橄榄苦苷调节RhoA/ROCK信号通路对肺炎链球菌感染导致的肺泡上皮细胞损伤的影响

严娅芬 陆光兵 田良东 张东香*

(眉山市中医医院, 呼吸与危重症医学科, 眉山 620010)

摘要 该文探讨了橄榄苦苷(OP)调节Ras同源基因家族成员A(RhoA)/Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶(ROCK)信号通路对肺炎链球菌感染导致的肺泡上皮细胞损伤的影响。将肺泡上皮细胞A549随机分为Control组、Model组、L-OP组、M-OP组、H-OP组、U46619组(H-OP+RhoA/ROCK信号通路激活剂U46619), 除Control组正常培养外, 其余各组均以肺炎链球菌感染建立细胞损伤模型。MTT和平板克隆实验检测细胞增殖情况; 试剂盒检测细胞中超氧化物歧化酶(SOD)、活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)水平; ELISA检测细胞中白细胞介素10(IL-10)、IL-1β、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平; 流式细胞仪检测细胞凋亡情况; Western blot检测细胞中Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3、RhoA、ROCK表达情况。结果显示, 与Control组相比, Model组细胞的D_{490}、克隆数、SOD、IL-10、Bcl-2表达水平降低, 细胞凋亡率、ROS、MDA、IL-1β、TNF-α、Bax、cleaved caspase-3、RhoA、ROCK表达水平升高; 与Model组相比, L-OP组、M-OP组、H-OP组细胞的D_{490}、克隆数、SOD、IL-10、Bcl-2表达水平升高, 细胞凋亡率、ROS、MDA、IL-1β、TNF-α、Bax、cleaved caspase-3、RhoA、ROCK表达水平降低; 与H-OP组相比, U46619组细胞的D_{490}、克隆数、SOD、IL-10、Bcl-2表达水平降低, 细胞凋亡率、ROS、MDA、IL-1β、TNF-α、Bax、cleaved caspase-3、RhoA、ROCK表达水平升高。由此提示, OP可能是通过抑制RhoA/ROCK信号通路, 减轻肺炎链球菌感染导致的肺泡上皮细胞炎症与氧化应激反应, 进而促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 缓解细胞损伤的。

关键词 橄榄苦苷; RhoA/ROCK信号通路; 肺炎链球菌感染; 肺泡上皮细胞损伤

Effect of Oleuropein on Alveolar Epithelial Cell Injury Induced by *Streptococcus pneumoniae* Infection by Regulating the RhoA/ROCK Signaling Pathway

YAN Yafen, LU Guangbing, TIAN Liangdong, ZHANG Dongxiang*

(*Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Meishan Traditional Chinese Medicine Hospital, Meishan 620010, China*)

Abstract The aim of this study is to investigate the effect of OP (oleuropein) on alveolar epithelial cell injury induced by *Streptococcus pneumoniae* infection by regulating RhoA (Ras homologous gene family member A)/ROCK (Rho-associated coiled-coil kinase) signaling pathway. Alveolar epithelial cells A549 were randomly divided into Control group, Model group, L-OP group, M-OP group, H-OP group and U46619 group (H-OP+RhoA/ROCK signaling pathway activator U46619). Except for the normal culture of the Control group, the cell injury model was established with *Streptococcus pneumoniae* infection in the other groups. MTT and plate cloning were used to detect the

收稿日期: 2024-07-09 接受日期: 2024-08-23

*通信作者。Tel: 13795545225, E-mail: 405890102@qq.com

Received: July 9, 2024 Accepted: August 23, 2024

*Corresponding author. Tel: +86-13795545225, E-mail: 405890102@qq.com

proliferation of cells. The levels of SOD (superoxide dismutase), ROS (reactive oxygen species) and MDA (malondialdehyde) were detected by kits. The levels of IL-10 (interleukin-10), IL-1β and TNF-α (tumor necrosis factor-α) were detected by ELISA. Flow cytometry was used to detect apoptosis. Western blot was used to detect the expression of Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3, RhoA and ROCK. The result showed that compared with the Control group, the D_{490}, clone number, the expression levels of SOD, IL-10 and Bcl-2 in the Model group were decreased; the apoptosis rate, the expression levels of ROS, MDA, IL-1β, TNF-α, Bax, cleaved caspase-3, RhoA and ROCK were increased. Compared with the Model group, the D_{490}, clone number, the expression levels of SOD, IL-10 and Bcl-2 in L-OP group, M-OP group and H-OP group were increased; the apoptosis rate, the expression levels of ROS, MDA, IL-1β, TNF-α, Bax, cleaved caspase-3, RhoA and ROCK were decreased. Compared with the H-OP group, the D_{490}, clone number, the expression levels of SOD, IL-10 and Bcl-2 in the U46619 group were decreased; the apoptosis rate, the expression levels of ROS, MDA, IL-1β, TNF-α, Bax, cleaved caspase-3, RhoA and ROCK were increased. As a reminder, OP may alleviate inflammation and oxidative stress in alveolar epithelial cells infected with *Streptococcus pneumoniae* by inhibiting the RhoA/ROCK signaling pathway, thereby promoting cell proliferation, inhibiting cell apoptosis, and alleviating cell injury.

Keywords oleuropein; RhoA/ROCK signaling pathway; *Streptococcus pneumoniae* infection; alveolar epithelial cells injury

细菌性肺炎严重威胁着人类生命的健康问题, 每年夺去大量生命, 特别是幼儿和老年人。而肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*), 也就是通常所说的肺炎球菌, 是引发细菌性肺炎最常见的病原体[1]。简单来说, 肺炎链球菌原本是与人类和平共处的鼻咽部微生物, 但当我们的免疫系统受到抑制, 无法有效防御时, 这些细菌便会乘虚而入, 从而感染肺泡上皮细胞, 引发细胞受损甚至凋亡, 最终形成细菌性肺炎[2-3]。在机体与肺炎链球菌斗争时, 免疫系统的过度反应往往是把双刃剑, 促炎因子和抗炎因子的平衡状态一旦被打破, 便会导致肺部持续炎症和氧化应激反应, 加剧肺泡上皮细胞的损伤[4]。因此, 寻找能够有效遏制细胞炎症和氧化应激反应, 恢复肺部健康状态的策略, 成为医学界亟待解决的重要课题。研究显示, Ras同源基因家族成员A(Ras homologous gene family member A, RhoA)/Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶(Rho-associated coiled-coil kinase, ROCK)信号通路, 作为调节细胞功能的关键分子机制, 其通路的上调不仅会加剧肺内皮细胞的炎症、促进免疫细胞迁移与细胞凋亡, 还会破坏肺屏障平衡, 加剧肺损伤[5]。而CHEN等[6]在体内外实验中证明, 抑制RhoA/ROCK信号通路, 可以有效减少炎症因子的释放量, 保护细胞免受损伤, 从而缓解急性肺损伤。此外, 橄榄苦苷(oleuropein, OP)是橄榄叶提取物中的主要酚类化合物, 具有抗炎、抗氧化等多种生物活性[7]。DIKMEN等[8]已证明, OP可通过其抗氧化、抗炎的特性来改善脂多糖诱导的大鼠的急性肺损伤。然而, 在肺炎链球菌感染导致的A549细胞损伤中, OP能否通过调节RhoA/ROCK信号通路, 减轻炎症、缓解氧化应激、促进细胞增殖并抑制凋亡, 从而全面减轻细胞损伤, 这不仅是科学探索的新前沿, 更是为肺炎治疗开辟新途径的宝贵希望。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

A549细胞系购自中国科学院上海细胞库; RPMI-1640培养基(货号: 11875093)购自ThermoFisher Scientific公司; 胎牛血清(货号: SH30084)、胰蛋白酶(货号: SH30042)购自美国Hyclone公司; OP(CAS号: 32619-42-4)、RhoA/ROCK信号通路激活剂U46619(CSA: 56985-40-1)购自MCE公司; Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(货号: 40302ES60)购自上海翌圣生物技术股份有限公司; MTT试剂盒(货号: C0009S)、RIPA裂解液(货号: P0013B)、BCA蛋白定量试剂盒(货号: P0011)购自上海碧云天生物技术有限公司; SOD活性检测试剂盒(货号: ml092620)、MDA检测试剂盒(货号: ml094962)、白细胞介素-1β(IL-1β, 货号: ml058059)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α, 货号: ml077385)、白细胞介素10(IL-

10, 货号: ml064299) ELISA试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司; WB(Western blot)检测试剂盒(货号: KGP1201)购自江苏凯基生物技术股份有限公司; ECL化学发光试剂盒(货号: WBKLS0100)购自Milipore公司; 抗体Bcl-2(货号: ab182858)、Bax(货号: ab32503)、cleaved caspase-3(货号: ab2302)、RhoA(货号: ab187027)、ROCK(货号: ab45171)、GAPDH(货号: ab8245)购自英国Abcam公司; 多功能酶标仪(型号: Spectra Max M5)购自Molecular Devices公司; 凝胶成像系统(型号: BioSpectrum 810 Imaging System)购自美国ThermoFisher Scientific公司; 流式细胞仪(型号: CytoFLEX LX)购自美国Beckman Coulter公司。

1.2 方法

1.2.1 OP浓度的筛选 A549细胞使用RPMI-1640培养基(10%胎牛血清、1%青霉素−链霉素), 放置在37 ℃、5% CO_2的湿润培养箱中培养, 用1×10^8 CFU/mL肺炎链球菌感染细胞[9], 再用不同浓度(0、25、50、100、200、400 μmol/L) OP处理A549细胞24 h, 按照说明书步骤进行MTT检测, 计算细胞存活率。

1.2.2 细胞分组 将A549细胞分为Control组、Model组、L-OP、M-OP、H-OP组(50、100、200 μmol/L OP)、U46619组(200 μg/mL OP+100 nmol/L RhoA/ROCK信号通路激活剂U46619[6])。除对照组正常培养外, 其余各组均以1×10^8 CFU/mL肺炎链球菌感染建立细胞损伤模型。

1.2.3 各组细胞的增殖检测 MTT法: 取对数生长期的A549细胞接种于96孔板中, 在37 ℃、5%的CO_2浓度下培养24 h, 加入MTT溶液(5 mg/mL, 10 μL/孔), 继续培养箱培养4 h, 终止培养, 加入DMSO(150 μL/孔), 避光, 低速振荡10 min, 使结晶物充分溶解。最后, 使用多功能酶标仪在490 nm波长处测量每孔的吸光度(D_{490})值。

平板克隆法: 取对数生长期的A549细胞接种于6孔板中, 在37 ℃、5% CO_2培养箱中培养, 经常观察, 形成肉眼可见菌落后, 弃去孔内培养液, 用PBS浸洗2次, 在室温下固定液固定10 min, PBS浸洗1次, 最后用结晶紫染色, 观察菌落的形成, 拍照记录, 并使用ImageJ软件分析统计细胞的克隆数。

1.2.4 各组细胞的凋亡检测 取对数生长期的A549细胞接种于6孔板中, 培养24 h。PBS洗涤3次, 用Annexin V-FITC/PI溶液染色, 细胞筛过滤, 然后立即将其置于流式细胞仪中, 观测、分析A549细胞的凋亡情况。

1.2.5 各组细胞中SOD、ROS、MDA水平检测 收集各组细胞, 加入RIPA裂解液冰水浴中提取总蛋白, 4 ℃、12 000 ×g离心10 min, BCA测量上清中总蛋白浓度, 各组取0.2 mL, 按照试剂盒说明书测定SOD、ROS、MDA水平, 剩余蛋白样品用于WB检测。

1.2.6 各组细胞中炎性因子水平检测 收集各组细胞培养液, 4 ℃、3 000 ×g离心10 min, 取上清于−20 ℃保存备用, 按照ELISA试剂盒说明书测定IL-10、IL-1β、TNF-α浓度。

1.2.7 各组细胞中凋亡及RhoA/ROCK信号通路相关蛋白的表达测定 加入RIPA裂解液, 冰上裂解A549细胞, 制备蛋白提取液, 进行SDS-PAGE凝胶电泳, 随后, 使用湿转法把蛋白质转至PVDF膜上, 接着, 用5%脱脂奶粉室温封闭1 h, 并用1× TBST洗涤2次, 然后, 在4 ℃摇床上, Bcl-2(1:2 000)、Bax(1:5 000)、cleaved caspase-3(1:200)、RhoA(1:5 000)、ROCK(1:5 000)、GAPDH(1:5 000)一抗孵育过夜。次日, 室温, 1× TBST洗涤3次, 二抗(1:5 000)孵育1 h。最后, 加入ECL化学发光液, 凝胶成像系统观察、拍照, 并用ImageJ软件进行蛋白表达的分析、统计。

1.3 统计与分析

采用SPSS 26.0软件进行数据统计分析, 结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用SNK-q检验。P<0.05表示差异有统计学意义。

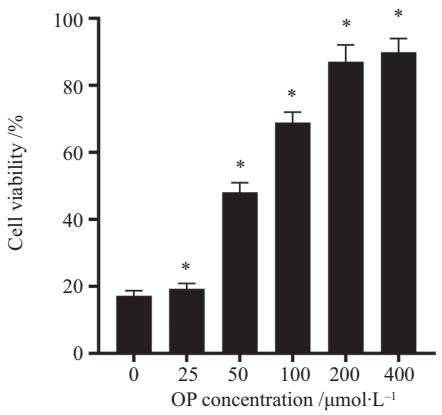
2 结果

2.1 OP浓度筛选

与0 μmol/L OP处理的肺炎链球菌感染细胞相比, 25、50、100、200、400 μmol/L OP处理的细胞存活率不断升高(P<0.05)。但与0 μmol/L OP处理的细胞相比, 25 μmol/L OP处理的细胞存活率变化较小, 与200 μmol/L OP处理的细胞相比, 400 μmol/L OP处理的细胞存活率变化较小。因此选取50、100、200 μg/mL为后续实验L-OP、M-OP、H-OP组的使用浓度(图1)。

2.2 OP对A549细胞增殖的影响

与Control组相比, Model组A549细胞的D_{490}、克隆数降低(P<0.05); 与Model组相比, L-OP组、M-OP组、H-OP组A549细胞的D_{490}、克隆数升高(P<0.05); 与H-OP组相比, U46619组A549细胞的D_{490}、克隆数降低(P<0.05)(图2)。

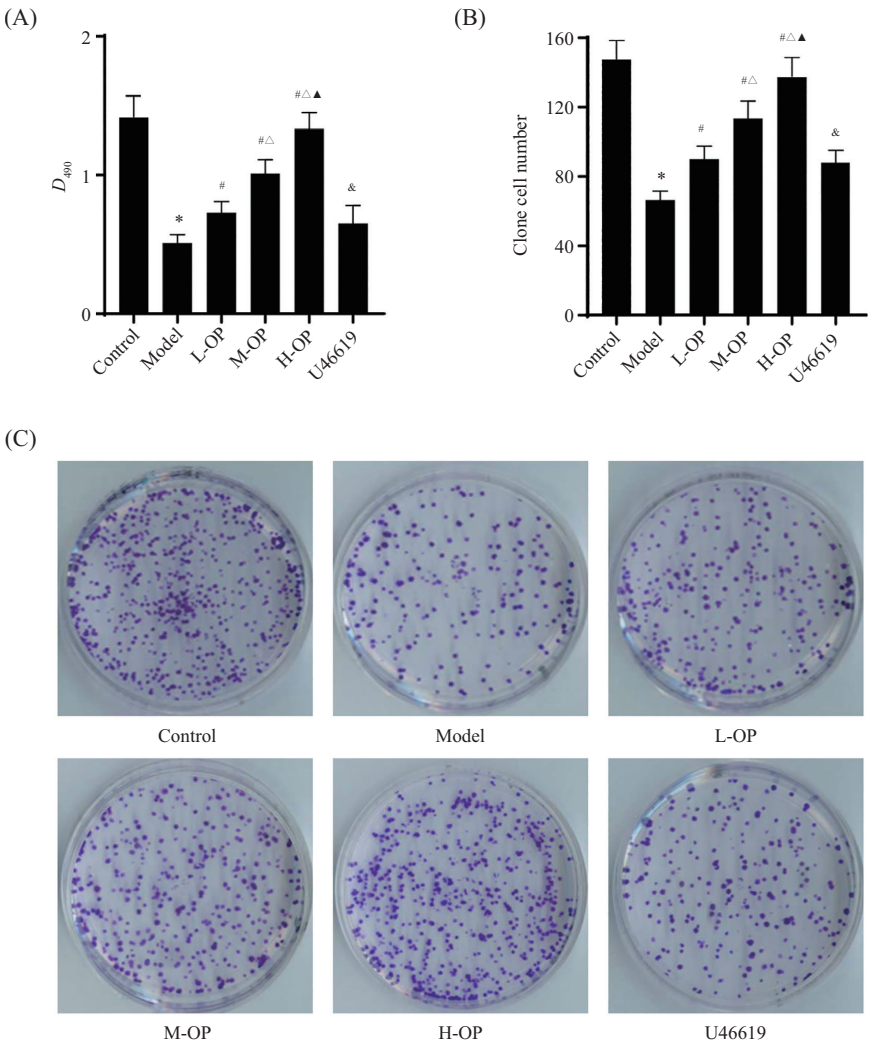


*P<0.05, 与0 μmol/L OP组比较。

*P<0.05 compared with the 0 μmol/L OP group.

图1 不同浓度OP对A549细胞存活率的影响

Fig.1 The effect of different concentrations of OP on the survival rate of A549 cells



A: MTT检测细胞增殖; B、C: 平板克隆检测细胞增殖。*P<0.05, 与Control组比较; #P<0.05, 与Model组比较; △P<0.05, 与L-OP组比较; ▲P<0.05, 与M-OP组比较; &P<0.05, 与H-OP组比较。

A: MTT assay was used to detect cell proliferation; B,C: plate clones were used to detect cell proliferation. *P<0.05 compared with the Control group; #P<0.05 compared with the Model group; △P<0.05 compared with L-OP group; ▲P<0.05 compared with M-OP group; &P<0.05 compared with H-OP group.

图2 OP对A549细胞增殖的影响

Fig.2 Effect of OP on proliferation of A549 cells

2.3 OP对A549细胞凋亡的影响

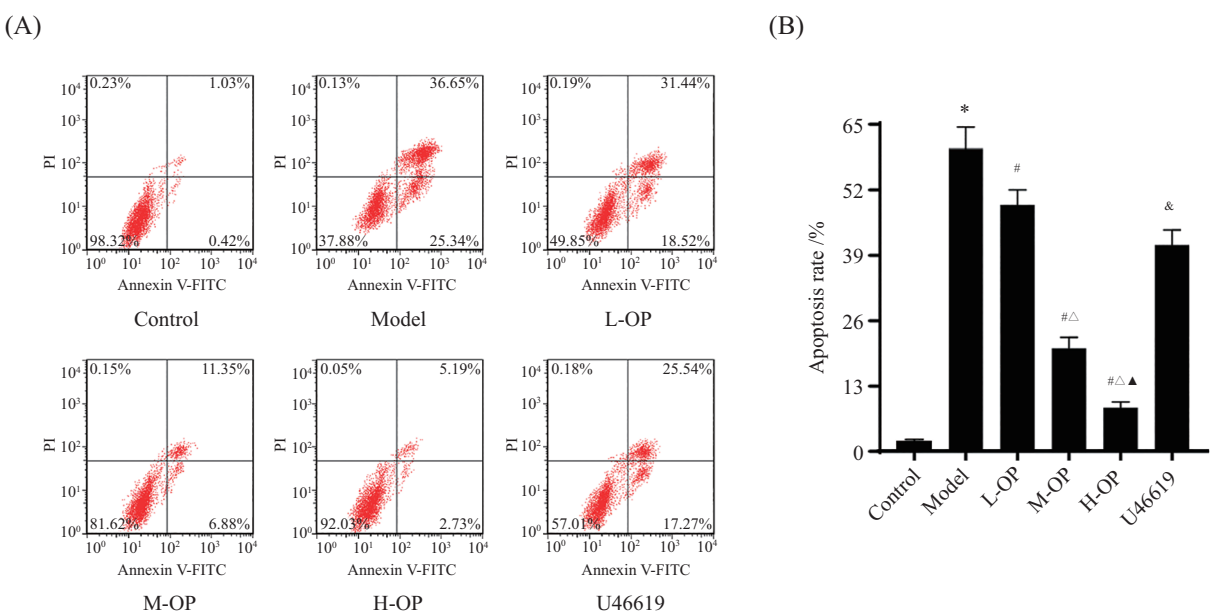
与Control组相比, Model组A549细胞凋亡率升高(P<0.05); 与Model组相比, L-OP组、M-OP组、H-OP组A549细胞凋亡率降低(P<0.05); 与H-OP组相比, U46619组A549细胞凋亡率升高(P<0.05)(图3)。

2.4 OP对A549细胞中SOD、ROS、MDA水平的影响

与Control组相比, Model组A549细胞的SOD蛋白表达水平降低, 而ROS、MDA表达水平升高(P<0.05); 与Model组相比, L-OP组、M-OP组、H-OP组A549细胞的SOD表达水平升高, 而ROS、MDA表达水平降低(P<0.05); 与H-OP组相比, U46619组A549细胞的SOD表达水平降低, 而ROS、MDA表达水平升高(P<0.05)(图4)。

2.5 OP对A549细胞中IL-10、IL-1β、TNF-α表达的影响

与Control组相比, Model组A549细胞的IL-10表达水平降低, 而IL-1β、TNF-α升高(P<0.05); 与Model组

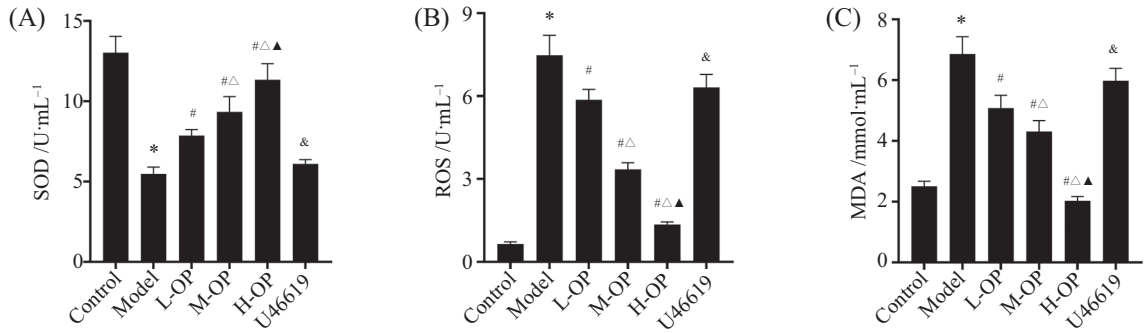


A、B: 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。*P<0.05, 与Control组比较; #P<0.05, 与Model组比较; △P<0.05, 与L-OP组比较; ▲P<0.05, 与M-OP组比较; &P<0.05, 与H-OP组比较。

A,B: flow cytometry was used to detect apoptosis. *P<0.05 compared with the Control group; #P<0.05 compared with the Model group; △P<0.05 compared with L-OP group; ▲P<0.05 compared with M-OP group; &P<0.05 compared with H-OP group.

图3 OP对A549细胞凋亡率的影响

Fig.3 Effect of OP on apoptosis rate of A549 cells

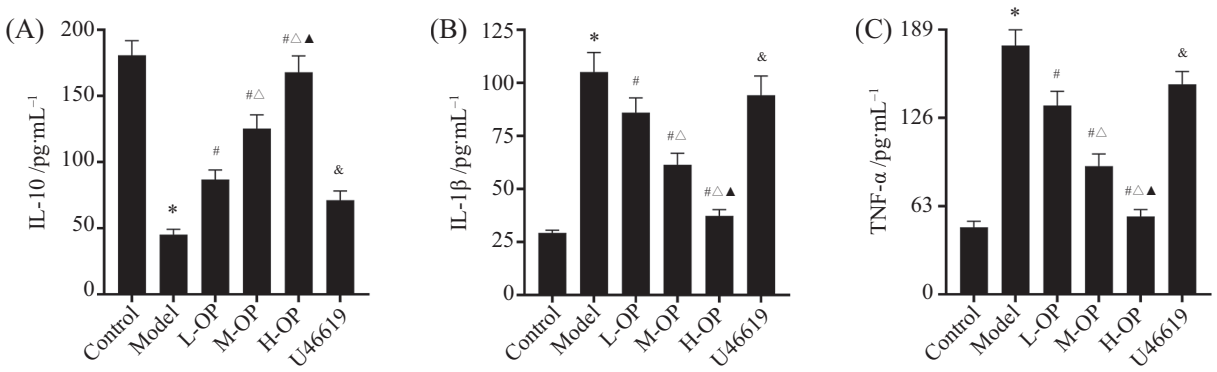


A: 试剂盒检测SOD水平; B: 试剂盒检测ROS水平; C: 试剂盒检测MDA水平。*P<0.05, 与Control组比较; #P<0.05, 与Model组比较; △P<0.05, 与L-OP组比较; ▲P<0.05, 与M-OP组比较; &P<0.05, 与H-OP组比较。

A: the kit was used to detect SOD levels; B: the kit was used to detect ROS levels; C: the kit was used to detect MDA levels. *P<0.05 compared with the Control group; #P<0.05 compared with the Model group; △P<0.05 compared with L-OP group; ▲P<0.05 compared with M-OP group; &P<0.05 compared with H-OP group.

图4 OP对A549细胞中SOD、ROS、MDA表达的影响

Fig.4 Effect of OP on the expression of SOD, ROS and MDA in A549 cells



A: ELISA检测IL-10水平; B: ELISA检测IL-1β水平; C: ELISA检测TNF-α水平。*P<0.05, 与Control组比较; #P<0.05, 与Model组比较; △P<0.05, 与L-OP组比较; ▲P<0.05, 与M-OP组比较; &P<0.05, 与H-OP组比较。

A: ELISA was used to detect IL-10 levels; B: ELISA was used to detect IL-1β levels; C: ELISA was used to detect TNF-α levels. *P<0.05 compared with the Control group; #P<0.05 compared with the Model group; △P<0.05 compared with L-OP group; ▲P<0.05 compared with M-OP group; &P<0.05 compared with H-OP group.

图5 OP对A549细胞中IL-10、IL-1β、TNF-α表达的影响

Fig.5 Effect of OP on the expression of IL-10, IL-1β and TNF-α in A549 cells

相比, L-OP组、M-OP组、H-OP组A549细胞的IL-10表达水平升高, 而IL-1β、TNF-α表达水平降低(P<0.05); 与H-OP组相比, U46619组A549细胞的IL-10表达水平降低, 而IL-1β、TNF-α表达水平升高(P<0.05)(图5)。

2.6 OP对A549细胞中凋亡及RhoA/ROCK信号通路相关蛋白表达的影响

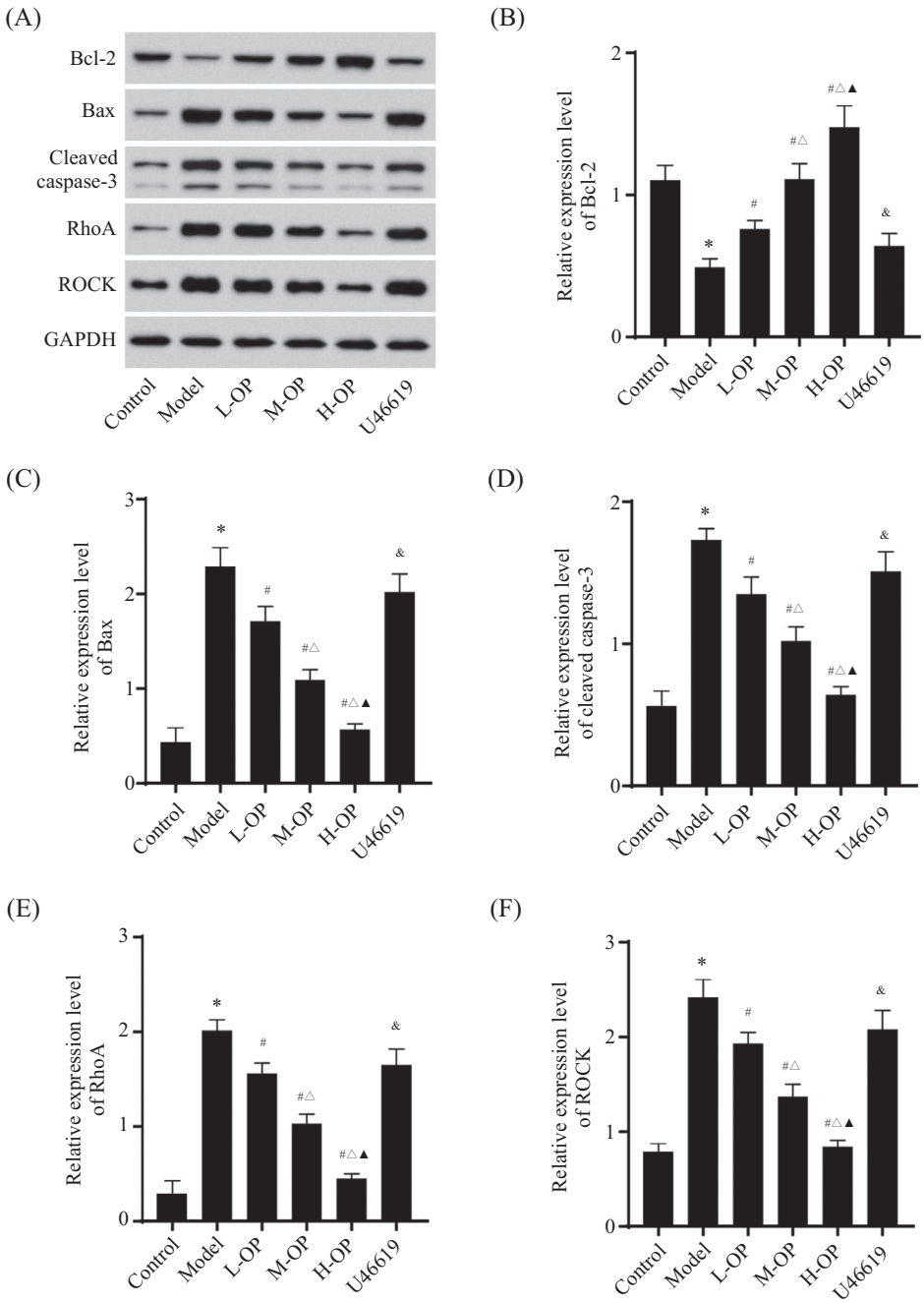
与Control组相比, Model组Bcl-2蛋白表达水平降低, Bax、cleaved caspase-3、RhoA、ROCK蛋白表达水平升高(P<0.05); 与Model组相比, L-OP组、M-OP组、H-OP组Bcl-2蛋白表达水平升高, Bax、cleaved caspase-3、RhoA、ROCK蛋白表达水平降低(P<0.05); 与H-OP组相比, U46619组Bcl-2蛋白表达水平降低, Bax、cleaved caspase-3、RhoA、ROCK蛋白表达水平升高(P<0.05)(图6)。

3 讨论

肺炎链球菌感染肺部后, 它会激活人体免疫系统, 导致炎症相关基因活跃度显著提升, 促使体内释放出大量的炎症因子, 如IL-1β和TNF-α等[10]。这些炎症因子不仅加剧肺部的炎症反应, 还可能破坏肺泡上皮细胞, 导致肺组织的结构和功能受到严重影响[11]。与此同时, 肺炎链球菌感染还会在肺部环境中引发氧化应激反应, 产生大量的ROS, 进一步加剧肺部损伤[12]。在治疗肺炎链球菌引起的肺炎时, 抗生素一直是首选武器[13]。然而, 随着抗生素的广泛应用, 肺炎链球菌的耐药性也日益增强, 这使得部分患者的治疗效果不佳。因此, 研发新的非抗生素类药物治疗肺炎链球菌肺炎, 已迫在眉睫。

随着医疗发展, 由于OP是天然多酚类化合物, 且具有优异的生物活性等作用, 被医疗领域和科研机构密切关注[14]。在体外细胞实验中, ANTOGNELLI等[15]研究表明, OP通过调控超氧阴离子与Akt信号通路的相互作用, 诱导线粒体中的GLO2蛋白表达上调, 进而触发A549细胞的凋亡程序。正如本实验结果显示, 低、中、高浓度的OP依次上调抗凋亡Bcl-2蛋白表达, 抑制促凋亡Bax、cleaved caspase-3蛋白表达, 降低细胞凋亡率, 从而促进细胞增殖。此外, HUGUET等[16]创新探索报道, 负载OP的纳米结构脂质载体, 能够持续稳定地释放OP, 在A549细胞内长效发挥抗氧化效能, 显著减轻细胞损伤。曹位平等[17]在体内动物实验中进一步证明, OP通过降低氧化应激水平和抑制炎症反应, 对缺血再灌注大鼠的心肌组织起到保护作用, 从而改善心脏功能。在本研究中, OP呈浓度依赖性降低肺炎链球菌感染诱导的氧化应激因子ROS及MDA、促炎因子IL-1β及TNF-α表达水平, 而上调抗氧化酶SOD、抗炎因子IL-10表达, 进而发挥抗炎、抗氧化生物学特性。因此, OP可以减轻肺炎链球菌感染引起的氧化应激和炎性反应, 抑制细胞凋亡, 最终促进细胞增殖, 延缓肺炎疾病进程, 但OP的作用机制复杂多样, 仍需进一步研究。

在复杂的分子机制中, RhoA/ROCK信号通路



A: Western blot检测细胞中Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3、RhoA、ROCK蛋白表达水平; B: Bcl-2蛋白相对表达水平; C: Bax蛋白相对表达水平; D: cleaved caspase-3蛋白相对表达水平; E: RhoA蛋白相对表达水平; F: ROCK蛋白相对表达水平。*P<0.05, 与Control组比较; $^{\#}P$<0.05, 与Model组比较; $^{\triangle}P$<0.05, 与L-OP组比较; $^{\blacktriangle}P$<0.05, 与M-OP组比较; $^{\&}P$<0.05, 与H-OP组比较。

A: Western blot was used to detect the protein expressions of Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3, RhoA, and ROCK. B: relative expression level of Bcl-2 protein; C: relative expression level of Bax protein; D: relative expression level of cleaved caspase-3 protein; E: relative expression level of RhoA protein; F: relative ROCK protein expression levels. *P<0.05 compared with the Control group; $^{\#}P$<0.05 compared with the Model group; $^{\triangle}P$<0.05 compared with L-OP group; $^{\blacktriangle}P$<0.05 compared with M-OP group; $^{\&}P$<0.05 compared with H-OP group.

图6 OP对A549细胞中Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3、RhoA、ROCK蛋白表达的影响

Fig.6 Effect of OP on the expression of Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3, RhoA and ROCK proteins in A549 cells

犹如一座不可或缺的桥梁, 连接着细胞内部的各个关键过程。RhoA作为小分子G蛋白家族的重要成员, 在细胞骨架的重塑、细胞运动、吞噬、转运和转录调控, 以及细胞生长等关键环节中发挥着决定性作用[18]。一旦RhoA被激活, 它便如同一个精确的指挥家, 引导下游的ROCK分子进行磷酸化, 进而对

细胞的形态、运动和连接等产生影响[19]。总的来说，RhoA/ROCK信号通路在细胞生长、分化、迁移和发育等过程中都发挥着不可替代的作用[20]。因此，对于这一信号通路的深入研究，不仅有助于我们更好地理解细胞生物学的奥秘，也可为未来的疾病治疗提供新的思路和方法。研究发现，抑制RhoA/ROCK信号通路的活性，能够有效抑制氧化应激[21]，显著抑制细胞因子释放和炎症细胞浸润[23]，最终对疾病发挥保护作用。进一步地，HE等[22]报道，阻断RhoA/ROCK信号通路不仅能改善炎症反应和氧化应激状态，还能显著减少细胞凋亡，从而有效缓解小鼠肺炎症状。本实验中，使用OP显著降低了肺炎链球菌诱导的RhoA/ROCK信号通路相关蛋白的表达水平，并减轻了细胞氧化应激与炎症反应，抑制了细胞凋亡；然而，RhoA/ROCK信号通路激活剂U46619逆转了上述变化。这揭示，OP可能通过调控RhoA/ROCK信号通路抑制细胞氧化应激并减轻炎症反应，抑制细胞凋亡，从而减轻细胞损伤。

综上所述，OP可能是通过抑制RhoA/ROCK信号通路，减轻肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞的炎症与氧化应激反应，进而促进细胞增殖，抑制细胞凋亡，最终减轻细胞损伤的。但本研究仅限于细胞层面的初步验证，关于其在体内如何运作以及其具体的生物作用机制，还需要我们进行更为详尽和深入的探究。

参考文献 (References)

[1] ESHWARA V K, MUKHOPADHYAY C, RELLO J. Community-acquired bacterial pneumonia in adults: an update [J]. Indian J Med Res, 2020, 151(4): 287-302.

[2] WEIGHT C M, VENTURINI C, POJAR S, et al. Microinvasion by *Streptococcus pneumoniae* induces epithelial innate immunity during colonisation at the human mucosal surface [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 3060.

[3] OLOTU C, LEHMENSIEK F, KOCH B, et al. *Streptococcus pneumoniae* inhibits purinergic signaling and promotes purinergic receptor P2Y2 internalization in alveolar epithelial cells [J]. J Biol Chem, 2019, 294(34): 12795-806.

[4] 范彩霞, 张宗林, 伏瑶, 等. 金合欢素通过调节Sirt1介导的AMPK/Nrf2信号通路改善肺炎链球菌感染引起的肺泡上皮细胞损伤[J]. 中国免疫学杂志(FAN C X, ZHANG Z L, FU Y. Acacetin ameliorates alveolar epithelial cell damage caused by *Streptococcus pneumoniae* infection by regulating Sirt1-mediated AMPK/Nrf2 signaling pathway [J]. Cellular & Molecular Immunology), 2024, 40(3): 513-8.

[5] ABEDI F, HAYES A W, REITER R, et al. Acute lung injury: the therapeutic role of Rho kinase inhibitors [J]. Pharmacol Res, 2020, 155: 104736.

[6] CHEN B, GONG S, LI M, et al. Protective effect of oxyberberine against acute lung injury in mice via inhibiting RhoA/ROCK signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 153: 113307.

[7] NEDIANI C, RUZZOLINI J, ROMANI A, et al. Oleuropein, a bioactive compound from *Olea europaea* L., as a potential preventive and therapeutic agent in non-communicable diseases [J]. Antioxidants, 2019, 8(12): 578.

[8] DIKMEN N, CELLAT M, ETYEMEZ M, et al. Ameliorative effects of oleuropein on lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in rats [J]. Inflammation, 2021, 44(6): 2246-59.

[9] 余莉萍, 余淑菁, 李旭成, 等. 玄参提取物调控circ_0038467/miR-495对肺炎链球菌诱导的肺泡上皮细胞损伤的影响[J]. 中国免疫学杂志(YU L P, YU S J, LI X C, et al. Effect of extract from scrophulariae on damage of alveolar epithelial cells induced by *Streptococcus pneumoniae* regulating by circ_0038467/miR-495 [J]. Cellular & Molecular Immunology), 2023, 39(2): 257-60.

[10] SUBRAMANIAN K, NEILL D R, MALAK H A, et al. Pneumolysin binds to the mannose receptor C type 1 (MRC-1) leading to anti-inflammatory responses and enhanced pneumococcal survival [J]. Nat Microbiol, 2019, 4(1): 62-70.

[11] SUBRAMANIAN K, HENRIQUES B, NORMARK S. Emerging concepts in the pathogenesis of the *Streptococcus pneumoniae*: from nasopharyngeal colonizer to intracellular pathogen [J]. Cell Microbiol, 2019, 21(11): e13077.

[12] HERNANDEZ M, OLIVERO N B, ZAPPIA V E, et al. The oxidative stress response of *Streptococcus pneumoniae*: its contribution to both extracellular and intracellular survival [J]. Front Microbiol, 2023, 14: 1269843.

[13] NARI G B, NIEDERMAN M S. Updates on community acquired pneumonia management in the ICU [J]. Pharmacol Ther, 2021, 217: 107663.

[14] 汪浅, 葛怡青, 仝涛. 橄榄苦苷的生物活性研究进展[J]. 食品工业科技(WANG Q, GE Y Q, TONG T, et al. Research progress on bioactivities of oleuropein [J]. Sci Technol Food Ind), 2022, 43(19): 479-86.

[15] ANTOGNELLI C, FROSINI R, SANTOLLA M F, et al. Oleuropein-induced apoptosis is mediated by mitochondrial glyoxalase 2 in nsclc a549 cells: a mechanistic inside and a possible novel nonenzymatic role for an ancient enzyme [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 8576961.

[16] HUGUET-CASQUERO A, MORENO-SASTRE M, LOPEZ-MENDEZ T B, et al. Encapsulation of oleuropein in nanostructured lipid carriers: biocompatibility and antioxidant efficacy in lung epithelial cells [J]. Pharmaceutics, 2020, 12(5): 429.

[17] 曹位平, 郭建淑, 冯文静, 等. 橄榄苦苷对缺血再灌注大鼠心肌应激性炎症损伤的保护作用[J]. 中国免疫学杂志(CAO W P, GUO J S, FENG W J, et al. Protective effect of oleuropein on stress-induced inflammatory injury in myocardial ischemia-reperfusion rats [J]. Cellular & Molecular Immunology), 2022, 38(16): 1940-5.

[18] IYER M, SUBRAMANIAM M D, VENKATESAN D, et al. Role of RhoA-ROCK signaling in Parkinson's disease [J]. Eur J Pharmacol, 2021, 894: 173815.

[19] WEI L, SHI J. Insight into Rho kinase isoforms in obesity and energy homeostasis [J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 886534.

[20] SAIDOVA A A, VOROBJEV I A. Lineage commitment, signal-

ing pathways, and the cytoskeleton systems in mesenchymal stem cells [J]. Tissue Eng Part B Rev, 2020, 26(1): 13-25.

[21] DOKUMACIOGLU E, DUZCAN I, ISKENDER H, et al. RhoA/ROCK-1 signaling pathway and oxidative stress in coronary artery disease patients [J]. Braz J Cardiovasc Surg, 2022, 37(2): 212-8.

[22] HE P, GUO Y, WANG J, et al. Protection of ripasudil, a Rho kinase inhibitor, in lipopolysaccharides-induced acute pneumonia in mice [J]. Am J Transl Res, 2019, 11(10): 6433-43.

[23] FENG G, SUN B, LIU H X, et al. EphA2 antagonism alleviates LPS-induced acute lung injury via Nrf2/HO-1, TLR4/MyD88 and RhoA/ROCK pathways [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 72: 176-85.