相比,CSE+siRNA TLR4组TLR4(1.81 ± 0.18 比 1.43 ± 0.17)、NF- κ B(1.65 ± 0.11 比 1.12 ± 0.05)、MUC5AC(2.09 ± 0.24 比 1.38 ± 0.13)、MUC7(2.21 ± 0.26 比 1.46 ± 0.30)、MUC8(1.75 ± 0.06 比 1.23 ± 0.03)mRNA表达均降低(均 $P < 0.05$),CSE+Lv-TLR4组TLR4(1.81 ± 0.18 比 2.42 ± 0.06)、NF- κ B(1.65 ± 0.11 比 1.94 ± 0.07)、MUC5AC(2.09 ± 0.24 比 2.56 ± 0.19)、MUC7(2.21 ± 0.26 比 2.72 ± 0.33)、MUC8(1.75 ± 0.06 比 2.10 ± 0.10)mRNA表达均升高(均 $P < 0.05$)。**结论** TLR4/NF- κ B信号通路与CSE所产生的气道炎症有关,且其下游相关基因及黏蛋白表达受TLR4基因调控,TLR4的过度表达会加重CSE导致的气道炎症及慢性阻塞性肺疾病(COPD),抑制TLR4/NF- κ B信号通路可在一定程度上减轻CSE所导致的气道炎症及COPD。

关键词: 烟雾吸入损伤; Toll样受体4; 核因子 κ B; 肺疾病,慢性阻塞性; 上皮细胞; 香烟烟雾溶液; 人支气管上皮样细胞; 黏蛋白; 信使RNA

Effects of cigarette smoke solution stimulation on gene expression in human bronchial epithelial-like cells based on the Toll-like receptor 4/nuclear factor κ B pathway

XU Chen¹, WANG Sheng², LI Chunying²

Author Affiliations:¹Graduate School of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230000, China;

²Department of Respiratory Medicine, Geriatrics Center, The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230000, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of cigarette smoke solution (CSE) on the expression of related genes in human bronchial epithelial-like cells after Toll-like receptor 4 (TLR4) gene silencing or overexpression. **Methods** From August to December 2020, conventionally cultured human bronchial epithelial-like cells with 16HBE were used as a blank control group, and experiments were set up for the small interfering RNA (siRNA) TLR4-1 group (hs-TLR4-si-1+16HBE), siRNA TLR4-2 group (hs-TLR4-si-2+16HBE), siRNA TLR4-3 group (hs-TLR4-si-3+16HBE), and another negative control group (NC+16HBE). Real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to determine the best silencing effect of the TLR4 gene. Homemade CSE was applied to 16HBE cells, and experiments were performed with conventional cultured 16HBE cells as a blank control group, CSE group (CSE+16HBE), siRNA TLR4 group (CSE+hs-TLR4-si-2+16HBE), siRNA TLR4-NC group (CSE+NC+16HBE), Lv-TLR4 group (CSE+Lv-TLR4-NC+16HBE), Lv-TLR4 group (CSE+Lv-TLR4-NC+16HBE), and Lv-TLR4-NC group (CSE+Lv-TLR4-NC+16HBE). qRT-PCR was performed to detect the expression of TLR4, nuclear factor- κ B (NF- κ B), and mucin MUC5AC, MUC7, and MUC8

mRNAs. **Results** Compared with the blank control group, TLR4 mRNA expression was significantly lower in the siRNA TLR4-2 group (1.00 ± 0.22 vs. 0.47 ± 0.04) ($P < 0.05$), so hs-TLR4-si-2 was selected as the best siRNA for TLR4 gene silencing. Compared with the blank control group, TLR4 (1.00 ± 0.09 vs. 1.81 ± 0.18), NF- κ B (1.00 ± 0.04 vs. 1.65 ± 0.11), MUC5AC (1.00 ± 0.12 vs. 2.09 ± 0.24), MUC7 (1.00 ± 0.20 vs. 2.21 ± 0.26), and MUC8 (1.00 ± 0.11 vs. 1.75 ± 0.06) mRNA expression were elevated ($P < 0.05$). Compared with the CSE group, TLR4 (1.81 ± 0.18 vs. 1.43 ± 0.17), NF- κ B (1.65 ± 0.11 vs. 1.12 ± 0.05), MUC5AC (2.09 ± 0.24 vs. 1.38 ± 0.13), MUC7 (2.21 ± 0.26 vs. 1.46 ± 0.30), and MUC8 (1.75 ± 0.06 vs. 1.23 ± 0.03) mRNA expression was reduced in the CSE+siRNA TLR4 group ($P < 0.05$), and TLR4 (1.81 ± 0.18 vs. 2.42 ± 0.06), NF- κ B (1.65 ± 0.11 vs. 1.94 ± 0.07), MUC5AC (2.09 ± 0.24 vs. 2.56 ± 0.19), MUC7 (2.21 ± 0.26 vs. 2.72 ± 0.33), and MUC8 (1.75 ± 0.06 vs. 2.10 ± 0.10) mRNA expression was elevated in the CSE+Lv-TLR4 group ($P < 0.05$). **Conclusions** TLR4/NF- κ B signaling pathway is related to airway inflammation produced by CSE, and its downstream related genes and mucin expression are regulated by the TLR4 gene. TLR4 overexpression can aggravate airway inflammation and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) caused by CSE, and inhibition of the TLR4/NF- κ B signaling pathway can reduce airway inflammation and COPD caused by CSE to some extent.

Key words: Smoke inhalation injury; Toll-like receptor 4; Nuclear factor-kappa B; Pulmonary disease, chronic obstructive; Epithelial cells; Cigarette smoke solution; 16HBE; Mucin; Messenger RNA

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是呼吸系统临床常见病、多发病。2021 GOLD指南中将其明确定义为: COPD是一种常见的、可预防和可治疗的疾病,这是因气道和(或)肺泡异常所致,通常由于大量暴露于有毒颗粒或气体并受到宿主因素的影响(包括肺部发育异常)。在我国,COPD总患病人数约1亿^[1],其中60岁以上人群患病率超过27%。COPD患病人数多,患病人群病死率高,生活质量和劳动能力严重下降,对家庭和社会经济造成巨大负担,已成为一个亟须解决的重要公共卫生问题。目前已知气道炎症和黏液高分泌是COPD的显著特征,Toll样受体4(TLR4)/核因子 κ B(NF- κ B)信号参与COPD气道炎症反应,黏蛋白(MUC)是COPD气道黏液高分泌的主要成分^[2]。因此,本实验于2020年8—12月通过沉默和过表达TLR4基因,利用实时荧光定量PCR法检测香烟烟雾溶液(cigarette smoke extract, CSE)对人支气管上皮样细胞16HBE TLR4/NF- κ B信号通路相关基因TLR4、NF- κ B、MUC5AC、MUC7、MUC8 mRNA的表达,进一步阐释TLR4/NF- κ B信号通路在COPD发生中的机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人支气管上皮样细胞16HBE,购自上海中乔新舟生物科技有限公司;DMEM高糖培养基购自美国Gibco公司,胎牛血清(FBS)购自日本HAKATA公司;lipo8000转染试剂购自碧云天公司;TLR4沉默干扰小RNA(siRNA)序列由上海汉恒生物公司合成;TLR4过表达质粒由上海吉凯基因公司合成;RNA提取试剂盒购自Life technologies公司;逆转录试剂盒购自TaKaRa公司,PCR引物由Sangon Biotech公司合成;酶标仪购自美国伯腾仪器有限公司;荧光定量PCR仪购自德国罗氏诊断有限公司;恒温细胞培养箱购自美国Nuair公司;超净工作台购自苏

州安泰空气技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 香烟烟雾溶液(CSE)的制备 自制简易提取CSE的气体抽动装置,用1支香烟(雄狮牌,每支焦油含量8 mg,尼古丁含量0.7 mg,烟气一氧化碳含量10 mg)连接胶管,另一头胶管连接至装有DMEM高糖培养基的无菌培养瓶,开动开关后香烟烟雾抽吸至培养基中,至香烟燃至5 mm处关闭开关,轻轻摇晃培养瓶至无烟雾,0.22 μ m滤头过滤CSE后转移至新的无菌培养瓶,酶标仪320 nm波长下检测吸光度,当吸光度为 1.00 ± 0.05 时定义该溶液为100% CSE^[3], -80°C 超低温冰箱储存,每次实验前取出现配现用。

1.2.2 细胞培养与传代 将人支气管上皮样细胞16HBE细胞冻存管从 -196.0°C 液氮罐中取出,迅速放入 37.0°C 水浴锅中快速摇晃至细胞悬液融化。在超净台内将细胞悬液移至含5 mL完全培养基(10%FBS、1%青-链霉素双抗溶液的90%DMEM高糖培养基)的15 mL离心管中,高速离心机1 200 r/min离心5 min后弃去上清。再加入5 mL完全培养基轻轻吹打细胞沉淀至均匀,将细胞悬液移至T25细胞培养瓶中,置于 37.0°C 、90%湿度、5%二氧化碳无菌培养箱中正常培养。2~3 d更换新鲜的完全培养基,当细胞长至培养瓶底面积80%~90%时即可传代。

1.2.3 TLR4基因最佳沉默效果筛选 (1)TLR4的siRNA序列由上海汉恒生物科技生物公司设计合成,包含3条不同序列的核苷酸链,以筛选出沉默效果最佳的siRNA,序列如表1所示。

(2)转染前24 h,在6孔板中用不含双抗的完全培养基中接种 $(2.0 \pm 0.2) \times 10^5/\text{mL}$ 密度的16HBE,每孔1.5 mL,共设3个复孔,另设一组空白对照组及阴

性对照NC组。各观测资料的样本量为3个平行样×2次观测=6。实验分组及处理方法如表2所示。

(3)用250 μL DMEM 稀释5 μL siRNA,再用250 μL的DMEM培养基稀释5 μL的lipo8000,轻轻吹吸3~5次混匀,室温下静置5 min。混合siRNA稀释液和转染试剂,室温下静置20 min。将转染复合物加入到6孔板中,每孔500 μL,前后轻摇培养板混合均匀,将培养板置于培养箱中。转染完成后24 h取出培养板,收集细胞,使用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测目的基因TLR4的沉默效果,筛选沉默效率最高的siRNA。

表1 核苷酸链序列

名称	序列(5'-3')
hs-TLR4-si-1	正向: CAGCAAUCUCACUUCUGUAdTdT 反向: UACAGAAGUGAGAUUGCUGdTdT
hs-TLR4-si-2	正向: GAAAUAGGGAGUUGUCUAAAdTdT 反向: UUAGACAACUCCUAUUUCdTdT
hs-TLR4-si-3	正向: GCUUAUAUCCUUAAGAAAdTdT 反向: UUUCUUUAAGGAUAUAAGCdTdT
NC	正向: UUCUCCGACGUGUCACGUdTdT 反向: ACGUGACACGUUCGGAGAAAdTdT

表2 Toll样受体4(TLR4)基因沉默筛选实验分组及干预方法

组别	干预方法
A组:空白对照	DMEM
B组:siRNA TLR4-NC	DMEM+NC
C组:siRNA TLR4-1	DMEM+hs-TLR4-si-1
D组:siRNA TLR4-2	DMEM+hs-TLR4-si-2
E组:siRNA TLR4-3	DMEM+hs-TLR4-si-3

1.2.4 TLR4基因过表达转染 将处于对数生长期的16HBE消化、离心、重悬后以 $(2.0 \pm 0.2) \times 10^5/\text{mL}$ 密度均匀铺种于6孔板,每孔2 mL完全培养基培养24 h。24 h后细胞长至70%~80%后取出,更换新鲜完全培养基。准备无菌无酶的1.5 mL EP管,各EP管中加入125 μL预热的不含血清及双抗的DMEM高糖培养基,再向其中1管加入2 μL过表达Lv-TLR4质粒,另外1管加入等量的Lv-TLR4-NC(阴性对照)质粒,移液枪吹打3~5次,各管再加入4 μL Lipo8000转染试剂,轻轻吹打混匀,室温下孵育10 min使复合物充分结合。轻轻前后水平摇晃培养板,将培养板放入培养箱中继续培养。

1.2.5 qRT-PCR法检测TLR4基因沉默和过表达后16HBE中相关基因mRNA的表达 (1)实验分组如表3。(2)收集各组细胞沉淀,TRIzol试剂提取细胞RNA,再将各组RNA逆转录成cDNA,qRT-PCR检测各组16HBE中TLR4、NF-κB、MUC5AC、MUC7、MUC8 mRNA表达水平,各检测指标引物如表4所

示。(3)得到各组的Ct值后保存,按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的扩增倍数。

表3 实验分组及干预方法

组别	干预方法
A组:空白对照	DMEM
B组:CSE	DMEM+CSE
C组:CSE+siRNA TLR4-NC	DMEM+CSE+NC
D组:CSE+siRNA TLR4	DMEM+CSE+hs-TLR4-si-2
E组:CSE+Lv-TLR4-NC	DMEM+CSE+Lv-TLR4-NC
F组:CSE+Lv-TLR4	DMEM+CSE+Lv-TLR4

注:CSE为香烟烟雾溶液,TLR4为Toll样受体4。

1.3 统计学方法 采用SPSS 26.0软件进行统计。定量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组间的两两比较采用SNK-*q*检验。 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TLR4基因最佳沉默效果筛选 与空白对照组(A组)相比,siRNA TLR4-1、2、3组(C、D、E组)TLR4 mRNA表达均降低($P < 0.05$)。与siRNA TLR4-1组(C组)相比,siRNA TLR4-2组(D组)TLR4 mRNA表达降低($P < 0.05$);其中siRNA TLR4-2组(D组)TLR4 mRNA表达最低。因此在后续实验中,选择hs-TLR4-si-2作为TLR4基因沉默的最佳siRNA。见表5。

表5 TLR4基因最佳沉默效果筛选实验中各组TLR4 mRNA相对表达量比较 $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	$2^{-\Delta\Delta C_t}$
A组:空白对照	6	1.00±0.22
B组:siRNA TLR4-NC	6	0.98±0.21
C组:siRNA TLR4-1	6	0.80±0.09 ^{①②}
D组:siRNA TLR4-2	6	0.47±0.04 ^{①②③}
E组:siRNA TLR4-3	6	0.62±0.05 ^{①②③}
F值		16.94
P值		<0.001

注:TLR4为Toll样受体4。

①和A组相比, $P < 0.05$ 。②和B组相比, $P < 0.05$ 。③和C组相比, $P < 0.05$ 。

2.2 TLR4基因沉默和过表达后16HBE中相关基因mRNA的表达 与空白对照组(A组)相比,实验组各指标mRNA表达均升高($P < 0.05$);与CSE组(B组)相比,CSE+siRNA TLR4组(D组)各指标mRNA降低,CSE+Lv-TLR4组(F组)各指标mRNA表达升高($P < 0.05$)。与CSE+siRNA TLR4-NC组(C组)相比,CSE+siRNA TLR4组(D组)TLR4 mRNA降低($P < 0.05$);与CSE+Lv-TLR4-NC组(E组)相比,CSE+Lv-TLR4组(F组)TLR4 mRNA表达升高($P < 0.05$)。见表6。

表4 各检测指标引物序列

基因	序列长度/bp	正向(5'→3')	反向(5'→3')
β-actin	96	CCCTGGAGAAGAGCTACGAG	GGAAGGAAGGCTGGAAGAGT
TLR4	144	GCCACATGTCAGGCCTTATG	TTGGTTGAAATGCCACCTG
MUC5AC	134	GACACCAAATACGCCAACA	GGGTCGTCCATCTTCTGC
NF-κB	110	GGGATGGCTTCTATGAGGC	CTGACTGATAGCCTGCTCCA
MUC7	83	ATGTCTGCACAAACGCTGTA	TAGGTGGCTGGTGAGGAT
MUC8	191	TCITCCTGCTTCTGTTTGTG	TTGTGATGCTGCATACCTTGA

注:β-actin为β肌动蛋白,TLR4为Toll样受体4,MUC为黏蛋白,NF-κB为核因子κB。

表6 TLR4基因沉默和过表达后各组TLR4、NF-κB、MUC5AC、MUC7、MUC8 mRNA相对表达量比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	TLR4	NF-κB	MUC5AC	MUC7	MUC8
A组:空白对照	6	1.00±0.09	1.00±0.04	1.00±0.12	1.00±0.20	1.00±0.11
B组:CSE	6	1.81±0.18 ^①	1.65±0.11 ^①	2.09±0.24 ^①	2.21±0.26 ^①	1.75±0.06 ^①
C组:CSE+siRNA TLR4-NC	6	1.91±0.22 ^①	1.66±0.10 ^①	2.13±0.18 ^①	2.27±0.42 ^①	1.82±0.03 ^①
D组:CSE+siRNA TLR4	6	1.43±0.17 ^{①②③}	1.12±0.05 ^{②③}	1.38±0.13 ^{①②③}	1.46±0.30 ^{①③}	1.23±0.03 ^{①②③}
E组:CSE+Lv-TLR4-NC	6	1.83±0.15 ^{①④}	1.68±0.11 ^{①④}	2.16±0.12 ^{①④}	2.29±0.34 ^{①④}	1.77±0.06 ^{①④}
F组:CSE+Lv-TLR4	6	2.42±0.06 ^{①②③④⑤}	1.94±0.07 ^{①②③④⑤}	2.56±0.19 ^{①②③④⑤}	2.72±0.33 ^{①③④⑤}	2.10±0.10 ^{①②④⑤}
F值		96.18	57.61	80.42	22.75	44.19
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:TLR4为Toll样受体4,NF-κB为核因子κB,MUC为黏蛋白,CSE为香烟烟雾溶液。

①和A组相比, $P<0.05$ 。②和B组相比, $P<0.05$ 。③和C组相比, $P<0.05$ 。④和D组相比, $P<0.05$ 。⑤和E组相比, $P<0.05$ 。

3 讨论

目前已知COPD发病与香烟烟雾及环境颗粒物关系密切,香烟烟雾及环境颗粒物中至少包含7 000种化学物质和至少70种致癌物质^[4-5]。香烟烟雾进入气道后会导致气道黏膜的通透性增加,使气道黏膜物理屏障的作用及黏膜纤毛清除系统能力降低,从而抗氧化剂、蛋白酶抑制剂和抗菌肽生成不足,免疫细胞反应活性下调,参与COPD发病的关键过程^[6]。其特征性病理改变为气道的慢性炎症和黏液高分泌,黏液高分泌导致多痰,在病人肺的不同部位有肺泡巨噬细胞、T淋巴细胞和中性粒细胞增加,激活的炎症细胞释放多种炎性介质包括白细胞介素(IL)-6、IL-8、肿瘤坏死因子α(TNF-α)及其他炎性介质,这些介质能破坏肺的结构和促进炎症反应从而导致COPD发生发展。研究发现,慢阻肺急性加重老年病人病人出现肺功能进行性下降,血清白蛋白、前白蛋白和体质量指数均会降低^[7]。研究表明,CSE可在多种肺泡上皮细胞系如人肺腺癌上皮细胞A549、肺乳头状腺癌上皮细胞H441等以及人原代小气道上皮细胞SAEC中引起氧化应激反应,CSE在SAEC中触发NF-κB活化并且使促炎细胞因子释放,而在所研究的任何转化上皮细胞系中都没有^[8]。此外,在多种原代上皮细胞系的研究中^[9],16HBE比其他支气管上皮样细胞如BEAS-2B具有更强的细胞间接触性以及更高的抗性,这使得处在胞间的黏附因子紧密连接蛋白ZO-1和上皮钙黏素(E-cad-

herin)在16HBE中表达最高。黏附分子ZO-1及E-cadherin分别参与了形成了与气道上皮屏障功能有关的紧密连接和黏附连接^[10],这些连接限制了细胞旁通透性,阻止了过敏原等微生物进入了气道上皮下层。研究发现,哮喘病人的气道上皮经常受损,通透性增加,导致ZO-1及E-cadherin的表达减少^[11-12]。不仅如此,与16HBE细胞相比,BEAS-2B损伤后屏障功能的恢复受损,这也预示着16HBE细胞更适合用于屏障形成的研究,这些研究结果表明16HBE细胞可作为研究支气管上皮屏障功能和损伤后细胞间连接重建的合适模型。因此实验通过CSE对16HBE细胞刺激,拟造出符合COPD的细胞模型。

Toll样受体(TLRs)是一类对病原相关分子模式特异性识别的模式受体家族,目前由10个成员组成(TLR1~10),TLRs的细胞质部分与IL-1受体家族高度相似,被称为TIR结构域(TIR),已证实每种TLRs均能识别病原体的特定组分,从而证明哺乳动物免疫系统通过TLRs识别微生物成分来检测病原体侵袭^[13]。其中TLR4为一种跨膜蛋白,通过高效能识别模式可有效识别大部分革兰阴性菌及病毒抗原,例如革兰阴性菌的脂多糖即是TLR4的配体,这种微生物识别系统的核心特征之一就是TLRs激活微生物攻击的免疫应答至关重要的信号通路,所有TLRs激活一个共同的信号通路导致NF-κB的激活^[14]。TLR4受脂多糖等刺激信号刺激,使用TIR结

构域的衔接蛋白 MyD88, 进行一系列磷酸化及泛素化级联活动激活 NF- κ B, 进入核内与 DNA 特定位点结合, 启动其靶基因转录, 释放表达炎症细胞因子, 通过炎症因子的释放进一步诱导黏蛋白 MUC 过量产生。此外, NF- κ B 信号除了上述途径间接刺激黏蛋白分泌, 还可直接诱导黏蛋白 MUC 的产生和合成。MUC, 具有黏弹性质的复合糖蛋白, 其转录产物可通过糖基化的不同翻译修饰后产生多种蛋白质, 上述论述已知目前被鉴定黏蛋白基因中研究最广泛的是 MUC5AC, 该基因主要从气道黏膜下腺释放。研究证明 MUC5AC 是可被诱导产生的, COPD 与气道 MUC5AC 表达增加有关, 且 MUC5AC 的表达与气流阻塞程度相关^[15]。而且香烟烟雾刺激可增加 COPD 气道上皮细胞中 TLRs 诱导的 MUC5AC 的产生^[16]。Kesimer 等^[17]研究发现, 各种黏蛋白均在特定的细胞中存在, MUC5AC 定位于浅表气道杯状细胞, MUC7 定位于黏膜下腺浆液细胞, MUC8 定位于黏膜下腺黏液细胞。这些细胞所分泌的黏蛋白共同排列形成了一个双层的气道表面黏液屏障^[18]。因此对于上述黏蛋白的研究有助于了解 COPD 病人黏蛋白调控的机制。

本实验通过对 TLR4 基因的沉默以及过表达研究得知: CSE 可激活 TLR4/NF- κ B 信号通路, 使 TLR4 基因 mRNA 表达升高, 其下游分子 NF- κ B 及 MUC5AC、MUC7、MUC8 mRNA 表达升高。对 TLR4 基因进行沉默干扰后, TLR4/NF- κ B 信号通路的激活上调, TLR4 基因 mRNA 表达降低, 下游分子 NF- κ B 及 MUC5AC、MUC7、MUC8 mRNA 表达降低。而当 TLR4 基因过度表达后, TLR4/NF- κ B 信号通路的过度激活使 TLR4 基因 mRNA 表达显著升高, 信号通路下游的 NF- κ B 及 MUC5AC、MUC7、MUC8 mRNA 表达升高。这表明 TLR4/NF- κ B 信号通路与 CSE 所产生的气道炎症有关, 且其下游相关基因及黏蛋白表达受 TLR4 基因调控, TLR4 通过衔接蛋白 MyD88 诱导 NF- κ B 信号通路^[19], TLR4 的过度表达会加重 CSE 导致的气道炎症及 COPD, 抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路可在一定程度上减轻 CSE 所导致的气道炎症及 COPD。杨丽霞等^[20]研究发现, COPD 病人外周血细胞中 TLR4、MyD88、NF- κ B mRNA 水平显著升高, 急性加重期病人上述指标最高, 说明 TLR4/NF- κ B 信号通路处于活化状态, 且其活化程度与 COPD 病情危重程度有关。

综上所述, CSE 刺激下的 16HBE 细胞中 TLR4、NF- κ B 及黏蛋白 MUC5AC、MUC7、MUC8 的表达与 TLR4/NF- κ B 信号通路有关, TLR4/NF- κ B 信号通路与 COPD 发生机制密切相关, 这为研究 COPD 发病

机制提供了实验证据, 并且为之后药物干预 COPD 抑制气道炎症和黏液高分泌带来新的理论支持。

参考文献

- [1] WANG C, XU J, YANG L, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health [CPH] study): a national cross-sectional study [J]. *The Lancet*, 2018, 391(10131):1706-1717.
- [2] 王胜, 熊玲玲, 邓雪, 等. 氨茶碱和辛伐他汀对慢性阻塞性肺疾病大鼠气道炎症和黏液高分泌的影响 [J]. *中南大学学报*, 2016, 41(1):37-43.
- [3] FACCHINETTI F, AMADEI F, GEPPETTI P, et al. Alpha,beta-unsaturated aldehydes in cigarette smoke release inflammatory mediators from human macrophages [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 37(5):617-623.
- [4] VOGELMEIER CF, CRINER GJ, MARTINEZ FJ, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 report. GOLD executive summary [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 195(5):557-582.
- [5] AGHAPOUR M, RAEE P, MOGHADDAM SJ, et al. Airway epithelial barrier dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: role of cigarette smoke exposure [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018, 58(2):157-169.
- [6] VAN DER TOORN M, REZAYAT D, KAUFFMAN HF, et al. Lipid-soluble components in cigarette smoke induce mitochondrial production of reactive oxygen species in lung epithelial cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 297(1):L109-L114.
- [7] 朱红娟, 殷晓明. 慢性阻塞性肺疾病急性加重期老年病人血清白蛋白、前白蛋白、体质量指数与肺通气功能的相关性 [J]. *安徽医药*, 2020, 24(8):1558-1561.
- [8] KODE A, YANG SR, RAHMAN I. Differential effects of cigarette smoke on oxidative stress and proinflammatory cytokine release in primary human airway epithelial cells and in a variety of transformed alveolar epithelial cells [J]. *Respir Res*, 2006, 7(1):132.
- [9] HEIJINK IH, BRANDENBURG SM, Noordhoek JA, et al. Characterisation of cell adhesion in airway epithelial cell types using electric cell-substrate impedance sensing [J]. *Eur Respir J*, 2010, 35(4):894-903.
- [10] GLOUSHANKOVA NA, RUBTSOVA SN, ZHITNYAK IY. Cadherin-mediated cell-cell interactions in normal and cancer cells [J]. *Tissue Barriers*, 2017, 5(3):e1356900. DOI: 10.1080/21688370.2017.1356900.
- [11] SONG J, ZHAO H, DONG H, et al. Mechanism of E-cadherin redistribution in bronchial airway epithelial cells in a TDI-induced asthma model [J]. *Toxicol Lett*, 2013, 220(1):8-14.
- [12] 吴毅, 孔潇, 李沁原, 等. 新生期小鼠肺炎链球菌肺炎对气道上皮损伤的影响 [J]. *解放军医学杂志*, 2019, 44(11):919-924.
- [13] TAKEDA K, AKIRA S. TLR signaling pathways [J]. *Semin Immunol*, 2004, 16(1):3-9.
- [14] SATOH T, AKIRA S. Toll-like receptor signaling and its inducible proteins [J]. *Microbiol Spectr*, 2016, 4(6):0040-2016. DOI: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0040-2016.
- [15] CARAMORI G, CASOLARI P, DI GREGORIO C, et al. MUC5AC expression is increased in bronchial submucosal glands of stable

- COPD patients[J]. Histopathology, 2009, 55(3): 321-331.
- [16] KANAI K, KOARAI A, SHISHIKURA Y, et al. Cigarette smoke augments MUC5AC production via the TLR3-EGFR pathway in airway epithelial cells [J]. Respiratory Investigation, 2015, 53(4): 137-148.
- [17] KESIMER M, EHRE C, BURNS KA, et al. Molecular organization of the mucins and glycocalyx underlying mucus transport over mucosal surfaces of the airways [J]. Mucosal Immunol, 2013, 6(2): 379-392.
- [18] BUTTON B, CAI LH, EHRE C, et al. A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia[J]. Science, 2012, 337(6097): 937-941.
- [19] PŁÓCIENNIKOWSKA A, HROMADA-JUDYCKA A, BORZECKA K, et al. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling [J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(3): 557-581.
- [20] 杨丽霞, 贾钦尧, 陈艳, 等. Toll样受体 2、4/MyD88/NF- κ B 信号通路及相关分子在 COPD 发病机制中的作用及临床意义[J]. 西部医学, 2020, 32(12): 1811-1815, 1820.
- (收稿日期: 2021-03-04, 修回日期: 2021-03-30)

引用本文: 张梦婷, 王采集, 徐冰, 等. 良性阵发性位置性眩晕 87 例发病危险因素研究[J]. 安徽医药, 2022, 26(12): 2421-2424. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.12.019.

◇临床医学◇



良性阵发性位置性眩晕 87 例发病危险因素研究

张梦婷, 王采集, 徐冰, 陈敏, 李宛桐, 张世丽, 乔月华

作者单位: 徐州医科大学附属医院耳鼻喉科, 江苏 徐州 221000

通信作者: 乔月华, 女, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为耳鸣耳聋与眩晕, Email: oto8558@163.com

基金项目: 国家自然科学基金项目(81470684)

摘要: **目的** 探索原发性良性阵发性位置性眩晕(BPPV)发病危险因素。**方法** 选取于徐州医科大学附属医院住院并确诊 BPPV 病人 87 例为研究组, 选择同期于该院体检健康者 51 例为对照组。收集两组间一般资料、既往病史、颈部超声、血脂分析及头颅 CT 等指标, 采用散射比浊分析仪测定脂蛋白磷脂酶 A2(Lp-PLA2)。**结果** 研究组颈部斑块检出率为 44.83%(39/87), 高于对照组 19.61%(10/51)($P < 0.05$)。研究组 Lp-PLA2 水平平均秩次 76.02, 比对照组 58.38 高($P < 0.05$)。研究组高血压、高脂血症、腔隙性脑梗死病史检出率分别为 16.10%(14/87)、41.38%(36/87)、63.22%(55/87), 分别高出对照组 3.92%(2/51)、8.05%(7/51)、39.22%(20/51)($P < 0.05$); 进行单因素分析筛选相关性较强的因素($P < 0.05$), 纳入多因素 logistic 回归分析提示合并腔隙性脑梗死($OR = 3.13$)、颈部斑块($OR = 3.63$)、高脂血症($OR = 4.40$)及 Lp-PLA2 水平($OR = 1.97$)是原发性 BPPV 发病的独立危险因素($P < 0.05, OR > 1$)。**结论** 腔隙性脑梗死、颈部斑块、高脂血症及 Lp-PLA2 水平是原发性 BPPV 发病的独立危险因素。

关键词: 良性阵发性位置性眩晕; 脂蛋白相关磷脂酶 A2; 颈动脉狭窄; 高脂血症; 动脉粥样硬化; 超声检查, 多普勒, 彩色

Study of risk factors for the development of benign paroxysmal positional vertigo in 87 cases

ZHANG Mengting, WANG Caiji, XU Bing, CHEN Min, LI Wantong, ZHANG Shili, QIAO Yuehua

Author Affiliation: Department of Otolaryngology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221000, China

Abstract: **Objective** To explore the risk factors for the development of benign paroxysmal positional vertigo (BPPV). **Methods** A total of 87 patients hospitalized at the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University with confirmed BPPV were selected as the study group, and 51 healthy individuals who were examined at the hospital during the same period were selected as the control group. General information, past medical history, neck ultrasound, blood lipid analysis and head CT were collected between the two groups, and lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) was measured by a scattering turbidimetric analyzer. **Results** The detection rate of neck plaque in the study group was 44.83% (39/87), which was higher than that of 19.61% (10/51) in the control group ($P < 0.05$). The mean rank of Lp-PLA2 level was 76.02 in the study group, which was higher than that of 58.38 in the control group ($P < 0.05$). The detection rates of hypertension, hyperlipidemia, and history of lacunar cerebral infarction in the study group were 16.10% (14/87), 41.38% (36/87), 63.22% (55/87), respectively, which were higher than those of the control group (3.92% (2/51), 8.05% (7/51), and 39.22% (20/51), respectively) ($P < 0.05$). Single-factor analysis was performed to screen for strong correlations ($P < 0.05$), and inclusion of multivariate logistic regression analysis suggested that the combination of lacunar cerebral infarction ($OR = 3.13$), neck plaque ($OR =$