

肿瘤坏死因子相关受体2介导的IRE1-JNK信号通路 在染矽尘大鼠肺泡巨噬细胞凋亡中的作用

郭肖非^{1a}, 王伟², 肖倩^{1b}

摘要: [目的] 通过抑制肿瘤坏死因子相关受体2(TNFR2)后观察纳米二氧化硅粉尘对肺泡巨噬细胞的损伤程度, 并进一步探索由TNFR2参与的肌醇酶1(IRE1)-C-Jun氨基端激酶(JNK)信号通路在介导肺泡巨噬细胞凋亡中的作用。[方法] 将NR8383.1型大鼠肺泡巨噬细胞分为空白对照组、二氧化硅组(50 mg/mL)和抗TNFR2组(在二氧化硅组基础上添加10 μg/mL anti-TNFR2抗体), 同时每组设立3个平行样, 培养24 h后, 检测各组肺泡巨噬细胞凋亡水平, IRE1-JNK信号通路相关蛋白(TNFR2、凋亡信号调控激酶1、JNK、激活蛋白1、Caspase12)含量。[结果] 空白对照组肺泡巨噬细胞凋亡水平, TNFR2、凋亡信号调控激酶1、JNK、激活蛋白1及Caspase12含量均低于二氧化硅组, 抗TNFR2处理后上述指标均较二氧化硅组降低, 但仍较空白对照组高。[结论] TNFR2可能在JNK-IRE1信号通路介导的肺泡巨噬细胞凋亡中发挥着重要作用。

关键词: 肿瘤坏死因子相关受体2; C-Jun氨基端激酶; 肌醇酶1; 肺泡巨噬细胞; 凋亡; 大鼠

Role of Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 2 Induced IRE1-JNK Signaling Pathway in Nanometer Silica Rat Treated Alveolar Macrophage Apoptosis GUO Xiao-fei^{1a}, WANG Wei², XIAO Qian^{1b} (1.a. Medical Experimental Center, The First Department of Clinic Medical College, Jitang College of Hebei United University, Hebei 063000, China; 2. Caofeidian Hospital, Hebei United University, Hebei 063000, China) • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To assess the damage to alveolar macrophages (AM) treated by nanometer silica and blocked tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TNFR2), and to explore the role of TNFR2 in inositol requiring enzyme 1 (IRE1)-c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway induced AM apoptosis. [Methods] AM were divided into blank control group, silica group (50 mg/mL), and anti-TNFR2 group (10 μg/mL anti-TNFR2 antibody was added to the silica group). After cultured for 24 h, AM apoptosis rate and the contents of TNFR2, apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1), JNK, transcription factor activator protein 1 (AP1), Caspase12 were detected. [Results] Compared with the blank control group, the silica group showed higher levels of AM apoptosis rate, TNFR2, ASK1, JNK, AP1, and Caspase12. The levels of above indicators were lowered after anti-TNFR2 treatment compared with those of the silica group, but still higher than those of the blank control group. [Conclusion] TNFR2 may play a potential important role in JNK-IRE1 signaling pathway induced AM apoptosis.

Key Words: tumor necrosis factor receptor-associated factor 2; c-Jun N-terminal kinase; inositol requiring enzyme 1; alveolar macrophage; apoptosis; rat

随着纳米材料的广泛应用, 纳米级二氧化硅(SiO₂)粉尘已经成为危害人们健康的重要因素。通过呼吸道进入肺泡的纳米级SiO₂粉尘沉积在肺中, 与肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, AM)交互作用, 可导致肺组织炎症和纤维化反应, 由于其病变的不可逆

性, 以肺组织炎症和纤维化改变为主的各种疾病给人们的生活带来了沉重的负担^[1]。目前针对肺组织纤维化的研究多集中在AM内线粒体或内质网通路介导的凋亡或自噬上, 较少有报道提及肿瘤坏死因子相关受体2(tumor necrosis factor receptor-associated factor 2, TNFR2)在AM凋亡进程中的作用。本研究通过抑制TNFR2, 观察C-Jun氨基端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)及相关蛋白的表达情况及AM凋亡水平, 探讨其在内质网应激介导肺纤维化中的作用, 为阐明肌醇酶1(inositol requiring enzyme 1, IRE1)-JNK信号通路及寻找有效靶点提供理论依据。

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2015.14404

[作者简介] 郭肖非(1987—), 硕士, 女, 助教; 研究方向: 生物化学;
E-mail: 544429144@qq.com

[作者单位] 1. 河北联合大学冀唐学院 a. 医学实验中心 b. 临床医学院
第一部, 河北 063000; 2. 河北联合大学曹妃甸医院, 河北
063000

1 材料与方法

1.1 试剂

结晶型SiO₂粉尘(纯度99.5%,粒径10~20nm)购自美国Sigma公司,RMPI 1640培养基、Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒、TNFR2、凋亡信号调控激酶1(apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK1)、JNK抗体购自美国Cell Signaling公司,Caspase 12购自美国ProSci公司,激活蛋白1(activator protein 1, AP1)、抗TNFR2抗体购自美国Abcam公司,Annexin V-EGFP细胞凋亡检测试剂盒、NP40细胞裂解液及苯甲基磺酰氟购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 将NR8383.1型大鼠AM(ATCC, Teddington Middlesex, UK)分装到6孔板内,使每孔细胞数为 5×10^6 个,并分为3组。空白对照组只加入含有50 U/mL青霉素及50 mg/mL链霉素的RPMI 1640培养基;SiO₂组按50 mg/mL浓度在RPMI 1640中加入纳米SiO₂粉尘;抗TNFR2组在SiO₂组基础上再添加10 μg/mL anti-TNFR2抗体;每组均匹配3个平行样。培养结束后,将贴壁生长的AM用不含乙二胺四乙酸的胰酶消化,并用磷酸盐缓冲液将细胞悬浮细胞离心(2 000 r/min,离心5 min,离心半径12.4 cm),制成1.5 mL细胞混悬液。

1.2.2 AM凋亡率 采用流式细胞术,取200 μL细胞混悬液,加入500 μL结合缓冲液后再次悬浮细胞,取

5 μL Annexin V-EGFP置于混悬液中混匀后,加入5 μL PI,混匀;室温、避光反应5~15 min后,用Accuri C6流式细胞仪(美国BD公司)检测AM凋亡率。

1.2.3 TNFR2、ASK1和JNK等相关蛋白水平 采用免疫印迹法(Western blot),取500 μL细胞混悬液在冰上加入30 μL细胞裂解液,吹打使与细胞完全接触,12 000 r/min(离心半径12.4 cm),离心5 min,取上清液。BCA(二喹啉甲酸)法蛋白定量后,参照文献[2]方法进行后续实验。

1.3 统计学分析

采用SAS 9.2进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 形式描述,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 AM凋亡相关蛋白

空白对照组AM凋亡水平,TNFR2、ASK1、JNK、AP1及Caspase12抗TNFR2含量均低于SiO₂组($P < 0.01$),抗TNFR2处理后上述指标均较SiO₂组降低,但仍较空白对照组高(表1)。

2.2 AM凋亡水平

结果表明,AM凋亡率与凋亡相关蛋白趋势一致,抗TNFR2组AM凋亡率高于空白对照组,低于SiO₂组(表1)。

表1 3组肺泡巨噬细胞凋亡相关蛋白相对表达及凋亡率水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡相关蛋白					凋亡率(%)
		TNFR2	ASK1	JNK	Caspase12	AP1	
空白对照组	3	0.1237 ± 0.0102	0.0843 ± 0.0122	0.0658 ± 0.0136	0.0702 ± 0.0094	0.0624 ± 0.0073	8.16 ± 0.95
SiO ₂ 组	3	0.6287 ± 0.0373*	0.5370 ± 0.0230*	0.5055 ± 0.0225*	0.4881 ± 0.0249*	0.5045 ± 0.0150*	56.80 ± 1.57*
抗TNFR2组	3	0.2954 ± 0.0278**	0.1822 ± 0.0083**	0.1593 ± 0.0066**	0.1754 ± 0.0020**	0.1683 ± 0.0120**	23.38 ± 0.24**
F		261.656	685.063	658.379	599.446	1 116.532	1421.356
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

[注]*:与空白对照组相比, $P < 0.01$ 。#:与SiO₂组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

内质网是细胞内蛋白质合成和成熟的主要场所,蛋白质成熟和折叠的异常可导致内质网损伤,由此造成的内质网应激是介导细胞凋亡的重要原因。目前研究认为,内质网应激主要包括未折叠蛋白反应(unfolded protein response)、固醇调节级联反应(sterol regulatory cascade reaction)和超负荷反应(endoplasmic reticulum overload response)3条信号通路[2]。目前研究最多的为未折叠蛋白反应,包含3种表面受体,分别

为活化转录因子6、双链RNA依赖的蛋白激酶样内质网类激酶和IRE1[3],3种受体均能通过不同通路介导细胞凋亡,但目前尚不能确定哪种受体起主导作用。

IRE1集蛋白激酶与核糖核酸内切酶活性于一体,可以通过自身磷酸化被激活,参与决定细胞命运。有报道指出当耦合于IRE1表面的Bid/GRP78分子伴侣与未折叠或错误折叠蛋白结合后,活化的IRE1表面会聚集大量的TNFR2,两者形成复合物,通过磷酸化可激活ASK1,ASK1可通过磷酸化激活丝裂原活化蛋

白激酶(mitogen-activated protein kinase kinase, MKK) 4和MKK7,进一步激活JNK和AP1,被激活的AP1作用于Caspase12,最终活化的Caspase12将介导AM凋亡^[4]。本研究中抗TNFR2组上述蛋白表达水平低于SiO₂组,与空白对照组接近,说明阻断TNFR2后,IRE1-JNK凋亡通路被有效抑制。小鼠TNFR2^{-/-}成纤维细胞在受到肿瘤坏死因子 α 的刺激时几乎检测不到JNK的活化,但人类不含有Caspase12,目前认为同属促炎症家族的Caspase4能够发挥类似的作用^[5]。

AM凋亡水平是对IRE1-JNK通路在细胞凋亡过程中作用的最有效反应。空白对照组、抗-TNFR2组和SiO₂组间AM凋亡率呈依次递增趋势,说明IRE1-JNK通路在内质网应激介导的AM凋亡中发挥着重要的作用。在对镉引起的活性氧增多介导细胞凋亡的研究中,Kato等^[6]指出未折叠蛋白反映的IRE1发挥了重要作用。此外,被JNK磷酸化的AP1能够调控炎症基因的表达,如肿瘤坏死因子 α 等,AM细胞凋亡后炎症因子被释放致细胞外,大量炎症因子的聚集是肺间质纤维化的重要原因。

阻断TNFR2后,IRE1-JNK通路相关蛋白含量降低,AM凋亡水平下调,但其对AM凋亡的调控机制仍需进一步探讨。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1]董静,陈莹,金一和,陈杰.纳米SiO₂与常规SiO₂粉尘致肺纤维化作用的研究[J].卫生毒理学杂志,2004,18(4): 215-217.
- [2]张林,姚三巧,何艳玲等.胶原样结构巨噬细胞受体介导染矽尘大鼠肺组织细胞线粒体凋亡信号通路研究[J].中国职业医学,2014,41(1): 7-13.
- [3]Chen W J, Xiong Z A, Zhang M, et al. Picosecond pulsed electric fields induce apoptosis in HeLa cells via the endoplasmic reticulum stress and caspase-dependent signaling pathways[J]. Int J Oncol, 2013, 42(3): 963-970.
- [4]Lin M H, Yen J H, Weng C Y, et al. Lipid peroxidation end product 4-hydroxy-trans-2-nonenal triggers unfolded protein response and heme oxygenase-1 expression in PC12 cells: Roles of ROS and MAPK pathways[J]. Toxicology, 2014, 315: 24-37.
- [5]Sou S N, Ilieva K M, Polizzi K M, et al. Binding of human BiP to the ER stress transducers IRE1 and PERK requires ATP[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 420(2): 473-478.
- [6]Kato H, Katoh R, Kitamura M. Dual regulation of cadmium-induced apoptosis by mTORC1 through selective induction of IRE1 branches in unfolded protein response[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e64344.

(收稿日期: 2014-06-09)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 张晶; 校对: 郑轻舟)

【EHP 专栏】

孕前母亲和父亲的持久性有机污染物暴露 与后代出生的大小: LIFE 研究

Candace A. Robledo, Edwina Yeung, Pauline Mendola, Rajeshwari Sundaram,
Jose Maisog, Anne M. Sweeney, Dana Boyd Barr, Germaine M. Buck Louis

摘要: [背景] 持久性有机污染物(POPs)是发育毒物,但母亲和父亲均受到POPs暴露对其后代出生大小的影响尚不清楚。[目的] 探讨母亲和父亲63种POPs(其中包括五大类污染物)的血清浓度与其后代出生大小测量值之间的关联。[方法] 测定234对夫妇在受孕前血清中的9种有机氯杀虫剂、1种多溴联苯(PBB)、7种全氟烷基化学品(PFCs)、10种多溴联苯醚(PBDEs)和36种多氯联苯(PCBs)的浓度。采用多元线性回归估计化学物浓度的自然对数转换(ln转换)值每增加1SD,所导致的出生体重、身长、头围和婴儿重量指数的差异。对每一对父母单独进行模型估计,调整母亲的年龄、孕前体质指数(kg/m²)等其他混杂因素,并且所有的模型都包含婴儿性别与各种化学品的交互作用项。[结果] 女童($n=117$)出生体重显著较低(范围为84~195g)与母亲血清DDT、PBDE-28、PBDE-183浓度的ln转换值增加每增加1SD、以及父亲血清PBDE-183和PCB-167浓度的ln转换值每增加1SD相关联。男童($n=113$)出生体重较低(范围为98~170g)与母亲(PCBs 138、153、167、170、195、209和全氟辛基磺酰)和父亲(PCB-172和PCB-195)的POPs血清浓度具有统计学意义的关联,而父亲血清中PBDE-66和PBDE-99浓度均与较高的出生体重相关联。后代头围、身长和婴儿重量指数的差异也与父母的POPs暴露相关联。[结论] 受孕前母亲和父亲血清中某些POPs的浓度与后代出生大小差异之间的关联具有统计学意义。

原文详见: *Environmental Health Perspectives*, 123(1): 88-94.