研究报告

Sestrin2 在吸烟诱导的肺泡Ⅱ型上皮细胞损伤中的作用机制

姜晓亮,刘　雪,刘云鹏,付　慧,刘　星,杨志伟*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,北京　100021)

【摘要】 **目的**　探索 Sestrin2 在吸烟诱导的肺泡Ⅱ型上皮细胞损伤中的作用机制。**方法**　使用香烟烟雾提取物(CSE)处理人肺泡Ⅱ型上皮细胞复制吸烟诱导的肺泡上皮细胞损伤。使用 DCFDA 荧光探针检测 ROS 的生成,ELISA 方法检测炎症因子 TNF-α 和 IL-8 的水平,免疫印迹方法检测 Sestrin2 的表达以及过氧化物酶(Prx-$SO_{2/3}$H)的氧化情况。同时检测 Sestrin2 siRNA 以及阿奇霉素处理后细胞中 Sestrin2 和 Prx-$SO_{2/3}$H 的表达以及 ROS 的生成和炎症因子的分泌。**结果**　CSE 处理 A549 细胞后 Sestrin2 的表达降低,Prx-$SO_{2/3}$H 的表达增加,ROS 的产量升高,TNF-α 和 IL-8 的分泌增多,阿奇霉素能够显著缓解 CSE 诱导的氧化应激及炎症损伤($P < 0.05$)。A549 细胞经 Sestrin2 siRNA 沉默后,超氧化的 Prx-$SO_{2/3}$H 表达增多,ROS 的产量升高,TNF-α 和 IL-8 的分泌增多,但额外给予阿奇霉素不能缓解细胞的氧化应激及炎症损伤。**结论**　Sestrin2 通过抑制细胞内 ROS 的生成在吸烟诱导的肺泡Ⅱ型上皮细胞损伤中发挥重要的保护作用,其机制与 Sestrin2 催化还原超氧化的过氧化物酶有关。

【关键词】 肺泡上皮细胞损伤;慢性阻塞性肺疾病;香烟烟雾;Sestrin2;活性氧

【中图分类号】R-33　　【文献标识码】A　　【文章编号】1671-7856(2018) 05-0046-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.05.009

Protective effect and mechanism of Sestrin2 in the development of pulmonary alveolar type II epithelial cell injury induced by cigarette smoking

JIANG Xiaoliang, LIU Xue, LIU Yunpeng, FU Hui, LIU Xing, YANG Zhiwei*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS);
Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China)

【**Abstract**】 **Objective**　To explore the role of Sestrin2 in pulmonary alveolar type II epithelial cell injury induced by cigarette smoking and its mechanism of action. **Methods**　The cell injury model was induced by cigarette smoke extract (CSE) in the human pulmonary alveolar type II epithelial A549 cells. The generation of ROS was detected by DCFDA fluorescence probe. The levels of inflammatory factors TNF-α and IL-8 were determined by ELISA, and the expression of Sestrin2 and the peroxiredoxin, Prx-$SO_{2/3}$H, was detected by Western blot. In addition, all the events were also measured in the A549 cells which were transfected with Sestrin2 siRNA and treated with azithromycin. **Results**　After the CSE treatment, the expression of Sestrin2 in the A549 cells was decreased, the expression of Prx-$SO_{2/3}$H was increased, the ROS production, secretion of cytokines TNF-α and IL-8 were increased ($P < 0.05$). These changes were partly reduced

[基金项目]国家自然科学基金面上项目(编号:81600387);国家自然科学基金青年项目(编号:81600334);中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目(编号:2016-I2M-1-016);生命科学学会联合体"青年人才托举工程"。

[作者简介]姜晓亮(1987—),女,博士研究生,研究方向:高血压发病机制。E-mail: rinoa2007@126.com

[通信作者]杨志伟(1969—),男,研究员,博士,研究方向:心脑血管疾病发病机制。E-mail: yangzhiwei@cnilas.pumc.edu.cn

by azithromycin, indicating that azithromycin significantly relieved CSE-induced oxidative stress and inflammatory injury. Silencing of Sestrin2 in the A549 cells result ed in an increase of Prx-$SO_{2/3}$H expression, ROS production and the secretion of the cytokines TNF-α and IL-8. However, oxidative stress and inflammatory injury were not alleviated with the addition of azithromycin in the Sestrin2 siRNA silencing A549 cells. **Conclusions** Sestrin2 plays an protective role in the pulmonary alveolar type II epithelial cell injury induced by cigarette smoking through negatively regulating the level of intracellular ROS via catalyzing the reduction of the hyperoxidized peroxiredoxin Prx-$SO_{2/3}$H.

【**Key words**】 pulmonary alveolar epithelial cell injury; chronic obstructive pulmonary disease, COPD; cigarette smoke; Sestrin2; reactive oxygen species, ROS

吸烟是严重危害公共健康的重大问题,也是导致支气管肺癌和慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)等疾病发展的重要病因之一[1]。香烟烟雾(cigarette smoke, CS)含有多种复杂的化学物质,包括大量的自由基以及高浓度的氧化剂[2]。香烟烟雾中自由基的吸入可导致氧化应激反应,直接损伤肺泡上皮细胞,是诱发肺损伤的第一步[3]。肺泡 II 型上皮细胞(alveolar type II epithelial cells, AT-II)是肺泡上皮的干细胞[4],它的损伤参与了多种慢性气道疾病的发展,导致不良预后的发生[5-6]。因此,保护 AT-II 细胞免受香烟烟雾的伤害,在多种与吸烟相关肺病的治疗中有重要意义。

Sestrin2 是抗氧化蛋白 Sestrin 家族的重要成员[7],它可缓解糖尿病代谢异常、心血管疾病等导致的氧化应激损伤[8-9],近年来被认为是一种高效的安全生物制剂。Sestrin2 通过抑制过氧化物酶(Prx-$SO_{2/3}$H)的超氧化,降低细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平[10],从而发挥抗氧化作用,可能参与吸烟诱导的 AT-II 细胞损伤的发生发展,然而肺泡上皮细胞受到烟雾刺激损伤时 Sestrin2 的作用机制仍然不是很清楚。因此,该研究以肺泡 II 型上皮细胞为靶细胞,从而对 Sestrin2 在香烟烟雾诱导的 AT-II 细胞损伤中的作用机制进行初步探讨。

1　材料和方法

1.1　实验材料

人 A549 细胞株(肺泡Ⅱ型上皮细胞来源)购自美国培养物保存中心(ATCC, 编号: CRM-CCL-185)。

1.2　主要试剂与仪器

1640 培养基购于 Gibco 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和双抗以及 Lipofectamine TM2000 购自 Invitrogen 公司;Sestrin2 抗体、GAPDH 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司;peroxiredoxin-Cys 和 peroxiredoxin-SO_3 抗体购自 Abcam 公司;Sestrin2 siRNA 和 non-silencing siRNA 购自 Thermo Scientific 公司;2', 7'-二氯荧光素二乙酸酯(2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFDA)购自 Molecular Probes 公司;羰酰氰基对氯苯腙购自 Sigma 公司;山羊抗兔/鼠二抗购自北京中山金桥公司;TNF-α 和 IL-8 检测 ELISA 试剂盒购自上海信帆生物有限公司。电泳仪(北京六一仪器厂, DYY-C);电泳槽(上海天能, VE-180);电转槽(上海天能, VE-186);多功能酶标仪(Multiskan GO);化学发光凝胶成像仪(Tanon-5500);正向显微镜(Leica DM6000 B);低温高速离心机(Beckman)。

1.3　实验方法

1.3.1　细胞培养和实验分组

将 A549 细胞用含 10% FBS 的 1640 培养基,置于 37℃、5% CO_2 的培养箱中培养。取指数生长期细胞接种于相应的培养皿中长至约 70% ~80%,实验前需换无血清的培养基培养 2 ~4 h 然后用于实验。然后将 A549 细胞分为八组:对照组、香烟烟雾提取物(cigarette smoke extract, CSE)处理组(10%, 24 h)、阿奇霉素(azithromycin, AZM)处理组(5 μg/mL, 24 h)、CSE + 阿奇霉素处理组、转染 non-silencing siRNA 组(10 nmol/L, 48 h)、转染 Sestrin2 siRNA 组(10 nmol/L, 48 h)、转染 non-silencing siRNA + 阿奇霉素处理组和转染 Sestrin2 siRNA + 阿奇霉素处理组。

1.3.2　香烟烟雾提取物(CSE)的制备

参照 Carp 等[11]的方法,将两支香烟去掉滤嘴后燃烧,由 50 mL 注射器负压吸引装置(改造)连续匀速抽吸(50 mL/min),该装置将烟雾吸入 10 mL 的 1640 培养基中,香烟在 15 min 内需要燃烧完毕,然后充分摇动使其溶解制成悬液,并用 1 mol/L 氢氧化钠(NaOH)将 pH 调至 7.2 ~7.4,最后用 0.22 μm 孔径的滤器(Millipore, Watford, UK)过滤,除去

细菌和杂质。制备好的 CSE 原液用不含血清的 1640 培养基稀释 10 倍[12],浓度用百分数表示(10%),在 30 min 内用于实验。

1.3.3 A549 细胞 Sestrin2 基因沉默

A549 细胞在 6 孔培养皿中培养 24 h,细胞密度达到每孔 2×10^5 个。按照说明书的步骤,使用 Lipofectamine TM2000 将 Sestrin2 siRNA(10 nmol/L)转入到 A549 细胞中,non-silencing siRNA 作为阴性对照。转染 48 h 后更换新鲜的培养基(含 10% FBS),用免疫印迹法检测细胞中 Sestrin2 的表达。

1.3.4 Western blot 检测蛋白表达

用细胞刮收集各组处理后的细胞,放置到蛋白裂解液中制备总蛋白样本,BCA 法测蛋白浓度并调整一致。每个样本取 30 μg 上样进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,脱脂奶粉常温封闭 1 h,抗体稀释液将不同抗体按比例稀释:抗 Sestrin2(1∶500)、peroxiredoxin-Cys(1∶1000)、peroxiredoxin-SO_3(1∶200)和 GAPDH 一抗,放置于 4℃ 冰箱孵育过夜,再次洗膜,室温下孵育二抗(1∶5000,1 h),洗膜后使用化学发光试剂显色,NC 膜扫描保存并定量分析。

1.3.5 炎症因子水平检测

取实验各组细胞上清液,ELISA 方法检测细胞上清液 TNF-α 和 IL-8 的水平,所有实验操作均严格按照 ELISA 试剂盒使用说明书进行,并设定实验平行组,最终使用酶标仪读数并分析。

1.3.6 细胞内 ROS 水平检测

细胞内 ROS 水平采用 DCFDA 荧光探针进行检测。药物处理的细胞使用无血清的 1640 培养基洗 1 次后,加入 10 μmol/L DCFDA 于 37℃ 孵育 30 min,羰酰氰基对氯苯腙作阳性对照。使用微板阅读器在 485 nm 的激发波长和 530 nm 的发射波长上测量 DCFDA 荧光并计算 ROS 的阳性率。

1.4 统计学方法

统计学分析采用 SPSS 20.0 软件。统计数据的表示采用平均数 ± 标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$),两组比较采用 t 检验,多组间比较采用 one-way ANOVA 分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

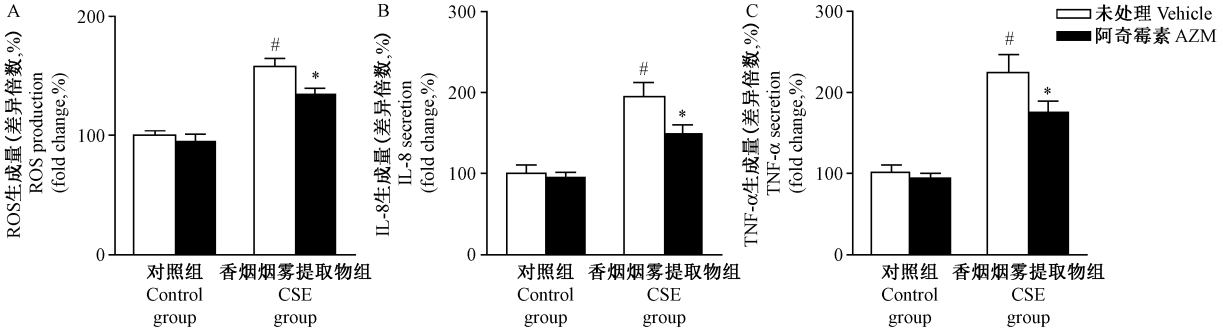
2 结果

2.1 香烟烟雾提取物诱导肺泡上皮细胞发生氧化应激

已有研究证实氧化应激是香烟烟雾的主要致病因子[12],本研究采用香烟烟雾提取物(CSE,10%)处理肺泡上皮细胞 24 h。研究发现 CSE 组细胞 ROS 产量较对照组显著升高($P < 0.05$,图 1A),细胞分泌的 TNF-α 和 IL-8 显著增多($P < 0.05$,图 1B 和 1C)。研究证实在 A549 细胞中,阿奇霉素能够抑制 CSE 诱导的氧化应激损伤[13],因此本研究在 CSE 处理的基础上同时给予阿奇霉素(AZM,5 μg/mL)。如图 1 所示,AZM 能够显著缓解 CSE 诱导的 ROS 产生,细胞分泌的 TNF-α 和 IL-8 等炎症因子较未进行阿奇霉素处理的 CSE 组亦显著减少。

2.2 Sestrin2 在肺泡上皮细胞氧化应激中的作用

图 2A 显示,CSE 处理 A549 细胞后抗氧化蛋白 Sestrin2 的表达较对照组显著降低[(71 ± 7.2)% 比(100 ± 8.7)%,$P < 0.05$],该结果显示 Sestrin2 可能通过其抗氧化作用参与了吸烟诱导的 COPD。为证实 Sestrin2 在 COPD 中的重要作用,本研究给予肺泡上皮细胞 Sestrin2 siRNA(10 nmol/L)处理。48 h 后检测 Sestrin2 蛋白表达显著降低[(50 ± 8.9)%



注:与对照组相比,#$P < 0.05$;与未进行阿奇霉素处理的香烟烟雾提取物组相比,*$P < 0.05$。

图 1 香烟烟雾提取物对肺泡上皮细胞 ROS 和细胞因子的影响

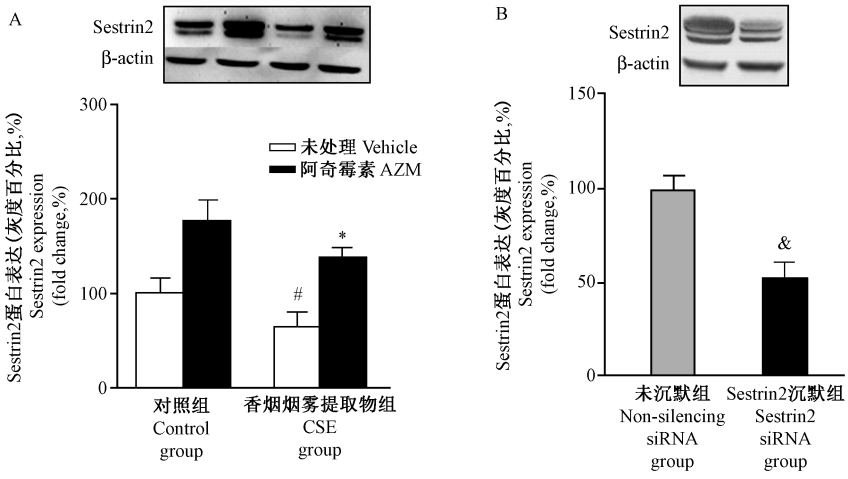
Note. Compared with the control group, #$P < 0.05$. Compared with the CSE group without AZM treatment, *$P < 0.05$.

Fig. 1 Effects of cigarette smoke extract on ROS production and the secretion of cytokines in the pulmonary alveolar epithelial A549 cells

比(100 ± 10)%,图 2B]。Sestrin2 siRNA 沉默组细胞的 ROS 的产量较对照组显著升高($P < 0.05$,图 3A),炎症因子 TNF-α 和 IL-8 的水平显著增加($P < 0.05$,图 3B 和 3C)。但给予 Sestrin2 siRNA 组阿奇霉素,发现升高的 ROS 并没有显著降低,Sestrin2 siRNA 沉默后使得阿奇霉素的抗氧化作用效果减弱。该结果证实了 Sestrin2 在肺泡上皮细胞中重要的抗氧化作用,同时显示阿奇霉素能够直接或者间接通过 Sestrin2 发挥其抗氧化功能。

2.3　Sestrin2 通过抑制 Prx-$SO_{2/3}$ 的超氧化参与肺泡上皮细胞氧化应激的机制

Sestrin2 能够抑制过氧化物酶的超氧化从而抑制 ROS 的产生[10]。过氧化物酶是一种以硫为基础的抗氧化酶,它通过两对半胱氨酸的氧化(Prx-$SO_{2/3}$),导致过氧化物酶活性的失活[14]。为探索肺泡上皮细胞中 Sestrin2 对过氧化物酶的调节作用,本研究检测了 peroxiredoxin-SO_3(Prx-$SO_{2/3}$)和总 peroxiredoxin-Cys(Prx-2Cys)蛋白的表达,计算二者

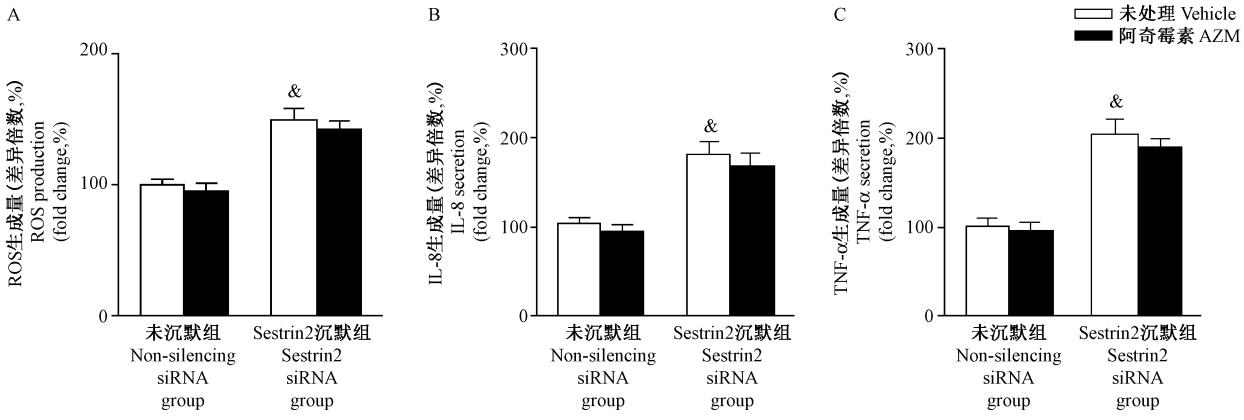


注:与对照组相比,#$P < 0.05$;与未进行阿奇霉素处理的香烟烟雾提取物组相比,*$P < 0.05$;与未沉默组相比,&$P < 0.05$。

图 2　Sestrin2 在肺泡上皮细胞中的表达

Note. Compared with the control group, #$P < 0.05$. Compared with the CSE group without AZM treatment, *$P < 0.05$. Compared with the non-silencing siRNA group, &$P < 0.05$.

Fig. 2　Expression of Sestrin2 in the pulmonary alveolar epithelial A549 cells



注:与未沉默组相比,&$P < 0.05$。

图 3　Sestrin2 siRNA 对肺泡上皮细胞 ROS 和细胞因子的影响

Note. Compared with the non-silencing siRNA group, &$P < 0.05$.

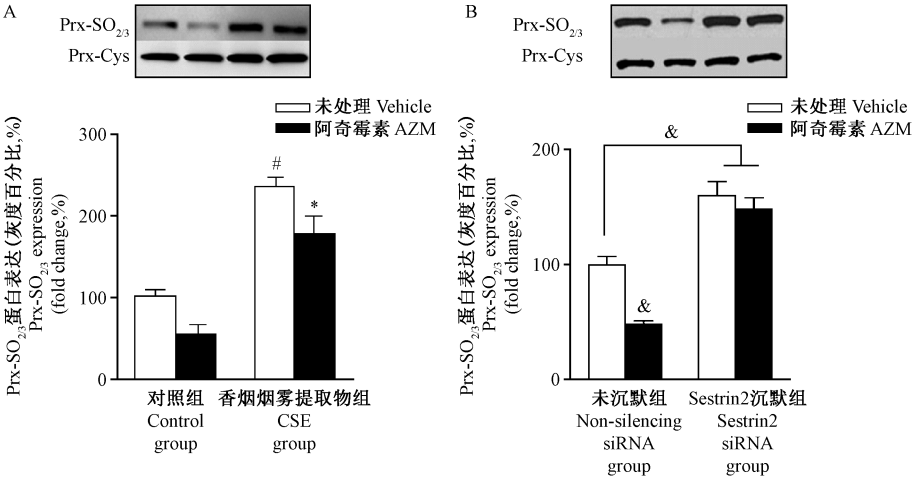
Fig. 3　Effects of Sestrin2 siRNA on ROS production and secretion of cytokines in the pulmonary alveolar epithelial A549 cells

的比率。如图 4 A 所示,CSE 处理 A549 细胞后 Prx-$SO_{2/3}$表达较对照组显著增加[(232 ± 8.1)% 比(100 ± 4.6)%, $P < 0.05$]而总 Prx-2Cys 不变,加入 AZM 能够显著减少 CSE 诱导的 Prx-$SO_{2/3}$超氧化[(171 ± 13)% 比(232 ± 8.1)%, $P < 0.05$]。Sestrin2 siRNA 同样能够诱导 Prx-$SO_{2/3}$ 超氧化[(156 ± 9.1)% 比(100 ± 5.1)%, $P < 0.05$],但 Sestrin2 siRNA 沉默后再给予 AZM 并不能减少 Prx-$SO_{2/3}$ 的超氧化[(148 ± 7.9)% 比(156 ± 9.1)%,图 4B]。证实 A549 细胞中 Sestrin2 通过抑制 Prx-$SO_{2/3}$的超氧化,从而抑制过氧化物酶的失活以及 ROS 产生,可能成为 COPD 抗氧化治疗的重要机制。

3 讨论

吸烟是导致肺内呼吸障碍的主要病因,包括慢性阻塞性肺疾病和特发性肺纤维化[15],其特征是肺泡上皮细胞的不可逆损伤。香烟烟雾(CS)是活性氧的丰富来源,氧化应激损伤是香烟烟雾的主要致病因子[12]。香烟烟雾的化学成分复杂,在本研究中,香烟烟雾提取物(CSE)被用于模拟香烟烟雾。在肺的各种细胞类型中,肺泡上皮细胞是氧化损伤的主要部位之一。与 I 型肺泡细胞(ATI)相比,肺泡Ⅱ型上皮细胞(ATII)在肺内的免疫反应中发挥着重要作用,它可以分泌多种细胞因子和趋化因子对呼吸刺激引起的慢性阻塞性肺疾病等慢性肺病的发展起重要作用[16]。本实验选用的人 A549 细胞系来源于肺泡Ⅱ型上皮细胞,其脂质转运体和补体系统与原代培养的 ATII 细胞具有显著相似性,作为 ATII 细胞生理模型广泛应用[17]。通过给予 A549 细胞香烟烟雾提取物(CSE)干预,本研究发现抗氧化蛋白 Sestrin2 能够抑制过氧化物酶 Prx-$SO_{2/3}$超氧化,从而阻断肺泡细胞内活性氧(ROS)的过度生成并抑制炎症因子分泌增多,可能成为吸烟诱导肺泡 II 型上皮细胞损伤及吸烟相关肺病治疗的新靶点。

Sestrins 蛋白是一类保守的应激诱导型抗氧化蛋白,在氧化应激和 DNA 损伤时表达上调[9]。哺乳动物的 Sestrins 家族成员主要包括:Sestrin1、Sestrin2 和 Sestrin3。Sestrin2 是 Sestrins 家族中的重要成员,它是 p53 的转录调控底物分子[18]。Sestrin2 能通过抑制细胞内 ROS 生成而发挥抗氧化作用,对抗糖尿病代谢异常、心血管疾病等导致的氧化应激损伤,近年来被广泛研究[8-9]。本研究证明在 A549 细胞中 CSE 可诱导 Sestrin2 表达抑制和 ROS 的大量生成,而同时给予阿奇霉素能够有效缓解 ROS 的增多,并且使得 Sestrin2 表达增加。Barnes[19] 在 2013 年提出了香烟烟雾通过氧化应激诱导慢性阻塞性肺疾病的过程。文章指出 ROS 通过激活 NF-κB 和 p38 MAPK,从而导致促炎、炎性细胞因子和趋化因子基因的激活,进而加速肺损伤和慢性阻塞性肺疾病的发展[20]。TNF-α、IL-8 是参与慢性气道性疾病



注:与对照组相比,$^{\#}P < 0.05$;与未进行阿奇霉素处理的香烟烟雾提取物组相比,$^{*}P < 0.05$;与未进行阿奇霉素处理的未沉默组相比,$^{\&}P < 0.05$。

图 4 Prx-$SO_{2/3}$和 Prx-Cys 在肺泡上皮细胞中的表达

Note. Compared with the control group, $^{\#}P < 0.05$. Compare with the CSE group without AZM treatment, $^{*}P < 0.05$. Compared with the non-silencing siRNA group without AZM treatment, $^{\&}P < 0.05$.

Fig. 4 Expression of Prx-$SO_{2/3}$ and Prx-Cys in the pulmonary alveolar epithelial A549 cells

炎症反应的重要促炎因子[21],通过诱发气道、肺实质以及肺部血管的慢性炎症反应最终导致肺结构的破坏。因此本研究也检测了 Sestrin2 对于炎症因子 TNF-α 和 IL-8 水平的影响。发现给予 A549 细胞 Sestrin2 siRNA 之后 ROS 的生成增多,TNF-α 和 IL-8 的水平显著升高,但同时给予阿奇霉素无法降低 ROS 的生成,也不能缓解 TNF-α 和 IL-8 的升高,证实了抗氧化蛋白 Sestrin2 在肺泡 II 型上皮细胞氧化应激损伤以及炎症反应中的重要作用。

研究表明 Sestrin2 可抑制过氧化物酶(Prx-$SO_{2/3}$)的超氧化,清除细胞内的 H_2O_2 从而维持细胞内的氧化还原稳态[22]。为探索 Sestrin2 的作用机制,本研究用 Sestrin2 siRNA 沉默处理 A549 细胞,发现 Sestrin2 siRNA 组细胞中超氧化的 Prx-$SO_{2/3}$增多而总蛋白 Prx-2Cys 表达不变。Yang 等[10]发现在肾脏中 Sestrin2 能够抑制过氧化物酶(Prx-$SO_{2/3}$)的超氧化,并且激活 PON2 信号通路参与了多巴胺 D2 受体诱导的 ROS 生成的阻断。Woo 等[23]也指出抑制 Prx-2Cys 的超氧化和 Sestrin2 对氧化应激的调节作用相似。本研究则证实在肺泡上皮细胞中 Sestrin2 通过抑制下游 Prx-$SO_{2/3}$的超氧化从而参与 ROS 的生成以及减少氧化应激。另外本研究额外给予 Sestrin2 siRNA 组的细胞阿奇霉素处理,发现氧化应激损伤并不能够缓解。该结果再次证实了 Sestrin2 以及下游过氧化物酶在肺泡上皮细胞中的重要作用。Sestrin2 也可通过多种机制参与 ROS 生成的调控,它通过下游信号通路在多种病理生理现象中发挥重要作用。研究发现 Sestrin2 能够激活 AMPK/mTORC1 信号通路从而抑制 ROS 的生成并诱导细胞凋亡,被认为结肠直肠癌的新靶点[24]。在肾小球系膜细胞中 Sestrin2 能够激活 AMPK 通路参与阻断 NOX4 依赖的 ROS 生成[25]。另一项研究发现,选择性降低 Sestrin2 的表达可激活下游 mTORC1-S6K 信号通路,从而导致胰岛素抵抗、葡萄糖耐受不良并出现肥胖等一系列代谢病症[26]。

综上所述,Sestrin2 能够抑制过氧化物酶(Prx-$SO_{2/3}$)的超氧化阻断 ROS 的多度产生,在香烟烟雾诱导的肺泡 II 型上皮细胞损伤中起到重要的保护作用,可能为吸烟相关肺病的防治提供新思路。然而 Sestrin2 还能够通过哪些信号途径和相关机制来抑制香烟诱导的肺泡 II 型上皮细胞损伤目前尚不得知。此外是否有其他抗氧化或抗炎分子在这一过程中协同作用也不明确,还需要进一步探索研究。

参考文献:

[1] Hartman TE, Tazelaar HD, Swensen SJ, et al. Cigarette smoking: CT and pathologic findings of associated pulmonary diseases [J]. RadioGraphics, 1997, 2(17): 377 – 390.

[2] Perfetti TA, Rodgman A. The complexity of tobacco and tobacco smoke [J]. Contrib Tob Res, 2011, 24(11): 215 – 232.

[3] Van Driessche W, Kreindler JL, Malik AB, et al. Interrelations/cross talk between transcellular transport function and paracellular tight junctional properties in lung epithelial and endothelial barriers [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 293(3): L520 – L524.

[4] 朱召浩, 朱嘉羚, 戚薇岩, 等. 肺泡上皮细胞的研究进展 [J]. 药物生物技术, 2017, 24(2): 159 – 162.

[5] 何志义, 冉丕鑫, 钟南山. 氧化/抗氧化失衡与慢性阻塞性肺疾病 [J]. 国外医学呼吸系统分册, 2003, 23(1): 5 – 7.

[6] 张莉, 许建英. 香烟烟雾暴露对大鼠支气管肺泡灌洗液及外周血 4-HNE 和 γ-GCS 表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(2): 43 – 46.

[7] Liu SY, Lee YJ, Lee TC. Association of platelet-derived growth factor receptor β accumulation with increased oxidative stress and cellular injury in sestrin 2 silenced human glioblastoma cells [J]. FEBS Lett, 2011, 585(12): 1853 – 1858.

[8] Morrison A, Chen L, Wang J, et al. Sestrin2 promotes LKB1-mediated AMPK activation in the ischemic heart [J]. FASEB J, 2015, 29(2): 408 – 417.

[9] 胡永亮, 谭启杏, 王红丽, 等. Sestrin2 通过抑制砷化物诱导的氧化应激反应发挥拮抗细胞凋亡的保护性作用 [J]. 生物技术通讯, 2016, 27(3): 314 – 317.

[10] Yang Y, Cuevas S, Yang S, et al. Sestrin2 decreases renal oxidative stress, lowers blood pressure, and mediates dopamine D2 receptor-induced inhibition of reactive oxygen species production [J]. Hypertension, 2014, 64(4): 825 – 832.

[11] Carp H, Janoff A. Possible mechanisms of emphysema in smokers. *In vitro* suppression of serum elastase-inhibitory capacity by fresh cigarette smoke and its prevention by antioxidants [J]. Am Rev Respir Dis, 1978, 118(3): 617 – 621.

[12] Faux SP, Tai T, Thorne D, et al. The role of oxidative stress in the biological responses of lung epithelial cells to cigarette smoke [J]. Biomarkers, 2009, 14(Suppl 1): 90 – 96.

[13] Chen M, Yang T, Meng X, et al. Azithromycin attenuates cigarette smoke extract-induced oxidative stress injury in human alveolar epithelial cells [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(5): 3414 – 3422.

[14] Thamsen M, Kumsta C, Li F, et al. Is overoxidation of peroxiredoxin physiologically significant? [J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 14(4): 725 – 730.

[15] Chen ZH, Kim HP, Sciurba FC, et al. Egr-1 regulates autophagy in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease [J]. PLoS One, 2008, 3(10): e3316.

[16] Olivera D, Knall C, Boggs S, et al. Cytoskeletal modulation and tyrosine phosphorylation of tight junction proteins are associated with mainstream cigarette smoke-induced permeability of airway epithelium [J]. Exp Toxicol Pathol, 2010, 62(5): 133 – 143.

[17] Cooper JR, Abdullatif MB, Burnett EC, et al. Long term culture of the A549 cancer cell line promotes multilamellar body formation and differentiation towards an alveolar type II pneumocyte phenotype [J]. PLoS One, 2016, 11(10): e0164438.

[18] Deng W, Cha J, Yuan J, et al. p53 coordinates decidual sestrin 2/AMPK/mTORC1 signaling to govern parturition timing [J]. J Clin Invest, 2016, 126(8): 2941 – 2954.

[19] Barnes PJ. New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease [J]. Nat Rev Drug Discov, 2013, 12(7): 543 – 559.

[20] 孙得胜, 欧阳瑶, 顾延会, 等. 慢阻肺大鼠肺组织中树突状细胞表面因子的表达变化及 CCL20 抗体的干预作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(3): 11 – 15.

[21] 王立婧, 闫亮. 吸烟对 COPD 患者肺功能及 IL-8 和 TNF-α 的影响 [J]. 医学综述, 2014, 20(24): 4606 – 4607.

[22] Shin BY, Jin SH, Cho IJ, et al. Nrf2-ARE pathway regulates induction of Sestrin-2 expression [J]. Free Radic Biol Med, 2012, 53(4): 834 – 841.

[23] Woo HA, Bae SH, Park S, et al. Sestrin 2 is not a reductase for cysteine sulfinic acid of peroxiredoxins [J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(4): 739 – 745.

[24] Wei JL, Fang M, Fu ZX, et al. Sestrin 2 suppresses cells proliferation through AMPK/mTORC1 pathway activation in colorectal cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(30): 49318 – 49328.

[25] Eid AA, Lee DY, Roman LJ, et al. Sestrin 2 and AMPK connect hyperglycemia to Nox4-dependent endothelial nitric oxide synthase uncoupling and matrix protein expression [J]. Mol Cell Biol, 2013, 33(17): 3439 – 3460.

[26] Lee JH, Budanov AV, Talukdar S, et al. Maintenance of metabolic homeostasis by Sestrin2 and Sestrin3 [J]. Cell Metab, 2012, 16(3): 311 – 321.

〔收稿日期〕2017 – 11 – 14

专家问答

问:基因治疗在医学中的应用?

答:基因治疗是指将外源正常基因导入靶细胞,以纠正或补偿因基因缺陷和异常引起的疾病,以达到治疗目的。基因治疗主要是治疗那些对人类健康威胁严重的疾病,包括:遗传病(如血友病、囊性纤维病、家庭性高胆固醇血症等)、恶性肿瘤、心血管疾病、感染性疾病(如艾滋病、类风湿等)。

基因治疗与常规治疗方法不同:一般意义上疾病的治疗针对的是因基因异常而导致的各种症状,而基因治疗针对的是疾病的根源——异常的基因本身。

基因治疗有两种形式:一是体细胞基因治疗,正在广泛使用;二是生殖细胞基因治疗,因能引起遗传改变而受到限制。

(1)体细胞基因治疗:体细胞基因治疗是指将正常基因转移到体细胞,使之表达基因产物,以达到治疗目的。这种方法的理想措施是将外源正常基因导入靶体细胞内染色体特定基因座位,用健康的基因确切地替换异常的基因,使其发挥治疗作用,同时还须减少随机插入引起新的基因突变的可能性。

(2)生殖细胞基因治疗:理想的方法是将正常基因转移到患者的生殖细胞(精细胞、卵细胞中早期胚胎)使其发育成正常个体。实际上,这种靶细胞的遗传修饰至今尚无实质性进展。基因的这种转移一般只能用显微注射,然而效率不高,并且只适用排卵周期短而次数多的动物,这难适用于人类。就人类而言,多不考虑生殖细胞的基因治疗途径。