

[文章编号] 1000-4718(2008)06-1205-07

腺病毒潜伏感染对大鼠肺泡上皮细胞氧化/抗氧化平衡的影响*

方怡¹, 李冰², 陈娟¹, 刘启才², 冉丕鑫^{1△}(广州医学院¹广州呼吸疾病研究所,²实验医学研究中心,广东 广州 510120)

[摘要] 目的:研究腺病毒潜伏感染对大鼠肺泡上皮细胞氧化/抗氧化平衡的影响。方法:构建稳定表达腺病毒 E1A 蛋白的大鼠肺泡上皮细胞,检测氧化剂刺激时 GSH、MDA 的含量变化和主要抗氧化酶 SOD、CAT、GPx、GST 以及 γ -GCS 酶活性的变化。结果:腺病毒 E1A 蛋白通过抑制大鼠肺泡上皮细胞内 γ -GCS 酶的活性,抑制了氧化应激时 GSH 的合成和 GPx 及 GST 酶的活性;腺病毒 E1A 蛋白下调了细胞在氧化应激后的恢复能力。结论:腺病毒潜伏感染扩大了大鼠肺泡上皮细胞氧化应激时的氧化/抗氧化失衡,而腺病毒 E1A 蛋白抑制 γ -GCS 酶的活性是其中的关键环节。

[关键词] 腺病毒潜伏感染; E1A; 大鼠; 肺泡上皮细胞; 肺疾病,阻塞性

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Adenovirus latent infection enhances the oxidant/antioxidant imbalance in rat alveolar epithelial cells

FANG Yi¹, LI Bing², CHEN Juan¹, LIU Qi - cai², RAN Pi - xin¹

(¹Guangzhou Institute of Respiratory Disease, ²The Experimental Medical Research Center, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510120, China. E-mail:pxran@gzhmc.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To observe the influence of adenovirus latent infection on the oxidant/antioxidant balance in rat alveolar epithelial cells. **METHODS:** The rat alveolar epithelial cells were stably transfected with the plasmid pE1Aneo and control plasmid pneo. GSH and MDA contents, the activities of major anti-oxidative enzymes including SOD, CAT, GPx, GST and γ -GCS were detected in oxidant stress. **RESULTS:** Adenovirus E1A expression repressed the activity of γ -GCS, and decreased GSH contents in oxidant stress. As a result, the activity of GPx and GST was decreased. The contents of MDA maintained high in oxidant stress. **CONCLUSION:** Adenovirus latent infection amplifies the oxidant/antioxidant imbalance in rat alveolar epithelial cells in oxidants stress, and adenovirus E1A protein decreases the activity of γ -GCS, which plays an important role in this process.

[KEY WORDS] Adenovirus latent infection; E1A; Rats; Alveolar epithelial cells; Lung diseases, obstructive

儿童时期下呼吸道感染是成年后发生慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)的危险因素^[1]。我们最近的流行病学研究结果进一步证实儿童时期呼吸疾病史与 COPD 患病有关^[2]。腺病毒是儿童时期下呼吸道感染的主要病原体之一,主要是腺病毒 C 属 5 型。其感染的特点是在急性感染痊愈后可在肺内形成潜伏感染,即长期表达病毒早期转录蛋白 E1A 但不出现病毒复制^[3]。E1A 基因具有自身的启动子和增强子,感染时最早转录,在腺病毒潜伏感染中起主导作用^[4]。已有流行病学研究证实 E1A 蛋白表达与 COPD 病情相

关^[5],动物实验表明腺病毒潜伏感染可以放大吸烟所致的肺部炎症和促进 COPD 的发生^[6];E1A 蛋白可以放大大鼠肺泡上皮细胞(A549 细胞)的炎性因子的表达^[7],还可能参与气道重塑^[8],并可能通过抑制铁蛋白的表达参与氧化/抗氧化损伤的早期过程^[9]。但是,有关 E1A 促进氧化应激状态下肺内炎症过程的准确机制仍然不甚清楚。本研究将通过系统分析 E1A 蛋白对肺组织细胞内主要抗氧化酶类的影响,进一步明确腺病毒潜伏感染在 COPD 发病中的地位,为 COPD 的防治提供新的思路。

[收稿日期] 2007-01-09 [修回日期] 2007-09-13

* [基金项目] 广东省自然科学基金团队资助项目(No. 05200239)

△ 通讯作者 pxran@gzhmc.edu.cn

材 料 和 方 法

1 材料

大鼠肺泡上皮 L2 细胞(来源于大鼠 II 型肺泡上皮细胞), 货号为 CCL-149, 购自 ATCC。E1A 单克隆抗体购自 Neomarker 公司(M58), 四甲基偶氮唑蓝[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 试剂盒购自罗氏公司, 谷胱甘肽(glutathione, GSH)检测试剂盒购自 Dojindo 公司, 丙二醛(maleic dialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)、谷胱甘肽 S 转移酶(glutathione S-transferase, GST)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所, RT-PCR 试剂购自 Invitrogen 公司, Western blotting 试剂购自 Bio-Rad 公司, 免疫组织化学试剂盒购自 Lab Vision 公司, 其余所用化学试剂均购自 Sigma 公司。

2 方法

2.1 稳定转染腺病毒 E1A 基因的大鼠肺泡上皮细胞株的构建 pE1Aneo 质粒由加拿大 McMaster 大学 Graham 教授馈赠。将 pE1Aneo 质粒经 *Sac* I 和 *Bam*HI 双酶切, 余下的质粒片段重新连接, 构建对照质粒。脂质体转染的方法将 2 种质粒分别转染于 CCL-149 细胞, 进行 G418 筛选, 筛选浓度为 300 mg/L, 筛选时间为 10 d, 有限稀释法筛选单克隆细胞, 得到 3 株 E1A 蛋白表达阳性细胞和 4 株对照细胞, 简称 E1A⁺ 和 E1A⁻ 细胞, 均以 G418 150 mg/L 维持培养。

2.2 稳定转染腺病毒 E1A 基因的大鼠肺泡上皮细胞株的鉴定

①RT-PCR 方法鉴定细胞株的 E1A 基因 mRNA 表达 用 Trizol 提取细胞总 RNA, 反转录合成 cDNA, 再进行 PCR 反应。E1A 基因的引物序列为 5'-TAATGTTGGCGGTGCAGGAAGG-3' 和 5'-TCAGGCTCAGGTTTCAGACACAG-3', 片段大小为 486 bp, PCR 反应条件为 95 °C 变性 2 min, 继续循环程序 95 °C 1 min, 63 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min, 于 4 °C 保存。

②Western blotting 方法鉴定细胞株的 E1A 蛋白表达 实验方法参照文献^[11]。

③免疫组织化学方法鉴定细胞株的 E1A 蛋白表达 实验方法参照试剂盒说明。

2.3 MTT 实验检验 4-HNE 和 H₂O₂ 溶液的细胞毒性, 选择最佳作用浓度 4-羟基壬烯醛(4-hydroxy

-2-nonenal, 4-HNE) 和 H₂O₂ 溶液的浓度为 1 nmol/L-1 mol/L, 各浓度相差 10 倍, 作用时间为 24 h, 按试剂盒说明书进行实验。

2.4 细胞内 GSH、MDA 含量和 SOD、CAT、GPx、GST 酶活性的测定 根据 MTT 实验结果, 选择 4-HNE 1 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L, H₂O₂ 100 μmol/L 作为刺激浓度, 在各浓度作用下, 分别于 0 h、1 h、2 h、4 h、8 h、16 h、24 h 收集细胞, 并在作用 24 h 后, 用 1 × PBS 清洗细胞, 加入完全培养基继续培养 24 h 后收集细胞, 每个浓度每个时点重复 3 次。按试剂盒要求进行检测。

2.5 γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶(gamma-glutamyl-cysteine synthetase, γ-GCS) 酶活性测定 根据 Seelig 等^[12]介绍的方法, 其原理是以 NADH 氧化成 NAD⁺ 的程度代表 γ-GCS 酶活力的高低。0.5 mL 反应体系包括 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、150 mmol/L KCl、20 mmol/L MgCl₂、0.2 mmol/L NADH、5 mmol/L ATP、2 mmol/L Na₂EDTA、10 mmol/L 谷氨酸钠盐、2 mmol/L 磷酸丙酮酸钠盐、10 mmol/L 氨基丁酸、2 U 丙酮酸激酶、10 U 乳酸脱氢酶, 将反应体系置于 37 °C 水浴 10 min。加入样品 100 μL, 对照管加入 0.25 mmol/L BSO, 于 37 °C 孵育 10 min, 340 nm 处测定吸光度(absorbance, A)值。

3 统计学处理

数据处理采用 SPSS12.0 统计软件进行统计分析, 各组间比较采用单因素方差分析, 方差不齐时做秩和检验, 各组数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

结 果

1 稳定表达 E1A 蛋白的大鼠肺泡上皮细胞株的鉴定

1.1 RT-PCR 鉴定 阳性细胞株均扩增出 486 bp 特异片段, 对照细胞无特异片段。3 株 E1A⁺ 细胞 mRNA 表达水平稍有不同(图 1)。

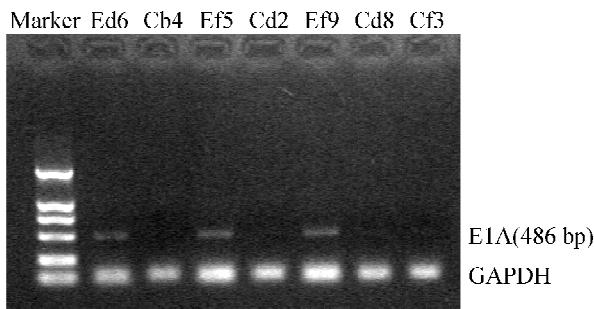


Fig 1 RT-PCR detection in E1A gene stable-transfected and control cells.

图 1 稳定转染细胞株 E1A mRNA RT-PCR 鉴定

1.2 E1A 蛋白表达的鉴定

①Western blotting 检测 阳性细胞株在 45 kD 左右处显示 E1A 蛋白阳性条带,阴性细胞株无阳性条带,3 株 E1A⁺ 细胞蛋白表达水平稍有不同(图 2)。

②免疫组织化学实验 E1A 蛋白定位于细胞核内,结

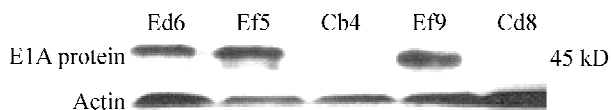


Fig 2 Western blotting detection of E1A protein in E1A gene stable-transfected and control cells.

图 2 稳定转染细胞株 E1A 蛋白表达的 Western blotting 鉴定

果显示阳性细胞株细胞形状稍呈立方改变,细胞核稍增大,染色后细胞核呈棕红色,细胞质呈浅蓝色。对照细胞株生长无明显改变,染色后细胞核呈深蓝色,细胞质呈浅蓝色(图 3),说明 E1A⁺ 细胞 E1A 蛋白表达于细胞并正确定位于细胞核。

2 细胞内 GSH 含量的变化(图 4)

E1A⁺ 细胞内 GSH 基础水平与 E1A⁻ 比较无显著差异,但在 H₂O₂ 和 4-HNE 作用后没有诱导出 GSH 含量的上升,表现出下降而低平的趋势,去除氧化剂的影响后,仍低于正常水平。E1A⁻ 细胞在氧化剂的作用后呈明显的上升趋势,去除氧化剂影响后仍高于基础水平。

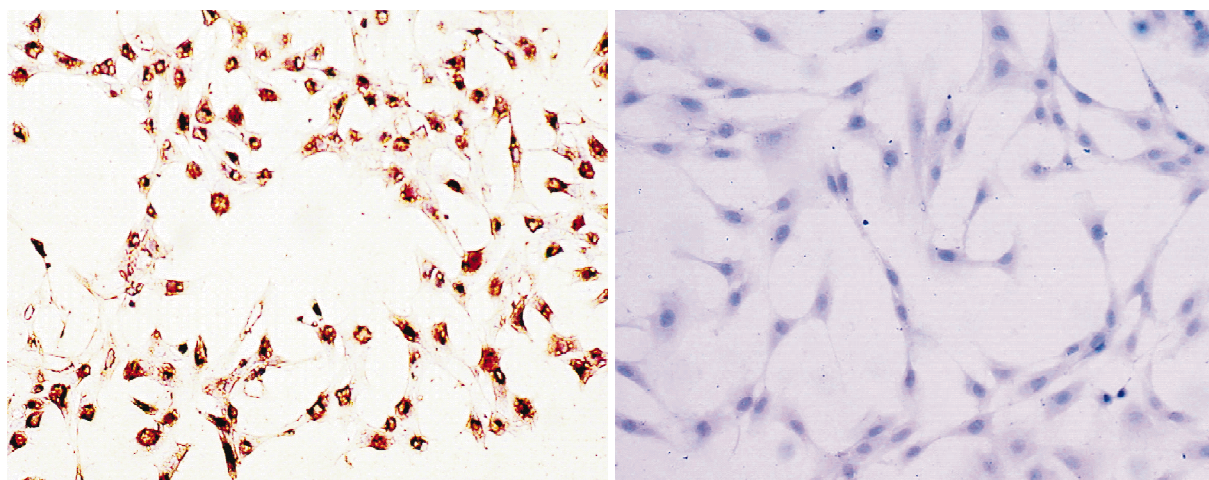


Fig 3 Immunohistochemistry identification in E1A gene stable-transfected and control cells.

图 3 稳定转染细胞株 E1A 蛋白表达的免疫组化鉴定

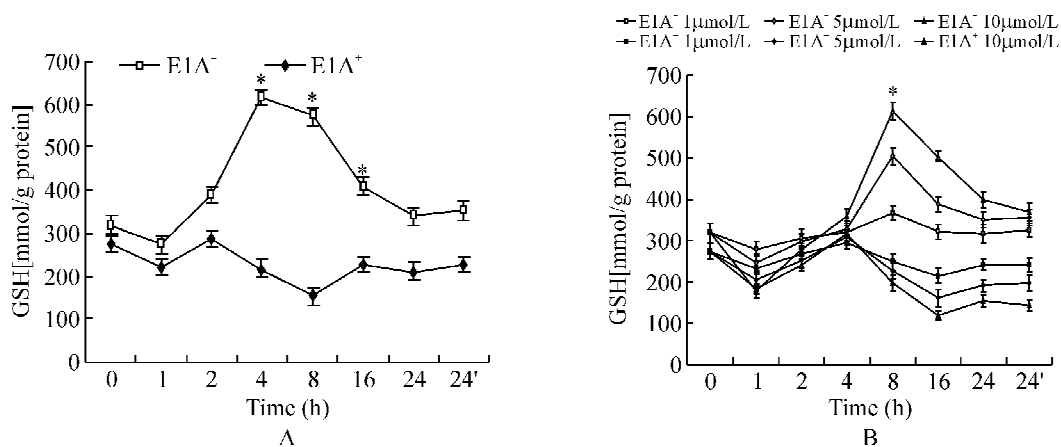


Fig 4 The change of GSH contents in E1A⁺ and E1A⁻ cells influenced by H₂O₂ (100 μmol/L) (A) and 4-HNE (1 μmol/L, 5 μmol/L, 10 μmol/L) (B). $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. *E1A⁺ vs E1A⁻, $P < 0.05$.

图 4 H₂O₂ (100 μmol/L) (A) 和 4-HNE (1 μmol/L, 5 μmol/L, 10 μmol/L) (B) 所致氧化应激时 E1A⁺ 和 E1A⁻ 细胞内 GSH 含量的改变

3 细胞内 MDA 含量的变化(图 5)

H₂O₂ 和 4-HNE 作用后,E1A⁺ 细胞与 E1A⁻ 细胞内 MDA 含量均出现逐渐增高的趋势,但 E1A⁺ 高于 E1A⁻ 细胞,清除氧化剂继续培养 24 h,E1A⁺ 细胞内含量仍维持较高的水平,而 E1A⁻ 细胞已基本恢复基础水平,2 者比较有显著差异。

4 细胞内 SOD 酶活性的变化(图 6)

基础状态时,两种细胞内 SOD 酶活性无显著差异。H₂O₂ 和 4-HNE 作用后,E1A⁺ 细胞与 E1A⁻ 细胞内 SOD 酶活性均出现短暂升高后逐渐下降的趋势,但 E1A⁺ 细胞的升高幅度较 E1A⁻ 细胞低。清除氧化剂的影响后,E1A⁺ 细胞内 SOD 酶活性低于基础

水平,而 E1A⁻ 细胞则明显高于基础水平,2 者比较 差异显著。

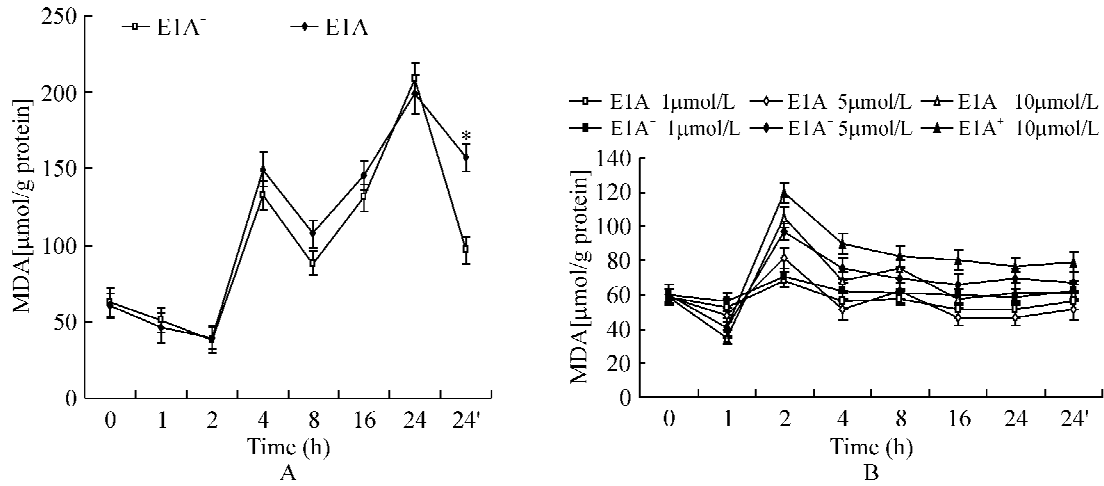


Fig 5 The change of MDA contents in E1A⁺ and E1A⁻ cells influenced by H₂O₂ (100 μmol/L) (A) and 4 - HNE (1 μmol/L, 5 μmol/L, 10 μmol/L) (B). $\bar{x} \pm s$. $n = 3$. * E1A⁺ vs E1A⁻, $P < 0.05$.

图 5 H₂O₂ (100 μmol/L) (A) 和 4 - HNE (1 μmol/L, 5 μmol/L, 10 μmol/L) (B) 所致氧化应激时 E1A⁺ 和 E1A⁻ 细胞内 MDA 含量的改变

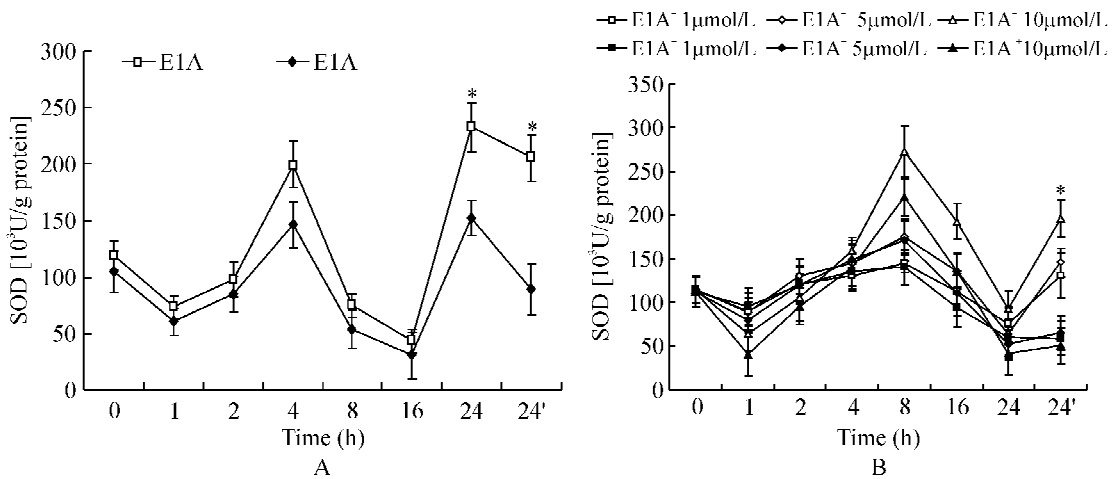


Fig 6 The change of SOD activity in E1A⁺ and E1A⁻ cells influenced by H₂O₂ (100 μmol/L) (A) and 4 - HNE (1 μmol/L, 5 μmol/L, 10 μmol/L) (B). $\bar{x} \pm s$. $n = 3$. * E1A⁺ vs E1A⁻, $P < 0.05$.

图 6 H₂O₂ (100 μmol/L) (A) 和 4 - HNE (1 μmol/L, 5 μmol/L, 10 μmol/L) (B) 所致氧化应激时 E1A⁺ 和 E1A⁻ 细胞内 SOD 活性的改变

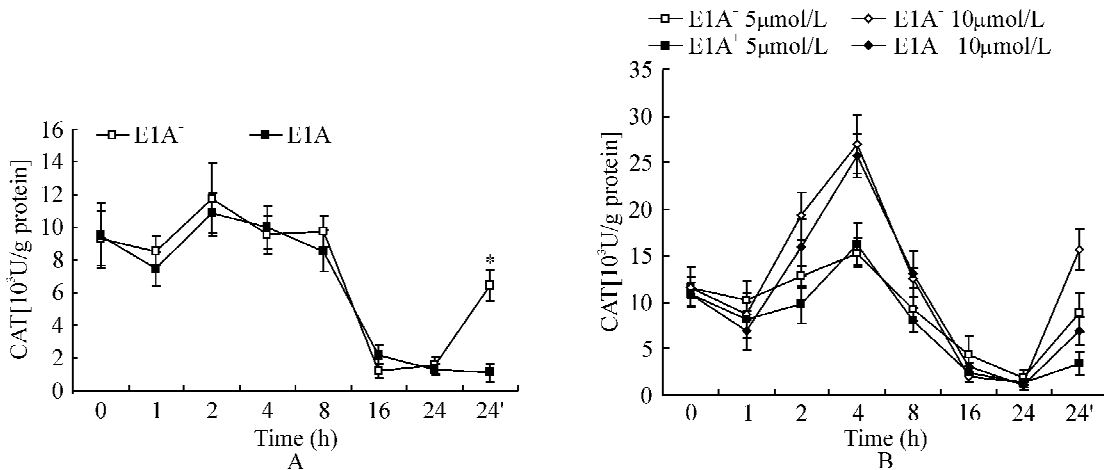


Fig 7 The change of CAT activity in E1A⁺ and E1A⁻ cells influenced by H₂O₂ (100 μmol/L) (A) and 4 - HNE (5 μmol/L, 10 μmol/L) (B). $\bar{x} \pm s$. $n = 3$. * E1A⁺ vs E1A⁻, $P < 0.05$.

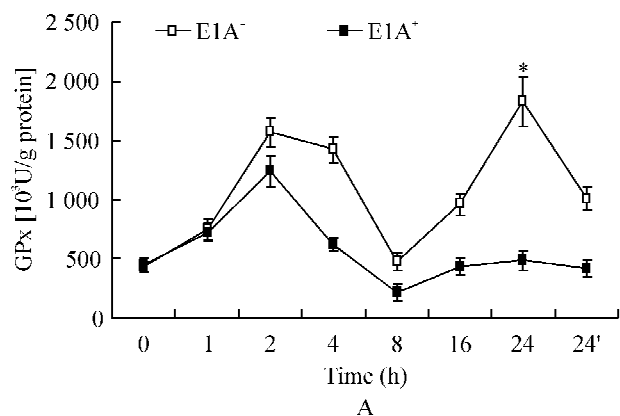
图 7 H₂O₂ (100 μmol/L) (A) 和 4 - HNE (5 μmol/L, 10 μmol/L) (B) 所致氧化应激时 E1A⁺ 和 E1A⁻ 细胞内 CAT 活性的改变

5 细胞内 CAT 酶活性的变化(图 7)

H₂O₂ 和 4-HNE 作用后, E1A⁺ 细胞和 E1A⁻ 细胞内 CAT 酶活性短时间内能保持恒定的状态, 后逐渐降至较低的水平, 去除氧化剂的影响后, E1A⁺ 细胞内 CAT 酶活性仍难以回复基础水平, 而 E1A⁻ 细胞能恢复基础状态, 2 者比较差异显著。

6 细胞内 GPx 酶活性的变化(图 8)

基础状态时, 2 种细胞内酶活性无明显差异。



H₂O₂ 和 4-HNE 作用后, E1A⁺ 细胞内 GPx 酶活性短时间内稍有上升, 后逐渐下降, 处于低平状态, 其上升的幅度显著低于 E1A⁻ 细胞, 去除氧化剂的影响后, E1A⁺ 细胞内酶活性仍难以恢复基础水平。

7 细胞内 GST 酶活性的变化(图 9)

2 者基础水平均较低, H₂O₂ 和 4-HNE 作用后, E1A⁻ 细胞内 GST 酶活性即出现明显的上升趋势, E1A⁺ 细胞的升高程度显著低于 E1A⁻ 细胞。

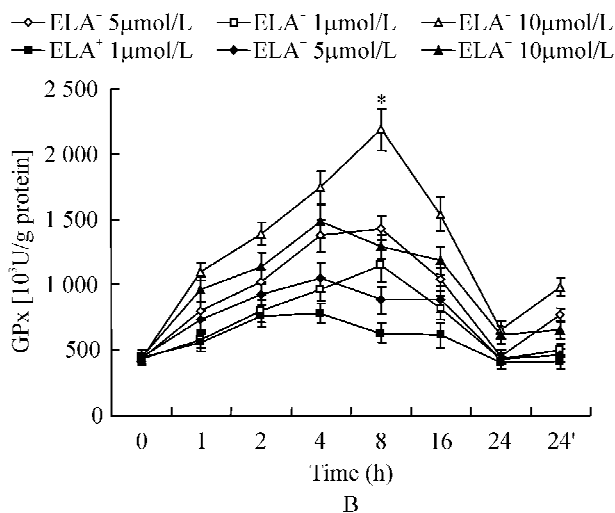


Fig 8 The change of GPx activity in E1A⁺ and E1A⁻ cells influenced by H₂O₂ (100 μmol/L) (A) and 4-HNE (1 μmol/L, 5 μmol/L, 10 μmol/L) (B). $\bar{x} \pm s, n=3$. *E1A⁺ vs E1A⁻, $P < 0.05$.

图 8 H₂O₂ (100 μmol/L) (A) 和 4-HNE (1 μmol/L, 5 μmol/L, 10 μmol/L) (B) 所致氧化应激时 E1A⁺ 和 E1A⁻ 细胞内 GPx 活性的改变

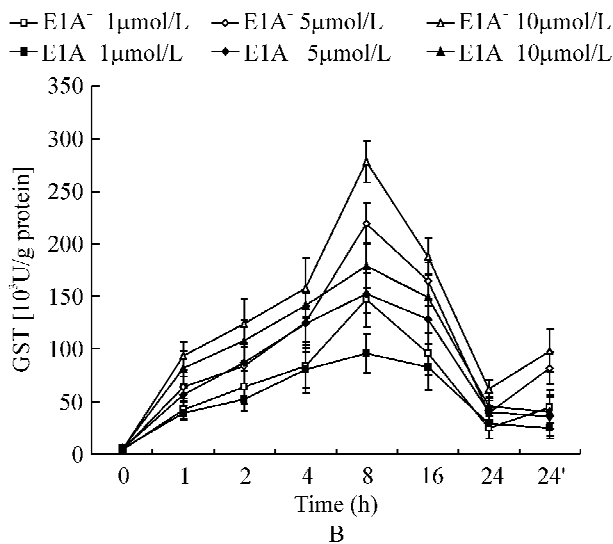
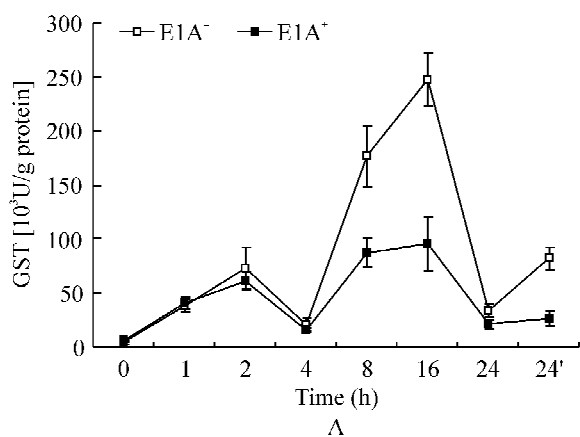


Fig 9 The change of GST activity in E1A⁺ and E1A⁻ cells influenced by H₂O₂ (100 μmol/L) (A) and 4-HNE (1 μmol/L, 5 μmol/L, 10 μmol/L) (B). $\bar{x} \pm s, n=3$. *E1A⁺ vs E1A⁻, $P < 0.05$.

图 9 H₂O₂ (100 μmol/L) (A) 和 4-HNE (1 μmol/L, 5 μmol/L, 10 μmol/L) (B) 所致氧化应激时 E1A⁺ 和 E1A⁻ 细胞内 GST 活性的改变

8 细胞内 γ-GCS 酶活性的变化(图 10)

E1A⁺ 细胞内 γ-GCS 酶活性基础水平仅为 E1A⁻ 细胞的 50% 左右, 并且对氧化剂的刺激改变不

明显, 一直处于低平状态。而 E1A⁻ 细胞内酶活性在 H₂O₂ 和 4-HNE 作用后即出现上升趋势, 8 h 可达到基础水平的 4 倍左右, 去除氧化剂影响后仍高于

基础水平。2 者比较显著差异。

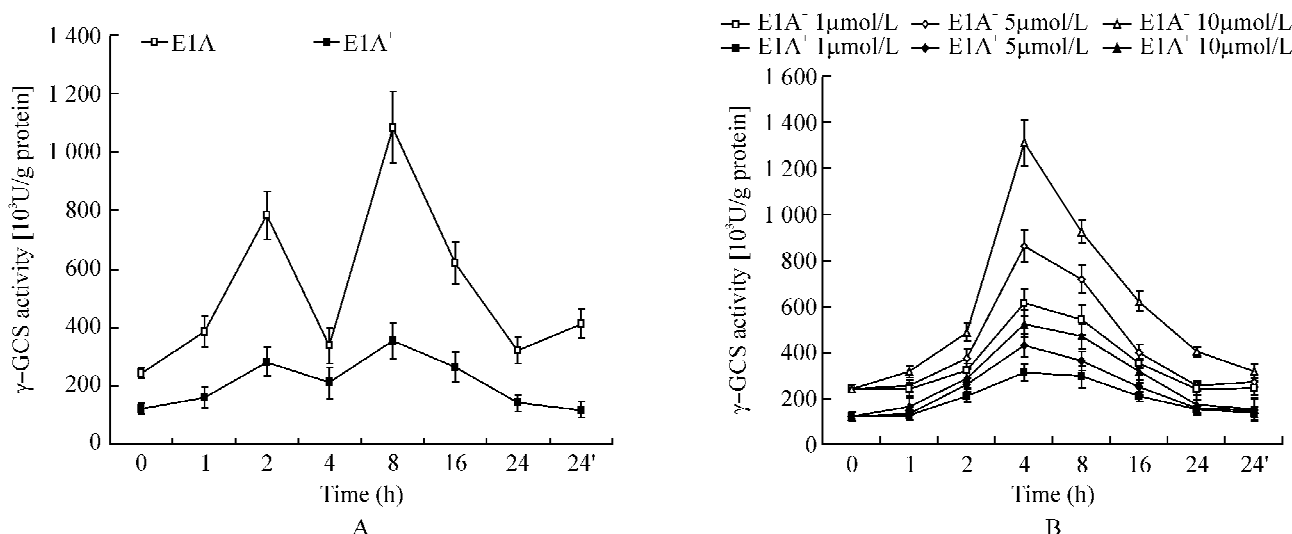


Fig 10 The change of γ -GCS activity in $E1A^+$ and $E1A^-$ cells influenced by H_2O_2 (100 $\mu\text{mol/L}$) (A) and 4-HNE (1 $\mu\text{mol/L}$, 5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$) (B). $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $E1A^+$ vs $E1A^-$, $P < 0.05$.

图 10 H_2O_2 (100 $\mu\text{mol/L}$) (A) 和 4-HNE (1 $\mu\text{mol/L}$, 5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$) (B) 所致氧化应激时 $E1A^+$ 和 $E1A^-$ 细胞内 γ -GCS 酶活性的改变

讨 论

COPD 的发病机制包含氧化/抗氧化失衡、肺部炎性细胞浸润和炎症因子释放、蛋白酶/抗蛋白酶失衡 3 个最主要病理生理学过程,其中氧化/抗氧化失衡是最重要发病环节,它不仅启动炎症反应和蛋白酶/抗蛋白酶失衡,肺部的炎症反应又会产生更多的活性氧,进一步加重氧化/抗氧化失衡。香烟是氧化剂的主要来源,除通过其内所包含的多种氧化物物质直接作用外,还通过脂质过氧化产生大量有害物质^[13]。本实验中以 H_2O_2 和脂质过氧化产物之一 4-HNE 作为氧化剂作用于细胞,观察 $E1A^+$ 细胞对这 2 种典型的氧化剂刺激的反应,分析可能的机制。

GSH 是细胞内抗氧化防御系统中的最主要成分^[14],它直接清除活性氧,同时还是肺内 2 个主要抗氧化酶 GPx 和 GST 的底物,作用在于清除和修复氧化剂损伤。本研究结果显示 $E1A^+$ 细胞中氧化应激诱导 GSH 升高的反应明显受到抑制,并且在去除氧化剂之后的恢复能力也远低于 $E1A^-$ 细胞,表明细胞在遭受氧化应激时可能更易被攻击受损。MDA 是脂质过氧化终末产物之一,可作为氧化剂引起细胞过氧化损伤的指标, $E1A^+$ 细胞内 MDA 大于 $E1A^-$ 细胞,说明在氧化刺激后细胞的损伤与 GSH 含量呈负相关。

GSH 和 MDA 的水平变化受细胞内多种因素影响,主要包括氧化剂刺激的水平、清除和修复过程的消耗以及体内抗氧化酶类的活性水平。其中抗氧化

酶的活性反映细胞对氧化刺激耐受能力。研究中发现 $E1A$ 蛋白的表达虽然没有显著降低 SOD、CAT、GPx、GST 等抗氧化酶的基础水平,但当细胞在氧化剂刺激时,这些抗氧化酶应有的活性增加幅度减小。 $E1A$ 表达在基础状态时即抑制了 γ -GCS 酶的活性,并且抑制了细胞内 γ -GCS 酶活性对氧化剂的反应。 γ -GCS 是合成 GSH 的关键限速酶,决定细胞内 GSH 水平,在抗氧化过程中起到关键作用^[15,16],在氧化应激细胞内需要合成大量 GSH 对抗氧化剂损伤时, $E1A^+$ 细胞内 GSH 合成的抑制还可能影响以 GSH 为反应底物的 GPx 和 GST 酶活性, γ -GCS 酶活性基础水平降低和对氧化剂刺激诱导反应能力丧失,可能会导致 $E1A^+$ 细胞抗氧化能力的整体下降。

由此可见, $E1A$ 蛋白的表达扩大了氧化应激时大鼠肺泡上皮细胞氧化/抗氧化失衡,其最重要的机制可能在于 $E1A$ 蛋白抑制了 γ -GCS 酶的催化活性,因而抑制了氧化应激时 GSH 的合成,并影响到抗氧化酶 GPx 和 GST 的活力,使过氧化损伤程度高于正常水平。这可能是腺病毒潜伏感染扩大细胞内炎症反应,参与 COPD 发生发展的一个重要机制。

本实验选择正常大鼠的肺泡上皮细胞作为实验平台,可为下一步动物实验打下基础。所采用的 pE1Aneo 质粒包含腺病毒 5 型的包装序列、 $E1A$ 基因 5' - 上游调控序列、 $E1A$ 基因的 cDNA 全长序列,构建的稳定表达 $E1A$ 蛋白的大鼠肺泡上皮细胞实际是模拟腺病毒潜伏感染的细胞模型,为进一步实验研究提供了一个有用的平台。

[参 考 文 献]

- [1] Hogg JC. Childhood viral infection and the pathogenesis of asthma and chronic obstructive lung disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 160(5 Pt 2): S26 – S28.
- [2] 周玉民,冉丕鑫. 慢性阻塞性肺疾病的流行病学[J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2004, 3(2): 68 – 70.
- [3] Hogg JC. Role of latent viral infections in chronic obstructive pulmonary disease and asthma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164(10 Pt 2): S71 – S75.
- [4] Gaynor RB, Hillman D, Berk AJ. Adenovirus early region 1A protein activates transcription of a nonviral gene introduced into mammalian cells by infection or transfection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81(4): 1193 – 1197.
- [5] Hogg JC. Latent adenoviral infection in the pathogenesis of emphysema: the Parker B. Francis Lectureship [J]. *Chest*, 117(5 Suppl 1): 282S – 285S.
- [6] Vitalis TZ, Keicho N, Itabashi S, et al. A model of latent adenovirus 5 infection in the guinea pig (*Cavia porcellus*) [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996, 14(3): 225 – 231.
- [7] Gilmour PS, Rahman I, Hayashi S, et al. Adenoviral E1A primes alveolar epithelial cells to PM(10) – induced transcription of interleukin – 8 [J]. *Am J Physiol*, 2001, 281(3): L598 – L606.
- [8] Ogawa E, Elliott WM, Hughes F, et al. Latent adenoviral infection induces production of growth factors relevant to airway remodeling in COPD [J]. *Am J Physiol*, 2004, 286(1): L189 – L197.
- [9] Anderson KP, Fennie EH. Adenovirus early region 1A modulation of interferon antiviral activity [J]. *J Virol*, 1987, 61(3): 787 – 795.
- [10] Marvisi M, Civardi G. Chronic obstructive pulmonary disease beyond cigarette smoke [J]. *Respiration*, 2005, 72(6): 575 – 576.
- [11] Sambrook J, David WR. *Molecular cloning: A laboratory manual* [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [12] Seelig GF, Meister A. Gamma – glutamylcysteine synthetase. Interactions of an essential sulfhydryl group [J]. *J Biol Chem*, 1984, 259(6): 3534 – 3538.
- [13] Rahman I, van Schadewijk AA, Crowther AJ, et al. 4 – hydroxy – 2 – nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 166(4): 490 – 495.
- [14] 邹朝霞,何志义,冉丕鑫. 吸烟对大鼠肺内谷胱甘肽与 γ – GCS 的影响及乙酰半胱氨酸的干预作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(1): 86 – 89.
- [15] Kinnula VL. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases [J]. *Thorax*, 2005, 60(8): 693 – 700.
- [16] Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke – induced airway disease [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(6 Pt 1): L1067 – L1088.

Clathrin 蛋白是调节上皮细胞基底外侧极性的关键因子

Clathrin 蛋白包被的囊泡 (clathrin – coated vesicles) 是所有真核细胞 (从酵母到人) 胞内运输的运载工具, 具有辅助细胞质膜内吞和信号转导的重要功能。然而其非内吞的运输作用, 除了最具特征性的将水解酶从高尔基体运送到溶酶体外, 其他则鲜为人知。研究表明, Clathrin 蛋白是维持上皮 MDCK 细胞基底胞外侧质膜极性所必须的。上皮细胞在吸收和分泌过程中需要细胞质膜蛋白的极性分布 (polarized distribution) 来完成各种功能, 极性的产生需要通过接收胞质膜蛋白的分选 (sorting) 信号, 将不同的质膜蛋白定位于紧密连接部位的顶端和基底外侧区域。通过 RNAi 的方法抑制 Clathrin 蛋白的表达, 发现 Clathrin 蛋白的基本作用是将胞质膜蛋白运输到基底外侧膜。Clathrin 基因的沉默会干扰基底外侧蛋白的运输和再循环从而使其失去极性, 但是对顶端蛋白的极性没有影响。定量的活体成像实验表明慢性和急性的 Clathrin 蛋白基因沉默可以选择性减缓基底外侧的蛋白质从高尔基复合体上脱离, 同时促使它们错误地进入顶端的载体小泡。这表明在上皮细胞基底外侧细胞质膜蛋白的定位和蛋白质运输需要 Clathrin 蛋白的参与。