DOI:10.16016/j.1000-5404.202009180

KIF3A 通过结合 Wnt/β-catenin 通路中的 β-arrestin 参与哮喘气道上皮的炎症调控

杨丽丽,王亚苹,薛坤娇,阮玲瑛,符 州,耿 刚 400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,国家儿童健康与疾病临床医学研究中心,儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地,儿科学重庆市重点实验室

[摘要] **目的** 研究 KIF3A 参与哮喘气道炎症调控的可能机制,为哮喘治疗提供新的靶点和方向。**方法** 选取 20 只雌性 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠建立哮喘模型,随机分为哮喘组与对照组($n=10$)。Western blot 和免疫组化(IHC)检测两组小鼠 KIF3A 的表达;在体外分别用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)和屋尘螨(house dust mite,HDM)干预人支气管上皮细胞 16HBE,Western blot 和 RT-PCR 检测 KIF3A 的表达;构建含有 KIF3A 的过表达组(LV-KIF3A-45894-J2,LV-KIF3A)和 RNA 干扰序列的慢病毒载体组(LV-KIF3A-RNAi-81183-1,RNAi),用含有空载的慢病毒和阴性对照序列的慢病毒载体作为对照,分别感染 16HBE;免疫共沉淀检测过表达组中 KIF3A 与 β-arrestin 的结合,同时 Western blot 和 RT-PCR 检测各组细胞 β-catenin 的表达水平,RT-PCR 检测 KIF3A 基因差异表达对趋化因子 CCL-17 和 CCL-26 表达的影响。**结果** 哮喘组的 KIF3A 表达水平较对照组减少($P<0.05$)。HDM 干预 16HBE 后的 KIF3A 蛋白和 mRNA 表达水平较对照组有下降趋势,但无统计学差异($P>0.05$)。慢病毒载体感染 16HBE 72 h 且经流式分选绿色荧光阳性细胞后,RT-PCR 和 Western blot 结果显示 LV-KIF3A 组和 RNAi 组的 KIF3A 蛋白和 mRNA 表达分别增多($P<0.05$)和下降($P<0.05$)。免疫共沉淀证实 KIF3A 与 β-arrestin 相结合。LV-KIF3A 组和 RNAi 组的 β-catenin 蛋白总量无明显差异;与对照组相比,RNAi 组的 β-catenin mRNA 表达显著下降($P<0.000\ 1$),LV-KIF3A 组则无统计学差异。RT-PCR 结果显示,与对照组相比,RNAi 组的趋化因子 CCL-17 和 CCL-26 的 mRNA 水平增加($P<0.001$),LV-KIF3A 组则降低($P<0.05$)。**结论** KIF3A 与 Wnt/β-catenin 通路中的 β-arrestin 结合,通过调节趋化因子 CCL-17 和 CCL-26 的表达而参与哮喘气道上皮炎症的调控。

[关键词] KIF3A;β-arrestin;Wnt/β-catenin;哮喘;气道炎症
[中图法分类号] R-332; R363.21; R562.25 [文献标志码] A

Kinesin family member 3A is involved in inflammatory regulation of asthmatic airway epithelial by binding to β-arrestin in the Wnt/β-catenin pathway

YANG Lili, WANG Yaping, XUE Kunjiao, RUAN Lingying, FU Zhou, GENG Gang Institute of Pediatrics, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, China-International Science and Technology Cooperation Base for Child Development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the possible mechanism of kinesin family member 3A (KIF3A) taking part in the regulation of asthma airway inflammation, so as to provide a new target and direction for asthma treatment. **Methods** Female C57BL/6 mice were randomly divided into asthma group ($n=10$) and control group ($n=10$). Western blotting and immunohistochemistry (IHC) were performed to detect the expression of KIF3A in the 2 groups. After human bronchial epithelial 16HBE cells were intervened using phosphate buffer solution (PBS) and house dust mite (HDM), Western blotting and RT-PCR were adopted to

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81670018);重庆市教委科学技术研究项目(KJQN201800407)
[通信作者] 耿 刚,E-mail:285544470@qq.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

detect the KIF3A expression. Moreover, the lentiviral vectors of KIF3A overexpression (LV-KIF3A-45894-J2, LV-KIF3A) and knock-down (LV-KIF3A-RNAi-81183-1, RNAi) were constructed and then transfected into 16HBE cells, and the blank lentiviral vectors and those containing negative control sequence served as controls, respectively. The binding of KIF3A to β-arrestin in the overexpressed cells was detected by immunoprecipitation, while the expression level of β-catenin in each group of cells was determined by Western blotting and RT-PCR. The effect of differential expression of KIF3A on the expression of chemokines CCL-17 and CCL-26 was also determined. **Results** In animal models, the expression of KIF3A was significantly lower in the asthma mice than the control mice ($P<0.05$). *In vitro* study indicated that HDM intervention decreased the expression of KIF3A at protein and mRNA levels in 16HBE cells, though there was no statistical difference ($P>0.05$). The RT-PCR and Western blotting results showed that the expression of KIF3A were increased in the LV-KIF3A transfected cells ($P<0.05$) and decreased in the RNAi treated cells ($P<0.05$). Immunoprecipitation confirmed the binding of KIF3A to β-arrestin. No significant difference was found in the total amount of β-catenin protein between the LV-KIF3A transfected cells and the RNAi treated cells. Compared with the corresponding cells, the mRNA level of β-catenin was significantly lower in the RNAi treated cells ($P<0.0001$), but no such difference was seen in the LV-KIF3A transfected cells. The RT-PCR results suggested that the levels of chemokines CCL-17 and CCL-26 were increased in the RNAi treated cells ($P<0.001$), while decreased in the LV-KIF3A transfected cells ($P<0.05$) as compared with their control cells. **Conclusion** KIF3A binds to β-arrestin in the Wnt/β-catenin pathway, and is involved in asthmatic airway epithelial inflammation by regulating the expression of chemokines CCL-17 and CCL-26.

[**Key words**] KIF3A; β-arrestin; Wnt/β-catenin pathway; asthma; bronchial inflammation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81670018) and the Science and Technology Research Program of Chongqing Municipal Education Commission (KJQN201800407). Corresponding author: GENG Gang, E-mail: 285544470@qq.com

哮喘是一种常见、复杂的慢性呼吸系统疾病,会引起可逆性气道阻塞、过度的黏液生成等病理改变[1]。哮喘的具体发病机制目前尚未完全明确。但在哮喘发病机制中,病理变化的基础是气道炎症。因此,抑制气道炎症反应、明确哮喘发病机制中参与炎症反应的基因以及分子机制具有重要意义。驱动蛋白家族成员3A(kinesin family member 3A,KIF3A)是调控微管功能和运输的异三聚体驱动蛋白2的亚基[2-4],其基因位点被多次证明与哮喘和湿疹易感相关[5-8]。有研究证实[9-11],KIF3A在哮喘患者中异常表达,并将其鉴定为新的哮喘标志物候选基因。因此,我们推测KIF3A可能在哮喘的发病中起重要作用。然而,目前有关KIF3A在哮喘气道炎症方面的报道不多,尤其是KIF3A在气道上皮细胞炎症中的作用研究。

Wnt/β-catenin通路可通过促进细胞因子和炎症介质的表达而调控哮喘气道炎症[12-14],被认为是哮喘治疗的可能分子靶标之一[15]。研究发现,β-arrestin是一种多功能支架蛋白,同时也是Wnt通路中的关键蛋白[16-17]。最近的研究表明,KIF3A能够抑制Wnt/β-catenin通路的活化[18]。还有研究报道:气道上皮除了作为保护性物理屏障之外,还发挥着有效的免疫反应功能,在哮喘的气道炎症中起重要作用[19]。在人支气管上皮细胞中,KIF3A调控Wnt/β-catenin通路活性的可能机制目前尚少见报道。因此,本研究拟通过动物和细胞实验来初步探讨KIF3A是否通过Wnt/β-catenin通路中的β-arrestin参与哮喘气道炎症的调控。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人支气管上皮细胞16HBE来自于本课题组液氮冻存细胞库;DMEM高糖培养基、胰酶(Gibco);胚胎血清(以色列BI);一抗KIF3A、β-arrestin(Abcam);一抗β-catenin(Cell Signaling);山羊抗兔IgG、封闭用山羊血清、兔二步法检测试剂盒、DAB显色试剂盒(中杉金桥);ECL发光试剂盒、PVDF膜(Millipore);全蛋白提取试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒(凯基);5×SDS-PAGE上样缓冲液、SDS-PAGE配胶试剂盒、Protein A+G Agarose、兔IgG(碧云天);屋尘螨(Greerlabs);敲低的慢病毒载体(LV-KIF3A-RNAi-81183-1,含有KIF3A RNAi序列TCAGTCTTTGATGAAACTA)及阴性对照载体(LV-KIF3A-Control,含有阴性对照序列TTCTC-CGAACGTGTCACGT),过表达的慢病毒载体(LV-KIF3A-45894-J2)及阴性对照载体(LV-KIF3A-Control),分别由上海吉凯基因技术公司基于GV493载体(元件顺序:hU6-MCS-CBh-gcGFP-IRES-puromycin)和GV492载体(元件顺序:

https://www.cnki.net

IRES-puromycin)构建、筛选并鉴定。总 RNA 提取试剂盒(百泰克);RNA 反转录试剂盒、SYBR Premix *ExTaq*™(TaKaRa);PCR 引物由华大科技合成。

1.2 实验方法

1.2.1 建立哮喘小鼠模型 20 只 6~8 周约 20 g 的 C57BL/6 雌性小鼠购于重庆医科大学实验动物中心,饲养于重庆医科大学附属儿童医院实验动物中心 SPF 级环境中(室温 24 ℃,湿度 55%~60%,12 h/12 h 黑暗/光照循环)。所有的动物实验根据动物实验管理委员会制定的指南进行的,且获得重庆医科大学伦理委员会批准。小鼠按随机数字表法随机分成对照组和哮喘组,每组 10 只。哮喘组分别在第 0、14 d,用 20 μg/30 μL 屋尘螨(house dust mite, HDM)工作液(由高温高压灭菌生理盐水配置)滴鼻致敏,在第 21、23、25、27、29 天予以 20 μg/30 μL HDM 工作液滴鼻激发哮喘。对照组在相同时间接受相同剂量的生理盐水致敏和激发。在最后一次激发后 24 h 内处死小鼠。

1.2.2 支气管肺泡灌洗液(BALF)灌取及细胞计数 末次 HDM 激发后 24 h 内,10%水合氯醛麻醉小鼠,眼球取血后脱颈处死并固定,暴露气管和胸腔,止血钳夹闭左肺门,留置针从气管上端插入并固定,用预冷的无菌 PBS 灌洗 3 次,每次 0.5 mL,2 500 r/min、4 ℃、离心 5 min,收集上清-80 ℃保存。余细胞沉淀中加入 1 mL 无菌 PBS 混匀后取 20 μL 行细胞总计数,剩余细胞悬液按同样方法离心后取细胞沉淀涂片,待干后行瑞氏-吉姆萨染色,油镜下不同视野分类计数 200 个细胞。

1.2.3 有创肺功能检测 末次 HDM 激发后 24 h 内,1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠后行气管插管,连接有创肺功能仪检测小鼠的基础肺功能值,待数据稳定后,用 0.9% NaCl 测基础值,后依次雾化吸入 3.125、6.25、12.5、25、50 mg/mL 的乙酰甲胆碱(Mech),每次雾化 1 min,记录 5 min,取后 3 min 肺阻力(lung resistance, LR)用做分析小鼠气道高反应性(airway hyperresponsiveness, AHR)的依据。

1.2.4 组织学和免疫组化 4%甲醛溶液固定肺组织,经乙醇梯度脱水,石蜡包埋,制成 4 μm 切片,HE 染色,评估肺部炎症细胞浸润情况。上述制备的石蜡切片经脱蜡和再水化后,5%胎牛血清室温封闭 30 min,一抗 4 ℃孵育过夜,滴加二抗和辣根酶标记链霉素工作液,显微镜下 DAB 显色,苏木精染色,经脱水后封片。

1.2.5 细胞培养和处理 16HBE 培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 中,培养条件为 37℃,5% CO_2。待细胞融合达 95%~98%,按 10^4~10^5/cm^2 接种在培养板中。16HBE 根据慢病毒过表达/敲低产品说明书进行感染,获得 GFP 阳性细胞后,传代培养并用于其后实验。通过 RT-PCR 和 Western blot 检测转染细胞 KIF3A 的表达。获得的各组细胞,以 10^5/cm^2 接种在培养板中过夜,50 μg/mL HDM 处理细胞 24 h 后,提取细胞蛋白和 RNA 用于之后的实验。

1.2.6 Western blot 检测 全蛋白试剂提取盒提取小鼠肺组织和细胞的总蛋白,BCA 蛋白含量检测试剂盒检测蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳后,凝胶上的蛋白湿转至 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶封闭后,与一抗 4 ℃孵育过夜,1×TBST 漂洗后,分别加入 HRP 标记的抗兔/鼠 IgG 二抗,室温孵育 1.5 h,1×TBST 洗涤后,ECL 发光剂显影,Image J 软件分析条带。

1.2.7 RT-PCR 检测 RNA 提取试剂盒从细胞中提取总 RNA,根据产品说明书,把 RNA 反转录成 cDNA,-20 ℃保存;使用 10 μL RT-PCR 反应体系,并利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法检测各样本目的基因 mRNA 的相对表达量。KIF3A 正向引物:5′-GTTTGGACTATGCTGATGGCTGC-3′,反向引物:5′-GTTGCCGAATGTTCTCCAGTAGG-3′;β-catenin 正向引物:5′-CACAAGCAGAGTGCTGAAGGTG-3′,反向引物:5′-GATTCCTGAGAGTCCAAAGACAG-3′;CCL-17 正向引物:5′-CCAGGGATGCCATCGTTTTTG-3′,反向引物:5′- TAGTCCCGGGAGACAGTCAG-3′;CCL-26 正向引物:5′- TTGAGGCTGAGCCAAAGACC-3′,反向引物:5′-TGGTAGTGAATATCACAGCCCG-3′;GAPDH 正向引物:5′-CAGCGACACCCACTCCTCCACCTT-3′,反向引物:5′-CATGAGGTCCACCACCCTGTTGCT-3′

1.2.8 免疫共沉淀 取蛋白样品,加入 IgG 作为阴性对照和充分重悬的 Protein A+G Agarose,4 ℃缓慢摇动 2 h。2 500 r/min 离心 5 min,取上清,加入用于免疫沉淀的一抗后,4 ℃缓慢摇动过夜。加入充分重悬的 Protein A+GAgarose,4 ℃缓慢摇动 3 h。2 500 r/min 离心 5 min,吸除上清,PBS 洗涤沉淀 5 次后,去除上清,1×SDS-PAGE 电泳上样缓冲液 Vortex 重悬沉淀,沸水浴处理 5 min,取部分或全部样品用于 SDS-PAGE 电泳。

1.3 统计学分析

采用 SPSS18.0 和 GraphPad Prism 7.0 软件进行分析,各组数据比较时,计量资料用 t 检验,计数资料用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 KIF3A 在哮喘小鼠中表达降低

2.1.1 C57BL/6 小鼠哮喘模型验证 小鼠哮喘模型构建如图 1 所示。BALF 细胞和嗜酸性粒细胞计数发现,哮喘组 BALF 细胞总数[(15.96±6.67)×10^5]和嗜酸性粒细胞计数[(1.20±1.48)×10^5]均较对照组

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

[(6.97±0.71)×10^5,P<0.05;(0.40±0.55)×10^5,P<0.001]明显增多。HE 染色结果显示,与对照组比较,哮喘组小鼠支气管周围大量炎症细胞浸润(图 2)。有创肺功能检测仪检测小鼠 AHR 的结果见图 3,Mech 激发后,哮喘组肺通气阻力较对照组明显增高(P<0.001)。以上结果说明小鼠哮喘模型构建成功。

2.1.2 KIF3A 在哮喘小鼠支气管肺组织中的表达

小鼠哮喘模型构建成功后,免疫组化和 Western blot 检测 KIF3A 的表达,结果见图 2、4,哮喘组 KIF3A 表达水平较对照组显著降低。说明 KIF3A 的差异表达与哮喘有着一定的相关性。

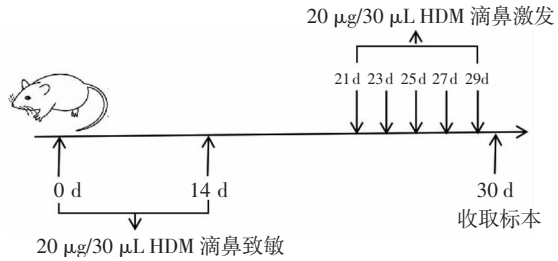


图 1 小鼠支气管哮喘致敏激发示意图

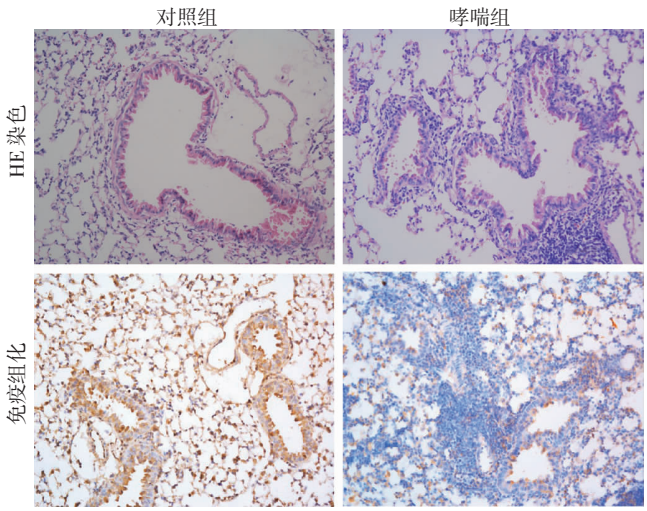


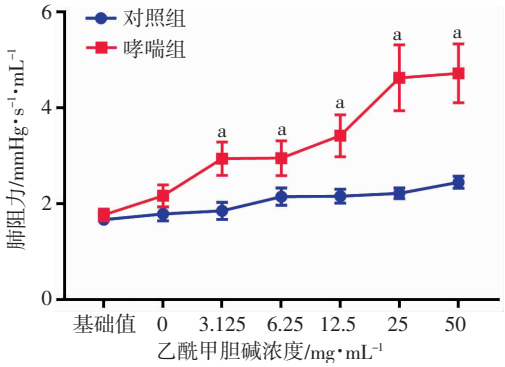
图 2 HE 染色及免疫组化观察 2 组小鼠肺组织病理变化及 KIF3A 的表达 (×200)

2.2 KIF3A 在 HDM 干预的人支气管上皮细胞 16HBE 中的表达

进一步用 HDM 干预人支气管上皮细胞 16HBE,Western blot 和 RT-PCR 检测 KIF3A 的表达水平,结果见图 5,与对照组比较,HDM 干预组的 KIF3A 蛋白和 mRNA 表达水平[(1.859±1.118)vs(0.610±0.123)]呈下降趋势,但无统计学差异(P>0.05)。

2.3 16HBE 过表达/敲低 KIF3A 的鉴定

慢病毒感染 16HBE 细胞,约 72 h 后均可见明亮绿色荧光,细胞形态正常(图 6)。RT-PCR 检测发现,过表达组(LV-KIF3A)较对照组(Ctrl)KIF3A mRNA 水平显著增多[(0.391±0.104)vs(2.798±1.189),P<0.05],敲低组(RNAi)较对照组(NC)则明显下降[(3.915±2.005)vs(0.391±0.386),P<0.05,图 7]。Western blot 检测 KIF3A 蛋白表达亦呈相似改变(图 7),提示成功构建过表达和敲低 KIF3A 的 16HBE 模型。



a:P<0.001,与对照组比较

图 3 有创肺功能检测各组小鼠气道阻力(n=7)

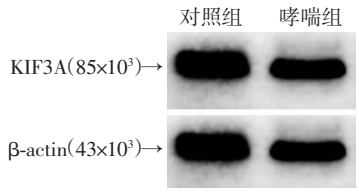


图 4 Western blot 检测各组小鼠肺组织中 KIF3A 的表达

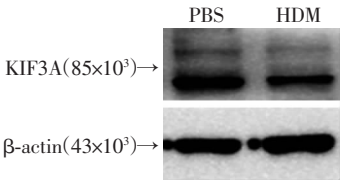


图 5 Western blot 检测 HDM 干预的 16HBE 中 KIF3A 的表达量

2.4 KIF3A 通过与 Wnt/β-catenin 通路中 β-arrestin 结合进而影响相关炎症介质的表达

免疫共沉淀结果见图 8,可观察到 KIF3A 与 β-arrestin 相结合;Western blot 检测结果如图 9 所示,过表达/敲低 KIF3A 的 16HBE 中,β-catenin 的蛋白总量无明显差异,RT-qPCR 检测发现,敲低 KIF3A 的 16HBE 中 β-catenin 的 mRNA 表达量显著降低[(2.134±0.052) vs (0.469±0.018),P<0.000 1],而过表达组差异无统计学意义[(1.103±0.288)vs(0.942±0.197),P>0.05]。

https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

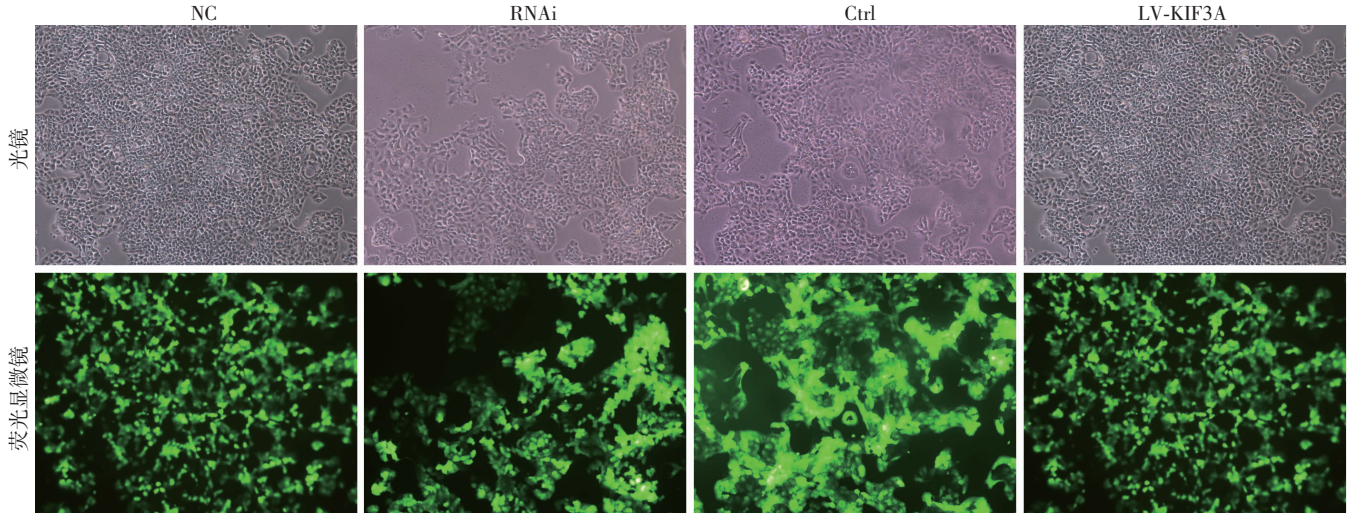


图 6 荧光显微镜观察慢病毒转染 16HBE 细胞 72 h 后的荧光表达 (×200)

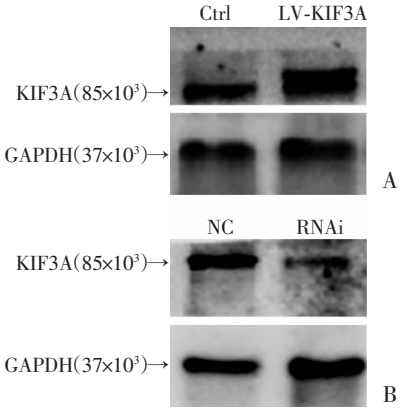
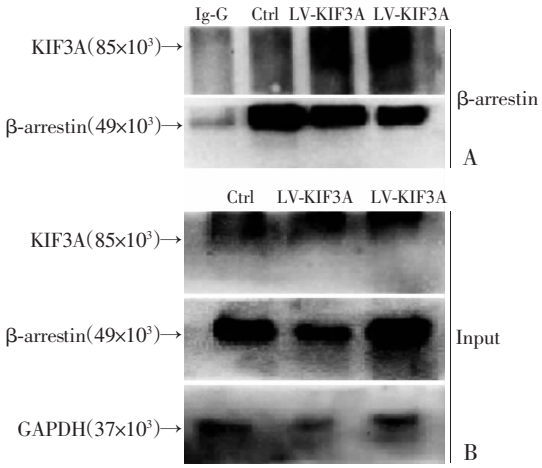
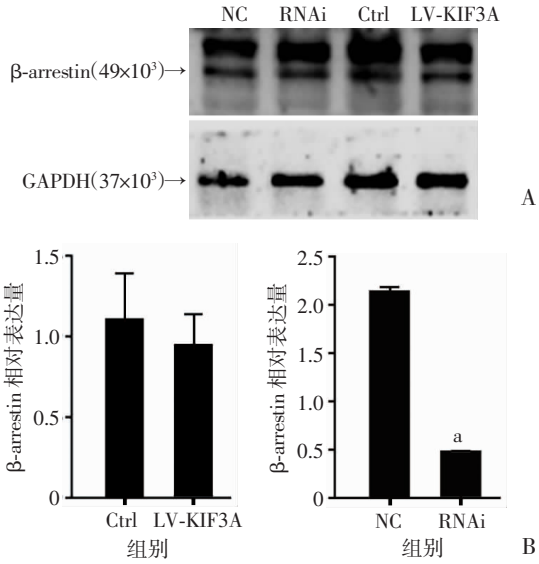


图 7 Western blot 检测 16HBE 中 KIF3A 过表达(A)及 KIF3A 敲低(B)情况



A:免疫共沉淀检测过表达 KIF3A 的 16HBE 中 β-arrestin 与 KIF3A 结合情况;B:免疫共沉淀中的阳性对照

图 8 免疫共沉淀检测过表达 KIF3A 的 16HBE 中 KIF3A 与 β-arrestin 的结合情况



a: $P<0.01$,与 NC 组比较

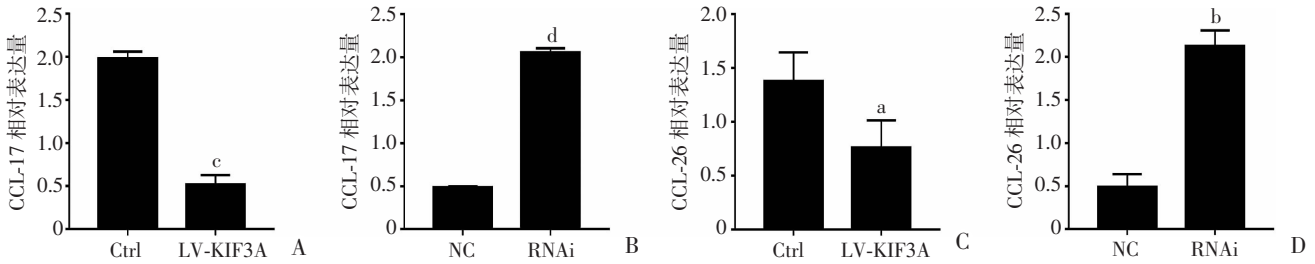
图 9 Western blot(A)和 RT-PCR(B)检测过表达/敲低 KIF3A 的 16HBE 中 β-catenin 的表达量

用 RT-PCR 检测过表达/敲低 KIF3A 的 16HBE 中胸腺活化调节趋化因子(CCL-17)和嗜酸性粒细胞趋化因子 3(CCL-26) mRNA 的表达水平。如图 10 所示,敲低 KIF3A 的 16HBE 中,CCL-17($P<0.001$)和 CCL-26($P<0.001$)的 mRNA 表达增多,过表达组则与之相反。

3 讨论

HDM 是最常见的空气过敏原之一,临床上高达 85%的哮喘患者对 HDM 过敏[20]。与经典的卵清蛋白(OVA)/氢氧化铝[$Al(OH)_3$]建模相比,本研究采用

https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



A、C:过表达组;B、D:敲低组 a:$P<0.05$,与 Ctrl 比较;b:$P<0.001$,与 NC 比较;c:$P<0.001$,与 Ctrl 比较;d:$P<0.001$,与 NC 比较

图 10 RT-PCR 检测各组趋化因子 CCL-17 和 CCL-26 的 mRNA 相对表达量

HDM 建立哮喘模型,以局部滴鼻的方式使致敏起始部位发生在肺内黏膜,引起 Th2 型炎症和 AHR 反应。因此,HDM 诱导建立的哮喘模型与临床实际结合更加紧密,更能说明 KIF3A 与哮喘的相关性。在体外实验中,我们用 HDM 干预 16HBE,结果发现 KIF3A 的表达量在统计学上无明显差异,考虑到体内实验涉及多种因素和分子机制的互联交叉复杂调控,因此与细胞实验结果不完全一致,但 KIF3A 的表达量均呈下降趋势,这些结果都说明 KIF3A 与哮喘发病密切相关,但其调控哮喘病理进程的可能机制仍需进一步探讨。

本研究在体外过表达 KIF3A 的 16HBE 中,通过免疫共沉淀,证实 KIF3A 通过与 β-arrestin 结合,参与 Wnt/β-catenin 通路的调节。此外,RT-PCR 结果显示,仅敲低 KIF3A 的 16HBE 中 β-catenin 的 mRNA 表达下调且有统计学差异,而在过表达/敲低 KIF3A 的 16HBE 中,β-catenin 总蛋白水平无差异。这说明就生物学相关性而言,某个基因和/或蛋白质的改变可能对通路整体效应的影响更大,而不是通路中某个具体的分子。其次,有时蛋白质的绝对量在生物学上可能不像其所经历的修饰(磷酸化、乙酰化等)那样具有相关性,并且由于转录后 mRNA 剪接修饰、密码子偏差、核糖体密度和其他调控机制等,基因表达和蛋白质表达之间的相关性可能较低。有研究也证明,β-catenin 可以结合结肠腺瘤样息肉病蛋白(adenomatous polyposis coli,APC)[21-22]和/或独立地在细胞核与细胞质之间穿梭[23],β-catenin 的穿梭暗示着一个更复杂的由 Wnt 信号启动的反馈调节回路。因此,KIF3A 通过与 β-arrestin 结合影响 β-catenin 的表达及在细胞内的动态转运,进而影响整个 Wnt 通路的深层分子机制,仍待进一步的研究。

Wnt/β-catenin 信号通路的异常激活,可促进细胞因子和炎症介质的表达和释放[15]。细胞趋化因子是一种小分子分泌蛋白,可在多种细胞中表达,促进相关细胞迁移至相应区域发挥作用[24]。CCL-17 与特异性受体 CCR-4 结合,可促进 T 细胞的活化、炎症介质及相关细胞因子的产生。有研究报道,CCL-17 在哮喘小鼠模型中表达上调,哮喘患者外周血中 CCL-17 较健康对照组也是增高的[25]。CCL-26 通过与 CCR-3 的信号识别,对嗜酸性粒细胞进行选择,趋化嗜酸性粒细胞迁移至相应区域释放炎症介质和相关蛋白[26]。因此,CCL-17 和 CCL-26 可以作为反映哮喘气道炎症的一个相对客观的指标。本研究结果表明,KIF3A 低表达时,炎症相关因子 CCL-17 和 CCL-26 表达水平增高,过表达 KIF3A 时则下降,说明 KIF3A 在过表达时可以在一定程度上缓解气道炎症反应。

本研究发现,HDM 诱导的哮喘小鼠模型中 KIF3A 表达下调,且在体外 HDM 干预的 16HBE 细胞株中发现 KIF3A 的表达也呈下降趋势,由此可证实 KIF3A 与哮喘存在一定的联系。同时证实 KIF3A 与 β-arrestin 结合通过对 Wnt/β-catenin 信号通路的调控参与哮喘气道上皮细胞的炎症。因此,KIF3A 可作为哮喘新的生物标志物以及哮喘治疗的潜在靶标。本研究还存在一定的局限性,首先,在体外过表达 KIF3A 的 16HBE 中证明 KIF3A 与 β-arrestin 结合,但二者间是直接结合还是间接结合,具体通过何种方式调控 Wnt/β-catenin 信号通路尚不明确;其次,本研究只在体外细胞模型上验证 KIF3A 通过与 β-arrestin 结合参与 Wnt/β-catenin 信号通路,进而参与气道上皮炎症的调控,而过表达 KIF3A 在体内哮喘模型中对气道炎症的调控作用,需要在以后的研究中逐渐完善并更深入探讨 KIF3A 在哮喘发病机制中的具体作用。

参考文献:

[1] CROISANT S. Epidemiology of asthma: prevalence and burden of disease[J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 795: 17-29. DOI: 10.1007/978-1-4614-8603-9_2.

[2] HIROKAWA N. Stirring up development with the heterotrimeric kinesin KIF_3[J]. Traffic, 2000, 1(1): 29-34. DOI: 10.1034/j.1600-0854.2000.010105.x.

[3] HIROKAWA N, NODA Y, TANAKA Y, *et al*. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009, 10(10): 682-696. DOI: 10.1038/nrm2774. https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

[4] KODANI A, SALOMÉ SIREROL-PIQUER M, SEOL A, *et al*. Kif3a interacts with Dynactin subunit p150 Glued to organize centriole subdistal appendages[J]. Embo J, 2013, 32(4): 597-607. DOI: 10.1038/emboj.2013.3.

[5] HIROTA T, TAKAHASHI A, KUBO M, *et al*. Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population[J]. Nat Genet, 2012, 44(11): 1222-1226. DOI: 10.1038/ng.2438.

[6] LEPRE T, CASCELLA R, RAGAZZO M, *et al*. Association of KIF_3A, but not OVOL1 and ACTL9, with atopic eczema in Italian patients[J]. Br J Dermatol, 2013, 168(5): 1106-1108. DOI: 10.1111/bjd.12178.

[7] KIM J H, CHA J Y, CHEONG H S, *et al*. KIF_3A, a Cilia structural gene on chromosome 5q31, and its polymorphisms show an association with aspirin hypersensitivity in asthma [J]. J Clin Immunol, 2011, 31(1): 112-121. DOI: 10.1007/s10875-010-9462-x.

[8] KANG Z H, LI Q, FU P, *et al*. Correlation of KIF3A and OVOL1, but not ACTL9, with atopic dermatitis in Chinese pediatric patients[J]. Gene, 2015, 571(2): 249-251. DOI: 10.1016/j.gene.2015.06.068.

[9] GIRIDHAR P V, BELL S M, SRIDHARAN A, *et al*. Airway epithelial KIF_3A regulates Th2 responses to aeroallergens[J]. J Immunol, 2016, 197(11): 4228-4239. DOI: 10.4049/jimmunol.1600926.

[10] BUTSCH KOVACIC M, BIAGINI MYERS J M, WANG N, *et al*. Identification of KIF_3A as a novel candidate gene for childhood asthma using RNA expression and population allelic frequencies differences[J]. PLoS ONE, 2011, 6(8): e23714. DOI: 10.1371/journal.pone.0023714.

[11] GENG G, DU Y, DAI J, *et al*. KIF_3A knockdown sensitizes bronchial epithelia to apoptosis and aggravates airway inflammation in asthma[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97: 1349-1355. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.160.

[12] SHARMA S, TANTISIRA K, CAREY V, *et al*. A role for Wnt signaling genes in the pathogenesis of impaired lung function in asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 181(4): 328-336. DOI: 10.1164/rccm.200907-1009oc.

[13] WANG R, AHMED J, WANG G, *et al*. Down-regulation of the canonical Wnt β-catenin pathway in the airway epithelium of healthy smokers and smokers with COPD[J]. PLoS ONE, 2011, 6(4): e14793. DOI: 10.1371/journal.pone.0014793.

[14] HUANG Y, WANG L, JIA X X, *et al*. Vitamin D alleviates airway remodeling in asthma by down-regulating the activity of Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 68: 88-94. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.12.061.

[15] KUMAWAT K, KOOPMANS T, GOSENS R. B-catenin as a regulator and therapeutic target for asthmatic airway remodeling[J]. Expert Opin Ther Targets, 2014, 18(9): 1023-1034. DOI: 10.1517/14728222.2014.934813.

[16] BRYJA V, GRADL D, SCHAMBONY A, *et al*. Beta-arrestin is a necessary component of Wnt/beta-catenin signaling *in vitro* and *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(16): 6690-6695. DOI: 10.1073/pnas.0611356104.

[17] SCHULTE G, SCHAMBONY A, BRYJA V. Beta-arrestins-scaffolds and signalling elements essential for WNT/Frizzled signalling pathways? [J]. Br J Pharmacol, 2010, 159(5): 1051-1058. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00466.x.

[18] KIM M, SUH Y A, OH J H, *et al*. KIF_3A binds to β-arrestin for suppressing Wnt/β-catenin signalling independently of primary Cilia in lung cancer[J]. Sci Rep, 2016, 6: 32770. DOI: 10.1038/srep32770.

[19] LÓPEZ-RODRÍGUEZ J C, BENEDÉ S, BARDERAS R, *et al*. Airway epithelium plays a leading role in the complex framework underlying respiratory allergy[J]. J Investig Allergol Clin Immunol, 2017, 27(6): 346-355. DOI: 10.18176/jiaci.0201.

[20] GREGORY L G, LLOYD C M. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung[J]. Trends Immunol, 2011, 32(9): 402-411. DOI: 10.1016/j.it.2011.06.006.

[21] NEUFELD K L, ZHANG F, CULLEN B R, *et al*. APC-mediated downregulation of beta-catenin activity involves nuclear sequestration and nuclear export[J]. EMBO Rep, 2000, 1(6): 519-523. DOI: 10.1093/embo-reports/kvd117.

[22] HENDERSON B R. Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover [J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(9): 653-660. DOI: 10.1038/35023605.

[23] ELEFTHERIOU A, YOSHIDA M, HENDERSON B R. Nuclear export of human β-catenin can occur independent of CRM1 and the adenomatous polyposis coli tumor suppressor [J]. J Biol Chem, 2001, 276(28): 25883-25888. DOI: 10.1074/jbc.m102656200.

[24] LEUNG T F, WONG C K, LAM C W, *et al*. Plasma TARC concentration may be a useful marker for asthmatic exacerbation in children[J]. Eur Respir J, 2003, 21(4): 616-620. DOI: 10.1183/09031936.03.00083303.

[25] YING S, O'CONNOR B, RATOFF J, *et al*. Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J]. J Immunol, 2008, 181(4): 2790-2798. DOI: 10.4049/jimmunol.181.4.2790.

[26] PIYADASA H, ALTIERI A, BASU S, *et al*. Biosignature for airway inflammation in a house dust mite-challenged murine model of allergic asthma[J]. Biol Open, 2016, 5(2): 112-121. DOI: 10.1242/bio.014464.

(收稿:2020-09-21;修回:2020-10-03)

(编辑 栾 嘉)

https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/