论 著

线粒体分裂抑制剂-1在香烟诱导小鼠气道炎症与氧化应激中的作用机制

刘军辉，胡雪茹，曾婷婷，王肖宇，陈秋贝，郭恒卢，丹　宜，申永春，文富强
四川大学华西医院 呼吸与危重症医学科/生物治疗国家重点实验室呼吸病学研究室（成都，610041）

【摘　要】目的 探索线粒体分裂抑制剂-1（Mdivi-1）在香烟诱导小鼠气道炎症与氧化应激中的作用及相关的作用机制。**方法** 香烟暴露构建小鼠气道炎症与氧化应激动物模型，腹腔注射Mdivi-1进行干预，收集肺泡灌洗液进行细胞分类计数，ELISA检测肺泡灌洗液炎症因子TNF-α、IL-6及MMP-9水平，生化试剂盒测定肺组织匀浆氧化应激指标MDA含量及SOD的活性，HE染色评估肺组织病理改变。在PubChem数据库中检索Mdivi-1作用靶点基因，对基因进行GO和KEGG分析，Western blot检测小鼠肺组织Drp1和Mfn2的表达变化及相关富集的通路。**结果** 熏烟诱导小鼠气道中的炎症细胞浸润增加、气道上皮细胞过度增生、气道上皮增厚，增加肺泡灌洗液中总细胞、中性粒细胞、巨噬细胞数量及炎症因子TNF-α、IL-6及MMP-9水平，增强氧化应激反应，而Mdivi-1预处理可以减轻上述改变。生物信息分析显示Mdivi-1潜在作用基因100个，GO分析显示富集到线粒体结构调节、凋亡过程、线粒体自噬等生物过程，KEGG分析显示富集到的主要通路为Tnf、Mtor、Ampk、Adipocytokine及Nod-Like受体信号通路。Western blot显示Mdivi-1干预抑制香烟诱导小鼠肺组织NF-κB信号通路激活，下调香烟诱导的Drp1表达并上调Mfn2表达。**结论** Mdivi-1缓解香烟诱导的小鼠气道炎症和氧化应激，其机制可能通过改善线粒体功能和抑制NF-κB信号通路活化实现，Mdivi-1有可能是治疗香烟诱导的气道炎症性疾病的新药物。

【关键词】线粒体分裂抑制剂-1；线粒体；香烟；气道炎症；氧化应激；NF-κB
【中图分类号】 R36　　**文献标志码** A　　DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2022.05.005

Effect of mitochondria division inhibitor-1 on cigarette smoke-induced airway inflammation and oxidative stress in mouse

LIU Junhui, HU Xueru, ZENG Tingting, WANG Xiaoyu, CHEN Qiubei, GUO Henglu, DAN Yi, SHEN Yongchun, WEN Fuqiang
Department of Respiratory and Critical Care Medicine, West China Hospital of Sichuan University, Division of Pulmonary Diseases, State Key Laboratory of Biotherapy of China, Chengdu 610041, China

【Abstract】Objective This study aimed to investigate the effects of mitochondria division inhibitor-1 (Mdivi-1) on cigarette smoke-induced airway inflammation and oxidative stress in mice and the possible mechanisms. **Methods** Mice were exposed to cigarette smoke to construct animal models of airway inflammation and oxidative stress, and midivi-1 was delivered by intraperitoneal injection. The bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected for cell counting analysis. The levels of TNF-α, IL-6, MMP-9 in BALF were detected by ELISA. The levels of oxidative stress, including MDA and the activity of SOD, in lung tissue homogenate, were determined via biochemical kits. HE staining was used to evaluate the pathological changes of lung tissues. The possible genes Mdivi-1affected were searched in the PubChem database, followed by GO and KEGG analysis. Western blot was used to determine the expression changes of Drp1 and Mfn2 in the mouse lung tissue, and related enriched signal pathway. **Results** Cigarette smoke induced increased inflammatory cell infiltration, airway epithelial hyperplasia, airway epithelial thickening, and increased the number of total cells, neutrophils, and macrophages in BALF. The levels of TNF-α, IL-6 and MMP-9 and oxidative stress were also increased, while pretreatment with Mdivi-1 could alleviate the above changes. 100 potential target genes of Mdivi-1 were retrieved by bioinformatic analysis, and GO analysis showed that they were enriched in biological processes of regulation of mitochondrion organization, apoptosis, and mitophagy, and KEGG analysis identified enriched signal pathways of Tnf, Mtor, Ampk, Adipocytokine and Nod-Like receptor. Western blot showed that pretreatment with Mdivi-1 could significantly inhibited the activation of NF-κB signaling pathway, down-regulated Drp1 expression and up-regulated Mfn2 expression in cigarette smoke-induced lung tissue of mice. **Conclusion** Mdivi-1 could alleviate airway inflammation and oxidative stress induced by cigarette smoke in mice, the mechanism of which might be achieved by improving mitochondrial function and inhibiting NF-κB signaling pathway. Thus, Mdivi-1 might be a novel drug for cigarette smoke-induced airway diseases.

【Key words】 Mdivi-1; Mitochondria; Cigarette smoke; Airway inflammation; Oxidative stress; NF-κB

基金项目：国家自然科学基金（31871157，81830001）
第一作者简介：刘军辉，硕士生。
通信作者：申永春，副教授，博士，博导。E-mail：shen_yongchun@126.com
引用本文：刘军辉，胡雪茹，曾婷婷，等. 线粒体分裂抑制剂-1在香烟诱导小鼠气道炎症与氧化应激中的作用机制[J]. 西南医科大学学报.2022，45(5)：387-392.DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2022.05.005

慢性阻塞性肺疾病（简称慢阻肺）是一种慢性进展性肺部疾病，不完全可逆性气流受限为其主要特征，存在显著的气道炎症、肺气肿及肺部结构和功能受损[1]。慢阻肺的发病机制非常复杂，其中香烟暴露是慢阻肺最重要的危险因素，香烟烟雾可诱导气道上皮释放炎症介质活化炎症细胞促进炎症反应，活化的炎症细胞释放的过多应激氧化产物同香烟中的氧化剂、自由基增强氧化应激反应，继而产生持续性的慢性炎症，促使黏液高分泌、支气管周纤维化及肺泡壁破坏是慢阻肺发生的主要病理机制[2-3]。因此对香烟诱导的炎症和氧化应激进行系统研究有望为慢阻肺寻找到新的干预靶点与药物，具有重要的临床意义。

近年来不断有研究显示线粒体结构和功能紊乱参与了慢阻肺的发生发展[4-5]，文献报道线粒体动力学的异常可能是慢阻肺发病机制的一部分，但具体机制尚不明确[6]。线粒体融合和分裂处于动态平衡中，在香烟等外界因素的刺激下，可能会导致线粒体融合和分裂的失衡，导致线粒体结构和功能的改变，进而参与炎症、氧化应激等病理生理过程[7]。围绕线粒体功能进行研究与药物研发，有望为慢阻肺的治疗寻找到新的药物。近年来越来越多的研究关注到Drp1，一种动力蛋白家族GTP酶，Drp1表达增加，线粒体分裂增加，网状结构破坏，是介导线粒体分裂的主要蛋白，研究表明Drp1的高表达与炎症、氧化应激密切相关[8-9]。线粒体分裂抑制剂1（mitochondrial division inhibitor-1，Mdivi-1）是一种喹唑酮衍生物，通过阻断Drp1在线粒体外的成环来抑制其GTP酶活性以减少线粒体过度分裂，是一种选择性线粒体分裂抑制剂[10]。研究显示Mdivi-1通过抑制Drp1转位到线粒体，减轻线粒体功能障碍和氧化应激对急性脊髓大鼠起保护作用[11]。最近研究Mdivi-1通过抑制丝裂原活化蛋白激酶、氧化应激和细胞凋亡减轻脂多糖诱导的急性肺损伤[12]。这些研究均提示Mdivi-1具有良好的抗炎症、抗氧化应激药理学效应，具备一定的临床应用前景，本研究拟探索Mdivi-1对香烟诱导的小鼠气道炎症和氧化应激是否具有保护作用，并探讨其相关的作用机制。

1 材料和方法

1.1 动物模型及分组

实验采用江苏集萃药康生物科技有限公司提供的雄性、清洁级C57BL/6J小鼠（8～10周龄，体重20～25 g）。实验小鼠共分为4组，对照组小鼠不做任何处理；药物对照组小鼠仅在腹腔注射Mdivi-1；单纯熏烟组仅接受香烟熏烟；实验组小鼠腹腔注射Mdivi-1后再接受香烟熏烟，该组小鼠熏烟前半小时腹腔注射给药1次，给药剂量50 mg/kg，每次熏烟75 min，每天熏烟2次，每周5 d，熏烟装置为经鼻自动熏烟装置，连续熏烟4周后腹腔注射1%苯巴比妥（50 mg/kg）处死小鼠后收集样本[13]。本研究符合善待实验动物要求，并经医院伦理委员会审核同意。

1.2 肺泡灌洗液收集及细胞计数

夹闭小鼠右气管下段，置入小鼠专用留置针，注入0.5 mL冰PBS，观察到左肺完全膨胀，说明灌洗液已经进入左肺，停留3～5 s后，低速缓慢回抽，回收至少90%灌洗液，此操作重复3次。将收集的肺泡灌洗液（broncho-alveolar lavage fluid，BALF）在4 ℃、1000 g条件下离心5 min，离心后得到的细胞沉淀进行细胞总数及分类计数。

1.3 BALF炎症因子测定

酶联免疫吸附（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒对BALF中的肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）（欣博盛，深圳）、白介素-6（interleukin-6，IL-6）（伊莱瑞特公司，武汉）、基质金属蛋白酶-9（matrix metallopeptidase 9，MMP-9）（伊莱瑞特公司，武汉）浓度进行检测，按照说明书的步骤实施检测。

1.4 HE染色

左侧未经灌洗的肺组织经固定、透明、蜡浸、包埋处理，以4 μm厚度切片，常规进行HE染色，光学显微镜下观察气道及支气管周围肺组织的变化，并由一名经验丰富且对实验干预及分组未知的实验人员对肺部炎症损伤进行评分[11]。

1.5 氧化应激水平测定

从液氮罐中取出保存好的肺组织，制成10%匀浆，按照南京建成生物工程研究所的试剂盒说明书检测肺组织匀浆中的丙二醛（malondialdehyde，MDA）水平和超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）活性。

1.6 生物信息分析

在PubChem数据库检索出已公开发表的Mdivi-1作用靶点基因，使用基因序列分析软件R语言进行生物信息分析，包括基因本体（Gene Ontology，GO）分析：富集出基因的生物过程、细胞成分和分子功能。信号通路分析：使用京都基因和基因组百科全书数据库（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）富集基因参与的通路。

1.7 Western Blot

取出冻存于液氮罐的肺组织，提取肺组织总蛋白，进行聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDSPAGE），转膜，BSA封闭，1 h后分别加入一抗P-P-65、P-65、IκBα、P- IκBα、Drp1、Mfn2、GAPDH（1∶1000），置于4 ℃孵箱中孵育过夜，洗膜，并加入辣根过氧化物酶标记的二抗（1∶10 000），显影，使用灰度检测软件ImageJ（National Institutes of Health，Bethesda，MD，USA）分别测定目的蛋白、内参蛋白灰度值。用目的条带灰度值/GAPDH灰度值

作为该目的蛋白的相对含量，用磷酸化蛋白灰度值/总蛋白灰度值作为该磷酸化蛋白的相对含量，再用统计软件对相对含量进行统计处理及分析。

1.8 统计学分析

所有值都表示为平均值 ± 标准差，使用单因素方差分析（one-way ANOVA）进行统计分析，费尔希最低显著性差异检验（Fisher's LSD）进行多重比较。使用R语言（3.6.3版本）分析数据并准备图形。$P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Mdivi-1缓解香烟诱导的小鼠肺组织病理改变及气道炎症评分

与对照组比较，熏烟组可见明显小鼠支气管周围炎性细胞浸润，管腔阻塞，气道上皮细胞增生，气道上皮增厚，然而Mdivi-1药物对照组未见上述改变明显，给予Mdivi-1干预可缓解前述改变，并能改善香烟诱导的气道炎症评分（图1）。

2.2 Mdivi-1减轻香烟诱导气道炎症细胞激活与炎症因子释放

与对照组比较，熏烟组小鼠BALF中的总细胞、中性粒细胞数目显著增加，给予Mdivi-1预处理显著降低了香烟诱导的小鼠BALF中总细胞、中性粒细胞数量上升，熏烟组小鼠BALF中的巨噬细胞较对照组比较明显上升，但是与实验组相比无统计学差异（图2）。

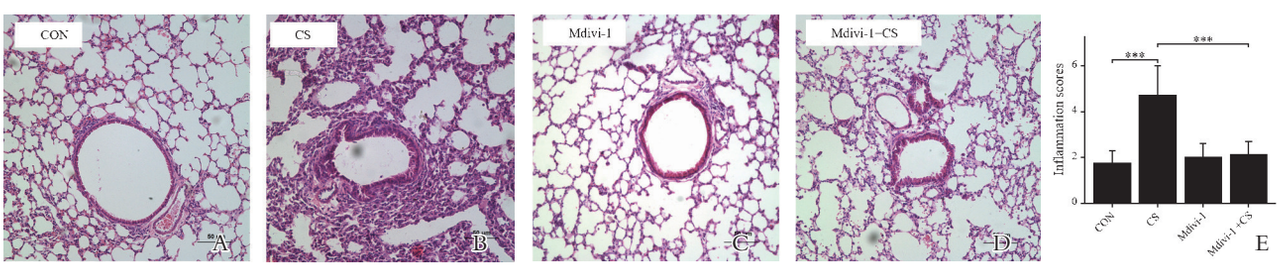


图1 Mdivi-1缓解香烟诱导的小鼠肺组织病理改变及气道炎症评分

Figure 1 Mdivi-1 alleviated CS-induced histopathological changes of lung tissue in mice and scores of airway inflammation

注：苏木精-伊红染色后（×200），对照组（A）、CS（B）、Mdivi-1（C）、Mdivi-1+CS（D）小鼠肺组织。小鼠气道炎症评分（E）。***$P < 0.001$；CON，对照组；CS，熏烟组；Mdivi-1，药物对照组；Mdivi-1+CS，Mdivi-1+熏烟组

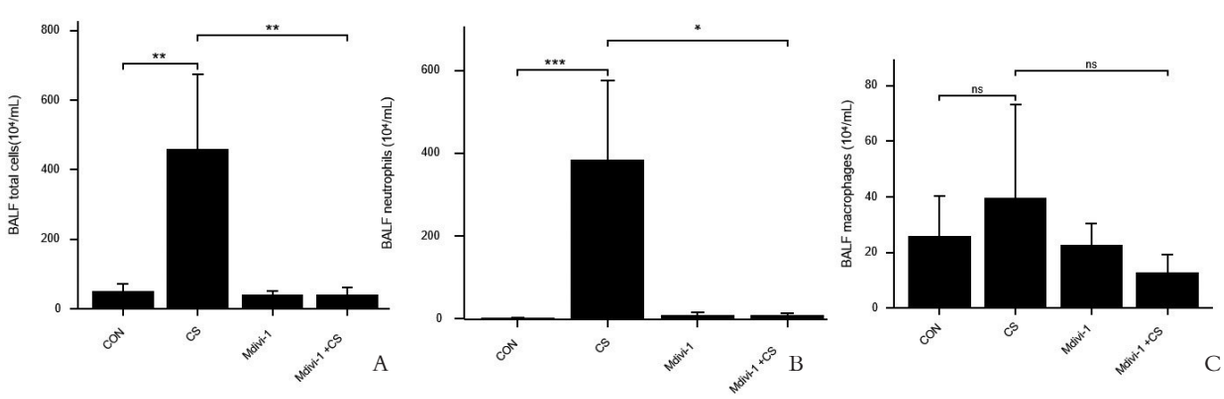


图2 Mdivi-1减少香烟诱导的小鼠肺内炎性细胞浸润

Figure 2 Mdivi-1 reduced CS-induced inflammatory cell infiltration in mouse lungs

注：BALF：肺泡灌洗液；A：BALF中的总细胞数；B：BALF中的中性粒细胞数；C：BALF中的巨噬细胞细胞数。* $P < 0.05$，** $P < 0.01$，*** $P < 0.001$。CON，对照组；CS，熏烟组；Mdivi-1，药物对照组；Mdivi-1+CS，Mdivi-1+熏烟组

2.3 Mdivi-1减轻香烟诱导气道炎症因子释放

小鼠在香烟暴露4周后，BALF中的TNF-α、IL-6及MMP-9释放数量较对照组显著增加，而Mdivi-1药物对照组较对照组无明显改变。Mdivi-1预处理能显著减少气道内TNF-α、IL-6的释放（图3A,B），实验组MMP-9较熏烟组有下降趋势，但是无统计学意义（图3C）。

2.4 Mdivi-1减轻香烟诱导的氧化应激状态

香烟暴露4周后，小鼠肺组织SOD活性显著低于对照组，MDA水平显著高于对照组，Mdivi-1预处理能显著增强SOD活性，减低CS诱导的MDA水平的升高（图4A,B）。

2.5 生物信息分析

共检索到Mdivi-1的潜在作用基因100个，GO分析富集生物学过程（BP）、细胞成分（CC）、生物学过程（BP）、分子功能（MF）及KEGG信号通路富集到主要通路见图5，其中富集到的生物学过程有线粒体结构调节、线粒体自噬及凋亡，富集到的主要的信号通路有Tnf、Mtor、Ampk、Adipocytokine及Nod-Like受体信号通

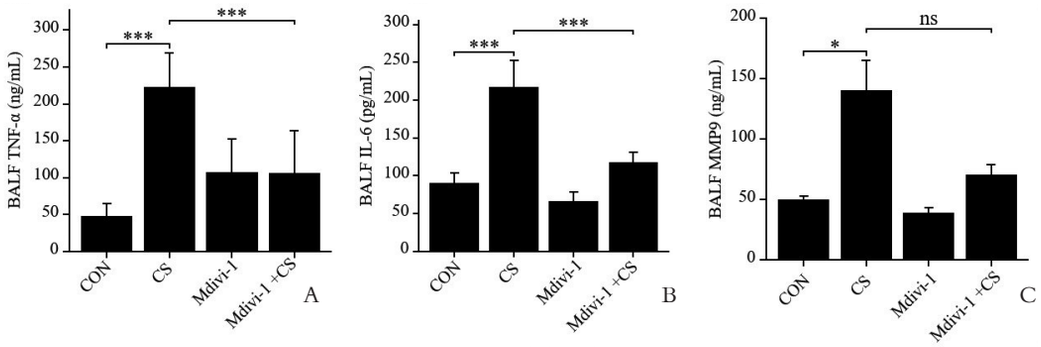


图3 Mdivi-1减少香烟诱导的小鼠肺泡灌洗液炎症因子释放

Figure 3 Mdivi-1 reduced CS-induced release of inflammatory cytokines in the BALF

注：BALF：肺泡灌洗液；A：BALF中TNF-α水平；B：BALF中IL-6水平；C: BALF中MMP9水平。* $P < 0.05$，*** $P < 0.001$；CON，对照组；CS，熏烟组；Mdivi-1，药物对照组；Mdivi-1+CS，Mdivi-1+熏烟组

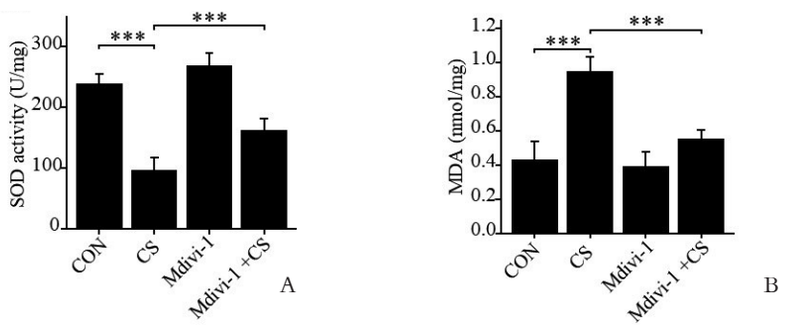


图4 Mdivi-1缓解香烟诱导的小鼠肺内氧化应激

Figure 4 Mdivi-1 alleviated CS-induced oxidative stress in mouse lungs

注：A:肺内SOD水平；B：肺内MDA水平；n=5-8只/组。*** $P < 0.001$，CON，对照组；CS，熏烟组；Mdivi-1，药物对照组；Mdivi-1+CS，Mdivi-1+熏烟组

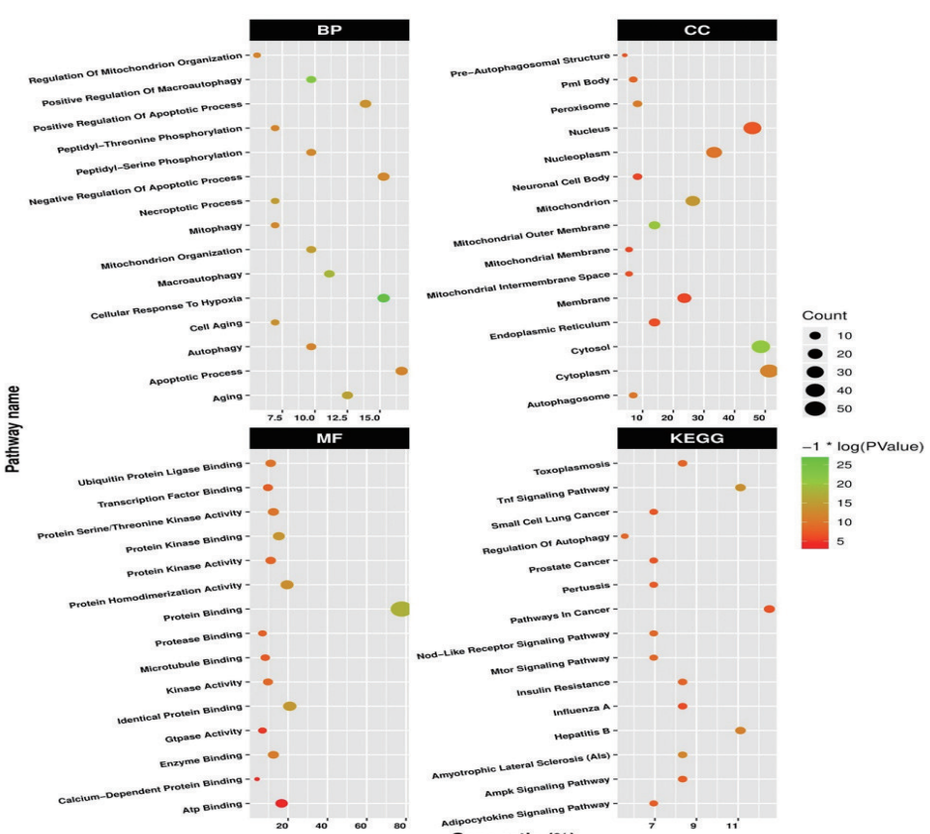


图5 Mdivi-1潜在作用基因GO分析和KEGG分析富集气泡图

Figure 5 GO and KEGG analysis of Mdivi-1 affected genes

注：气泡图显示Midiv-1作用基因GO和KEGG分析，y轴标签代表了通路，x轴标签代表富集到该通路占总基因的百分比。每个泡沫的大小代表基因数量，颜色代表了统计学差异。富集水平 $P < 0.05$ 被认为有统计学差异。KEGG：京都基因与基因组百科全书

路。

2.6 Mdivi-1抑制了香烟诱导的NF-κB信号通路激活

KEGG分析富集到了Tnf信号通路，它包括NF-κB、JNK、MARK等信号通路[14]，此部分实验目的是选择其中NF-κB通路进行验证。小鼠香烟暴露4周后显示：香烟诱导NF-κB通路蛋白P-65，IκBα的磷酸化水平升高，P-P-65/P-65及P-IκBα/IκBα相对定量升高。Mdivi-1预处理明显抑制香烟诱导P-65及IκBα蛋白的磷酸化（图6）。

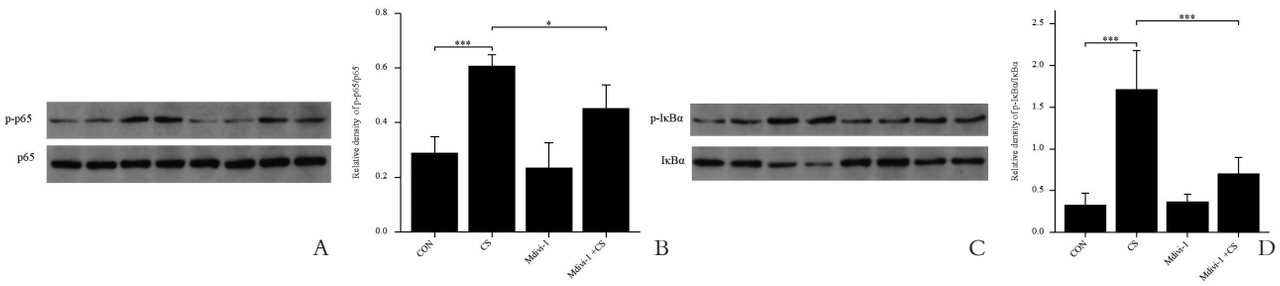


图6 Mdivi-1抑制香烟诱导小鼠肺组织内NF-κB的激活

Figure 6 Mdivi-1 inhibited cigarette smoke-induced activation of NF-κB in mouse lungs

注：A：WB测定各组P-65、P-P-65蛋白水平，B：表示各组内P-P-65/P-65相对表达量，C:表示各组IκBα、P-IκBα蛋白水平，D表示各组内P-IκBα/IκBα相对表达量。* $P<0.05$，*** $P<0.001$；CON，对照组；CS，熏烟组；Mdivi-1，药物对照组；Mdivi-1+CS，Mdivi-1+熏烟组

2.7 Mdivi-1改善香烟诱导的线粒体功能障碍

小鼠香烟暴露4周后显著降低了肺组织线粒体融合蛋白Mfn2的表达，增加了线粒体分裂蛋白Drp1的表达，导致线粒体功能障碍，而给予Mdivi-1预处理可减轻此现象（图7）。

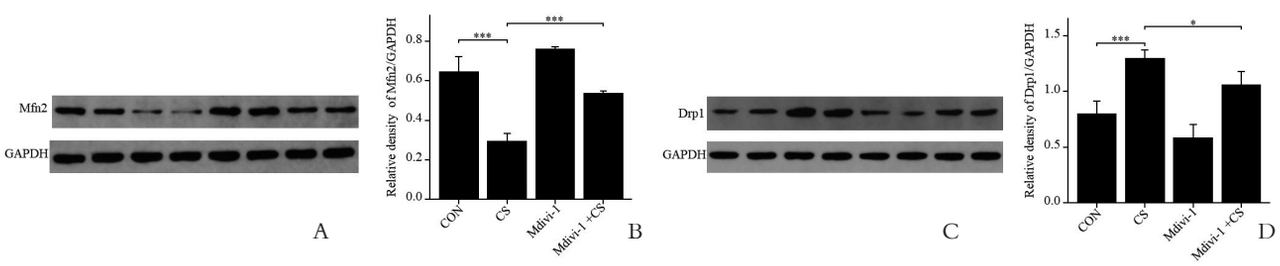


图7 Mdivi-1改善香烟诱导小鼠肺组织线粒体功能障碍

Figure7 Mdivi-1 improved cigarette smoke-induced mitochondrial dysfunction

注：A：WB测定各组Mfn2、GAPDH蛋白水平，B：表示各组内Mfn2/GAPDH相对表达量，C:表示各组Drp1、GAPDH蛋白水平，D表示各组内Drp1/GAPDH相对表达量。* $P<0.05$，*** $P<0.001$；CON，对照组；CS，熏烟组；Mdivi-1，药物对照组；Mdivi-1+CS，Mdivi-1+熏烟组

3 讨论

本实验探讨了线粒体分裂抑制剂Mdivi-1在香烟诱导的小鼠气道炎症及氧化应激模型中的作用及其相关机制。实验结果显示，Mdivi-1可显著改善香烟诱导的气道炎症与氧化应激反应，机制探索显示Mdivi-1预处理可抑制香烟诱导的p-65及IκBα磷酸化，从而抑制NF-κB信号通路激活，并且Mdivi-1预处理可下调线粒体分裂蛋白Drp1的表达，上调线粒体形态融合蛋白Mfn2表达以改善线粒体功能，为探索Mdivi-1在以慢阻肺为代表的慢性气道炎症性疾病中的运用提供了新的探究证据。

香烟中的有毒颗粒物引起慢性气道炎症，是慢阻肺重要的发病机制，炎症引起气道及肺结构的破坏及重塑，导致不可逆的气流受限[2,15-16]。炎症因子如TNF-α、IL-6、IL-18及MMP-9通过激活中性粒细胞、巨噬细胞、辅助性Th1、Th17淋巴细胞，在炎症的触发和扩大起了关键作用[2,15-16]。中性粒细胞是香烟诱导气道炎症的重要效应细胞，中性粒细胞也可以释放多种促炎介质，包括细胞因子、趋化因子和氧化剂，并可通过释放内源性损伤相关分子模式和髓过氧化物酶驱动的亚硝酸盐，诱导慢阻肺病人下气道的细胞损伤[17]。本实验给予Mdivi-1干预可显著抑制香烟诱导的气道炎症因子释放（TNF-α、IL-6）和炎症细胞（中性粒细胞）数目增加，表明Mdivi-1改善了香烟诱导的气道炎症反应。在本研究中，虽然没有观察到Mdivi-1显著降低BALF中的巨噬细胞，但是仍观察到了其下调趋势，巨噬细胞在气道炎症中处重要位置，巨噬细胞分泌多种趋化因子和细胞因子，如TNF-α，诱导内皮细胞表达粘附分子，促进多种炎症细胞的迁移[18-19]。既往的研究表明MMP-9可能与气道炎症与粘液高分泌有关，在慢阻肺的发病机制中具有一定的作用[20-21]，Mdivi-1干预组MMP-9水平较熏烟组虽然没有统计学差异，但是仍具有较明显的下降趋势。这些结果提示Mdivi-1与气道炎症之间调控关系可能是复杂的，还需更深层次的研究其调控机制。

氧化应激在慢阻肺的发病机制起了重要作用[22]，

氧化应激尤其是线粒体介导的氧化应激反应可导致蛋白质、脂质和DNA的修饰，进而影响其功能，最终可导致细胞损伤及凋亡[5,22]。在本研究中，SOD的活性及MDA作为衡量氧化应激指标，给予Mdivi-1干预可减轻香烟诱导的SOD活性降低和MDA积累，结果表明Mdivi-1改善了香烟诱导的气道氧化应激反应，其抗氧化的效能使其具有治疗气道炎症性疾病的潜能。

动物实验显示Mdivi-1在小鼠体内发挥了抗炎及抗氧化作用，为寻找Mdivi-1在香烟诱导的气道炎症与氧化应激模型中潜在作用机制，本研究在PubChem数据库检索Mdivi-1作用靶点，对相关基因进行生物信息分析，GO富集的生物过程为线粒体结构调节、凋亡、线粒体自噬等。香烟可诱导线粒体分裂及碎片化，线粒体结构及功能异常，与慢阻肺发病密切相关[23-24]。本次GO分析富集了线粒体结构调节这一生物过程提示Mdivi-1通过调节线粒体结构参与香烟诱导的气道炎症及氧化应激。本次研究再次证实，在香烟构建的小鼠气道炎症及氧化应激模型中Drp1表达上调，Mfn2表达下调，说明香烟促进线粒体的分裂，线粒体分裂可进一步损伤线粒体功能及介导炎症。给予Mdivi-1干预后可上调Mfn2表达及下调Drp1表达以促进线粒体融合，从而维持线粒体功能，改善氧化应激，降低炎症反应。本次KEGG分析富集了Tnf信号通路，我们选择其中的NF-κB通路进行验证，并证实NF-κB通路可能参与了Mdivi-1调控香烟诱导的气道炎症与氧化应激反应的进程，从侧面印证了本次生物信息分析的可靠性。需要注意的是，本研究有一定的局限性，比如仅有动物实验，未在体外探讨Mdivi-1对NF-κB信号通路及线粒体功能的作用，未对其他富集的信号通路进行验证等，未来还需要更多的研究进行验证。

4 结论

Mdivi-1可能通过抑制NF-κB信号通路激活及改善线粒体功能对香烟诱导的小鼠气道炎症与氧化应激起到保护作用。Mdivi-1有可能是治疗香烟诱导的气道炎症性疾病比如慢阻肺的新药物。

（利益冲突：无）

参 考 文 献

[1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组，中国医师协会呼吸医师分会慢性阻塞性肺疾病工作委员会. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南（2021年修订版）[J]. 中华结核和呼吸杂志，2021，44(3)：170-205.

[2] HIKICHI M，MIZUMURA K，MARUOKA S，*et al*. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by cigarette smoke[J]. J Thorac Dis，2019，11(Suppl 17)：S2129-S2140.

[3] 高恒兴，温中梅，袁海波，等. 慢性阻塞性肺病发病机制研究的最新进展[J]. 中国老年学杂志，2015，35(19)：5668-5670.

[4] AGHAPOUR M，REMELS AHV，POUWELS SD，*et al*. Mitochondria: at the crossroads of regulating lung epithelial cell function in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol，2020，318(1)：L149-L164.

[5] 麻恒，傅攀峰，邓在春，等. 线粒体相关的慢性阻塞性肺疾病氧化应激机制和抗氧化治疗的研究进展[J]. 现代实用医学，2021，33(12)：1675-1677.

[6] 王素文，王炯，李锋. 线粒体质量控制体系在慢性阻塞性肺疾病发病机制中的作用[J]. 国际呼吸杂志，2021，41(10)：788-793.

[7] 黄凯欣，熊艳，郑乐葳，等. 线粒体融合与分裂的分子机制及相关疾病的研究进展[J]. 武汉大学学报(医学版)，2019，40(2)：333-337.

[8] HU CX，HUANG Y，LI LJ. Drp1-dependent mitochondrial fission plays critical roles in physiological and pathological progresses in mammals[J]. Int J Mol Sci，2017，18(1)：144.

[9] 陈慧娟，刘金东. 线粒体动力相关蛋白 Drp1 与心肌缺血再灌注损伤机制的研究进展[J]. 生理科学进展，2016，47(5)：369-374.

[10] 李清晖，吴跃，匡磊，等. mdivi-1对急性心肌缺血小鼠心脏的保护作用[J]. 第三军医大学学报，2021，43(14)：1326-1331.

[11] LI G，JIA ZQ，CAO Y，*et al*. Mitochondrial division inhibitor 1 ameliorates mitochondrial injury，apoptosis，and motor dysfunction after acute spinal cord injury in rats[J]. Neurochem Res，2015，40(7)：1379-1392.

[12] DENG SY，ZHANG LN，MO YN，*et al*. Mdivi-1 attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting MAPKs，oxidative stress and apoptosis[J]. Pulm Pharmacol Ther，2020，62：101918.

[13] YANG DQ，XU D，WANG T，*et al*. Mitoquinone ameliorates cigarette smoke-induced airway inflammation and mucus hypersecretion in mice[J]. Int Immunopharmacol，2021，90：107149.

[14] SILKE J. The regulation of TNF signalling: what a tangled web we weave[J]. Curr Opin Immunol，2011，23(5)：620-626.

[15] BARNES PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. J Allergy Clin Immunol，2016，138(1)：16-27.

[16] WANG YJ，XU JY，MENG YQ，*et al*. Role of inflammatory cells in airway remodeling in COPD[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis，2018，13：3341-3348.

[17] HOENDERDOS K，CONDLIFFE A. The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Respir Cell Mol Biol，2013，48(5)：531-539.

[18] KAPELLOS TS，BASSLER K，ASCHENBRENNER AC，*et al*. Dysregulated functions of lung macrophage populations in COPD[J]. J Immunol Res，2018，2018：2349045.

[19] 樊迪，张爽，张凡，等. 巨噬细胞在慢性阻塞性肺疾病发病机制中作用的研究进展[J]. 医学综述，2017，23(13)：2526-2530.

[20] REN S，GUO LL，YANG J，*et al*. Doxycycline attenuates acrolein-induced mucin production，in part by inhibiting MMP-9[J]. Eur J Pharmacol，2011，650(1)：418-423.

[21] 弋可，黄玲. 基质蛋白酶9与慢性阻塞性肺疾病的研究进展[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版)，2018，11(3)：366-369.

[22] BARNES PJ. Oxidative stress-based therapeutics in COPD[J]. Redox Biol，2020，33：101544.

[23] HOFFMANN RF，ZARRINTAN S，BRANDENBURG SM，*et al*. Prolonged cigarette smoke exposure alters mitochondrial structure and function in airway epithelial cells[J]. Respir Res，2013，14(1)：97.

[24] RYTER SW，ROSAS IO，OWEN CA，*et al*. Mitochondrial dysfunction as a pathogenic mediator of chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Ann Am Thorac Soc，2018，15(Suppl 4)：S266-S272.

（2022-06-26 收稿，2022-07-24 修回）

论 著

不同龋敏感性儿童口腔变异链球菌信号分子AI-2活性检测

陈　岚[1,3]，韩林秀[2]，吴　菊[1,3]，徐　皑[4]，刘兴容[1]
1.西南医科大学附属口腔医院 儿童口腔科(泸州 646000)；2.重庆市开州区人民医院 口腔科(开州 405400)；
3.西南医科大学 口颌面修复重建和再生实验室(泸州 646000)；4.西南医科大学附属口腔医院 牙体牙髓科(泸州 646000)

【摘　要】目的 探索不同龋敏感性儿童口腔变异链球菌(streptococcus mutans，S.mutans)临床分离株的群体感应信号分子AI-2(autoinducer-2，AI-2)的表达差异。 **方法** 以不同龋敏感性儿童口腔分离得到的变异链球菌株(高龋株、中龋株、无龋株)为实验对象，以哈维弧菌BB170(vibrio harveyi BB170)检测各组菌株AI-2的产量，通过实时荧光定量核酸检测系统(real-time quantitative PCR detecting system，RT-qPCR)测定高龋株在不同生长时期*LuxS*与*pfs*基因的表达量情况，分析AI-2的合成与*LuxS*、*pfs*基因的关系。 **结果** 各组菌株均能产生AI-2，其中以高龋株产量最多；高龋株在生长的不同时期均有AI-2的表达，在迟缓期、对数前期表达量较少，到对数后期达到峰值(19.00 ± 0.90，$P < 0.05$)，为阴性对照的19倍，至稳定期开始下降。RT-qPCR结果显示，高龋株在对数后期*LuxS*、*pfs*基因的表达量最高，分别为10.47 ± 0.35、7.22 ± 0.06；*LuxS*、*pfs*基因的转录水平与AI-2的产生保持一致，但AI-2的产生与*LuxS*的相关性更高($P < 0.05$)。 **结论** 致龋敏感性越高的儿童口腔变异链球菌临床分离株产生的信号分子AI-2越多；且AI-2活性与*LuxS*基因转录水平相关性较*pfs*基因转录水平相关性高。

【关键词】变异链球菌；群体感应；AI-2；*LuxS*；*pfs*
【中图分类号】 R781.1　　**文献标志码** A　　**DOI**：10.3969/j.issn.2096-3351.2022.05.006

Detection of activity of signal molecule AI-2 of streptococcus mutans isolated from children with different caries experience

CHEN Lan[1,3]，HAN Linxiu[2]，WU Ju[1,3]，XU Ai[4]，LIU Xingrong[1]
1.*Department of Pediatric Dentistry，the Affiliated Stomatology Hospital of Southwest Medical University，Luzhou 646000，China;* 2.*Department of Stomatology，People's Hospital of Kaizhou District，Kaizhou 405400，China;* 3.*Oral & Maxillofacial Reconstruction and Regeneration Laboratory，Southwest Medical University，Luzhou 646000，China;* 4.*Department of Endodontics，the Affiliated Stomatology Hospital of Southwest Medical University，Luzhou 646000，China*

【Abstract】Objective To explore the expression differences of the quorum sensing molecule AI-2 of streptococcus mutans isolated from children with different caries experience. **Methods** Streptococcus mutans isolated from children with different caries experience (high caries strain，medium caries strain，and non-cariogenic strain) were used as the experimental subjects. Vibrio harveyi BB170 was used to detect the yield of AI-2 in each group. Real-time quantitative PCR detecting system (RT-qPCR) was used to measure the high caries strain's expression of *LuxS* and *pfs* genes at different growth periods，and the relationship between the synthesis of AI-2 and *LuxS* and *pfs* genes was analyzed. **Results** All the strains produced AI-2，the high caries strain had the highest yield. AI-2 expression was found in the high caries strains at different growth stages. The AI-2 of high caries strain had low expression in the lag phase and pre-log phase，and then reached the peak at the post-log phase (19.00 ± 0.90，$P < 0.05$)，which was 19 times higher than that of the negative control，and began to decline in the stable phase. RT-qPCR results showed that *LuxS* and *pfs* genes of high caries strains had the highest expression in the post-log phase，which were 10.47 ± 0.35 and 7.22 ± 0.06 respectively; The transcriptional level of *LuxS* and *pfs* genes were consistent with that of AI-2，but the correlation with *LuxS* was higher ($P < 0.05$). **Conclusion** Streptococcus mutans isolated from children with higher caries experience produced more signal molecule AI-2; and the correlation between AI-2 activity and *LuxS* gene transcription level was higher than that of *pfs* gene transcription level.

【Key words】 Streptococcus mutans; Quorum sensing; AI-2; *LuxS*; *pfs*

基金项目：四川省科技厅-泸州市人民政府-泸州医学院联合科研项目(LY53)；四川省卫生厅科研课题(100247)；四川省教育厅科研基金(13ZA0235)
第一作者简介：陈　岚，硕士研究生。
通信作者：刘兴容，教授，硕导。E-mail：liuxingrong163@163.com
引用本文：陈岚，韩林秀，吴菊，等. 不同龋敏感性儿童口腔变异链球菌信号分子AI-2活性检测 [J]. 西南医科大学学报.2022,45(5)：393-398.
DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2022.05.006