

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2020.12.1322

· 论 著 ·

臭氧暴露导致人鼻黏膜上皮细胞中氧化应激相关基因表达的改变

朱乘婧[△], 唐海红[△], 高颖娜, 滕伟强, 陈争明, 郑宏良*

海军军医大学(第二军医大学)长海医院耳鼻咽喉头颈外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 通过分析臭氧暴露后人鼻黏膜上皮细胞中氧化应激相关基因表达的变化, 初步探索臭氧暴露引发慢性鼻窦炎的机制。**方法** 建立人鼻黏膜上皮细胞臭氧暴露体外培养模型, 用高通量 PCR 芯片技术对臭氧暴露前后鼻黏膜氧化应激相关基因进行检测, 并用 qRT-PCR 进行验证。采用 qRT-PCR、蛋白质印迹法及流式细胞术检测臭氧暴露前后培养细胞中环氧化酶 2 (Cox2) 和活性氧 (ROS) 的表达。**结果** 用 PCR 芯片对鼻黏膜上皮细胞中 84 个氧化应激相关基因进行筛查, 发现高强度臭氧暴露后人鼻黏膜上皮细胞中醛酮还原酶家族 1 成员 C2 (*AKR1C2*)、谷氨酸半胱氨酸连接酶 (*GCLM*)、谷胱甘肽过氧化物酶 2 (*GPX2*)、谷胱甘肽还原酶 (*GSR*)、血红素加氧酶 1 (*HMOX1*)、NADPH 氧化酶 (*NOX5*)、前列腺素内过氧化物酶合酶 2 (*PTGS2*)、超氧化物歧化酶 2 (*SOD2*) 及丝氨酸蛋白酶抑制剂 (Kazal 型) 1 (*SPINK1*) 9 个基因表达上调, 而趋化因子配体 5 (*CCL5*)、细胞球蛋白 (*CYGB*)、可溶性环氧化酶水解酶 2 (*EPHX2*)、谷胱甘肽 S-转移酶 zeta 1 (*GSTZ1*)、角蛋白 1 (*KRT1*)、组氨酸磷酸酶 (*LHPP*)、肌球蛋白 (*MB*)、MPV17 线粒体内膜蛋白 (*MPV17*)、硒蛋白 P (*SEPP1*) 及转运蛋白颗粒复合物 6A (*TRAPPC6A*) 10 个基因表达下调。同时, 臭氧暴露导致 ROS 大量生成 (暴露组及对照组荧光强度: 184.3 ± 6.8 vs 13.0 ± 1.4 , $P < 0.05$), Cox2 mRNA 及蛋白表达水平升高 (暴露组与对照组 mRNA 相对表达量: 6.4 ± 1.2 vs 1.0 ± 0.0 , $P < 0.05$; 暴露组与对照组蛋白相对表达量: 11.7 ± 2.6 vs 13.8 ± 1.5 , $P < 0.05$)。**结论** 臭氧暴露后 *GSTZ1*、*NOX5*、*SOD2* 等相关基因参与鼻黏膜氧化应激调控, 臭氧暴露引发鼻黏膜炎症反应可能与这些基因调控 Cox2 表达的相关信号通路有关。

[关键词] 臭氧; 鼻窦炎; 氧化性应激; 环氧化酶 2**[中图分类号]** R 765.41**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2020)12-1322-07

Expression of oxidative stress-related genes in human nasal epithelium after ozone exposure

ZHU Cheng-jing[△], TANG Hai-hong[△], GAO Ying-na, TENG Wei-qiang, CHEN Zheng-ming, ZHENG Hong-liang*

Department of Otorhinolaryngology/Head and Neck Surgery, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism of ozone exposure-induced chronic rhinosinusitis by analyzing the alterations in the expression of oxidative stress-related genes in human nasal epithelium. **Methods** An *in vitro* cultured ozone exposure-induced human nasal epithelium model was established. The oxidative-stress-related genes of human nasal epithelium were detected by high-throughput polymerase chain reaction (PCR) chip before and after ozone exposure, and were verified by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The expressions of cyclooxygenase 2 (Cox2) and reactive oxygen species (ROS) were detected by qRT-PCR, Western blotting and flow cytometry. **Results** A total of 84 oxidative-stress-related genes were screened by PCR chip in the human nasal epithelium. It was found that the expression of aldo-keto reductase family 1 member C2 (*AKR1C2*), glutamate-cysteine ligase modifier subunit (*GCLM*), glutathione peroxidase 2 (*GPX2*), glutathione-disulfide reductase (*GSR*), heme oxygenase 1 (*HMOX1*), NADPH oxidase 5 (*NOX5*), prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (*PTGS2*), superoxide dismutase 2 (*SOD2*), and serine peptidase inhibitor Kazal type 1 (*SPINK1*) was up-regulated after intensive ozone exposure, while the expression of C-C motif chemokine ligand 5 (*CCL5*), cytoglobin (*CYGB*), epoxide hydrolase 2 (*EPHX2*), glutathione S-transferase zeta 1 (*GSTZ1*), keratin 1 (*KRT1*), phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase (*LHPP*), myoglobin (*MB*), mitochondrial inner membrane protein MpV17 (*MPV17*), selenoprotein P (*SEPP1*), and trafficking protein particle complex 6A (*TRAPPC6A*) was down-regulated. At the same time, ozone exposure resulted in a large amount of ROS (fluorescence intensity of the exposure group and control group: 184.3 ± 6.8 vs 13.0 ± 1.4 ,

[收稿日期] 2020-06-21 **[接受日期]** 2020-11-10**[基金项目]** 国家自然科学基金(81200734). Supported by National Natural Science Foundation of China (81200734).**[作者简介]** 朱乘婧, 博士, 主治医师. E-mail: zhuzhuxaz@163.com; 唐海红, 博士, 副教授、副主任医师. E-mail: maria5318@163.com[△]共同第一作者 (Co-first authors).

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31162012, E-mail: zheng_hl2004@163.com

$P < 0.05$) and increased expressions of Cox2 mRNA and protein (relative expression of mRNAs: 6.4 ± 1.2 vs 1.0 ± 0.0 , $P < 0.05$; relative protein expression: 11.7 ± 2.6 vs 13.8 ± 1.5 , $P < 0.05$). **Conclusion** After ozone exposure, *GSTZ1*, *NOX5*, *SOD2* and other related genes are involved in the regulation of oxidative stress in nasal epithelium. The inflammatory response of nasal epithelium induced by ozone exposure may be related to the signaling pathways of Cox2 expression that regulated by these genes.

[Key words] ozone; rhinosinusitis; oxidative stress; cyclooxygenase 2

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2020, 41(12): 1322-1328]

慢性鼻窦炎 (chronic rhinosinusitis, CRS) 是耳鼻喉科常见病, 人群患病率高达 15%, 每年因 CRS 造成的直接或间接经济损失超过 13 亿美元^[1-2]。CRS 的病因和发病机制复杂, 目前仍缺乏完善的理论体系对其进行解释。随着社会经济的发展, 环境污染对 CRS 发生、发展的影响日益受到重视。

臭氧广泛存在于大气中, 具有极强的氧化性, 交通工具尾气排放、石油化工等都是其工业污染源^[3]。长期臭氧暴露可诱导呼吸道发生强烈氧化应激, 引发细胞炎症反应和组织损伤, 损害呼吸道功能, 已成为现代社会引发呼吸道疾病的重要因素^[4-7]。鼻及鼻窦表面覆盖富含纤毛柱状上皮的黏膜, 是呼吸道的第一道屏障, 臭氧暴露造成鼻黏膜氧化应激损伤并引发炎症反应已得到证实^[8-11]。实验发现, 短期臭氧暴露即可引起动物和人鼻黏膜黏液分泌增多、中性粒细胞聚集并释放 IL-8、TNF- α 、巨噬细胞炎性蛋白等炎性介质; 长期吸入臭氧则诱发鼻黏膜上皮细胞凋亡、纤毛运动障碍、细胞活性和代谢减弱、细胞外基质蛋白沉积, 引起鼻及鼻窦黏膜组织损伤和重构、破坏上皮屏障功能, 诱导 CRS 发生^[11-13]。

大量研究指出, 臭氧暴露引起的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 堆积是鼻黏膜氧化损伤及慢性炎症发展的起始因素^[8-11]。我们前期研究发现, 臭氧暴露能诱导离体培养的鼻黏膜上皮细胞环氧化酶 2 (cyclooxygenase 2, Cox2) 及前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 表达上调, 同时伴有细胞纤毛摆动能力的明显减弱, 认为臭氧暴露可能通过 Cox2 调控炎症因子表达参与鼻黏膜氧化应激, 与 CRS 发病有关^[14-15]。目前对鼻黏膜上皮细胞中参与氧化应激调控的信号通路尚缺乏研究, 本实验采用氧化应激 PCR 芯片对臭氧暴露后体外培养的人鼻黏膜上皮细胞系信号通路相关基因进行检测, 为深入研究臭氧暴露引发 CRS 的相关机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂 CO₂ 培养箱 (HF151, 上海力康

生物医疗科技控股有限公司); 生物安全柜 (HFsafe 1200 A2, 上海力康生物医疗科技控股有限公司); 臭氧培养箱 (秦皇岛展坤臭氧科技有限公司); 显微镜 (CKX31, 日本 Olympus 公司); 流式细胞仪 (FACSCalibur, 美国 BD 公司); 荧光定量 PCR 仪 (480 II, 瑞士 Roche 公司); PCR 仪 (9700, 美国 ABI 公司); 高速离心机 (Neofuge15, 上海力康生物医疗科技控股有限公司); 酶标分析仪 (RT-2100C, 深圳雷杜生命科学股份有限公司); 电泳仪 (EPS-300, 上海天能科技有限公司); 凝胶分析软件 Gel-Pro analyzer (美国 Media Cybernetics 公司)。

氯仿 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), Rnase 抑制剂 (加拿大 Fermentas 公司), TRIzol (15596-026)、焦碳酸二乙酯水 (diethyl pyrocarbonate, DECP)、荧光染料 SYBR Green I、反转录酶 SuperScript III Reverse Transcriptase、特异性引物、Platinum Taq DNA Polymerase、100 mmol/L dNTP (美国 Invitrogen 公司产品), RT² First Strand Kit、RT² SYBR Green QPCR Mastermix、氧化应激 PCR 芯片 (Oxidative Stress Plus RT2 Profiler PCR Array, 德国 QIAGEN 公司), RIPA 液、BCA 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), PVDF 膜 (美国 Millipore 公司), Cox2 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司)。
1.2 体外培养人鼻黏膜上皮细胞 人鼻黏膜上皮细胞系 RPMI2650 (ATCC CCL-30, 美国典型培养物保藏中心) 复苏后置含 10% FBS 的 MEM 培养液培养 (37 °C, 5% CO₂)。细胞融合后 Hank's 平衡盐溶液 (美国 Gibco 公司) 洗涤 2 次, 0.25% EDTA (美国 Gibco 公司) 孵育 10 min 后收集脱落细胞, 500×g 离心 10 min。锥虫蓝计数细胞后置 6 孔板培养, 每孔接种 2×10⁵ 个细胞。隔日观察细胞, 对贴壁良好的细胞更换培养液后培养过夜 (37 °C, 5% CO₂)。

1.3 臭氧暴露 显微镜下观察培养细胞生长情况。选取无污染、生长良好的细胞置臭氧培养箱培养, 设定臭氧暴露质量分数为 2×10⁻⁶, 暴露 48 h,

同时通入 5% CO₂ 及臭氧。培养箱进气口置臭氧浓度监测探头实时检测箱体内臭氧浓度,计算机自动控制保持箱体内臭氧浓度稳定。培养箱底部置水盘以保持箱体内湿度。

1.4 流式细胞术检测 ROS 的表达 细胞置于质量分数为 2×10^{-6} 的臭氧中,培养 48 h 后检测 ROS。培养细胞用 PBS 洗涤 3 次,按 1×10^7 /mL 细胞加入 5 μ L 的 10 mmol/L 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA; 美国 Sigma 公司),室温孵育 15 min。500 \times g 离心、PBS 洗涤 3 次后加入 1 mL PBS 重悬并上机检测荧光强度 (激发波长为 488 nm,发射波长为 525 nm),同时设置空白对照。

1.5 qRT-PCR 检测 Cox2 的表达 在质量分数为 2×10^{-6} 的臭氧中暴露 48 h 后收集细胞。500 \times g 离心、PBS 洗涤 3 次后以 TRIzol 一步法提取总 RNA,紫外分光光度法鉴定,反转录获得 cDNA 备用。按说明书分别加入 cDNA 模板、引物、dNTP、5 倍 PCR 缓冲液、Taq 酶等,总反应体系为 20 μ L。引物设计:正向 5'-CACCTCTATCACTGGCATCC-3',反向 5'-TTC CTACCACCAGCAACCCT-3'。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 Cox2 相对表达量。

1.6 蛋白质印迹法检测 Cox2 的表达 在质量分数为 2×10^{-6} 的臭氧中暴露 48 h 后收集细胞,500 \times g 离心、PBS 洗涤 3 次,用 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。将待测样品与 5 \times SDS 上样液按 4 : 1 混合,95 $^{\circ}$ C 加热 5 min 使蛋白变性。蛋白样品冷却至室温后上样到预先配制的 SDS-PAGE 胶,100 V 恒压电泳 20 min,待指示剂溴酚蓝进入分离胶后改用 120 V 恒压,转至 PVDF 膜室温封闭 1 h。按说明书加入 Cox2 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,加入二抗 (鼠抗兔,美国 Santa Cruz 公司) 孵育,结束后显色拍照,用图像分析软件 Gel-Pro analyzer 4.0 检测蛋白表达。以 β -actin 为内参。

1.7 氧化应激 PCR 芯片检测 收集细胞,用 TRIzol 法抽提 RNA,紫外分光光度法鉴定后用 RT² First Strand 试剂盒将 RNA 样本反转录为 cDNA。将 cDNA 与 RT² SYBR Green QPCR Mastermix 混合并准确加样后进行 qRT-PCR 检测。根据荧光信号进行数据处理并绘制标准曲线,分析基因相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,基因表达变化倍数 > 2 作为

阳性。对筛选出的通路相关基因用 qRT-PCR 进行验证。实验过程中注意避免 DNA 污染。

1.8 统计学处理 所有实验数据录入 Prism 统计软件进行统计学分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 臭氧暴露后人鼻黏膜上皮细胞 ROS 表达增加 在质量分数为 2×10^{-6} 的臭氧中暴露 48 h 后,人鼻黏膜上皮细胞 ROS 表达升高 (臭氧暴露组及对照组荧光强度: 184.3 ± 6.8 vs 13.0 ± 1.4 , $P < 0.05$),提示细胞经臭氧暴露后发生明显氧化应激反应,大量氧化应激产物生成。

2.2 臭氧暴露后人鼻黏膜上皮细胞 Cox2 表达增加 在质量分数为 2×10^{-6} 的臭氧中暴露 48 h 后,用 qRT-PCR 和蛋白质印迹法分别检测臭氧暴露组与对照组细胞 Cox2 mRNA 和蛋白表达,结果显示臭氧暴露诱导培养细胞 Cox2 转录, mRNA 表达较对照组升高 (6.4 ± 1.2 vs 1.0 ± 0.0 , $P < 0.05$)。此外, Cox2 蛋白表达 (图 1) 也较对照组升高 (13.8 ± 1.5 vs 11.7 ± 2.6 , $P < 0.05$),提示臭氧暴露能增强鼻黏膜上皮细胞中 Cox2 的表达,可能是鼻黏膜氧化应激损伤的重要因素。

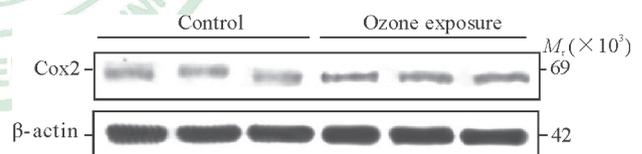


图 1 人鼻黏膜上皮细胞臭氧暴露 (质量分数: 2×10^{-6}) 48 h 后 Cox2 蛋白表达变化

Fig 1 Changes of Cox2 protein expression in human nasal epithelial cells after 48 h ozone exposure (mass fraction: 2×10^{-6})

2.3 臭氧暴露后鼻黏膜氧化应激相关基因改变 在质量分数为 2×10^{-6} 的臭氧中暴露 48 h 后,用氧化应激 PCR 芯片对鼻黏膜上皮细胞 84 个氧化应激相关通路基因进行检测,选出其中目的基因表达相对于对照组基因表达的变化倍数 > 2 的基因 (表 1)。臭氧暴露后鼻黏膜上皮细胞中表达较对照组降低的基因有 10 个,包括趋化因子配体 5 (C-C motif chemokine ligand 5, CCL5)、细胞球蛋白 (cytoglobin, CYGB)、可溶性环氧化酶水解酶 2 (epoxide hydrolase 2, EPHX2)、谷胱

甘肽 S-转移酶 zeta 1 (glutathione S-transferase zeta 1, *GSTZ1*)、角蛋白 1 (keratin 1, *KRT1*)、组氨酸磷酸酶 (phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase, *LHPP*)、肌球蛋白 (myoglobin, *MB*)、MPV17 线粒体内膜蛋白 (mitochondrial inner membrane protein MpV17, *MPV17*)、硒蛋白 P (selenoprotein P, *SEPP1*)、转运蛋白颗粒复合物 6A (trafficking protein particle complex 6A, *TRAPPC6A*)；表达较对照组升高的基因有 9 个, 包括醛酮还原酶家族 1 成员 C2 (aldo-keto reductase family 1 member C2, *AKR1C2*)、

谷氨酸半胱氨酸连接酶 (glutamate-cysteine ligase modifier subunit, *GCLM*)、谷胱甘肽过氧化物酶 2 (glutathione peroxidase 2, *GPX2*)、谷胱甘肽还原酶 (glutathione-disulfide reductase, *GSR*)、血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, *HMOX1*)、NADPH 氧化酶 (NADPH oxidase 5, *NOX5*)、前列腺素内过氧化物酶合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, *PTGS2*)、超氧化物歧化酶 2 (superoxide dismutase 2, *SOD2*)、丝氨酸肽酶抑制剂 (Kazal 型) 1 (serine peptidase inhibitor Kazal type 1, *SPINK1*)。

表 1 氧化应激 PCR 芯片检测人鼻黏膜上皮细胞臭氧暴露后相关基因表达

Tab 1 Detection of gene expression in human nasal epithelial cells after ozone exposure by oxidative stress PCR array

Gene	Expression	Fold change	Gene	Expression	Fold change
<i>CCL5</i>	Down	0.47	<i>AKR1C2</i>	Up	7.34
<i>CYGB</i>	Down	0.25	<i>GCLM</i>	Up	2.18
<i>EPHX2</i>	Down	0.48	<i>GPX2</i>	Up	2.87
<i>GSTZ1</i>	Down	0.29	<i>GSR</i>	Up	2.30
<i>KRT1</i>	Down	0.16	<i>HMOX1</i>	Up	3.56
<i>LHPP</i>	Down	0.35	<i>NOX5</i>	Up	2.22
<i>MB</i>	Down	0.16	<i>PTGS2</i>	Up	3.97
<i>MPV17</i>	Down	0.35	<i>SOD2</i>	Up	3.85
<i>SEPP1</i>	Down	0.49	<i>SPINK1</i>	Up	2.34
<i>TRAPPC6A</i>	Down	0.23			

CCL5: C-C motif chemokine ligand 5; *CYGB*: Cytoglobin; *EPHX2*: Epoxide hydrolase 2; *GSTZ1*: Glutathione S-transferase zeta 1; *KRT1*: Keratin 1; *LHPP*: Phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase; *MB*: Myoglobin; *MPV17*: Mitochondrial inner membrane protein MpV17; *SEPP1*: Selenoprotein P; *TRAPPC6A*: Trafficking protein particle complex 6A; *AKR1C2*: Aldo-keto reductase family 1 member C2; *GCLM*: Glutamate-cysteine ligase modifier subunit; *GPX2*: Glutathione peroxidase 2; *GSR*: Glutathione-disulfide reductase; *HMOX1*: Heme oxygenase 1; *NOX5*: NADPH oxidase 5; *PTGS2*: Prostaglandin-endoperoxide synthase 2; *SOD2*: Superoxide dismutase 2; *SPINK1*: Serine peptidase inhibitor Kazal type 1

根据基因表达情况并参考既往研究选择部分基因进行 qRT-PCR 验证, 所选 3 个基因涉及超氧化物歧化酶家族 (*SOD2*)、谷胱甘肽转移酶家族

(*GSTZ1*)、醛酮还原酶家族 (*AKR1C2*)，结果见表 2，qRT-PCR 结果与芯片筛查结果一致。

表 2 qRT-PCR 验证 3 个基因的结果

Tab 2 Expression of three selected genes after ozone exposure by qRT-PCR

Gene	Primer (5'-3')	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (ozone exposure group)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (control group)	Relative expression	Expression
<i>SOD2</i>	Forward: CTGGACAAACCTCAGCCCTAAC	8.25×10^{-2}	9.06×10^{-3}	9.1	Up
	Reverse: CTTATTGAAACCAAGCCAACCC				
<i>AKR1C2</i>	Forward: TGTCCTGGGATTGGCACC	1.97×10^{-3}	8.87×10^{-5}	22.1	Up
	Reverse: AACCTGCTCCTCATTATTGTAACAT				
<i>GSTZ1</i>	Forward: CCCAGAACGCCATCACTTGT	4.08×10^{-4}	2.04×10^{-3}	0.2	Down
	Reverse: CCACCTTGAATCTTTTCAGCAATT				

qRT-PCR: Quantitative real-time polymerase chain reaction; *SOD2*: Superoxide dismutase 2; *AKR1C2*: Aldo-keto reductase family 1, member C2; *GSTZ1*: Glutathione transferase zeta 1

3 讨论

鼻黏膜血供丰富、表面积大,是人体对抗病毒、细菌入侵呼吸系统的第一道屏障,也是臭氧暴露的靶器官,目前臭氧暴露引发上呼吸道慢性炎症的相关机制尚不清楚^[16]。

本研究用PCR芯片筛查臭氧暴露后鼻黏膜上皮细胞84个氧化应激通路相关基因表达变化,共发现9个基因表达升高、10个基因表达下降,涉及过氧化酶、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽还原酶等,这些基因调控Cox2表达并参与胃肠、胰腺、肺等器官炎症和肿瘤发生。既往研究证实,Cox2广泛表达于CRS患者鼻甲黏膜的上皮细胞和炎症细胞的胞质和胞核中^[17],是调控阿司匹林不耐受的CRS患者对臭氧暴露易感的重要因子^[15]。本实验中臭氧暴露后人鼻黏膜上皮细胞中Cox2表达和ROS生成升高,提示它们可能参与调控鼻黏膜Cox2表达相关通路,在维持鼻腔氧化还原平衡、调控鼻腔慢性炎症中发挥作用。

超氧化物歧化酶是常见的抗氧化金属酶,通过将超氧离子自由基转化为氧及过氧化氢发挥抗氧化作用。超氧化物歧化酶通过抑制ROS介导的转录因子NF- κ B及AP-1激活,抑制鼻黏膜分泌IL-6、IL-8等炎症因子,阻止真菌诱导CRS的发生^[18],并在缓解气道免疫反应、降低呼吸道高反应性中发挥重要作用^[9,18-19]。本研究提示SOD2可能参与了鼻黏膜Cox2表达的调控。NF- κ B是常见的调控Cox2表达的转录因子,超氧化物歧化酶是否通过NF- κ B抑制Cox2活性实现鼻黏膜上皮细胞抗氧化应激反应还需深入研究。

HMOX1是血红素分解代谢的限速酶,广泛存在于心、脑、肝、肺等组织,一方面可阻止游离血红素参与氧化反应,另一方面与其酶解产物胆红素等共同作用,广泛参与机体抗炎、抗氧化作用^[20]。本研究证实HMOX1能影响Cox2的表达,在鼻黏膜氧化应激中发挥作用,但具体机制尚不明确。有研究指出,转染HMOX1能通过调控Cox2提高胰岛细胞的抗氧化应激能力^[21]。已有证实HMOX1抗氧化作用是由Nrf2介导的^[22],推测HMOX1可能通过Nrf2相关通路调控鼻黏膜上皮细胞中Cox2的表达,在鼻黏膜臭氧暴露后的抗氧化应激反应中发挥作用。

GPX2是硒蛋白家族成员,其活化位点上含硒半胱氨酸,通过减少氢过氧化物生成调节细胞内外的氧化还原反应,抑制炎症发生。离体及在体实验均证实,GPX2敲除后细胞及组织炎症因子TNF- α 、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、PGE2及Cox2的表达升高,脂氧化物增多,增加GPX2则增强组织及细胞抗氧化能力,抑制结肠环氧化酶和脂氧化酶代谢,阻止结肠炎症和肿瘤发生^[23-24]。本研究结果也提示,GPX2相关通路参与了鼻黏膜氧化应激调控。研究证实,GPX2通过NF- κ B通路抑制Cox2活性进而实现抗氧化和炎症抑制,在抑制结肠炎症和肿瘤发生中发挥作用^[23-24],这一通路是否也参与调控鼻黏膜上皮细胞中Cox2的表达尚需进一步研究。

GSTZ1是谷胱甘肽结合反应的关键酶,根据底物不同分为不同系列,可催化羟基、芳基、芳羟基、烯基和氧基等的转移反应,在生物转化第一相反应中发挥解毒作用。同时GSTZ1也是一种重要的抗氧化应激因子,在调节脂多糖介导的炎症反应、抗衰老及肿瘤发生中均发挥作用^[25-27]。在肝癌的相关研究中还发现,GSTZ1缺乏会导致谷胱甘肽消耗,破坏机体氧化-抗氧化平衡,促使ROS作为信号分子激活Nrf2调控的抗氧化应激通路,增强肝癌细胞分化能力,对抗凋亡、诱导肝癌发生^[28]。GSTZ1还参与呼吸道药物代谢和解毒,缓解吸烟对慢性阻塞性肺病的影响^[29],并通过甲基化调控视网膜氧化应激反应,是糖尿病视网膜病发生的重要机制^[30]。GSTZ1在鼻黏膜炎症反应中的作用未见报道。本研究显示臭氧暴露后鼻黏膜上皮细胞GSTZ1表达下降、Cox2表达增加,提示鼻黏膜可能存在GSTZ1调控的Cox2通路,与鼻黏膜氧化应激反应调控有关。GSTZ1缺乏引起Nrf2/NF- κ B通路持续激活是否为鼻黏膜上皮细胞Cox2表达升高的原因有待进一步研究。

NOX5是NADPH氧化酶家族成员,在所有胚胎组织中均有表达,是维持机体氧化还原稳态的重要因子。NOX5通过NF- κ B调控Cox2表达参与氧化应激反应,已在酸诱导食管慢性炎症模型中得到证实^[31]。该研究发现酸刺激诱发ROS产生,引起人Battett细胞NOX5过量表达,并促进Cox2合

成大量 PGE₂, 用小干扰 RNA 抑制 p50 活性能抑制食管 Cox2 和 PGE₂ 表达。本研究也发现, 臭氧暴露后 NOX5、ROS 及 Cox2 表达同步升高, 提示 NOX5 调控 Cox2 表达是鼻黏膜上皮氧化应激的重要途径。鼻黏膜发生氧化应激反应时 NOX5 是否也通过 NF- κ B 通路调控 Cox2 表达还需要进一步深入研究。此外, NOX5 还可诱导中性粒细胞和巨噬细胞产生 ROS, 作为信号活性产物直接参与细胞分化、增殖、凋亡的调节^[32]。推测臭氧暴露后鼻黏膜上皮应对氧化应激反应形式多样, 其中 NOX5 通过 Cox2 间接调控炎症因子表达和作为第二信使直接参与细胞凋亡调控是其中 2 种重要方式。

本研究还发现了其他参与鼻黏膜上皮氧化应激的相关基因, 如 *GCLM*、*PTGS2*、*EPH2* 等。*GCLM* 可通过 Nrf2 参与炎症反应调控; *PTGS2* 是花生四烯酸合成 PGE₂ 的限速酶, 可能直接参与氧化应激反应介导炎症发生、发展; *EPHX2* 是编码细胞可溶性环氧化物水解酶的基因, 在炎症、心血管病等多种疾病中发挥作用, 可能也参与了人鼻黏膜上皮细胞氧化应激反应^[33]。

本研究成功建立了体外培养人鼻黏膜上皮细胞 RPMI2650 臭氧暴露模型。通过 PCR 芯片检测筛查了臭氧暴露后鼻黏膜相关基因表达变化。结果显示多个基因参与了人鼻黏膜上皮细胞的氧化应激调控, 推测这些基因主要通过 Cox2 相关通路调节炎症反应的发生、发展。这些通路相互间如何调节, 尤其是如何对 Cox2 调控, 可能是明确臭氧引发 CRS 相关机制的关键, 有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] ALT J A, LEE W Y, DAVIS B M, SAVAGE J R, KENNEDY T P, PRESTWICH G D, et al. A synthetic glycosaminoglycan reduces sinonasal inflammation in a murine model of chronic rhinosinusitis[J/OL]. PLoS One, 2018, 13: e0204709. doi: 10.1371/journal.pone.0204709.
- [2] KUCUKSEZER U C, OZDEMIR C, AKDIS M, AKDIS C A. Chronic rhinosinusitis: pathogenesis, therapy options, and more[J]. Expert Opin Pharmacother, 2018, 19: 1805-1815.
- [3] 徐怡珊, 文小明, 苗国斌, 王晓玲, 王鸳鸯. 臭氧污染及防治对策[J]. 中国环保产业, 2018(6): 35-38.
- [4] FLAYER C H, LARSON E D, JOSEPH A, KAO S, QU W, VAN HAREN A, et al. Ozone-induced enhancement of airway hyperreactivity in rhesus macaques: effects of antioxidant treatment[J]. J Allergy Clin Immunol, 2020, 145: 312-323.
- [5] YANG Q, GE M Q, KOKALARI B, REDAI I G, WANG X, KEMENY D M, et al. Group 2 innate lymphoid cells mediate ozone-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in mice[J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 137: 571-578.
- [6] ONG C B, KUMAGAI K, BROOKS P T, BRANDENBERGER C, LEWANDOWSKI R P, JACKSON-HUMBLES D N, et al. Ozone-induced type 2 immunity in nasal airways. Development and lymphoid cell dependence in mice[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2016, 54: 331-340.
- [7] HUBBELL B J, HALLBERG A, MCCUBBIN D R, POST E. Health-related benefits of attaining the 8-hr ozone standard[J]. Environ Health Perspect, 2005, 113: 73-82.
- [8] TOPAL O, KULAKSIZOGLU S, ERBEK S S. Oxidative stress and nasal polyposis: does it affect the severity of the disease?[J/OL]. Am J Rhinol Allergy, 2014, 28: e1-e4. doi: 10.2500/ajra.2014.28.3963.
- [9] KIRKHAM P, RAHMAN I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy[J]. Pharmacol Ther, 2006, 111: 476-494.
- [10] BOZKUS F, SAN I, ULAS T, IYNEN I, YESILOVA Y, GULER Y, et al. Evaluation of total oxidative stress parameters in patients with nasal polyps[J]. Acta Otorhinolaryngol Ital, 2013, 33: 248-253.
- [11] JIA M, CHEN X, LIU J, CHEN J. PTEN promotes apoptosis of H₂O₂-injured rat nasal epithelial cells through PI3K/Akt and other pathways[J]. Mol Med Rep, 2018, 17: 571-579.
- [12] GOSEPATH J, SCHAEFER D, BROMMER C, KLIMEK L, AMEDEE R G, MANN W J. Subacute effects of ozone exposure on cultivated human respiratory mucosa[J]. Am J Rhinol, 2000, 14: 411-418.
- [13] FORDHAM M T, MULLIGAN J K, CASEY S E, MULLIGAN R M, WANG E W, SANSONI E R, et al. Reactive oxygen species in chronic rhinosinusitis and secondhand smoke exposure[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2013, 149: 633-638.
- [14] FRUTH K, ZHU C, SCHRAMEK E, ANGERMAIR J, KASSEM W, HAXEL B R, et al. Vascular endothelial growth factor expression in nasal polyps of aspirin-intolerant patients[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2012, 138: 286-293.
- [15] ZHU C J, FRUTH K, SCHNEIDER A, MANN W J, BRIEGER J. Impact of ozone exposure on prostaglandin release in nasal polyps[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2012, 269: 1623-1628.
- [16] PARK M, LEE J S, PARK M K. The effects of air

- pollutants on the prevalence of common ear, nose, and throat diseases in South Korea: a national population-based study[J]. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 2019, 12: 294-300.
- [17] 王振霖,李源,杨秀海,张革化,李鹏,叶进,等.慢性鼻-鼻窦炎中鼻甲黏膜环氧合酶2与上游丝裂原激活蛋白激酶及核因子 κ B信号通路相关性探讨[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2007, 6: 447-451.
- [18] LAWRENCE L A, MULLIGAN J K, ROACH C, PASQUINI W N, SOLER Z M, BANGLAWALA S M, et al. Superoxide dismutase reduces the inflammatory response to *Aspergillus* and *Alternaria* in human sinonasal epithelial cells derived from patients with chronic rhinosinusitis[J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2015, 29: 89-93.
- [19] CHANG L Y, CRAPO J D. Inhibition of airway inflammation and hyperreactivity by an antioxidant mimetic[J]. *Free Radic Biol Med*, 2002, 33: 379-386.
- [20] 李航,段惠军. Nrf2 /ARE 信号通路及其调控的抗氧化蛋白[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27: 300-303.
- [21] YEOM H J, RO H, PARK S J, HONG J H, CHO B, KIM H, et al. Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer to neonatal porcine islet-like cluster cells: the effects on gene expression and protection from cell stress[J]. *Biochip J*, 2012, 6: 56-64.
- [22] LOBODA A, DAMULEWICZ M, PYZA E, JOZKOWICZ A, DULAK J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73: 3221-3247.
- [23] BANNING A, FLORIAN S, DEUBEL S, THALMANN S, MULLER-SCHMEHL K, JACOBASCH G, et al. GPx2 counteracts PGE2 production by dampening COX-2 and mPGES-1 expression in human colon cancer cells[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10: 1491-1500.
- [24] KOEBERLE S C, GOLLOWITZER A, LAOUKILI J, KRANENBURG O, WERZ O, KOEBERLE A, et al. Distinct and overlapping functions of glutathione peroxidases 1 and 2 in limiting NF-kappaB-driven inflammation through redox-active mechanisms[J/OL]. *Redox Biol*, 2020, 28: 101388. doi: 10.1016/j.redox.2019.101388.
- [25] DI CIANNI F, CAMPA D, TALLARO F, RIZZATO C, DE RANGO F, BARALE R, et al. MAP3K7 and GSTZ1 are associated with human longevity: a two-stage case-control study using a multilocus genotyping[J]. *Age (Dordr)*, 2013, 35: 1357-1366.
- [26] PEDRO N F, BISELLI J M, MANIGLIA J V, SANTINETO D, PAVARINO E C, GOLONI-BERTOLLO E M, et al. Candidate biomarkers for oral squamous cell carcinoma: differential expression of oxidative stress-related genes[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19: 1343-1349.
- [27] MA J W, JI D D, LI Q Q, ZHANG T, LUO L. Inhibition of connexin 43 attenuates oxidative stress and apoptosis in human umbilical vein endothelial cells[J/OL]. *BMC Pulm Med*, 2020, 20: 19. doi: 10.1186/s12890-019-1036-y.
- [28] LI J, WANG Q, YANG Y, LEI C, YANG F, LIANG L, et al. GSTZ1 deficiency promotes hepatocellular carcinoma proliferation via activation of the KEAP1/NRF2 pathway[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38: 438. doi: 10.1186/s13046-019-1459-6.
- [29] BERG T, HEGELUND MYRBÄCK T, OLSSON M, SEIDEGÅRD J, WERKSTRÖM V, ZHOU X H, et al. Gene expression analysis of membrane transporters and drug-metabolizing enzymes in the lung of healthy and COPD subjects[J/OL]. *Pharmacol Res Perspect*, 2014, 2: e00054. doi: 10.1002/prp2.54.
- [30] XIE M Y, YANG Y, LIU P, LUO Y, TANG S B. 5-aza-2'-deoxycytidine in the regulation of antioxidant enzymes in retinal endothelial cells and rat diabetic retina[J]. *Int J Ophthalmol*, 2019, 12: 1-7.
- [31] SI J, FU X, BEHAR J, WANDS J, BEER D G, SOUZA R F, et al. NADPH oxidase NOX5-S mediates acid-induced cyclooxygenase-2 expression via activation of NF-kappaB in Barrett's esophageal adenocarcinoma cells[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 16244-16255.
- [32] 冷丽丽,唐圣松. NADPH氧化酶NOX家族的组织分布及生理功能[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2008, 28: 19-23.
- [33] 陈小林,杨兴彪,胡基埂,高粱. 环氧化物水解酶与人类疾病的关系[J]. *生命的化学*, 2014, 34: 660-666.

[本文编辑] 尹 茶