

## 橄榄苦苷抑制丙烯醛诱导的 HBE 细胞内质网应激的机制研究

徐朝琪,许玉宇,姜盼,冯晴\*

(南京医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学系,江苏 南京 211166)

**[摘要]** **目的:**探讨橄榄苦苷(oleuropein, OP)和丙烯醛(acrolein, ACR)对人支气管上皮样细胞(human bronchial epithelial cells, HBE)内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)相关的增殖与凋亡影响的可能机制。**方法:**OP与ACR联合处理HBE细胞,MTT比色法检测细胞存活率,Hoechst33258染色法和流式细胞检测细胞凋亡,Western blot检测ERS相关蛋白葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78, GRP78)和CCAAT增强子结合蛋白同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)的表达,Real-time PCR法检测GRP78和CHOP mRNA表达;雄性Sprague-Dawley大鼠经ACR腹腔注射和(或)橄榄叶提取物(olive leaf extract, OLE)灌胃处理,取大鼠肺组织,Western blot法检测ERS相关蛋白GRP78和CHOP的表达,Real-time PCR法检测GRP78和CHOP mRNA表达。**结果:**体外实验证实ACR可以抑制HBE细胞的增殖,诱导其凋亡;联合OP处理后,ACR抑制细胞增殖、促进细胞凋亡的作用明显受到抑制;同时,ACR上调HBE细胞中ERS相关蛋白GRP78和CHOP的表达,联合OP可抑制GRP78和CHOP的表达;在mRNA水平上,ACR单独处理上调了ERS相关分子GRP78和CHOP的mRNA表达水平,而联合OP处理,GRP78和CHOP的mRNA水平未见明显变化;Sprague-Dawley大鼠体内实验结果与体外细胞实验基本一致。**结论:**ACR抑制HBE细胞增殖,促发ERS,进而诱导HBE细胞凋亡。在蛋白质翻译水平上,OP可以通过抑制ERS途径,拮抗ACR诱导的细胞凋亡效应。

**[关键词]** 橄榄苦苷;丙烯醛;HBE细胞;内质网应激

**[中图分类号]** R124

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)09-1124-07

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170911

## Mechanism study of oleuropein inhibiting endoplasmic reticulum stress induced by acrolein in HBE cells

Xu Chaoqi, Xu Yuyu, Jiang Pan, Feng Qing\*

(Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, NJMU, Nanjing 211166, China)

**[Abstract]** **Objective:**To study the effect of oleuropein in combination of acrolein on proliferation and apoptosis related to endoplasmic reticulum stress(ERS) in human bronchial epithelial cells. **Methods:**HBE cells were treated with oleuropein and acrolein. MTT assay was performed to detect cell viability. Plate clone formation assay was used to get colony forming efficiency. Hoechst 33258 staining and flow cytometric assay were applied to investigate the apoptosis of cells. The levels of ERS biomarkers including glucose-regulated protein 78(GRP78) and C/EBP homologous protein(CHOP) were measured by Western blot. The mRNA expressions of GRP78 and CHOP were analyzed by real-time PCR. Twelve male Sprague-Dawley rats were treated with acrolein alone through intraperitoneal injection, or olive leaf extract in combination through gavage. Lung tissues were obtained from the rats for detecting the expressions of GRP78 and CHOP. **Results:**HBE cell proliferation was inhibited by acrolein in a dose dependent manner. Cell proliferation increased significantly with the combination of oleuropein. Oleuropein combined with acrolein also inhibited acrolein-induced apoptosis in HBE cells. Western blot demonstrated that ERS biomarkers such as GRP78 and CHOP were induced by acrolein combined with oleuropein, acrolein-induced ERS was alleviated. However, oleuropein had no effects on the GRP78 and CHOP mRNA expression. The *in vivo* results of Sprague-Dawley rats were in agreement with those *in vitro*. **Conclusion:**Acrolein could trigger ERS in HBE cells and lead to cell apoptosis. Nevertheless, oleuropein in combination with acrolein could inhibit the acrolein-induced apoptosis. The potential mechanism may be related with the alleviation of acrolein-induced ERS. In protein translational level, oleuropein can inhibit apoptosis induced by acrolein via ERS pathway.

**[Key words]** oleuropein; acrolein; HBE cells; endoplasmic reticulum stress

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(09): 1124-1130]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81472977);江苏高校优势学科建设工程资助项目

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: qingfeng@njmu.edu.cn

丙烯醛(acrolein, ACR)是一种广泛分布于自然环境中的污染物,已被证实与多种疾病的发生密切相关,如慢性阻塞性肺疾病、肺癌<sup>[1]</sup>、动脉粥样硬化和其他心血管疾病<sup>[2]</sup>等。此外,ACR 可造成蛋白损伤<sup>[3]</sup>,引起未折叠蛋白累积而引发内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)<sup>[4]</sup>。内质网中未折叠蛋白和错误折叠蛋白的累积可引起 ERS,进而引发未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)和细胞周期停滞。随着未折叠蛋白在内质网腔的累积,葡萄糖调节蛋白 78(glucose-regulated protein 78, GRP78)从 UPR 感应器上释放而被激活,进而引发 ERS<sup>[5]</sup>。另外,CAAT 增强子结合蛋白同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)在 ERS 状态下表达增加,并在诱导凋亡过程中发挥重要作用<sup>[6]</sup>。因此,一些具有抗炎、抗氧化或抗凋亡的植物化学物可能发挥阻止 ERS 诱发凋亡的作用。

橄榄苦苷(oleuropein, OP)是存在于橄榄叶、果实和橄榄油中主要的植物化学物,具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抗微生物、保护心血管和神经系统的作用。已有研究表明,OP 可抑制爱佩琳(apelin)引起 ERS 蛋白的增加<sup>[7]</sup>。

本研究拟探讨 OP 抑制 ACR 诱导 HBE 细胞 ERS 相关凋亡的机制。为进一步研究 OP 对人支气管与肺的保护作用提供了理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

ACR、OP(北京索莱宝科技有限公司),用灭菌水溶解稀释为 5 mmol/L 保存于 4 ℃,使用前用 DMEM 培养基稀释成所需浓度;橄榄叶提取物(olive leaf extract, OLE,北京索莱宝科技有限公司)。噻唑蓝(MTT, Sigma 公司,美国),使用时用 pH7.2 PBS 配制成 5 g/L 的溶液。DMEM 培养粉(Gibco 公司,美国),胎牛血清(杭州四季青公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 裂解液、PMSF 蛋白酶抑制剂、DEPC 水、Hoechst33258 染色液、结晶紫染色液试剂盒(上海碧云天生物技术研究);RNAiso Plus Total RNA 提取试剂、Prime Script™ RT Master Mix 逆转录试剂盒、SYBR Premix ExTaq™ II (TaKaRa)PCR 扩增试剂盒(大连宝生物工程)。免抗人 GRP78 多克隆抗体、小鼠抗 CHOP 单克隆抗体和小鼠抗  $\beta$ -tubulin 单克隆抗体(Abcam 公司,英国),小鼠抗  $\beta$ -actin 单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司),辣根过氧化酶标记的羊抗兔 IgG 及羊抗小鼠 IgG(北京

中山金桥生物技术有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

人支气管上皮细胞 HBE 购自美国 ATCC 公司。细胞培养于 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中,并含有 100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素。细胞放置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 的恒温细胞培养箱中培养。每 1~2 d 更换 1 次培养液,待细胞单层长满约 80%时,用 0.25%的胰蛋白酶溶液进行消化,1 000 r/min 离心 5 min 后收集细胞,按比例传代。

#### 1.2.2 细胞 MTT 实验

取对数生长期的 HBE 细胞,于 96 孔板以 2 000 个/孔的密度接种,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱过夜。次日根据实验目的设立空白组及若干实验处理组,用不同浓度的 ACR(0.5、10、20、40、80、100、150、200  $\mu$ mol/L),OP (0、10、20、40、80、100、200、250、300  $\mu$ mol/L),以及 OP (80  $\mu$ mol/L)+ACR(0.5、10、20、40、80、100、150、200  $\mu$ mol/L)联合,每个剂量设 6 个复孔,药物处理后于培养箱培养 24 h。次日每孔加入 20  $\mu$ L MTT 溶液(5 mg/mL),继续培养 4 h 后,弃去上清液,每孔加入 150  $\mu$ L DMSO 溶液,微量震荡器震荡 10 min,使结晶紫充分溶解。酶标仪 490 nm 波长测各孔吸光度值,计算细胞存活率。细胞存活率=(实验组吸光度值/对照组吸光度值) $\times$ 100%。

#### 1.2.3 平板克隆形成实验

将对数生长期的单层培养 HBE 细胞,按实验需要处理后,用 0.25%胰蛋白酶消化并吹打成单细胞悬液,含 10%胎牛血清的培养液重悬备用。将细胞悬液作梯度倍数稀释,每个 60 mm 培养皿接种 500 个细胞,并轻轻晃动,使细胞分散均匀。将培养皿置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的环境下,静置培养 2 周,每 2~3 d 更换新鲜培养液。经常观察,当培养皿中出现肉眼可见的克隆时,终止培养。弃去上清液,用 PBS 小心浸洗 2~3 次。加入甲醇固定 15 min。弃去固定液,加入适量的结晶紫染色 10 min,用流水轻柔洗去染色液,于室温中空气干燥。拍照保存,计数细胞集落数并计算细胞集落形成率。

#### 1.2.4 细胞 Hoechst33258 染色实验

取对数生长期的 HBE 细胞,以适当密度接种于 6 孔板,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养过夜。待细胞单层长满至 70%~80%,经 ACR 20  $\mu$ mol/L、OP 80  $\mu$ mol/L、ACR20  $\mu$ mol/L+OP 80  $\mu$ mol/L 处理 2 h 后,按照 Hoechst 33258 染色液操作说明进行染色。吸尽培养液,每孔加入 0.5 mL 固定液,固定 10 min;吸尽固定

液,用PBS于低速摇床清洗2次,每次3 min;吸去PBS,加入0.5 mL Hoechst33258染色液,于低速摇床染色5 min;吸尽染色液,用PBS在低速摇床上清洗2遍,每次3 min;吸去PBS,滴加抗荧光猝灭封片液,染色完成后使用荧光显微镜以相应波长观察、拍照。使用Image-Pro Plus 6.0图像处理软件进行分析处理,计算细胞凋亡百分比。

#### 1.2.5 流式细胞检测细胞凋亡

取对数生长期的HBE细胞,以适当密度接种于60 mm培养皿,培养过夜使细胞贴壁,按实验需要进行相应处理后,弃去原有培养液,用PBS清洗2次,加入0.25%胰蛋白酶胰酶消化,1 500 r/min离心5 min,收集沉淀,用1 mL PBS轻轻吹打均匀,再次离心5 min,弃去PBS;加入400  $\mu$ L Annexin V-FITC结合液使细胞重悬,然后加入5  $\mu$ L Annexin V-FITC,轻轻混匀后,于4~8  $^{\circ}$ C避光孵育15 min,再加入10  $\mu$ L PI,避光孵育5 min。样品在1 h内用流式细胞仪检测细胞凋亡率。流式细胞检测由南京医科大学分析测试中心完成。

#### 1.2.6 动物实验

12只健康雄性Sprague-Dawley大鼠由南京莱芜养殖公司提供,初始体重150~180 g,室温控制在(22 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相对湿度为40%~60%,室内12 h光亮,12 h黑暗。大鼠自由摄食与饮水1周,使其适应环境并检疫。大鼠按体重大小编号并采用随机数字法随机分为4组(对照组、ACR处理组、低剂量OLE联合ACR处理组、高剂量OLE联合ACR处理组),各组平均体重无明显差异。其中ACR联合低剂量OLE和高剂量OLE处理组分别予200 mg/(kg·d)和400 mg/(kg·d)OLE灌胃处理1个月,然后与ACR单独处理组同时经腹腔注射ACR 5 mg/(kg·d)处理4 d;对照组给予相同体积的蒸馏水处理。大鼠处死后取肺组织,冷冻保存于-80  $^{\circ}$ C。

#### 1.2.7 免疫印迹试验检测蛋白水平

收集处理后的细胞,加入RIPA细胞裂解液(RIPA:PMSF=200:1),于4  $^{\circ}$ C摇床裂解30 min,12 000 r/min离心30 min,取上清;取大鼠组织约0.1 g,加入400  $\mu$ L RIPA细胞裂解液,经匀浆机匀浆处理5 min后,12 000 r/min离心30 min,取上清。用BCA蛋白定量法测蛋白浓度后,取40  $\mu$ g蛋白于100  $^{\circ}$ C加热5 min,置于-80  $^{\circ}$ C储存备用。制12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶,按常规方法电泳、转膜、封闭。一抗(GRP78、CHOP、 $\beta$ -actin和 $\beta$ -tubulin,1:1 000)4  $^{\circ}$ C孵育过夜,用TBST洗涤,10 min $\times$ 3次;相应二

抗(1:2 000)室温孵育1 h,TBST洗涤,10 min $\times$ 9次;化学发光试剂(ECL)显色,Tanon 5200全自动化学发光图像分析系统曝光采集图像。

#### 1.2.8 Real-time PCR实验

取对数生长期的HBE细胞,按 $5\times 10^5$ 个/孔接种。次日设置对照组后,分别加入ACR(10、20、40、80  $\mu$ mol/L),ACR 40  $\mu$ mol/L联合OP(0、20、40、80  $\mu$ mol/L)继续培养至24 h。ACR处理时间设置为3、6、12、24 h。用TRIzol Reagent提取细胞总RNA,经紫外分光光度仪检测浓度, $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 在1.8~2.1范围内,确定RNA样本基本无污染。取约0.05 g大鼠组织,加入1 mL TRIzol Reagent,经匀浆机匀浆处理5 min后,提取总RNA并测定浓度。定量后逆转录,逆转录产物于ABI 7300仪器进行实时荧光定量聚合酶链反应(PCR),以GAPDH为内参照。细胞目的基因表达计算公式为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ;大鼠组织目的基因表达计算公式为 $2^{-\Delta C_t}$ 。GRP78、CHOP、GAPDH的引物由上海Invitrogen公司设计。人GRP78上游:5'-CACAGTGGTGCCTACCAAGA-3',下游:5'-TGTCTTTTGTTCAGGGGTCTTT-3';人CHOP上游:5'-GCACCTCCCAGAGCCCTCACTCTCC-3',下游:5'-GTCTACTCCAAGCCTTCCCCCTGCG-3';人GAPDH上游:5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3',下游:5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3';大鼠GRP78上游:5'-ACTGGAATCCCTCCTGCT C-3',下游:5'-CAAACCTTCTCGGCGTCAT-3';大鼠CHOP上游:5'-GCACCTCCCAGAGCCCTCGC-3',下游:5'-CCGTTTCCTAGTTCCTTCCTT-3';大鼠GAPDH上游:5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3',下游:5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'。

#### 1.3 统计学方法

应用SPSS16.0软件进行分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间均数比较采用 $t$ 检验;两组间率的比较采用卡方分析;多组间均数比较采用one-way ANOVA单因素方差分析,然后采用Dunnett- $t$ 检验进行组间两两比较;独立的重复实验结果的比较采用重复测量资料的方差分析。 $P\leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ACR和OP对HBE细胞增殖和凋亡的影响

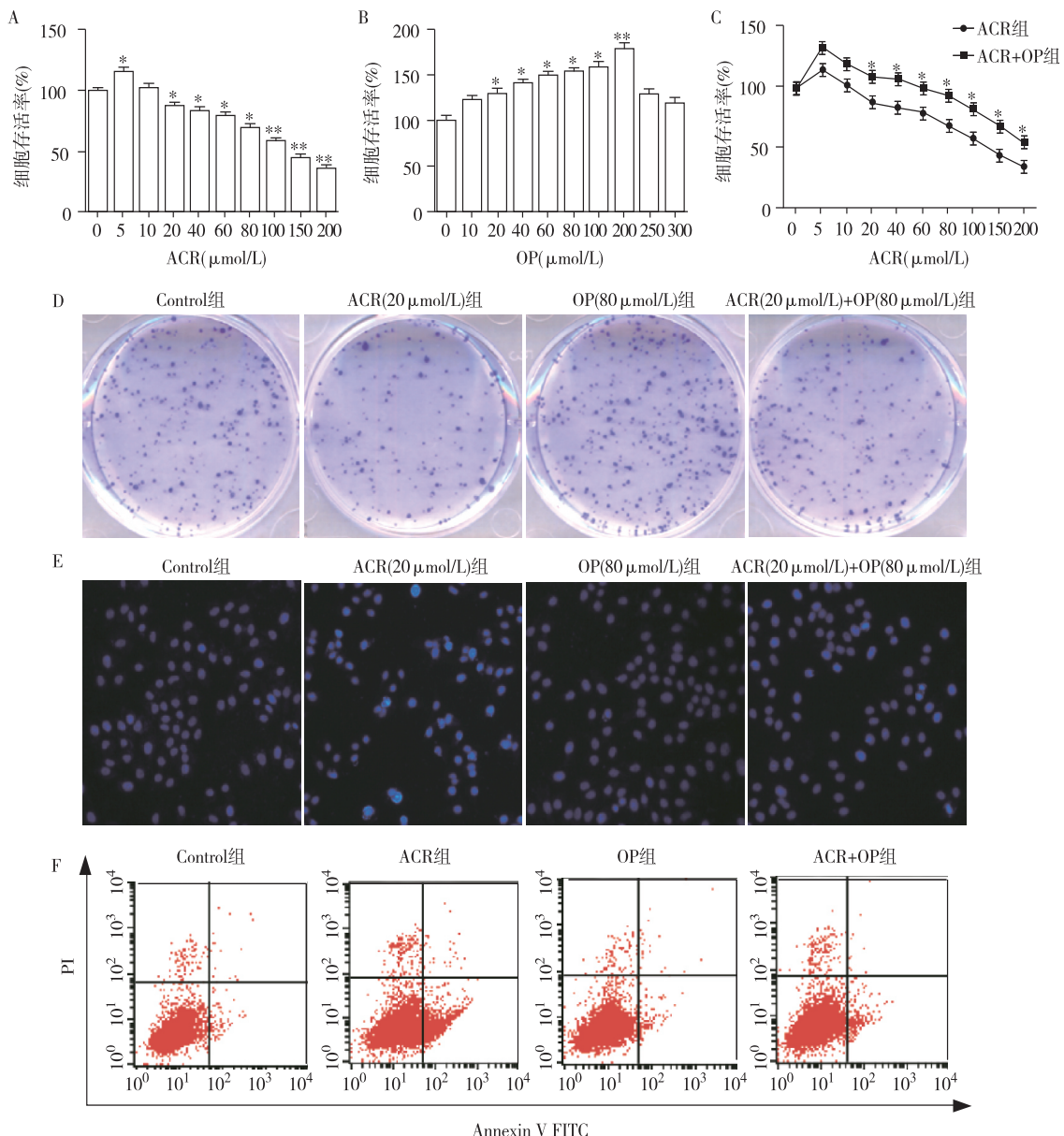
HBE细胞经不同浓度ACR处理24 h,低剂量ACR(5  $\mu$ mol/L)轻微促进HBE细胞生存,而20~200  $\mu$ mol/L ACR抑制HBE细胞生存,并有明显的剂量效应(图

1A);而 OP 单独处理 HBE 细胞,明显促进了细胞生存,并有剂量效应(图 1B)。HBE 细胞经 80  $\mu\text{mol/L}$  OP 和不同浓度 ACR 处理后,相对于 ACR 单独处理,联合 OP 处理提高了细胞存活率(图 1C)。

图 1D 显示了 ACR 和 OP 对 HBE 细胞集落形成率的影响。与对照组相比,20  $\mu\text{mol/L}$  ACR 明显抑制了 HBE 细胞集落的形成,而 80  $\mu\text{mol/L}$  OP 使细胞集落形成率增加。并且,与 20  $\mu\text{mol/L}$  ACR 单独处理组相比,20  $\mu\text{mol/L}$  ACR 与 80  $\mu\text{mol/L}$  OP 联合

处理后,细胞集落形成率明显增加。

图 1E 显示了 ACR 和 OP 对 HBE 细胞凋亡的影响。随机选取 10 个低倍镜视野( $\times 40$ ),经 20  $\mu\text{mol/L}$  ACR 处理,HBE 细胞凋亡率为(10.6  $\pm$  1.7)%,明显高于对照组(1.7  $\pm$  0.8)%( $P < 0.05$ )。而与 80  $\mu\text{mol/L}$  OP 联合处理后,HBE 细胞的凋亡率为(2.1  $\pm$  1.3)%,明显低于 20  $\mu\text{mol/L}$  ACR 单独处理组( $P < 0.05$ )。以上结果说明,ACR 可抑制 HBE 细胞增殖,促进细胞凋亡,而 OP 可以抑制 ACR 对 HBE 的损伤作用。



A: 0~200  $\mu\text{mol/L}$  ACR 处理对 HBE 细胞存活率的影响,与 0  $\mu\text{mol/L}$  组比较, $^*P < 0.05$ ;B:0~300  $\mu\text{mol/L}$  OP 处理对 HBE 细胞存活率的影响,与 0  $\mu\text{mol/L}$  组比较, $^*P < 0.05$ , $^{**}P < 0.01$ ;C:80  $\mu\text{mol/L}$  OP 和 0~200  $\mu\text{mol/L}$  ACR 联合处理 24 h 对 HBE 细胞存活率的影响,两组比较, $^*P < 0.05$ 。D:ACR 和 OP 对 HBE 细胞集落形成的影响。E:Hoechst33258 染色法检测 ACR 和 OP 对 HBE 细胞凋亡的影响( $\times 400$ )。F:细胞流式检测 ACR 和 OP 对 HBE 细胞凋亡的影响。

图 1 橄榄苦苷和丙烯醛对 HBE 细胞存活、增殖和凋亡的影响

Figure 1 Effects of oleuropein and acrolein on viability, proliferation and apoptosis of HBE cells

图 1F 进一步采用流式细胞检测细胞凋亡,验证 ACR 和 OP 对 HBE 细胞凋亡的影响。3 次独立重复实验中,经 20  $\mu\text{mol/L}$  ACR 处理,HBE 细胞凋亡率为  $(9.28\pm 0.52)\%$ ,明显高于对照组  $(1.94\pm 0.40)\%$  ( $P<0.05$ )。而与 80  $\mu\text{mol/L}$  OP 联合处理后,HBE 细胞的凋亡率为  $(2.10\pm 0.35)\%$ ,明显低于 20  $\mu\text{mol/L}$  ACR 单独处理组( $P<0.05$ )。以上结果说明,ACR 可抑制 HBE 细胞增殖,促进细胞凋亡,而 OP 可以抑制 ACR 对 HBE 的细胞毒性作用。

### 2.2 ACR 和 OP 对 HBE 细胞中 ERS 相关蛋白表达的影响

如图 2 所示,ACR 处理 HBE 细胞 24 h,上调了 ERS 蛋白 GRP78 和 CHOP 的表达,并有明显的剂量效应(图 2A,  $P<0.05$ )和时间效应(图 2B,  $P<0.05$ )。并且,二者联合处理时,GRP78 和 CHOP 蛋白的表达随 OP 处理剂量增加而下调(图 2C)。然而,在 mRNA 水平上,40  $\mu\text{mol/L}$  和 80  $\mu\text{mol/L}$  的 ACR 上调 GRP78 和 CHOP mRNA 表达作用较显著(图 2D、E),且当处理时间为 24 h 时,效应最为明显(图 2F、G)。相对

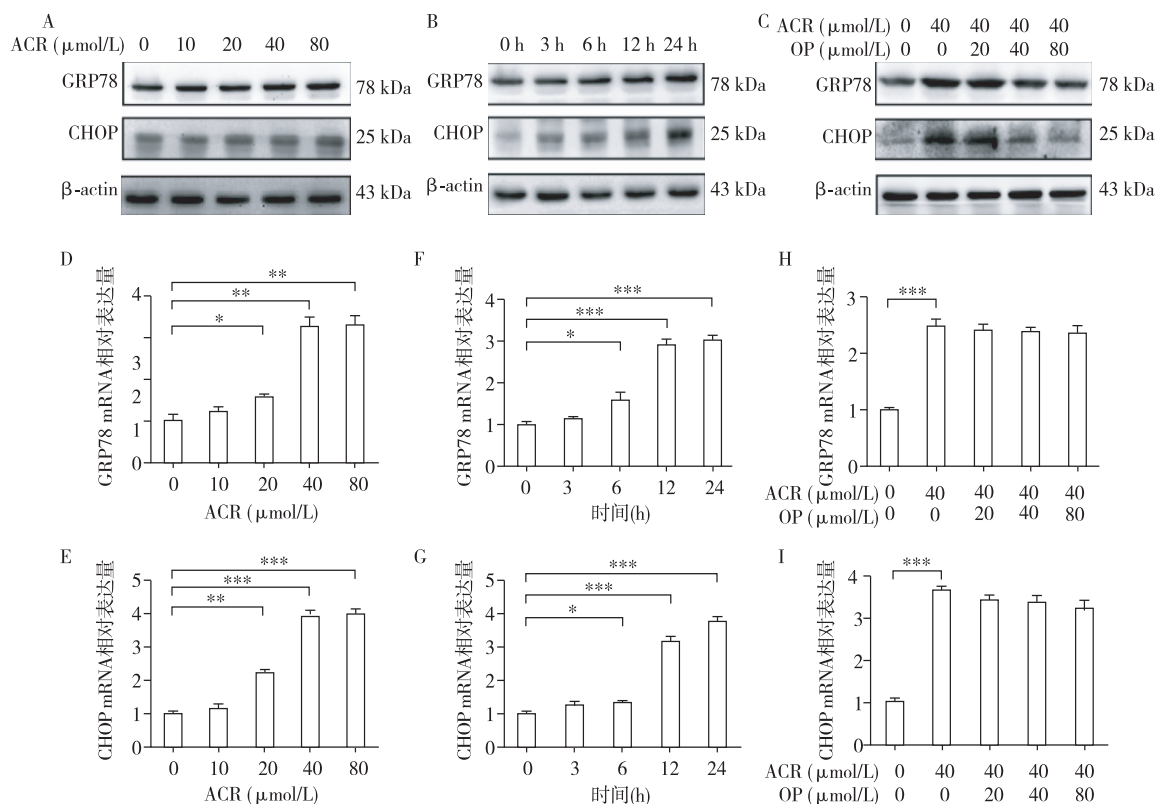
于 40  $\mu\text{mol/L}$  ACR 单独处理,联合 OP 处理并没有显著降低相关 mRNA 的表达(图 2H、I)。

### 2.3 OLE 和 ACR 对大鼠肺组织 ERS 相关蛋白表达的影响

如图 3 所示,与对照组相比,经 ACR 单独处理的大鼠肺组织 GRP78 和 CHOP 的表达显著上调,而经 OLE 联合处理的大鼠肺组织中 GRP78 和 CHOP 表达比 ACR 单独处理组低(图 3A)。在 mRNA 水平上,ACR 单独处理组的 GRP78 mRNA 相对表达水平比对照组高,且高剂量 400  $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$  OLE 对 GRP78 mRNA 表达有下调作用。其余各组 GRP78 和 CHOP mRNA 的表达差异无统计学意义(图 3B)。

### 3 讨论

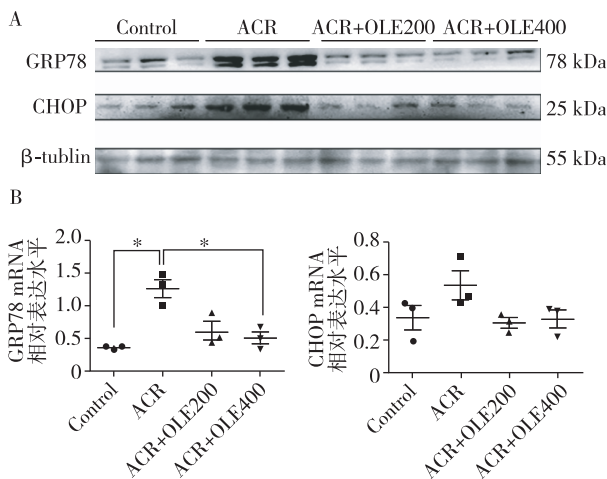
ACR 是一种活泼的  $\alpha,\beta$  不饱和醛,在自然环境中广泛存在,已确定为肺癌的危险因素,并且其细胞毒性作用已经在多种类型细胞中得到证实。在呼吸系统细胞系中,ACR 的毒性作用也有大量研究。如诱导人肺动脉内皮细胞线粒体产生活性氧<sup>[8]</sup>,影



A: 不同剂量 ACR 处理 HBE 细胞 24 h,GRP78 和 CHOP 蛋白表达情况; B:40  $\mu\text{mol/L}$  ACR 处理 HBE 细胞不同时间,GRP78 和 CHOP 蛋白表达情况; C:40  $\mu\text{mol/L}$  ACR 联合不同剂量 OP 处理 HBE 细胞 24 h 后,GRP78 和 CHOP 蛋白表达情况; D、E:不同剂量 ACR 处理 HBE 细胞 24 h, GRP78(D)和 CHOP(E) mRNA 表达情况;F、G:40  $\mu\text{mol/L}$  ACR 处理 HBE 细胞不同时间,GRP78(F)和 CHOP(G) mRNA 的表达情况;H、I:40  $\mu\text{mol/L}$  ACR 联合不同剂量 OP 处理 HBE 细胞 24 h 后,GRP78(H)和 CHOP(I) mRNA 的表达情况。与对照组比较,\*  $P<0.05$ ,\*\*  $P<0.01$ ,\*\*\*  $P<0.001$ 。

图 2 橄榄苦苷和丙烯醛对 HBE 细胞中 ERS 相关蛋白表达的影响

Figure 2 Effects of oleuropein and acrolein on expressions of ERS biomarkers in HBE cells



Control: 对照组; ACR: ACR 处理组; ACR+OLE200: 200 mg/(kg·d) OLE 联合 ACR 处理组; ACR+OLE400: 400 mg/(kg·d) OLE 联合 ACR 处理组。A: 大鼠经不同处理后, 肺组织中 GRP78 和 CHOP 蛋白的表达情况; B: 大鼠经不同处理后, 肺组织中 GRP78 和 CHOP mRNA 表达情况, 两组比较, \* $P < 0.01$ 。

**图 3 OLE 和 ACR 对大鼠肺组织 ERS 相关蛋白表达的影响**  
**Figure 3 Effects of olive leaf extract and acrolein on expressions of ERS biomarkers in the lung tissues of rats**

响 RLE-6TN、H441 和 pAT2 等几种肺组织细胞系的线粒体功能和代谢等<sup>[9]</sup>。ACR 对支气管的损害作用曾受到关注, 如诱发气道高敏性反应等<sup>[10]</sup>。近年来, ACR 对支气管上皮细胞的损害亦引起了高度重视, 如降低 HBE 细胞中谷胱甘肽水平而引起细胞毒性<sup>[11]</sup>, 诱发 HBE 细胞 DNA 损伤并损害 DNA 修复能力等<sup>[12]</sup>。

ERS 具有潜在的促炎作用, 因此与慢性肺部炎症性疾病有关。在 ERS 过程中, PERK 与 GRP78 解离, 并通过齐聚反应和自身磷酸化激活自身的酶结构域<sup>[13]</sup>。磷酸化的 PERK 诱导真核细胞翻译起始因子(eIF2 $\alpha$ )磷酸化<sup>[14]</sup>, 从而促进 ATF4 等的 mRNA 转录, ATF4 可进一步激活凋亡相关基因如 CHOP 等的转录, 而 CHOP 是启动凋亡级联反应的重要分子<sup>[15]</sup>。ACR 引起 ERS 已在体内实验和体外实验中得到证实, 所以对支气管上皮细胞的损害可能与 ERS 有关。本研究以 ACR 诱发 ERS, 检测相应的 ERS 标志蛋白 GRP78 和 CHOP 的表达情况。由上述结果可知, ACR 处理 HBE 细胞, 诱导细胞发生 ERS 反应并引起相关凋亡, 且有明显的时间效应和剂量效应, 而 OP 可通过下调 CHOP 和 GRP78 蛋白的表达, 减轻 ERS 反应, 并抑制 ERS 介导的细胞凋亡。

OP 是未成熟橄榄的苦味来源, 是橄榄叶、种子、生橄榄果肉、果皮以及橄榄油中主要的酚类化合物,

具有多种生物活性作用。在小鼠足细胞中, OP 可抑制 apelin 引起的 ERS, 降低 p-eIF2 $\alpha$  和 CHOP 的表达<sup>[7]</sup>。因此, 本研究以 OP 为潜在的 ERS 抑制剂, 探讨其对 ACR 诱导的 HBE 细胞 ERS 反应的影响机制。本研究中, OP 降低了 ERS 相关蛋白 GRP78 和 CHOP 的表达, 而在 mRNA 水平上, OP 并未下调相应的 mRNA 表达水平。

为了进一步验证 OP 对 ERS 相关蛋白 GRP78 和 CHOP 表达的影响, 本研究对 12 只大鼠进行随机分组, 分别给予 OP 和(或)OLE 处理, 并检测各组大鼠肺组织中 GRP78 和 CHOP 蛋白及 mRNA 表达情况。OP 是 OLE 中最主要的活性成分, 耿成燕等<sup>[16]</sup>用不同剂量的 OLE (100、250、500 mg/kg) 对大鼠进行灌胃处理, 发现 OLE 可明显降低致炎因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的 mRNA 表达。Abunab 等<sup>[17]</sup>对不同剂量 OLE 处理组 (<100 mg/kg, 100~250 mg/kg, 251~500 mg/kg) 中糖尿病大鼠的血糖和胰岛素水平进行 meta 分析, 发现 OLE 可以增加胰岛素并降低血糖水平, 并具有剂量效应。在本研究中, ACR 联合 OLE 处理组的大鼠肺组织中 GRP78 和 CHOP 蛋白水平比 ACR 单独处理组低, 说明 OLE 对 ACR 诱导的 ERS 具有抑制作用。该结果进一步验证了 OP 在 HBE 细胞中对 GRP78 和 CHOP 表达的影响。但是, 由于作用时间、作用方式、有效靶剂量等因素的不同, 以及细胞与机体、组织之间的差异, OP 对 HBE 细胞和 大鼠肺组织中 GRP78 和 CHOP mRNA 表达的影响有一定差异。在大鼠肺组织中, ACR 处理组的 GRP78 mRNA 水平相对较高, 而高剂量 400 mg/(kg·d) OLE 对 GRP78 mRNA 表达有下调作用, 其余各组间 GRP78 和 CHOP mRNA 表达水平无明显差异。目前尚无其他相关研究表明 OP 对 ERS 相关蛋白 mRNA 水平的影响。因此, OP 对 ERS 相关蛋白表达的影响机制有待进一步研究。

长链非编码 RNA (long-non-coding RNAs, lncRNAs) 是 1 组无蛋白质编码功能但却对蛋白表达具有决定性调控的 RNA, 可在转录水平和转录后水平调控基因的表达<sup>[18]</sup>。Song 等<sup>[19]</sup>研究发现, lncRNA TUG1 的过表达可以下调小鼠肝组织和小鼠肝细胞以及肝窦状内皮细胞中 ERS 相关蛋白如 GRP78、CHOP、PERK、p-eIF2 $\alpha$  等的表达水平。本研究中 OP 可抑制 ACR 诱导的 GRP78 和 CHOP 蛋白的表达, 却对其 mRNA 水平无明显影响, 可能涉及对其转录后水平的调控, 而 lncRNA TUG1 有可能参与 OP 对 GRP78 和 CHOP 表达的调控。

此外,细胞中的蛋白质可通过自噬和泛素蛋白酶系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)两个途径降解。研究表明,OP可以在大鼠嗜铬细胞瘤细胞系中调控自噬<sup>[20]</sup>,ERS也可以启动自噬。因此,OP对细胞内 GRP78 和 CHOP 等蛋白水平的影响可能涉及对自噬的调控。UPS 可以降解通过错误折叠、突变或者损伤的蛋白和关键的调节蛋白来调控细胞的基本生命活动。目前尚无研究表明 OP 对泛素化降解的影响,OP 下调 ACR 诱导的 GRP78 和 CHOP 蛋白表达的作用是否涉及对泛素化降解的影响有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Bein K, Leikauf GD. Acrolein-a pulmonary hazard [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2011, 55(9):1342-1360
- [2] Rashedinia M, Lari P, Abnous K, et al. Proteomic analysis of rat cerebral cortex following subchronic acrolein toxicity [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 272(1):199-207
- [3] Kenche H, Ye ZW, Vedagiri K, et al. Adverse outcomes associated with cigarette smoke radicals related to damage to protein-disulfide isomerase [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(9):4763-4778
- [4] Kitaguchi Y, Taraseviciene-Stewart L, Hanaoka M, et al. Acrolein induces endoplasmic reticulum stress and causes airspace enlargement [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5):e38038
- [5] Pfaffenbach KT, Lee AS. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2011, 23(2):150-156
- [6] Tao YK, Yu PL, Bai YP, et al. Role of PERK/eIF2 $\alpha$ /CHOP endoplasmic reticulum stress pathway in oxidized low-density lipoprotein mediated induction of endothelial apoptosis [J]. *Biomed Environ Sci*, 2016, 29(12):868-876
- [7] Guo C, Liu Y, Zhao W, et al. Apelin promotes diabetic nephropathy by inducing podocyte dysfunction via inhibiting proteasome activities [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(9):2273-2285
- [8] Ouyang JS, Li YP, Li CY, et al. Mitochondrial ROS-K<sup>+</sup> channel signaling pathway regulated secretion of human pulmonary artery endothelial cells [J]. *Free Radic Res*, 2012, 46(12):1437-1445
- [9] Agarwal AR, Yin F, Cadenas E. Metabolic shift in lung alveolar cell mitochondria following acrolein exposure [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 305(10):764-773
- [10] Leikauf GD. Mechanisms of aldehyde-induced bronchial reactivity: role of airway epithelium [J]. *Res Rep Health Eff Inst*, 1992, 49:1-35
- [11] Sthijns MM, Randall MJ, Bast A, et al. Adaptation to acrolein through upregulating the protection by glutathione in human bronchial epithelial cells: the materialization of the hormesis concept [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 446(4):1029-1034
- [12] Wang HT, Hu Y, Tong D, et al. Effect of carcinogenic acrolein on DNA repair and mutagenic susceptibility [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(15):12379-12386
- [13] Ma K, Vattem KM, Wek RC. Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(21):18728-18735
- [14] Yu L, Li B, Zhang M, et al. Melatonin reduces PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4-mediated endoplasmic reticulum stress during myocardial ischemia-reperfusion injury: role of RISK and SAFE pathways interaction [J]. *Apoptosis*, 2016, 21(7):809-824
- [15] Nishitoh H. CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response [J]. *J Biochem*, 2012, 151(3):217-219
- [16] 耿成燕, 宫德正, 姜丽平, 等. 橄榄叶提取物对大鼠急性炎症和痛觉过敏的研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2011, 23(5):931-934.
- [17] Abunab H, Dator WL, Hawamdeh S. Effect of olive leaf extract on glucose levels in diabetes-induced rats: A systematic review and meta-analysis [J]. *J Diabetes*, 2016 [2016-12-30]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1753-0407.12508>
- [18] Rutenberg-Schoenberg M, Sexton AN, Simon MD. The properties of long noncoding RNAs that regulate chromatin [J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2016, 17:69-94
- [19] Song S, Liu J, He K, et al. Overexpression of the long noncoding RNA TUG1 protects against cold-induced injury of mouse livers by inhibiting apoptosis and inflammation [J]. *FEBS J*, 2016, 283(7):1261-1274
- [20] Achour I, Arel-Dubeau AM, Renaud J, et al. Oleuropein prevents neuronal death, mitigates mitochondrial superoxide production and modulates autophagy in a dopaminergic cellular model [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(8):1293

[收稿日期] 2017-02-24