

分类号: R122.2

学校代码: 11065

密级: 公开

学号: 2021024482



专业硕士学位论文

(统招全日制)

炭黑与 *CTNNB1* 竞争性结合 Δ Np63 致气道上皮损伤修复异常的机制研究

作者姓名

刘楠

指导教师

魏潇然 助理教授

学 科

公共卫生

培养单位

医学部-公共卫生学院

答辩日期

2024 年 06 月 05 日

炭黑与 *CTNNB1* 竞争性结合 Δ Np63 致气道上皮损伤

修复异常的机制研究

摘要

背景与目的

炭黑（Carbon black, CB）纳米颗粒是一种广泛应用的工业材料，随着 CB 的大规模生产，人们在职业环境中接触 CB 的风险正在增加。CB 进入人体后会诱发呼吸道疾病和肺部损伤。气道上皮细胞是抵御污染物进入人体的重要物理屏障，因其持续暴露于环境中而极易受到损伤，损伤后的高效修复对于维持上皮稳态和预防疾病至关重要。研究发现 CB 会抑制气道上皮细胞增殖。然而，气道上皮细胞修复过程主要包括细胞增殖和分化两个阶段，目前对 CB 暴露干扰气道上皮细胞修复的关键阶段尚未完全阐明。本研究旨在评估 CB 暴露干扰气道上皮细胞修复的关键阶段，揭示 CB 致气道上皮细胞修复异常的毒理学机制。

方法

1. 在气道上皮细胞增殖、分化过程中及整个修复周期给予 CB 暴露，通过实时荧光定量 PCR（Quantitative real-time PCR, *qRT-PCR*）检测修复生物标志物粘蛋白 5B（Mucin 5B, *MUC5B*）、粘蛋白 5AC（Mucin 5AC, *MUC5AC*）、叉头框蛋白 J1（Forkhead-box J1, *FOXJ1*）、叉头框蛋白 J2（Forkhead-box J2, *FOXJ2*）的 mRNA 表达，阐明 CB 暴露对气道上皮细胞修复的干扰效应；并记录修复过程中原代人支气管上皮细胞（Primary human airway epithelial cells, pHAECs）的跨膜电阻值（Transepithelial electrical resistance, TEER），以评估 CB 作用下气道上皮细胞屏障完整性的变化。之后，通过 EdU 增殖实验检测细胞增殖数量变化、*qRT-PCR* 检测增殖生物标志物细胞周期调节蛋白-67（Cell cycle regulatory protein-67, *Ki67*）、增殖细胞核抗原（Proliferating cell nuclear antigen, *PCNA*）的 mRNA 表达明确增殖阶段是 CB 干扰气道上皮细胞修复的关键阶段。

2. 将经 Δ Np63 过表达质粒处理的气道上皮细胞暴露于 CB，通过 EdU 增殖实验阐明 Δ Np63 对 CB 干扰气道上皮细胞增殖的介导效应。进而通过 *qRT-PCR* 和蛋白免疫印迹（Western blotting, WB）检测 CB 暴露对 Δ Np63 的 mRNA 和蛋白表达的影响。

3. 利用 GTRD、ChIP-Atlas 和 KnockTF 数据库预测受 Δ Np63 调控的相关靶基因。将 siRNA/ Δ Np63-over 质粒转染细胞后探讨 Δ Np63 对其靶基因 *CTNNB1* 的调控作用。

4. 使用 JASPAR 数据库预测 Δ Np63 在 *CTNNB1* 启动子区域内的结合位点，并经分子动力学模拟（Molecular dynamics, MD）对 CB、 Δ Np63 和 *CTNNB1* 之间的结合和相互作用进行模拟分析。

结果

1. 气道上皮修复过程中，在增殖阶段暴露 CB，使 *MUC5B* 和 *FOXJ1* 的 mRNA 表达水平显著下降，说明增殖阶段暴露 CB 会抑制杯状细胞和纤毛细胞生长；此外，CB 处理下，增殖生物标志物 *Ki67*、*PCNA* 的 mRNA 表达和 EdU 标记的增殖细胞数量显著下调，明确了 CB 暴露对气道上皮细胞增殖的干扰效应。

2. 气道上皮细胞中 Δ Np63 是 p63 的主要表达亚型。暴露 CB 显著降低 Δ Np63 的 mRNA 和蛋白表达水平；并且过表达 Δ Np63 后，缓解了 CB 暴露对气道上皮细胞增殖的抑制效应，证明 Δ Np63 在 CB 暴露诱导的细胞增殖抑制过程中发挥了重要调控作用。

3. 通过 GTRD、Chip-Atlas 和 KnockTF 数据库分析并结合文献查阅预测 Δ Np63 的下游靶基因为表皮生长因子受体（Epidermal Growth Factor Receptor, *EGFR*）、锯齿状典型 Notch 配体 1（Jagged canonical Notch ligand 1, *JAG1*）和 β -连环蛋白（Beta Catenin, *CTNNB1*）。结合分子生物学实验，初步发现 Δ Np63 调控 *CTNNB1* 是 CB 暴露抑制气道上皮修复的关键通路。进一步在敲低和过表达 Δ Np63 细胞株中，发现 *CTNNB1* 与 Δ Np63 的变化趋势保持一致，验证了 Δ Np63 通过调节 *CTNNB1* 参与 CB 暴露抑制细胞增殖，从而干扰气道上皮细胞修复。

4. 通过 JASPAR 数据库预测 Δ Np63 和 *CTNNB1* 的结合位点，并基于此位点，进行有/无 CB 的 MD，RMSD 和结构分析发现 CB 表面的含氧官能团（包括-OH 和-COOH）通过类竞争作用结合在 Δ Np63 上的 Arg311 上，破坏了 Δ Np63 对 *CTNNB1* 的稳定结合，从而抑制了 *CTNNB1* 的表达，最终干扰气道上皮细胞修复。

结论

本论文聚焦于 CB 致气道上皮损伤修复异常的关键阶段及分子机制，阐明 CB 可通过抑制增殖干扰气道上皮细胞修复，而 Δ Np63 靶向 *CTNNB1* 是 CB 抑制细胞增殖的关键路径之一。CB 表面的-OH 和-COOH 可与 Δ Np63 上的 Arg311 结合，从而阻碍了 Δ Np63 对 *CTNNB1* 的识别，最终抑制了气道上皮的修复。

硕士研究生： 刘楠（公共卫生）

指导老师： 魏潇然（助理教授）

关键词：炭黑；气道上皮修复；呼吸暴露风险； Δ Np63；*CTNNB1*

Competitive binding between carbon black and *CTNNB1* to Δ Np63 interpreting the abnormal respiratory epithelial repair after injury

Abstract

Background and objective

Carbon black (CB) nanoparticles are a widely used industrial material, and the risk of exposure to CB particles in the working environment has increased with the large-scale production of CB. CB entering the human body can induce respiratory diseases and lung injury. Airway epithelial cells are an important physical barrier to prevent pollutants from entering the human body. The continuous exposure of airway epithelial cells to environment leading to damage, so the efficient repair after injury of them is highly susceptible to maintaining epithelial homeostasis and preventing diseases. There were researches have shown that CB inhibits the proliferation of airway epithelial cells. However, the repair process of airway epithelial cells mainly includes cell proliferation and differentiation. The key stage in which CB interferes with the repair of airway epithelial cells has not been fully elucidated. This study aims to evaluate the key steps of the function of CB in the repair of airway epithelial cells and reveal the toxicological mechanism.

Methods

1. Airway epithelial cells were exposed to CB during the proliferation, differentiation and the whole repair cycle, and the mRNA expression of repair biomarker Mucin 5B (*MUC5B*), Mucin 5AC (*MUC5AC*), Fork head box J1 (*FOXP1*) and Fork head box J2 (*FOXP2*) was detected by Quantitative real-time PCR (qRT-PCR). To clarify the interference effect of CB exposure on the repair of airway epithelial cells. Recording the transmembrane electrical resistance (TEER) of primary human airway epithelial cells (pHAECs) during the repair process to evaluate the variations in airway epithelial cell barrier integrity under the influence of CB. Subsequently, changes in the number of proliferating cells were detected through EdU experiments, and the mRNA expression of proliferation biomarkers, cell cycle regulatory protein-67 (*Ki67*) and proliferating cell nuclear antigen (*PCNA*) were detected through qRT-PCR, which indicated proliferation phase was a crucial phase for CB interference in the repair of airway epithelial cells.

2. Airway epithelial cells treated with Δ Np63-over plasmid were exposed to CB, and the mediating effect of Δ Np63 on the interference of CB with airway epithelial cell proliferation was elucidated by EdU experiment. Then, the effects of CB exposure on the mRNA and protein expression of Δ Np63 were detected by qRT-PCR and Western blotting (WB)

3. The GTRD, ChIP-Atlas and KnockTF databases were used to predict relevant target genes regulated by Δ Np63. Airway epithelial cells was transfected by the siRNA/ Δ Np63-

over plasmid to investigate the regulatory effect of Δ Np63 on target gene *CTNNB1*.

4. The JASPAR database was used to predict the binding sites of Δ Np63 in the *CTNNB1* promoter region, and the binding and interaction between CB, Δ Np63 and *CTNNB1* were simulated and analyzed by Molecular dynamics (MD).

Results

1. During the process of airway epithelial repair, the cells exposed to CB at the proliferation phase significantly decreased the mRNA expression of *MUC5B* and *FOXJ1*, indicating that exposure to CB at the proliferation phase inhibited the growth of goblet cells and ciliated cells. In addition, the mRNA expression of proliferation biomarkers *Ki67* and *PCNA* and the quantity of proliferation of airway epithelial cells were downregulated under CB treatment, clarifying the interfering effect of CB on airway epithelial cell proliferation.

2. Δ Np63 was the predominant isoform of p63 in airway epithelial cells. Airway epithelial cells exposed to CB significantly decreased the mRNA and protein expression of Δ Np63. Moreover, Δ Np63 over-expression alleviated the inhibitory effect of CB on the proliferation of airway epithelial cells, indicating that Δ Np63 played an important regulatory role in CB-induced cell proliferation inhibition.

3. The target gene of Δ Np63 was predicted to be Epidermal Growth Factor Receptor (*EGFR*), Jagged canonical Notch ligand 1 (*JAG1*) and Beta Catenin (*CTNNB1*) by GTRD, Chip-Atlas and KnockTF database analysis combined with literature review. Combined with molecular biology experiments, it was found that Δ Np63 regulated *CTNNB1*, which was the key pathway for CB to inhibit airway epithelial repair. Furthermore, in the Δ Np63 knockdown and overexpression cell lines, the change trend of *CTNNB1* was consistent with the Δ Np63, which verified that Δ Np63 involved in CB inhibition of cell proliferation by regulating *CTNNB1*, thereby interfering with airway epithelial cell repair.

4. The binding sites of Δ Np63 and *CTNNB1* were predicted by JASPAR database. Based on this site, MD on Δ Np63-*CTNNB1* complex with/without CB were conducted. RMSD and structural analysis revealed that oxygen-containing functional groups (including -OH and -COOH) on the surface of CB bind through competition interactions on Arg311 of Δ Np63. It disrupted the stable binding of Δ Np63 to *CTNNB1*, thereby inhibiting the expression of *CTNNB1* and ultimately interfering with airway epithelial cell repair.

Conclusion

This thesis focused on the key phases and molecular mechanisms of CB-induced abnormal repair of airway epithelial injury and demonstrated that CB could interfere with airway epithelial cell repair by inhibiting proliferation, and Δ Np63 targeting *CTNNB1* was one of the key pathways by which CB inhibited cell proliferation. The -OH and -COOH on CB could bind to Arg311 of Δ Np63, thereby hindering the recognition of *CTNNB1* by

Δ Np63 and ultimately inhibiting the repair of airway epithelium.

Graduate student: Nan Liu (Public health)

Directed by prof: Xiaoran Wei

Key words: carbon black; airway epithelial repair; respiratory exposure risk; Δ Np63; *CTNNB1*

目 录

引言.....	1
材料与方法.....	3
1 主要仪器及试剂.....	3
2 CB 制备及实验溶液配制	5
3 细胞常规培养.....	5
4 细胞染毒.....	7
5 细胞活性检测.....	7
6 跨膜电阻实验.....	7
7 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR).....	7
8 Western blot 检测相关蛋白表达	10
9 EdU 检测细胞增殖	11
10 生物信息学分析.....	13
11 细胞转染.....	14
12 分子动力学模拟(MD)	15
13 数据处理.....	15
结果.....	16
1 CB 的表征及暴露浓度的筛选	16
2 ALI 培养构建人气道上皮细胞体外培养模型	17
3 筛选气道上皮细胞 ALI 培养时间.....	18
4 CB 干扰气道上皮细胞修复的关键阶段	19
5 CB 抑制气道上皮细胞增殖	21
6 ANp63 在 CB 抑制气道上皮细胞增殖中的作用	22
7 ANp63 的靶基因 CTNNB1 参与 CB 抑制气道上皮细胞增殖.....	24
8 CB 及 CTNNB1 与 Δ Np63 类竞争作用	28
讨论.....	31
结论.....	33
创新与不足.....	34
参考文献.....	35
综述 空气污染物对气道上皮细胞修复影响及机制研究进展	39
综述参考文献.....	44
附录或缩略词表	47

表目录

表 1 主要仪器及耗材	3
表 2 主要试剂	4
表 3 反转录反应体系	8
表 4 基因引物序列	9
表 5 <i>q</i> RT-PCR 常用反应体系	9
表 6 <i>q</i> RT-PCR 反应程序	10
表 7 Click-iT 工作液体系	12
表 8 Δ Np63 与靶基因结合位点的预测	13
表 9 CB 的 Zeta 电位和水合粒径	16

图目录

图 1 CB 的 TEM 图像.....	16
图 2 CB 的细胞毒性.....	17
图 3 ALI 培养构建人气道上皮细胞体外培养模型.....	17
图 4 修复生物标志物的 mRNA 表达水平.....	18
图 5 CB 干扰气道上皮细胞修复的关键阶段.....	20
图 6 CB 致增殖生物标志物 <i>Ki67</i> 和 <i>PCNA</i> 的 mRNA 表达降低.....	21
图 7 不同细胞中 <i>Ki67</i> 的 mRNA 表达水平.....	21
图 8 CB 致气道上皮细胞增殖数量减少.....	22
图 9 CB 致 Δ Np63 mRNA 和蛋白表达降低.....	23
图 10 pHAECs 暴露 CB 降低 Δ Np63 mRNA 和蛋白表达水平.....	23
图 11 过表达 Δ Np63 逆转 CB 对细胞增殖抑制作用.....	24
图 12 预测 Δ Np63 的靶基因.....	24
图 13 Δ Np63 靶基因的 GO 分析结果.....	25
图 14 CB 暴露后 <i>CTNNB1</i> 、 <i>EGFR</i> 和 <i>JAG1</i> 的 mRNA 表达水平.....	25
图 15 CB 暴露后 <i>CTNNB1</i> 、 <i>EGFR</i> 和 <i>JAG1</i> 的蛋白表达水平.....	26
图 16 敲低 Δ Np63 后暴露 CB Δ Np63 和 <i>CTNNB1</i> mRNA 表达水平.....	26
图 17 过表达 Δ Np63 后暴露 CB Δ Np63 和 <i>CTNNB1</i> 的 mRNA 和蛋白表达水平.....	27
图 18 Δ Np63 与靶基因 <i>CTNNB1</i> 启动子区结合位点的预测.....	28
图 19 CB 致 Δ Np63 与 <i>CTNNB1</i> 之间结合距离动态曲线改变.....	29
图 20 CB 干扰 Arg311 与 dGMP 之间的相互作用.....	30
图 21 CB 与 <i>CTNNB1</i> 对 Δ Np63 类竞争作用致气道上皮修复异常的机制图.....	33

引言

炭黑 (Carbon black, CB) 是由近乎纯元素碳组成的纳米级颗粒物^[1]。2012 年 CB 全球产量约为 1100 万吨, 被应用于橡胶、塑料和印刷油墨等生产过程中^[2], 是一种广泛存在的职业暴露污染物。1993 年至 1995 年间, 美国从事 CB 生产的工人中, CB 的最大暴露浓度达到 13.25 mg/m^3 ^[3]。2010 年 CB 被国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 归类为可能对人类致癌 (2B 组) 物质^[4]。CB 粒径小且长期悬浮在空气中, 可经呼吸系统进入人体^[5], 继而沉积在呼吸道和肺部深处^[4], 诱发呼吸道及肺泡上皮细胞的氧化损伤和炎症反应, 最终导致呼吸道及肺部损伤^[6], 主要包括降低肺功能及诱发呼吸系统疾病, 例如慢性阻塞性肺疾病 (Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、哮喘、肺纤维化 (Pulmonary fibrosis, PF)、急性呼吸窘迫综合征 (Acute respiratory distress syndrome, ARDS) 等^[7]。流行病学研究发现, CB 包装工的肺功能指标 (FEV1/FVC、MMEF、FEF25 和 FEF75) 和肺损伤敏感指标 (CC16 和 SP-A) 显著低于普通人群, 表明长期接触 CB 可导致肺功能下降^[8]。另外一项针对 CB 诱发呼吸系统疾病的病例报告研究发现, 患者在大量接触 CB 后出现呼吸困难、咳嗽等呼吸道症状及阻塞性通气缺陷, 还可能增加患小气道疾病的风险^[9]; 动物研究也表明 CB 暴露会导致哮喘小鼠模型杯状细胞增殖、粘液分泌过多和肺纤维化的发展^[10]。综上所述, CB 暴露危害呼吸系统健康, 有必要对其展开研究。

气道上皮细胞作为假复层纤毛柱状上皮, 主要由杯状细胞、纤毛细胞和基底细胞组成^[7], 作为抵御污染物和病原体进入人体的物理屏障, 其能通过粘液纤毛清除功能清除吸入的颗粒物^[11]。然而, 长时间或高浓度暴露于污染物 (如颗粒物、香烟烟雾和呼吸道病原体) 会破坏上皮屏障的完整性^[11-13]。为了应对上皮细胞稳态失衡, 气道上皮细胞会迅速启动修复功能, 异常修复被越来越多地认为与多种疾病的发生有关, 如 COPD、哮喘、慢性鼻窦炎等^[7]。与正常人群相比, 哮喘患者会出现伤口愈合延迟^[14]; 在原发性纤毛运动障碍患者中, 研究发现粘液纤毛清除能力受损^[15]。由此可见, 损伤后的高效修复是维持组织健康和预防疾病的关键因素。

细胞增殖和分化是气道上皮细胞修复的主要过程^[16, 17]。外源性污染物或病原体对气道上皮细胞修复不同阶段的影响不同。研究表明, 细颗粒物 (Particulate matter 2.5, $\text{PM}_{2.5}$) 会损害兔鼻黏膜纤毛、诱导粘蛋白 5AC (Mucin 5AC, *MUC5AC*) mRNA 表达升高及杯状细胞增生^[18]; 原代支气管上皮细胞暴露于香烟烟雾会限制纤毛细胞生长并诱导杯状细胞增生^[19], 这均表明外源性污染物能通过影响细胞分化干扰气道上皮细胞修复。此外, 污染物还可通过影响细胞增殖干扰气道上皮修复, 例如, 制动磨损纳米颗粒暴露于人肺腺癌细胞 (Calu-3 细胞) 会升高细胞增殖率^[20]。

尽管有大量关于污染物扰动上皮稳态和细胞修复的研究，但 CB 干扰气道上皮细胞修复的相关研究较少。有限研究表明，超细炭黑能通过表皮生长因子受体（Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR）信号通路刺激人气道上皮细胞的增殖^[21]。但该研究只针对气道上皮细胞修复过程中的单一阶段进行探索，其原因是传统单层细胞培养无法还原完整修复过程，导致对气道上皮修复的细胞生理学变化及机制的探索受阻^[22]。气液界面（Air-liquid interface, ALI）模型为研究气道上皮细胞增殖、分化的联合过程提供有效方法，该模型能还原气道上皮细胞假复层的特征，同时还可以模拟吸入暴露方式，便于对 CB 与气道上皮修复之间的相互作用及具体机制展开研究^[23]。因此，本论文将利用 ALI 模型来阐明 CB 诱导气道上皮细胞修复异常的关键阶段。

肿瘤蛋白 p63（Tumor protein p63, p63）是 p53 转录因子家族的一员^[24]。p63 在肺基底细胞中大量表达，研究发现在 PF 患者的细支气管及慢性鼻窦炎患者的鼻黏膜中，p63 阳性细胞数量显著增加^[25, 26]。此外，p63 还参与调节细胞增殖、分化和粘附相关的众多靶基因^[27]，其在气道上皮细胞修复中发挥积极作用^[28]。研究表明，敲低 p63 可使慢性鼻窦炎和鼻息肉患者纤毛的数量增加^[29]；并且敲低 p63 表达能显著抑制气道上皮细胞的伤口闭合度和细胞增殖水平^[30]。然而，外源性污染物的刺激能诱导 p63 表达改变。例如，将人头颈部鳞状细胞癌细胞暴露于香烟烟雾中会导致 $\Delta Np63$ 蛋白表达水平升高^[31]；在人支气管上皮细胞中暴露香烟烟雾上调了 $\Delta Np63$ 蛋白表达，进而激活 Notch 信号通路^[32]。基于以上发现，本研究提出假设 p63 可能在 CB 干扰气道上皮细胞修复中发挥调控作用。因此，进一步研究 CB 作用下 p63 的功能变化有利于全面揭示 CB 干扰气道上皮细胞修复的复杂机制。p63 蛋白结构主要包括 N 端反式激活结构域（N-terminal transactivation domain, TAD），DNA 结合结构域（DNA-binding domain, DBD）和四聚化结构域（Tetramerization domain, TD）^[33]。有研究发现 p63 的 DBD 结构域中的点突变与遗传性面部和肢体综合征有关^[34]，同时，p63 DBD-DNA 晶体结构上的点突变图谱表明，当出现点突变时会破坏蛋白的稳定性或损害蛋白-DNA 之间的相互作用^[35]。分子动力学模拟（Molecular dynamics, MD）能直观揭示 p63-DNA 的结合作用，其主要是通过计算机平台模拟配体-受体蛋白相互作用，有利于探索 CB 干扰气道上皮修复的机制。

本研究旨在阐明 CB 诱导气道上皮细胞异常修复的关键阶段和具体机制。首先采用 ALI 模型系统地阐明 CB 干扰细胞修复进程中的关键阶段。为了探究 CB 暴露致气道上皮细胞异常修复相关的调控因子，本研究使用 siRNA 和过表达质粒转染细胞并在基因和蛋白水平上检测 p63 和其靶基因的表达。进一步，利用 MD 揭示 CB、靶基因和 p63 之间潜在的微观机制。

材料与amp;方法

1 主要仪器及试剂

1.1 实验仪器与耗材

表 1 主要仪器及耗材

仪器名称	公司
数控超声波清洗器	昆山市超声仪器有限公司
普通离心机	上海昕仪仪器仪表有限公司
高速低温离心机	美国 Thermo 公司
光学显微镜	上海长方光学仪器有限公司
各量程移液器	美国 Thermo 公司
酶标仪	美国 Thermo 公司
计数器	美国 Tally Counter Store
超低温冰箱	中国海尔公司
普通冰箱	中国海尔公司
细胞计数板	新乡市维克科教仪器有限公司
荧光显微镜	日本 Olympus 公司
超纯水仪	厦门锐思捷水纯化技术有限公司
高压蒸汽灭菌锅	厦门致微仪器有限公司
涡旋振荡器	德国 Heidolph 公司
精密电子分析天平	赛多利斯科学仪器(北京)有限公司
生物安全柜	中国海尔公司
超净工作台	中国海尔公司
CO ₂ 培养箱	美国 Thermo 公司
倒置生物显微镜	美国 LI-COR 公司
恒温水浴锅	中国医用恒温设备厂
制冰机	中国比朗公司
普通 PCR 仪	美国 BIO-RAD 公司
Fast real-time PCR system	瑞士 Roche 公司
恒温金属浴	中国博日科技公司
枪头	美国康宁公司
96、24、12、6 孔板	美国康宁公司
Transwell	美国康宁公司
T25 瓶	美国康宁公司
电泳仪	美国 BIO-RAD 公司
无菌离心管	美国康宁公司
Millicell ERS-2	美国 Millipore

1.2 实验试剂

表 2 主要试剂

试剂名称	公司名称
MEM 培养基	美国 Hy Clone 公司
胎牛血清 (FBS)	以色列 BI 公司
0.25%-胰酶-EDTA	美国 Gibco 公司
胰酶 (EDTA)	瑞士 Lonza 公司
胰蛋白酶中和溶液 (TNS)	瑞士 Lonza 公司
青霉素和链霉素	美国 Gibco 公司
磷酸缓冲溶液 (PBS)	美国 Hy Clone 公司
杜氏磷酸缓冲盐溶液 (DPBS)	美国 Hy Clone 公司
PneumaCult-ALI 培养基	美国 STEMCELL 公司
PneumaCult-Ex 培养基	美国 STEMCELL 公司
RIPA 裂解液	中国碧云天公司
蛋白酶抑制剂	美国 MCE 公司
BCA 检测试剂盒	中国美伦公司
Phenyl methane sulfonyl fluoride	美国 Roche 公司
10%PAGE 凝胶快速制备试剂盒	中国雅酶公司
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液	中国雅酶公司
蛋白 Marker	中国雅酶公司
SDS-PAGE 电泳液	中国碧云天公司
转膜缓冲液	中国碧云天公司
TBST 粉末	中国碧云天公司
Western 封闭液	中国碧云天公司
化学发光检测试剂盒	美国 Thermo 公司
一抗二抗稀释液	中国博士德公司
PVDF 膜	美国 Millipore 公司
Anti-ΔNp63	美国 Abcam 公司
Anti-CTNBN1	中国正能生物公司
Anti-JAG1	美国 Abcam 公司
Anti-EGFR	中国正能生物公司
Anti-β-actin	中国 Abclonal 公司
Trizol	日本 Takara 公司
HiScript III RT SuperMix	中国诺唯赞生物
NovoStart SYBR qPCR SuperMix Plus	中国 Novoprotein 公司
DEPC 水	中国碧云天公司
EdU 检测试剂盒	美国 APEX-BIO 公司
无内毒素质粒小量试剂盒	中国康为世纪公司
LB 肉汤	中国美伦生物
嘌呤霉素	中国碧云天公司
Opti 培养基	中国源培生物公司
二甲基亚砷 (DMSO)	中国索莱宝公司
RFect 小核酸转染试剂	中国百代生物公司
RFect 质粒 DNA 转染试剂	中国百代生物公司

2 CB 制备及实验溶液配制

将 10 mg 的 CB 粉末溶于 10 mL 的超纯水中并超声 20 min 充分混匀，配成 1 mg/mL 的 CB 母液，高压灭菌后于 4°C 储存。CB 暴露前，按照 10 和 25 $\mu\text{g/mL}$ 的暴露浓度用完全培养基梯度稀释成染毒工作液，并超声 20 min 使其充分混匀。

3 细胞常规培养

3.1 获取原代人支气管上皮细胞 (Primary human airway epithelial cells, pHAECs)

(1) 用支气管刷法从正常人支气管中获得细胞。

(2) 将支气管刷置于含有 3 mL PneumaCult-Ex 培养基的 15 mL 离心管中，用移液枪吹打支气管刷 15-20 次收集细胞。

(3) 放入离心机中，离心力 1000 rpm，离心 5 min 后，将细胞转移到预涂有基质胶的 T25 培养瓶中。

(4) 细胞在 37°C、5% CO₂ 的 PneumaCult-Ex 培养基中培养。每 2 天更换一次培养基。本实验采用第三代细胞。

3.2 ALI 培养构建模型

增殖期

(1) 冲洗细胞：用 2 mL DPBS 清洗细胞。

(2) 消化：加入 2 mL 胰酶，并在 37°C 下孵育 1-3 min，在倒置显微镜低倍镜下观察细胞状态直至轻轻敲击培养皿可使细胞脱落。

(3) 中止消化：加入 2 mL 的 TNS 中止消化，将细胞收集至 15 mL 离心管中。

(4) 离心：以 1000 rpm 离心 5 min。弃去上清液，将细胞团块重悬于 1 mL PneumaCult-Ex 增殖培养基中。

(5) 加培养基：向 12 孔板的 Transwell 下室孔中加入 PneumaCult-Ex 增殖培养基 1 mL。

(6) 在上室中以 1×10^5 个细胞/cm² 溶于 0.5 mL PneumaCult-Ex 增殖培养基接种到直径为 0.4 μm 的多聚碳膜 Transwell 上进行铺板，混匀后转入培养箱中孵育 (37°C, 5% CO₂)。

(7) 隔一天对细胞进行换液 (PneumaCult-Ex 增殖培养基) 直至细胞长至完全融合。

分化期

(1) 在细胞长至完全融合时开始进行分化。

(2) 从 Transwell 下室和上室中轻轻吸出 PneumaCult-Ex 增殖培养基。仅向下室内添加 PneumaCult-ALI 分化培养基 1 mL，上室中不加培养基。放置培养箱内孵

育 (37°C, 5% CO₂)。

(3) 隔一天对下室进行一次换液 (PneumaCult-ALI 分化培养基)。

(4) 从分化第 2 周开始, 每周用 0.5 mL 的 DPBS 清洗细胞一次, 除去顶端表面多余的粘液, 以防止过多的粘液积聚。

3.3 人支气管上皮细胞系 (16HBE 细胞) 的培养

3.3.1 细胞培养

以人 16HBE 细胞为受试细胞株, 按 10%胎牛血清, 0.1%青霉素和链霉素的比例配制 MEM 完全培养基, 将细胞放入培养箱 (37°C, 5% CO₂) 中进行培养, 每天更换培养基。

3.3.2 细胞复苏

(1) 将冻存管放入 37°C水浴锅中快速摇晃使其融化。

(2) 在 15 mL 离心管中加入 1 mL 新鲜培养基, 将细胞加入其中充分混匀放入离心机中, 1000 rpm, 离心 5 min。

(3) 弃掉上清液, 加入 1 mL 完全培养基重悬细胞, 将细胞悬液加入含有完全培养基的培养皿中, 充分混匀后放入培养箱内 (37°C, 5% CO₂)。

3.3.3 细胞传代

(1) 弃掉旧培养基并加入 1 mL 的 PBS, 润洗细胞后弃去 PBS。

(2) 加入 2 mL 含 0.25% EDTA 的胰酶, 缓慢摇匀, 保证胰酶充满整个皿底, 放入培养箱消化约 1 min。

(3) 在镜下观察细胞状态然后加入 1 mL 完全培养基终止消化。

(4) 移液枪轻轻敲打皿底将细胞脱落, 把细胞悬液加入到 15 mL 离心管中, 1000 rpm 离心 5 min。

(5) 在培养皿中加入培养基, 离心后弃掉细胞上清液, 取 1 mL 完全培养基重悬细胞后按 1: 3 比例将细胞悬液移入新的培养皿内, 混匀后转入细胞培养箱内。

3.3.4 细胞冻存

(1) 按照 DMSO: 胎牛血清=1: 9 比例配制冻存液并充分混合。

(2) 细胞收集过程见 2.3.3.3 细胞传代部分。

(3) 将含有细胞沉淀的冻存管中加入 1 mL 的细胞冻存液, 放入细胞冻存盒中并在 -80°C冰箱冻存 24 h 后转移至液氮罐中长期冻存。

4 细胞染毒

(1) 按 1、5、10、25、50、100 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度稀释 CB 母液用于细胞暴露。

(2) 在增殖阶段,待细胞贴壁后,DPBS 清洗 2 次,将溶解在 PneumaCult-Ex 培养基中的 CB 加入到 Transwell 的上室暴露于细胞,于 37°C 培养箱内暴露 3 天,每两天换一次液。

(3) 在分化阶段,使用 DPBS 清洗细胞去除 CB,将溶解在 PneumaCult-ALI 培养基中的 CB 添加到 Transwell 的下室中暴露于细胞,于 37°C 培养箱内长期暴露,每两天换一次培养基。

5 细胞活性检测

(1) 将细胞用胰酶消化、离心、加入培养基重悬后制成细胞悬液进行细胞计数。

(2) 细胞接种至 96 孔板,每个样本设 3 个复孔,将培养板在培养箱进行预培养 24 h (37°C , 5% CO_2)。

(3) CB 处理细胞 24 h 后弃掉培养基,加入 PBS 清洗残留培养基,然后配制 10% 的 CCK-8 溶液加入细胞培养孔中。

(4) 将培养板在培养箱内培养 0.5-4 h,具体时间以显色程度而定。

(5) 酶标仪检测:测定在 450 nm 处的吸光度,按公式:细胞活力 (%) = $[A(\text{加药}) - A(\text{空白})] / [A(0\text{加药}) - A(\text{空白})] \times 100$ 计算细胞活性。

6 跨膜电阻实验

(1) 将 STX-2 电极放至 75% 酒精 15 min 后自然晾干,放入 DPBS 中冲洗酒精,并平衡电极 15 min。

(2) 吸去旧培养基,在小室下层加入 1 mL 的 DPBS,上室加入 0.5 mL 的 DPBS 平衡 15 min。

(3) 将电极短端浸入培养板内部,长端浸入外部进行测量,测得每个小室内三个侧孔处的电阻值。

(4) TEER 值由测得的电阻计算,按单层面积归一化。从细胞中测得的 TEER 值减去空白的 Transwell 小室的背景值。

7 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

7.1 Trizol 法抽提细胞总 RNA

(1) 分离 RNA:取出细胞培养板,弃去旧培养基,用 PBS 润洗细胞,加入 500 μL 的 Trizol,用移液枪充分吹打细胞并吸入到 RNase-Free 1.5 mL 的离心管中,

涡旋 5-10 s, 静置 5 min。按照 Trizol 与氯仿 5: 1 的比例加入 100 μL 的氯仿, 震荡涡旋 45 s, 使 Trizol 与氯仿充分混匀至溶液呈淡粉色且无分层, 在室温下静置 5 min, 离心: 12000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 时长 15 min。

(2) 沉淀 RNA: 准备新的 RNase-Free 1.5 mL 离心管并做好标记, 在无菌离心管中加入含有 RNA 的水样层, 然后加入异丙醇, 上下颠倒混匀 10 次后在室温下静置 30 min。离心: 12000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 时长 15 min。离心完毕弃掉上清。

(3) 洗涤 RNA: 按照无水乙醇与 DEPC 水 3: 1 的比例配置 75%乙醇, 向含有 RNA 沉淀的离心管中加入 500 μL 的 75%乙醇, 轻轻吹下离心管中的白色沉淀使 RNA 沉淀悬浮, 离心: 13000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 时长 10 min。重复上步。弃上清, 13000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 空管离心 5 min, 弃掉管内剩余液体。将离心管室温干燥至 RNA 沉淀变透明。

(4) 溶解 RNA: 取 10 μL 的 DEPC 水, 使用 58 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴 10 min 后置于冰上。

(5) 检测 RNA 样品纯度和浓度: 用移液枪吸取 1 μL 样品进行 RNA 检测, 使用微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度和 A260/A280 比值。

7.2 逆转录 (RT)

逆转录过程用逆转录 (RT) 试剂盒, 根据: 1000 ng/RNA 的浓度=RNA 体积计算 RNA 的量, 用 20 μL 体系反转。如表 3 所示。按照逆转录试剂盒说明书加入表中的各种试剂, 混匀之后在 PCR 仪上进行两步逆转录反应。

表 3 反转录反应体系

试剂	体积
总 RNA	VRNA=1000 ng/RNA 浓度 (μL)
4 $\times$ gDNA wiper Mix	4 μL
RNase-free ddH ₂ O	to 16 μL
用移液枪轻轻吹打混匀。42 $^{\circ}\text{C}$ 2 min	
5 $\times$ HiScript III qRT SuperMix	4 μL
用移液枪轻轻吹打混匀。37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min; 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s	
Total	20 μL

7.3 qRT-PCR

(1) 引物合成: 所有引物均由上海生工 (Sangon Biotech) 生物工程股份有限公司合成, 引物列表如下。

表 4 基因引物序列

基因	基因序列 (5'-3')
<i>ΔNp63</i>	Forward primer: GGAAAACAATGCCCAGACTC Reverse primer: TGTATAGGGACTGGTGGAC
<i>TAp63</i>	Forward primer: TGGAGCAGGGTGGACACTCATC Reverse primer: GCTGGAGGCATCTCTGAACCTCTG
<i>Ki67</i>	Forward primer: GGCCTGCTCGACCCTACAGA Reverse primer: GCTTGTCAACTGCGGTTGC
<i>PCNA</i>	Forward primer: CCTGCTGGGATATTAGCTCCA Reverse primer: CAGCGGTAGGTGTCGAAGC
<i>MUC5B</i>	Forward primer: GGGCTTTGACAAGAGAGT Reverse primer: AGGATGGTCGTGTTGATGCG
<i>MUC5AC</i>	Forward primer: CCTTCGACGGACAGAGCTAC Reverse primer: TCTCGGTGACAACACGAAAG
<i>FOXJ1</i>	Forward primer: GGAGGGGACGTAAATCCCTA Reverse primer: TTGGTCCCAGTAGTTCCAGC
<i>FOXJ2</i>	Forward primer: CTGAGGGGAATCCGCAGATG Reverse primer: CAGCACTTTCTCGGCCTGAA
<i>EGFR</i>	Forward primer: TCCCCGTAATTATGTGGTGAC Reverse primer: GCCCTTCGCACTTCTTACAC
<i>CTNNB1</i>	Forward primer: CATCTACACAGTTTGATGCTGCT Reverse primer: GCAGTTTGTGTCAGTTCAGGGA
<i>JAG1</i>	Forward primer: AAGGGTGTGGGCAGAATGGAAAC Reverse primer: GCAGACAAGTTGACGAGGGAAGG
<i>β-actin</i>	Forward primer: CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG Reverse primer: TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG

(2) 根据试剂盒说明书操作, 操作流程如下。

表 5 qRT-PCR 常用反应体系

反应试剂	体积
2×NovoStart SYBR qPCR SuperMix Plus	10 μL
ROX II	0.4 μL
上游引物	0.4 μL
下游引物	0.4 μL
cDNA	2 μL
RNase Free Water	至 20 μL

表 6 qRT-PCR 反应程序

反应温度	反应时间	循环数
95°C	1 min	1
95°C	20 s	40
60°C	1 min	40

8 Western blot 检测相关蛋白表达

8.1 提取细胞蛋白

(1) 取 1 mL 的 RIPA 裂解液，按照 100: 1 的比例，将其与蛋白酶抑制剂充分混合，配制好后放在冰上备用。

(2) 取出细胞培养板，在弃去旧培养基后用凉的 PBS 润洗细胞。在细胞培养板中均匀缓慢的加入 100 μ L 的裂解液。将细胞培养板放至冰上，摇床快摇 15 min (保证裂解液液面晃动)，直至细胞蛋白充分裂解。

(3) 用细胞刮把细胞刮下来，用移液枪吸至 RNase-Free 1.5 mL 离心管中，用超声进一步裂解细胞 (超声时要把样品放至冰上进行)。

(4) 离心: 15000 g, 4°C, 时长 10 min。

(5) 离心结束后，取上清液至新的 1.5 mL 离心管中，吸取部分样品测定浓度。

8.2 BCA 法测定蛋白浓度

(1) 配制工作液: BCA: Cu = 50: 1 的比例配制 BCA 工作液，充分混匀。

(2) 稀释标准品: BCA 标准品使用 PBS 稀释 10 倍，使其终浓度为 0.5 mg/mL。将标准品按照 0、1、2、4、8、12、16、20 μ L 加到 96 孔板中，然后加 PBS 补齐至 20 μ L。

(3) 稀释蛋白: 取 4 μ L 蛋白样品加入 96 孔板中，加 PBS 补足到 20 μ L。

(4) BCA 工作液加入 200 μ L 至 96 孔板中，在 37°C 烘箱内避光放置 30 min。使用酶标仪测定 562 nm 处吸光度。根据标准曲线与稀释倍数计算出样品蛋白浓度。

8.3 Western-blot 实验

(1) 配胶: 取等体积的胶溶液和胶缓冲液并加入促凝剂充分混匀，配置 10% 的分离胶和浓缩胶。

(2) 检漏: 玻璃板清洗干净，将 1.5 mm 的玻璃板固定在制胶架上，加入超纯水检查有无漏液。

(3) 灌胶: 加入分离胶再加入无水乙醇进行封层。在室温下静置 15 min，待分离胶凝固后倒出无水乙醇。加入浓缩胶后垂直插入梳子。室温静置 15 min，待浓缩胶完全凝固之后，使用电泳槽将玻璃板固定并保证没有缝隙。

(4) 配置电泳液: 在 1000 mL 超纯水中加入电泳液粉末，然后在磁力搅拌器

上混匀至完全溶解。

(5) 电泳：把配制好的电泳液倒入到电泳槽中，垂直取出梳子。根据 marker，蛋白，marker 顺序加入样品。上样完成之后，接通电源，设置恒定电压 60 V，40 min，当样本蛋白跑到分离胶时，调整电压到 120 V。待溴酚蓝电泳到下层胶底部的时候关闭电源。根据蛋白分子量去除多余部分，进行转膜。

(6) 配置转膜液：在 800 mL 超纯水中加入无水乙醇至 1000 mL 然后加入转膜液粉在磁力搅拌器上充分混匀。

(7) 转膜：剪裁 5×8 cm 的 PVDF 膜并且在甲醇中激活 30 s。按照转膜板白色面-黑色滤网-海绵-PVDF 膜-胶-海绵-黑色滤网-转膜板黑色面的顺序依次叠加，保证胶与膜之间没有气泡。将装好的转膜夹固到转膜槽中，转膜夹的白色面对应转膜槽的红色面。在转膜槽中倒入转膜液，加入冰块及冰袋设置 260 mA 恒流进行转膜 2 h。

(8) 封闭：PVDF 膜使用 TBST 溶液冲洗 10 min，然后在孵育盒中加入快速封闭液将 PVDF 膜浸没，室温下缓慢摇动封闭 2 h。

(9) 一抗孵育：用 TBST 快速摇动漂洗 PVDF 膜 3 次，每次 10 min。按照 1:1000 的比例用抗体稀释液稀释一抗 (ΔNp63、JAG1、CTNNB1、EGFR、β-actin)，在抗体孵育盒中加入一抗，4℃缓慢摇床过夜。

(10) 二抗孵育：回收一抗，用 TBST 快速漂洗 PVDF 膜 3 次，每次 10 min。按照 1:1000 的比例用抗体稀释液稀释二抗。在抗体孵育盒中加入二抗，常温下在摇床上缓慢摇动 2 h，进行孵育。

(11) 显影：回收二抗并在摇床上用 TBST 快速摇动漂洗 PVDF 膜 3 次，每次 10 min。取 ECL 化学发光试剂 A 液 1 mL 和 B 液 1 mL 进行充分混合，将 PVDF 膜放至发光液中，过程全称需要避光操作。最后在化学发光仪中扫描并拍照。

(12) 定量分析：通过 Image J 软件分析内参蛋白条带和目的蛋白条带的灰度值，按照公式：目的蛋白条带/内参蛋白条带进行定量。

9 EdU 检测细胞增殖

9.1 细胞培养

取对数生长期细胞，以每孔 5×10^4 细胞接种于 24 孔培养板中，培养至正常生长阶段，使用对应浓度 CB 处理细胞。

9.2 EdU 标记

(1) 制备浓度为 10 μM 的 EdU 培养基，该过程用细胞完全培养基稀释 EdU 溶液。

(2) 弃去旧培养基, 用 PBS 润洗细胞 2 次, 更换 EdU 培养基并在培养箱 (37°C, 5% CO₂) 中孵育 2 h。

9.3 细胞固定及促渗

(1) 细胞孵育完成后, 弃掉培养基, 加入 200 μ L 的 4%多聚甲醛固定液室温孵育 20 min。

(2) 在每孔中加入 200 μ L 的 2 mg/mL 甘氨酸溶液, 在室温下孵育 5 min。

(3) 以每孔 200 μ L 的 3% BSA 洗涤细胞 2 次, 每次 3 min。

(4) 去除 BSA 洗涤液, 在每孔中加入 200 μ L 的 0.5% Triton X-100, 在室温下孵育 20 min。

(5) 去除 0.5% Triton X-100 的促渗剂, 在每孔中加入 200 μ L 的 3% BSA 洗涤细胞 2 次, 每次 3 min。

9.4 EdU 检测

(1) 配置 1 $\times$ Click-iT EdU 反应缓冲液: 用 ddH₂O 将 10 $\times$ Click-iT EdU 反应缓冲液稀释 10 倍。

(2) 加 300 μ L 的 ddH₂O 至 30 mg 的 Click-iT EdU 缓冲液添加物中配成终浓度为 100 mg/mL 的 5 $\times$ Click-iT EdU 缓冲液添加物, 用 ddH₂O 稀释制备成 1 $\times$ EdU 缓冲液添加物。

(3) 制备 Click-iT 工作液。

表 7 Click-iT 工作液体系

反应组分	体积 (1 个孔)
1 $\times$ Click-iT EdU 反应缓冲液	171 μ L
1 $\times$ Click-iT EdU 缓冲液添加物	20 μ L
CuSO ₄	8 μ L
YF 488 Azide	1 μ L
总体积	200 μ L

(4) 每孔中加入 200 μ L Click-iT 工作液, 室温孵育 30 min。

(5) 去除 Click-iT 工作液, 在每孔中加入 200 μ L 的 3% BSA 洗涤细胞 2 次, 每次 3 min, 去除洗涤液。

9.5 DNA 复染

(1) 用 200 μ L 的 PBS 洗涤细胞 1 次, 去除洗涤液。

(2) 用 PBS 将 Hoechst 33342 溶液稀释 2000 倍, 每孔中加入 200 μ L 的 1 $\times$ Hoechst 33342 溶液, 室温避光孵育 30 min。

(3) 去除 Hoechst 33342 溶液, 用 200 μ L PBS 洗涤细胞 2 次。

9.6 拍照及分析

应用荧光显微镜进行拍照成像，并使用 Image J 分析数据。

10 生物信息学分析

(1) 使用 GTRD (<http://gtrd.biouml.org/>)、ChIP-Atlas (<https://chip-atlas.org>) 和 KnockTF (<http://www.licpathway.net/KnockTF/index.html>) 数据库预测 $\Delta Np63$ 的靶基因。

(2) GTRD 数据库：根据靶基因启动子区域 [-100, +10] 来预测结合位点和靶基因；KnockTF 数据库：根据 $FDR \leq 0.05$ 筛选 $\Delta Np63$ 的靶基因。为了识别三个数据库的共表达基因，使用在线工具 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 绘制维恩图进行分析。

(3) 为了预测靶基因中与细胞修复相关的基因，本研究利用 Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID, <https://david.ncifcrf.gov/>) 对 $FDR \leq 0.05$ 的 $\Delta Np63$ 共表达基因进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 信号通路富集分析和基因本体 (Gene Ontology, GO) 分析。靶基因启动子序列从美国国家生物技术信息中心 (National Center of Biotechnology Information, NCBI) 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取。潜在启动子区域由基因起源上游 2000 碱基对 (Base Pair, bp) 和下游 100 bp 序列组成。本研究使用 JASPAR 数据库 (<http://jaspar.genereg.net/>) 预测 *CTNNB1* 启动子区域内的结合位点，其中特别关注相对得分高于 80% 的结合位点，结果如表 8 所示。

表 8 $\Delta Np63$ 与靶基因结合位点的预测

Gene(human)	Score	Relative score	Start	End	Strand	Predicted sequence
<i>EGFR</i>	11.27	0.859	618	637	+	CAGGAAGCACACACATGCCT
	11.15	0.858	399	418	+	TGACTTGTACACACAGGTCA
	10.71	0.852	775	794	-	GGGCAAGCGCAGACAGACAC
	8.84	0.831	308	327	+	ACTGATGTTCTTACATGCTG
<i>JAG1</i>	11.11	0.857	828	847	+	AGGCCTGTCCACCCACGTCC
<i>CTNNB1</i>	8.21	0.824	1675	1694	+	AGGCGCGCCGAGTCCTGCAG

11 细胞转染

11.1 siRNA 转染

siRNA 准备

本部分实验使用的 NC-si 和 Δ Np63-si, 均购自上海吉玛制药技术有限公司。具体配制方法如下:

- (1) 按 10000 rpm, 4°C, 离心 siRNA 2 min, 将管中粉末离心至管底。
- (2) 缓慢打开管盖加入对应量的 DEPC 水溶解成终浓度为 20 μ M 的储备液。

siRNA 转染

(1) 使用不含双抗的培养基将细胞接种于 12 孔板内, 待细胞贴壁后密度为 30-50% 时进行细胞转染。

(2) siRNA-RFect 混合物准备:

提前准备好 1.5 mL 离心管并做好标记。分为 NC-si 组、 Δ Np63-si 组、CB+NC-si 组及 CB+ Δ Np63-si 四组, 配制转染试剂, 15 μ L siRNA 用 250 μ L opti 培养基稀释, 10 μ L 的 RFect 用 250 μ L opti 培养基稀释。用移液枪将两者轻轻混匀, 在室温下孵育 5 min。将 siRNA 稀释液与 RFect 稀释液混合后轻轻混匀, 在室温下孵育 20 min。

(3) 将混合物加入到培养板孔中, 轻轻晃动培养板混匀。

(4) 培养箱内 (37°C, 5% CO₂) 培养 6 h 后, 更换培养基暴露 CB。48 h 后, 收取细胞样品用于 qRT-PCR。

11.2 质粒转染

本部分实验使用的 NC-over 和 Δ Np63-over, 均购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司。

(1) 转染前 24 小时左右对细胞进行接种并培养过夜, 确保转染时细胞密度为 80% 左右。

(2) 弃去旧培养基, 更换新鲜的含血清培养基。

(3) RFect/DNA 转染复合体准备

提前准备好 1.5 mL 离心管并做好标记。分为 NC-over 组、 Δ Np63-over 组、CB+NC-over 组及 CB+ Δ Np63-over 四组。在 1.5 mL 离心管中加入 200 μ L 的 Trans buffer 及 10 μ L 转染试剂。混匀后在室温静置 5 min。在离心管中加入 200 μ L 的 Trans buffer 及适量 DNA, 混匀后在室温静置 5 min。将两者混匀后在室温静置 15-20 min。将 RFect/DNA 转染复合体加入至孔板中, 充分混合后放至培养箱 37°C, 5% CO₂ 培养 12 h, 然后更换含有 CB 的培养基进行暴露。

(5) 细胞暴露 CB 培养 48 h 后做 *qRT-PCR*, 暴露 72 h 做 Western blot。

12 分子动力学模拟 (MD)

12.1 构建 Δ Np63-*CTNNB1*-CB 复合物模型

(1) Δ Np63 的初始模型是基于蛋白质数据库 (PDB 代码 3QYM) p63-DNA 复合物结构构建的。

(2) 构建 *CTNNB1* 的双螺旋结构, 并进一步对接到 Δ Np63 上形成蛋白-基因复合物, 其中保留了鸟嘌呤与 Arg311 的氢键相互作用^[33, 36]。

(3) 根据 Zhang 等人的研究构建 CB 结构^[37]。利用 AutoDock Vina 程序包^[38], 将 CB 对接到蛋白-基因复合物中, 得到 Δ Np63-*CTNNB1*-CB 复合物。在构建模拟模型时, 通过 h++ 程序估计了可滴定氨基酸残基的质子化状态^[39]。

12.2 MD

(1) 采用 AMBER18 分子模拟包进行经典 MD, 蛋白和 DNA 分别用 Amber ff14SB 和 OL15 力场进行描述^[40], 溶剂水分子采用 TIP3P 模型^[41]。CB 的力场参数以 GAFF 为基础生成^[42], 部分原子电荷由基于 HF/6-31G* 计算的约束静电势电荷定义。初始坐标和拓扑文件由 tleap 程序通过中和、溶剂化生成^[39]。随后采用三次模型的周期边界条件进行了经典动力学模拟。经过一系列能量最小化、程控加热 (0~310 K, NVT, 100 ps) 和密度平衡 (310 K, 1.0 atm, NPT, 100 ps), 最后进行了 200 ns NVT 进行 MD, 以生成轨迹。

(2) 在 MD 过程中, 使用 SHAKE 算法来约束所有含氢键的高频拉伸振动, 并为范德华 (LJ-12 势) 和静电相互作用 (PME 策略) 的截止值设置为 12 Å^[43]。最后, 使用 cpptraj 进行轨迹分析, 使用 PyMOL 进行可视化。

13 数据处理

数据的结果以均数 $\pm$ 标准差表示, 应用 Graph Pad Prism 6.0 软件对数据进行分析, 采用 *t* 检验、单因素方差分析对数据进行比较分析。

结果

1 CB 的表征及暴露浓度的筛选

使用透射电镜 (Transmission electron microscope, TEM) 对 CB 粒径进行表征。TEM 结果显示, CB 的单颗粒粒径为 $37.80 \pm 3.37 \text{ nm}$ (图 1), 且 CB 为形态大小均匀的球状颗粒, 多以团聚体形式存在。为了进一步评估 CB 的团聚情况, 利用动静态激光散射仪对不同溶液中 CB 的水合粒径进行表征, 其中, 在 PneumaCult-Ex 和 PneumaCult-ALI 两种培养基中 CB 的水合粒径分别为 $1119.59 \pm 130.18 \text{ nm}$ 和 $980.24 \pm 49.90 \text{ nm}$, 表明 CB 容易聚集。之后, 利用 Zeta 电位仪测定 CB 的 Zeta 电位值, 结果显示 CB 在所有溶液中均为负 ($-57.72 \sim -57.24 \text{ mV}$) (表 9)。

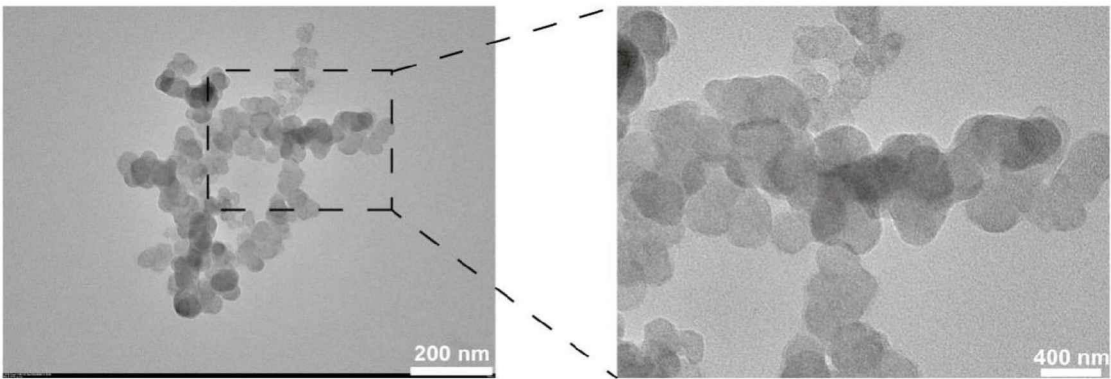


图 1 CB 的 TEM 图像

表 9 CB 的 Zeta 电位和水合粒径

	PneumaCult-Ex	PneumaCult-ALI	DPBS	去离子水
Zeta 电位 (mV)	-57.24 ± 0.13	-57.68 ± 0.24	-57.72 ± 0.53	-57.50 ± 0.19
水合粒径 (nm)	1119.59 ± 130.18	980.24 ± 49.90	1805.21 ± 247.91	486.94 ± 15.48

为确定 CB 的染毒剂量, 采用 CCK-8 法测定细胞活力并通过倒置显微镜观察 CB 诱发的细胞形态变化。CCK-8 实验结果显示, 随着 CB 暴露浓度的升高, pHAECs 的细胞活力以剂量依赖性趋势逐渐下降 (图 2A)。与对照组相比, CB 暴露浓度在 $25 \text{ }\mu\text{g/mL}$ 以下时, 对细胞存活率影响较小, 倒置显微镜镜下照片显示 pHAECs 的细胞数量也无明显减少、细胞形态正常 (图 2B)。然而, 在较高暴露浓度范围内 ($50\text{-}200 \text{ }\mu\text{g/mL}$), 细胞活力显著下降, 最低降至 37.59% , 并且 pHAECs 细胞数量显著减少、细胞体积缩小并出现明显的细胞死亡。结合以上结果, 最终以细胞存活率 80% 为标准选择无毒剂量 10 和 $25 \text{ }\mu\text{g/mL}$ 开展后续研究。

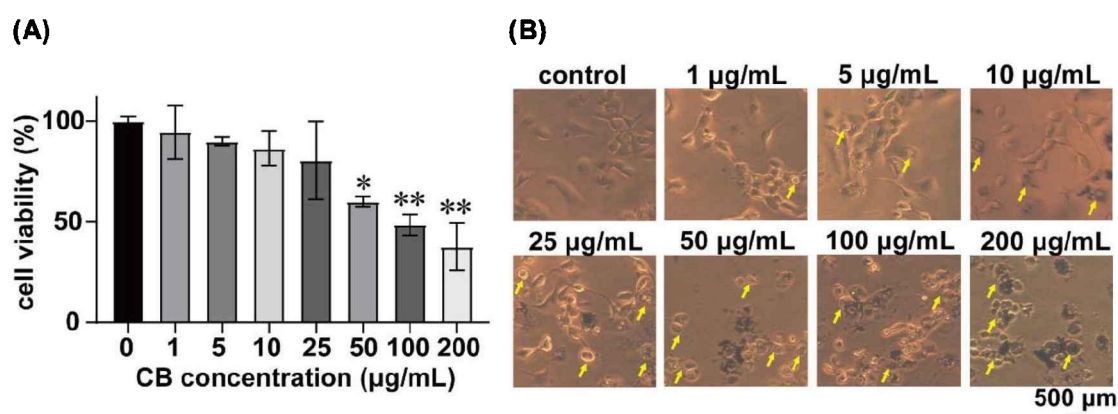


图 2 CB 的细胞毒性

注：(A) CCK-8 法测定 CB 暴露 pHAECs 24 h 后细胞活力；(B) CB 暴露于 pHAECs 24 h 后细胞形态变化（黄色箭头代表形态异常的细胞）；与对照组相比，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ 。

2 ALI 培养构建人气道上皮细胞体外培养模型

本研究采用 ALI 培养法建立原代人气道上皮细胞体外培养模型（图 3A）。通过倒置显微镜观察从细胞增殖到细胞分化过程中的细胞形态，将 pHAECs 形态规则且贴壁良好的细胞接种到 Transwell 膜上，并在细胞长至完全融合后进行细胞分化，细胞间逐渐从紧密连接到出现杯状细胞（淡黄色云雾状黏液），最终形成索状形态细胞，标志着假复层上皮结构分化成熟，构建成功的人气道上皮细胞体外培养模型如图 3B。

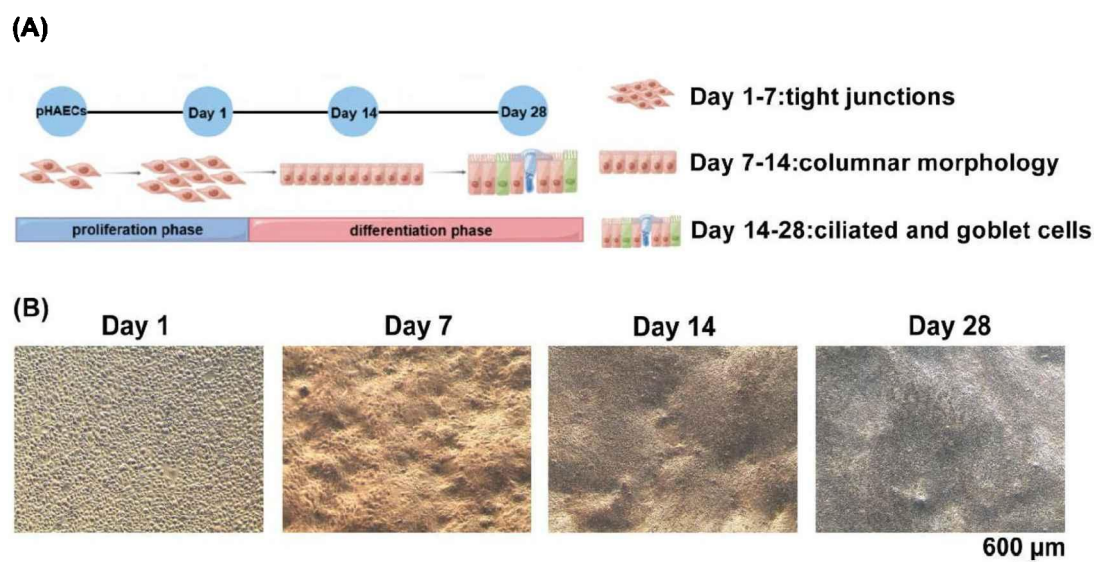


图 3 ALI 培养构建人气道上皮细胞体外培养模型

注：(A) ALI 培养示意图；(B) pHAECs 细胞经 ALI 培养倒置显微镜镜下细胞形态照片。

3 筛选气道上皮细胞 ALI 培养时间

基于构建的人气道上皮细胞体外培养模型，分别在细胞培养 14 天、20 天、24 天和 28 天后中止分化，通过检测修复生物标志物黏蛋白 5AC (Mucin 5AC, *MUC5AC*)、黏蛋白 5B (Mucin 5B, *MUC5B*)、叉头框蛋白 J1 (Forkhead-box J1, *FOXJ1*) 和叉头框蛋白 J2 (Forkhead-box J2, *FOXJ2*) 的 mRNA 表达，明确 ALI 的最佳培养时间。其中，*FOXJ1*、*FOXJ2* 通常用作监测运动纤毛形成的特异性标记物^[44]；*MUC5AC*、*MUC5B* 作为粘液的主要成分及分泌细胞的产物，能表明杯状细胞形成情况^[45]。图 4 中可看出，与细胞分化 14 天相比，细胞培养 24 天时纤毛细胞标志物 *FOXJ1*、杯状细胞标志物 *MUC5AC* 和 *MUC5B* 的 mRNA 表达水平显著升高，在细胞分化 28 天时，*FOXJ1*、*MUC5AC* 和 *MUC5B* 的 mRNA 表达水平出现降低趋势（图 4）。因此，后续研究将以 pHAECS 细胞 ALI 分化 24 天为周期进行培养。

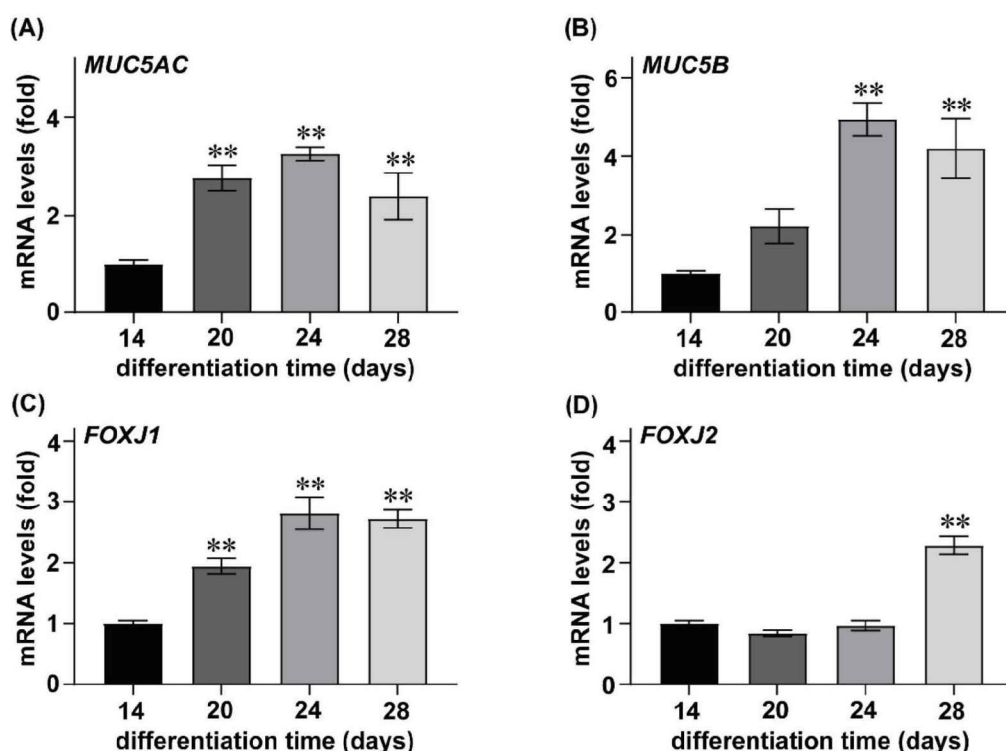


图 4 修复生物标志物的 mRNA 表达水平

注：(A-B) *MUC5AC*、*MUC5B* 的 mRNA 表达变化；(C-D) *FOXJ1*、*FOXJ2* 的 mRNA 表达变化（分别于 pHAECS 培养的第 14、20、24、28 天进行测定）；与对照组相比，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ 。

4 CB 干扰气道上皮细胞修复的关键阶段

为了分析 CB 在修复不同阶段与气道上皮细胞的相互作用，本研究将 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 CB 在增殖阶段、分化阶段和整个修复过程中与气道上皮细胞进行孵育，检测修复生物标志物的 mRNA 表达和跨膜电阻值（Transepithelial electrical resistance, TEER）变化（图 5A）。图 5B 显示，增殖阶段及全程都暴露 CB 时修复生物标志物 *MUC5B* 和 *FOXJ1* 的 mRNA 表达水平较对照组显著下降，表明 CB 会抑制杯状细胞和纤毛细胞生长；其中增殖阶段暴露 CB 时修复生物标志物下降最为明显，近 70%。而分化阶段暴露 CB 只有 *MUC5B* 的 mRNA 表达显著下降，*FOXJ1* 的 mRNA 表达改变无统计学差异，提示分化阶段暴露 CB 会抑制杯状细胞生长，对纤毛细胞的生长影响较小（图 5B）。进一步仅在细胞增殖阶段暴露 10 和 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 CB，发现 *FOXJ1* 和 *MUC5B* 的 mRNA 表达水平呈剂量依赖性降低（图 5D 和 E），明确了细胞增殖阶段暴露 CB 抑制气道上皮修复的剂量-依赖关系。除此之外，TEER 是测量上皮组织屏障的电阻，能反映上皮细胞屏障完整性和通透性^[46]。图 5C 显示，与对照组相比，虽然 CB 暴露组 pHAECs 的 TEER 值均略有下降，但未发现具有统计学差异，说明 CB 对 pHAECs 的屏障功能影响不明显（图 5C）。

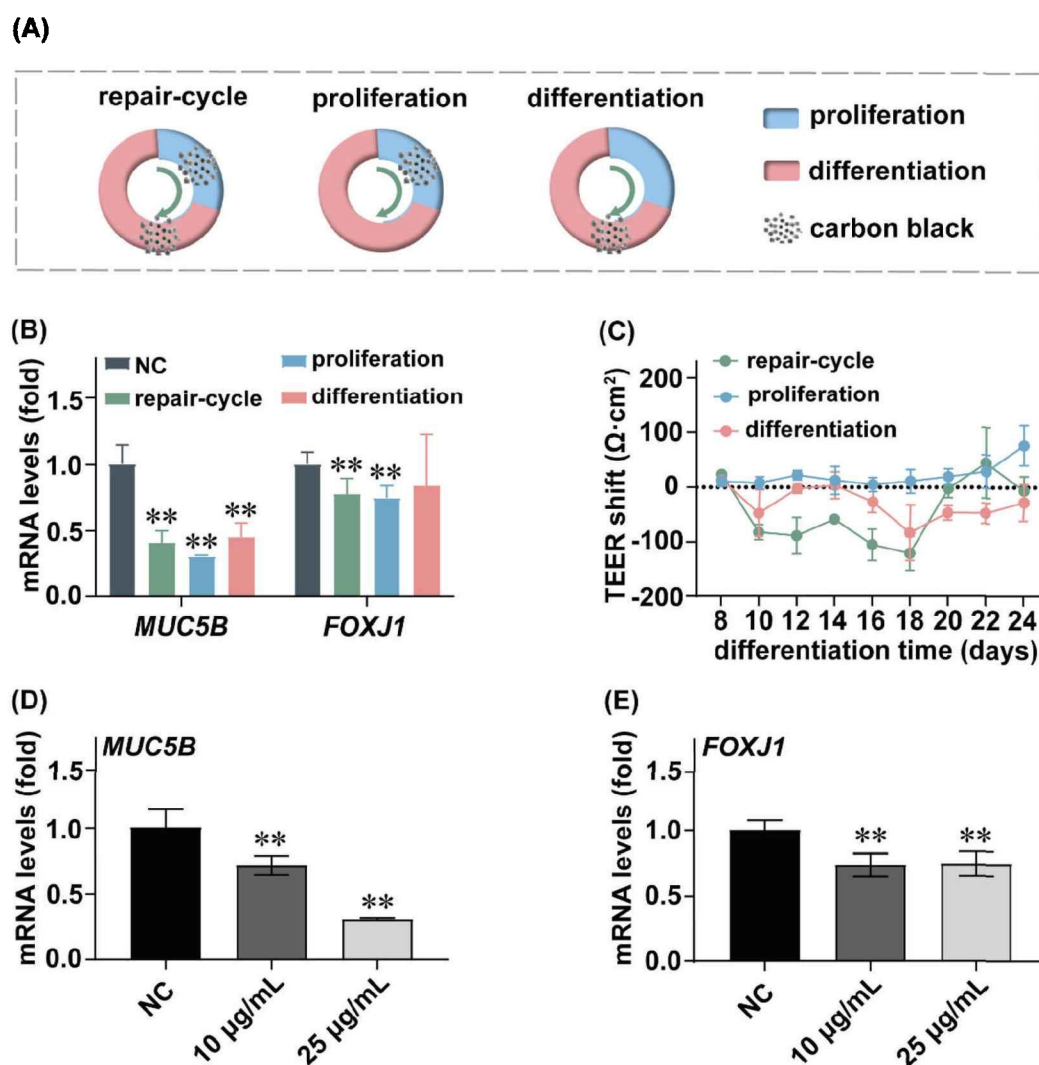


图 5 CB 干扰气道上皮细胞修复的关键阶段

注：(A) CB 暴露示意图；(B) 在气道上皮细胞修复不同阶段暴露 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 CB 后 *MUC5B* 和 *FOXJ1* mRNA 表达水平；(C) 在气道上皮细胞修复的不同阶段暴露 25 $\mu\text{g/mL}$ CB 后的 TEER 值；(D-E) 在气道上皮细胞修复的增殖阶段暴露 10、25 $\mu\text{g/mL}$ 的 CB 后 *MUC5B* 和 *FOXJ1* mRNA 表达水平；与对照组相比，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ 。

5 CB 抑制气道上皮细胞增殖

鉴于细胞增殖在 CB 干扰气道上皮修复过程中的关键作用, 本研究进一步检测增殖生物标志物细胞周期调节蛋白-67 (Cell cycle regulatory protein-67, *Ki67*) 和增殖细胞核抗原 (Proliferating cell nuclear antigen, *PCNA*) 的 mRNA 表达, 分析 CB 暴露对气道上皮细胞增殖能力的影响。*Ki67* 作为核 DNA 结合蛋白, 通常被认为是细胞增殖所必需的蛋白^[47]。*PCNA* 能调节 DNA 复制和修复, 以指示细胞增殖^[48]。图 6 显示, CB 暴露显著降低 *Ki67*、*PCNA* 的 mRNA 表达水平且呈剂量依赖性趋势, 表明 CB 能显著降低气道上皮细胞的增殖能力 (图 6)。同时, 在人支气管上皮细胞系 16HBE 细胞中, *Ki67* 的 mRNA 水平与 pHAECs 保持一致 (图 7), 提示 16HBE 细胞可以作为 pHAECs 的替代细胞模型。因此, 接下来以 16HBE 细胞作为研究对象来阐明 CB 干扰气道上皮细胞修复的具体机制。

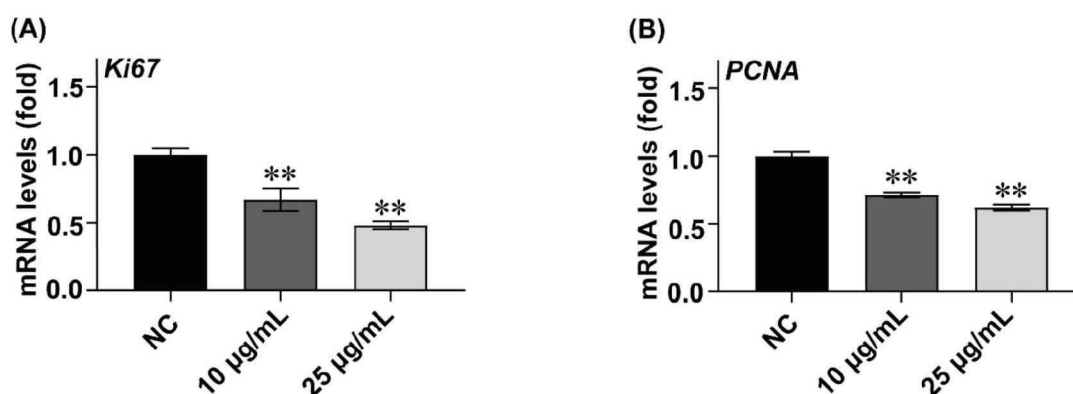


图 6 CB 致增殖生物标志物 *Ki67* 和 *PCNA* 的 mRNA 表达降低

注: 与对照组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

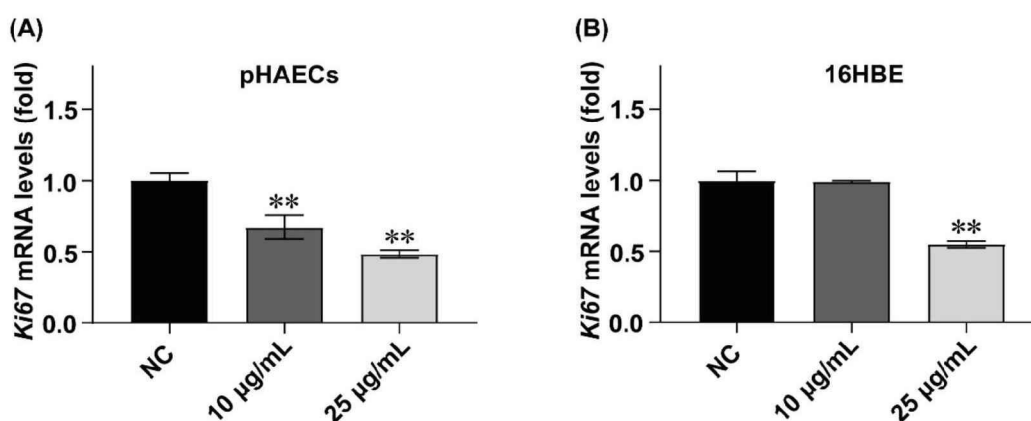


图 7 不同细胞中 *Ki67* 的 mRNA 表达水平

注: (A) 在 pHAECs 增殖阶段暴露 CB 后 *Ki67* 的 mRNA 表达水平; (B) 在 16HBE 细胞增殖阶段暴露 CB 后 *Ki67* 的 mRNA 表达水平; 与对照组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

EdU 作为胸苷类似物可在细胞增殖过程中掺入到新合成的 DNA 中，通过荧光成像跟踪增殖细胞的分布特征^[49]。EdU 增殖实验可通过检测增殖细胞数量，反应细胞增殖能力。本研究发现，与对照组相比，CB 暴露使 EdU 标记细胞数目减少（图 8A），定量结果显示气道上皮细胞增殖数量逐渐减少且呈剂量-依赖关系（图 8B）。结合 CB 暴露降低气道上皮细胞增殖能力和增殖数量可得出结论 CB 主要通过抑制细胞增殖来干扰气道上皮细胞修复。

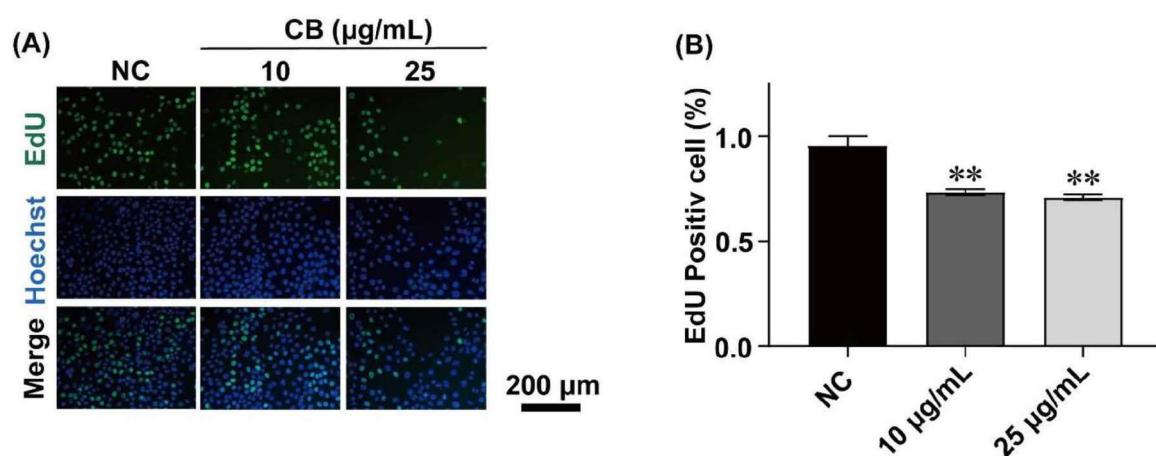


图 8 CB 致气道上皮细胞增殖数量减少

注：(A) EdU 标记细胞荧光图；(B) EdU 标记细胞数目与细胞总数的对比；与对照组相比，

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

6 $\Delta Np63$ 在 CB 抑制气道上皮细胞增殖中的作用

上述结果明确了 CB 对气道上皮细胞增殖的抑制作用。既往研究表明，p63 可以抑制细胞的增殖能力^[28]，这为探究 CB 暴露干扰气道上皮修复的机制提供借鉴。p63 主要包括 $\Delta Np63$ 和 $TAp63$ 两种亚型，在气道上皮细胞中检测 $\Delta Np63$ 和 $TAp63$ 的 mRNA 表达。结果发现 $\Delta Np63$ 的 mRNA 表达水平远高于 $TAp63$ （图 9A），证明了 $\Delta Np63$ 是气道上皮细胞中的主要表达亚型。为进一步探索 CB 对 $\Delta Np63$ 的影响，将 16HBE 细胞暴露于 10 和 25 μg/mL 的 CB 检测 $\Delta Np63$ 的 mRNA 和蛋白表达。图 9B 显示随着 CB 暴露浓度的升高， $\Delta Np63$ 的 mRNA 表达以剂量依赖性趋势逐渐下降，其中当 CB 暴露浓度为 25 μg/mL 时 $\Delta Np63$ 的 mRNA 表达显著高于对照组（图 9B）。其次，CB 暴露也使 $\Delta Np63$ 的蛋白表达以剂量依赖性趋势显著下降（图 9C），该结果与 $\Delta Np63$ 的 mRNA 表达结果一致，提示 $\Delta Np63$ 可能在 CB 干扰气道上皮细胞修复过程中起调节作用。此外，与 16HBE 细胞的结果类似，在 pHAECS 中也观察到 $\Delta Np63$ 的 mRNA 和蛋白表达水平降低（图 10），进一步证明 16HBE 细胞可以作为 pHAECS 的替代细胞模型。总之，CB 对 $\Delta Np63$ 表达的抑制预示着 $\Delta Np63$ 可能对 CB

诱导气道上皮细胞修复异常具有潜在的调控作用。

以上研究结果揭示 CB 能改变 Δ Np63 的表达, 进一步通过过表达 Δ Np63 明确其是否在 CB 抑制气道上皮细胞增殖中发挥调控作用。图 11A 结果表明, 转染 Δ Np63-over 质粒后, Δ Np63 蛋白表达水平显著增加 (约为 NC-over 组的 3.3 倍, 图 11A), 提示 Δ Np63-over 细胞株构建成功。进一步, 在 CB 暴露后, EdU 标记细胞数目较对照组显著减少; 与单纯暴露 CB 相比, 过表达 Δ Np63 和 CB 联合处理后 EdU 标记细胞数量的降低趋势消失且出现明显升高 (图 11B 和 C)。以上结果证实 Δ Np63 在 CB 诱导细胞增殖抑制中至关重要。基于此可推断 Δ Np63 是减轻 CB 对气道上皮细胞修复不良影响的潜在干预靶点。

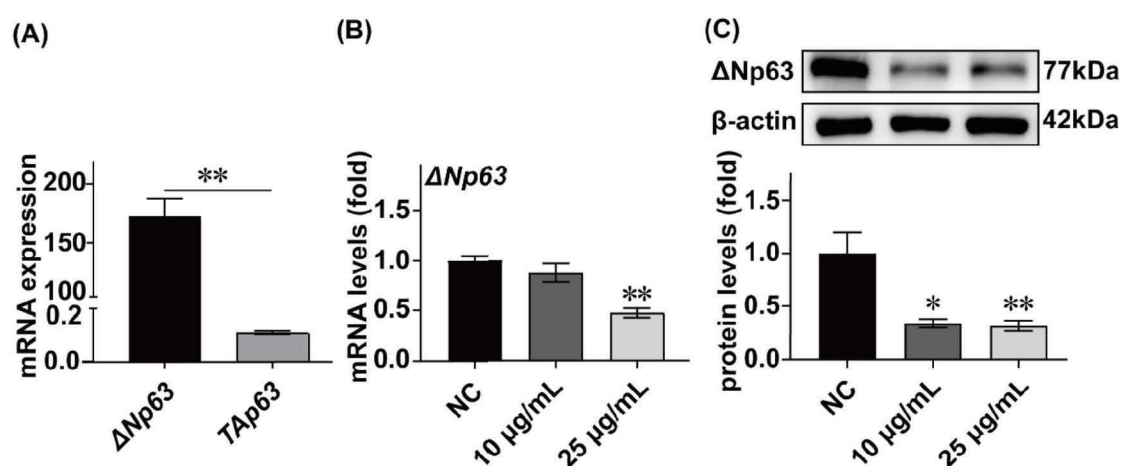


图 9 CB 致 Δ Np63 mRNA 和蛋白表达降低

注: (A) Δ Np63 与 TAp63 的 mRNA 表达水平; (B) CB 暴露后 Δ Np63 的 mRNA 表达情况; (C) CB 暴露后 Δ Np63 的蛋白表达情况; 与对照组相比, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 。

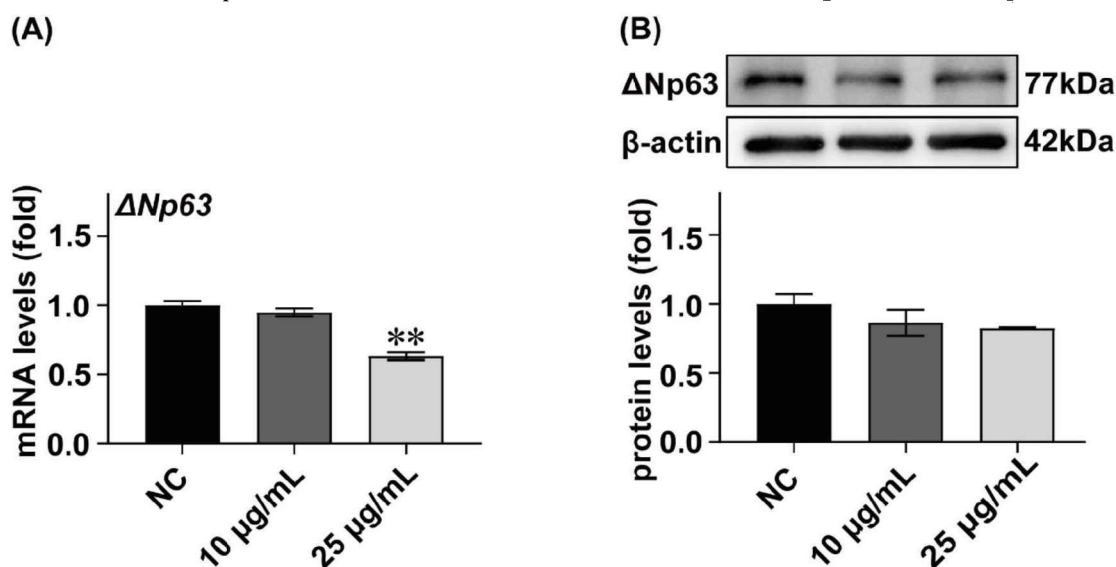


图 10 pHAECs 暴露 CB 降低 Δ Np63 mRNA 和蛋白表达水平

注: 与对照组相比, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 。

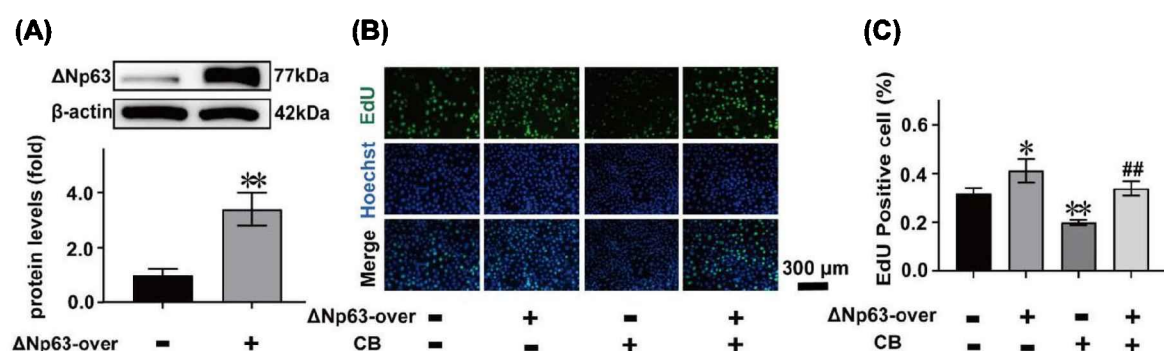


图 11 过表达 ΔNp63 逆转 CB 对细胞增殖抑制作用

注：(A) 过表达 ΔNp63 蛋白表达水平；(B) EdU 标记细胞荧光图；(C) EdU 标记细胞数与细胞总数对比；与对照组相比，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ；与 CB 暴露组相比，# $p < 0.05$ ，## $p < 0.01$ 。

7 ΔNp63 的靶基因 CTNNB1 参与 CB 抑制气道上皮细胞增殖

综上所述，CB 能通过下调 ΔNp63 表达抑制气道上皮细胞增殖，但其具体调控机制有待研究。本研究使用 GTRD、ChIP-Atlas 和 KnockTF 数据库筛选并取交集获得 4611 个靶基因（图 12A），为筛选与细胞修复相关靶基因进一步进行 KEGG 信号通路富集分析和 GO 分析。其中，GO 分析结果表明 ΔNp63 靶基因的生物过程主要与转录调控有关（图 13）。KEGG 信号通路富集分析发现 FoxO 和 Focal adhesion 信号通路与细胞修复显著相关（图 12B），在取交集后确定 8 个靶基因，其中值得关注的是 EGFR（图 12C），研究表明，EGFR 参与细胞增殖和分化调节中^[30]。本论文同时对文献中涉及可能对细胞增殖、分化有调控作用的 p63 靶基因进行收集，将 β-连环蛋白（Beta Catenin, CTNNB1）和锯齿状典型 Notch 配体 1（Jagged canonical Notch ligand 1, JAG1）纳入研究中^[30]。因此，本研究专注于探究 CTNNB1、EGFR 和 JAG1 是否受到 ΔNp63 调控及其在 CB 诱导气道上皮细胞增殖抑制机制中的作用。

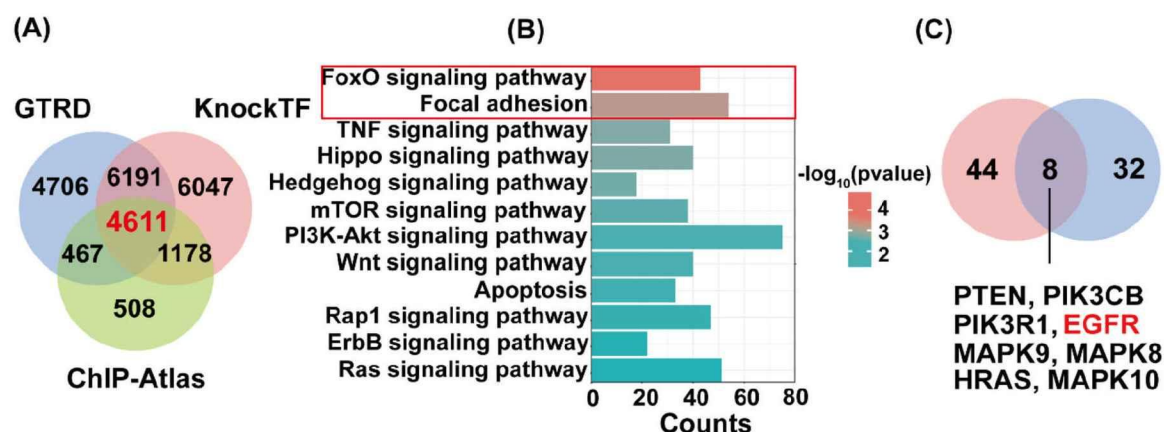
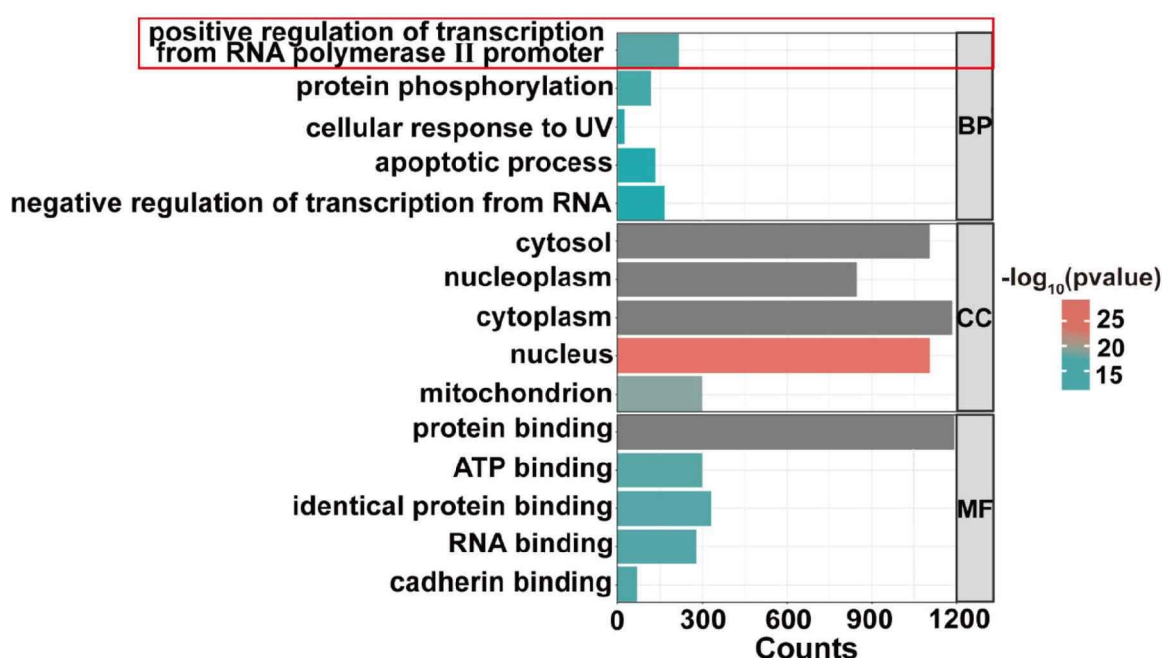
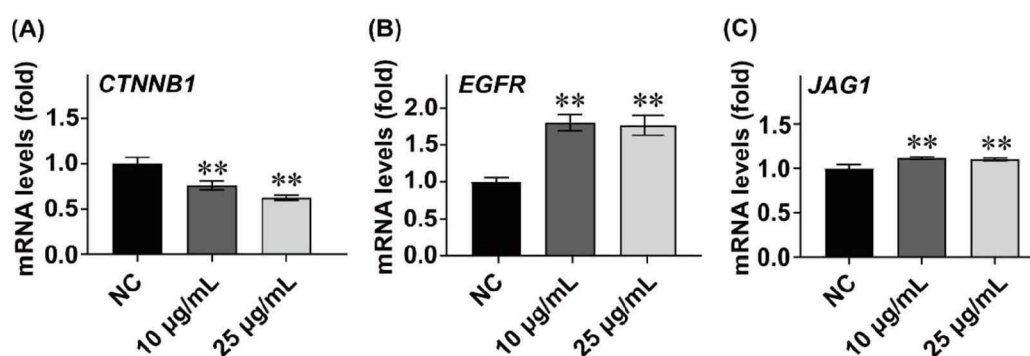


图 12 预测 ΔNp63 的靶基因

注：(A) 经数据库预测 ΔNp63 靶基因；(B) ΔNp63 靶基因的 KEGG 通路分析；(C) FoxO 信号通路与 Focal adhesion 信号通路共表达基因进行 Venn 分析。

图 13 Δ Np63 靶基因的 GO 分析结果

进一步在 16HBE 细胞中暴露 10 和 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 CB，使用 *qRT-PCR* 检测 *CTNNB1*、*EGFR* 和 *JAG1* 的 mRNA 表达水平。图 14 结果显示，与对照组相比，*CTNNB1* 的 mRNA 表达水平以剂量依赖性趋势显著下降（图 14A），而 *EGFR* 和 *JAG1* 的 mRNA 表达水平以剂量依赖性趋势显著升高（图 14B 和 C）。WB 检测发现 CB 处理后 *CTNNB1* 蛋白表达水平出现显著降低并具有统计学差异（图 15A）。而 *EGFR* 和 *JAG1* 蛋白表达水平呈上升趋势并无统计学差异（图 15B 和 C），该结果与 mRNA 表达趋势一致。因此，本研究提出合理假设 Δ Np63 可能通过调控 *CTNNB1* 参与 CB 抑制气道上皮细胞增殖。

图 14 CB 暴露后 *CTNNB1*、*EGFR* 和 *JAG1* 的 mRNA 表达水平

注：与对照组相比，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ 。

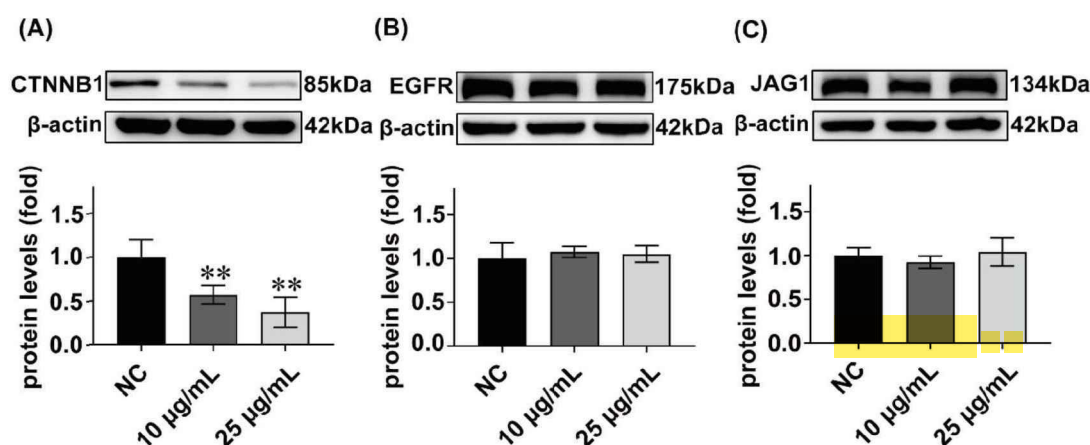


图 15 CB 暴露后 CTNNB1、EGFR 和 JAG1 的蛋白表达水平

注：与对照组相比，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ 。

为了证实以上假设，使用 siRNA 构建 $\Delta Np63$ 低表达细胞株，并暴露于 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 CB。在 $\Delta Np63$ -si 预处理后， $\Delta Np63$ 和 CTNNB1 的 mRNA 表达水平均下降。随后，与单纯暴露 CB 组相比，经 $\Delta Np63$ -si 预处理后暴露 CB 使 $\Delta Np63$ 和 CTNNB1 的 mRNA 表达下降更加明显（图 16A 和 B）。而当 $\Delta Np63$ 过表达时， $\Delta Np63$ 和 CTNNB1 的 mRNA 和蛋白表达均上调。值得注意的是，与单纯暴露 CB 相比， $\Delta Np63$ 过表达后暴露 CB 在 mRNA 和蛋白表达水平上能显著减弱 CB 对 $\Delta Np63$ 和 CTNNB1 的抑制作用（图 17）。这些发现均证实 $\Delta Np63$ 通过转录调控 CTNNB1 参与 CB 抑制细胞增殖，进而干扰气道上皮细胞修复。

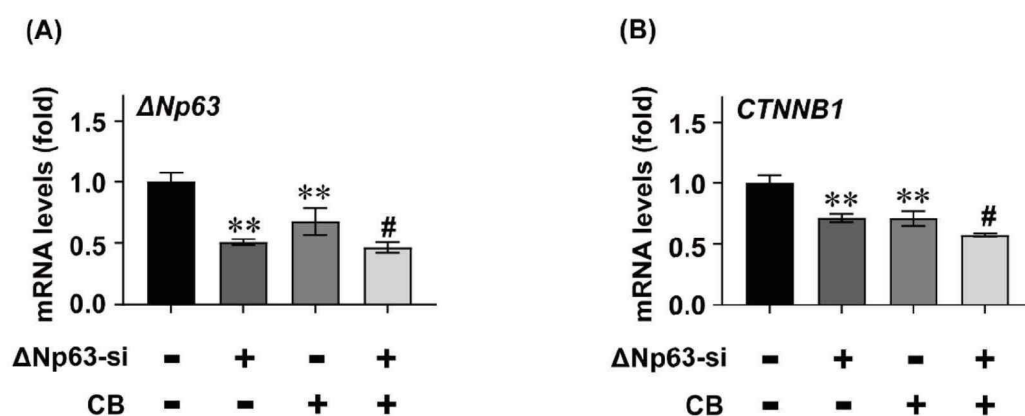


图 16 敲低 $\Delta Np63$ 后暴露 CB $\Delta Np63$ 和 CTNNB1 mRNA 表达水平

注：与对照组相比，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ；与 CB 暴露组相比，# $p < 0.05$ ，## $p < 0.01$ 。

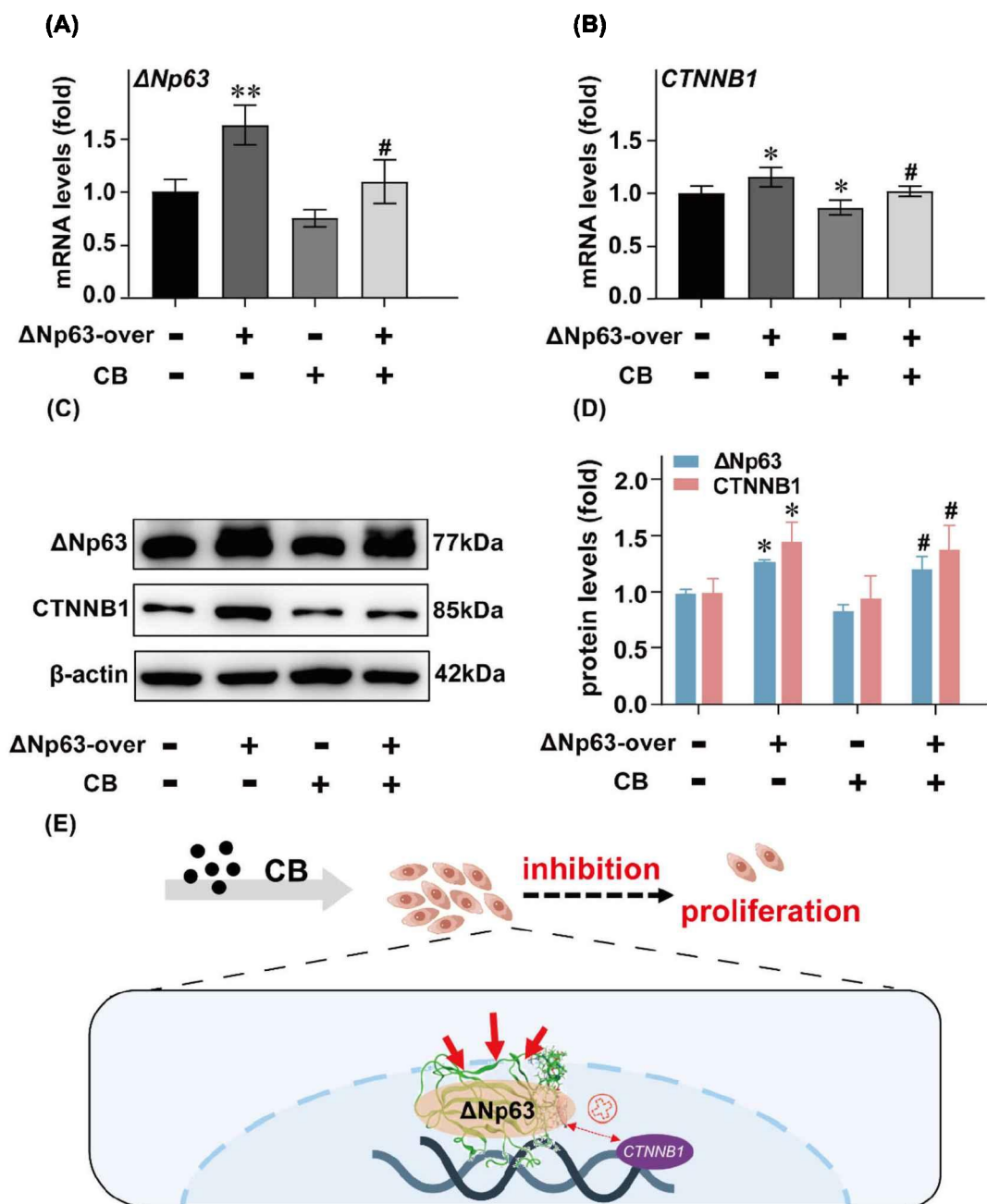


图 17 过表达 $\Delta Np63$ 后暴露 CB $\Delta Np63$ 和 $CTNNB1$ 的 mRNA 和蛋白表达水平

注：(A-B) 过表达 $\Delta Np63$ 后暴露 CB $\Delta Np63$ 和 $CTNNB1$ 的 mRNA 表达改变；(C-D) 过表达 $\Delta Np63$ 后暴露 CB $\Delta Np63$ 和 $CTNNB1$ 蛋白表达改变；(E) 分子机制模拟图；与对照组相比，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ；与 CB 暴露组相比，# $p < 0.05$ ，## $p < 0.01$ 。

8 CB 及 *CTNNB1* 与 Δ Np63 类竞争作用

Δ Np63 作为转录因子能与靶基因的启动子或增强子相结合，从而控制遗传信息的转录速率，调控 *CTNNB1* 基因表达^[50]。本研究基于 Δ Np63 和 *CTNNB1* 结合位点，通过 MD 分析两者间的结合距离和相互作用模式，探讨 Δ Np63 调控 *CTNNB1* 的具体方式。首先，应用 JASPAR 数据库根据位置频率矩阵（Position weight matrix, PFM）预测 Δ Np63 与 *CTNNB1* 的结合位点是位于其启动子区域的 AGGCGCGCCGAGTCCTGCAG 片段（图 18）。

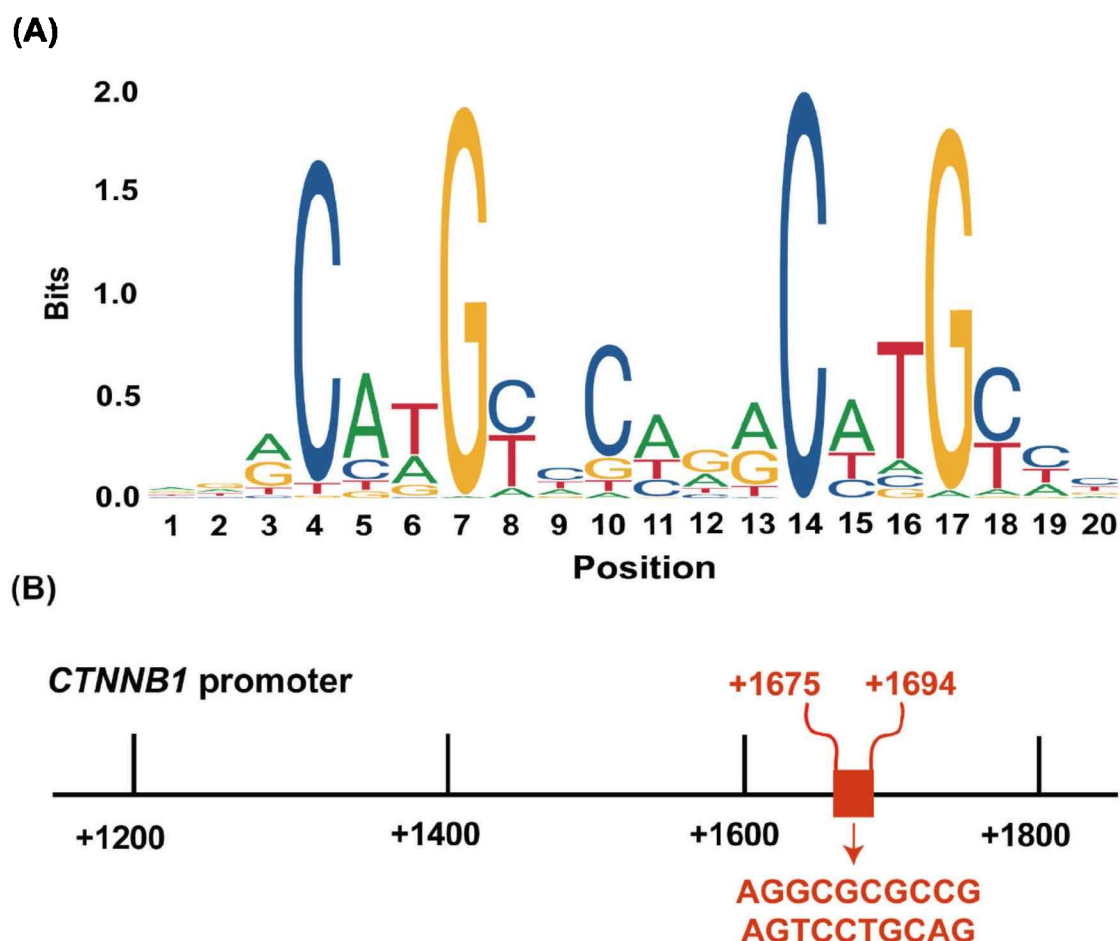


图 18 Δ Np63 与靶基因 *CTNNB1* 启动子区结合位点的预测

注：(A) Δ Np63 与靶基因启动子区域上的结合位点图；(B) Δ Np63 与 *CTNNB1* 启动子区域结合位点示意图。

以预测的结合位点作为基础进一步利用 MD 构建 $\Delta Np63$ - $CTNNB1$ 复合物, 为了阐明 CB 干扰 $\Delta Np63$ - $CTNNB1$ 结合的机制, 对 $\Delta Np63$ - $CTNNB1$ 复合物进行了含/不含 CB 的 MD。如图 19 所示, 无 CB 干扰情况下, 0 ~ 200 ns 内 $\Delta Np63$ - $CTNNB1$ 之间结合距离变化较小, 表明 $\Delta Np63$ - $CTNNB1$ 复合物能稳定存在 ($\Delta D \approx 0$)。而在加入 CB 后, 从 RMSD 曲线可以看出 $\Delta Np63$ - $CTNNB1$ 复合物难以稳定存在: 在 0-40 ns 内 (阶段 I) $\Delta Np63$ - $CTNNB1$ 之间 RMSD 变化较小, 提示两者结合较为稳定; 而在 50-70 ns (阶段 II) 后, $\Delta Np63$ - $CTNNB1$ 之间的 RMSD 曲线变化较大, 提示两者间结合距离迅速拉大; 并在 70 ns 后 (阶段 III), $\Delta Np63$ - $CTNNB1$ 之间结合距离最终稳定在 12 Å 左右 (图 19)。由此可见, CB 暴露干扰了 $\Delta Np63$ 和 $CTNNB1$ 复合物的稳定性。

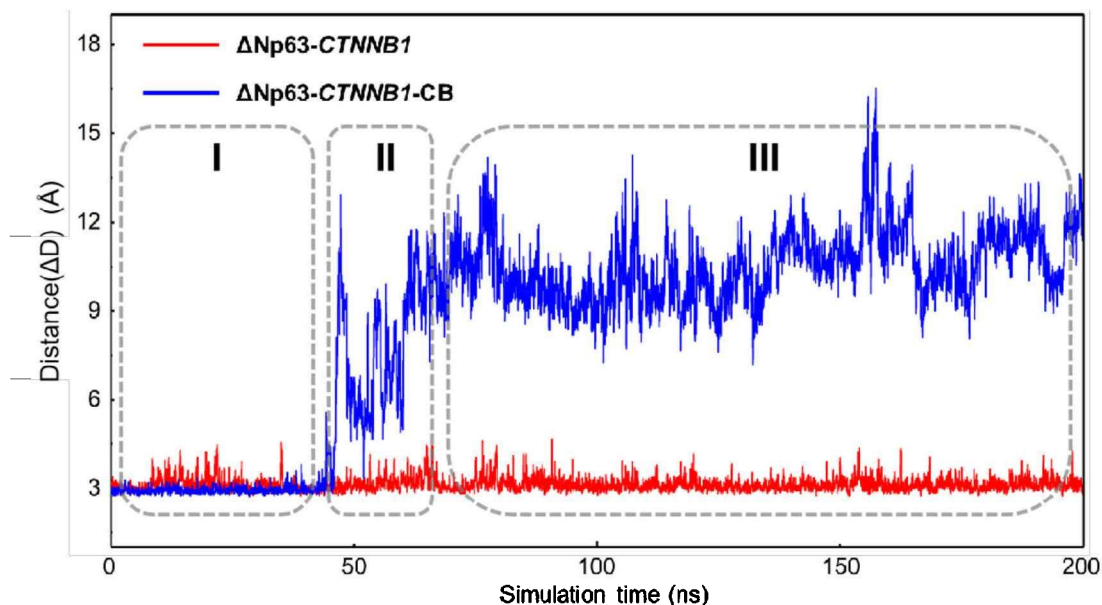


图 19 CB 致 $\Delta Np63$ 与 $CTNNB1$ 之间结合距离动态曲线改变

注: 蓝色表示含 CB 的复合物, 红色表示不含 CB 的复合物。

先前研究表明 $\Delta Np63$ 上的 Arg311 与 $CTNNB1$ 上鸟嘌呤 (Guanine, dGMP) 之间形成的氢键作用能使 $\Delta Np63$ 和 $CTNNB1$ 复合物稳定存在^[33]。图 20A 结果显示, $CTNNB1$ 上的 dGMP 可以在没有 CB 干扰的情况下通过氢键相互作用稳定地与 $\Delta Np63$ 中的 Arg311 结合, 其距离在 2.87 ~ 3.07 Å。然而, 当引入 CB 后, Arg311-dGMP 之间出现了明显的分离, 以最初的 2.93 Å 逐渐拉大致 11.57 Å (图 20A), 提示 Arg311 和 dGMP 之间的氢键逐渐消失, 反而, CB 与 Arg311 之间形成了氢键 (图 20B), 表明 CB 和 dGMP 与 Arg311 之间出现类竞争作用, 以致 dGMP 和 Arg311 之间无法维持氢键相互作用。基于以上结果得出结论 CB 通过干扰转录因子 $\Delta Np63$ 与靶基因 $CTNNB1$ 结合从而抑制细胞增殖, 干扰气道上皮细胞修复。

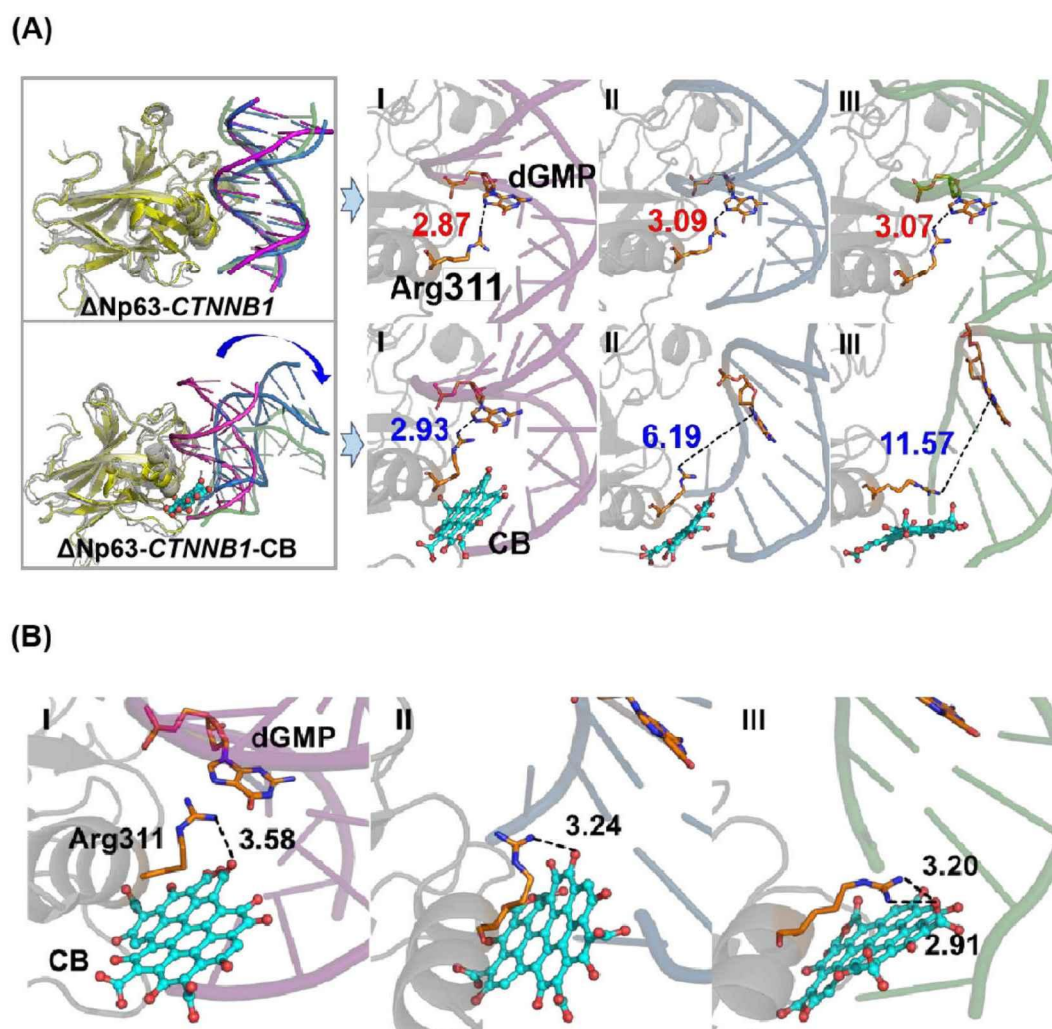


图 20 CB 干扰 Arg311 与 dGMP 之间的相互作用

注：(A) Δ Np63-CTNNB1 和 Δ Np63-CTNNB1-CB MD 轨迹的三维结构；(B) Arg311 与 CB 在 Δ Np63-CTNNB1-CB MD 轨迹中的氢键相互作用；(Δ Np63 和 CTNNB1 用带状标记，Arg311 和 dGMP 用橙色棒状结构标记；CB 用蓝色棒状结构标记；Arg311 和 CB 的氢键相互作用用黑色虚线表示，距离单位用 Å 表示)。

讨论

气道上皮是抵御各种污染物和呼吸道病原体进入人体的主要物理屏障。然而,长期或高水平暴露于颗粒物、香烟烟雾和呼吸道病原体等污染物可破坏上皮屏障的完整性^[1]。体内研究发现,暴露于香烟烟雾的大鼠鼻粘膜屏障功能受损,具体体现在与紧密连接相关的蛋白表达降低^[51]。体外研究发现,PM_{2.5}可降低人正常肺上皮细胞的闭锁小带蛋白-1和E钙粘着蛋白表达,导致气道上皮细胞屏障功能丧失^[52]。CB在职业人群和环境中广泛存在^[53]。此外,CB主要由元素碳组成^[54]。它们可以到达肺的最深处,导致肺功能受损^[55]。在本研究中,从Degussa获得的CB具有作为柴油尾气颗粒的关键替代指标的优势,可以作为环境污染物替代模型^[37]。研究表明,CB暴露可使16HBE细胞周期阻滞于G2/M期,抑制细胞增殖^[56, 57]。然而,日前关于CB暴露引起气道上皮异常修复的特点和机制尚不清楚。因此,本研究旨在从气道上皮修复过程的角度探讨CB暴露对气道上皮损伤修复的机制。

暴露于污染物会损伤上皮细胞,上皮修复是对抗不良损伤的基本生理反应,其修复过程主要包括细胞增殖和分化^[52, 58, 59]。有研究发现,PM_{2.5}的刺激能诱导人鼻上皮细胞中杯状细胞增加^[60],表明污染物会干扰气道上皮细胞修复。基底细胞作为气道中关键的祖细胞,在人体气道中普遍存在^[61],它能够通过快速增殖和分化来再生气道上皮细胞^[62],基于此特点使基底细胞成为一种非常理想的细胞研究模型。因此,本研究利用ALI培养模拟气道上皮细胞修复过程(图3)^[63]。本研究的实验设计包括三组:在pHAECs细胞的增殖、分化和整个修复周期过程中暴露于CB(图5A)。结果表明,CB主要在增殖阶段损害气道上皮细胞修复(图5B)。PM_{2.5}和香烟烟雾均显著下调*FOXJ1*的表达^[60, 64]。动物实验也表明,碳纳米管和CB可降低气道中*MUC5B*的mRNA表达水平^[64, 65]。以上均与本研究的结果保持一致,表明是由于CB对基底细胞的增殖产生不良影响,进而抑制杯状细胞和纤毛细胞的分化,最终阻碍了气道上皮的修复。此外,暴露于CB后,增殖标志物*Ki67*和*PCNA*的mRNA水平显著降低(图6),气道上皮细胞增殖数量也显著减少(图8)。前期有动物实验表明,在新生小鼠肺部紧邻终末细支气管区域内暴露超细颗粒物会使细胞增殖速率显著降低,呼吸道中的细胞分裂发生变化,进而导致呼吸系统生长发生改变^[66]。体外实验结果也显示,超细炭黑会抑制成纤维细胞增殖且使细胞周期停滞在S期^[67],这均与本研究结果一致,表明基底细胞的损伤源于减少细胞增殖数量和损伤细胞增殖能力^[68]。

p63能参与调节气道上皮屏障修复^[29]。前期研究^[30]和本研究的实验结果(图9A)都表明 Δ Np63是气道上皮细胞中主要表达亚型。在增殖阶段暴露CB,发现 Δ Np63的mRNA和蛋白水平均被下调(图9B和C)。通过数据库筛选并结合文献

查阅发现 *CTNNB1*、*EGFR* 和 *JAG1* 是 Δ Np63 的三个关键靶基因，参与细胞增殖、分化和粘附过程的调节（图 12）^[30]。*EGFR* 参与细胞增殖、分化^[69]。*JAG1* 能通过激活经典 Notch 信号通路来增强细胞增殖^[70]。*CTNNB1* 是一种与细胞增殖相关的 mRNA^[71]。本研究在细胞增殖阶段使用 CB 处理细胞后发现只有 *CTNNB1* 受到 Δ Np63 的调控（图 14 和 15）。之前有研究表明，抑制 *CTNNB1* 表达可降低基底细胞标志物细胞角蛋白（Cytokeratin, ck）-5、ck-14 和 ck-19 以及 β 1 整合素（Integrin beta-1, ITG β 1）和纤维连接蛋白的表达，导致上皮细胞修复受损^[72]。这些发现强调了 *CTNNB1* 在气道上皮细胞修复中的关键作用。此外， Δ Np63 参与 CB 抑制 16HBE 细胞的增殖（图 16 和 17）。因此，我们得出结论，CB 诱导的气道上皮细胞增殖抑制与 Δ Np63-*CTNNB1* 的下调有关。综上所述，本研究揭示了 Δ Np63 在 CB 诱导的气道上皮损伤修复中的关键作用。这一发现为 CB 暴露人群的呼吸系统保护提供了有益的指导。

Δ Np63 作为转录因子可以与特定基因结合形成复合物来调节转录过程，基于此本研究提出合理假设，即 CB 可能通过干扰 Δ Np63 和 *CTNNB1* 的结合抑制细胞增殖进而干扰气道上皮细胞修复。数据库预测表明 Δ Np63 选择性结合在 *CTNNB1* 上的启动子区域+1675~+1694（图 18），通过 MD 实验的直接观察进一步证实 Δ Np63 可以和 *CTNNB1* 结合且结合距离发生改变（图 19）。根据以往的研究发现， Δ Np63 与 *CTNNB1* 的结合依赖于 Δ Np63 上的 Arg311 和 *CTNNB1* 上的 dGMP 之间的特异性识别^[33]。CB 的存在阻碍了 dGMP 与 Arg311 的结合。相反，CB 很容易与 Δ Np63 上的 Arg311 形成稳定的复合物，这一现象表明 CB 和 *CTNNB1* 与 Δ Np63 之间出现了类竞争作用（图 20），这种类竞争相互作用似乎抑制了 Δ Np63 对 *CTNNB1* 的转录，从而导致气道上皮细胞修复异常。探究原因， Δ Np63-*CTNNB1* 复合物结合的稳定性是由 dGMP 上的-N/-O 基团与 Arg311 侧链之间形成的氢键维持的，然而，CB 表面存在-OH 和-COOH 官能团^[73]，这些官能团也能与 Arg311 侧链形成氢键^[74]，因此 CB 和 dGMP 之间出现了类竞争作用。总之，CB 的存在破坏了 Arg311 和 dGMP 之间的氢键作用力，从而减弱了 Δ Np63 和 *CTNNB1* 之间的结合。

结论

本研究从分子到微观层面揭示 CB 暴露对气道上皮细胞修复功能的不良影响。CB 暴露抑制细胞增殖是干扰气道上皮修复的关键环节。值得注意的是， Δ Np63 在 CB 暴露抑制细胞增殖过程中起着关键的调节作用。分子动力学模拟发现，CB 表面的 -OH 和 -COOH 可与 Δ Np63 上的 Arg311 形成氢键，从而影响 Δ Np63 与 *CTNNB1* 的结合，这种类竞争作用损害了 Δ Np63 对 *CTNNB1* 的识别进而抑制细胞增殖。这些发现有助于理解 CB 干扰气道上皮修复的机制，这为评估 CB 暴露的潜在健康风险提供了理论基础。

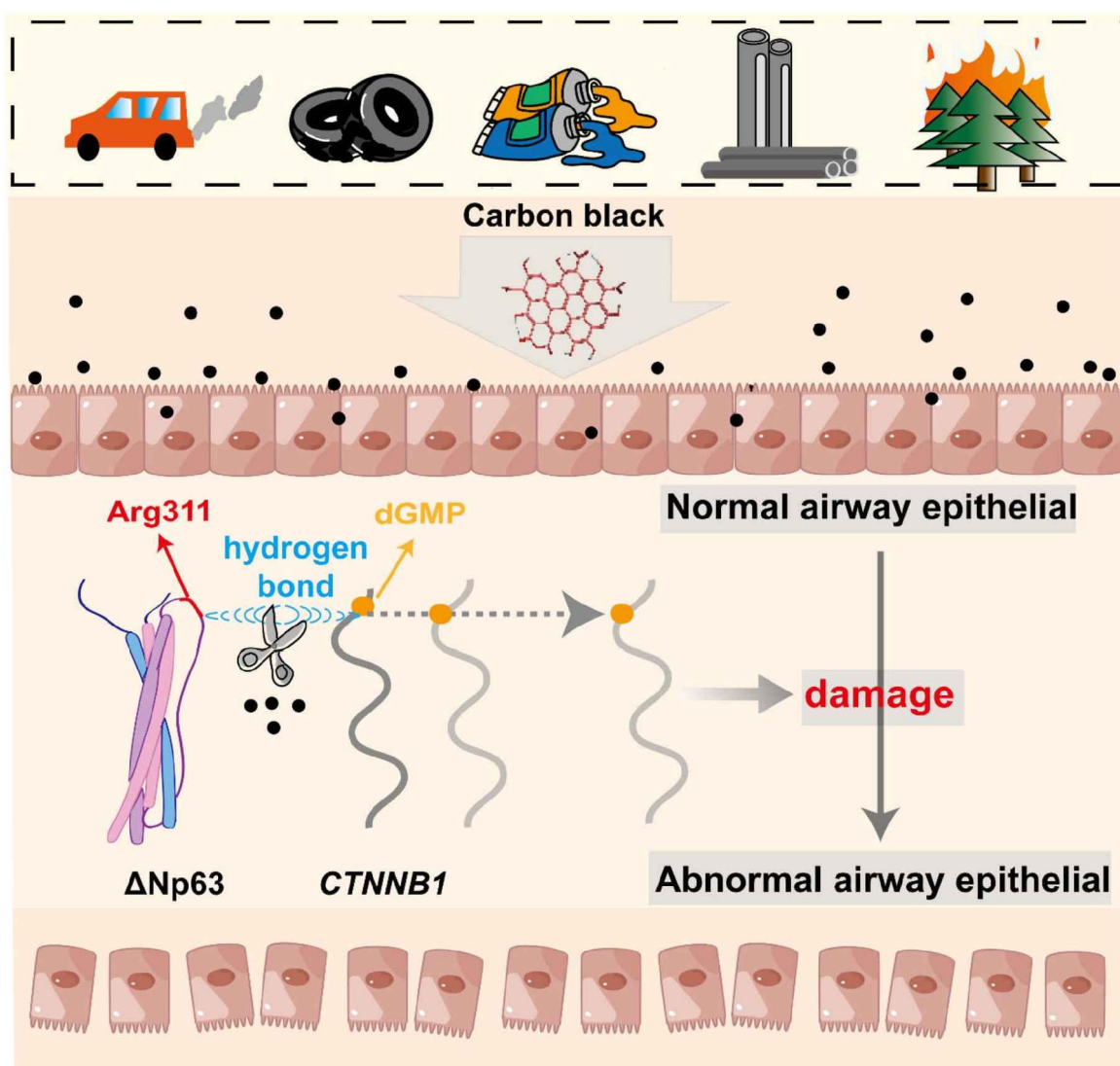


图 21 CB 与 *CTNNB1* 对 Δ Np63 类竞争作用致气道上皮修复异常的机制图

创新与不足

创新:

(1) 本研究利用 ALI 方法构建体外人气道上皮细胞模型, 对细胞修复的增殖和分化联合过程开展研究, 阐明增殖阶段是 CB 暴露干扰气道上皮细胞修复的关键。

(2) 通过 MD 分析 CB 暴露对 $\Delta Np63$ -CTNNB1 相互作用的影响, 为深入探讨 CB 吸入对气道上皮细胞修复的干预靶点和生物标志物提供一定的参考, 也为研究转录因子-核酸复合物的结合作用提供方法借鉴。

不足:

(1) 本研究利用 ALI 体外培养模型阐明了 CB 暴露致气道上皮修复受损的相关机制。然而, CB 损伤气道上皮修复及 $\Delta Np63$ 的调节作用并没有在体内模型及人群样本中得到证实。

(2) 虽然本研究阐明了 CB 与气道上皮修复的关系, 但需要注意的是巨噬细胞是 CB 的靶细胞, 因此, CB 被巨噬细胞吞噬后对气道上皮的生物学效应有待进一步研究。

(3) 本研究阐明 $\Delta Np63$ -CTNNB1 相互作用参与 CB 干扰气道上皮修复, 未来研究将进一步探索其他潜在的分子机制, 如信号通路、基因表达变化等, 以更全面地理解 CB 暴露对气道上皮细胞修复的影响。

(4) 在明确 $\Delta Np63$ 是 CB 抑制细胞增殖的关键靶点时未考虑到 p63 其他亚型的作用。

参考文献

- [1] Long C M, Nascarella M A, Valberg P A. Carbon black vs. black carbon and other airborne materials containing elemental carbon: physical and chemical distinctions [J]. *Environ Pollut*, 2013, 181: 271-286.
- [2] Tang J, Cheng W, Gao J, et al. Occupational exposure to carbon black nanoparticles increases inflammatory vascular disease risk: an implication of an ex vivo biosensor assay [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2020, 17(1).
- [3] Muranko H J, Hethmon T A, Smith R G. "Total" and respirable dust exposures in the U.S. carbon black manufacturing industry [J]. *Aihaj*, 2001, 62(1): 57-64.
- [4] Cheng W, Liu Y, Tang J, et al. Carbon content in airway macrophages and genomic instability in chinese carbon black packers [J]. *Arch Toxicol*, 2020, 94(3): 761-771.
- [5] Ma J, Rubin B K, Voynow J A. Mucins, mucus, and goblet cells [J]. *Chest*, 2018, 154(1): 169-176.
- [6] 林慧, 余其梅, 付国庆, 等. 黑碳与炭黑颗粒对呼吸系统影响的异同与研究展望 [J]. *环境与健康杂志*, 2019, 36(10): 852-856.
- [7] Tam A, Wadsworth S, Dorscheid D, et al. The airway epithelium: more than just a structural barrier [J]. *Ther Adv Respir Dis*, 2011, 5(4): 255-273.
- [8] Cao X, Lin L, Sood A, et al. Small airway wall thickening assessed by computerized tomography is associated with low lung function in chinese carbon black packers [J]. *Toxicol Sci*, 2020, 178(1): 26-35.
- [9] Bergmann J, Oksanen E, Ryde U. Combining crystallography with quantum mechanics. *Curr Opin Struct Biol*, 2022, 72: 18-26.
- [10] Deng R, Li J, Wu H, et al. Mechanistic insight into the adjuvant effect of co-exposure to ultrafine carbon black and high humidity on allergic asthma [J]. *Environ Geochem Health*, 2023, 45(12): 9653-9667.
- [11] Tatsuta M, Kan-O K, Ishii Y, et al. Effects of cigarette smoke on barrier function and tight junction proteins in the bronchial epithelium: protective role of cathelicidin LL-37 [J]. *Respir Res*, 2019, 20(1).
- [12] Man W H, de Steenhuijsen P, de Boer W A, Bogact D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health [J]. *Nat Rev. Microbiol*, 2017, 15(5): 259-270.
- [13] Zhang Y, Zhang L, Chen W, et al. Shp2 regulates PM2.5-induced airway epithelial barrier dysfunction by modulating ERK1/2 signaling pathway [J]. *Toxicol Lett*, 2021, 350: 62-70.
- [14] Inoue H, Hattori T, Zhou X, et al. Dysfunctional ErbB2, an EGF receptor family member, hinders repair of airway epithelial cells from asthmatic patients [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2019, 143(6): 2075-2085.
- [15] Lobo L J, Zariwala M A, Noone P G. Primary ciliary dyskinesia [J]. *QJM*, 2014, 107(9): 691-699.
- [16] Crosby L M, Waters C M. Epithelial repair mechanisms in the lung [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 298(6): L715-L731.
- [17] Ng-Blichfeldt J P, de Jong T, Kortekaas R K, et al. TGF- β activation impairs fibroblast ability to support adult lung epithelial progenitor cell organoid formation [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 317(1): L14-L28.
- [18] Zhao R, Guo Z, Dong W, et al. Effects of PM2.5 on mucus secretion and tissue remodeling in a rabbit model of chronic rhinosinusitis [J]. *Forum Allergy Rhinol*, 2018, 8(11): 1349-1355.
- [19] Gindele J A, Kiechle T, Benediktus K, et al. Intermittent exposure to whole cigarette smoke alters the differentiation of primary small airway epithelial cells in the air-liquid interface culture [J]. *Sci*

- Rep, 2020, 10(1).
- [20] Puisney-Dakhli C, Oikonomou E K, Tharaud M, et al. Effects of brake wear nanoparticles on the protection and repair functions of the airway epithelium [J]. *Environ Pollut*, 2023, 327.
 - [21] Tamaoki J, Isono K, Takeyama K, et al. Ultrafine carbon black particles stimulate proliferation of human airway epithelium via EGF receptor-mediated signaling pathway [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 287(6): L1127-L1133.
 - [22] Clippinger A J, Ahluwalia A, Allen D, et al. Expert consensus on an in vitro approach to assess pulmonary fibrogenic potential of aerosolized nanomaterials [J]. *Arch Toxicol*, 2016, 90(7): 1769-1783.
 - [23] Lacroix G, Koch W, Ritter D, et al. Air-liquid interface in vitro models for respiratory toxicology research: consensus workshop and recommendations [J]. *Appl In Vitro Toxicol*, 2018, 4(2): 91-106.
 - [24] Fisher M L, Balinth S, Mills A A. P63-related signaling at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2020, 133(17).
 - [25] Chilosi M, Poletti V, Murer B, et al. Abnormal re-epithelialization and lung remodeling in idiopathic pulmonary fibrosis: the role of ΔN -p63 [J]. *Lab Invest*, 2002, 82(10): 1335-1345.
 - [26] Huang H, Tan K S, Zhou S, et al. P63+Krt5+ basal cells are increased in the squamous metaplastic epithelium of patients with radiation-induced chronic Rhinosinusitis [J]. *Radiat Oncol*, 2020, 15(1).
 - [27] Soares E, Zhou H. Master regulatory role of p63 in epidermal development and disease [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 75(7): 1179-1190.
 - [28] Kalinichenko V V, Arason A J, Jonsdottir H R, et al. DeltaNp63 has a role in maintaining epithelial integrity in airway epithelium [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2).
 - [29] Kaneko Y, Kohno T, Kakuk i T, et al. The role of transcriptional factor p63 in regulation of epithelial barrier and ciliogenesis of human nasal epithelial cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1).
 - [30] Warner S M, Hackett T L, Shaheen F, et al. Transcription factor p63 regulates key genes and wound repair in human airway epithelial basal cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 49(6): 978-988.
 - [31] Ratovitski E A. $\Delta Np63\alpha$ /IRF6 interplay activates NOS2 transcription and induces autophagy upon tobacco exposure [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2011, 506(2): 208-215.
 - [32] Xie C, Zhu J, Jiang Y, et al. Sulforaphane inhibits the acquisition of tobacco smoke-induced lung cancer stem cell-like properties via the IL-6/ $\Delta Np63\alpha$ /Notch Axis [J]. *Theranostics*, 2019, 9(16): 4827-4840.
 - [33] Chen C, Gorlatova N, Herzberg O. Pliable DNA conformation of response elements bound to transcription factor p63 [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(10): 7477-7486.
 - [34] Rinne T, Brunner H G, Van Bokhoven H. P63-associated disorders [J]. *Cell Cycle*, 2014, 6(3): 262-268.
 - [35] Chen C, Gorlatova N, Kelman Z, et al. Structures of p63 DNA binding domain in complexes with half-site and with spacer-containing full response elements [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(16): 6456-6461.
 - [36] Enthart A, Klein C, Dehner A, et al. Solution structure and binding specificity of the p63 DNA binding domain [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1).
 - [37] Zhang R, Dai Y, Zhang X, et al. Reduced pulmonary function and increased pro-inflammatory cytokines in nanoscale carbon black-exposed workers [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2014, 11(1).
 - [38] Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack A F, et al. AutoDock Vina 1.2.0: new docking methods, expanded force field, and python bindings [J]. *J Chem Inf Model*, 2021, 61(8): 3891-3898.
 - [39] Gordon J C, Myers J B, Folta T, et al. H++: a server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(Web Server): W368-W371.
 - [40] Maier J A, Martinez C, Kasavajhala K, et al. Ff14SB: improving the accuracy of protein side chain

- and backbone parameters from ff99SB [J]. *J Chem Theory Comput*, 2015, 11(8): 3696-3713.
- [41] Jorgensen W L, Chandrasekhar J, Madura J D, et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water [J]. *J Chem Phys*, 1983, 79(2): 926-935.
- [42] Wang J, Wolf R M, Caldwell J W, et al. Development and testing of a general amber force field [J]. *J Comput Chem*, 2004, 25(9): 1157-1174.
- [43] Ryckaert J P C, Ciccotti G, Berendsen H J C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes [J]. *J Comput Phys*, 1977(23): 327-341.
- [44] Yu X, Ng C P, Habacher H, et al. Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(12): 1445-1453.
- [45] Thornton D J, Rousseau K, McGuckin M A. Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus [J]. *Annu Rev Physiol*, 2008, 70(1): 459-486.
- [46] Karakocak B B, Keshavan S, Gunasingam G, et al. Rethinking of TEER measurement reporting for epithelial cells grown on permeable inserts [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2023, 188.
- [47] Sobocki M, Mrouj K, Camasses A, et al. The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin [J]. *Elife*, 2016, 5.
- [48] Gu L, Lingeman R, Yakushijin F, et al. The anticancer activity of a first-in-class small-molecule targeting PCNA [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(23): 6053-6065.
- [49] Radwan B, Rocchetti S, Matuszyk E, et al. EdU sensing: the raman way of following endothelial cell proliferation in vitro and ex vivo [J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 216.
- [50] Francois M, Donovan P, Fontaine F. Modulating transcription factor activity: Interfering with protein-protein interaction networks [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2020(99): 12-19.
- [51] Castro-Mondragon J A, Riudavets-Puig R, Rauluseviciute I, et al. JASPAR 2022: the 9th release of the open-access database of transcription factor binding profiles [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(D1): D165-D173.
- [52] Zhao C, Wang Y, Su Z, et al. Respiratory exposure to PM2.5 soluble extract disrupts mucosal barrier function and promotes the development of experimental asthma [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 730.
- [53] Rasking L, Koshy P, Bongaerts E, et al. Ambient black carbon reaches the kidneys [J]. *Environ Int*, 2023, 177.
- [54] Cruz-Núñez X. An approach to a black carbon emission inventory for Mexico by two methods [J]. *Sci Total Environ*, 2014, 479-480.
- [55] Nemmar A, Hoet P H M, Vanquickenborne B, et al. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans [J]. *Circulation*, 2002, 105(4): 411-414.
- [56] Pei Z, Ning J, Zhang N, et al. Genetic instability of lung induced by carbon black nanoparticles is related with Plk1 signals changes [J]. *NanoImpact*, 2022, 26.
- [57] Pan X, Wu J, Jiang C, et al. Synergistic effects of carbon nanoparticle-Cr-Pb in PM2.5 cause cell cycle arrest via upregulating a novel lncRNA NONHSAT074301.2 in human bronchial epithelial cells [J]. *J Hazard Mater*, 2021, 411.
- [58] Zepp J A, Morrissey E E. Cellular crosstalk in the development and regeneration of the respiratory system [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(9): 551-566.
- [59] Basil M C, Katzen J, Engler A E, et al. The cellular and physiological basis for lung repair and regeneration: past, present, and future [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(4): 482-502.
- [60] Montgomery M T, Sajuthi S P, Cho S H, et al. Genome-wide analysis reveals mucociliary remodeling of the nasal airway epithelium induced by urban PM2.5. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2020, 63(2): 172-184.

- [61] Boers J E, Ambergen A W, Thunnissen F B. Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157: 2000-2006.
- [62] Whitsett Jeffrey A, Kalinichenko Vladimir V. Notch and basal cells take center stage during airway epithelial regeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(6): 597-598.
- [63] Prytherch Z, Job C, Marshall H, et al. Tissue-specific stem cell differentiation in an in vitro airway model [J]. *Macromol Biosci*, 2011, 11(11): 1467-1477.
- [64] Ahmad S, Valencia-Gattas M, Conner G E, et al. Gefitinib, an EGFR tyrosine kinase inhibitor, prevents smoke-mediated ciliated airway epithelial cell loss and promotes their recovery [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8).
- [65] Lindner K, Webering S, Stroebele M, et al. Low dose carbon black nanoparticle exposure does not aggravate allergic airway inflammation in mice irrespective of the presence of surface polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Nanomaterials*, 2018, 8(4).
- [66] Pinkerton K E, Zhou Y-M, Teague S V, et al. Reduced lung cell proliferation following short-term exposure to ultrafine soot and iron particles in neonatal rats: key to impaired lung growth? [J]. *Inhal Toxicol*, 2008, 16(sup1): 73-81.
- [67] Chu S, Li X, Sun N, et al. The combination of ultrafine carbon black and lead provokes cytotoxicity and apoptosis in mice lung fibroblasts through oxidative stress-activated mitochondrial pathways [J]. *Sci Total Environ*, 2021, 799.
- [68] Vuong N Q, Goegan P, Mohottalage S, et al. Proteomic changes in human lung epithelial cells (A549) in response to carbon black and titanium dioxide exposures [J]. *J Proteomics*, 2016, 149: 53-63.
- [69] Ayati A, Moghimi S, Salarinejad S, et al. A review on progression of epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors as an efficient approach in cancer targeted therapy [J]. *Bioorg Chem*, 2020, 99.
- [70] Simon D P, Giordano T J, Hammer G D. Upregulated JAG1 enhances cell proliferation in adrenocortical carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(9): 2452-2464.
- [71] Li Q, Zhang B, Lu J, et al. SNHG1 functions as a ceRNA in hypertrophic scar fibroblast proliferation and apoptosis through miR-320b/CTNNB1 axis [J]. *Arch Dermatol Res*, 2023, 315(6): 1593-1601.
- [72] Moheimani F, Roth H M, Cross J, et al. Disruption of β -catenin/CBP signaling inhibits human airway epithelial-mesenchymal transition and repair [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 68: 59-69.
- [73] Majumder N, Velayutham M, Bitounis D, et al. Oxidized carbon black nanoparticles induce endothelial damage through C-X-C chemokine receptor 3-mediated pathway [J]. *Redox Biol*, 2021, 47.
- [74] Wei X, Yu J, Ding L, et al. Effect of oxide nanoparticles on the morphology and fluidity of phospholipid membranes and the role of hydrogen bonds [J]. *J Environ Sci (China)*, 2017, 57: 221-30.

综述

空气污染物对气道上皮细胞修复影响及机制研究进展

引言

气道上皮细胞是人体与外界环境接触的第一道屏障，能够有效阻碍污染物进入肺部^[1]。但是，空气污染物与气道上皮细胞的长间接接触会损伤上皮细胞完整性^[2]。气道上皮细胞一旦受损，即刻启动细胞修复功能，损伤后修复和再生的能力对于维持正常的组织功能至关重要^[3]。然而，修复过程也可能通过污染物或病原体暴露直接改变或由污染物诱导的炎症间接改变^[4]。

空气污染物会对人体健康造成损害，根据世界卫生组织的数据，每年有 700 万人因空气污染而死亡，其中受影响最大的疾病是慢性阻塞性肺疾病（Chronic obstructive pulmonary disease, COPD）、肺癌和呼吸道感染^[5]。空气污染物种类繁多，大量研究发现香烟烟雾、颗粒物、多环芳烃、臭氧、氮氧化物等会破坏气道上皮细胞的屏障及修复功能，诱发呼吸系统疾病的发生。例如，沉积在肺内的大量细颗粒物（Particulate Matter 2.5, PM_{2.5}）可通过降低紧密连接蛋白表达，损伤人鼻上皮细胞屏障完整性^[6]；小鼠暴露于PM_{2.5}还可能导致肺部炎症细胞浸润，从而引发肺损伤^[7]。气道上皮细胞本身的修复过程能有效恢复其屏障功能，但研究人员发现空气污染物的暴露也有可能干扰气道上皮细胞的增殖、分化等修复过程。凌敏等人研究发现，当PM_{2.5}的浓度升高到一定程度时，气道上皮细胞增殖受到抑制^[8]；并且气道上皮细胞修复过程的异常可能导致气道壁重塑^[9]，诱发COPD等呼吸道疾病。鉴于修复过程对维持气道上皮细胞屏障功能的重要性，本文主要对空气污染物致气道上皮细胞损伤修复及干扰修复的相关机制进行汇总，为制定人群健康防护措施提供理论依据。

关键词：气道上皮细胞、修复、空气污染物

正文

1. 气道上皮细胞的结构

气道上皮细胞是抵御微生物、颗粒物和过敏原进入人体的第一道屏障^[10]。上皮中至少存在八种不同的上皮细胞类型，根据其功能的不同主要分为杯状细胞、纤毛细胞及基底细胞^[11]。研究发现气道上皮细胞中存在丰富的粘液，其主要是由水、离子、蛋白质和大分子组成。其中，粘液的大分子主要成分是杯状细胞分泌的粘蛋白，它可分为三类：分泌但不聚合的粘蛋白 7（Mucin 7, MUC7），分泌并聚合形成凝胶的粘蛋白 5AC（Mucin 5AC, MUC5AC）、粘蛋白 5B（Mucin 5B, MUC5B），以

及具有跨膜结构域且与细胞表面相关的粘蛋白 1, 粘蛋白 4, 粘蛋白 16 粘蛋白 20^[12]。粘液层能有效黏附病原体、毒素和颗粒物, 其对气道的局部防御至关重要。纤毛细胞位于气道上皮细胞的最上层, 其游离面上有大量纤毛, 因而可通过纤毛的摆动清除气道粘液及异物^[11]。基底细胞含有丰富的细胞骨架、连接和粘附蛋白, 能将上皮锚定在基质上, 使其与基底膜直接接触。干细胞可以进行自我更新并产生其他类型的细胞^[13], 基底细胞通常被认为是一种干细胞, 因为它能分化为纤毛细胞及杯状细胞, 促进表皮的发育、修复和再生^[14]。并且可通过肿瘤蛋白 63, 细胞骨架蛋白角蛋白 5 和神经生长因子受体这几种生物标志物进行识别^[13]。

2. 气道上皮细胞的屏障功能及损伤修复

气道上皮细胞是内部环境与外部环境之间的第一道屏障, 帮助其维持屏障功能主要由三部分完成: 粘液及纤毛、细胞间紧密和粘附连接以及抗菌物质的分泌^[15]。粘液的分泌和纤毛的摆动在气道上皮中首先成为第一层“过滤装置”, 其过程是由粘液黏附污染物并通过纤毛的不断摆动使已黏附污染物的粘液移动至咽部咳出, 从而去除气道中吸入的异物颗粒^[11]。气道的第二道防线是由紧密连接及粘附连接形成。其中, 紧密连接位于细胞间连接复合物的最顶端, 由跨膜蛋白和细胞内蛋白构成^[16]; 粘附连接位于紧密连接的正下方, 其主要功能是参与细胞之间的粘附并促进紧密连接的形成。这两个连接能形成一个连续的带状结构来维持上皮的屏障功能并调节上皮旁细胞的通透性, 减轻外部环境对气道上皮细胞的影响。除了物理屏障外, 气道上皮细胞还能分泌多种抗菌物质, 如酶、蛋白酶抑制剂、氧化剂和抗菌肽等等。其中, 抗菌肽是具有直接抗菌功能的先天免疫效应分子^[17], 能有效杀死吸入肺部的病原体、抵御外来入侵的病毒^[15]。总之, 气道上皮细胞作为接触污染物的第一道屏障, 维持其屏障功能至关重要。

气道上皮细胞的另一重要功能即修复和再生能力。正常气道上皮细胞在受到损伤后会迅速修复和再生, 以恢复其完整性和屏障功能^[18]。气道上皮细胞的损伤修复是一个复杂的过程, 需要基底细胞的迁移、增殖及再分化产生气道上皮细胞的所有细胞类型以形成假复层纤毛柱状上皮结构^[19]。基底细胞迁移是修复过程的重要组成部分, 它是一个周期性的过程^[20], 可分为形态极化, 膜延伸, 细胞-基质附着的形成, 收缩力和牵引力, 以及附着物的释放五个阶段^[21]。研究人员在动物模型中发现, 受损气道上皮细胞的修复过程可能同时涉及迁移和增殖, 但受损区域的大小似乎决定了何种过程占主导地位。当受损区域较小时可能并不需要细胞增殖, 迁移就能覆盖受损部位; 而较大的损伤则需要迁移和增殖过程共同修复。基底细胞除迁移和增殖过程外, 还可以作为杯状细胞和纤毛细胞的前体来再生气道上皮细胞, 因此基底细胞的分化也是修复中必不可少的过程^[22, 23]。研究人员发现, 基底细胞增殖和分化

之间正常平衡的破坏会出现基底细胞增生或上皮发育不全,进一步导致粘液细胞增生、化生或鳞状化生等等^[13]。综上所述,气道上皮细胞的修复过程对维持其屏障功能不可或缺。

3. 空气污染物与气道上皮细胞修复的关系

3.1 空气污染物致气道上皮细胞损伤

气道上皮细胞的屏障功能和修复过程能有效抵御外来污染物进入人体,但接触高浓度污染物或长时间的接触空气污染物可能会损伤其功能,进而损害人体健康,例如空气污染物的暴露可能会增加患COPD的风险,并且COPD作为一种显著影响小气道的疾病,已经成为全球第三大死因^[24]。已有大量研究表明,空气污染物,例如香烟烟雾、颗粒物、多环芳烃、臭氧、氮氧化物和硫氧化物等等会破坏气道上皮细胞的屏障和修复功能。首先,接触空气污染物可能会导致肺部炎症反应。有研究人员发现,PM_{2.5}暴露后会在肺和肺泡结构中出现炎症细胞浸润。并且在人支气管上皮细胞(16HBE细胞)中暴露PM_{2.5}后也出现肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α), 白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) 和白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6) 等炎症细胞因子表达增多^[7]。Guo等人也通过细胞实验及小鼠模型研究发现,在使用香烟烟雾提取物对细胞及小鼠进行诱导后,炎症细胞因子TNF- α 和IL-1 β 分泌增多,诱发肺部炎症,从而增加患COPD的风险^[25]。除此之外,空气污染物暴露还可能会破坏气道上皮细胞的屏障功能。例如,PM_{2.5}暴露会导致气道上皮细胞的紧密连接蛋白闭锁小带蛋白-1、紧密连接蛋白-1 和闭合蛋白的蛋白表达降低,证明其会对气道上皮细胞的屏障功能造成破坏,使气道上皮细胞更易受到外来物的损伤^[26]。Zeglinski等人发现随着可溶性木烟浓度的增加,结合蛋白E钙粘蛋白的染色强度降低,表明可溶性木烟暴露也会破坏气道上皮细胞的屏障^[27]。空气污染物除了会破坏气道上皮细胞的屏障功能外,最重要的是还可能会干扰气道上皮细胞的修复过程。例如,为了明确超细碳黑的暴露是否会阻碍气道上皮细胞的增殖,研究人员使用超细碳黑对原代人支气管上皮细胞进行暴露,通过增殖测定发现^{[3}H]胸苷和^{[3}H]亮氨酸增多,与经无血清培养基处理后抑制细胞生长的结果保持一致,表明超细碳黑会抑制气道上皮细胞增殖^[28]。有体外细胞实验发现,香烟烟雾中的挥发性成分,如乙醛和丙烯醛,能够抑制人气道上皮细胞趋化性、增殖和三维胶原凝胶收缩的能力,干扰气道上皮细胞修复过程,从而导致气道结构的改变,诱发COPD^[29]。除对增殖阶段有影响外,空气污染物还会干扰分化。有动物实验表明,在小鼠远端气道上皮细胞分泌细胞克拉拉细胞(Clara细胞)中暴露香烟烟雾发现在支气管肺泡导管交界处的再分化出现不完整的现象,证明其分化过程受到抑制^[29]。Gindele等人通过建立原代小气道上皮细胞气-液界面(Air-Liquid Interface, ALI)

培养物后进行香烟烟雾的暴露，在气道上皮细胞分化过程中发现，香烟烟雾的暴露不仅会使跨膜电阻值降低，损害了上皮屏障形成；还会对基底细胞分化为分泌细胞产生影响，导致杯状细胞增生和Club细胞减少，具体体现在Club细胞标志物分泌珠蛋白家族1A成员1和粘蛋白MUC5AC的mRNA表达水平下降。此外，研究人员还发现香烟烟雾暴露会损害纤毛细胞的发育和功能^[30]。进一步表明空气污染物的暴露会干扰气道上皮细胞的分化，影响气道上皮细胞的修复进程。

3.2 空气污染物损伤气道上皮细胞修复功能的机制

气道上皮细胞修复过程包括迁移、增殖及分化三个阶段，空气污染物对气道上皮细胞修复过程的破坏主要是干预以上三个过程。

大量研究表明，Wnt信号传导是肺部发育的主要调节因子^[31]，参与了空气污染物对气道上皮细胞造成的损伤及修复过程。Wnt信号通路在胚胎发育、上皮修复反应例如多种细胞的增殖、分化、存活和迁移中发挥重要的调节作用^[32, 33]。既往研究发现，抑制经典Wnt通路可使气道上皮增殖和修复能力减弱^[34-36]，例如，在用萘对小鼠注射干预并对气道上皮细胞的体外原代培养物处理后发现，Wnt3a促进基底细胞的角蛋白K5 细胞的增殖，该研究证明了Wnt/ β -Catenin信号传导在基底细胞增殖中的参与^[37]。与此同时，Zhou等人研究发现二氧化硅处理后Wnt配体Wnt10a出现上调进而导致经典Wnt/ β -catenin信号通路的激活，包括GSK-3 β 的磷酸化和LSPC衍生的气道上皮中 β -catenin的积累，同时这些信号均能被NLRP3 炎症小体抑制剂MCC950 阻断^[38]。Wnt经典通路中关键下游效应分子 β -Catenin会导致BrdU染色显著降低及纤毛细胞标志物FOXJ1 mRNA的表达增加。并且在使用Wnt/ β -Catenin信号传导抑制剂FH535 干预后，不仅气道上皮细胞增殖减少，而且纤毛细胞标志物FOXJ1 mRNA的表达降低，抑制纤毛发生，进一步表明Wnt/ β -Catenin对气道上皮细胞修复的调控作用^[39]。除此之外，还有研究表明，高水平的Wnt/ β -Catenin信号传导可通过激活 Δ N-TP63 表达来阻止基底细胞分化为纤毛细胞和杯状细胞。研究人员通过使用非洲爪蟾表皮、小鼠气道和人气道基底细胞培养物研究发现 Δ N-Tp63 是粘膜纤毛细胞分化的主调节因子并且Wnt/ β -Catenin通过上调基底干细胞中的 Δ N-Tp63 来抑制分化^[40]。综上所述，Wnt信号传导通路对于气道上皮细胞修复过程至关重要。

表皮生长因子受体（Epidermal growth factor receptor, EGFR）通路也与受损气道上皮修复有关^[41]。例如，Peteccchia等人研究发现，香烟烟雾暴露于人支气管上皮细胞系中BEAS-2B和16HBE细胞发现细胞的紧密连接出现时间依赖性和浓度依赖性分解，EGFR-细胞外信号调节激酶（Extracellular signal-regulated kinase, ERK）1/2 通路参与香烟烟雾诱导的损伤，具体体现在暴露于香烟烟雾能诱导ERK1/2 的显著磷酸化，而且香烟烟雾诱导的紧密连接分解和DNA片段化被EGFR抑制剂

AG1478 完全阻断^[6]。这表明EGFR通路能参与调节气道上皮细胞屏障，尤其是细胞间的紧密连接。此外，EGFR激活对于基底细胞增殖和正常上皮修复也是必要的，Brechtel等人研究表明在正常和蔡诱导的损伤小鼠气管以及ALI培养物中检测发现EGFR和ERB-B2 具有活性，并且在使用EGFR抑制剂AG1478 处理使细胞增殖减少99%，使用Erb-B2 抑制剂AG825 使细胞增殖减少约 66%，这说明EGF和EGFR是基底细胞增殖所必需的^[42]，Inoue等人研究也表明EGF家族成员红细胞增多症癌基因B2 在调节哮喘细胞增殖和修复中发挥至关重要的作用^[43]。

同时，EGFR活性也是纤毛细胞和杯状细胞在体外存活所必需的，Manzo等人研究发现气道上皮细胞中的双调蛋白依赖性EGFR信号通路有助于蔡诱导的肺损伤模型的粘液细胞化生^[44]。Tyner等人研究发现在小鼠气道中出现纤毛细胞增生与杯状细胞化生，EGFR-PI3K信号通路发挥调控作用能防止纤毛细胞继续凋亡，并且使用EGFR激酶抑制剂EKB-569 处理后发现病毒诱导的纤毛细胞和杯状细胞的增生减弱^[45]。综上所述，EGFR信号传导通路在气道上皮细胞修复中也发挥重要调控作用。

4. 总结与展望

随着环境中污染物的不断增加，空气污染物的多种组分可通过损伤气道上皮细胞影响肺功能水平，增加患呼吸系统疾病的风险。气道上皮细胞作为一道重要的屏障，能抵御多种外来污染物进入人体。气道上皮细胞的正常修复过程是维持其屏障功能的重要保证，有大量的研究已经表明Wnt信号通路和EGFR介导的信号通路在气道上皮细胞增殖和分化过程中发挥重要调控作用。但对空气污染物干扰气道上皮细胞修复过程的明确阶段及分子机制研究较少，对人群的相关研究也较为缺乏，并且尚不明确气道上皮细胞修复异常在呼吸系统疾病中的角色。但通过对空气污染物导致气道上皮细胞修复功能破坏的现有机制进行总结，能为后期研究提供线索和思路。

综述参考文献

- [1] Tatsuta M, Kan-O K, Ishii Y, et al. Effects of cigarette smoke on barrier function and tight junction proteins in the bronchial epithelium: protective role of cathelicidin LL-37 [J]. *Respir Res*, 2019, 20(1).
- [2] Coraux C, Hajj R, Lesimple P, et al. Réparation et régénération de l'épithélium respiratoire [J]. *Med Sci (Paris)*, 2005, 21(12): 1063-1069.
- [3] Warner S M B, Hackett T-L, Shaheen F, et al. Transcription factor p63 regulates key genes and wound repair in human airway epithelial basal cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 49(6): 978-988.
- [4] Chen P, Amatngalim G D, Broekman W, et al. Cigarette smoke modulates repair and innate immunity following Injury to airway epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11.
- [5] Sachini E, Sioumalas-Christodoulou K, Chrysomallidis C, et al. COVID-19 enabled co-authoring networks: a country-case analysis [J]. *Scientometrics*, 2021, 126(6): 5225-5244.
- [6] Zhang Y, Zhang L, Chen W, et al. Shp2 regulates PM2.5-induced airway epithelial barrier dysfunction by modulating ERK1/2 signaling pathway [J]. *Toxicol Lett*, 2021, 350: 62-70.
- [7] Jia H, Liu Y, Guo D, et al. PM2.5-induced pulmonary inflammation via activating of the NLRP3/caspase-1 signaling pathway [J]. *Environ Toxicol*, 2020, 36(3): 298-307.
- [8] 凌敏, 梁婕, 石根勇, 等. 氧化应激在 PM2.5 诱导人支气管上皮细胞增殖中的作用 [J]. *江苏预防医学*, 2017, 28(06): 644-650.
- [9] Heijink I H, De Bruin H G, Van Den Berge M, et al. Role of aberrant WNT signalling in the airway epithelial response to cigarette smoke in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Thorax*, 2013, 68(8): 709-716.
- [10] Lambrecht B N, Hammad H. The airway epithelium in asthma [J]. *Nature Medicine*, 2012, 18(5): 684-692.
- [11] Knight D A, Holgate S T. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease [J]. *Respirology*, 2003, 8(4): 432-446.
- [12] Ma J, Rubin B K, Voynow J A. Mucins, mucus, and goblet Cells [J]. *Chest*, 2018, 154(1): 169-176.
- [13] Rock J R, Randell S H, Hogan B L M. Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling [J]. *Dis Model Mech*, 2010, 3(9-10): 545-556.
- [14] Ning W, Muroyama A, Li H, et al. Differentiated daughter cells regulate stem cell proliferation and fate through intra-tissue tension [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(3): 436-452.
- [15] Ganesan S, Comstock A T, Sajjan U S. Barrier function of airway tract epithelium [J]. *Tissue Barriers*, 2013, 1(4).
- [16] Otani T, Furuse M. Tight junction structure and function revisited [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(10): 805-817.
- [17] Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res*. 2000, 1(3): 141-150.
- [18] 金明珠, 陈晓秋, 李钰, 等. 气道上皮细胞损伤修复在哮喘中的研究进展 [J]. *疑难病杂志*, 2021, 20(03): 315-319.
- [19] Crespin S, Bacchetta M, Bou Saab J, et al. Cx26 regulates proliferation of repairing basal airway epithelial cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 52: 152-160.
- [20] Xiao H, Li D X, Liu M. Knowledge translation: airway epithelial cell migration and respiratory

- diseases [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2012, 69(24): 4149-4162.
- [21] Lauffenburger D A, Horwitz A F. Cell migration: a physically integrated molecular process. Cell, 1996, 84(3): 359-369.
- [22] Montoro D T, Haber A L, Biton M, et al. A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes [J]. Nature, 2018, 560(7718): 319-324.
- [23] Plasschaert L W, Žilionis R, Choo-Wing R, et al. A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte [J]. Nature, 2018, 560(7718): 377-381.
- [24] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010 [J]. Lancet, 2012, 380(9859): 2095-2128.
- [25] Guo L, Wang T, Wu Y, et al. WNT/ β -catenin signaling regulates cigarette smoke-induced airway inflammation via the PPAR δ /p38 pathway [J]. Lab Invest, 2016, 96(2): 218-229.
- [26] Zhao R, Guo Z, Zhang R, et al. Nasal epithelial barrier disruption by particulate matter $\leq 2.5 \mu\text{m}$ via tight junction protein degradation [J]. J Appl Toxicol, 2017, 38(5): 678-687.
- [27] Zeglinski M R, Turner C T, Zeng R, et al. Soluble wood smoke extract promotes barrier dysfunction in alveolar epithelial cells through a MAPK signaling pathway [J]. Sci Rep, 2019, 9(1).
- [28] Tamaoki J, Isono K, Takeyama K, et al. Ultrafine carbon black particles stimulate proliferation of human airway epithelium via EGF receptor-mediated signaling pathway [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 287(6): L1127-L1133.
- [29] Van Winkle L S, Brown C D, Shimizu J A, et al. Impaired recovery from naphthalene-induced bronchiolar epithelial injury in mice exposed to aged and diluted sidestream cigarette smoke. Toxicol Lett, 2004, 154(1-2): 1-9.
- [30] Gindele J A, Kiechle T, Benediktus K, et al. Intermittent exposure to whole cigarette smoke alters the differentiation of primary small airway epithelial cells in the air-liquid interface culture [J]. Sci Rep, 2020, 10(1).
- [31] Voleckaert T, De Langhe S P. Wnt and FGF mediated epithelial-mesenchymal crosstalk during lung development. Dev Dyn, 2015, 244(3): 342-366.
- [32] Huang P, Yan R, Zhang X, et al. Activating Wnt/ β -catenin signaling pathway for disease therapy: Challenges and opportunities [J]. Pharmacol Ther, 2019, 196: 79-90.
- [33] Igota S, Tosa M, Murakami M, et al. Identification and Characterization of Wnt Signaling Pathway in Keloid Pathogenesis [J]. Int J Med Sci, 2013, 10(4): 344-354.
- [34] Stripp B R, Reynolds S D. Maintenance and repair of the bronchiolar epithelium [J]. Proc Am Thorac Soc, 2008, 5(3): 328-333.
- [35] Crosby L M, Waters C M. Epithelial repair mechanisms in the lung [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010, 298(6): L715-L731.
- [36] Kneidinger N, Yildirim A Ö, Callegari J, et al. Activation of the WNT/ β -Catenin pathway attenuates experimental emphysema [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183(6): 723-733.
- [37] Hsu H-S, Liu C-C, Lin J-H, et al. Repair of naphthalene-induced acute tracheal injury by basal cells depends on β -catenin [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2014, 148(1): 322-332.
- [38] Zhou H, Zhang Q, Huang W, et al. NLRP3 inflammasome mediates silica-induced lung epithelial injury and aberrant regeneration in lung stem/progenitor cell-derived organotypic models [J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(6): 1875-1893.
- [39] Schmid A, Sailland J, Novak L, et al. Modulation of Wnt signaling is essential for the differentiation

- of ciliated epithelial cells in human airways [J]. *FEBS Lett*, 2017, 591(21): 3493-3506.
- [40] Haas M, Gómez Vázquez J L, Sun D I, et al. ΔN -Tp63 mediates Wnt/ β -Catenin-induced inhibition of differentiation in basal stem cells of mucociliary epithelia [J]. *Cell Rep*, 2019, 28(13): 3338-3352.
- [41] Burgel P R. Roles of epidermal growth factor receptor activation in epithelial cell repair and mucin production in airway epithelium [J]. *Thorax*, 2004, 59(11): 992-996.
- [42] Brechbuhl H M, Li B, Smith R W, et al. Epidermal growth factor receptor activity is necessary for mouse basal cell proliferation [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 307(10): L800-L810.
- [43] Inoue H, Hattori T, Zhou X, et al. Dysfunctional ErbB2, an EGF receptor family member, hinders repair of airway epithelial cells from asthmatic patients [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2019, 143(6): 2075-2085.
- [44] Manzo N D, Foster W M, Stripp B R. Amphiregulin-dependent mucous cell metaplasia in a model of nonallergic lung injury [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 47(3): 349-357.
- [45] Tyner J W. Blocking airway mucous cell metaplasia by inhibiting EGFR antiapoptosis and IL-13 transdifferentiation signals [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(2): 309-321.

附录或缩略词表

中文名称	英文全称	缩写
气液界面	Air-liquid interface	ALI
急性呼吸窘迫综合征	Acute respiratory distress syndrome	ARDS
炭黑	Carbon black	CB
慢性阻塞性肺疾病	Chronic obstructive pulmonary disease	COPD
β -连环蛋白	Beta Catenin	CTNNB1
细胞角蛋白	Cytokeratin	ck
DNA 结合结构域	DNA-binding domain	DBD
鸟嘌呤	Guanine	dGMP
表皮生长因子受体	Epidermal Growth Factor Receptor	EGFR
细胞外信号调节激酶	Extracellular signal-regulated kinase	ERK
叉头框蛋白 J1	Forkhead-box J1	FOXJ1
叉头框蛋白 J2	Forkhead-box J2	FOXJ2
基因本体	Gene Ontology	GO
国际癌症研究机构	International Agency for Research on Cancer	IARC
白细胞介素-1 β	Interleukin-1 β	IL-1 β
白细胞介素-6	Interleukin-6	IL-6
β 1 整合素	Integrin beta-1	ITG β 1
锯齿状典型 Notch 配体 1	Jagged canonical Notch ligand 1	JAG1
京都基因与基因组百科全书	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	KEGG
细胞周期调节蛋白-67	Cell cycle regulatory protein-67	Ki67
分子动力学模拟	Molecular dynamics	MD
黏蛋白 5AC	Mucin 5AC	MUC5AC
黏蛋白 5B	Mucin 5B	MUC5B
肿瘤蛋白 p63	Tumor protein p63	p63
肺纤维化	Pulmonary fibrosis	PF
增殖细胞核抗原	Proliferating cell nuclear antigen	PCNA
原代人支气管上皮细胞	Primary human airway epithelial cells	pHAECs
细颗粒物	Particulate matter 2.5	PM _{2.5}
实时荧光定量 PCR	Quantitative real-time PCR	qRT-PCR
N 端反式激活结构域	N-terminal transactivation domain	TAD
四聚化结构域	Tetramerization domain	TD
跨膜电阻值	Transepithelial electrical resistance	TEER
透射电镜	Transmission electron microscope	TEM
肿瘤坏死因子- α	Tumor necrosis factor- α	TNF- α