DOI:10.16016/j.2097-0927.202309135

重组 CC16 蛋白质抑制香烟烟雾提取物诱导人支气管上皮细胞衰老的初步研究

李 婷[1],杨晓雪[1],高 睿[1],栗馨洋[2],王海龙[2],庞 敏[1] 030001 太原,山西医科大学第一医院呼吸与危重症医学科,呼吸疾病防治与基础研究山西省重点实验室[1];030600 山西 晋中,山西医科大学基础医学研究中心[2]

[摘要] **目的** 探讨重组人 CC16 蛋白质(rhCC16)对香烟烟雾提取物(cigarette smoke extract,CSE)诱导的人支气管上皮细胞(human bronchial epithelial cells,HBECs)衰老的抑制作用及机制。**方法** CCK-8 法检测 CSE(0%、1%、2.5%、5%、7.5%和 10%)及 rhCC16(0、10、100、250 和 500 ng/mL)对 HBECs 细胞活力的影响;β-半乳糖苷酶染色试剂盒检测对照组、CSE 组以及 CSE+rhCC16 组细胞 β-半乳糖苷酶活性;实时荧光定量 PCR(qPCR)检测各组细胞 *P*16、*P*21 mRNA 表达水平;Western blot 检测各组细胞 P16、P21、p-P53、P38、p-P38、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达水平。**结果** 与对照组相比,5% CSE 刺激细胞 72 h 对 HBECs 细胞活力无显著影响;500 ng/mL 及以下浓度 rhCC16 对 HBECs 细胞活力无显著影响;与对照组相比,5% CSE 刺激 HBECs 细胞 72 h 致 β-半乳糖苷酶染色阳性细胞率明显升高($P<0.05$),且 P16 和 P21 蛋白和 mRNA 表达水平明显升高($P<0.05$),p-P53、p-P38 与 p-ERK1/2 蛋白表达量显著增加($P<0.05$);与 CSE 组相比,250 ng/mL rhCC16 干预下,HBECs 细胞 β-半乳糖苷酶染色阳性细胞率显著下降($P<0.05$),P16 和 P21 蛋白和 mRNA 表达水平显著下降($P<0.05$),p-P53、p-p38 和 p-ERK1/2 的表达量降低($P<0.05$)。**结论** rhCC16 蛋白质抑制香烟烟雾诱导的 HBECs 衰老,抑制 P38 MAPK 和 ERK1/2 信号通路可能是其作用机制。

[关键词] 细胞衰老;香烟烟雾提取物;CC16 蛋白质;P38 MAPK/ERK1/2

[中图法分类号] R322.34; R329.28; R977.6 [文献标志码] A

Recombinant human CC16 inhibits senescence in human bronchial epithelial cells induced by cigarette smoke extract

LI Ting[1], YANG Xiaoxue[1], GAO Rui[1], LI Xinyang[2], WANG Hailong[2], PANG Min[1] [1]Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Shanxi Provincial Key Laboratory of Respiratory Diseases, First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi Province, 030001; [2]Laboratory Center for Basic Medicine, Shanxi Medical University, Jinzhong, Shanxi Province, 030600, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect and mechanism of recombinant human CC16 protein (rhCC16) on cigarette smoke extract (CSE)-induced senescence of human bronchial epithelial cells (HBECs). **Methods** CCK-8 assay was used to evaluate the cell viability in HBECs after treated with 0%, 1%, 2.5%, 5%, 7.5% and 10% CSE and/or 0, 10, 100, 250 and 500 ng/mL rhCC16. β-galactosidase staining was used to observe the activity of the enzyme in control, CSE, and CSE+ rhCC16 treated HBECs. The mRNA levels of *P*16 and *P*21 in above cell groups were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR), and the protein levels of P16, P21, p-P53, P38, p-P38, ERK1/2 and p-ERK1/2 were

[基金项目] 山西省省筹资金资助回国留学人员科研项目(2022-191);山西省应用基础研究计划项目(202103021223433);山西医科大学第一医院 136 专项经费科研项目(2021-07)

[通信作者] 庞 敏,E-mail:pangmin2009@126.com

2097-0927/Copyright © 2024, 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/)

detected with Western blot in control group, CSE and CSE+rhCC16 groups. **Results** Compared with the control group, 5% CSE stimulation for 72 h or the treatment of 500 ng/mL or lower dose of rhCC16 had no significant effect on cell viability of HBECs. Stimulation 5% CSE for 72 h resulted in significantly higher positive rate to β-galactosidase staining ($P<0.05$), elevated mRNA and protein levels of P16 and P21 ($P<0.05$), and enhanced protein levels of p-P53, p-P38 and p-ERK1/2 ($P<0.05$) when compared with the control group. Compared with the simple CSE stimulation, 250 ng/mL rhCC16 treatment decreased positive rate to β-galactosidase staining ($P<0.05$), reduced mRNA and protein levels of P16 and P21 ($P<0.05$) and protein levels of p-P53, p-P38 and p-ERK1/2 ($P<0.05$). **Conclusion** rhCC16 inhibits CSE-induced cellular senescence of HBECs, which may due to its suppression in P38 MAPK and ERK1/2 signaling pathway.

[**Key words**] cellular senescence; cigarette smoke extract; CC16 protein; P38 MAPK/ERK1/2

Supported by the Research Foundation for Overseas Returners of Shanxi Province (2022-191), the Natural Science Fund of Shanxi Province (202103021223433) and the "136" Special Fund Project of the First Hospital of Shanxi Medical University (2021-07). Corresponding author: PANG Min, E-mail: pangmin2009@126.com

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种常见的、可预防和可治疗的疾病,被定义为1s内用力呼气量与肺活量(FEV_1/FVC)比值的降低,其特征是由于肺通气异常引起呼吸道持续性症状(咳嗽、咳痰、喘息等),而吸烟是COPD发生的主要危险因素之一[1]。据世界卫生组织估计,COPD将成为2030年全球人群发病和死亡的第三大疾病[2]。细胞衰老是指永久性的细胞周期阻滞,是COPD和特发性肺纤维化等慢性肺部疾病的重要驱动机制[3-5],且流行病学研究显示,COPD随着年龄增加其患病率也随之上升[6],提示衰老在COPD发生发展中具有重要作用。

Club细胞分泌蛋白16(CC16),也被称为CC10、SCGB1A1和子宫珠蛋白等,是一种主要由Club细胞分泌的保护性蛋白质,具有肺组织特异性[7],大约8%~14%和17%~27%的Club细胞分别定位于终末细支气管和呼吸性细支气管[8],且从支气管至终末支气管Club细胞的含量越来越高,而Club细胞是香烟烟雾中有害物质攻击的主要细胞之一。有研究表明,COPD患者的血清和肺泡灌洗液CC16水平降低,且气道CC16的表达量与气流受限的严重程度呈反比[9]。LAUCHO-CONTRERAS等[10]研究发现,CC16基因缺失小鼠导致肺部衰老表型加速,肺部炎症加剧,COPD样肺部病变增加,然而CC16增强策略用以减少CC16缺乏个体的肺衰老的实验研究未见报道。鉴于给予COPD患者CC16蛋白质已成为一种潜在的治疗策略[11],本研究拟采用香烟烟雾提取物(cigarette smoke extract, CSE)刺激人支气管上皮细胞(human bronchial epithelial cells, HBECs)制备细胞衰老,给予重组人CC16蛋白质(rhCC16)干预并检测其抗衰老作用及潜在机理,以期揭示CC16蛋白质新的生物学功能及其机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

人肺支气管上皮细胞(HBECs)购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司;rhCC16蛋白质由本实验室自主纯化保存[12];某牌香烟(烟气烟碱量:0.9 mg,焦油量:10 mg,烟气CO量:11 mg)购自云南玉溪卷烟厂;四季青胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司;MEM细胞培养基、CCK-8试剂盒、超敏ECL化学发光液、HRP-羊抗兔IgG购自武汉博士德生物工程有限公司;胰蛋白酶消化液、无血清细胞冻存液购自大连美仑科技有限公司;逆转录试剂盒、实时荧光定量试剂盒、预染蛋白Marker购自北京聚合美生物科技有限公司;衰老β-半乳糖苷酶染色试剂盒购自武汉赛维尔生物科技有限公司;4%多聚甲醛、TritonX-100购自北京索莱宝科技有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒、总RNA提取试剂盒购自北京赛文创新生物科技有限公司;兔抗P16多克隆抗体、兔抗P21多克隆抗体和兔抗p-P53(Ser33)多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;兔抗P38多克隆抗体、兔抗p-P38多克隆抗体、兔抗ERK1/2多克隆抗体、兔抗p-ERK1/2多克隆抗体购自Cell Signaling Technology;兔抗GAPDH多克隆抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司。

Alpha-1860S紫外可见分光光度计(中国,上海谱元公司),HERACELL150i二氧化碳培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司),Quant studio 3实时荧光定量PCR仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),D30微量核酸检测仪(德国Eppendorf公司),Proteinsimple凝胶

成像系统(美国 Alphalmager MINI 公司),Ts2 倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.2 CSE 的制备

取 1 支去除海绵过滤嘴的香烟,点燃后用 50 mL 注射器(内含 20 mL MEM 培养基)重复等量地抽吸,每次抽吸后快速水平摇晃注射器 10 下,促进香烟烟雾溶解于培养基,再进行下次抽吸,直至香烟燃烧完毕。将收集到的烟雾全部溶于 20 mL MEM 培养基中后调整培养基 pH 至 7.5,使用 0.22 μm 孔径的滤器过滤除菌;使用 Alpha-1860S 分光计于 320 nm 处测定光密度值(1.36 ±0.12)时所得溶液即为 100% CSE 原液[13],其余各浓度的 CSE 均在此基础上用 MEM 完全培养基稀释制备。

1.3 CCK-8 实验检测 CSE 对细胞活力的影响

在 96 孔板中接种 HBECs 悬液(每孔 3 000 个/100 μL),置于恒温细胞培养箱中培养 24 h;用完全培养基稀释 100% CSE 原液,使其终浓度分别为 0%(对照组)、1%、2.5%、5%、7.5%、10%,弃去原有培养基,每孔加入不同浓度的 CSE 稀释液,每组设置 6 个复孔,于恒温细胞培养箱中培养;分别于 24、48、72、96、120 h 后,弃去含有各浓度 CSE 溶液的培养基,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂以及 90 μL 完全培养基,将培养板置于恒温细胞培养箱内孵育 1 h;酶标仪检测各组细胞在 450 nm 处的光密度值。

1.4 CCK-8 实验检测 rhCC16 蛋白质对细胞活力的影响

在 96 孔板中接种 HBECs 悬液(每孔 3 000 个/100 μL),置于恒温细胞培养箱中培养 24 h;弃去原培养液,用含 0(对照组)、10、100、250、500 ng/mL rhCC16 蛋白质的完全培养基继续培养,每组设 6 个复孔。分别于 24、48、72 h 后弃去培养基,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂和 90 μL 完全培养基,置于恒温细胞培养箱内孵育 1 h;酶标仪检测各组细胞在 450 nm 处的光密度值。

1.5 细胞培养与处理

HBECs 在含 10%胎牛血清的 MEM 培养基中培养(37 ℃、5% CO_2),每日观察细胞形态,待细胞融合度达到 80%左右时消化、传代、计数,并根据实验需要在 6 孔板中均匀接种细胞悬液(每孔 30 万个/2 mL),培养板置于恒温细胞培养箱中预培养 24 h。待细胞贴壁后,弃去原有培养基,rhCC16 干预孔加入 250 ng/mL rhCC16 蛋白质,2 h 后再加入终浓度为 5%的 CSE 稀释液继续培养。

1.6 RNA 提取和 RT-qPCR

按照试剂盒说明书提取各组细胞总 RNA,以所提取的 RNA 为模板进行逆转录获得 cDNA。PCR 反应体系为 10 ng cDNA,2×M_5 PCR 预混液 10 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,ddH_2O 补足至 20 μL。常规 PCR 扩增后得到 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各基因 mRNA 的相对表达水平,并对结果进行统计学分析。ΔΔCt=(实验组目的基因 Ct 值-实验组内参基因 Ct 值)-(对照组目的基因 Ct 值-对照组内参基因 Ct 值)。引物由北京中美泰和科技有限公司合成,实验所用引物见表 1。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列(5′-3′)
P16	上游:CGATTGAAAGAACCAGAGAGG
	下游:TGGACATTTACGGTAGTGGG
P21	上游:TGGACCTGTCACTGTCTTGTA
	下游:ATTAGGGCTTCCTCTTGGA
β-actin	上游:CATGTACGTTGCTATCCAGGC
	下游:CTCCTTAATGTCACGCACGAT

1.7 β-半乳糖苷酶染色法检测细胞衰老

细胞干预结束后,吸除细胞培养液,PBS 洗涤细胞 2~3 次,每孔细胞内加入 1 mL β-半乳糖苷酶染色固定液,室温固定 20 min,弃去固定液,PBS 洗涤 3 次,每孔加入 1 mL 染色工作液,并用封口膜封住 6 孔板,以防止染色液蒸发影响染色效果,置于 37 ℃恒温培养箱过夜孵育。高倍镜下随机选取 5 个视野观察细胞,拍照,后续用 Image J 进行计数分析。

1.8 蛋白印迹法检测细胞的蛋白表达

使用 SDS 蛋白裂解液提取各组细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度后,取 30 μg 蛋白样品与 5×loading buffer 以 4∶1 比例混合,放入恒温金属浴中 100 ℃ 3 min 煮沸变性,室温 6 000 r/min 离心 3 min,进行 SDS-PAGE 分离蛋白、转膜、5%脱脂奶粉封闭后,分别与 GAPDH 抗体(1∶5 000)、P16 抗体(1∶1 000)、P21 抗体(1∶1 000)、p-P53 抗体(1∶1 000)、P38 抗体(1∶1 000)、p-P38 抗体(1∶1 000)、ERK1/2 抗体(1∶1 000)、p-ERK1/2 抗体(1∶1 000)于 4 ℃ 摇床孵育过夜;次日以 HRP-IgG(1∶5 000)作为二抗,室温摇床孵育 1 h 后进行 ECL 曝光显影。采用 Image J 软件分析蛋白条带的灰度值,以 GAPDH 为内参,以目的蛋白条带的灰度值与 GAPDH 条带灰度值的比值表示目的蛋白表达水平;磷酸化蛋白条带灰度值与总蛋白条带灰度值的比值表示磷酸化蛋白表达水平。

1.9 统计学方法

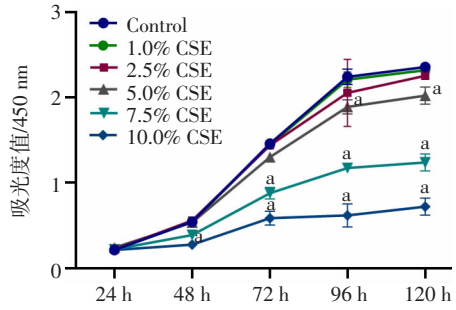
采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件对实验数据进行分析,所有实验均进行 3 次重复,两组之间采用独立样本 *t* 检验进行比较,多组间比较采用单因素方差分

析,$P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 5% CSE 作用 72 h 成功诱导 HBECs 衰老

CCK-8 结果显示(图 1),5% CSE 浓度刺激细胞 72 h 对细胞活力无显著影响。β-半乳糖苷酶染色结果显示(图 2A, B),与对照组细胞相比,5% CSE 刺激 72 h,细胞 β-半乳糖苷酶活性更高,染色阳性细胞率显著升高($P<0.01$),故选用 5% CSE 刺激细胞 72 h 进行后续实验。qPCR 和 Western blot 实验结果显示,CSE 刺激可显著增加 *P16* 和 *P21* mRNA 和 P16、P21 和 p-P53 蛋白表达水平(图 2C, D),这些结果均提示 5% CSE 作用 72 h 成功诱导 HBECs 衰老。



a: $P<0.01$,与对照组比较

图 1 不同浓度 CSE 对 HBECs 活力的 CCK-8 检测

2.2 rhCC16 有效抑制 CSE 诱导的 HBECs 衰老

CCK-8 检测结果显示,与对照组相比,rhCC16 作用浓度在 500 ng/mL 及以下时,均不会影响 HBECs 的活力(图 3)。β-半乳糖苷酶染色结果显示,与 CSE 组相比,250 ng/mL rhCC16 组细胞 β-半乳糖苷酶活性明显降低,染色阳性细胞率显著下降($P<0.01$,图 4A, B),故选用 250ng/mL rhCC16 干预细胞进行后续实验。qPCR 和 Western blot 实验结果显示,与 CSE 组相比,CC16 组 *P16*、*P21* mRNA 和 P16、P21 和 p-P53 蛋白表达水平明显降低($P<0.01$,图 4C, D)。这些结果表明 250 ng/mL rhCC16 可以有效抑制 CSE 诱导的 HBECs 衰老。

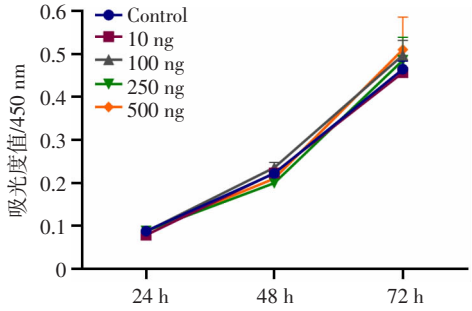
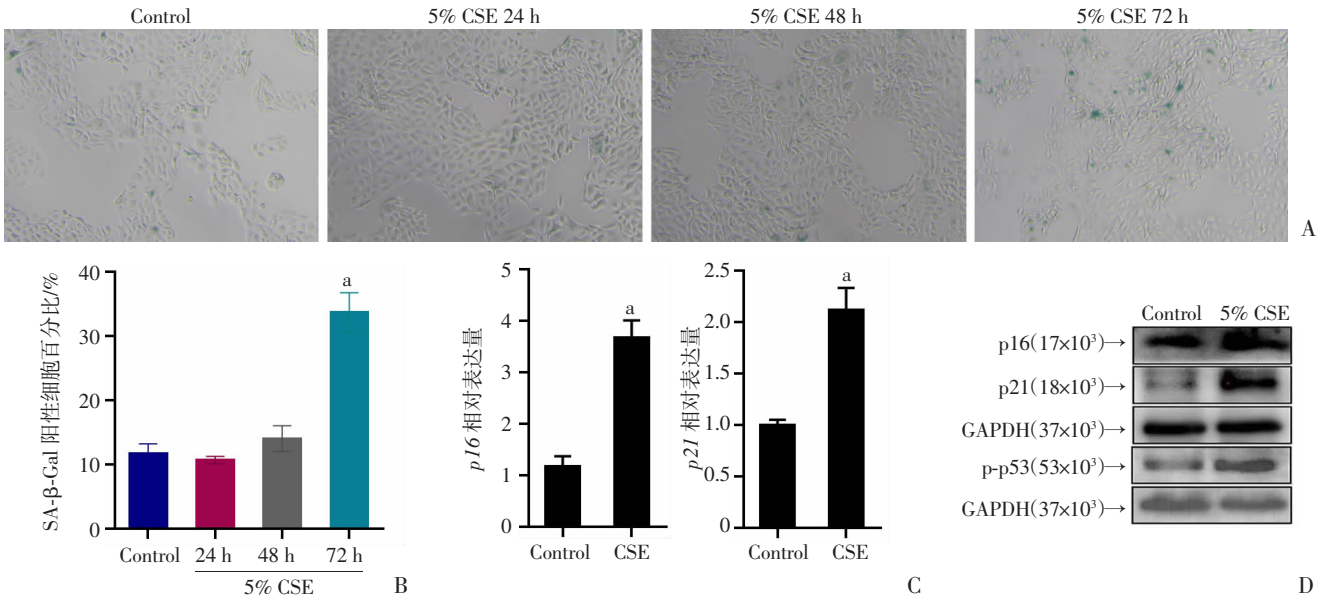
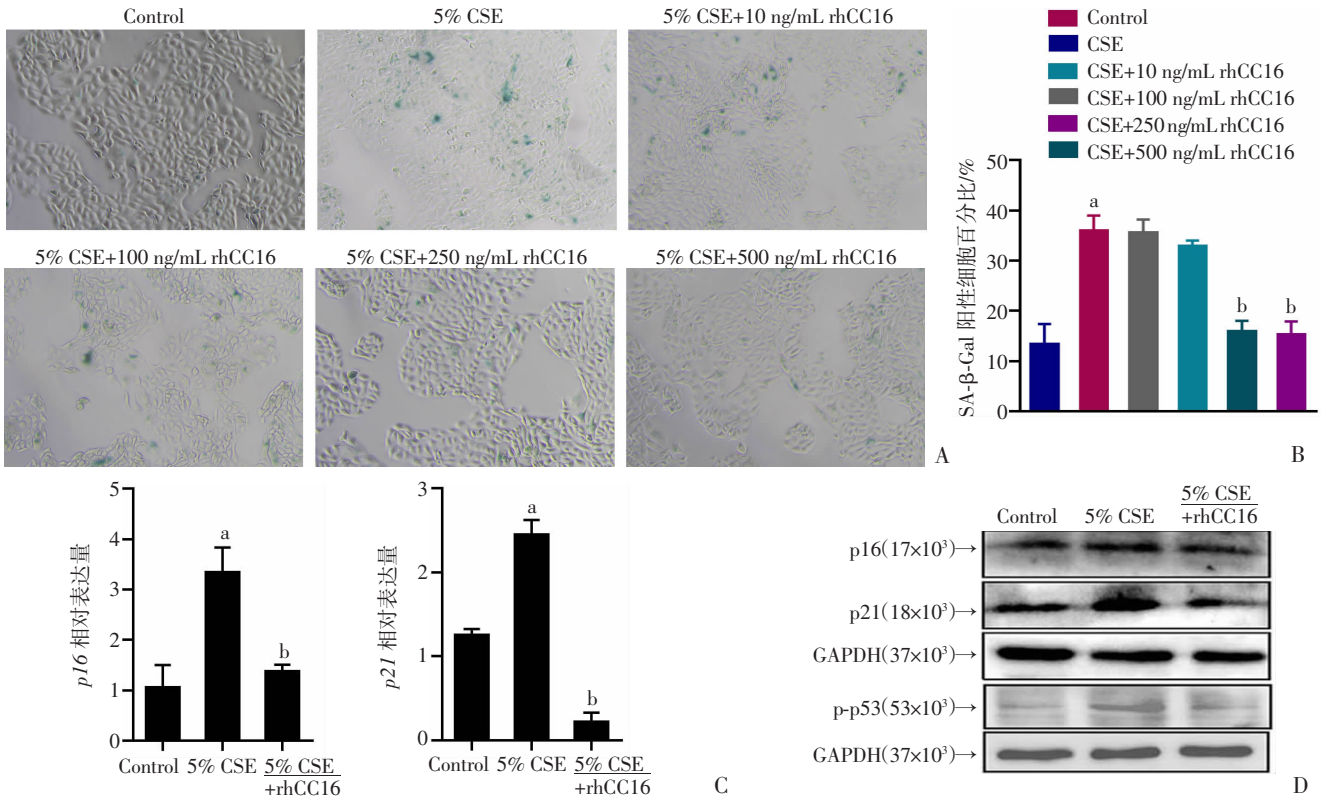


图 3 不同浓度 rhCC16 对 HBECs 活力的 CCK-8 检测



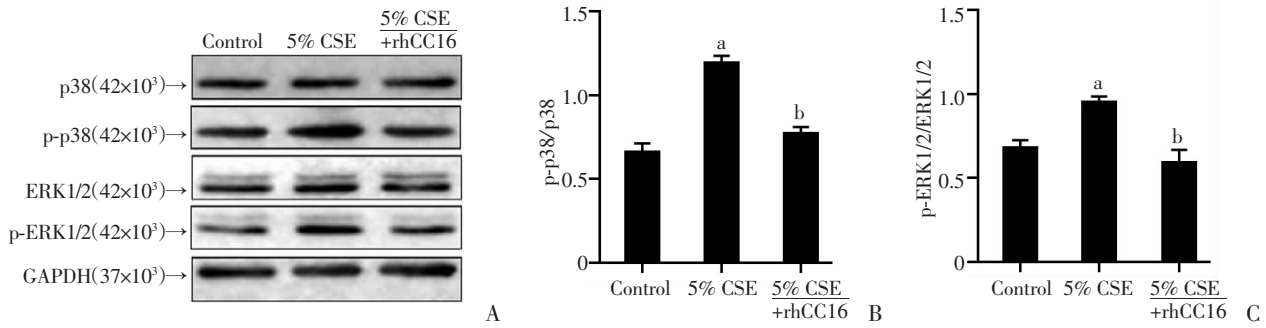
A:5% CSE 刺激 HBECs 细胞 24、48、72 h 后 β-半乳糖苷酶染色结果(×100);B: SA-β-Gal 染色结果统计分析; C:qPCR 检测 *P16*、*P21* mRNA 表达水平;D:Western blot 检测 P16、P21 和 p-P53 蛋白表达水平;a: $P<0.01$,与对照组比较

图 2 5% CSE 诱导 HBECs 衰老的检测



A:β-半乳糖苷酶染色检测 rhCC16 抑制 CSE 诱导 HBECs 衰老(×100);B: β-半乳糖苷酶染色结果统计分析;C:qPCR 检测 *P16*、*P21* mRNA 表达水平;D:Western blot 检测 P16、P21 和 p-P53 蛋白表达水平;a: $P<0.01$, 与对照组比较;b: $P<0.01$, 与 CSE 组比较

图 4 rhCC16 抑制 CSE 诱导的 HBECs 衰老



A: Western blot 检测各组细胞 P38、ERK1/2、p-P38、p-ERK1/2 的蛋白表达水平;B、C:p-p38、p-ERK 的 Western blot 结果统计分析;a: $P<0.01$, 与对照组比较;b: $P<0.01$,与 CSE 组比较

图 5 rhCC16 抑制 CSE 激活的 p38/ERK 信号通路

2.3 rhCC16 抑制 CSE 激活的 p38/ERK 信号通路

Western blot 结果显示,与对照组相比,CSE 组 p-p38 与 p-ERK1/2 蛋白表达量显著增加($P<0.05$);与 CSE 组相比,rhCC16 组 p-p38 和 p-ERK1/2 的表达量降低($P<0.05$,图 5)。

3 讨论

COPD 是世界上第二大最常见的呼吸系统疾病,具有较高的发病率及死亡率,对其药物治疗的研究一直备受重视。COPD 主要由吸烟引起,以慢性气道炎症及持续性气流受限为主要特征,而细胞衰老在 COPD 发生发展中发挥重要作用[4]。细胞衰老被定义为永久性的细胞周期阻滞,长期丧失增殖能力,但保持正常的代谢活动和活力。细胞衰老发生的机制涉及自噬受损、端粒缩短、线粒体功能障碍、营养感觉缺陷、表观遗传的改变和干细胞衰竭等[14]。细胞衰老发生时,周期蛋白依赖的激酶抑制剂 $p16^{INK4a}$ 被激活,进而导致 $p21^{CIP1}$ 的激活和细胞周期阻滞[15-16]。β-半乳糖苷

酶在 pH 为 6.0 时会有较高的酶活性,半乳糖苷键在衰老特异 β-半乳糖苷酶的催化下水解生成蓝色产物,这一现象常被视为衰老标志[17]。在 COPD 患者肺部常有衰老的肺泡上皮细胞和肺内皮细胞聚集,并且长时间持续暴露于香烟烟雾会增加气道上皮细胞的衰老标记物[18-20],提示香烟烟雾诱导的细胞衰老参与了 COPD 的发生发展。

课题组前期研究发现,rhCC16 可以抑制 CSE 诱导的 HBECs 炎症反应[12],且 rCC16 可以减缓香烟烟雾诱导的 COPD 模型小鼠的肺部炎症[21],提示其可以作为 COPD 治疗的潜在生物制剂,然而其是否可以通过抑制细胞衰老发挥抗 COPD 作用还未有报道。本研究用 5% CSE 作用 72 h 制备 HBECs 细胞衰老模型,在不影响细胞活力情形下检测其衰老标志物的表达,发现 5% CSE 增加 β-半乳糖苷酶活性,且 P16 和 P21 表达量也升高;rhCC16 蛋白质干预后,β-半乳糖苷酶活性降低,P16 和 P21 表达量亦下降。这些结果提示 CSE 能够成功诱导 HBECs 衰老,而 rhCC16 蛋白质可有效抑制其衰老。

香烟烟雾诱导 COPD 的发病机制复杂,涉及许多信号级联的改变,包括丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)[22]。MAPKs 属于丝蛋白/苏氨酸激酶家族,包括:p38 MAPK、ERK1/2 和 JNK 3 个成员[23]。肿瘤坏死因子 TNF-α 激活 MAPK 信号通路,促进小鼠 Müller 细胞增殖[24];核糖体蛋白 RPL5 通过激活 MAPK/ERK 信号通路促进结肠癌细胞增殖和迁移[25]。而在其他环境下,MAPKs 激活后促进 p16、p21、IL-6、IL-8 等分子的表达,从而引发细胞衰老和炎症反应。p38 MAPK 的激活能在衰老的细胞中诱导衰老分泌表型(senescence-associated secretory phenotype, SASP)的产生,ERK 磷酸化加速纤维细胞的衰老[26-27]。MAPKs 对细胞增殖调节的双向性可能依赖于不同的细胞类型及不同环的境刺激。本研究结果显示 CSE 刺激增加 HBECs 中 p38 MAPK 和 ERK 磷酸化水平,rrhCC16 可以降低 CSE 引起 HBECs 中 p-P38 和 p-ERK1/2 的表达水平。而动物实验亦表明 rhCC16 可以减轻 COPD 小鼠肺组织衰老,改善 COPD 模型小鼠肺功能,这一作用可能是通过 P38 MAPK/ERK1/2 信号通路实现的[28]。

有研究显示,CC16 蛋白质可以与细胞膜上 α4β1 整合素结合,通过配体/受体方式发挥 CC16 蛋白在阻塞性肺疾病中的抗炎和抗氧化作用[29]。而在肺癌组织微环境中,肿瘤相关成纤维细胞分泌的血管细胞粘附分子-1(vascual cell adhesion molecule-1, VCAM-1)通过肺癌细胞膜上 α4β1 整合素激活 MAPK 信号通路促进肺癌细胞增殖和侵袭[30]。因此,我们推测 rhCC16 通过其膜受体 α4β1 整合素-MAPKs 的介导发挥其抗衰老作用。综上,本研究表明 rhCC16 减缓 CSE 诱导的 HBECs 细胞衰老,可能是通过抑制 P38 MAPK/ERK1/2 信号通路实现的。本研究丰富了 CC16 蛋白质的功能研究,并为 rhCC16 作为干预 COPD 的潜在应用提供了实验支持。

参考文献:

[1] HOGG J C, TIMENS W. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Annu Rev Pathol, 2009, 4: 435-459. DOI: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092145.

[2] WU C T, LI G H, HUANG C T, *et al*. Acute exacerbation of a chronic obstructive pulmonary disease prediction system using wearable device data, machine learning, and deep learning: development and cohort study[J]. JMIR Mhealth Uhealth, 2021, 9(5): e22591. DOI: 10.2196/22591.

[3] WU H, MA H M, WANG L M, *et al*. Regulation of lung epithelial cell senescence in smoking-induced COPD/emphysema by microR-125a-5p via Sp1 mediation of SIRT1/HIF-1a[J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(2): 661-674. DOI: 10.7150/ijbs.65861.

[4] BARNES P J, BAKER J, DONNELLY L E. Cellular senescence as a mechanism and target in chronic lung diseases[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2019, 200(5): 556-564. DOI: 10.1164/rccm.201810-1975TR.

[5] AGHALI A, KOLOKO NGASSIE M L, PABELICK C M, *et al*. Cellular senescence in aging lungs and diseases[J]. Cells, 2022, 11(11): 1781. DOI: 10.3390/cells11111781.

[6] CORTOPASSI F, GURUNG P, PINTO-PLATA V. Chronic obstructive pulmonary disease in elderly patients[J]. Clin Geriatr Med, 2017, 33(4): 539-552. DOI: 10.1016/j.cger.2017.06.006.

[7] BROECKAERT F, BERNARD A. *Clara* cell secretory protein (CC16): characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker[J]. Clin Exp Allergy, 2000, 30(4): 469-475. DOI: 10.1046/j.1365-2222.2000.00760.x.

[8] BOERS J E, AMBERGEN A W, THUNNISSEN F B. Number and proliferation of clara cells in normal human airway epithelium[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999, 159(5 Pt 1): 1585-1591. DOI: 10.1164/ajrccm.159.5.9806044.

[9] GRIBBEN K C, POOLE J A, NELSON A J, *et al*. Relationships of serum CC16 levels with smoking status and lung function in COPD[J]. Respir Res, 2022, 23(1): 247. DOI: 10.1186/s12931-022-02158-8.

[10] LAUCHO-CONTRERAS M E, POLVERINO F, ROJAS-QUINTERO J, *et al*. Club cell protein 16 (Cc16) deficiency increases inflamm-aging in the lungs of mice[J].

Physiol Rep, 2018, 6(15): e13797. DOI: 10.14814/phy2.13797.

[11] LAUCHO-CONTRERAS M E, POLVERINO F, TESFAIGZI Y, *et al*. Club cell protein 16 (CC16) augmentation: a potential disease-modifying approach for chronic obstructive pulmonary disease (COPD)[J]. Expert Opin Ther Targets, 2016, 20(7): 869-883. DOI: 10.1517/14728222.2016.1139084.

[12] 秦轲茹. 重组 CC16 蛋白质抑制香烟烟雾诱导炎症反应的初步研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2022. DOI: 10.27288/d.cnki.gsxyu.2022.001152.
QIN K R. Preliminary study on recombinant CC16 protein inhibiting inflammatory response induced by cigarette smoke [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2022.

[13] 廖科, 陈亚娟, 赵绿翠, 等. 烟草烟雾提取物通过 TGF-β1/Smad2 通路诱导 RLE-6TN 细胞凋亡[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(14): 1412-1416. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201411195.
LIAO K, CHEN Y J, ZHAO L C, *et al*. Cigarette smoke extract induces apoptosis of RLE-6TN cells via TGF-β1/Smad2 pathway[J]. J Third Mil Med Univ, 2015, 37(14): 1412-1416. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201411195.

[14] LOPEZ-OTIN C, BLASCO M A, PARTRIDGE L, *et al*. The hallmarks of aging[J]. Cell, 2013, 153(6): 1194-1217. DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.039.

[15] MUNOZ-ESPIN D, SERRANO M. Cellular senescence: from physiology to pathology[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(7): 482-496. DOI: 10.1038/nrm3823.

[16] VAN DEURSEN J M. The role of senescent cells in ageing [J]. Nature, 2014, 509(7501): 439-446. DOI: 10.1038/nature13193.

[17] ITAHANA K, CAMPISI J, DIMRI G P. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay[J]. Methods Mol Biol, 2007, 371: 21-31. DOI: 10.1007/978-1-59745-361-5_3.

[18] TSUJI T, AOSHIBA K, NAGAI A. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 174(8): 886-893. DOI: 10.1164/rccm.200509-1374OC.

[19] AMSELLEM V, GARY-BOBO G, MARCOS E, *et al*. Telomere dysfunction causes sustained inflammation in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 184(12): 1358-1366. DOI: 10.1164/rccm.201105-0802OC.

[20] RUTTEN E P A, GOPAL P, WOUTERS E F M, *et al*. Various mechanistic pathways representing the aging process are altered in COPD[J]. Chest, 2016, 149(1): 53-61. DOI: 10.1378/chest.15-0645.

[21] PANG M, LIU H Y, LI T, *et al*. Recombinant club cell protein 16 (CC16) ameliorates cigarette smoke-induced lung inflammation in a murine disease model of COPD[J]. Mol Med Rep, 2018, 18(2): 2198-2206. DOI: 10.3892/mmr.2018.9216.

[22] BANERJEE A, KOZIOL-WHITE C, PANETTIERI R. p38 MAPK inhibitors, IKK2 inhibitors, and TNFα inhibitors in COPD[J]. Curr Opin Pharmacol, 2012, 12(3): 287-292. DOI: 10.1016/j.coph.2012.01.016.

[23] HERRANZ N, GALLAGE S, MELLONE M, *et al*. mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype[J]. Nat Cell Biol, 2015, 17(9): 1205-1217. DOI: 10.1038/ncb3225.

[24] NIU L L, FANG Y, YAO X Q, *et al*. TNFα activates MAPK and Jak-Stat pathways to promote mouse Müller cell proliferation[J]. Exp Eye Res, 2021, 202: 108353. DOI: 10.1016/j.exer.2020.108353.

[25] ZHANG H H, LIU J L, DANG Q Q, *et al*. Ribosomal protein RPL5 regulates colon cancer cell proliferation and migration through MAPK/ERK signaling pathway[J]. BMC Mol Cell Biol, 2022, 23(1): 48. DOI: 10.1186/s12860-022-00448-z.

[26] DEBACQ-CHAINIAUX F, BOILAN E, DEDESSUS LE MOUTIER J, *et al*. p38 (MAPK) in the senescence of human and murine fibroblasts[J]. Adv Exp Med Biol, 2010, 694: 126-137. DOI: 10.1007/978-1-4419-7002-2_10.

[27] DESCHEÊNES-SIMARD X, GAUMONT-LECLERC M F, BOURDEAU V, *et al*. Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation[J]. Genes Dev, 2013, 27(8): 900-915. DOI: 10.1101/gad.203984.112.

[28] 郭民, 李婷, 杨晓雪, 等. 重组人 CC16 蛋白改善慢性阻塞性肺疾病模型小鼠肺功能及其机制[J]. 中国病理生理杂志, 2023, 39(10): 1789-1795. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2023.10.008.
GUO M, LI T, YANG X X, *et al*. Recombinant human CC16 protein improves lung function in chronic ob-structive pulmonary disease mice and its mechanism[J]. Chin J Pathophysiol, 2023, 39(10): 1789-1795. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2023.10.008.

[29] JOHNSON M D L, YOUNIS U S, MENGHANI S V, *et al*. CC16 binding to $\alpha_4\beta_1$ integrin protects against *Mycoplasma pneumoniae* infection[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2021, 203(11): 1410-1418. DOI: 10.1164/rccm.202006-2576OC.

[30] ZHOU Z, ZHOU Q, WU X, *et al*. VCAM-1 secreted from cancer-associated fibroblasts enhances the growth and invasion of lung cancer cells through AKT and MAPK signaling[J]. Cancer Lett, 2020, 473: 62-73. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.12.039.

(**收稿**:2023-09-24;**修回**:2023-12-06)

(编辑 张 维)