

丙烯醛对肺上皮细胞增殖活力及生物钟基因 Per1蛋白表达的影响*

李聪敏¹, 刘 扬², 许莉敏¹, 吴卫东¹, 姜碧杰^{1△}

1. 新乡医学院公共卫生学院 劳动卫生与环境卫生教研室(新乡 453003);

2. 新乡医学院基础医学院 组织学与胚胎学教研室(新乡 453003)

【摘要】 目的 研究丙烯醛对肺上皮细胞增殖活力的影响及其可能机制。方法 选用A549和MLE15两种肺上皮细胞株作为模型,分别用PBS(对照组)和80 μmol/L丙烯醛处理30 min。采用CCK-8试剂盒检测丙烯醛处理结束恢复培养12 h、24 h、36 h和48 h时细胞的增殖活力,Western blot检测丙烯醛处理结束恢复培养24 h时生物钟基因Per1的蛋白表达水平。检测在恢复培养阶段加入10 mg/L转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)处理对丙烯醛处理后的肺上皮细胞增殖活力及Per1蛋白表达的影响。结果 80 μmol/L丙烯醛刺激30 min可导致A549细胞及MLE15细胞增殖活力明显降低以及细胞Per1蛋白表达下降($P<0.05$)。丙烯醛处理结束以后,在细胞恢复培养过程中添加10 mg/L TGF-β未明显改变丙烯醛诱导的细胞增殖活力的降低,但是肺上皮细胞中Per1蛋白的表达水平高于未添加TGF-β的丙烯醛处理组($P<0.05$)。结论 丙烯醛会导致肺上皮细胞增殖活力以及Per1表达量降低,TGF-β虽然不能逆转丙烯醛导致的细胞增殖活力的下降,但可以使Per1的表达得到一定程度的恢复。

【关键词】 丙烯醛 肺上皮细胞 Per1 转化生长因子-β

Effects of Acrolein on the Proliferation of and Per1 Gene Expression in Pulmonary Epithelial Cells LI Cong-min¹, LIU Yang², XU Li-min¹, WU Wei-dong¹, JIANG Bi-jie^{1△}. 1. Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China; 2. Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China

△ Corresponding author, E-mail: jiangbijie1001@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of acrolein on the proliferation of pulmonary epithelial cells and its possible mechanism. **Methods** Two strains of pulmonary epithelial cells, A549 cells and MLE15 cells, were used as *in vitro* models of pulmonary epithelial cell, and were treated with 80 μmol/L acrolein or phosphate buffer saline (PBS) as the control. The proliferation of pulmonary epithelial cells were determined with CCK-8 kit after cell culturing resumed for 12 h, 24 h, 36 h and 48 h post acrolein treatment, and the expression of period circadian regulator gene 1 (Per1) was examined using Western blot test 24 h after acrolein treatment. In addition, after acrolein treatment, the cells were restored with transforming growth factor-β (TGF-β) added in the medium, and the cell proliferation and the expression of Per1 protein were also examined. **Results** The proliferation of A549 cells and MLE15 cells decreased significantly after being treated with 80 μmol/L acrolein for 30 min, and the expression of Per1 protein was also downregulated significantly ($P<0.05$). The addition of TGF-β after acrolein treatment did not significantly change the reduction in cell proliferation caused by acrolein, but the expression of Per1 protein in pulmonary epithelial cells was significantly higher than that in cells restored without TGF-β ($P<0.05$). **Conclusion** Acrolein treatment resulted in the decreased proliferation of pulmonary epithelial cells and the Per1 expression in pulmonary epithelial cells. Although TGF-β addition did not reverse the reduction of cell proliferation after acrolein treatment, the Per1 expression levels were recovered to a certain extent compared to that in cells restored in medium without TGF-β after acrolein treatment.

【Key words】 Acrolein Pulmonary epithelial cells Per1 Transforming growth factor-β

丙烯醛是一种广泛存在的环境污染物,通常由香烟、食物、石油和生物柴油等有机质不完全燃烧产生^[1-2]。丙烯醛不仅常能在日常生活中接触,同时也是一些化工生产的中间产物,更是火灾中的重要致死因素,与化工、消防等行业的职业健康密切相关。丙烯醛的化学性质活

泼,其易与巯基发生Micheal加合反应形成烷基化化合物^[3]。丙烯醛可与多种生物大分子(包括蛋白质、DNA和磷脂)发生反应,导致线粒体功能障碍、细胞内谷胱甘肽水平降低和髓磷脂破坏等^[4-5],对呼吸系统的刺激尤为显著,常会引发肺损伤、支气管损伤、肺炎和肺癌等肺部疾病^[6]。丙烯醛引起的氧化应激,可以进一步导致生物节律的紊乱^[7-8]。有学者研究发现在丙烯醛加剧动脉粥样硬化的过程中,昼夜节律发挥了重要作用^[9]。而空气污染、吸烟、熬夜、时差等因素导致的肺组织节律功能的紊乱也可以

* 国家自然科学基金(No. 81602828、No.81573112)、河南省重点研发与推广专项(No. 182102311138)和国家级大学生创新项目(No.201610472022、No.201710472008)资助

△ 通信作者, E-mail: jiangbijie1001@163.com

导致肺部更加严重的病理变化^[10]。Per1是重要的生物钟基因^[11], 不仅调节昼夜节律, 还在细胞增殖、凋亡等生物学过程中发挥重要作用^[12]。研究Per1蛋白在丙烯醛处理的肺上皮细胞中的表达情况, 可进一步探讨丙烯醛导致机体损伤的机制, 为预防及治疗丙烯醛导致的肺损伤提供思路。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)是一个具有多种功能的细胞因子, 参与多种生物学过程^[13], 可调节细胞的增殖、分化、发育和凋亡等多种生命活动^[14]。有研究表明, TGF- β 不仅是肺纤维化形成的关键因子^[15], 而且在肺损伤中发挥调控肺上皮细胞增殖和凋亡的作用^[16-17]。本研究选用A549细胞及MLE15细胞作为实验模型, 研究丙烯醛对肺上皮细胞增殖活力的影响及其与Per1蛋白、TGF- β 作用的关系, 为预防及治疗丙烯醛导致的肺损伤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂和细胞

丙烯醛(濮阳盛华德化工有限公司)为无色透明液体, 有强烈的刺激性气味, 沸点53 °C, 熔点-88 °C, 极易溶于水且易挥发^[18]。

F12K(吉诺生物 #1808310406), 胎牛血清(FBS, Excell #FSS500), 青链霉素(Gibco #15140-122), 胰蛋白酶-EDTA(Gibco #25200-056), DMEM/F12(Hyclone #SH30023.01), 胰岛素(Sigma #i5500), 转铁蛋白(Sigma #T8158), 亚硒酸钠(Sigma #S5261), 氢化可的松(Sigma #H0888-1G), β -雌二醇(Sigma #E2758), 胶原 I(GIBCO #A10483-01), RIPA(Solarbio #R0020), 改良型Bradford试剂(Sangon #C503041), 蛋白酶抑制剂(BBI Life Science #DB0IDA003), 抗Per1小鼠单克隆抗体(Santa Cruz Blotechnology #SC-398890), 蛋白marker(Solarbio #PR1910), Cell Counting Kit-8(CCK-8, 碧云天 #C0037), Western blot膜再生液(Solarbio #SW3020), HRP耦联山羊抗小鼠IgG抗体(Proteintech #SA000-1), HRP耦联 β -actin抗体(Proteintech #HRP-60008)。其他试剂均为国产分析纯。人非小细胞肺癌细胞(A549细胞)由新乡医学院基础医学院微生物教研室馈赠, 永生化小鼠肺上皮细胞(MLE15细胞)购于Abm公司(加拿大, 列治文)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 A549细胞培养时用含10%FBS+100 μ g/mL青链霉素的DMEM/F12作为培养基。培养MLE15细胞时, 先将培养皿用0.02 mol/L胶原 I 提前包被过夜, 然后用含有5 mg/L胰岛素、10 μ g/mL转铁蛋白、3 ng/mL亚硒酸钠、10 nmol/L氢化可的松、10 nmol/L β -

雌二醇、2%FBS及100 μ g/mL青链霉素的DMEM/F12作为培养基。将细胞置于体积分数为5%CO₂、37 °C以及饱和湿度条件下培养。每天用倒置相差显微镜(BA310生物显微镜, 麦克奥迪实业集团有限公司)观察细胞密度和形态并拍照。培养基每隔2~3 d更新1次, 待细胞生长融合至80%~90%时, 用0.25%胰蛋白酶-EDTA消化并传代培养, 选择生长良好的细胞进行进一步实验。

1.2.2 细胞分组及处理 细胞处理取生长良好的细胞接种于96孔板, 每孔加100 μ L细胞悬液。将培养板在体积分数为5%CO₂、37 °C及饱和湿度条件下进行培养。细胞汇合度为80%时, 分为实验组和对照组, 每组设置3个复孔: 实验组加入80 μ mol/L丙烯醛, 对照组加入相应体积的PBS, 30 min后弃去丙烯醛及PBS, 然后用1.2.1中相同的细胞培养基清洗两遍, 加入相同培养基(或添加10 mg/L TGF- β , 具体分组情况见结果部分)在培养箱中继续培养。

1.2.3 丙烯醛对细胞增殖活力的影响 分别在丙烯醛处理前0.5 h(记为-0.5 h)以及丙烯醛处理结束恢复培养12 h、24 h、36 h和48 h时使用CCK-8试剂盒检测细胞增殖活力, 每100 μ L培养液中加入10 μ L CCK-8试剂, 继续于体积分数为5%CO₂、37 °C及饱和湿度条件下培养2 h后用Enspire多功能酶标仪2300(美国Perkinelmer)测450 nm波长的光吸收度(A₄₅₀)值。

1.2.4 Western blot检测细胞Per1蛋白表达 丙烯醛处理结束细胞恢复培养24 h后, 弃去培养基并用PBS清洗, 加入RIPA裂解液在冰上裂解细胞, 收集细胞总蛋白。在配置好的SDS-PAGE凝胶中行电泳分离, 然后转至PVDF膜上, 5%脱脂牛奶中室温封闭2 h, 加入抗Per1小鼠单克隆抗体(1:200), 4 °C孵育过夜。用TBST洗膜3遍, 每遍10 min。然后在常温下孵育HRP耦联山羊抗小鼠IgG抗体(1:2000)1 h, 用TBST洗膜3遍, 每遍10 min。进行发光和显影。之后将膜用TBST洗1遍, 然后加洗脱液, 在摇床上洗脱2次, 每次15 min。继续用TBST洗3遍, 每遍10 min。5%脱脂牛奶中室温封闭2 h后用HRP耦联 β -actin抗体(1:2000)室温孵育1 h, TBST洗3遍, 每遍10 min, 然后进行发光和显影。最后用ImageJ软件分析目的蛋白条带相对于内参的灰度值。

1.2.5 统计学方法 数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采用方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丙烯醛对肺上皮细胞增殖活力的影响

在A549细胞及MLE15细胞中, 将细胞分为丙烯醛处

理组及PBS对照组,经过丙烯醛处理后,细胞形态并未发生明显改变,但是细胞整体汇合度降低,部分细胞漂浮(图1)。CCK-8实验结果显示(图2):在丙烯醛处理结束恢复培养12 h、24 h、36 h和48 h时,实验组细胞(A549、MLE15)增殖活力低于对照组($P < 0.05$),而且随时间延长呈持续下降的趋势。对照组A549细胞的增殖活力在24 h之前呈上升趋势,说明A549细胞在用不含丙烯醛的PBS处理后,可以保持较好的增殖状态,并在24 h以后达到接触抑制,细胞增殖进入平台期。MLE15细胞由于较差的贴壁性能,在使用不含丙烯醛的PBS作为对照处理以后,有部分细胞也会呈现悬浮状态,因此在12 h时细胞增殖活力稍下降,但是在随后的24 h又呈现出上升的势态。丙烯

醛处理过的MLE15细胞尽管在24 h时也出现了增殖活力上升的趋势,但总体仍低于对照组,而且在24 h以后其活细胞数量急剧下降,有大量细胞发生凋亡或坏死。

2.2 丙烯醛对肺上皮细胞Per1蛋白表达的影响

Western blot结果显示(图3),丙烯醛处理结束细胞恢复培养24 h后,实验组Per1蛋白表达量较对照组降低($P < 0.05$)。其中,丙烯醛处理后MLE5细胞中几乎检测不到Per1蛋白的表达,提示不同的细胞系对于丙烯醛的敏感程度也存在差异。

2.3 TGF- β 对丙烯醛处理后肺上皮细胞增殖活力的影响

在丙烯醛处理后的继续培养阶段,在培养基中添加10 mg/L TGF- β ,以检验TGF- β 对丙烯醛处理后肺上皮细

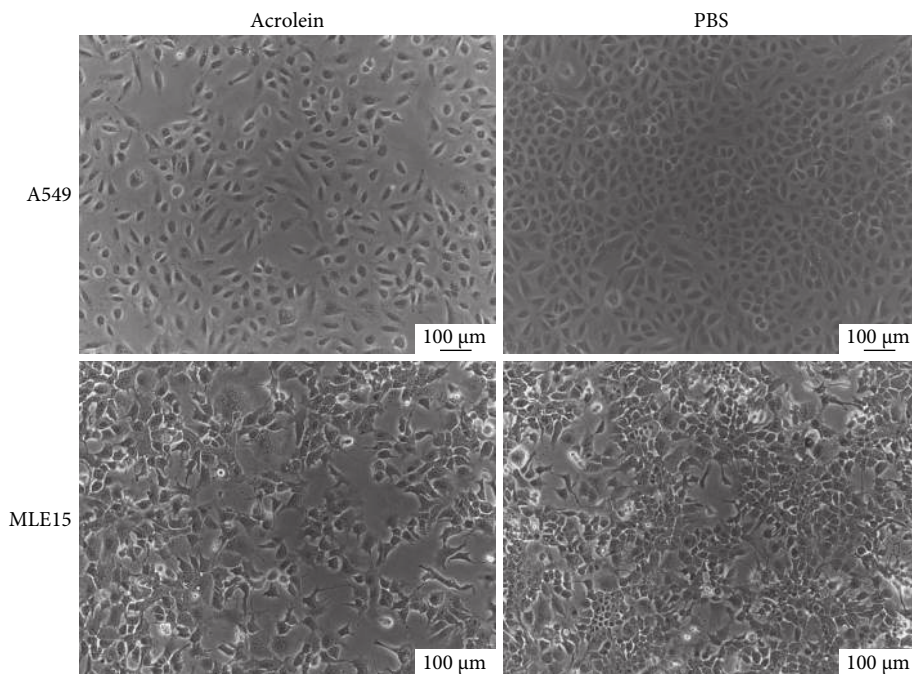


图1 丙烯醛处理24 h后肺上皮细胞形态的变化

Fig 1 The morphological change of pulmonary epithelial cells 24 h after acrolein treatment

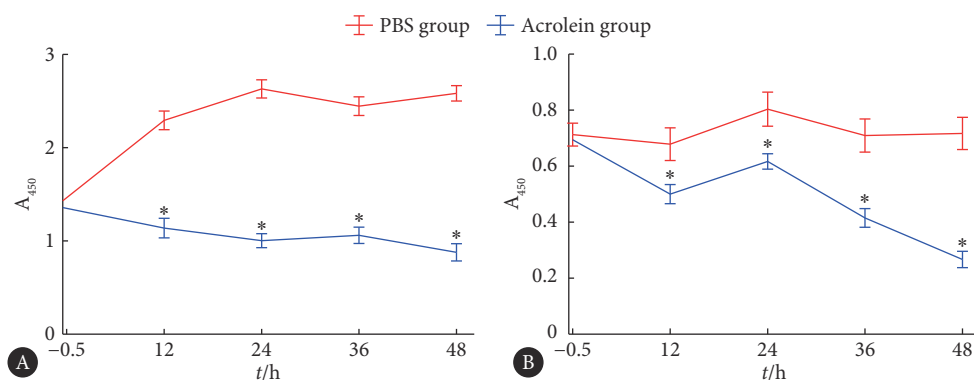


图2 丙烯醛处理后肺上皮细胞增殖活力的变化 ($n=3$)

Fig 2 Changes in the proliferation of lung epithelial cells treated with acrolein ($n=3$)

A: A549; B: MLE15. * $P < 0.05$, vs. PBS group.

胞的影响。实验分为4组,即未用丙烯醛处理且继续培养阶段未添加TGF-β(PBS+PBS组),未用丙烯醛处理但继续培养阶段添加了TGF-β(PBS+TGF-β组),使用丙烯醛处理且继续培养阶段添加了TGF-β(acrolein+TGF-β组)和使用丙烯醛处理而继续培养阶段未添加TGF-β(acrolein+PBS组)。CCK-8结果显示(图4),实验组肺上皮细胞在丙烯醛处理后的恢复培养过程中,添加10 mg/L TGF-β对细胞的增殖活力均无明显影响($P > 0.05$)。无论是否添加TGF-β,对照组肺上皮细胞的增殖活力在恢复培养后均

高于实验组肺上皮细胞($P < 0.05$),且TGF-β仍然没有对对照组细胞的增殖活力造成明显影响($P > 0.05$)。

2.4 TGF-β对丙烯醛处理后肺上皮细胞Per1蛋白表达的影响

Western blot结果显示(图5),丙烯醛处理后的肺上皮细胞在恢复培养时添加TGF-β处理24 h后,Per1蛋白表达量尽管没有恢复到未用丙烯醛处理的细胞的水平,但是相对于丙烯醛处理后没有添加TGF-β的细胞,则有增加($P < 0.05$)。

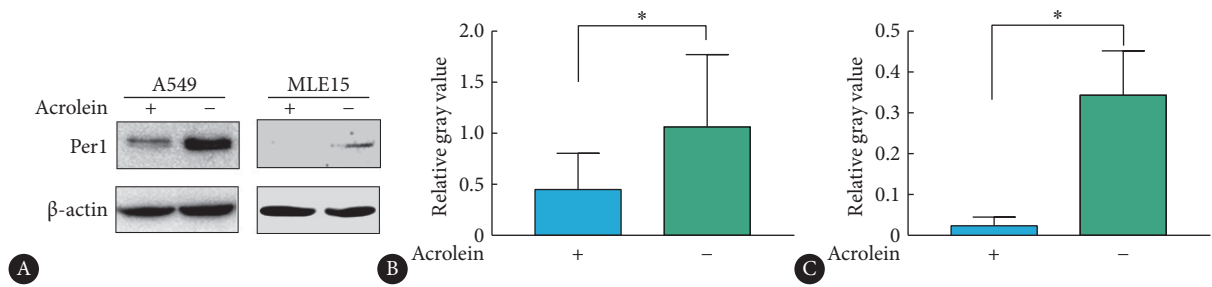


图 3 丙烯醛处理后肺上皮细胞中Per1蛋白表达量的变化

Fig 3 The expression of Per1 protein in lung epithelial cells treated with acrolein

A: Western blot bands; B: Protein expression of Per1 in A549 ($n=3$); C: Protein expression of Per1 in MLE15 ($n=3$). * $P < 0.05$.

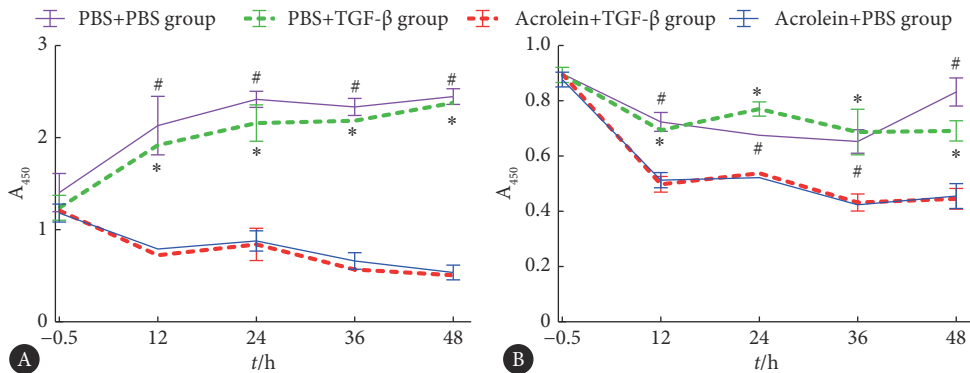


图 4 TGF-β对丙烯醛处理后肺上皮细胞增殖活力的影响 ($n=3$)

Fig 4 The proliferation of acrolein-treated pulmonary epithelial cells after TGF-beta was added in the medium ($n=3$)

A: A549; B: MLE15. * $P < 0.05$, vs. acrolein+TGF-β group; # $P < 0.05$, vs. acrolein+PBS group.

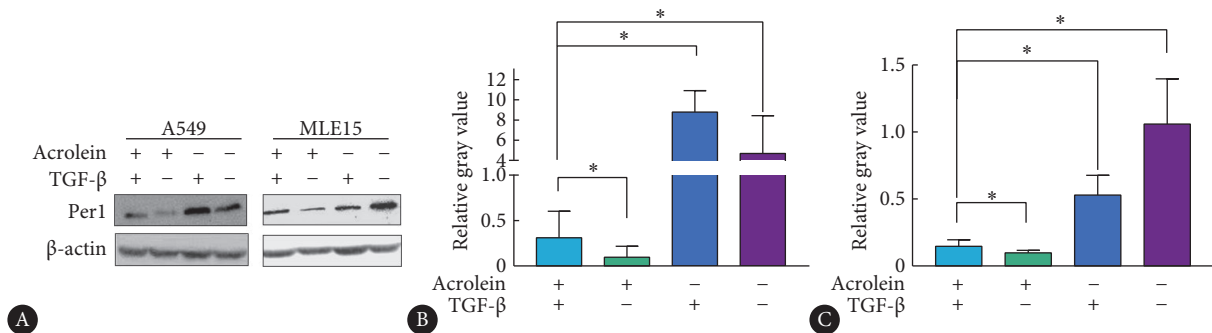


图 5 TGF-β对丙烯醛处理后肺上皮细胞中Per1蛋白表达量的影响

Fig 5 The expression of Per1 protein in acrolein-treated pulmonary epithelial cells after TGF-beta was added in the medium

A: Western blot bands; B: Protein expression of Per1 in A549 ($n=3$); C: Protein expression of Per1 in MLE15 ($n=3$). * $P < 0.05$.

3 讨论

丙烯醛作为一种性质活泼的小分子物质,能够通过多种途径影响细胞的增殖、分化以及凋亡等活动,肺上皮作为空气中的丙烯醛直接刺激的部位,其受损及之后的修复机制一直没有清晰地揭示。本研究发现丙烯醛能够导致肺上皮细胞的增殖活动受到抑制,并可能诱发其持续的凋亡,同时细胞中节律分子Per1的表达量也显著降低。由此可以推测,在丙烯醛导致细胞增殖受到抑制的过程中,节律基因可能参与了其中的调控作用。MARANO等^[19]认为在细胞周期中任何时间添加丙烯醛,都会阻止细胞进行有丝分裂。SUN等^[20]通过对小鼠进行鼻内注射丙烯醛,证明其可以造成肺上皮细胞死亡。有研究表明^[21],丙烯醛能够导致细胞死亡,用100 $\mu\text{mol/L}$ 丙烯醛处理人脐静脉内皮细胞,超过一半的细胞死亡。我们的预实验显示,用100 $\mu\text{mol/L}$ 丙烯醛处理肺上皮细胞,24 h后几乎所有细胞发生漂浮,50 $\mu\text{mol/L}$ 丙烯醛处理后Per1的表达量则未发生明显改变,而80 $\mu\text{mol/L}$ 丙烯醛处理后,大部分细胞仍然能保持贴壁生长的状态,而且可以检测到明显的Per1蛋白表达量的变化。也有对于抽烟人群的研究表明抽烟者气道表面的丙烯醛浓度最高可达80 $\mu\text{mol/L}$ ^[22]。因此,我们选用80 $\mu\text{mol/L}$ 作为本研究中丙烯醛处理的浓度。HORTON等^[23]将A549细胞暴露于丙烯醛中30 min后发现,细胞中的谷胱甘肽(GSH)和DNA合成以及与核因子- κB (NF- κB)结合均降低了80%以上,并发现丙烯醛能在不影响细胞死亡的剂量下抑制细胞增殖。有学者认为丙烯醛在体内引起氧化应激,使细胞氧化还原被丙烯醛介导的GSH缺失所破坏,这导致基因表达或转录因子激活的改变,从而影响细胞的增殖和整个细胞的健康^[24-25]。这些研究主要关注了丙烯醛通过氧化应激的途径影响细胞的增殖和凋亡活动,而本研究则首次揭示了丙烯醛处理对于节律基因的影响。

节律基因表达的改变与细胞增殖、代谢、DNA复制和修复、衰老、凋亡等方面失控有关^[26]。许多研究表明,空气污染以及抽烟等许多环境因素都能导致肺组织节律分子功能的紊乱,从而加剧肺部的病理变化^[27]。例如大气颗粒物的吸入则可导致节律基因Per1、Per2、Per3、REV-ERB α 和DBP的表达量下调^[28]。本研究中,丙烯醛处理后,Per1蛋白表达量的下降或消失可能是肺上皮细胞中增殖活动停止甚至发生凋亡的关键分子机制之一。由于TGF- β 能够使Per1的表达水平得到一定的恢复,因此可能存在一个丙烯醛/TGF- β /Per1的连锁反应,导致细胞周期受损,增殖活动阻滞,细胞进入凋亡或死亡途径。但是

丙烯醛作为一种能够广泛性的与蛋白质发生反应的小分子物质,如何对细胞内的TGF- β 信号产生影响,还有待进一步的研究和验证。

本研究结果显示,尽管添加TGF- β 使得Per1蛋白的表达量得到了一定程度的恢复,但是对于最终的细胞增殖能力并没有明显的促进作用,其原因可能是细胞的增殖活动还受到其他多方面因素的共同影响,或者对于TGF- β 的剂量有更严格的依赖性。外源性TGF- β 能显著上调细胞中的某些因子,从而参与机体创伤修复、胚胎发育及肿瘤恶性转化等过程^[29],调控多种细胞的增殖、分化以及凋亡^[30-34]。在肺上皮细胞中的一些研究显示,TGF- β 参与许多呼吸道疾病,包括肺纤维化、肺气肿、支气管哮喘和肺癌^[35]。在肺分支、形态发生和肺泡形成的过程中,TGF- β 对上皮-间质相互作用至关重要^[3]。许多研究认为,TGF- β 具有双向调节作用,它可以刺激中胚层起源的细胞如平滑肌细胞、肌细胞等增殖,但是抑制上皮细胞、内皮细胞等外胚层来源的细胞增殖^[36-37]。本研究中,虽然TGF- β 的添加并没有导致肺上皮细胞增殖活力的明显改变,但是却能导致与细胞增殖有密切关系的Per1蛋白的表达量在丙烯醛处理后又得以恢复,进一步说明TGF- β 在不同生理或病理状态下其功能的复杂性。

本研究揭示了丙烯醛处理后肺上皮细胞中Per1蛋白水平的下调,以及TGF- β 在其中的参与作用。尽管还不能完全断定这一机制是导致肺上皮细胞增殖受到阻滞甚至发生凋亡或坏死的直接原因,但是为阐明丙烯醛对细胞的毒性发生机制提示了一个可能的途径,也为研究其它因素引起的肺上皮损伤提供了借鉴的思路。下一步可以深入验证丙烯醛处理是否能够影响肺上皮细胞内TGF- β 信号通路的活性,研究TGF- β 和Per1相互调控的分子机制,并探明这些信号与肺上皮细胞增殖以及凋亡等活动的关系,由此可以为预防和治疗丙烯醛或其他类似物导致的肺上皮损伤提供更全面的理论依据。

参 考 文 献

- [1] CONKLIN D J, HABERZETTL P, JAGATHEESAN G, *et al.* Role of TRPA1 in acute cardiopulmonary toxicity of inhaled acrolein. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, 324: 61-72.
- [2] GIBBS-FLOURNOY E A, GILMOUR M I, HIGUCHI M, *et al.* Differential exposure and acute health impacts of inhaled solid-fuel emissions from rudimentary and advanced cookstoves in female CD-1 mice. *Environ Res*, 2018, 161: 35-48.
- [3] SIERRA L M, BARROS A R, GARC A M, *et al.* Acrolein genotoxicity in *Drosophila melanogaster*. I. Somatic and germinal mutagenesis under proficient repair conditions. *Mutat Res*, 1991, 260(3): 247-256.
- [4] SHI R, RICKETT T, SUN W. Acrolein-mediated injury in nervous system trauma and diseases. *Mol Nutr Food Res*, 2011, 55(9): 1320-1331.

- [5] YEAGER R P, KUSHMAN M, CHERMERYNSKI S, *et al.* Proposed mode of action for acrolein respiratory toxicity associated with inhaled tobacco smoke. *Toxicol Sci*, 2016, 151(2): 347–364.
- [6] HENNING R J, JOHNSON G T, COYLE J P, *et al.* Acrolein can cause cardiovascular disease: a review. *Cardiovasc Toxicol*, 2017, 17(3): 227–236.
- [7] KWOLEK-MIREK M, ZADRĄG-TĘCZA R, BEDNARSKA S, *et al.* Acrolein-induced oxidative stress and cell death exhibiting features of apoptosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* deficient in SOD1. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 71(3): 1525–1536.
- [8] RIE M, NAOYUKI T, HIROSHI S, *et al.* Circadian rhythms of oxidative stress markers and melatonin metabolite in patients with xeroderma pigmentosum group A. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 5741517[2019-12-14]. <https://doi.org/10.1155/2016/5741517>.
- [9] WU X, CHEN L, ZEB F, *et al.* Clock-Bmal1 mediates MMP9 induction in acrolein-promoted atherosclerosis associated with gut microbiota regulation. *Environ Pollut*, 2019, 252(Pt B): 1455–1463.
- [10] SUNDAR I K, YAO H, SELIX M T, *et al.* Circadian clock coupled lung cellular and molecular functions in chronic airway diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015, 53(3): 285–290.
- [11] MAUVOISIN D. Circadian rhythms and proteomics: it's all about posttranslational modifications. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2019, 11(5): e1450[2020-04-27]. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1450>.
- [12] 付小娟, 杨凯, 李晗雪, 等. 生物钟基因Per1对人口腔鳞状细胞癌细胞增殖、凋亡、细胞周期和体内成瘤的影响及机理. *华西口腔医学杂志*, 2016, 34(3): 255–261.
- [13] SAITO A, HORIE M, NAGASE T. TGF-beta signaling in lung health and disease. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(8): pii: E2460[2019-12-14]. <https://doi.org/10.3390/ijms19082460>.
- [14] BOGUSŁAWSKA J, RODZIK K, POPLAWSKI P, *et al.* TGF-β1 targets a microRNA network that regulates cellular adhesion and migration in renal cancer. *Cancer Lett*, 2020, 480: 52–55.
- [15] GUAN S, ZHOU J. CXCR7 attenuates the TGF-beta-induced endothelial-to-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis. *Mol Biosyst*, 2017, 13(10): 2116–2124.
- [16] HAGIMOTO N, KUWANO K, INOSHIMA I, *et al.* TGF-1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. *J Immunol*, 2002, 168(12): 6470–6478.
- [17] GU L Z, SUN H, CHEN J H. Histone deacetylases 3 deletion restrains PM2.5-induced mice lung injury by regulating NF-kappaB and TGF-beta/Smad2/3 signaling pathways. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85: 756–762.
- [18] EUA. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for acrolein. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2007: 1–5.
- [19] MARANO F, PUISEUX-DAO S. Acrolein and cell cycle. *Toxicol Lett*, 1982, 14(3/4): 143–149.
- [20] SUN Y, ITO S, NISHIO N, *et al.* Acrolein induced both pulmonary inflammation and the death of lung epithelial cells. *Toxicol Lett*, 2014, 229(2): 384–392.
- [21] LAU S, RANGARAJAN R, PHILIDET C, *et al.* Effects of acrolein in comparison to its prodrug cyclophosphamide on human primary endothelial cells *in vitro*. *Toxicol In Vitro*, 2020, 62: 104685[2019-12-14]. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104685>.
- [22] JANG J H, BRUSE S, HUNEIDI S, *et al.* Acrolein-exposed normal human lung fibroblasts *in vitro*: cellular senescence, enhanced telomere erosion, and degradation of Werner's syndrome protein. *Environ Health Perspect*, 2014, 122(9): 955–962.
- [23] HORTON N D, BISWAL S S, CORRIGAN L L, *et al.* Acrolein causes inhibitor kappaB-independent decreases in nuclear factor kappaB activation in human lung adenocarcinoma (A549) cells. *J Biol Chem*, 1999, 274(14): 9200–9206.
- [24] PARK J H, KU H J, LEE J H, *et al.* IDH2 deficiency exacerbates acrolein-induced lung injury through mitochondrial redox environment deterioration. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 1595103[2020-04-27]. <https://doi.org/10.1155/2017/1595103>.
- [25] ZHANG S, ZHANG J, CHEN H, *et al.* Combined cytotoxicity of co-exposure to aldehyde mixtures on human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *Environ Pollut*, 2019, 250: 650–661.
- [26] HERNÁNDEZ-ROSAS F, LÓPEZ-ROSAS C A, SAAVEDRA-VÉLEZ M V. Disruption of the molecular circadian clock and cancer: an epigenetic link. *Biochem Genet*, 2020, 58(1): 189–209.
- [27] SUNDAR I K, YAO H, SELIX M T, *et al.* Circadian molecular clock in lung pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 309(10): L1056–L1075.
- [28] SONG P, LI Z, LI X, *et al.* Transcriptome profiling of the lungs reveals molecular clock genes expression changes after chronic exposure to ambient air particles. *Int J Environ Res Public Health*, 2017, 14(1): pii: E90[2020-04-27]. <https://doi.org/10.3390/ijerph14010090>.
- [29] GOPAL S, VERACINI L, GRALL D, *et al.* Fibronectin-guided migration of carcinoma collectives. *Nat Commun*, 2017, 8: 14105[2019-12-14]. <https://www.nature.com/articles/ncomms14105>. doi: 10.1038/ncomms14105.
- [30] LEASK A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ Res*, 2010, 106(11): 1675–1680.
- [31] DENG Y L, XIONG X Z, CHENG N S. Organ fibrosis inhibited by blocking transforming growth factor-β signaling via peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2012, 11(5): 467–478.
- [32] GAO H, BO Z, WANG Q, *et al.* Salvianic acid B inhibits myocardial fibrosis through regulating TGF-β1/Smad signaling pathway. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 685–691.
- [33] WANG J, SHEN W, ZHANG J Y, *et al.* Stevioside attenuates isoproterenol-induced mouse myocardial fibrosis through inhibition of the myocardial NF-κB/TGF-β1/Smad signaling pathway. *Food Funct*, 2019, 10(2): 1179–1190.
- [34] 李小权, 张菊平, 刘俐, 等. 重复应用TGF-β1对缺氧缺血性新生大鼠的影响. *中国妇幼健康研究*, 2011, 22(3): 293–295.
- [35] ASCHNER Y, DOWNEY G P. Transforming growth factor-β: master regulator of the respiratory system in health and disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 54(5): 647–655.
- [36] ZIYADEH F N. Mediators of diabetic renal disease: the case for TGF-beta as the major mediator. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15 Suppl 1: S55–S57.
- [37] GOPAL S, VERACINI L, GRALL D, *et al.* Fibronectin-guided migration of carcinoma collectives. *Nat Commun*, 2017, 8: 14105[2020-04-27]. <https://www.nature.com/articles/ncomms14105>. doi: 10.1038/ncomms14105.