

[文章编号] 1000-4718(2007)08-1587-03

JNK 信号转导通路介导吸烟所致的气道黏液高分泌

李 琪, 周向东

(重庆医科大学附属第二医院呼吸内科, 重庆 400010)

[摘要] 目的: 探讨香烟对气道黏液分泌的影响及其信号转导机制。方法: 利用香烟提取物条件培养人气道上皮 BEAS-2B 细胞, 以 JNK 特异性抑制剂 SP600125 为干预条件。采用 RT-PCR 技术观察培养细胞黏蛋白 (MUC)5AC 转录水平的改变。同时分别采用 ELISA 和 Western blotting 法检测培养上清液中 MUC5AC 和细胞表皮生长因子受体(EGFR)的蛋白水平。结果: 香烟刺激下培养细胞 MUC5AC mRNA 和蛋白分泌水平显著高于正常培养细胞, 同时伴激活态 EGFR 蛋白含量的显著增高, 但 EGFR 蛋白总量未见显著升高。SP600125 显著下调香烟所致 MUC5AC 表达水平和分泌量的升高水平, 而未对激活态 EGFR 水平的上升产生明显影响。结论: 香烟提取物可从转录水平诱导气道上皮细胞呈现黏液高分泌状态; 进一步证明其信号转导机制有 EGFR 的作用, 而 JNK 信号通路也部分参与其中, 且不依赖于 EGFR。

[关键词] 信号转导; 烟; 气道

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

JNK signal cascades in cigarette smoke - induced mucous hypersecretion

LI Qi, ZHOU Xiang - dong

(Department of Respiratory Medicine, The Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400010, China. E-mail: zxd999@263.net)

[ABSTRACT] **AIM:** To explore the mechanism of signal cascades in cigarette smoke - induced mucous hypersecretion. **METHODS:** The BEAS-2B airway epithelial cell line was cultured in medium with cigarette smoking extracts (CSE), then treated with SP600125, which was a potent and selective c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor. The levels of mucin (MUC) 5AC in culture medium, epidermal growth factor receptor (EGFR), activated EGFR and MUC5AC level mRNA in culture cells were detected with ELISA, Western blotting and RT-PCR, respectively. **RESULTS:** There were an obvious increase in MUC5AC level and MUC5AC mRNA and activated EGFR protein in the cultures exposed to CSE. However, there was no significant change of EGFR. SP600125 significantly down-regulated the cigarette smoke - induced mucin production at both secretion and transcriptional level, and little effect on EGFR protein was observed. **CONCLUSION:** Cigarette smoke stimulates MUC5AC transcription. EGFR and JNK signal cascades may play a part role in the process. However, EGFR is independent in this process.

[KEY WORDS] Signal transduction; Smoke; Airway

正常情况下, 气管、支气管上皮细胞和黏膜下腺分泌的黏液能保护气道上皮免受空气污染物和病原体的攻击, 而在慢性气道炎症性疾病如慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 等病理情况下, 常常伴有黏液过度分泌。过多的黏液滞留加重了气流阻塞, 与病情严重程度密切相关。许多刺激物均可以引起黏液高分泌, 而香烟烟雾为最常见的刺激因素之一。研究发现, 在香烟所致黏液高分泌的信号通路中, 除已达成共识的表皮生长

因子受体(EGFR)信号转导^[1]之外, c-Jun 氨基末端激酶(JNK)也可能是一个重要的通路^[2]。本研究采用 JNK 信号通路的特异性抑制剂为处理因素, 了解其对黏液高分泌的影响, 旨在对吸烟所致黏液高分泌中可能的另一信号转导机制做一探讨。

材 料 和 方 法

1 主要材料

人气道上皮 BEAS-2B 细胞系由香港大学医学

[收稿日期] 2005-11-11

[修回日期] 2006-02-26

E-mail: zxd999@263.net

院 Judith Mak 博士提供, RPMI - 1640 培养液、Hepes 液、Trizol、小牛血清(Sigma), SP600125(Biomol), 小鼠抗 MUC5AC 单克隆抗体 45M1 (Neomarkers), 小鼠抗 EGFR 单克隆抗体(Sigma), 小鼠抗磷酸化 EGFR (P-EGFR) 单克隆抗体(Calbiochem 公司), 黏蛋白(MUC)5AC 的 PCR 引物(香港大学医学院基因研究中心)。

2 香烟烟雾提取物(CSE)的制备

参照文献^[3]方法进行: 骆驼牌无过滤嘴燃烧的香烟由注射器驱动装置以 1 puff/min 速率连续抽吸(35 mL/puff), 每支烟约 10 puff, 共使用 10 支烟。吸入的烟雾经三通管缓慢注入 20 mL 含 50 mmol/L HEPES 的 RPMI - 1640 培养液中制成悬液, 密封瓶内摇动使其充分溶解, 滴定至 pH 7.4。0.22 μm 醋酸纤维灭菌系统过滤除菌。存于冰中, 并于 0.5 h 内用于实验。

3 细胞的培养及处理

BEAS - 2B 上皮细胞系于 6 孔培养板加入 RPMI - 1640 培养液(含 10% 小牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素及 25 mmol/L Hepes), 置于 37 °C 5% CO₂ 湿度培养箱孵育, 常规换液培养, 当细胞融合达 70% 时, 按细胞浓度 1×10^8 cells/L 分为: (1) 对照组: 在无血清的新鲜 RPMI - 1640 液中继续培养; (2) 香烟组: 培养基中加入终浓度为 20% 的 CSE 孵育; (3) 香烟 + SP600125 组: 加入 20% CSE 刺激的同时给予 SP600125 30 μm。继续培养 24 h 后分别收集培养上清液和细胞, 测定蛋白含量及 mRNA 含量。

4 RT-PCR 检测黏蛋白 MUC5AC mRNA

细胞内总 RNA 的提取: 采用 Trizol 法分别提取各组细胞内的总 RNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 测 RNA 在 260 nm 和 280 nm 的吸光度(A)值, 样品 A_{260}/A_{280} 比值均介于 1.8 - 2.0, 根据 260 nm 的 A 值对样品的总 RNA 初步定量, 加入无水乙醇, 保存于 -20 °C 备用。以两步法行 RT-PCR。参照 MMLV 第 1 链 cDNA 合成试剂盒(上海生工)说明书合成 cDNA 第 1 链, 定量分析后, -20 °C 保存备用。PCR 扩增: 灭菌 PCR 管中依次加入如下试剂: MgCl₂ (25 mmol/L) 4.0 μL、10 × PCR 缓冲液 5.0 μL、Taq 酶(5×10^6 U/L) 0.5 μL、上下游引物各 1.0 μL、dNTP 4.0 μL、cDNA 2.0 μL, 加入 ddH₂O 定容至 50.0 μL, 轻轻混匀后离心。于 94 °C 预变性 10 min 终止后, 紧随 30 个循环, 循环参数: 94 °C 30 s, 55 °C 50 s, 70 °C 50 s, 后 72 °C 7 min 补齐末端。PCR 产物

经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳缓冲液为 $1 \times$ TAE, 电压 94 V 鉴定, 约 540 bp 处为目的基因片段。电泳结果经电脑吸光度面积积分分析, 以管家基因 GAPDH-mRNA 的比值作为目的基因 mRNA 的相对含量。

5 ELISA 检测培养上清液 MUC5AC 含量

吸取培养基上清液 50 μL, 与 50 μL 重碳酸盐一起于 40 °C 包被 96 孔板, 干燥, PBS 洗板 3 次, 2% 小牛血清室温封闭 1 h; 再次 PBS 洗板 3 次, 加入小鼠抗 MUC5AC 单克隆抗体 45M1 (1:100, 用含 0.05% Tween-20 的 PBS 稀释至 50 μL), 孵育 1 h; 洗板 3 次, 加入 100 μL 辣根过氧化物酶-羊抗小鼠 IgG (1/10 000; Sigma) 孵育 1 h; 四甲基联苯胺过氧化物酶溶液显色, 终止反应后测各孔 A 值($\lambda = 450$ nm), 得到黏蛋白 MUC5AC 的相对值。

6 Western blotting 检测 EGFR 及磷酸化 EGFR 含量

细胞加入冰预冷的裂解液置冰浴中 20 min, 12 000 r/min 离心 4 min, 取上清液加入等体积十二烷基磺酸钠(SDS)缓冲液煮沸 5 min, 经含有 8% 丙烯酰胺的 SDS - PAGE 电泳分离, 电压 200 V, 60 min, 注意每孔上样量一致。印迹转移至硝酸纤维素膜, 于 PBS(含 0.05% Tween-20 和 5% 脱脂牛乳)中封闭 1 h, 继而与小鼠抗 EGFR 及小鼠抗磷酸化 EGFR 单克隆抗体(均为 1:1 000; 1 mg/L)室温孵育 2 h, 加入辣根过氧化物酶-羊抗小鼠 IgG 结合物(1:10 000), 反应于室温下进行 15 h 并不断摇动。彻底洗涤后 DAB 显色, 终止反应。结果经吸光度面积积分分析, 以管家基因 GAPDH 蛋白产物条带的比值作为相对含量。

7 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS10.0 统计软件行 *t* 检验。组间差异显著性分析采用方差分析和 *q* 检验。

结 果

1 香烟提取物刺激 BEAS - 2B 细胞后 MUC 及 EGFR 的变化

上清液中香烟刺激组的 MUC、激活态 EGFR 蛋白含量和 MUC5AC mRNA 的表达水平与正常对照组相比有显著增高(均 $P < 0.01$), 但 EGFR 蛋白总量未见明显升高, 见表 1。

2 SP600125 对香烟所致 BEAS - 2B 细胞 MUC 及 EGFR 变化的影响

给予 SP600125 干预后, 明显降低了黏蛋白高水平的分泌和表达($P < 0.05$), 而对激活态的 EGFR

几乎没有影响($P > 0.05$),见表1。

表1 SP600125 对香烟所致 BEAS-2B 细胞 MUC 及 EGFR 的影响

Tab 1 Effect of SP600125 on expression of MUC and EGFR induced by smoke in BEAS-2B cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

| Group | p-EGFR | EGFR | MUC5AC | MUC5AC mRNA |
|----------|---------------|-------------|---------------|---------------|
| Control | 0.29 ± 0.06 | 0.32 ± 0.09 | 0.22 ± 0.07 | 0.32 ± 0.06 |
| CSE | 0.68 ± 0.12** | 0.36 ± 0.11 | 0.59 ± 0.12** | 0.78 ± 0.14** |
| SP600125 | 0.65 ± 0.10** | 0.35 ± 0.07 | 0.42 ± 0.09*▲ | 0.59 ± 0.11*▲ |

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; ▲ $P < 0.05$ vs CSE group.

讨 论

烟草烟雾中含有焦油、烟碱和活性氧等成分,是慢性气道黏液高分泌的最常见刺激诱导因素,大量的实验研究和流行病学调查均发现,吸烟是导致慢性支气管炎和肺气肿的主要原因^[4]。由于烟雾中成分复杂,能各自通过不同的方式作用于气道上皮细胞引起黏液分泌,故深入探究其中的信号转导机制就显得尤为必要;而研究最为广泛和透彻的是吸烟能导致 EGFR 酪氨酸激酶活化引起黏液过度分泌^[5]。本研究在香烟刺激后运用鼠抗 P-EGFR 单克隆抗体检测到激活态的 EGFR 水平增高,也进一步验证了该信号通路的存在。

MUC5AC 是气道上皮的主要黏蛋白表型^[6],且也已证实 MUC5AC 基因上游 200 bp 处有 EGF 敏感元件。但最近研究发现,吸烟引起的黏液分泌主要由 MUC5AC 基因 5' 端“EGF 敏感元件”上游约 3 kb 处的“吸烟敏感元件”所调控,该元件有 2 个序列特异性转录激活因子 AP-1 (activating protein 1) 结合位点,吸烟通过 AP-1 引起黏液分泌需要 JNK 和细胞外信号调节激酶 (extracellular signal regulated protein kinase, ERK) 参与。ERK 激活是通过 EGFR 信号通路已是不争事实,而相反, JNK 引起的黏液高分泌并不依赖于 EGFR。JNK 应激激活的机制仍不明,可能是由 ROS/Src 信号通路活化。JNK 通路是丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 信号通路系统的一员,能被生长因子、脂多糖、肿瘤坏死因子 α 等多种刺激因子激活^[7],激活后的 JNK 转而磷酸化转录因子 c-Jun 氨基末端的特定位点。c-Jun 是序列特异性转录激活因子 AP-1

的成分之一,磷酸化的 c-Jun 通过诱导同源或异源二聚体形成,与 AP-1 位点的顺式作用元件结合而启动 MUC5AC 基因的转录^[8]。

SP600125 是 JNK 的特异性抑制剂,能完全阻断 JNK 信号转导,而对 ERK 等其它激酶无抑制作用。本研究发现加入 SP600125 后黏蛋白的分泌和表达明显下降,但并没有影响激活态 EGFR 的水平,短程刺激尚未涉及 EGFR 的合成,即香烟烟雾所致气道黏液高分泌的信号转导中并不单有 EGFR 级联的作用, JNK 信号通路也部分参与了其中,且并不依赖于 EGFR,因此, JNK 的特异性抑制剂也将是治疗慢性气道黏液高分泌疾病的一个有效途径。

[参 考 文 献]

- [1] Burgel PR, Nadel JA. Roles of epidermal growth factor receptor activation in epithelial cell repair and mucin production in airway epithelium [J]. Thorax, 2004, 59(11): 992-996.
- [2] Gensch E, Gallup M, Sucher A, et al. Tobacco smoke control of mucin production in lung cells requires oxygen radicals AP-1 and JNK [J]. J Biol Chem. 2004, 279(37): 39085-39093.
- [3] Nakamura Y, Romberger DJ, Tate L, et al. Cigarette smoke inhibits lung fibroblast proliferation and chemotaxis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1995, 151(5): 1497-1504.
- [4] 许建英, 杜永成, 庞敏, 等. 香烟烟雾提取物通过活化 NF- κ B 上调小鼠巨噬细胞 ICAM-1 表达 [J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(9): 1843-1845.
- [5] Takeyama K, Jung B, Shim JJ, et al. Activation of epidermal growth factor receptors is responsible for mucin synthesis induced by cigarette smoke [J]. Am J Physiol, 2001, 280(1): L165-L172.
- [6] 周向东, 童瑾, 兰箭. 慢性阻塞型肺病患者气道黏蛋白分子表性的研究 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(7): 437.
- [7] 刘辉, 姚咏明. 细胞内炎症信号通路交汇作用研究进展 [J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(8): 1607-1613, 1627.
- [8] Kyriakis JM, Avruch J. Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation [J]. J Biol Chem, 1996, 271(40): 24313-24316.