

[文章编号] 1671-587X(2024)05-1205-12

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240503

## 烟曲霉对人支气管上皮细胞DNA损伤和IL-33表达的影响及其机制

王 侨, 曾紫菱, 王 星, 马 宁, 王志彬, 徐国锋, 袁谢芳, 王孝芸, 李月蛟, 唐红梅, 张 云  
(西南医科大学附属医院炎症与变态反应实验室, 四川 泸州 646000)

**[摘要]** **目的:** 探讨烟曲霉 (*Af*) 对人支气管上皮细胞DNA损伤和白细胞介素33 (IL-33) 表达的影响, 阐明其相关作用机制。**方法:** 采用不同浓度 (1、5和10 mg·L<sup>-1</sup>) *Af*刺激支气管上皮BEAS-2B细胞, 筛选合适的刺激浓度。采用N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 和*Af*刺激BEAS-2B细胞时, 将细胞分为对照组、*Af*组、NAC组和*Af*+NAC组。采用DNA双链断裂修复抑制剂NU7441和*Af*刺激BEAS-2B细胞时, 将细胞分为对照组、*Af*组、NU7441组和*Af*+NU7441组。采用彗星实验检测各组细胞彗星尾部DNA百分率, 采用免疫荧光法检测各组细胞中DNA损伤相关蛋白磷酸化组蛋白H2AX ( $\gamma$ H2AX) 表达水平, 采用2, 7-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 荧光探针法检测各组细胞中活性氧 (ROS) 水平, 采用实时荧光定量PCR (RT-qPCR) 法检测各组细胞中IL-33、胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP) 和白细胞介素25 (IL-25) mRNA表达水平, 采用Western blotting法检测各组细胞中磷酸化核因子 $\kappa$ B (p-NF- $\kappa$ B)、磷酸化共济失调毛细血管扩张突变 (p-ATM) 和 $\gamma$ H2AX蛋白表达水平。**结果:** 与对照组比较, 1 mg·L<sup>-1</sup> *Af*组细胞中彗星尾部DNA百分率和 $\gamma$ H2AX表达水平差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 5 mg·L<sup>-1</sup> *Af*组细胞中彗星尾部DNA百分率和 $\gamma$ H2AX表达水平明显升高 ( $P<0.01$ ); 与5 mg·L<sup>-1</sup> *Af*组比较, 10 mg·L<sup>-1</sup> *Af*组细胞中彗星尾部DNA百分率和 $\gamma$ H2AX表达水平均明显升高 ( $P<0.01$ )。与对照组比较, 1 mg·L<sup>-1</sup> *Af*组支气管上皮细胞中ROS水平明显升高 ( $P<0.05$ ); 与1 mg·L<sup>-1</sup> *Af*组比较, 5 mg·L<sup>-1</sup> *Af*组细胞中ROS水平明显升高 ( $P<0.01$ ); 与5 mg·L<sup>-1</sup> *Af*组比较, 10 mg·L<sup>-1</sup> *Af*组细胞中ROS水平明显升高 ( $P<0.05$ )。NAC处理后, 与*Af*组比较, *Af*+NAC组细胞中彗星尾部DNA百分率 ( $P<0.01$ )、 $\gamma$ H2AX表达水平 ( $P<0.05$ ) 和ROS水平 ( $P<0.01$ ) 明显降低; NU7441处理后, 与*Af*组比较, *Af*+NU7441组细胞中彗星尾部DNA百分率明显升高 ( $P<0.01$ ),  $\gamma$ H2AX表达水平明显升高 ( $P<0.01$ )。RT-qPCR检测, NAC处理后, 与对照组比较, *Af*组细胞中IL-33 mRNA表达水平明显升高 ( $P<0.05$ ); 与*Af*组比较, *Af*+NAC组细胞中IL-33 mRNA表达水平明显降低 ( $P<0.05$ ); NU7441处理后, 与*Af*组比较, *Af*+NU7441组细胞中IL-33 mRNA表达水平明显升高 ( $P<0.05$ )。Western blotting法检测, NAC处理后, 与对照组比较, *Af*组细胞中p-NF- $\kappa$ B、p-ATM和 $\gamma$ H2AX蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.05$ ); 与*Af*组比较, *Af*+NAC组细胞中p-NF- $\kappa$ B、p-ATM和 $\gamma$ H2AX蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.05$ )。NU7441处理后, 与*Af*组比较, *Af*+NU7441组细胞中p-NF- $\kappa$ B、p-ATM和 $\gamma$ H2AX蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.05$ )。**结论:** *Af*通过引起人支气管上皮细胞DNA损伤促进细胞中IL-33表达, 其机制可能与激活ATM/NF- $\kappa$ B信号通路有关。

**[关键词]** 烟曲霉; DNA损伤; 白细胞介素33; 支气管上皮细胞; 活性氧

**[中图分类号]** R392.12 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2023-09-07

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目 (82100021); 四川省科技厅自然科学基金项目 (2022NSFSC1306)

[作者简介] 王 侨 (1996—), 女, 四川省德阳市人, 在读硕士研究生, 主要从事呼吸系统相关疾病免疫学方面的研究。

[通信作者] 张 云, 副主任医师, 硕士研究生导师 (E-mail: zhangyun000hf@163.com);

唐红梅, 助理研究员, 硕士研究生导师 (E-mail: hmtang@swmu.edu.cn)

## Effect of *Aspergillus fumigatus* on DNA damage and IL-33 expression in human bronchial epithelial cells and its mechanism

WANG Qiao, ZENG Ziling, WANG Xing, MA Ning, WANG Zhibin, XU Guofeng, YUAN Xiefang,  
WANG Xiaoyun, LI Yuejiao, TANG Hongmei, ZHANG Yun  
(Laboratory of Inflammation and Allergy, Affiliated Hospital, Southwest Medical University,  
Luzhou 646000, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the effect of *Aspergillus fumigatus* (*Af*) on DNA damage and interleukin (IL)-33 expression in the human bronchial epithelial cells, and to clarify its related mechanism. **Methods:** Different concentrations (1, 5, and 10 mg·L<sup>-1</sup>) of *Af* were used to stimulate the bronchial epithelial BEAS-2B cells to select the appropriate stimulation concentration. When the BEAS-2B cells were treated with N-acetylcysteine (NAC) and *Af*, the cells were divided into control group, *Af* group, NAC group, and *Af*+NAC group. When the BEAS-2B cells were treated with DNA double-strand break repair inhibitor NU7441 and *Af*, the cells were divided into control group, *Af* group, NU7441 group, and *Af*+NU7441 group. The comet assay was used to detect the percentages of comet tail DNA of cells in various groups; immunofluorescence method was used to detect the expression levels of DNA damage-related protein phosphorylated H2AX ( $\gamma$ H2AX) in the cells in various groups; 2, 7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescence probe was used to detect the levels of reactive oxygen species (ROS) in the cells in various groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of interleukin-33 (IL-33), thymic stromal lymphopoietin (TSLP), and interleukin-25 (IL-25) mRNA in the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of phosphorylated nuclear factor  $\kappa$ B (p-NF- $\kappa$ B), phosphorylated ataxia telangiectasia mutated (p-ATM), and  $\gamma$ H2AX proteins in the cells in various groups. **Results:** Compared with control group, the percentage of comet tail DNA and the expression level of  $\gamma$ H2AX in the cells in 1 mg·L<sup>-1</sup> *Af* group showed no significant difference ( $P>0.05$ ), while the percentage of comet tail DNA and the expression level of  $\gamma$ H2AX in the cells in 5 mg·L<sup>-1</sup> *Af* group were significantly increased ( $P<0.01$ ); compared with 5 mg·L<sup>-1</sup> *Af* group, the percentage of comet tail DNA and the expression level of  $\gamma$ H2AX in the cells in 10 mg·L<sup>-1</sup> *Af* group were significantly increased ( $P<0.01$ ). Compared with control group, the ROS levels in the bronchial epithelial cells in 1 mg·L<sup>-1</sup> *Af* group was significantly increased ( $P<0.05$ ); compared with 1 mg·L<sup>-1</sup> *Af* group, the ROS level in the cells in 5 mg·L<sup>-1</sup> *Af* group was significantly increased ( $P<0.01$ ); compared with 5 mg·L<sup>-1</sup> *Af* group, the ROS level in the cells in 10 mg·L<sup>-1</sup> *Af* group was significantly increased ( $P<0.05$ ). After treatment of NAC, compared with *Af* group, the percentage of comet tail DNA ( $P<0.01$ ), the expression level of  $\gamma$ H2AX ( $P<0.05$ ), and the ROS level ( $P<0.01$ ) in the cells in *Af*+NAC group were significantly decreased; after treatment of NU7441, compared with *Af* group, the percentage of comet tail DNA and the expression level of  $\gamma$ H2AX in the cells in *Af*+NU7441 group were significantly increased ( $P<0.01$ ). The RT-qPCR results showed that after treatment of NAC, compared with control group, the expression level of IL-33 mRNA in the cells in *Af* group was significantly increased ( $P<0.05$ ); compared with *Af* group, the expression level of IL-33 mRNA in the cells in *Af*+NAC group was significantly decreased ( $P<0.05$ ); after treatment of NU7441, compared with *Af* group, the expression level of IL-33 mRNA in the cells in *Af*+NU7441 group was significantly increased ( $P<0.05$ ). The Western blotting results showed that after treatment of NAC, compared with control group, the expression levels of p-NF- $\kappa$ B, p-ATM, and  $\gamma$ H2AX proteins in the cells in *Af* group were significantly increased ( $P<0.05$ ); after treatment of NU7441, compared with *Af* group,

the expression levels of p-NF- $\kappa$ B, p-ATM, and  $\gamma$ H2AX proteins in the cells in Af+NAC group were significantly decreased ( $P<0.05$ ); After treatment of NU7441, compared with Af group, the expression levels of p-NF- $\kappa$ B, p-ATM, and  $\gamma$ H2AX proteins in the cells in Af+NU7441 group were significantly increased ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Af promotes the IL-33 expression in the human bronchial epithelial cells by causing DNA damage, and its mechanism may be related to the activation of ATM/NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**KEYWORDS** *Aspergillus fumigatus*; DNA damage; Interleukin-33; Bronchial epithelial cell; Reactive oxygen species

烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*, Af) 是迄今为止曲霉菌属中最常见的致病菌种, 其分生孢子可以被吸入并深嵌入人体气道, 引起多种肺部疾病, 包括支气管哮喘和侵袭性肺曲霉病, 特别是在免疫功能低下患者中<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2-4]</sup>显示: 支气管上皮细胞在抗 Af 免疫中起重要作用, 其中细胞因子的产生是关键。白细胞介素 33 (interleukin-33, IL-33) 是白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1) 家族中的核细胞因子, 主要由支气管上皮细胞表达, 在 2 型免疫反应和过敏性气道疾病中发挥重要作用<sup>[5]</sup>。Af 能诱导多种上皮细胞表达 IL-33, 包括人鼻窦上皮细胞<sup>[6]</sup>、人角膜上皮细胞<sup>[7]</sup>和鼠肺上皮细胞<sup>[8]</sup>, 但 Af 对人支气管上皮细胞中 IL-33 表达的影响及其机制尚不清楚。当暴露于过敏原<sup>[9]</sup>、空气细颗粒物<sup>[10]</sup>和煤尘<sup>[11]</sup>时, 支气管上皮细胞 DNA 发生损伤。宿主来源的受损 DNA 被认为是损伤相关分子模式, 能诱导 2 型免疫反应和过敏性炎症<sup>[12]</sup>。研究<sup>[13-14]</sup>显示: DNA 损伤能调节 IL-33 表达水平。本研究以人支气管上皮细胞为研究对象, 探讨 Af 对其 DNA 损伤和 IL-33 表达的影响, 分析其潜在的分子机制。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、主要试剂和仪器** BEAS-2B 细胞由中国科学院细胞库馈赠。10% 胎牛血清购于美国康宁公司, 高糖杜氏改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) 购于上海源培生物科技股份有限公司, Af 购于美国 Stallergenes Greer 生物制药公司, CometChip 试剂盒购于美国 Trevigen 生物技术公司, 人磷酸化组蛋白 H2AX (phosphorylated  $\gamma$ H2AX,  $\gamma$ H2AX) 抗体购于德国默克集团生命科学部, Alexa Fluor 555 购于赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司, 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 即用型溶液、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒、聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene

fluoride, PVDF) 膜、细胞裂解液、二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 试剂盒 (增强型) 和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 试剂盒购于广州碧云天生物技术有限公司, 逆转录试剂盒和实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 试剂盒购于南京诺维赞生物科技有限公司, Western blotting 抗体甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、核因子  $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)、磷酸化 NF- $\kappa$ B (phosphorylated NF- $\kappa$ B, p-NF- $\kappa$ B)、共济失调毛细血管扩张突变 (ataxia telangiectasia mutation, ATM) 和磷酸化 ATM (phosphorylated ATM, p-ATM) 购于美国 Cell Signaling Technology 公司, 超敏增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂盒购于四正柏生物有限公司, N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC) 购于美国 Sigma-Aldrich 公司, DNA 双链断裂修复抑制剂 NU7441 购于美国 Selleck Chemicals 公司, 4% 多聚甲醛购于北京兰杰柯科技有限公司, 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 购于德国 BioFroxx 公司。奥林巴斯转盘式共聚焦显微镜 Spin10 购于日本奥林巴斯公司, 凝胶成像分析仪购自美国伯乐公司, Centrifuge 5810R 离心机购自德国艾本德公司, Nano400 微量分光光度计购自北京原平皓生物技术有限公司, LightCycler480 II RT-qPCR 系统购自瑞士罗氏医学仪器公司。

**1.2 细胞分组和处理** BEAS-2B 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 中, 并置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养。将细胞接种于 6 孔细胞培养板中 ( $5 \times 10^5$ /孔)。24 h 后, 采用不同浓度 (1、5 和 10 mg·L<sup>-1</sup>) Af 刺激细胞时, 将细胞分为对照组 (0 mg·L<sup>-1</sup> Af 组), 1、5 和 10 mg·L<sup>-1</sup> Af 组。采用 NAC 处理细胞时, 将细胞分为对照组、Af 组、

NAC组和Af+NAC组;采用NU7441处理细胞时,将细胞分为对照组、Af组、NU7441组和Af+NU7441组。

### 1.3 彗星实验观察各组细胞彗星尾部DNA百分率

采用Af刺激细胞时,将细胞分为对照组(0 mg·L<sup>-1</sup> Af组)和1、5及10 mg·L<sup>-1</sup> Af组;采用Af+NAC刺激细胞时,将细胞分为对照组、Af组、NAC组和Af+NAC组;采用Af和NU7441刺激细胞时,将细胞分为对照组、Af组、NU7441组和Af+NU7441组。对照组细胞采用二甲基亚砷处理。24 h后,采用CometChip试剂盒进行彗星实验。显微镜下观察各组细胞DNA损伤情况。DNA损伤水平以各组细胞彗星尾部DNA百分率表示,采用comet Assay(上海Instem Information Systems有限公司)分析DNA百分率。

### 1.4 免疫荧光法检测各组细胞中 $\gamma$ H2AX表达水平

将处理后的细胞在室温下采用4%多聚甲醛固定10 min,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤3次,每次5 min;采用0.3% Triton X-100穿孔15 min, PBS缓冲液洗涤3次,每次5 min;采用2% BSA封闭30 min,  $\gamma$ H2AX一抗(1:200)4℃孵育过夜, PBS缓冲液洗涤3次,每次5 min,与Alexa Fluor 555偶联二抗(1:500)在室温下孵育2 h。室温下采用DAPI染色细胞核5 min,采用奥林巴斯转盘式共聚焦显微镜Spin10观察各组细胞核中 $\gamma$ H2AX表达情况,计算 $\gamma$ H2AX表达水平。 $\gamma$ H2AX表达水平= $\gamma$ H2AX阳性细胞数/

总细胞数 $\times$ 100%。

**1.5 2,7-二氯荧光素二乙酸酯(2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)荧光探针法检测各组细胞中ROS水平**按“1.2”中分组方法采用Af和NAC刺激BEAS-2B细胞。处理24 h后, PBS缓冲液洗涤,采用含10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> DCFH-DA的DMEM 37℃孵育细胞30 min, PBS缓冲液洗涤,采用奥林巴斯转盘式共聚焦显微镜Spin10观察细胞中ROS荧光强度,以各组细胞中ROS平均荧光强度代表ROS水平。

**1.6 RT-qPCR法检测各组细胞中IL-33、胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)和白细胞介素25(interleukin-25, IL-25) mRNA表达水平**将处理好的细胞按照RNA提取试剂盒说明书提取RNA;采用微量分光光度计测定细胞中总RNA纯度和浓度,控制A(260)/A(280)在1.8~2.2。取2  $\mu$ g各样本总RNA,采用逆转录试剂盒合成cDNA。反应总体积为20  $\mu$ L: RNA和ddH<sub>2</sub>O共16  $\mu$ L, RT-qPCR Master Mix 4  $\mu$ L。

逆转录程序:37℃、15 min, 85℃、5 s。cDNA纯化后采用PCR仪进行PCR扩增。反应总体积为10  $\mu$ L: cDNA模板1  $\mu$ L, 引物1  $\mu$ L, SYBR qPCR Master Mix 5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 3  $\mu$ L。PCR反应程序:95℃预变性30 s, 扩增循环95℃、5 s, 56℃、34 s, 共40个循环。以GAPDH为参照品,采用2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct}</sup>法计算各组细胞中IL-33、TSLP和IL-25 mRNA表达水平。RT-qPCR引物序列见表1。

表1 RT-qPCR引物序列

Tab. 1 Primer sequences of RT-qPCR

Gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
IL-33	GCCTGTCAACAGCAGTCTACTG	TGTGCTTAGAGAAGCAAGATACTC
IL-25	AACCGCCACCCAGAGTCCTGT	ACAGGCAACGGCGTGGTACA
TSLP	TATCTGGTGCCAGGCTATTTCG	TGAAGCGACGCCACAATCCTTG
GAPDH	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

### 1.7 Western blotting法检测各组细胞中p-NF- $\kappa$ B、p-ATM和 $\gamma$ H2AX蛋白表达水平

细胞刺激结束后,吸去培养基, PBS洗涤1次,加入含1%磷酸酶抑制剂和1 mmol·L<sup>-1</sup>苯甲基磺酰氟的裂解液100  $\mu$ L。冰上裂解10 min后,将细胞裂解液12 000 r·min<sup>-1</sup> (4℃)离心10 min,收集上清液,采用BCA试剂盒测定蛋白浓度。然后将样品与SDS-PAGE蛋白上样缓冲液混匀,100℃变性

5 min。配制12%的SDS-PAGE凝胶,80 V电泳1.5 h,200 mA转膜2 h,5%脱脂奶粉封闭1 h,三羟甲基氨基甲烷吐温20缓冲液(tris-buffered saline with Tween-20, TBST)洗涤3次,加入抗体GAPDH(1:2 000)、p-NF- $\kappa$ B(1:1 000)、NF- $\kappa$ B(1:1 000)、p-ATM(1:1 000)、ATM(1:1 000)和 $\gamma$ H2AX(1:1 000),4℃过夜孵育。TBST洗涤3次,4℃孵育二抗2 h, TBST洗涤3次, ECL

超敏化学底物显影。采用Image J软件分析各蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白表达水平。 $\gamma$ H2AX蛋白表达水平= $\gamma$ H2AX蛋白条带灰度值/GAPDH蛋白条带灰度值, 蛋白磷酸化水平=磷酸化蛋白条带灰度值/总蛋白条带灰度值。

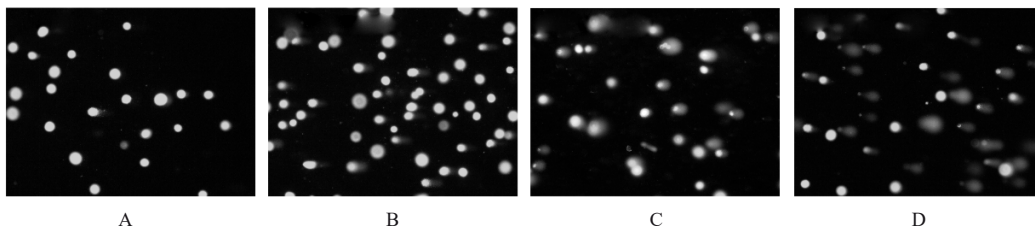
**1.8 统计学分析** 采用SPSS 23.0统计软件进行统计学分析。各组细胞中彗星尾部DNA百分率,  $\gamma$ H2AX表达水平, ROS水平, IL-33、TSLP和IL-25 mRNA表达水平, p-NF- $\kappa$ B、p-ATM和 $\gamma$ H2AX蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用Tukey-Kramer检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Af处理后各组细胞中彗星尾部DNA百分率和 $\gamma$ H2AX表达水平

与对照组比较,  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

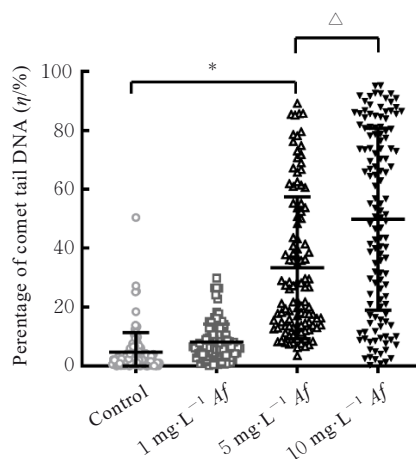
Af组细胞中彗星尾部DNA百分率差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ),  $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Af组细胞中彗星尾部DNA百分率明显升高 ( $P<0.01$ ); 与 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Af组比较,  $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Af组细胞中彗星尾部DNA百分率明显升高 ( $P<0.01$ ), 见图1和2。免疫荧光法检测结果显示: 与对照组比较,  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Af组细胞中 $\gamma$ H2AX表达水平差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ),  $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Af组细胞中 $\gamma$ H2AX表达水平明显升高 ( $P<0.01$ ); 与 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Af组比较,  $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Af组细胞中 $\gamma$ H2AX表达水平明显升高 ( $P<0.01$ ), 见图3和图4。Western blotting法检测结果显示: 与对照组比较,  $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Af组细胞中 $\gamma$ H2AX蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.05$ ); 与 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Af组比较,  $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Af组细胞中 $\gamma$ H2AX蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.01$ ), 见图5。



A: Control group; B:  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Af group; C:  $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Af group; D:  $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Af group.

图1 各组细胞中彗星尾部DNA表达情况( $\times 200$ )

Fig. 1 Expressions of comet tail DNA in cells in various groups



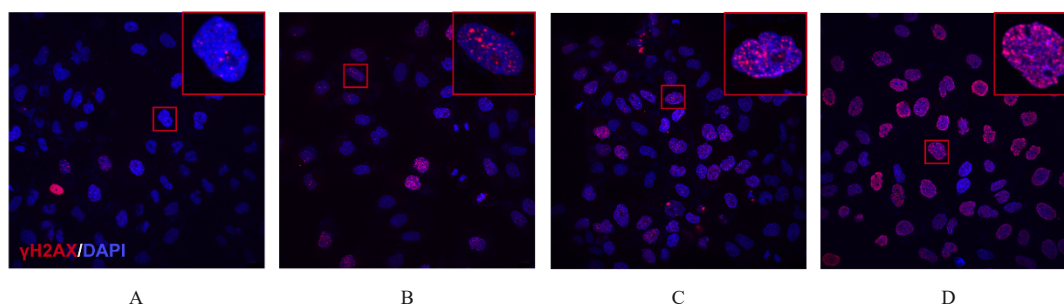
\* $P<0.01$  vs control group;  $\Delta P<0.01$  vs  $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Af group.

图2 各组细胞中彗星尾部DNA百分率

Fig. 2 Percentages of comet tail DNA in cells in various groups

**2.2 Af处理后各组细胞中ROS水平** 与对照组比较,  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Af组细胞中ROS水平明显升高 ( $P<0.05$ ); 与 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Af组比较,  $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Af组细胞中ROS水平明显升高 ( $P<0.01$ ); 与 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Af组比较,  $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Af组细胞中ROS水平明显升高 ( $P<0.05$ )。见图6和7。后续实验选用 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Af作为实验组剂量。

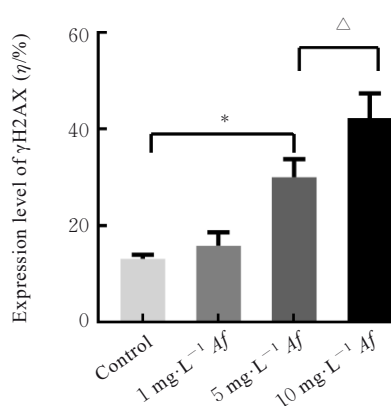
**2.3 NAC处理后各组细胞中彗星尾部DNA百分率、 $\gamma$ H2AX表达水平和ROS水平** 彗星实验结果显示: 与对照组比较, Af组细胞中彗星尾部DNA百分率明显升高 ( $P<0.01$ ), NAC组彗细胞中星尾部DNA百分率差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 与Af组比较, Af+NAC组细胞中彗星尾部DNA百分率明显降低 ( $P<0.01$ )。免疫荧光法结果显示: 与对照组比较, Af组细胞中 $\gamma$ H2AX表达水平明显升高 ( $P<0.01$ ), NAC组细胞中 $\gamma$ H2AX表达水平



A: Control group; B:  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Af group; C:  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Af group; D:  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Af group.

图3 免疫荧光法检测各组细胞中 $\gamma\text{H2AX}$ 表达情况( $\times 400$ )

Fig. 3 Expressions of  $\gamma\text{H2AX}$  in cells in various groups detected by immunofluorescence assay( $\times 400$ )



\* $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.01$  vs  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Af group.

图4 各组细胞中 $\gamma\text{H2AX}$ 表达水平

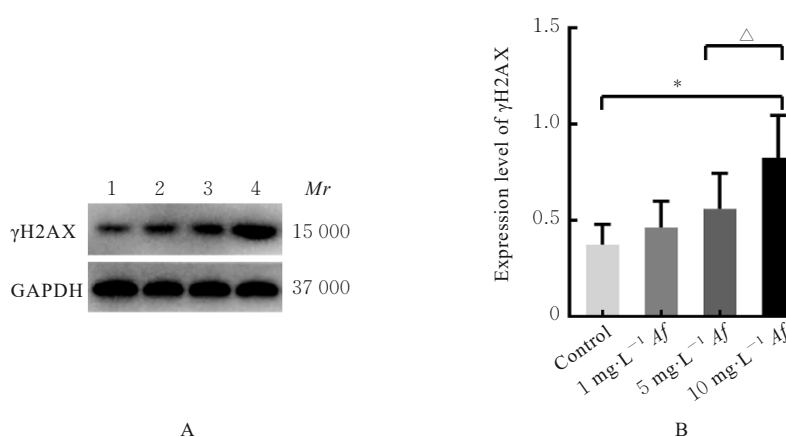
Fig. 4 Expression levels of  $\gamma\text{H2AX}$  in cells in various groups

差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与 Af 组比较, Af+NAC 组细胞中  $\gamma\text{H2AX}$  表达水平明显降低 ( $P <$

$0.05$ )。DCFH-DA 荧光探针法检测结果显示: 与对照组比较, Af 组细胞中 ROS 水平明显升高 ( $P < 0.01$ ), NAC 组细胞中 ROS 水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与 Af 组比较, Af+NAC 组细胞中 ROS 水平明显降低 ( $P < 0.01$ ), 见图 8 和 9。

**2.4 NAC 处理后各组细胞中 IL-33、TSLP 和 IL-25 mRNA 表达水平** RT-qPCR 结果显示: 与对照组比较, Af 组细胞中 IL-33 mRNA 表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与 Af 组比较, Af+NAC 组细胞中 IL-33 mRNA 表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。各组细胞中 TSLP 和 IL-25 mRNA 表达水平比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 10。

**2.5 NAC 处理后各组细胞中 p-NF- $\kappa\text{B}$ 、p-ATM 和  $\gamma\text{H2AX}$  蛋白表达水平** Western blotting 检测结果显示: 与对照组比较, Af 组细胞 p-NF- $\kappa\text{B}$ 、p-ATM 和  $\gamma\text{H2AX}$  蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), NAC 组细胞 p-NF- $\kappa\text{B}$ 、p-ATM 和  $\gamma\text{H2AX}$  蛋白表达



Lane 1: Control group; Lane 2:  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Af group; Lane 3:  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Af group; Lane 4:  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Af group. \* $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.01$  vs  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Af group.

图5 各组细胞中 $\gamma\text{H2AX}$ 蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 5 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of  $\gamma\text{H2AX}$  protein in cells in various groups

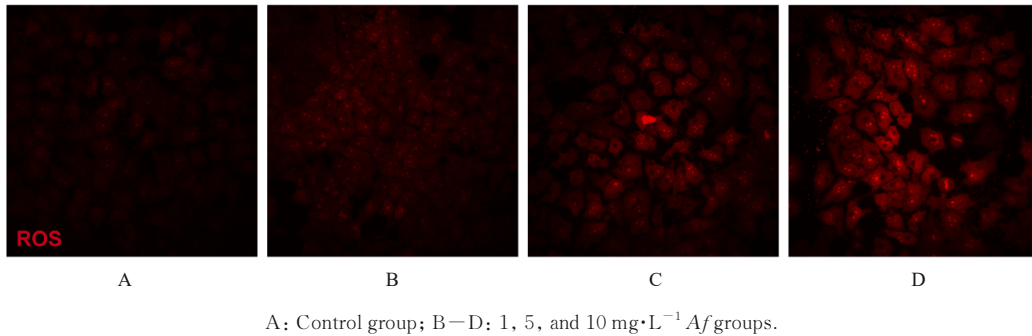
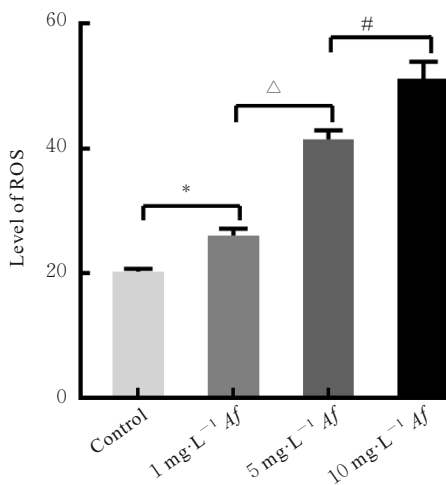


图6 DCFH-DA 荧光探针法检测各组细胞中ROS表达情况(×200)

Fig. 6 Expressions of ROS in cells in various groups detected by DCFH-DA fluorescence probe method(×200)



\* $P < 0.05$  vs control group;  $\Delta P < 0.01$  vs 1 mg·L<sup>-1</sup> Af group;  
# $P < 0.05$  vs 5 mg·L<sup>-1</sup> Af group.

图7 各组细胞中ROS水平

Fig. 7 Levels of ROS in cells in various groups

水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与 Af 组比较, Af+NAC 组细胞中 p-NF- $\kappa$ B、p-ATM 和  $\gamma$ H2AX 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图 11。

**2.6 NU7441 处理后各组细胞中彗星尾部 DNA 百分率和  $\gamma$ H2AX 表达水平** 彗星实验结果显示: 与对照组比较, Af 组细胞中彗星尾部 DNA 百分率明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与 Af 组比较, Af+NU7441 组细胞中彗星尾部 DNA 百分率明显升高 ( $P < 0.01$ )。免疫荧光结果显示: 与对照组比较, Af 组细胞中  $\gamma$ H2AX 表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ ), 与 Af 组比较, Af+NU7441 组细胞中  $\gamma$ H2AX 表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ )。见图 12 和 13。

**2.7 NU7441 处理后各组细胞中 IL-33 mRNA 和 p-NF- $\kappa$ B、p-ATM 及  $\gamma$ H2AX 蛋白表达水平** RT-qPCR 检测结果显示: 与对照组比较, Af 组细胞中 IL-33 mRNA 表达水平升高 ( $P < 0.01$ ), NU7441 组

细胞中 IL-33 mRNA 表达水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与 Af 组比较, Af+NU7441 组细胞中 IL-33 mRNA 表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ )。Western blotting 检测结果显示: 与对照组比较, Af 组细胞中 p-NF- $\kappa$ B、p-ATM 和  $\gamma$ H2AX 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), NU7441 组细胞中 p-NF- $\kappa$ B 和  $\gamma$ H2AX 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与 Af 组比较, Af+NU7441 组细胞中 p-NF- $\kappa$ B、p-ATM 和  $\gamma$ H2AX 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见图 14。

### 3 讨论

Af 是一种霉菌, 人类每天吸入约几百个 Af 分生孢子<sup>[15]</sup>。在健康宿主中, 真菌孢子从呼吸道中迅速清除。然而, 在免疫缺陷 (例如中性粒细胞减少症, 哮喘或空洞性肺病) 患者中, Af 孢子可以持续存在, 定植并导致曲霉菌病<sup>[16]</sup>。近年来支气管上皮细胞与 Af 的相互作用成为研究热点, 但关于支气管上皮细胞在抗曲霉菌防御中的作用尚不明确。本课题组假设 Af 可直接诱导高水平的 ROS 生成, 并对支气管上皮细胞造成 DNA 损伤。Af 引发肺部疾病的详细机制尚未阐明, 进一步研究可能有助于通过控制 ROS 诱导的支气管上皮细胞 DNA 损伤来有效治疗 Af 相关的肺部疾病。

ROS 是细胞代谢的副产物, 当细胞产生的 ROS 超过其抗氧化能力时, 细胞中的大分子如 DNA、脂质和碳水化合物等可能会受到损害<sup>[17]</sup>。过量 ROS 在气道和肺部引发各种病理变化, 包括气道反应性增加和肺部炎症等<sup>[18]</sup>。研究<sup>[19]</sup>显示: Af 菌丝通过促进 ROS 产生激活单核细胞中 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 炎症小体。过量 ROS 已被广泛证明能造成 DNA 氧化损伤<sup>[20]</sup>。DNA 的持续氧化损伤与多种肺部疾病有关, 如慢性肺

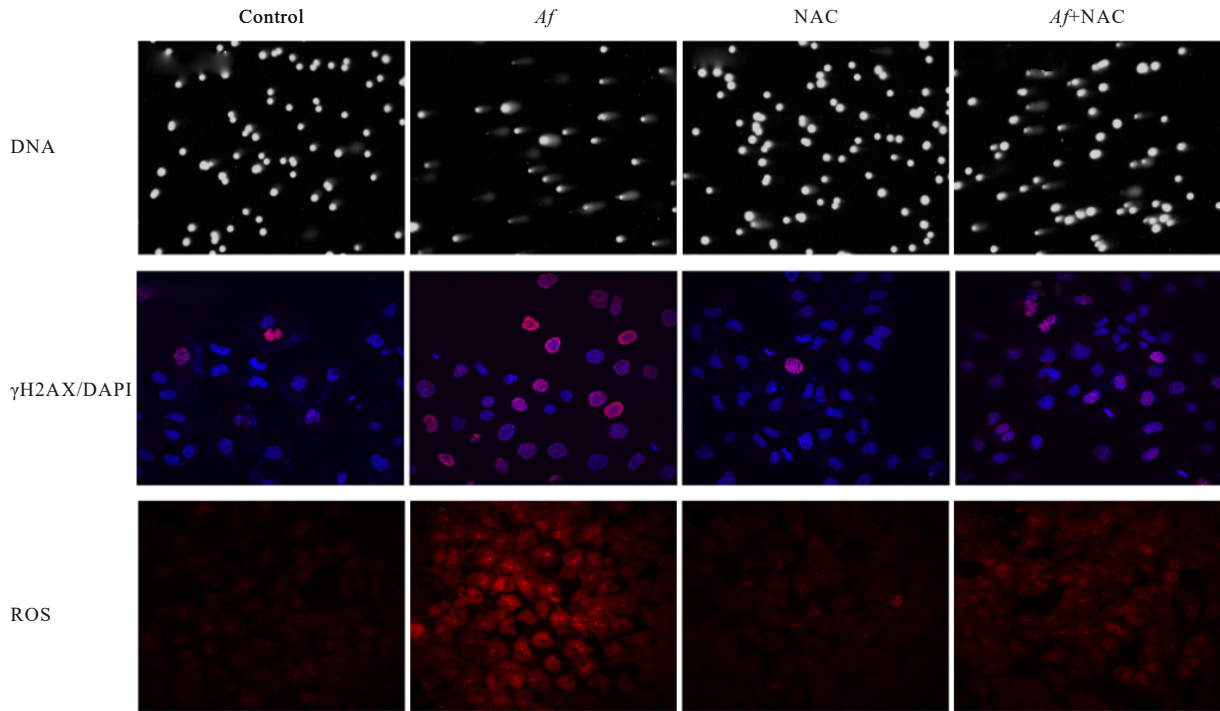
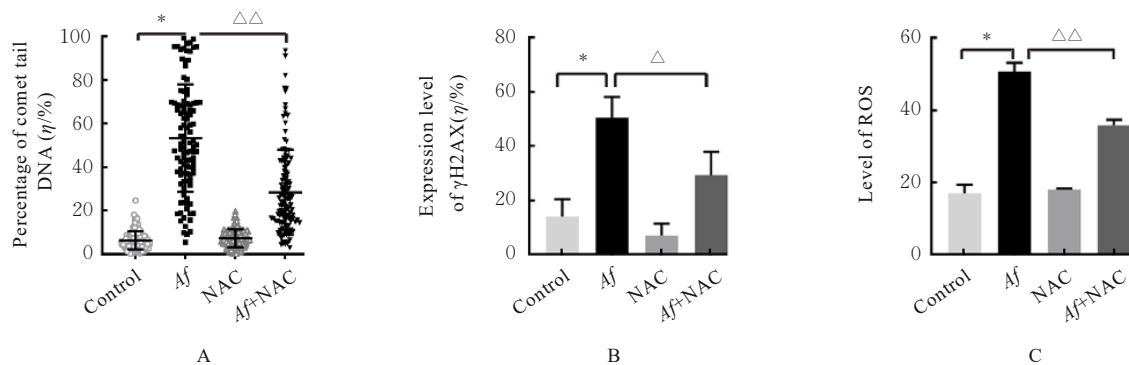


图8 各组细胞中DNA损伤情况、 $\gamma$ H2AX表达情况和ROS荧光强度( $\times 200$ )

Fig. 8 DNA damage, expressions of  $\gamma$ H2AX and fluorescence intensities of ROS in cells in various groups( $\times 200$ )



\* $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs Af group.

图9 NAC处理后各组细胞中彗星尾部DNA百分率(A)、 $\gamma$ H2AX表达水平(B)和ROS水平(C)

Fig. 9 Percentages of comet tail DNA(A), positive expression levels of  $\gamma$ H2AX(B), and levels of ROS(C) in cells in various groups after treated with NAC

病<sup>[21]</sup>、肺动脉高压<sup>[22]</sup>和肺部肿瘤<sup>[23]</sup>等。本研究结果显示：*Af*刺激的支气管上皮细胞中DNA损伤明显增加，提示*Af*可以通过诱导支气管上皮细胞氧化应激促进DNA损伤。

研究<sup>[13]</sup>显示：腺病毒转导通过激活DNA损伤机制促进内皮细胞中IL-33表达，依赖于DNA损伤传感器双链断裂修复核酸酶和干扰素调节因子1，而非下游DNA损伤反应信号。本研究结果显示：*Af*刺激支气管上皮细胞IL-33分泌，而NAC处理可抑制IL-33分泌，提示*Af*通过引起DNA损伤促进IL-33

表达。研究<sup>[24]</sup>显示：IL-33可通过IL-1受体肿瘤发生抑制蛋白2介导其生物学效应，激活NF- $\kappa$ B，并驱动体外极化的2型辅助T淋巴细胞（type 2 helper T lymphocyte, Th2），产生Th2相关的细胞因子。蛋白激酶ATM被认为是响应DNA损伤的关键信号成分，主要由DNA双链断裂（double-strand breakage, DSB）的传感器Mre11-Rad50-Nbs1三聚体复合物将其募集并激活<sup>[25]</sup>。活化的ATM通过NF- $\kappa$ B必需调节剂（NF- $\kappa$ B essential modulator, NEMO）的修饰促使ATM/NEMO复合物输出到

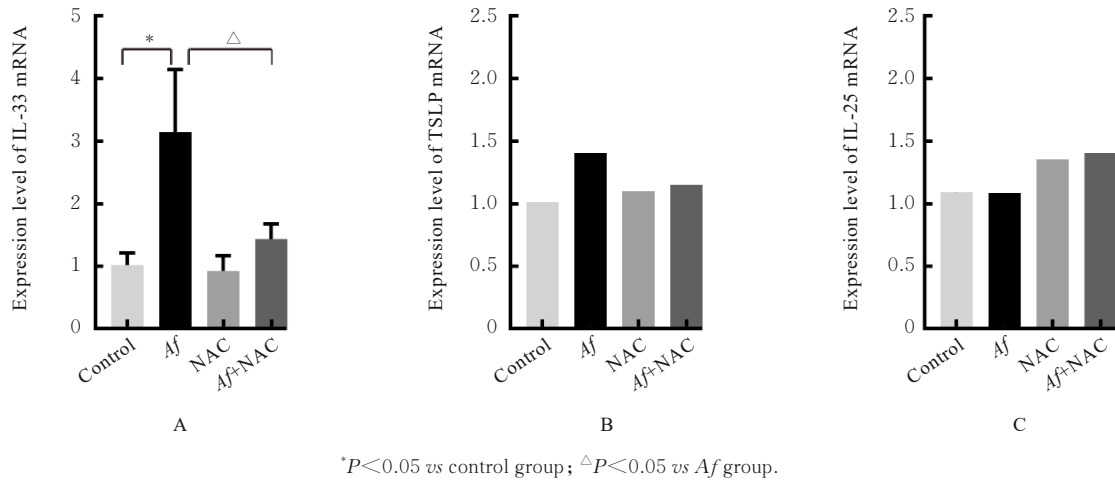
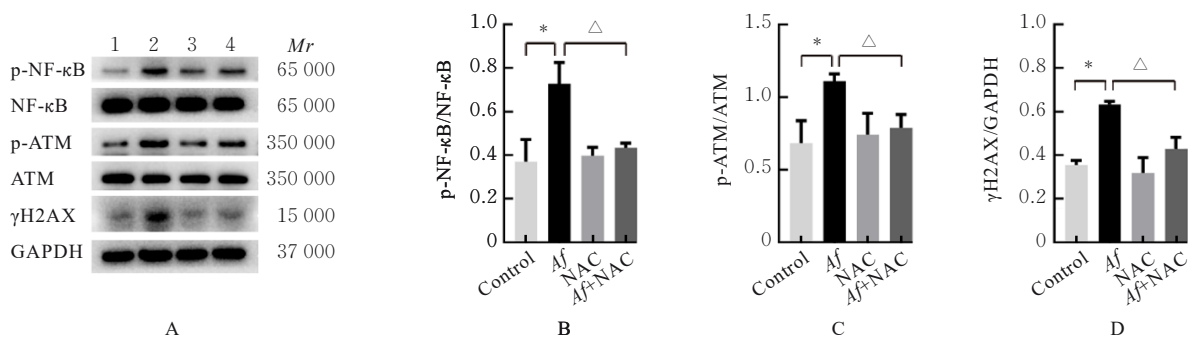


图 10 各组细胞中 IL-33(A)、TSLP(B)和 IL-25(C) mRNA 表达水平

Fig. 10 Expression levels of IL-33(A), TSLP (B), and IL-25(C) mRNA in cells in various groups



Lane 1: Control group; Lane 2: Af group; Lane 3: NAC group; Lane 4: Af+NAC group. \*P<0.01 vs control group; <sup>△</sup>P<0.05 vs Af group.

图 11 各组细胞中 p-NF-κB、NF-κB、p-ATM、ATM 和 γH2AX 蛋白表达电泳图(A)和直条图(B~D)

Fig. 11 Electrophoregram (A) and histograms (B~D) of expressions of p-NF-κB, NF-κB, p-ATM, ATM and γH2AX proteins in cells in various groups

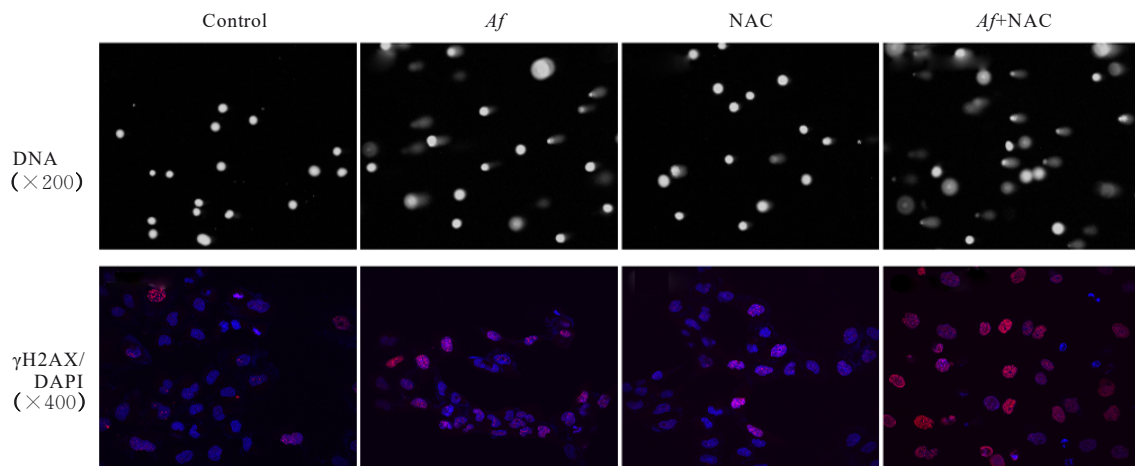


图 12 NU7441 处理后各组细胞中彗星尾部 DNA 和 γH2AX 表达情况

Fig. 12 Expressions of DNA in comet tail and γH2AX in cells in various groups after treated with NU7441

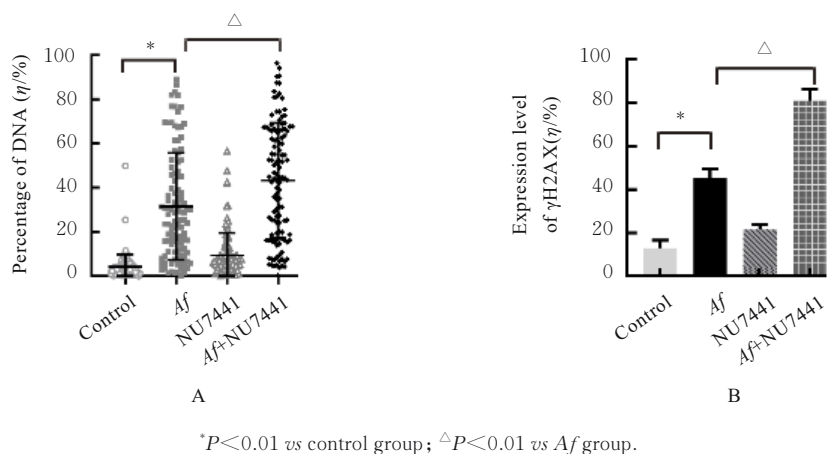
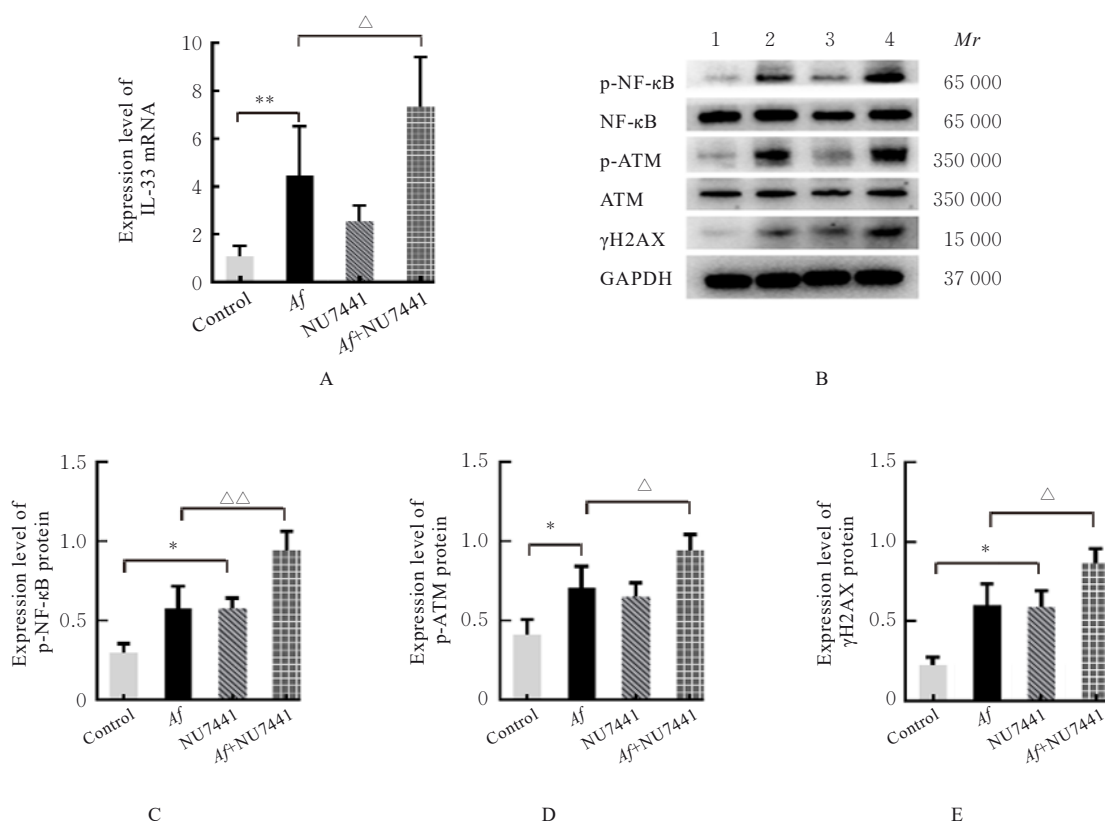


图 13 NU7441处理后各组细胞中彗星尾部DNA百分率(A)和 $\gamma$ H2AX表达水平(B)

Fig. 13 Percentages of comet tail DNA (A) and positive expression levels of  $\gamma$ H2AX(B) in cells in various groups



A: Histogram of expression level of IL-33 mRNA; B: Electrophoregram of expression levels of p-NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B, p-ATM, ATM and  $\gamma$ H2AX proteins (Lane 1: Control group; Lane 2: Af group; Lane 3: NU7441 group; Lane 4: Af+NU7441 group); C-E: Histograms of expression levels of p-NF- $\kappa$ B, p-ATM/ATM, and  $\gamma$ H2AX. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 vs control group;  $\triangle P$ <0.05,  $\triangle\triangle P$ <0.01 vs Af group.

图 14 各组细胞中 IL-33 mRNA 表达水平和 p-NF- $\kappa$ B、NF- $\kappa$ B、p-ATM、ATM 及  $\gamma$ H2AX 蛋白表达水平

Fig. 14 Expression levels of IL-33 mRNA and p-NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B, p-ATM, ATM, and  $\gamma$ H2AX proteins in cells in various groups

细胞质中触发 NF- $\kappa$ B 信号转导<sup>[26]</sup>。NF- $\kappa$ B 是一种主要的氧化还原敏感转录因子,能调节多个促炎基因的转录,如 IL-33、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18 和 Toll 样受体 4 的表达,从而引发炎症反应<sup>[27-28]</sup>。研究<sup>[29]</sup>

显示: Af 能刺激巨噬细胞产生 ROS 和 NF- $\kappa$ B 的激活。本研究结果显示: Af 刺激使支气管上皮细胞中 p-NF- $\kappa$ B、p-ATM 和  $\gamma$ H2AX 蛋白表达水平升高,而 NAC 可降低其表达。NU7441 是一种高度有效

的、选择性DNA依赖性蛋白激酶抑制剂,可诱导DNA DSB并延缓其修复<sup>[30]</sup>。本研究采用NU7441再次验证DNA损伤对IL-33 mRNA水平及p-NF- $\kappa$ B、p-ATM和 $\gamma$ H2AX蛋白表达水平的影响,结果显示:NU7441可增强Af的作用,提示Af诱导的DNA损伤可能通过激活ATM/NF- $\kappa$ B通路促进IL-33表达上调。

综上所述,Af通过诱导ROS引发的DNA损伤促进IL-33表达,引发Th2型细胞反应,可能与ATM/NF- $\kappa$ B通路有关,但其具体机制仍需进一步研究。未来应进一步结合动物实验和临床试验探索Af的炎症作用机制,为寻找Af治疗靶点提供依据。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

王侨、曾紫菱和王星参与实验过程及论文撰写,张运和唐红梅参与实验设计及论文写作指导,王星、马宁和王志彬参与实验数据分析,徐国锋、袁谢芳和李月蛟参与论文校对。

#### [参考文献]

- [1] LATGÉ J P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis[J]. Clin Microbiol Rev, 1999, 12(2): 310-350.
- [2] BIGOT J, GUILLOT L, GUITARD J, et al. Bronchial epithelial cells on the front line to fight lung infection-causing *Aspergillus fumigatus* [J]. Front Immunol, 2020, 11: 1041.
- [3] RICHARD N, MARTIL L, VARROT A, et al. Human bronchial epithelial cells inhibit *Aspergillus fumigatus* germination of extracellular conidia via FleA recognition[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 15699.
- [4] CUI X, CHEN F Y, ZHAO J Y, et al. Involvement of JNK signaling in *Aspergillus fumigatus*-induced inflammatory factors release in bronchial epithelial cells[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 1293.
- [5] DRAKE L Y, KITA H. IL-33: biological properties, functions, and roles in airway disease[J]. Immunol Rev, 2017, 278(1): 173-184.
- [6] DIETZ C J, SUN H, YAO W C, et al. *Aspergillus fumigatus* induction of IL-33 expression in chronic rhinosinusitis is PAR2-dependent [J]. Laryngoscope, 2019, 129(10): 2230-2235.
- [7] YOU J, LIN J, ZHOU Y F, et al. Role of the IL-33/ST2/p38 signaling pathway in the immune response of corneal epithelial cells to *Aspergillus fumigatus* infection[J]. Int J Ophthalmol, 2019, 12(4): 549-556.
- [8] KHOSRAVI A R, SHOKRI H, HASSAN AL-HEIDARY S, et al. Evaluation of murine lung epithelial cells (TC-1 JHU-1) line to develop Th2-promoting cytokines IL-25/IL-33/TSLP and genes Tlr2/Tlr4 in response to *Aspergillus fumigatus* [J]. J Mycol Med, 2018, 28(2): 349-354.
- [9] CHAN T K, LOH X Y, PEH H Y, et al. House dust mite-induced asthma causes oxidative damage and DNA double-strand breaks in the lungs [J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 138(1): 84-96.e1.
- [10] NIU B Y, LI W K, LI J S, et al. Effects of DNA damage and oxidative stress in human bronchial epithelial cells exposed to PM<sub>2.5</sub> from Beijing, China, in winter[J]. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17(13): 4874.
- [11] LI A M, ZHANG Y C, MA Y F, et al. The effects of coal dust exposure on DNA damage and repair of human bronchial epithelial cells[J]. Toxicol Ind Health, 2022, 38(7): 389-398.
- [12] IMANISHI T, ISHIHARA C, BADR M E L S, et al. Nucleic acid sensing by T cells initiates Th2 cell differentiation[J]. Nat Commun, 2014, 5: 3566.
- [13] STAV-NORAAS T E, EDELMANN R J, POULSEN L C, et al. Endothelial IL-33 expression is augmented by adenoviral activation of the DNA damage machinery[J]. J Immunol, 2017, 198(8): 3318-3325.
- [14] HUANG C Q, LIU J Y, HE L, et al. The long noncoding RNA noncoding RNA activated by DNA damage (NORAD)-microRNA-496-Interleukin-33 axis affects carcinoma-associated fibroblasts-mediated gastric cancer development [J]. Bioengineered, 2021, 12(2): 11738-11755.
- [15] VAN DE VEERDONK F L, GRESNIGT M S, ROMANI L, et al. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions [J]. Nat Rev Microbiol, 2017, 15(11): 661-674.
- [16] LATGÉ J P, CHAMILOS G. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis in 2019[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 33(1): e00140-18.
- [17] THANNICKAL V J, FANBURG B L. Reactive oxygen species in cell signaling[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 279(6): L1005-L1028.
- [18] ALBANO G D, GAGLIARDO R P, MONTALBANO A M, et al. Overview of the mechanisms of oxidative stress: impact in inflammation of the airway diseases[J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(11): 2237.

- [19] SAÏD-SADIER N, PADILLA E, LANGSLEY G, et al. *Aspergillus fumigatus* stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase [J]. *PLoS One*, 2010, 5(4): e10008.
- [20] SRINIVAS U S, TAN B W Q, VELLAYAPPAN B A, et al. ROS and the DNA damage response in cancer [J]. *Redox Biol*, 2019, 25: 101084.
- [21] NEOFYTOU E, TZORTZAKI E G, CHATZIANTONIOU A, et al. DNA damage due to oxidative stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(12): 16853-16864.
- [22] SHARMA S, ALDRED M A. DNA damage and repair in pulmonary arterial hypertension [J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(10): 1224.
- [23] CAO C, LAI T W, LI M, et al. Smoking-promoted oxidative DNA damage response is highly correlated to lung carcinogenesis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(14): 18919-18926.
- [24] SCHMITZ J, OWYANG A, OLDHAM E, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals *via* the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines [J]. *Immunity*, 2005, 23(5): 479-490.
- [25] MARÉCHAL A, ZOU L E. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5(9): a012716.
- [26] SALMINEN A, KAUPPINEN A, KAARNIRANTA K. Emerging role of NF- $\kappa$ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP) [J]. *Cell Signal*, 2012, 24(4): 835-845.
- [27] MITCHELL J P, CARMODY R J. NF- $\kappa$ B and the transcriptional control of inflammation [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2018, 335: 41-84.
- [28] ZHANG L W, WAN Y, MA L, et al. Inhibition of NF- $\kappa$ B/IL-33/ST2 axis ameliorates acute bronchiolitis induced by respiratory syncytial virus [J]. *J Immunol Res*, 2021, 2021: 6625551.
- [29] SUN H, XU X Y, TIAN X L, et al. Activation of NF- $\kappa$ B and respiratory burst following *Aspergillus fumigatus* stimulation of macrophages [J]. *Immunobiology*, 2014, 219(1): 25-36.
- [30] CISZEWSKI W M, TAVECCHIO M, DASTYCH J, et al. DNA-PK inhibition by NU7441 sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation and doxorubicin [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 143(1): 47-55.