



## 蛋白酶激活受体1介导人肺上皮细胞分泌白细胞介素-8

蛋白酶激活受体(protase-activated receptors, PARs)属G蛋白耦联受体家族,目前共发现4个成员:PAR1、PAR2、PAR3和PAR4。蛋白酶可以酶切PARs的N末端,暴露含有系锁配体的新的N末端,可自我激活PARs功能,激活的PARs引起信号级联反应,最终影响细胞的形状、参与细胞的分泌、整合蛋白的活化、代谢反应、转录过程及细胞运动等多种功能。PARs分布在多种组织细胞上,包括血小板、白细胞、肥大细胞、内皮细胞、血管平滑肌细胞、成纤维细胞、消化道上皮细胞等[1]。PARs在炎症中的作用引起了广泛的关注,我们曾证明,PAR2可介导人肺上皮细胞分泌趋化因子MCP-1[2]。PAR1作为发现最早的蛋白酶激活受体同样参与多种炎症反应,PAR1作为凝血酶的高亲和力受体,能介导中性粒细胞脱颗粒[3],通过因子Xa诱导内皮细胞释放细胞因子和表达黏附分子引起血管舒张,介导血浆外渗、粒细胞浸润和水肿形成[4]。除凝血酶外,PAR1还可被与系锁配体序列相同的多肽即激动肽所激活从而参与细胞的功能。最近发现肺上皮细胞表达PAR1,本研究利用人肺上皮细胞系A549研究PAR1在肺部的炎症介质释放中的作用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

PAR1激动剂SFLLR和反PAR1激动剂RLLFS由美联生物科技有限公司(西安)合成。人凝血酶、青链霉素购于Sigma公司,凝血酶抑制剂水蛭素为Calbiochem产品,DMEM培养液、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶-EDTA消化液均购自Gibco公司,IL-8 ELISA检测试剂盒为Pierce公司产品。

#### 1.2 细胞培养

人肺癌上皮细胞系A549细胞(购自中国科学院上海细胞研究所)接种于50 ml培养瓶内,用DMEM完全培养液(含100 ml/L FBS、100 mg/L青/链霉素),于37 °C、50 ml/L CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

#### 1.3 激发实验

待细胞铺满瓶底后,用2.5 g/L胰蛋白酶-EDTA消化液消化,将获得的细胞分种于12孔培养板各孔内。用1 ml完全培养液培养至细胞相互融合后,换无血清培养液培养16 h。本项目共分6组:SFLLR、RLLFS、凝血酶、水蛭素、水蛭素+凝血酶各1组和激发对照组。激发实验由向每孔的细胞内加入不同浓度的PAR-1激动剂SFLLR或反PAR-1激动剂RLLFS(0.1~300 μmol/L)及凝血酶(0.01~10 kU/L)和/或相应浓度的水蛭素,分别培养2、16 h后收获细胞上清液,上清液离心后于-80 °C冻存,准备用于ELISA检测。每组实验均重复5次。

#### 1.4 IL-8的ELISA检测

人IL-8检测用人IL-8 ELISA检测试剂盒,按操作说明检测细胞上清液中的IL-8水平,并用酶标仪于450 nm波长处测定吸光度A值。

#### 1.5 统计学处理

全部统计分析均采用SPSS11.0版软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间数据的比较用单因素方差分析(One way ANOVA),两两比较用SNK法。

## 2 结果

### 2.1 PAR1激动剂对肺上皮细胞IL-8释放的影响

经过16 h的培养, PAR1激动剂SFLLR可引起浓度相关性IL-8的释放增加。SFLLR在浓度10  $\mu\text{mol/L}$ 时就可引起IL-8释放增加, 增加到300  $\mu\text{mol/L}$ 时诱导IL-8的释放量比基础分泌量增加了近16倍(图1)。反PAR1激动剂RLLFS不能引起IL-8的释放增加(图2)。不同浓度的SFLLR与A549细胞分别培养2、16 h, 结果显示SFLLR作用2 h即可引起IL-8分泌增加, 随着药物作用时间的延长, IL-8的释放量显著增加, 具有明显的时间相关性, 反PAR1激动剂RLLFS随着药物作用时间的延长, 未能引起IL-8释放量的增加(图3)。

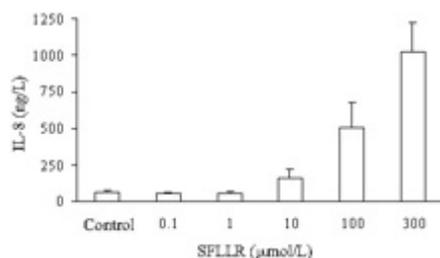


图 1 PAR1 激动剂对A549细胞IL-8释放的影响

Fig.1 Effects of PAR1 agonist peptides on the release of IL-8 from A549 cells

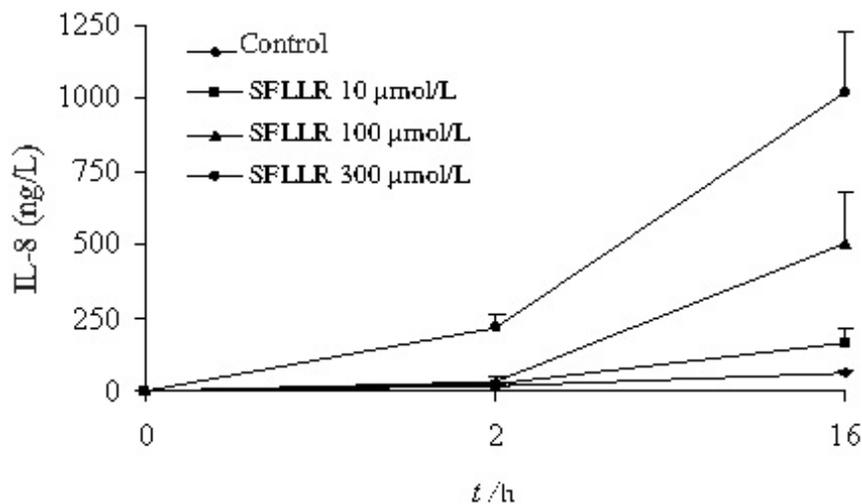


图 2 蛋白酶激动肽诱导IL-8释放的时间关系

Fig.2 Time course for IL-8 release induced by agonist peptides

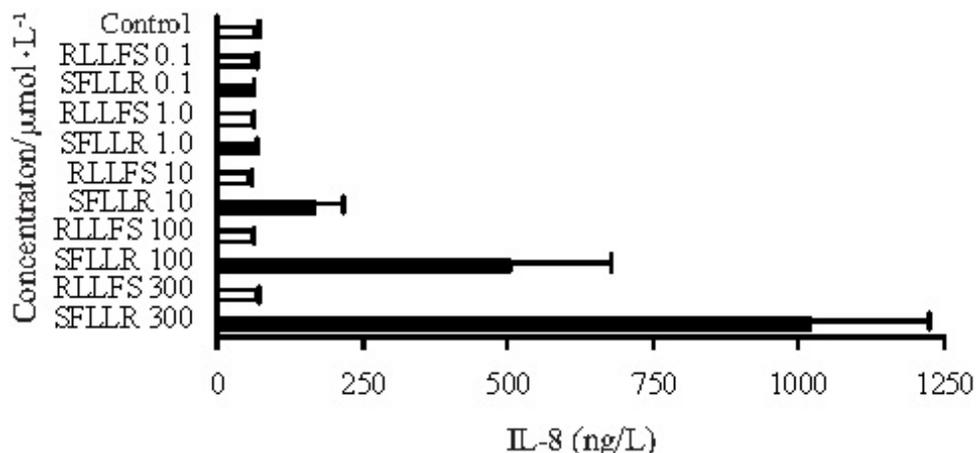


图 3 PAR1 激动剂及其对照多肽对A549细胞IL-8释放的影响

### 2.2 凝血酶对肺上皮细胞系IL-8释放的影响

经过16 h的培养，凝血酶可引起浓度相关性IL-8释放增加。凝血酶在浓度1 kU/L时就可引起IL-8释放量增加，10 kU/L时诱导IL-8的释放量达高峰，为基础分泌量的7倍(图4)。时间关系曲线显示，凝血酶引起A549细胞分泌IL-8的量从2 h起就有所增加，作用16 h时IL-8的聚集量增加最显著(图5)。

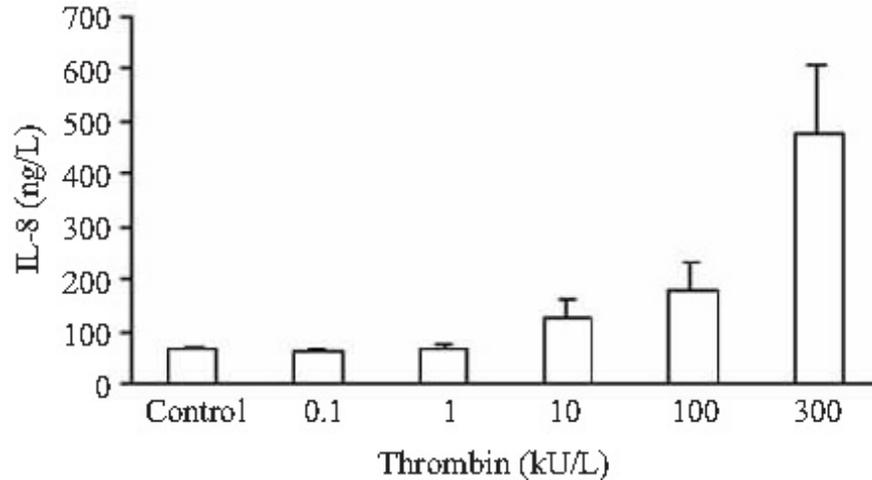


图 4 凝血酶对A549细胞释放IL-8的影响  
Fig.4 Effect of thrombin on the release of IL-8 from A549 cells

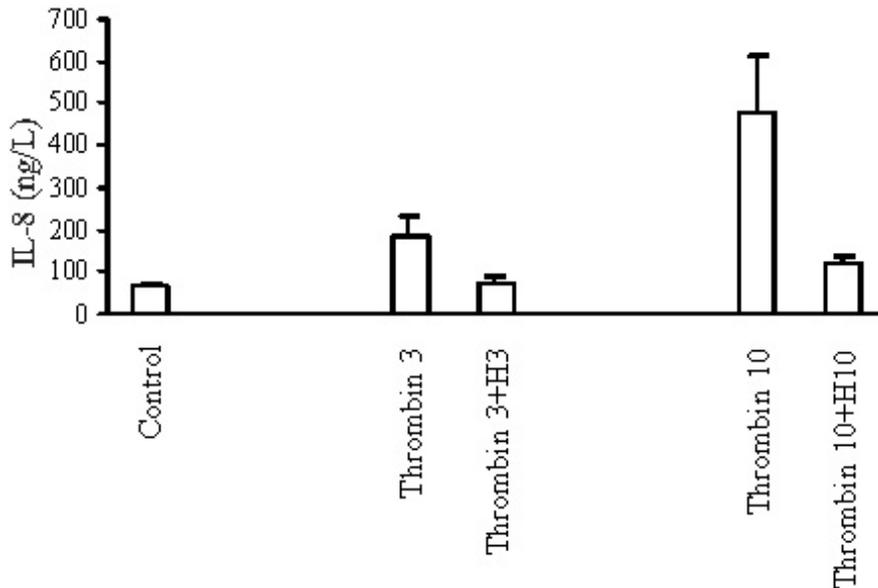


图 5 水蛭素对凝血酶诱导IL-8释放的抑制作用  
Fig.5 Inhibitory effect of hirudin (H) on the release of IL-8 from A549 cells induced by thrombin

### 2.3 凝血酶抑制剂对凝血酶释放IL-8的抑制作用

水蛭素和凝血酶与A549细胞共同培养16 h后，结果显示：水蛭素本身不能影响IL-8的分泌，但水蛭素在浓度为3和10 kU/L时可分别抑制相应浓度凝血酶刺激A549细胞释放IL-8的作用(图6)。

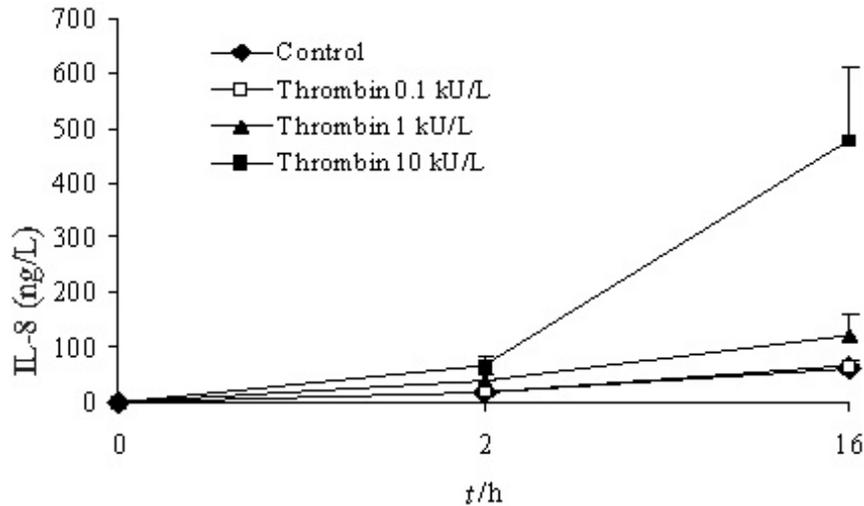


图 6 凝血酶引起IL-8释放的时间关系曲线  
Fig.6 Time course for IL-8 release induced by thrombin

### 3 讨论

PARs属G蛋白耦联受体家族中的亚类,最初是在研究血液凝固和血小板激活相互作用机制中得以确认,最初的研究多集中在损伤修复和创伤愈合方面。最近,PARs在炎症和变态反应性疾病中的作用日益得到关注和重视[5][6]。凝血酶作为体内的主要凝血因子之一,主要参与机体凝血、止血功能。凝血酶可激活PAR1、PAR3和PAR4。PAR1作为凝血酶的高亲和力受体,参与多种炎症反应过程[7][8]。IL-8是激活中性粒细胞并将中性粒细胞和T细胞迁移到炎症部位的主要趋化因子,在炎症反应中起重要作用[9]。而肥大细胞类糜蛋白酶通过PAR1引起慢性皮炎病人嗜酸粒细胞浸润[10]。

PAR-1激动剂刺激呼吸道上皮细胞可引起高达16倍的IL-8释放,表明其对IL-8的释放的促进作用是高效的,足以在体内引起炎症反应,也暗示肥大细胞分泌的类糜蛋白酶和呼吸道上皮细胞之间可能存在着直接的关系。PAR1激动剂对IL-8分泌的刺激作用明显强于它们相对应的反肽,更说明这种刺激作用是具有特异性的,而不是对肽类的一种无选择性的反应。PAR1拮抗剂可能具有抗炎作用。

凝血酶可引起肺上皮细胞高达7倍的IL-8释放,表明蛋白酶对IL-8的释放促进作用是高效的。同时提示,蛋白酶除了能够水解组织中的特异性底物外,还可以通过PARs受体刺激细胞分泌促炎介质,从而加重炎症的发展。凝血酶对呼吸道上皮细胞IL-8分泌的促进作用表明在肥大细胞分泌的类糜蛋白酶和呼吸道上皮细胞之间可能存在着直接的联系[10],间接证明了肥大细胞在哮喘和慢性阻塞性肺疾病的发病过程中起着一定的作用。凝血酶活性抑制剂水蛭素可以抑制凝血酶对IL-8的释放作用,表明凝血酶的作用是通过其水解活性实现的,也表明凝血酶抑制剂可能有抗炎作用。从时间关系曲线上看,PAR1激动剂和凝血酶对IL-8分泌的刺激作用是一个比较缓慢的过程,这可能表明分泌出的IL-8是由上皮细胞新合成的,而不是原有贮存的IL-8的单纯释放,但具体分泌机制还有待于进一步探索。

我们已经证明,A549细胞系可同时表达PAR1-4四种受体,而凝血酶既可激活PAR1受体,又是PAR3和PAR4的激活剂。因此,凝血酶引起的肺上皮细胞IL-8的释放,是单纯由PAR1或PAR3或PAR4介导,还是PAR1、PAR3与PAR4同时参与,须经进一步的实验证实。

(责任编辑:黄开颜)

#### 参考文献:

[1]Michane SR, Seatter MJ, Kanke T, et al. Proteinase-activated re- ceptors[J].

Pharmacol Res, 2001, 53(2): 245-82.

[2]王海燕, 何韶衡. 蛋白酶激活受体2激动剂诱导上皮细胞分泌MCP-1[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(19): 1782-4.

Wang HY, He SH. Induction of secretion of MCP1 from epithelial cells by proteinase activated receptors 2 agonists[J]. J Fourth Mil Med Univ, 2004, 25(19): 1782-4.

[3]Kannan S. Role of protease-activated receptors in neutrophil degranulation[J]. Med Hypotheses, 2002, 59(3): 266-7.

[4]Camerer E, Kataoka H, Kahn M, et al. Genetic evidence that protease-activated receptors mediate factor Xa signaling in endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(18): 16081-7.

[5]Coughlin SR, Camerer E. PAR participation in inflammation[J]. J Clin Invest, 2003, 111(1): 25-7.

[6]Witherden IR, Vanden Bon EJ, Goldstraw P, et al. Primary human alveolar type II epithelial cell chemokine release: effects of cigarette smoke and neutrophil elastase[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004, 30(4): 500-9.

[7]Asokanathan N, Graham PT, Fink J, et al. Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E2 release from human respiratory epithelial cells[J]. J Immunol, 2002, 168(7): 3577-85.

[8]Marty I, Peclat V, Kirdaite G, et al. Amelioration of collagen-induced arthritis by thrombin inhibition[J]. J Clin Invest, 2001, 107(5): 631-40.

[9]Wolf M, Delgado MB, Jones SA, et al. Granulocyte chemotactic protein 2 acts via both IL-8 receptors, CXCR1 and CXCR2[J]. Eur J Immunol, 1998, 28(1): 164-70.

[10]Tomimori Y, Muto T, Fukami H, et al. Chymase participates in chronic dermatitis by inducing eosinophil infiltration[J]. Lab Invest, 2002, 82(6): 789-94.