

[文章编号] 1000-4718(2009)01-0018-04

不可分型流感嗜血杆菌通过 p38 MAPK 和 NF-κB 依赖的方式上调 IL-8 的表达*

徐峰¹, 夏靖燕^{2△}, 杨燕¹, 徐志豪¹, 沈华浩¹

(浙江大学医学院附属第二医院¹呼吸科, 浙江大学呼吸疾病研究所,²放疗科, 浙江 杭州 310009)

[摘要] 目的: 探讨不可分型流感嗜血杆菌(NTHi)致肺泡上皮细胞炎症反应的分子机制。方法: A549 肺泡上皮细胞株与 NTHi(感染复数:10)共孵育 15 min、30 min 后收集细胞,用 Western blotting 检测 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)的磷酸化;4 h 后用流式细胞仪检测胞内 NF-κB p65 亚单位的表达。预先用 p38 MAPK 抑制剂(SB203580)和 NF-κB 抑制剂(PDTC)与 A549 细胞共孵育 1 h,然后加入 NTHi,24 h 后收集上清,以酶联免疫吸附法检测白介素 8(IL-8)的水平。结果: NTHi 能迅速地诱导 p38 MAPK 通路的磷酸化。NTHi 刺激 4 h 后 A549 细胞胞内 NF-κB p65 的表达较与未加细菌组明显增加($P < 0.05$)。NTHi 刺激 A549 细胞 24 h 后上清中的 IL-8 较未加细菌组显著增加,差异显著($P < 0.05$)。与细菌攻击组比较,阻断 p38 MAPK 或 NF-κB 通路,能显著地降低 A549 细胞生成 IL-8($P < 0.05$)。结论: NTHi 以 p38 MAPK 和 NF-κB 依赖的方式诱导肺泡上皮细胞的炎症反应。

[关键词] 嗜血菌, 流感; 有丝分裂素激活蛋白激酶类; NF-κB; 白细胞介素 8; 肺泡上皮细胞

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Nontypeable haemophilus influenzae induces IL-8 expression in alveolar epithelial cells in a p38 MAPK and NF-κB dependent manner

XU Feng¹, XIA Jing-yan², YANG Yan¹, XU Zhi-hao¹, SHEN Hua-hao¹

(¹Department of Respiratory Medicine, Institute of Respiratory Diseases of Zhejiang University, ²Department of Radiotherapy, The Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China. E-mail: xiajingyan2000@yahoo.com.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the key molecular mechanism of inflammatory response in alveolar epithelial cells induced by nontypeable *haemophilus influenzae* (NTHi). **METHODS:** A549 cells were co-cultured with NTHi (multiplicity of infection, MOI: 10) and harvested 15 min and 30 min after stimulation. The phosphorylation of p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK) in A549 cells was detected by Western blotting. The intracellular expression of nuclear factor-κB (NF-κB) p65 was examined by flow cytometry 4 h after stimulation. A549 cells were preincubated with p38 inhibitor (SB203580) or NF-κB inhibitor (PDTC) for 1 h and then stimulated with NTHi for 24 h. The level of interleukin 8 (IL-8) in the supernatants was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **RESULTS:** The phosphorylation of p38 MAPK was rapidly induced by NTHi stimulation. The expression of NF-κB p65 in A549 cells after NTHi stimulation was significantly up-regulated compared with control group ($P < 0.05$). The level of IL-8 in the supernatants was increased 24 h after bacterial stimulation compared with control group ($P < 0.05$). Blockage of p38 MAPK or NF-κB remarkably decreased IL-8 secretion in A549 cells ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** NTHi induces inflammatory response in alveolar epithelial cells in a p38 MAPK and NF-κB dependent manner.

[KEY WORDS] *Haemophilus influenzae*; Mitogen activated protein kinases; NF-κB; Interleukin-8; Alveolar epithelial cells

流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*, Hi)是多形的、无动力的革兰氏阴性杆菌,分为荚膜型和无荚膜型。无荚膜型因不能与已知的 Hi 荚膜多糖抗原发生凝集反应,被称为不可分型 Hi(nontypeable

Hi, NTHi)。大量研究证实 NTHi 是成人慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive lung disease, COPD)急性加重和小儿中耳炎的最重要的病原体^[1]。

NTHi 释放细菌内毒素、纤毛毒素和蛋白水解酶

[收稿日期] 2007-12-16 [修回日期] 2008-05-27

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30500229; No. 30871130)

△通讯作者 Tel: 0571-87783537; E-mail: xiajingyan2000@yahoo.com.cn

等细菌产物,导致前炎症细胞因子释放和中性粒细胞、巨噬细胞等炎症细胞在气道和肺实质的聚集和脱颗粒,造成肺实质损伤和进行性小气道闭塞,甚至引起组织的破坏和重构,从而促进 COPD 的发生发展^[2]。因此如何有效地扼制细菌感染所致的过度炎症反应对 COPD 的防治具有重要意义。

早先的 COPD 研究多重视巨噬细胞、中性粒细胞等在呼吸道炎症和细菌清除中的作用,然而呼吸道上皮细胞作为 NTHi 作用和定植的重要靶标,在肺部炎症反应中同样占据至关重要的地位。但迄今为止呼吸道上皮细胞在产生前炎症因子、反应性氧化中介产物和花生酸类物质中的作用被严重低估^[3]。Frick 等用 NTHi 感染体外培养的呼吸道上皮细胞株 (BEAS-2B、A549 等),发现 NTHi 及其内毒素均能诱导呼吸道黏膜上皮细胞释放前炎症细胞因子白细胞介素 8 (interleutin-8, IL-8)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和细胞间黏附因子-1 的表达,这些细胞因子使中性粒细胞的趋化和活化能力明显增强,对于细菌诱导气道炎症极其重要^[4]。

本研究着重观察 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 和 NF- κ B 在介导肺泡上皮细胞炎症反应中的作用。由于目前尚无可预防 NTHi 感染的疫苗,而临床上流行的 NTHi 菌株对多种常用抗生素有较高耐药率,因此深入阐明 NTHi 感染的分子致病机制,将为制定更为有效的治疗策略、研制疫苗和新药等提供思路和依据^[5]。

材 料 和 方 法

1 主要实验材料

NTHi 菌株来自浙医二院临床分离菌^[5], A549 细胞 (CCL-185) 购自 ATCC。抗 NF- κ B p65 单抗和同型对照抗体购自 Santa Cruz。RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自 Gibco; 磷酸化 p38 MAPK 和 p38 MAPK 抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自 Cell Signaling Technology; SB203580 (p38 MAPK 抑制剂) 购自 Calbiochem; PDTC (NF- κ B 抑制剂) 购自 Sigma。

2 细胞培养和细菌刺激

A549 细胞置 RPMI-1640 (加有 10% 热灭活的胎牛血清 FCS) 中培养。取对数生长期细胞,胰酶/EDTA 消化,稀释为 5×10^8 cells/L,接种于 48 孔细胞培养板 (1×10^5 cells/well)。在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱过夜。细胞 80% - 90% 融合时,更换新鲜培养基。加入 NTHi (感染复数 MOI 为 10),分别于刺激后的 15 min、30 min 收集细胞放于电泳加样缓

冲液 [50 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8), 50 mmol/L DTT, 2% SDS, 0.1% 溴酚蓝, 10% 甘油] 中, Western blotting 检测。另组细胞先分别予 SB203580 (20 μ mol/L)、PDTC (25 μ mol/L) 预作用 1 h, 再加入 NTHi (MOI:10) 刺激, 24 h 后收集上清, 待测 IL-8。

3 Western blotting 检测 A549 细胞磷酸化 p38 MAPK 的表达

取 30 μ g 蛋白, 经 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 电转至硝酸纤维素膜, 脱脂奶粉封闭。I 抗为兔抗 p38 MAPK 磷酸化抗体 (1:1 000), II 抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (1:4 000), 增强化学发光法显色。以 p38 MAPK 的表达量作内参照。

4 流式细胞术 (FCM) 检测 A549 细胞的 NF- κ B p65 的表达

NTHi (MOI: 10) 刺激 A549 细胞 4 h 后收集细胞于加样管内 (5×10^5 cells/管), 4 °C $3 000 \times g$ 离心 10 min; 去除上清液, 加入 50 μ L PBS; 加入 5 μ L 藻红蛋白 (PE) 标记的 NF- κ B p65 抗体和 50 μ L 通透液, 混匀, 设置阴性对照: 加 isotype 抗体 5 μ L; 在 4 °C 黑暗环境中孵育 30 min; 加入 1 mL PBS 洗涤, 4 °C $3 000 \times g$ 离心 10 min, 去除上清液; 加入含 1% 多聚甲醛的 PBS 1 mL, 充分振摇; 上机测定平均荧光强度 (MFI), 用专业软件 CellQuest 3.1 获取分析数据。

5 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定上清中的 IL-8

采用双抗夹心 ELISA 法测定, 操作步骤严格按照说明书进行。IL-8 测定灵敏度为 31.2 ng/L。

6 统计学处理

采用 SPSS 11.5 统计软件, 数据以均数 \pm 标准误 ($\bar{x} \pm SE$) 表示。两组间比较行 *t* 检验, 多组间比较行单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

结 果

1 A549 细胞中 p38 MAPK 蛋白的表达

NTHi 刺激 15 - 30 min 后, A549 细胞内磷酸化的 p38 MAPK 即开始迅速增加, 这提示 p38 MAPK 可能参与 NTHi 诱导的肺泡上皮细胞的激活, 见图 1。

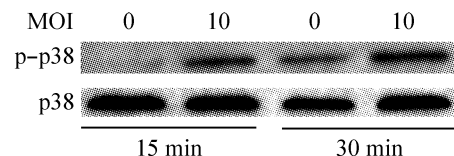


Fig 1 Effect of NTHi stimulation on the phosphorylation of p38 MAPK in A549 cells. The representative gel is from 3 independent experiments with similar results.

图 1 NTHi 对 A549 细胞的磷酸化 p38 MAPK 的影响

2 A549 细胞 NF-κB p65 的表达

FCM 法显示 NTHi 刺激 4 h 后, A549 细胞内 NF-κB p65 的表达较对照组明显增强, 见图 2A。按

以下公式计算相对平均荧光强度 (rMFI)^[6]: $rMFI = \frac{MFI_{NF-\kappa B p65}}{MFI_{Isotype\ antibody}}$, 细菌刺激组 rMFI 明显高于对照组, 两组间差异显著 ($P < 0.05$), 见图 2B。

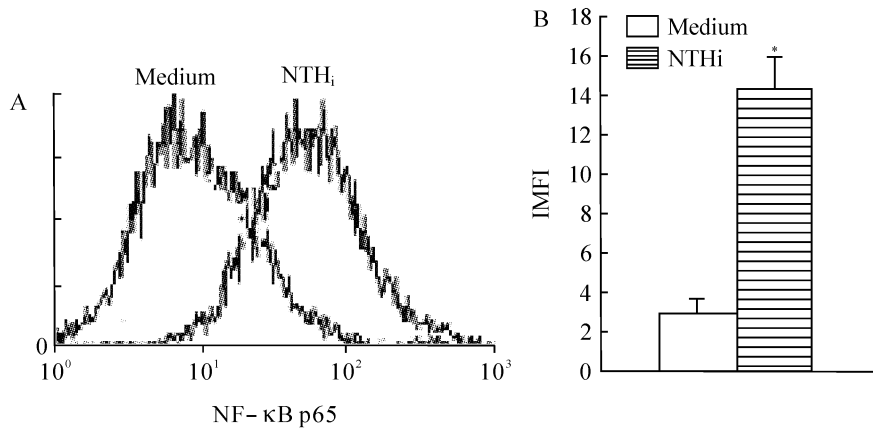


Fig 2 Expression of NF-κB p65 in A549 cells stimulated with NTHi. $\bar{x} \pm SE$. $n = 4$. * $P < 0.05$ vs medium group.

图 2 NTHi 诱导 A549 细胞内 NF-κB p65 的表达

3 NTHi 诱导的 A549 细胞的炎症反应和分子调控

NTHi 刺激 A549 细胞 24 h 后, 上清中 IL-8 水平较对照组明显增高 ($P < 0.05$)。p38 MAPK 的特异抑制剂 SB203580 和 NF-κB 抑制剂 PDTC 预处理细胞, 可以显著降低 A549 细胞分泌 IL-8 ($P < 0.05$), 见图 3。

NTHi 感染可直接或间接地促进 COPD 的发病。肺泡上皮细胞是肺部天然免疫的重要参与者, 胞内外免疫受体感知病原菌及其组分可导致肺上皮细胞释放前炎症因子和趋化因子, 而后者引起白细胞 (主要是中性粒细胞) 在肺组织的募集^[7-9]。鉴于肺组织中上皮细胞数量众多, 研究 NTHi 与上皮细胞的相互作用, 转归的分子机制对于有效地扼制细菌感染所致的过度炎症反应有重要意义。

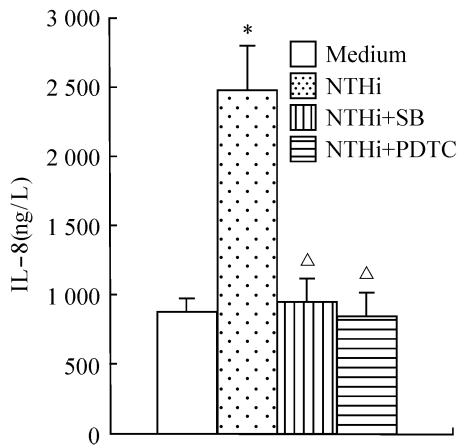


Fig 3 Effects of p38 MAPK and NF-κB inhibitors on NTHi-induced IL-8 production in A549 cells. $\bar{x} \pm SE$. $n = 4$. * $P < 0.05$ vs medium group; $\Delta P < 0.05$ vs NTHi group.

图 3 p38 MAPK 和 NF-κB 抑制剂对 NTHi 诱导 A549 细胞 IL-8 生成的影响

讨 论

大量研究表明 NTHi 是成人 COPD 急性加重和小儿中耳炎最重要的病原体^[1]。NTHi 是一种条件致病菌, 常聚居在上呼吸道, 可以持续数周或数月, 而无呼吸道症状。一旦宿主微环境和微生物之间平衡被破坏, NTHi 即可引起疾病。Sethi 等认为肺组织

近年来, NTHi 感染后气道上皮细胞免疫应答的信号转导通路研究为各国研究者所关注。李建东等^[10]的系列研究阐明: NTHi 感染可激活上皮细胞多条信号通路, 启动靶基因表达, 参与 NTHi 发病。NTHi 主要通过核因子 NF-κB 核转位依赖和非依赖的两条不同信号通路激活人上皮细胞。前者涉及 NF-κB 诱导激酶 (NIK) - IKKα/β 复合物的激活, IκBα 磷酸化和降解; 后者涉及丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 途径。上面两条途径的分叉点可能是转化生长因子 (TGF-β) 激活激酶 1 (TAK1)。另外, NTHi 诱导 NF-κB 激活过程需要 Toll 样受体 (TLR) 2 参与^[11]。利用 II 型肺泡上皮细胞 A549 的体外感染模型中, 我们着重观察了 p38 MAPK 和 NF-κB 在介导 NTHi 所致 A549 分泌前炎症因子 IL-8 中的作用。本研究发现 NTHi 刺激 A549 细胞 15 min 后, 即可测得磷酸化 p38 MAPK 的表达明显增加。FACS 检测也发现细菌刺激 4 h 后 A549 细胞内 NF-κB p65 亚单位表达较对照组明显增加。分别用 p38 MAPK 抑制剂 SB203580 和 NF-κB 抑制剂 PDTC 预处理细胞, 可以显著降低 NTHi 诱导的 A549 细胞产生 IL-8。上

述结果说明 NTHi 是通过 NF- κ B 和 p38 MAPK 两条途径诱导 IL-8 基因的表达,这与 Wang 等的报道一致。Wang 等^[12]发现 NTHi 的可溶性胞质成分通过 p38 和 ERK MAPK 途径上调肺泡上皮细胞株 A549 内 IL-8 的表达。在我们先前的研究中,凝胶迁移 (EMSA)方法显示:NF- κ B 和 p38 MAPK 并不直接发生作用^[5]。但上述结果仍不能排除这两条信号转导通路在更下游发生交集。确实,一些实验发现阻断 MAPK 可阻止依赖于 NF- κ B 的基因转录,但不影响 I κ B 的磷酸化和 NF- κ B 的核转位^[13-15]。这就很好地解释了本实验的结果:抑制 NF- κ B 或 p38 MAPK 途径,几乎可以完全阻断 NTHi 诱导的 IL-8 上调。这是因为 p38 MAPK 可以通过调节 NF- κ B p65 介导的 IL-8 基因转录活化,从而影响炎症因子表达^[16]。

深入了解 NTHi 促炎症反应的分子发病机制,将有助于新的分子靶向性药物的研发。在将来的研究中,我们需要进一步阐明天然免疫受体如 TLR 和核苷酸结合寡聚结构域等在 NTHi 及其组分诱导的炎症反应中的作用。

[参 考 文 献]

- [1] Sethi S. Infectious etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis [J]. *Chest*, 2000, 117(5 Suppl 2): 380 - 385.
- [2] Sethi S. Bacterial infection and the pathogenesis of COPD [J]. *Chest*, 2000, 117 (5 Suppl 2): 286 - 291.
- [3] Sunil, VR, Connor AJ, Guo Y, et al. Activation of type II alveolar epithelial cells during acute endotoxemia [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 282 (4): L872 - L880.
- [4] Frick AG, Joseph TD, Pang L, et al. *Haemophilus influenzae* stimulates ICAM-1 expression on respiratory epithelial cells [J]. *J Immunol*, 2000, 164 (8): 4185 - 4196.
- [5] Xu F, Xu ZH, Zhang R, et al. Nontypeable *Haemophilus influenzae* induces COX-2 and PGE2 expression in lung epithelial cells via activation of p38 MAPK and NF- κ B pathways [J]. *Respir Res*, 2008, 9(1): 16.
- [6] Droemann D, Goldmann T, Tiedjel T, et al. Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients [J]. *Respir Res*, 2005, 6(1): 68.
- [7] Kagnoff MF, Eckmann L. Epithelial cells as sensors for microbial infection [J]. *J Clin Invest*, 1997, 100 (1): 6 - 10.
- [8] Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(5): 571 - 577.
- [9] Hiemstra PS, Bals R. Series introduction: innate host defense of the respiratory epithelium [J]. *J Leuko Biol*, 2004, 75(1): 3 - 4.
- [10] Li JD. Exploitation of host epithelial signaling networks by respiratory bacterial pathogens [J]. *J Pharmacol Sci*, 2003, 91(1): 1 - 7.
- [11] Shuto T, Xu H, Wang B, et al. Activation of NF- κ B by nontypeable *Haemophilus influenzae* is mediated by toll-like receptor 2 - TAK1 - dependent NIK - IKK alpha/beta - I κ B alpha and MKK3/6 - p38 MAP kinase signaling pathways in epithelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(15): 8774 - 8779.
- [12] Wang BN, Cleary PP, Xu HD, et al. Up-regulation of interleukin-8 by novel small cytoplasmic molecules of nontypeable *haemophilus influenzae* via p38 and extracellular signal-regulated kinase pathways [J]. *Infect Immun*, 2003, 71(10): 5523 - 5530.
- [13] Vanden Berghe W, Plaisance S, Haegeman G, et al. p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor- κ B p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(6): 3285 - 3290.
- [14] Bergmann M, Hart L, Newton R, et al. I κ B α degradation and nuclear factor- κ B DNA binding are sufficient for interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α induced κ B-dependent transcription [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273 (12): 6607 - 6610.
- [15] Rawadi G, Garcia J, Lemercier B, et al. Signal transduction pathways involved in the activation of NF- κ B, AP-1, and *c-fos* by *Mycoplasma fermentans* membrane lipoproteins in macrophages [J]. *J Immunol*, 1999, 162 (4): 2193 - 2203.
- [16] Schmeck B, Zahlten J, Moog K, et al. *Streptococcus pneumoniae* - induced p38 MAPK - dependent phosphorylation of RelA at the interleukin-8 promoter [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(51): 53241 - 53247.