

[文章编号] 1000-4718(2007)01-0071-05

脂多糖诱导人气道上皮细胞 hBD-2 表达及核转录因子 κ B 活性的变化*

廖伟¹, 钱桂生¹, 雷撼^{2△}, 张方¹¹第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所, 重庆 400037; ²上海市东方医院呼吸内科, 上海 200120)

[摘要] 目的: 观察脂多糖(LPS)诱导人气道上皮细胞人 β 防御素-2(hBD-2)的表达及核转录因子 κ B(NF- κ B)活性的变化,探讨 NF- κ B 在 LPS 诱导人气道上皮细胞 hBD-2 表达中的作用。方法: 体外培养人气道原代上皮细胞,用不同剂量 LPS 刺激,RT-PCR 法检测 hBD-2 mRNA 的表达,凝胶迁移试验(EMSA)检测不同时相 NF- κ B 活性的变化。结果: LPS 刺激 2 h 后可见人气道上皮细胞 hBD-2 mRNA 表达,并呈时间、剂量依赖性;NF- κ B 在 LPS 刺激 1h 后明显活化,并与 LPS 剂量正相关,抗体超迁移率实验结果显示 NF- κ B 的异型二聚体 p65-p50 参与了 NF- κ B 的活化。结论: 一定剂量的 LPS 可诱导人气道上皮细胞 hBD-2 mRNA 表达,NF- κ B 在 LPS 诱导气道上皮细胞 hBD-2 mRNA 起重要的调控作用。

[关键词] 人类;上皮,气道;防御素类;脂多糖类;NF- κ B

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Expression of the hBD-2 and change of NF- κ B activity in human primary epitheliums induced by LPS

LIAO Wei¹, QIAN Gui-sheng¹, LEI Han², ZHANG Fang¹¹Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China; ²Department of Respiratory Disease, Shanghai East Hospital, Shanghai 200120, China. E-mail: leihan@sina.com)

[ABSTRACT] AIM: To investigate the expression of human β -defensin-2 (hBD-2) mRNA and the changes of NF- κ B activity induced by lipopolysaccharide (LPS) in human primary epitheliums. **METHODS:** The pulmonary primary epitheliums from human were stimulated with LPS and the expression of hBD-2 mRNA was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The nuclear factor- κ B (NF- κ B) binding activity was analyzed by electrophoretic mobility shift assays. **RESULTS:** The hBD-2 mRNA was detected 2 hours after LPS stimulation and the expression of hBD-2 showed a dose-dependent manner. The NF- κ B was activated remarkably half an hour after LPS stimulation. The supershifts assays indicated that the p65-p50 heterodimer formed complexes of NF- κ B, that was involved in the activated of NF- κ B. **CONCLUSION:** LPS induces the expression of hBD-2 mRNA in a dose-dependent manner. The p65-p50 heterodimer-formed complexes of NF- κ B plays an important role in the regulation of hBD-2 gene expression in response to LPS.

[KEY WORDS] Human; Epithelium, airway; Defensins; Lipopolysaccharides; NF- κ B

人 β 防御素-2(human β -defensin-2, hBD-2)是气道抵抗微生物入侵的重要介质,在呼吸系统中发挥着重要的防御病原微生物侵袭及免疫作用^[1]。然而,hBD-2 诱导表达的机理和信号转导途径并不完全清楚,已有研究表明,hBD-2 的基因调控区有核因子- κ B(NF- κ B)的结合位点,hBD-2 的表达与 NF- κ B 激活有关^[2]。但不同细胞在不同的刺激因素作用下,被激活的 NF- κ B 类型并不相

同。因此,本研究以人气道原代上皮细胞为研究对象,观察脂多糖(LPS)诱导人气道上皮细胞 hBD-2 表达及 NF- κ B 活性的变化,以期阐明人气道上皮细胞 hBD-2 基因的可诱导表达及核转录因子 κ B 在 hBD-2 表达中的作用。

材 料 和 方 法

[收稿日期] 2005-04-06 [修回日期] 2005-07-14

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30270592)

△通讯作者 Tel: 021-58446069; E-mail: leihan@sina.com

1 主要试剂材料

LPS (*E. coli*. 111:B4)、吡咯二硫氨基甲酸酯 (PDTC)、蛋白酶 X IV、DMEM/F12 培养基、胰岛素、人胎盘胶原及表皮生长因子均为 Sigma 公司产品,通用型 RT-PCR 试剂盒(北京鼎国生物技术公司), EMSA 试剂盒(No. 3353591, Roche 公司), hBD-2 引物及 NF- κ B 探针由大连宝生物工程有限公司合成。

2 分离、培养人气道原代上皮细胞

参照黄宁等^[3]的方法,并略作改动,经患者同意,取新桥医院胸外科同期作肺叶切除术病人的肺叶支气管标本,无菌条件下,用冰冷 PBS 冲洗,纵向切开气管,置于含蛋白酶 X IV 型的 PBS 中,4 °C 过夜消化,用细胞刮轻轻刮下上皮细胞,吸管轻轻吹打数分钟,用含 5% FCS 的 DMEM/F12 培养基 37 °C、5% 的 CO₂ 培养(涂有人胎盘的塑料培养皿),24 h 后换为含表皮生长因子、胰岛素、氢化可的松的 DMEM/F12 无血清培养基,培养 5 d,并用角蛋白免疫组化鉴定(另文发表)。

3 用 LPS 及 PDTC 作用于上皮细胞

于培养的上皮细胞加入不同浓度(0.1、1、10、100、1 000 mg/L)的 LPS 进行刺激 2 h;用一定浓度的 LPS (0.1 mg/L)刺激 0.5、1、3、5、8 h;或用一定浓度的 PDTC (100 μ mol/L)预处理细胞 2 h 后再用 LPS (1 mg/L)刺激 10 h。分别收集各时点细胞,提取细胞总 RNA 和细胞核蛋白,每个实验均重复进行 3 次实验。

4 用 RT-PCR 检测 hBD-2 mRNA 表达

4.1 根据 GenBank hBD-2 cDNA 设计跨内含子区域的引物 上游引物:5' - CCA GCC ATC AGC CAT GAG GGT - 3', 下游:5' - GGA GCC CTT TCT GAA TCC GCA - 3', 产物长 255 bp。

4.2 总 RNA 提取 用 Tripure 试剂盒,采用异硫氰酸胍-氯仿一步抽提。

4.3 RT-PCR 扩增 RT:依吸光度(A)值,取等量(约 2 μ g)总 RNA,1 μ L 随机引物,含 dNTP 0.5 mmol/L,总体积 20 μ L,照试剂盒指示执行。PCR 扩增:依照通用型 RT-PCR 试剂盒说明书,取 RT 产物 5 μ L,50 μ L 反应体系含 MgCl₂ (25 mmol/L),dNTP (2.5 mmol/L),上、下游引物各 5 μ L (终浓度为 1 μ mol/L)、TaqDNA 聚合酶 1 U,混匀后,置 PCR 扩增仪上(Bio-Rad Gene Cyclor™,美国),反应条件为 95 °C 变性 5 min;94 °C 60 s,62 °C 30 s,72 °C 120 s,共 35 个循环;72 °C 延伸 5 min。设阳性对照 GAPDH(产物长 470 bp)。

5 EMSA 检测 NF- κ B 活性

5.1 核蛋白提取 取约 10⁷ 个上皮细胞,4° CPBS 洗涤 1 次,加入 400 μ L A 液(Hepes - NaOH 10 mmol/L,EGTA 0.05 mol/L,KCl 10 mmol/L,EDTA 0.1 mmol/L, MgCl₂ 1.5 mol/L, PMSF 10 μ mol/L, DTT 10 μ mol/L,0.5% NP-40),冰浴 15 - 30 min,涡动 10 s,4 °C 12 000 \times g 离心 5 min,取沉淀加入 B 液(Hepes - NaOH 20 mmol/L,EGTA 0.05 mol/L, EDTA 0.2 mmol/L, MgCl₂ 1.5 mol/L, NaCl 0.42 mol/L, PMSF 10 μ mol/L, DTT 10 μ mol/L)冰浴 30 min,4 °C 12 000 \times g 离心 5 min,沉淀即为核蛋白。

5.2 EMSA 按 EMSA 试剂盒说明书操作,主要包括①探针变性、标记;②测定探针标记效率;③凝胶迁移反应;④聚丙烯酰胺凝胶电泳;⑤印迹及交联反应;⑥化学发光检测。NF- κ B 通用探针序列:5' - AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C - 3', 3' - TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G - 5'。NF- κ B 突变探针序列:5' - ATT CGA TCG GGG CGG GGC GAGC - 3', 3' - TAA GCT AGC CCC GCC CCG CTC G - 5'。

5.3 NF- κ B 的超迁移率试验 在 DNA 核蛋白反应体系中,加入 2 μ g 兔抗人 NF- κ B p65、p50 抗体,于冰上孵育 30 min 后再加入标记探针,其余步骤同 EMSA。

5.4 图像分析 将各测量组的电泳照片扫描至计算机,然后应用 EPSON Scanner 扫描胶片影像,用图像分析方法测定电泳带的积分吸光度(A)值。

6 统计学处理

所有计量数据均用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 10.0 软件进行方差分析和 *t* 检验。

结 果

1 hBD-2 表达与 LPS 刺激的量效关系

结果显示,LPS 可以诱导人气道上皮细胞 hBD-2 表达,诱导 hBD-2 mRNA 表达的最小剂量为 0.01 mg/L,随着浓度的增加,可增强 hBD-2 mRNA 表达,在 0.01 mg/L 到 10 mg/L 范围内呈剂量依赖关系($r=0.752$),见图 1、表 1。

2 hBD-2 表达与 LPS 刺激的时效关系及 PDTC 对 hBD-2 表达的抑制作用

本实验结果显示,LPS 诱导人气道上皮细胞 hBD-2 表达呈时间依赖性,当加入 LPS 1 mg/L 时,2 h 后可见 hBD-2 mRNA 表达,在 5 - 10 h 达到高峰,用 100 μ mol/L 的 PDTC 预处理 2 h 可抑制 LPS 应用 10 h 诱导 hBD-2 的表达(与单用 LPS 1 mg/L 刺激 10 h 比较, $P < 0.01$),见图 2。

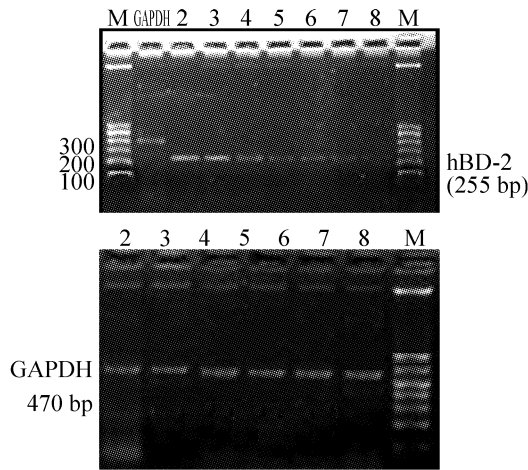


Fig 1 Concentration - dependent increase of hBD - 2 mRNA expression by LPS in primary epitheliums. Lane 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8: LPS 1 000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/L.

图1 hBD - 2 mRNA 表达与 LPS 的量效关系

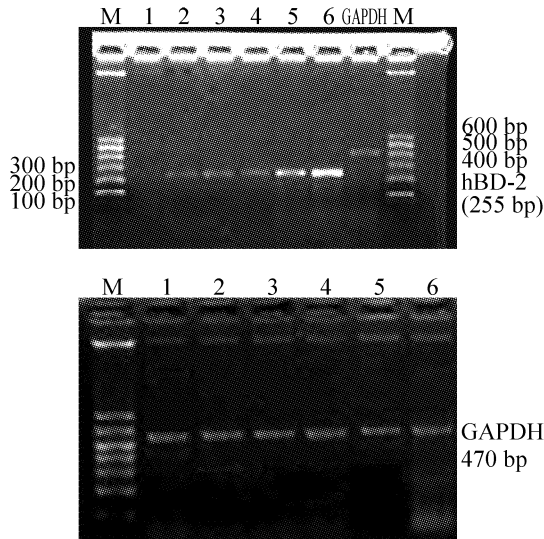


Fig 2 Time - dependent increase of hBD - 2 mRNA expression by LPS with 1 mg/L in human primary cpitheliums. Lane 1: PDTC + LPS stimulated at 10 h; 2 - 6: LPS stimulated at 2, 3, 4, 5, 10 h. 1 lane.

图2 人气道上皮细胞 hBD - 2 mRNA 表达与 LPS 刺激时效关系及 PDTC 的抑制作用

3 NF - κB 活性变化与 LPS 刺激的量效关系

正常上皮细胞内 NF - κB 轻度活化, 0.1 mg/L LPS 刺激 1 h, 即可使 NF - κB 活性迅速增加 ($P < 0.01$), 在 LPS 0.01 mg/L 到 10 mg/L 的范围内 NF - κB 的活性与 LPS 呈剂量依赖关系 ($r = 0.843$), 见图 3、表 3。

4 NF - κB 活性变化与 LPS 刺激的时效关系

用 1 mg/L LPS 刺激人气道上皮细胞 0.5 h, NF - κB 即迅速出现活化, 1 h 达到峰值后活性逐渐下降, 各组 NF - κB 活性均显著增强 (与对照组比较,

$P < 0.01$), 见图 4、表 4。

5 竞争抑制实验和抗体超迁移率实验

本实验结果显示, 过量未标记的 NF - κB 寡核苷酸 (冷探针) 可竞争抑制 NF - κB 与探针的结合,

表 1 不同剂量 LPS 刺激人气道上皮细胞 hBD - 2 mRNA 的表达

Tab 1 hBD - 2 mRNA expression after LPS treatment at different concentrations in primary epitheliums ($\bar{x} \pm s. n = 3$)

Group	hBD - 2/GAPDH(A)
LPS 0.01 mg/L	0.075 ± 0.012
LPS 0.1 mg/L	0.652 ± 0.008*
LPS 1 mg/L	8.250 ± 1.250*
LPS 10 mg/L	72.550 ± 8.520*

* $P < 0.01$ vs LPS 0.01 mg/L group.

表 2 PDTC 对人气道上皮细胞 hBD - 2 mRNA 表达的抑制作用

Tab 2 PDTC decreased hBD - 2 mRNA expression at 10 h after LPS treatment in human primary epitheliums ($\bar{x} \pm s. n = 3$)

Group	hBD - 2/GAPDH (A)
LPS 1 mg/L	8.52 ± 2.56
LPS + PDTC	2.24 ± 0.85*

* $P < 0.01$ vs LPS group.

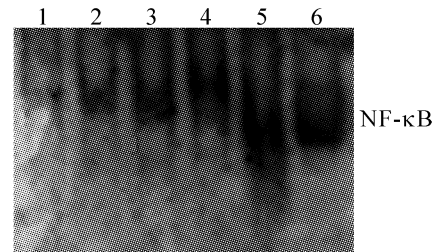


Fig 3 Concentration - dependent increase of the NF - κB activity in human primary epitheliums by LPS. Lane 1 - 6: LPS 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 mg/L stimulated at 1 h.

图3 不同浓度 LPS 对人气道上皮细胞 NF - κB 活性的影响

表 3 不同剂量 LPS 刺激人气道上皮细胞 NF - κB 活性变化

Tab 3 The NF - κB activity after LPS treatment at different concentrations in human primary epitheliums ($\bar{x} \pm s. n = 3$)

Group	NF - κB(A)
LPS 0 mg/L	0.08 ± 0.01
LPS 0.01 mg/L	0.65 ± 0.10*
LPS 0.1 mg/L	8.25 ± 1.32*
LPS 1 mg/L	72.55 ± 8.56*
LPS 10 mg/L	650.30 ± 78.36*

* $P < 0.01$ vs LPS 0 mg/L group.

表 4 LPS 1 mg/L 刺激人气道上皮细胞不同时间 NF-κB 活性变化

Tab 4 The NF-κB activity after 1mg/L LPS treatment at different times in human primary epitheliums ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Group	NF-κB(A)
0 h	0.75 ± 0.12
0.5 h	12.65 ± 2.35*
1 h	18.25 ± 3.24*
1.5 h	9.55 ± 1.85*
2 h	8.56 ± 1.76*

* $P < 0.01$ vs LPS group.

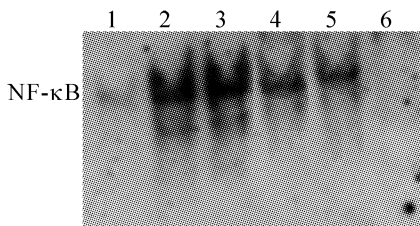


Fig 4 Change of NF-κB activity in human primary epitheliums stimulated with LPS (0.01 mg/L). Lane 1 - 5: LPS stimulated at 0, 0.5, 1, 1.5, 2 h. Lane 6: negative control.

图 4 LPS 刺激不同时间人气道上皮细胞 NF-κB

而突变的 NF-κB 寡核苷酸不能竞争抑制 NF-κB 与探针的结合。抗体超迁移率实验结果显示加入 p50 抗体和 p65 抗体的有超迁移条带出现,提示 p50 和 p65 亚型参与了 NF-κB 的活化,见图 5。

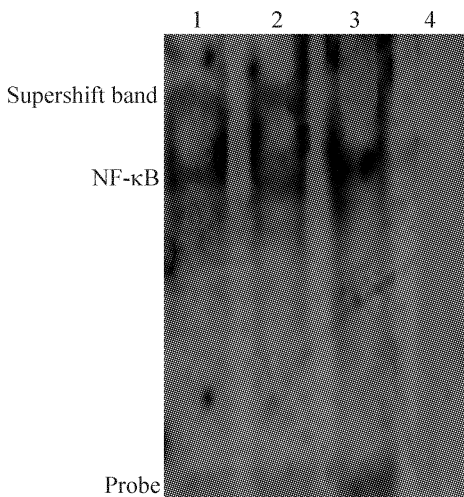


Fig 5 Supershift assays and compete inhibition of NF-κB activity in human primary epitheliums treated with LPS (1 mg/L). Lane 1: anti-p65; Lane 2: anti-p50 Ab; Lane 3: mutation probes; Lane 4: 100 fold unlabeled probes.

图 5 人气道上皮细胞 NF-κB 超迁移实验及竞争抑制实验

讨 论

Harder 等^[4]于 1997 年首先发现 hBD-2,他们

用高压液相层析法在牛皮癣病人皮肤中分离纯化到约 4.3 kD 的多肽,经氨基酸序列分析表明与牛的气管抗菌肽、舌抗菌肽及人 β 防御素-1 同源,属于人 β 抗菌肽成员之一,命名 hBD-2。以后逐渐证实 hBD-2 是粘膜和上皮细胞抵抗微生物入侵的重要介质,在持续暴露在病原微生物的器官表面发挥重要的抗菌作用,与 hBD-1 在所有人气道中固有、持续表达不同, hBD-2 在肺里呈可诱导表达。已发现炎性肺病如囊性纤维化、间质性肺病、肺炎、非典型分支杆菌感染患者的 BALF 或血浆中 hBD-2 蛋白水平增高。因此,有必要对其诱导表达的机制和上调表达的途径作进一步研究,以期通过基因调控表达的方法使机体内源性的 hBD-2 表达发挥具有药理抗菌活性的治疗作用。

已有研究表明, hBD-2 的诱导表达可能是通过多信号途径实现的,其中 NF-κB 的作用较为明确和重要。Tsutsumi 等^[2]用 LPS 刺激鼠巨噬细胞,证实 NF-κB 的激活参与了 hBD-2 的表达。他们进一步用肺泡 II 型上皮细胞系 A549 作为研究对象诱导表达 hBD-2 时,发现 hBD-2 基因转录起始点近端的两个 NF-κB 位点是 hBD-2 转录表达所必需的;而且 p65 与 p50 型 NF-κB 均参与上皮细胞系 A549 的 hBD-2 基因转录^[5]。同样,汪宇辉等^[6]通过构建 hBD-2 上游启动子序列的质粒转染 A549 细胞,再用 LPS、TNF-α 刺激,发现 hBD-2 基因上游含 NF-κB 结合位点的调控元件为 LPS、TNF-α 诱导上皮细胞 hBD-2 基因表达所必需,而 IL-6 结合基序不起作用。Tomita 等^[7]用人气道细胞株 LC2/ad 作对象,发现地塞米松、细胞内钙螯合剂可通过抑制 NF-κB 及 AP-1 的活化抑制 LPS 诱导的 hBD-2 表达。但不同的细胞在不同的刺激因素作用下,被激活的 NF-κB 类型并不相同。Qgushi 等^[8]和 Wada 等^[9]分别在人肿瘤细胞 Caco-2 及胃癌细胞诱导表达 hBD-2 时是通过激活 NF-κB 的 p65 同型二聚体实现的;国外 Jang 等^[10]用 IL-1β 刺激上皮细胞系 A549 诱导 hBD-2 表达时发现 p65 型 NF-κB 参与基因转录;Kao 等^[11]用 IL-17 刺激人原代气道上皮细胞发现抑制 p65 NF-κB 亚单位的激活可抑制 hBD-2 的表达,且 hBD-2 的表达是通过激活 p65 型 NF-κB 及 JAK 双信号通道实现的。

本研究以原代人气道上皮细胞为研究对象,使之更接近于人气道实际情况,用常用的炎性介质 LPS 刺激来诱导上皮细胞 hBD-2 表达,结果显示,加入 LPS 刺激 2 h 可见 HBD-2 mRNA 表达,呈时间依赖性,在 6-12 h 达到高峰, NF-κB 在加入 LPS 后

0.5 h 迅速活化,1 h 达到峰值,此后活性逐渐下降,且 NF- κ B 的活性变化与 LPS 呈剂量依赖关系。NF- κ B 抑制剂 PDTC 可抑制 HBD-2 mRNA 表达。抗体超迁移实验结果显示, p50 及 p65 NF- κ B 参与 hBD-2 诱导表达,因此 NF- κ B 是人气道上皮细胞表达 hBD-2 的重要的、必需的核转录因子。为进一步研究利用外源因素诱导气道 hBD-2 表达防治呼吸系统感染打下基础。

[参 考 文 献]

- [1] Schroder JM, Harder J. Human beta - defensin - 2 [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, 31(6): 645 - 651.
- [2] Tsutsumi Y, Nagaoka I. NF - kappa B - mediated transcriptional regulation of human beta - defensin - 2 gene following lipopolysaccharide stimulation [J]. *J Leukoc Biol*, 2002, 71(1): 154 - 162.
- [3] 黄 宁,唐 彬,潘小玲,等. 气管上皮细胞气液界面无血清培养 [J]. *基础医学与临床*, 2000, 20(2): 89 - 92.
- [4] Harder J, Bartels E, Christophers JM, et al. A peptide antibiotic from human skin [J]. *Nature*, 1997, 387(6636): 861.
- [5] Tsutsumi Y, Nagaoka I. Modulation of human beta - defensin - 2 transcription in pulmonary epithelial cells by lipopolysaccharide - stimulated mononuclear phagocytes via proinflammatory cytokine production [J]. *J Immunol*, 2003, 170(8): 4226 - 4233.
- [6] 汪宇辉,黄 宁,吴 琦,等. 人 β - 防御素 - 2 基因 5' - 端转录调控区 DNA 片段的克隆及序列初步分析 [J]. *中国病理生理杂志*, 2003, 19(11): 1565 - 1566.
- [7] Tomita T, Nagase T, Ohga E, et al. Molecular mechanisms underlying human beta - defensin - 2 gene expression in a human airway cell line (LC2/ad) [J]. *Respirology*, 2002, 7(4): 305 - 310.
- [8] Ogushi Ki, Wada A, Niidome T, et al. Salmonella enteritidis Flic (flagella filament protein) induces human β - defensin - 2 mRNA production by Cacl - 2 cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(32): 30521 - 30532.
- [9] Wada A, Ogushi K, Kimura T, et al. Hirayama, - T Helicobacter pylori - mediated transcriptional regulation of the human beta - defensin 2 gene requires NF - kappa B [J]. *Cell Microbiol*, 2001, 3(2): 115 - 122.
- [10] Jang BC, Ki JL, Paik JH, et al. Up - regulation of human β - defensin 2 by interleukin - 1 β in A549 cells: involvement of PI3K, PKC, p38 MAPK, JNK, and NF - κ B [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320(8): 1026 - 1033.
- [11] Kao CY, Chen Y, Thai P, et al. IL - 17 markedly up - regulates beta - defensin - 2 expression in human airway epithelium via JAK and NF - kappa B signaling pathways [J]. *J Immunol*, 2004, 173(7): 3482.