

论著

文章编号:1000-5404(2012)24-2498-05

淋巴细胞微粒刺激 AKT/Foxo1 阻滞气道上皮细胞周期的研究

焦燕,邱倩,杨再兴,但小革,熊玮 (400038 重庆,第三军医大学西南医院呼吸内科)

[摘要] **目的** 研究淋巴细胞微粒(lymphocyte microparticles, LMPs)作用于气道上皮细胞引起周期阻滞在 G₁ 期的机制通路。**方法** 将人类正常气道上皮细胞培养到对数生长期时,20 μg/ml 的 LMPs 按照不同的时间 0、4、8、16、20、24 h 刺激气道上皮细胞,用 RT-PCR 方法检测 P21、P27 在 mRNA 水平的表达情况。20 μg/ml 的 LMPs 按照不同的时间 0、4、8、16、24 h 刺激气道上皮细胞,用 Western blot 方法检测 P21、P27、Foxo1、p-Foxo1、AKT、p-AKT 的蛋白表达情况。用免疫细胞化学技术检测 Foxo1 的核定位情况。**结果** 与 0 h 对比,20 μg/ml 的 LMPs 作用于气道上皮细胞能使 P21、P27 的 mRNA、蛋白水平显著升高($P < 0.01$),Foxo1 蛋白水平无明显变化($P > 0.05$),p-Foxo1 的蛋白水平表达减弱($P < 0.01$),AKT 蛋白水平无明显变化($P > 0.05$),p-AKT 蛋白水平表达减弱($P < 0.01$)。**结论** LMPs 作用于气道上皮细胞上调 P21、P27 蛋白的表达引起周期阻滞 G₁ 期,可能是通过 AKT/Foxo1 信号通路调节。

[关键词] 细胞周期阻滞;淋巴细胞微粒;Foxo1;AKT;P21;P27;p-Foxo1;p-AKT

[中图分类号] R392.11;R392.32;R560.2

[文献标志码] A

Lymphocyte particles stimulates AKT/Foxo1 blocking airway epithelial cell cycle *in vitro*

Jiao Yan, Qiu Qian, Yang Zaixing, Dan Xiaoping, Xiong Wei (Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To determine the effect of lymphocyte microparticles (LMPs) on the cell cycle of airway epithelial cells and investigate the underlying mechanism. **Methods** LMPs of 20 μg/ml was treated human normal airway epithelial cells at logarithmic growth period for 0, 4, 8, 16, 20 and 24 h respectively. RT-polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the expression of P21 and P27 at mRNA level. Western blot analysis was employed to test the expression of P21, P27, Foxo1, p-Foxo1, AKT and p-AKT at protein level. Immunocytochemical assay was to test the nuclear localization of Foxo1. **Results** LMPs of 20 μg/ml resulted in an obvious increase of P21 and P27 at mRNA and protein levels ($P < 0.01$). No change was found in Foxo1 and AKT protein levels ($P > 0.05$), but their phosphorylated proteins were evidently down-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion** LMPs upregulates P21 and P27 expression and causes cell cycle arrested at G₁ phase in the airway epithelial cells through AKT/Foxo1 signaling pathways.

[Key words] cell cycle arrest; lymphocyte microparticles; Foxo1; AKT; P21; P27; p-Foxo1; p-AKT

Corresponding author: Xiong Wei, E-mail: xiongwei64@126.com

淋巴细胞微粒(lymphocyte microparticles, LMPs)是淋巴细胞受到刺激活化或凋亡时从浆膜上脱落成直径为 0.05 ~ 1.0 μm 的小囊泡颗粒^[1]。微粒主要是由磷脂和蛋白质组成,可能含有胞质成分和少量核碎片,微粒包括了细胞受体、胞质蛋白、核酸(RNA、micro RNA、DNA)以及细胞因子。可通过与靶细胞的相互作用启动靶细胞的生物学效应。近年研究发现,淋巴细胞微粒具有抗凝、促凝、促炎反应,加重内皮损伤,影响血管收缩,诱导血管生长以及免疫调节等多种生物学活性^[2]。LMPs 本身也能促进炎症介质的释放和粘

附分子的表达,从而加重炎症的反应,释放的 LMPs 促使巨噬细胞凋亡,进而释放更多的微粒导致炎症的扩大和反复。在呼吸系统疾病如慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、慢性支气管炎、哮喘等慢性疾病中与免疫调节息息相关,疾病的发生、发展直接与气道上皮的损伤与修复有着密切的关系。在 COPD 患者中,不同部位的炎症其主要致炎细胞存在差异,大、中气道以中性粒细胞为主,小气道中以淋巴细胞和巨噬细胞浸润为主,而在管壁和肺实质主要见淋巴细胞浸润,尤其是 CD8⁺ T 淋巴细胞为多。由此可见, T 淋巴细胞在 COPD 的病理进展中发挥着重要的作用。COPD 患者外周血 T 淋巴细胞总数

下降,凋亡增加,在急性加重期尤为突出^[3],淋巴细胞所释放的微粒与疾病之间的发生、发展关系现今研究较少。本课题组前期工作已经证实淋巴细胞微粒能够抑制人类正常支气管上皮细胞的生长,使其生长周期阻滞在G₁期且能诱导凋亡,这一现象在国内外尚少见报道。但LMPs引起气道上皮细胞生长周期阻滞在G₁期的具体机制不详。本研究利用人类支气管上皮细胞株16HBE进行体外实验,对其机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

人类支气管上皮细胞株(human bronchial epithelial cells, 16HBE)购自北京细胞库,兔抗人Foxo1抗体、兔抗人P21抗体、兔抗人P27抗体购自Epitomics公司,兔抗人AKT抗体购自Cell Signaling technology,鼠抗人p-AKT抗体、鼠抗人p-Foxo1抗体购自Santa Cruz公司,辣根过氧化物标记的山羊抗兔IgG、兔抗鼠IgG(二抗)购自北京中杉公司,胎牛血清购自中国四季青,DAPI购自碧云天公司,蛋白定量试剂盒购自北京康为世纪公司,总RNA提取和cDNA第1链合成试剂盒购自宝生物公司(TaKaRa),PCR引物合成由上海捷瑞生物工程有限公司完成。

1.2 细胞培养

将16HBE培养于含有10%的胎牛血清的1640培养基中,用0.25%胰酶溶液消化后,按照(1.2~1.5)×10⁴/cm²进行传代。

1.3 淋巴细胞微粒的制备

于25 cm²培养瓶培养淋巴细胞白血病细胞株6T-CEM,给予放线菌素D溶液(终浓度为0.5 μg/L)处理24 h,收集细胞培养液上清,12 000×g离心50 min共3次,取沉淀,PBS重悬,得到LMPs重悬液。LMPs的鉴定:AnnexinV-Cy5避光标记LMPs悬液,上流式细胞仪检测阳性率。上机前加入直径为1.0 μm的标准微球1×10⁵作为定位对照,分别加入等量的IgG和不作任何标记的相同的LMPs悬液作为阴性对照和空白对照。采用Bio-Rad蛋白测定仪检测LMPs的浓度^[4-6]。

1.4 实验分组

将16HBE细胞培养24 h观察其融合率达60%~70%,细胞同步化处理,更换为含有LMPs 2%的胎牛血清的1640培养基培养,按照0、4、8、16、24 h分为5组。将20 μg/ml的LMPs按照所设计的时间点加入各实验组。

1.5 RT-PCR检测P21、P27 mRNA表达

实验各组细胞终止刺激培养,用于提取总RNA。总RNA的提取、cDNA合成以及PCR反应体系均按照试剂盒的操作步骤进行操作。引物序列:P21上游5'-CCCTGTCCCTTCCTTCAGTAC-3',下游5'-CCCATCATATACCCTAACACA-3',片段大小为191 bp;P27上游5'-TGGGGCTCCGGCTAACTCTG-3',下游5'-GGCATTGGGGAACCGTCTGA-3',片段大小为244 bp;β-actin上游5'-ACAGAGCTCGCCTTTGCC-3',下游5'-ACAGAGCTCGCCTTTGCC-3',片段大小为321 bp。PCR反应的条件:94℃预变性5 min,然后依次94℃变性30 s,54℃退火30 s,72℃延伸1 min,共循环32次,最后预延伸10 min。扩增产物完成后,取5 μl PCR产物做琼脂糖凝胶电泳分析,并用

GIS凝胶图像处理系统处理图像。GIS密度分析软件分析目的基因条带的灰度值。目的片段相对表达量=目的片段灰度值/内参β-actin灰度值。

1.6 Foxo1蛋白的核定位情况

采用免疫荧光细胞化学技术检测,按照1.5×10⁴/孔细胞数种植爬片,融合率达到60%~70%时,按照0、24 h的时间点加入20 μg/ml的LMPs刺激16HBE,然后4%多聚甲醛固定30 min,0.01%的Triton通透15 min,山羊血清封闭1 h,4℃孵育一抗(兔抗人Foxo1抗体,1:100稀释),4℃过夜;加FITC标记的二抗(山羊抗兔IgG,1:100稀释)于湿盒避光室温孵育1 h;加入DAPI染核4 min;水溶性封片剂封片,激光共聚焦观察。

1.7 P21、P27、p-Foxo1、Foxo1、AKT、p-AKT的蛋白表达的检测

采用Western blot检测。细胞同步化处理,将各组按照不同的时间点加20 μg/ml LMPs刺激。用预冷的PBS洗掉培养基。用细胞刮收集细胞,离心收集细胞沉淀,加入细胞裂解液(碧云天,P0013),置于冰上裂解20 min,14 000×g离心10 min,收集上清;BCA法测蛋白浓度,100℃水浴10 min,上样总蛋白量为50 μg。10%分离胶,5%的浓缩胶跑电泳。PVDF膜转膜,5%脱脂奶粉或者5%牛血清(磷酸化蛋白)封闭,加一抗(Foxo1 1:1 000;P21 1:1 000;P27 1:1 000;AKT 1:1 000;p-AKT 1:1 000;p-Foxo1 1:1 000)4℃孵育过夜。TBST洗一抗。孵育二抗(山羊抗兔1:5 000;兔抗鼠1:5 000)。TBST洗膜。增强发光底物ECL试剂反应发光。图像分析系统测定灰度值比值。

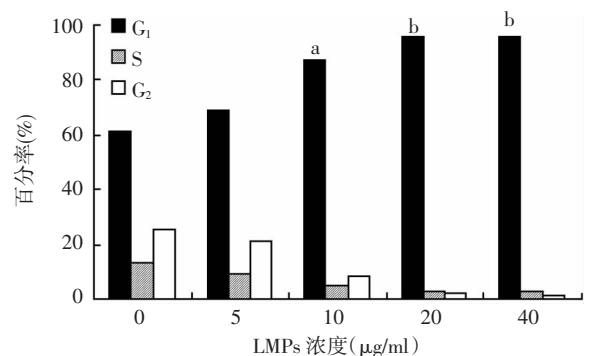
1.8 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件进行多组间参数单因素方差分析。

2 结果

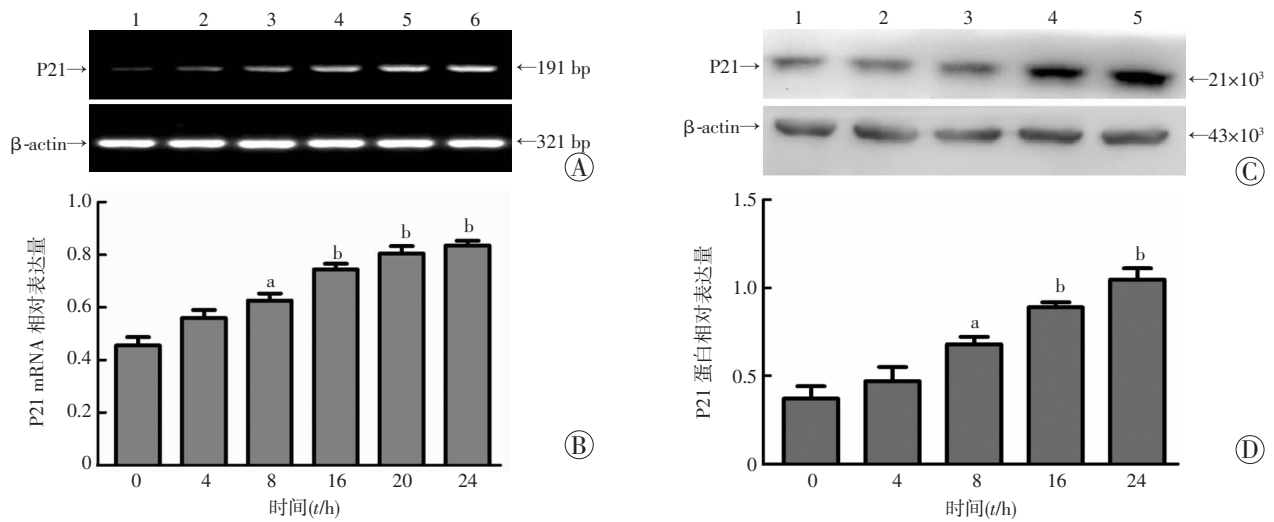
2.1 P21及P27 mRNA与蛋白表达水平的变化

20 μg/ml的LMPs作用于气道上皮细胞能使生长周期阻滞在G₁期(P<0.01,图1)。P21、P27能够调节细胞生长周期从G₁向S期过渡。检测LMPs不同时间点作用于16HBE后P21、P27 mRNA水平、蛋白水平的表达情况,与0 h比较,P21 mRNA水平和蛋白水平均表达升高(P<0.01,图2);P27 mRNA水平、蛋白水平也均明显表达升高(P<0.01,图3)。



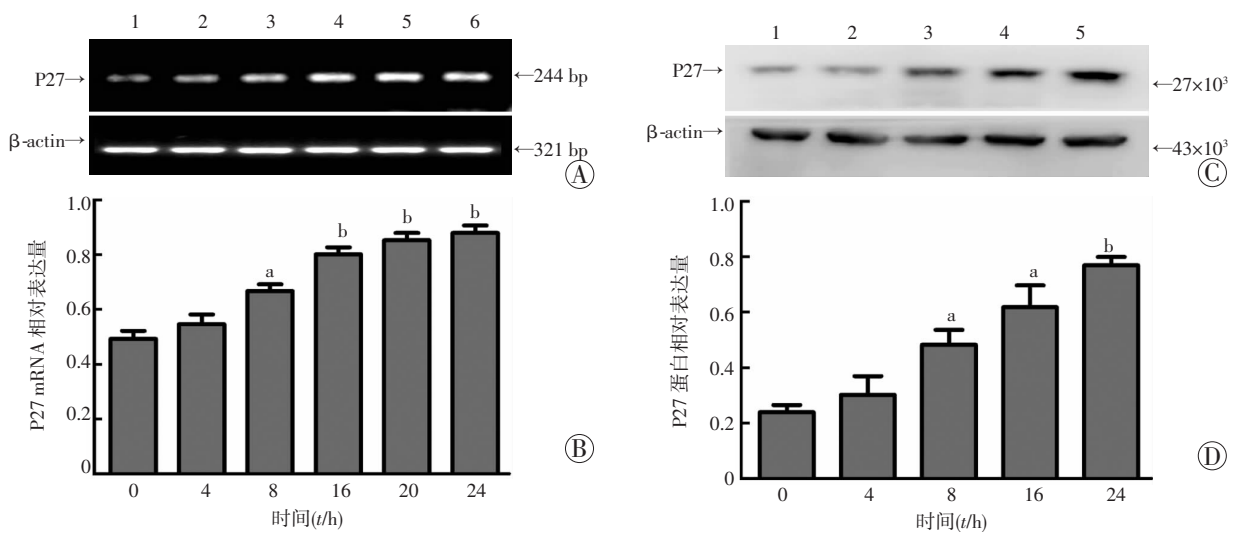
a: P<0.05, b: P<0.01, 与0 μg/ml LMPs处理组比较

图1 不同浓度LMPs作用于16HBE细胞后不同生长周期细胞比例



A: RT-PCR 检测 P21 mRNA 1~6:0、4、8、16、20、24 h; B: P21 mRNA 半定量分析 a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与 0 h 比较; C: Western blot 检测 P21 蛋白表达 1~5:0、4、8、16、24 h; D: P21 蛋白半定量分析 a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与 0 h 比较

图2 LMPs 刺激后不同时间点 16HBE 细胞中 P21 mRNA 及蛋白水平



A: RT-PCR 检测 P27 mRNA 1~6:0、4、8、16、20、24 h; B: P27 mRNA 半定量分析 a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与 0 h 比较; C: Western blot 检测 P27 蛋白表达 1~5:0、4、8、16、24 h; D: P27 蛋白半定量分析 a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与 0 h 比较

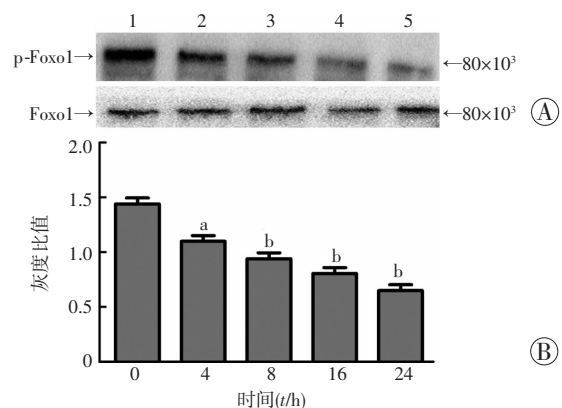
图3 LMPs 刺激后不同时间点 16HBE 细胞中 P27 mRNA 及蛋白水平

2.2 p-Foxo1、p-AKT 蛋白水平的变化

Western blot 检测显示, p-Foxo1 蛋白水平有明显减弱趋势 ($P < 0.01$), 总 Foxo1 蛋白水平无明显变化 ($P > 0.05$, 图 4), p-AKT 蛋白水平呈明显减弱趋势 ($P < 0.01$), 总 AKT 蛋白水平无明显变化 ($P > 0.05$, 图 5)。说明磷酸化水平发挥调节作用, p-Foxo1 调节 Foxo1 发挥其调节周期作用。

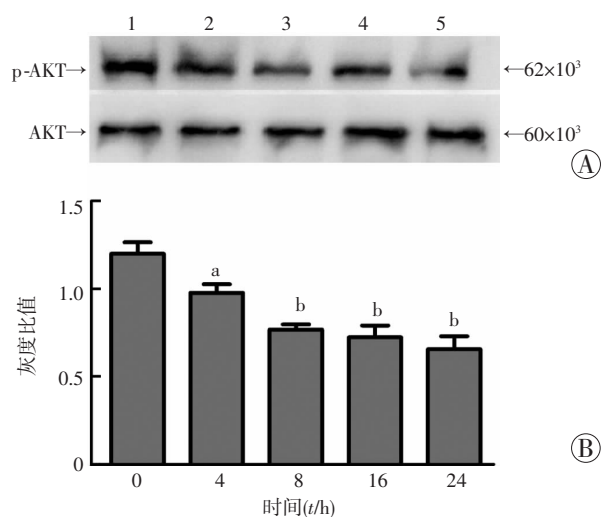
2.3 免疫荧光细胞化学 Foxo1 蛋白的核定位变化

激光共聚焦观察 Foxo1 在淋巴细胞微粒刺激 24 h 后进入细胞核的表达情况: 与对照组比较, Foxo1 在 24 h 进核比较明显(图 6)。结合 Western blot 结果可以推测 LMPs 抑制 16HBE 的生长可能与 p-AKT 以及 Foxo1 的核定位有关系。



A: Western blot 检测 1~5:0、4、8、16、24 h; B: 半定量分析 a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与 0 h 比较

图4 LMPs 刺激后不同时间点 16HBE 细胞中 p-Foxo1、Foxo1 蛋白的表达



A: Western blot 检测 1~5:0、4、8、16、24 h; B: 半定量分析 a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与 0 h 比较

图5 LMPs 刺激后不同时间点 16HBE 细胞中 p-AKT、AKT 蛋白的表达

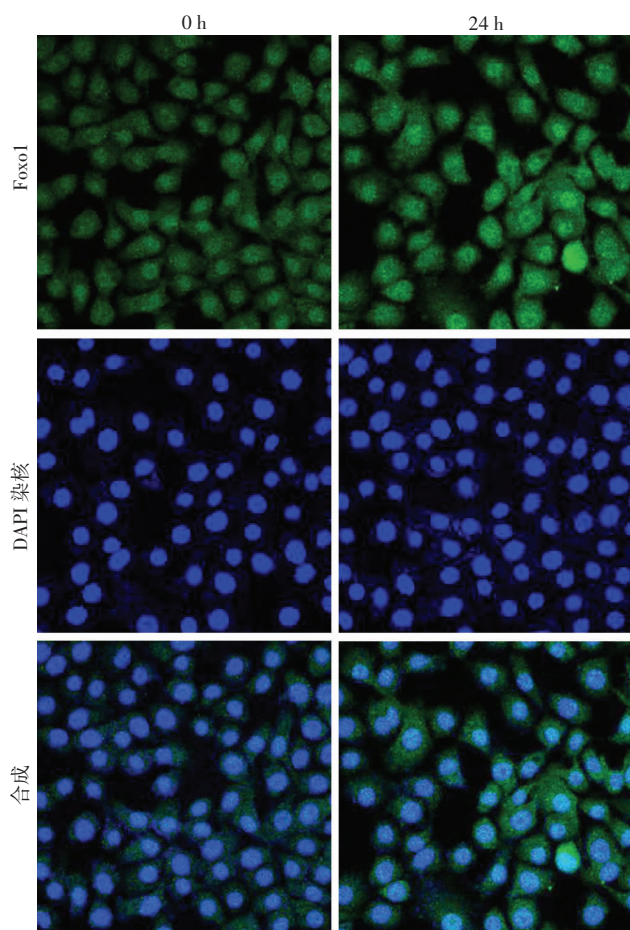


图6 LMPs 作用于气道支气管上皮细胞 24 h Foxo1 进入细胞核的情况 (激光共聚焦显微镜 $\times 300$)

3 讨论

气道上皮的损伤和修复在肺部疾病中起着至关重

要的作用,比如哮喘、COPD、慢性支气管炎等疾病的发生、发展直接与气道上皮的损伤与修复有着密切的关系。研究发现在 COPD 患者中,尤其是急性加重期,外周血中发现大量凋亡的 T 淋巴细胞,以 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 为主,同时血清中的白介素-6 (IL-6)、白介素-8 (IL-8)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis fact, TNF- α) 的水平升高,但只有 TNF- α 与凋亡的淋巴细胞成正相关关系^[7-8]。但凋亡的淋巴细胞释放的微粒是否与疾病的发生、发展有关系尚未有足够数据说明。研究证实白细胞微粒(单核细胞微粒和巨噬细胞微粒)通过分泌细胞因子和粘附分子加重气道上皮的损伤,主要通过上调 IL-8、细胞间粘附分子(ICAM -1)、单核细胞趋化因子(MCP-1)加重炎症反应^[9]。来源于淋巴细胞与单核细胞的微粒诱导 NF- κ B 活化,促进滑膜纤维细胞合成 IL-6 与 IL-8 等,加重炎症反应^[10]。本课题组体外实验研究发现淋巴细胞微粒能够抑制人类正常支气管上皮细胞株的生长。

一定浓度的淋巴细胞微粒作用于气道上皮细胞株能够抑制其生长且生长周期阻滞在 G_1 期。细胞周期蛋白依赖性激酶(cell cycle protein kinase dependence, CDK),是一种能够与细胞周期结合并将周期蛋白作为其亚单位,进而表现出蛋白激酶活性的蛋白,在细胞调控中起关键作用^[11-12]。CDK 的活性受 CDK 激酶抑制物(CKI)的负性调节,通过与 cyclin-CDK 复合物的结合,改变 CDK 分子活性位点空间位置^[11]。其中 P21、P27 在细胞生长周期调控中起关键作用,尤其在调控 G_1 向 S 期过渡的生长阶段^[13]。文献[13-14]证实在人类气道上皮细胞上,P21、P27 在调节生长周期中起重要作用,它们的表达上调,使其生长周期阻滞在 G_1 期。我们也证实用 LMPs 处理后的 16HBE, P21、P27 mRNA 和蛋白水平表达升高。

Foxo 家族是一类转录调节因子,在哺乳动物中分为 Foxo1、Foxo3a、Foxo4、Foxo6^[15]。Foxo 家族能够对细胞的增殖、凋亡以及细胞生长周期起调控作用^[16]。Foxo 的核定位发挥各种生物学效应,比如抗氧化、调节新陈代谢,以及调控细胞生长周期。文献[17-20]报道,在心肌细胞、乳腺上皮细胞、肝星状细胞、鼻咽癌细胞中,证实 P21、P27 是转录调节因子 Foxo1 进核后的下游靶基因, Foxo1 进核通过上调 P21、P27 使其生长周期阻滞在 G_1 期。心肌平滑肌细胞、肝星状细胞上都已经证实 P27 为 Foxo1 下游重要的调控靶点^[21-23]。我们推测在气道上皮细胞上 P21、P27 的表达升高可能是通过 Foxo1 调节的。而 Foxo1 的核定位是转录调

节激活的首要条件, Foxo1 进核后使下游靶基因 P21、P27 表达升高。AKT 激酶能够调节 Foxo1 的磷酸化水平, Foxo1 的磷酸化能够抑制其进入细胞核和促进它向细胞核外转运, 进而促进细胞的生长分化, 一旦磷酸化被抑制, Foxo1 则会进入细胞核内发挥转录活性, 上调 CKI 引起生长阻滞。LMPs 能够诱导 Foxo1 从细胞质向细胞核定位, 且随 AKT 和 Foxo1 的磷酸化水平而改变。这些结果说明 LMPs 抑制气道上皮细胞的生长很有可能是通过 Foxo1 的核定位, Foxo1 进而调节 P21、P27 的表达, 导致其生长周期阻滞在 G₁ 期。

本研究表明, LMPs 抑制气道上皮细胞生长是通过上调 P21、P27 的表达使其生长周期阻滞在 G₁ 期, 这一现象很有可能是通过 AKT/Foxo1 通路调节的, 为微粒在临床上的应用开辟了一条新路径。

参考文献:

[1] Nomura S, Ozaki Y, Ikeda Y. Function and role of microparticles in various clinical settings[J]. *Thromb Res*, 2008, 123(1): 8-23.

[2] Distler J H, Jungel A, Huber L C, et al. The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(8): 2892-2897.

[3] Cerri C, Chimenti D, Conti I, et al. Monocyte/macrophage-derived microparticles up-regulate inflammatory mediator synthesis by human airway epithelial cells[J]. *J Immunol*, 2006, 177(3): 1975-1980.

[4] Yang C, Xiong W, Qiu Q, et al. Role of receptor-mediated endocytosis in the antiangiogenic effects of human T lymphoblastic cell-derived microparticles[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2012, 302(8): R941-R949.

[5] Yang C, Mwaikambo B R, Zhu T, et al. Lymphocytic microparticles inhibit angiogenesis by stimulating oxidative stress and negatively regulating VEGF-induced pathways[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008, 294(2): R467-R476.

[6] Martin S, Tesse A, Hugel B, et al. Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression[J]. *Circulation*, 2004, 109(13): 1653-1659.

[7] Lim S C, Ju J Y, Chi S Y, et al. Apoptosis of T lymphocytes isolated from peripheral blood of patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Yonsei Med J*, 2011, 52(4): 581-587.

[8] Hodge S, Hodge G, Holmes M, et al. Increased airway epithelial and T-cell apoptosis in COPD remains despite smoking cessation[J]. *Eur Respir J*, 2005, 25(3): 447-454.

[9] Hodge S J, Hodge G L, Reynolds P N, et al. Increased production of TGF-beta and apoptosis of T lymphocytes isolated from peripheral blood in COPD[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 285(2): L492-L499.

[10] Baka Z, Senolt L, Vencovsky J, et al. Increased serum concentration

of immune cell derived microparticles in polymyositis/dermatomyositis [J]. *Immunol Lett*, 2010, 128(2): 124-130.

[11] Parry D, Bates S, Mann D J, et al. Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product[J]. *EMBO J*, 1995, 14(3): 503-511.

[12] Sherr C J, Roberts J M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression[J]. *Genes Dev*, 1999, 13(12): 1501-1512.

[13] Minagawa S, Araya J, Numata T, et al. Accelerated epithelial cell senescence in IPF and the inhibitory role of SIRT6 in TGF-beta-induced senescence of human bronchial epithelial cells[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, 300(3): L391-L401.

[14] Fischer B M, Zheng S, Fan R, et al. Neutrophil elastase inhibition of cell cycle progression in airway epithelial cells *in vitro* is mediated by p27kip1[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 293(3): L762-L768.

[15] Potente M, Urbich C, Sasaki K, et al. Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(9): 2382-2392.

[16] Lam E W, Francis R E, Petkovic M. FOXO transcription factors: key regulators of cell fate[J]. *Biochem Soc Trans*, 2006, 34(5): 722-726.

[17] Evans-Anderson H J, Alfieri C M, Yutzy K E. Regulation of cardiomyocyte proliferation and myocardial growth during development by FOXO transcription factors[J]. *Circ Res*, 2008, 102(6): 686-694.

[18] Li J, Yang L, Song L, et al. Astrocyte elevated gene-1 is a proliferation promoter in breast cancer *via* suppressing transcriptional factor Foxo1[J]. *Oncogene*, 2009, 28(36): 3188-3196.

[19] Sun X, Zhang X, Hu H, et al. Berberine inhibits hepatic stellate cell proliferation and prevents experimental liver fibrosis[J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(9): 1533-1537.

[20] van-Duijn P W, Ziel-van-der-Made A C, van-der-Korput J A, et al. PTEN-mediated G1 cell-cycle arrest in LNCaP prostate cancer cells is associated with altered expression of cell-cycle regulators[J]. *Prostate*, 2010, 70(2): 135-146.

[21] Jia G, Aggarwal A, Tyndall S H, et al. Tumor necrosis factor-alpha regulates p27 kip expression and apoptosis in smooth muscle cells of human carotid plaques *via* forkhead transcription factor O1[J]. *Exp Mol Pathol*, 2011, 90(1): 1-8.

[22] Adachi M, Osawa Y, Uchinami H, et al. The forkhead transcription factor FoxO1 regulates proliferation and transdifferentiation of hepatic stellate cells[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(4): 1434-1446.

[23] Park K W, Kim D H, You H J, et al. Activated forkhead transcription factor inhibits neointimal hyperplasia after angioplasty through induction of p27[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(4): 742-747.

(收稿:2012-09-21;修回:2012-10-23)

(编辑 王红)