

多聚左旋精氨酸对 NCI-H292 细胞炎症介质的调节

唐伟 范晓云 陆兆双 霍龙

摘要 目的 研究多聚左旋精氨酸(PLA)对 NCI-H292 细胞分泌白细胞介素(IL)-6、IL-8、IL-13、嗜酸性粒细胞趋化因子(Eotaxin)的影响。方法 将 NCI-H292 细胞分为对照组(培养液)、脂多糖(LPS)组(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、PLA 组(Max = 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、LPS + PLA 组、LPS + PLA + 肝素组。采用 ELISA 法检测各组 IL-6、IL-8、IL-13、Eotaxin 的水平,并比较各组间的差异。结果 LPS + PLA 组 IL-6、IL-8、Eotaxin 的水平明显高于对照组、LPS 组、PLA 组($P < 0.05$),而 LPS 组、PLA 组与对照组比较,IL-6、IL-8、Eotaxin 的水平差异无统计学意义($P > 0.05$);各组 IL-13 的水平差异无统计学意义($P > 0.05$);而肝素能够降低 LPS + PLA 组 IL-6、IL-8、Eotaxin 的水平($P < 0.05$)。结论 PLA 促进 LPS 诱导 NCI-H292 细胞 IL-6、IL-8、Eotaxin 的表达,但肝素可抑制其表达;而 PLA 对 IL-13 的表达没有影响。

关键词 哮喘;多聚左旋精氨酸;白细胞介素-6;白细胞介素-8;白细胞介素-13;嗜酸性粒细胞趋化因子;肝素

中图分类号 R 256.12

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)04-0427-04

支气管哮喘是一种以多种炎性细胞浸润及气道高反应为特征的可逆性气道阻塞性疾病^[1],其中嗜酸性粒细胞(eosinophil, Eos)在气道黏膜的浸润是以哮喘为主要特征。在患者支气管活检组织、肺泡灌洗液和外周血中均发现活化的 Eos,其活化后释放的颗粒主要是嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(eosinophil cationic protein, ECP),而在支气管哮喘气道高反应性(airway hyperresponsiveness, AHR)的病理过程中,上皮细胞起着重要作用。ECP 通过改变上皮细胞功能或直接细胞毒作用而影响气道上皮细胞,释放多种细胞因子如:白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-8、IL-13、嗜酸性粒细胞趋化因子(Eotaxin)等

参与 AHR。作为 ECP 的类似物,多聚左旋精氨酸(poly-L-arginine, PLA)具有与 ECP 相似的生物学活性。该实验旨在通过气道上皮细胞来研究 PLA 在气道炎症反应中的作用以及肝素对其影响。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 上皮细胞系 NCI-H292 是一种人肺腺癌细胞系,属于肺泡 II 型上皮细胞,单层贴壁生长,购自美国 ATCC 公司。

1.2 主要试剂 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、PLA 均购自美国 Sigma 公司;肝素购自江苏万邦生化医药公司;胎牛血清、RPMI 1640 购自美国 Gibco 公司;ELISA(IL-6、IL-8、IL-13、Eotaxin)试剂盒购自上海森雄公司。

1.3 细胞培养 NCI-H292 细胞在常规培养基(RPMI 1640 + 10% 胎牛血清 + 100 U/ml 青霉素 + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素)中培养^[2], 37 $^{\circ}\text{C}$ 含 5% CO_2 培养箱中孵育,当细胞长至 70% ~ 80% 时开始传代,每周传代 2 次,用于后续试验。

1.4 ELISA 法检测细胞因子 IL-6、IL-8、Eotaxin、IL-13 的表达 准备一定量的 NCI-H292 细胞过夜,在加入刺激物之前,用不含血清的 RPMI 1640 再洗 1 次,以去除内源性细胞因子和排除血清的影响^[3],以不加任何刺激物的细胞作为阴性对照,依照试验设计加入 LPS(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、PLA(Max = 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、肝素(100 U/ml),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 h 后,收集上清液,采用 ELISA 法分别检测各组 IL-6、IL-8、Eotaxin、IL-13 的水平。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA);两两比较方差齐时采用 LSD 检验,方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验。

2 结果

2.1 PLA 在 LPS 刺激后增加 IL-6、IL-8 的释放 一定浓度的 PLA(5 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)明显促进 LPS 诱导的 NCI-H292 细胞 IL-6、IL-8 的水平($P < 0.01$);与对照组比较, LPS 组、PLA 组 IL-6、IL-8 的水平差异

2013-12-12 接收

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(编号:81100027);安徽省高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2011A176);安徽医科大学第一附属医院博士启动基金;安徽省人社厅第九批学术和技术带头人及后备人选学术科研活动资助

作者单位:安徽医科大学第一附属医院老年呼吸内科,合肥 230022

作者简介:唐伟,女,硕士研究生;

范晓云,女,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: smallcloud2@126.com

无统计学意义 ($P > 0.05$), 且在 PLA 为 $5 \mu\text{g/ml}$ 时 IL-6、IL-8 的水平最高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1。

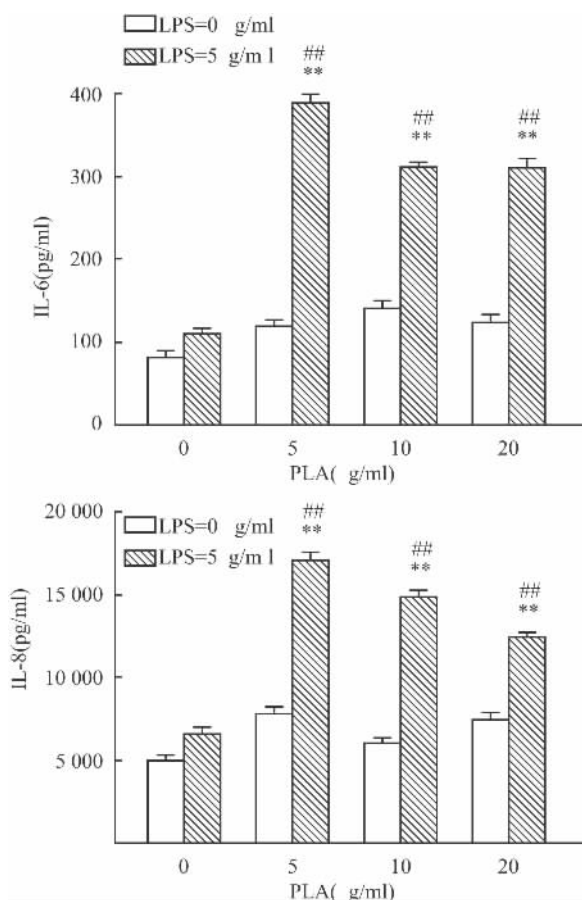


图1 PLA 与 LPS 联合刺激 NCI-H292 细胞其 IL-6、IL-8 的水平
与 LPS 组 (LPS = $5 \mu\text{g/ml}$, PLA = $0 \mu\text{g/ml}$) 比较: ** $P < 0.01$; 与
对照组 [PLA 组 (LPS = $0 \mu\text{g/ml}$)] 比较: ## $P < 0.01$

2.2 PLA 在 LPS 刺激后增加 Eotaxin 的释放 一定浓度的 PLA ($5 \sim 40 \mu\text{g/ml}$) 明显促进 LPS 诱导的 NCI-H292 细胞 Eotaxin 的水平 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 与对照组比较, LPS 组、PLA 组 Eotaxin 的水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 且在 PLA = $20 \mu\text{g/ml}$ 时 Eotaxin 的水平最高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2。

2.3 PLA 在 LPS 刺激后对 IL-13 的水平无影响 不论有无 LPS 刺激, 不论 PLA 浓度多大, 各组 IL-13 的水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3。

2.4 肝素降低 PLA 与 LPS 联合刺激下 IL-6、IL-8、Eotaxin 的水平 当 LPS、PLA 均为 $5 \mu\text{g/ml}$ 时, IL-6、IL-8 的表达水平出现高峰, 一定浓度的肝素 (100 U/ml) 降低 LPS ($5 \mu\text{g/ml}$) + PLA ($5 \mu\text{g/ml}$) 组

IL-6、IL-8 水平 ($P < 0.01$), 而 Eotaxin 的表达在 PLA = $20 \mu\text{g/ml}$ 时出现高峰, 100 U/ml 的肝素降低 LPS ($5 \mu\text{g/ml}$) + PLA ($20 \mu\text{g/ml}$) 组 Eotaxin 水平 ($P < 0.05$)。见图 4。

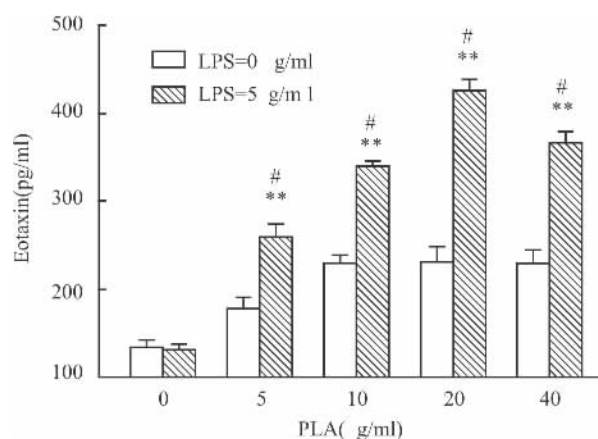


图2 PLA 与 LPS 联合作用 NCI-H292 细胞其 Eotaxin 的水平
与 LPS 组 (LPS = $5 \mu\text{g/ml}$, PLA = $0 \mu\text{g/ml}$) 比较: ** $P < 0.01$; 与
对照组 [PLA 组 (LPS = $0 \mu\text{g/ml}$)] 比较: # $P < 0.05$

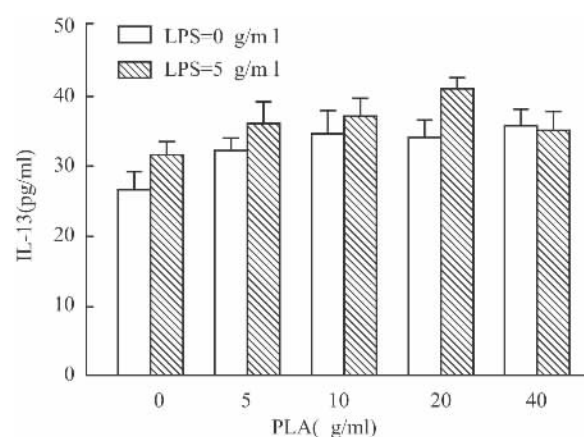


图3 PLA 与 LPS 联合作用 NCI-H292 细胞其 IL-13 的水平

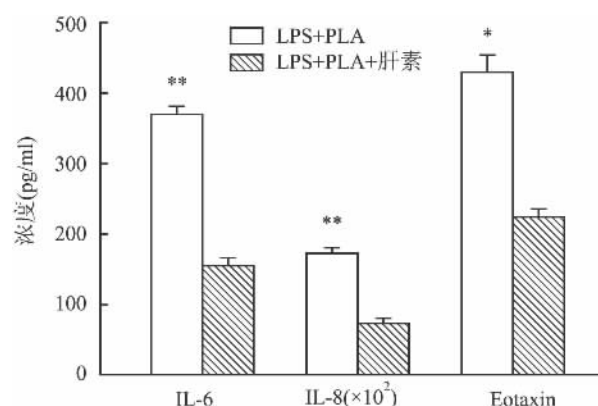


图4 肝素降低 PLA 与 LPS 共同作用 NCI-H292 细胞
IL-6、IL-8、Eotaxin 的水平

与 LPS + PLA + 肝素组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

支气管哮喘是一种由多种细胞及细胞因子参与的慢性气道炎症,其发生过程是气道炎症、AHR、气道重构三联征;其发病及演变主要受控于 Th2 型细胞因子^[4]。病理检查显示有大量炎症细胞的浸润,在此过程中,一些细胞因子起重要的促进作用,如 IL-6、IL-8、IL-13、Eotaxin 等促进炎症细胞的聚集、活化和炎症介质的释放。在正常的情况下,其表达及分泌受机体严格调控,但在病理情况下会出现异常表达,如细胞因子表达过高,从而引起炎症、自身免疫性疾病、过敏反应等。

IL-6 是一种多活性、调节急性相反应和炎症的重要因子,主要参与哮喘的急性发作;在血清及肺泡灌洗液中均可发现 IL-6 水平明显升高,IL-6 可反映气道炎症情况,作为支气管哮喘急性发作的指标之一。IL-8 又称中性粒细胞趋化因子,能够选择性趋化中性粒细胞进入气道,并诱导和增强中性粒细胞脱颗粒和杀菌作用,同时吸引 Eos、淋巴细胞向炎症部位聚集,并促使其释放 ECP 等炎症介质,参与气道炎症及 AHR 形成。该研究显示:哮喘大鼠血清、肺泡灌洗液中 IL-8 水平明显升高;用外源性抗 IL-8 抗体中和 IL-8 能抑制中性粒细胞的聚集及其介导的组织损伤。IL-13 是 Th2 类细胞因子,主要通过 STAT6 信号途径调控基因表达引起 AHR^[5];但对缺乏 IL-13 的小鼠,IL-13 对诱导 AHR 是必须的,同时引入外源性 IL-13 可直接激活引起 AHR 的途径,可不需要 Eos 及 IL-4 的表达。

Eotaxin 是近年发现的趋化因子,主要来源于气道上皮细胞,在参与哮喘发生的众多趋化因子中,唯有 Eotaxin 对 Eos 具有特异性趋化活性,主要促进 Eos 在肺内募集并使其活化,从而引起组织损伤。研究^[6]显示,在大鼠血清、肺泡灌洗液及肺组织中均发现 Eotaxin 呈高表达,在典型哮喘及咳嗽变异性哮喘患者血清中 Eotaxin 的浓度明显升高,且与 Eos 计数呈正相关^[7]。

本实验研究显示,在 LPS 的诱导下,一定浓度的 PLA 显著升高 NCI-H292 细胞 IL-6、IL-8、Eotaxin 的水平,并且 IL-6、IL-8 在 PLA 为 5 $\mu\text{g/ml}$ 时出现高峰;而 Eotaxin 水平在 PLA 0 ~ 40 $\mu\text{g/ml}$ 之间逐渐升高,在 PLA 为 20 $\mu\text{g/ml}$ 时出现高峰,可能与 PLA 联合 LPS 诱导 NCI-H292 细胞释放细胞因子的机制不同有关。推测 PLA 可促进 IL-6、IL-8、Eotaxin 表

达,从而趋化中性粒细胞、Eos、淋巴细胞等向气道聚集,引起气道炎症反应;但 IL-13 的水平在 LPS 与 PLA 联合作用下未见明显变化,推测 IL-13 可能不通过 Eos 发挥作用,可能直接作用于气道上皮细胞或通过其他信号通路等引起 AHR。

肝素作为最有效的抗凝剂之一,在体内外均能延缓或阻止血液凝固;肝素已用于治疗支气管哮喘,特别是难治性哮喘,其治疗作用是改善血流动力学从而改善肺循环^[8];肝素具有阴离子电荷及黏多糖结构;而内源性肝素能够抑制 Eos 向炎症区域聚集,并且使阳离子蛋白引起的组织损伤减轻。在本实验中,肝素能够抑制 PLA 在 LPS 诱导下 IL-6、IL-8、Eotaxin 释放,肝素可能中和 PLA 对细胞的毒性作用,抑制 PLA 对细胞因子的表达。

综上所述,PLA 能够显著促进炎症介质 IL-6、IL-8、Eotaxin 的释放,引起或加重气道炎症反应,从而引起哮喘发作;而肝素能够拮抗 PLA 的作用。随着对支气管哮喘研究的不断深入,信号传导对各种细胞因子、炎症介质的调节已成为热点研究之一^[9],而阻断这些炎症介质引起哮喘发作的信号通路为哮喘的治疗提供了更广阔的思路。

参考文献

- [1] 齐胤良,桂淑玉,王勇生,等.哮喘大鼠模型支气管肺组织骨桥蛋白表达的变化及其调控机制的初探[J].安徽医科大学学报 2010 45(1):9-12.
- [2] Fan X Y, van den Berg A, Snoek M, et al. Arginine deficiency augments inflammatory mediator production by airway epithelial cells *in vitro* [J]. Respir Res 2009 10: 62.
- [3] Rhee C K, Kang C M, You M B, et al. Effect of fudosteine on mucin production [J]. Eur Respir J 2008 32(5): 1195-202.
- [4] Goetzl E J. Changing paradigms in the immunological science of allergy [J]. Curr Allergy Asthma Rep 2008 8(1): 28-31.
- [5] 辛琪,李浩璇. IL-13 与气道高反应的作用机制及研究进展 [J]. 中国医药指南 2012 10(17): 88-9.
- [6] 汪浩,武晓兰,范晓云,等. IL-8 和 Eotaxin 在哮喘大鼠中的表达及地塞米松的作用 [J]. 安徽医科大学学报 2012 47(3): 270-3.
- [7] 武晓兰,唐伟,范晓云,等. 咳嗽变异性哮喘患者 Eotaxin 的表达及其与肺功能的关系 [J]. 实用医学杂志 2013 29(2): 199-201.
- [8] 李峰,于颖,张立红. 肝素钙综合治疗婴幼儿哮喘的疗效及机制 [J]. 第四军医大学学报 2008 29(14): 1301-12.
- [9] Botero T M, Son J S, Vodopyanov D, et al. MAPK signal is required for LPS-induced VEGF in pulp stem cells [J]. J Dent Res 2010 89(3): 264-9.

stim1 和 orai1 蛋白在哮喘大鼠支气管平滑肌中的表达

王 丽¹, 丁圣刚¹, 李忠强², 王亚亭¹

摘要 目的 研究基质交感分子 1 (stim1) 和钙离子释放激活钙离子通道蛋白 1 (orai1) 在哮喘气道平滑肌细胞中表达水平的变化。方法 选取 40 只清洁级 SD 大鼠随机分为对照组和哮喘组, 其中哮喘组用鸡卵清蛋白 (OVA) 激发制备大鼠哮喘模型 ($n = 20$), 对照组用生理盐水代替 ($n = 20$)。肺组织病理切片 HE 染色判断哮喘模型是否建立成功, 分析支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中的细胞总数及分类计数, 应用免疫组化技术及彩色病理图文分析系统测定 stim1 和 orai1 蛋白阳性细胞平均光密度值。结果 肺组织病理切片 HE 染色镜下观察呈现大量炎细胞浸润, 支气管黏膜肿胀, 支气管腔内可见黏液栓等, 证实哮喘模型建立成功。哮喘组中大鼠 BALF 中细胞总数、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞计数明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。哮喘组大鼠支气管平滑肌表达 orai1 蛋白阳性细胞平均光密度值明显高于

对照组 ($P < 0.05$)。哮喘组和对照组大鼠支气管平滑肌表达 stim1 蛋白阳性细胞的平均光密度值无明显差异 ($P > 0.05$)。结论 orai1 蛋白在哮喘大鼠气道平滑肌细胞中表达变化较 stim1 蛋白明显, 对支气管平滑肌调节作用可能更重要。

关键词 基质交感分子 1; orai1 蛋白; 哮喘; 平滑肌细胞

中图分类号 R 562.25

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)04-0430-04

钙库调控钙离子内流 (store operated calcium entry, SOCE) 在机体生理、病理活动中起着重要作用, 参与细胞的生长、迁移、增殖与分化, 同时与机体免疫细胞、炎症细胞以及结构细胞发挥作用有密切关系^[1-2]。钙离子释放激活钙离子通道蛋白 1 (calcium release-activated calcium channel protein 1, orai1) 和基质交感分子 1 (stromal interaction molecule 1, stim1) 是构成 SOCE 的重要分子, orai1 被公认为介导 SOCE 通道中 Ca^{2+} 内流的离子通道, stim1 被认为是胞内钙库 Ca^{2+} 的“传感器”, Ca^{2+} 敏感区是细胞内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 腔内的 EF-hand

2013-10-28 接收

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院儿科, 合肥 230022

²临沂市人民医院儿科, 临沂 276000

作者简介: 王 丽, 女, 硕士研究生;

王亚亭, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wangyating1348@126.com

Poly-L-arginine regulate inflammatory mediator production by airway epithelial cells NCI-H292 *in vitro*

Tang Wei, Fan Xiaoyun, Lu Zhaoshuang, et al

(Dept of Geriatric Pulmonology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract **Objective** To study the effect of interleukin (IL)-6, IL-8, IL-13, Eotaxin epithelial cells NCI-H292 by poly-L-arginine (PLA). **Methods** NCI-H292 cells were divided into control group (culture solution), lipopolysaccharide (LPS) group (5 $\mu\text{g/ml}$), PLA group (Max = 40 $\mu\text{g/ml}$), LPS + PLA group and LPS + PLA + heparin group. The expressions of IL-6, IL-8, IL-13 and Eotaxin were determined by ELISA, and compared the differences among the groups. **Results** IL-6, IL-8 and Eotaxin levels in LPS + PLA group were significantly higher than other groups ($P < 0.05$); but there was no statistical significance among LPS group, PLA group and the control group ($P > 0.05$); and also no statistical significance on IL-13 among each group ($P > 0.05$); but heparin could reduce the levels of cytokines in LPS + PLA group ($P < 0.05$). **Conclusion** PLA can increase the expression of IL-6, IL-8, Eotaxin in NCI-H292 cells association with LPS, but heparin can inhibit the expression of cytokines; and there has no effect on IL-13.

Key words asthma; poly-L-arginine; interleukin-6; interleukin-8; interleukin-13; Eotaxin; heparin