

• 基础实验研究论著 •

烟曲霉提取物对人支气管上皮细胞嗜酸性粒细胞趋化因子浓度的影响*

辛 娜¹, 吴跃刚², 井发红¹, 李敬梅¹, 康 炜¹

(1. 西安医学院第一附属医院检验科, 陕西西安 710077; 2. 西安市华山中心医院呼吸内科, 陕西西安 710043)

摘要: 目的 探讨烟曲霉对呼吸道上皮细胞人嗜酸性粒细胞趋化因子(Eotaxin)浓度变化的影响及其可能机制, 为研究烟曲霉在变应性支气管肺曲霉病发病机制中的作用奠定基础。方法 分别应用不同浓度(0、8、16、20 mg/L)的烟曲霉提取物(AFE)作用体外培养人支气管上皮细胞(16HBE)不同的时间(12、24、48、72 h)。应用 ELISA 法检测细胞上清液 Eotaxin 浓度。结果 正常未给予 AFE 刺激培养条件下的对照组细胞表达一定量 Eotaxin, 而给予不同浓度的 AFE 作用 24 h 后, 细胞合成和分泌 Eotaxin 的量明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 并呈明显的时间依赖性。热处理的 AFE 仍然能刺激 16HBE 细胞分泌 Eotaxin 并呈时间依赖性。随着 AFE 浓度的升高在相同作用时间下 AFE 刺激 16HBE 细胞分泌 Eotaxin 的浓度并未呈现上升趋势。结论 AFE 并非依赖其蛋白酶活性促进呼吸道上皮细胞合成和分泌 Eotaxin, 一定浓度的 AFE 刺激 16HBE 细胞分泌 Eotaxin 呈明显的时间依赖性。

关键词: 烟曲霉; 支气管上皮细胞; 嗜酸性粒细胞趋化因子

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.24.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)24-3289-03

Effects of Aspergillus fumigatus extracts on the content of Eotaxin in human bronchial epithelial cells*

Xin Na¹, Wu Yuegang², Jing Fahong¹, Li Jingmei¹, Kang Wei¹

(1. Department of Clinical Laboratory, the First Hospital Affiliated to Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi 710077, China;

2. Department of Respiratory Medicine, Huashan Center Hospital of Xi'an, Xi'an, Shaanxi 710043, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of *Aspergillus fumigatus* extracts(AFE) on the content of Eotaxin in human bronchial epithelial cells and its possible mechanism, and to lay the foundation for the study on the effect of *Aspergillus fumigatus* in the pathogenesis of allergic bronchial pulmonary aspergillosis. **Methods** Human bronchial epithelial cells(16HBE) were cultured *in vitro*, which were exposed to different concentrations of AFE(0,8,16,20 mg/L) for different times(12,24,48,72 h). The production and release of Eotaxin in different groups were tested by ELISA. **Results** In normal control group, certain amount of Eotaxin was detected. In the experimental groups with AFE exposure after 24 h, cells produced more Eotaxin compared to normal control group($P < 0.01$), which were positively related to the exposure time. Heat-treated AFE, which lost protease activities, also exerted effect on Eotaxin production. With the increase of AFE concentration, the stimulation of 16HBE cells secreting Eotaxin content did not show a rising trend. **Conclusion** AFE is not dependent on its protease activity causes human bronchial epithelial cells to produce and release more Eotaxin. A certain concentration of AFE stimulation of 16HBE cells secreting Eotaxin is positively related to the exposure time.

Key words: Aspergillus fumigatus; bronchial epithelial cells; Eotaxin

烟曲霉为空气中常见的腐生菌, 其孢子直径很小, 可被吸入呼吸道, 极易被吸入到各级支气管和肺泡并导致多种疾病。近年来, 烟曲霉已成为临幊上仅次于白色念珠菌的一种重要的条件致病真菌^[1]。嗜酸性细胞(EOS)在气道慢性炎症和气道高反应性中起核心作用, 而嗜酸性细胞趋化因子(Eotaxin)作为 EOS 的特异性趋化因子, 与 EOS 上的特异性受体CCR3 结合, 诱导 EOS 向炎症部位移动, 使其被激活并发生脱颗粒反应, 释放微粒体中的大量活性有毒介质, 引起气道上皮细胞损伤, 导致气道高反应性的形成, 在变应性支气管肺曲霉病的发病过程中起着重要作用。

气道炎症部位的嗜酸性粒细胞增多在很大程度上是由趋化因子来调控的。呼吸道上皮细胞是 Eotaxin 的重要来源, 烟曲霉在生长过程中可以分泌多种具有生物活性的蛋白酶, 在烟曲霉致病过程中起着较为重要的作用, 是否能促进呼吸道上皮细胞合成和分泌 Eotaxin 目前还不清楚。本实验通过烟曲霉提取物(AFE)对人支气管上皮细胞的作用, 应用 ELISA 方法检测细胞上清液 Eotaxin 的浓度, 探讨烟曲霉提取物对呼吸道

上皮细胞人嗜酸性粒细胞趋化因子浓度变化的影响, 为研究烟曲霉在变应性支气管肺曲霉病发病机制中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 人支气管上皮细胞株(16HBE)由西安交通大学医学院惠赠; DMEM 培养基(Gibco 公司); 沙氏琼脂培养基为杭州天和微生物试剂有限公司产品, 人嗜酸性粒细胞趋化蛋白(Eotaxin)ELISA 检测试剂盒为上海朗卡生物科技有限公司产品。3% 蔗糖 Zapeck 溶液配置所需化学试剂由天津市天力化学试剂有限公司提供。BCA 蛋白定量试剂盒为上海贝博生物试剂公司产品。

1.2 方法

1.2.1 3% 蔗糖 Zapeck 溶液的配置 Zapeck 溶液: NaNO_3 30.0 g, KCl 35.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, 加 dd H_2O 100 mL。3% 蔗糖 Zapeck 溶液: 10 mL Zapeck 溶液, K_2HPO_4 1 g, 蔗糖 30 g, 加 dd H_2O 定容至 1 000 mL 锥形瓶内低压灭菌备用。

1.2.2 烟曲霉提取物的制备 烟曲霉来源于本院肺部烟曲霉

* 基金项目: 西安医学院校级课题资助项目(10FC19); 西安医学院附属医院院级课题资助项目(XYFY10-21)。作者简介: 辛娜, 女, 主治医师, 主要从事临床病原微生物学研究。

感染患者临床痰液标本中分离鉴定后的保存菌株。其培养基提取物和菌丝提取物的制备参考 Kauffman 等^[2]的方法。制备烟曲霉孢子悬液,加入 250 mL 3% 蔗糖 Zapeck 溶液中置 30 ℃ 摆床(200 r/min)内培养 6 d,培养基用滤纸过滤掉留取白色菌丝,无菌 PBS 冲洗,灭菌玻璃匀浆器匀浆,超声破碎仪破碎,4 ℃ 离心 10 000 r/min 30 min,留上清,4 ℃ 下透析(14×10³)72 h,0.45 μm 滤器过滤,−70 ℃ 低压冻干,−20 ℃ 保存备用,冻干粉为菌丝提取物。将加有烟曲霉孢子悬液的蔗糖 Zapeck 溶液于 30 ℃ 孵箱内静置 21 d,吸取培养基,上述相同条件下透析、过滤、冻干保存,此冻干粉为培养基提取物。后续实验应用的 AFE 为培养基提取物和菌丝提取物(1:1)的混合物,将冻干粉溶解于无血清 DMEM 并用 BCA 法进行蛋白定量,后续实验的应用浓度为 AFE 蛋白浓度。热处理的 AFE 为 AFE 溶液置于 65 ℃ 中 30 min。

1.2.3 细胞培养及实验分组 人支气管上皮细胞株 16HBE 常规培养于 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基,细胞生长至单层细胞,培养基无血清 DMEM 继续培养 24 h。实验分为 3 组:(1)正常溶剂对照组,只加入无血清 DMEM 培养基;(2)AFE 处理组,给予不同浓度 AFE(0、8、16、20 mg/L)作用不同时间(12、24、48、72 h);(3)热处理 AFE(HT-AFE)组,HT-AFE 替代 AFE。

1.2.4 ELISA 方法检测细胞上清液中 Eotaxin 的浓度 AFE 作用结束后收集细胞上清液,2 000 r/min 离心 5 min 后−80 ℃ 保存待测。应用 ELISA 法检测 Eotaxin,人嗜酸性粒细胞趋化蛋白 ELISA 检测试剂盒购自上海朗卡生物科技有限公司,按说明书操作,反应完成后用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD)值,画出标准曲线,得出最终浓度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *q* 检验, *P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 BCA 法蛋白定量结果 烟曲霉的菌丝提取物和培养基提取物的蛋白浓度分别为 198 mg/L 和 82.5 mg/L,菌丝提取物的蛋白浓度明显高于培养基提取物的蛋白浓度。

表 1 不同浓度 AFE 作用不同时间 16HBE 细胞分泌 Eotaxin 的浓度(ng/L)

AFE(mg/L)	12 h	24 h	48 h	72 h
8	22.95	26.65	34.80	42.65
16	20.40	26.90	38.50	47.30
20	20.85	26.20	30.60	48.45

表 2 不同浓度 AFE 热处理后作用不同时间 16HBE 细胞分泌 Eotaxin 的浓度(ng/L)

AFE(mg/L)	12 h	24 h	48 h	72 h
8	15.30	17.65	30.60	45.20
16	14.40	17.15	23.20	45.20
20	14.60	15.30	19.25	38.05

2.2 16HBE 细胞上清液中 Eotaxin 的浓度 不同浓度 AFE 作用不同时间 16HBE 细胞分泌 Eotaxin 的浓度,见表 1;不同浓度 AFE 热处理后作用不同时间 16HBE 细胞分泌 Eotaxin 的浓度,见表 2。16HBE 细胞上清液 ELISA 检测发现,一定浓度的 AFE 刺激 16HBE 细胞分泌 Eotaxin 呈时间依赖关系,见

图 1,随着 AFE 浓度的升高 AFE 刺激 16HBE 细胞分泌 Eotaxin 无浓度依赖关系。热处理的 AFE 刺激 16HBE 细胞分泌 Eotaxin 仍呈时间依赖关系。

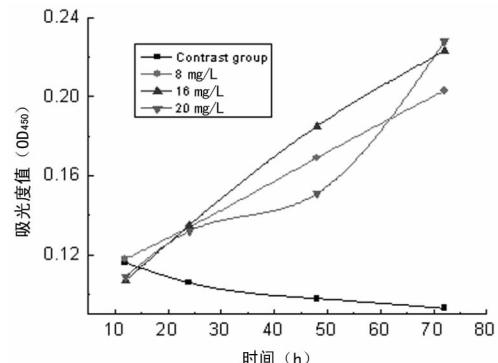


图 1 不同浓度 AFE 刺激 16HBE 细胞分泌 Eotaxin 的时间效应曲线

3 讨 论

烟曲霉在生长过程中可以分泌多种具有生物活性的蛋白酶,在烟曲霉致病过程中起着较为重要的作用。肺基质主要由弹性蛋白和胶原蛋白组成,推测烟曲霉感染主要通过弹性蛋白酶和胶原蛋白酶造成肺损伤。有研究发现烟曲霉提取物(AFE)能促进呼吸道上皮细胞粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的合成和分泌^[3],还能促进呼吸道上皮细胞的黏液蛋白 Muc5ac 表达增加^[4],使黏液分泌增加,促进哮喘的发生和发展。AFE 蛋白酶活性是否参与其他的致病过程还需要进一步研究。实验中应用的 AFE 为烟曲霉菌丝提取物和烟曲霉培养基提取物的 1:1 混合物,分别代表了烟曲霉菌丝的成分和生长过程中分泌到周围环境内的蛋白成分,AFE 体外作用可以代表吸入的烟曲霉对呼吸道上皮细胞的特异性作用。

变应性支气管肺曲霉病(ABPA)系肺泡、肺间质和支气管对曲霉抗原(主要是烟曲霉)产生的变态反应性炎症,嗜酸性粒细胞升高在变应性支气管肺曲霉病的发病过程起着重要作用,研究发现抗原诱导嗜酸性粒细胞在肺部组织的募集中,嗜酸性粒细胞趋化因子 Eotaxin 起主要作用^[5]。Eotaxin 基因为组成性表达,在各种组织中都能检测到其 mRNA 水平。Eotaxin 既可由结构性细胞(如上皮细胞、纤维原细胞、平滑肌细胞、内皮细胞等)也可由渗出性炎症细胞(如巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞等)产生。在正常的呼吸道, Eotaxin 主要由上皮细胞产生^[6]。支气管上皮细胞一般被认为是结构细胞,具有屏障功能,研究发现,体外培养的支气管上皮细胞株和正常人支气管上皮细胞在基础状态下能低水平表达 Eotaxin^[7]。本研究中正常未给予 AFE 刺激培养条件下的对照组细胞表达一定量的 Eotaxin,与文献报道一致。给予不同浓度的 AFE 作用 12 h 后,细胞合成和分泌 Eotaxin 的量与对照组相比无统计学差异(*P* > 0.05),而给予不同浓度的 AFE 作用 24 h 后,细胞合成和分泌 Eotaxin 的量明显高于对照组(*P* < 0.01)。正常未给予 AFE 刺激培养条件下的对照组细胞随着培养时间的延长分泌 Eotaxin 的量呈下降趋势,8、16、20 mg/L 的 AFE 刺激 16HBE 细胞分泌 Eotaxin 的浓度随作用时间的延长均呈上升趋势,表现出明显的时间依赖关系。

龙飞等^[3-4]研究发现 AFE 依赖其丝氨酸蛋白酶活性刺激细胞合成分泌 GM-CSF 以及黏液蛋白 Muc5ac,而且呈明显的时间和浓度依赖关系。热处理的 AFE 蛋白酶活性完全丧失并不能有效刺激细胞合成和分泌 GM-CSF 以及黏液蛋白 Muc5ac。本研究中随着 AFE 浓度的升高,16HBE 细胞分泌

Eotaxin 的浓度在 AFE 作用相同时间后并没有出现升高的趋势,而且 65 ℃、30 min 对 AFE 进行热处理后作用不同时间,16HBE 细胞仍然能分泌 Eotaxin,虽然在作用 12 h 后 Eotaxin 浓度与未进行热处理组相比有所降低,但是随作用时间的延长依然呈上升趋势。可见,AFE 刺激支气管上皮细胞合成和分泌 Eotaxin 并非依赖其蛋白酶活性,因此,Eotaxin 浓度的升高与 AFE 蛋白浓度无关。在哮喘发生过程中,吸入的过敏原活化肺部肥大细胞和 Th2 型淋巴细胞,使之产生 IL-4、IL-13 和 TNF- α 。这些细胞因子能诱导气道平滑肌细胞、鼻黏膜成纤维细胞、支气管上皮细胞产生 Eotaxin^[8]。有文献报道出芽的烟曲霉孢子或菌丝能刺激肺泡上皮细胞分泌 IL-6、IL-8、TNF- α 的表达^[9-10],笔者推测一定浓度的烟曲霉提取物中的菌丝成分有可能刺激支气管上皮细胞分泌某些细胞因子,在细胞因子的作用下支气管上皮细胞分泌 Eotaxin 增加,具体的机制还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] 王菲.烟曲霉致病因子的研究进展[J].华中医学杂志,2007,31(5):357-358.
- [2] Kauffman HF, Tomee JF, Vande Riet MA, et al. Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production[J]. J Allergy Clin Immunol, 2000, 105(6):1185-1193.
- [3] 龙飞,高福生,丁星,等.烟曲霉菌提取物对人支气管上皮细胞粒-巨噬细胞集落刺激因子表达的影响[J].第二军医大学学报,

(上接第 3288 页)

细胞(MC)中 miR-216a 协同 miR-217 靶向 PTEN(phosphatase and tensin homologue)可促使 TGF- β 激活 AKT^[9];人内皮细胞中,随着年龄的增长 miR-217 逐渐增多从而抑制 SirT1(silent information regulator 1)表达,诱导细胞的早期衰亡^[10]等。但在乳腺上皮细胞中,miR-217 与 DNMT1 的作用机制尚不清楚。

瞬时转染 miR-217 minics 和 miR-217 inhibitor,过表达和抑制 miR-217,结果显示过表达 miR-217, DNMT1 蛋白表达下降;抑制 miR-217, DNMT1 蛋白表达增高,说明 miR-217 可以下调 DNMT1 的表达。利用 293T 细胞作为双荧光素酶报告实验的工具细胞,分别转染 DNMT1-UTR-WT 及 DNMT1-UTR-MUT 载体质粒,48 h 后进行双荧光检测,结果显示两者的相对荧光素酶活性具有统计学差异($P < 0.05$),说明 miR-217 通过直接作用于 DNMT1 3'UTR 下调 DNMT1 表达。

总之,本研究结果表明,在乳腺癌上皮细胞中 miR-217 对 DNMT1 表达具有调控作用,且 miR-217 通过直接作用于 DNMT1 3'UTR 调控 DNMT1 表达。这为 miR-217 可能作为乳腺癌潜在治疗靶点的体外实验研究提供了实验依据。

参考文献

- [1] Alford SH, Toy K, Merajver SD, et al. Increased risk for distant metastasis in patients with familial early-stage breast cancer and high EZH2 expression[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 132(2):429-437.
- [2] Shi JF, Li XJ, Si XX, et al. ER α positively regulated DNMT1 expression by binding to the gene promoter region in human breast cancer MCF-7 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 427

2008, 29(8):917-920.

- [4] 龙飞,高福生,丁星,等.烟曲霉菌提取物对人支气管上皮细胞 Muc5ac 表达的影响[J].中国病理生理杂志,2009, 25(2):327-332.
- [5] Im GJ, Hwang CS, Jung HH. Quantitative expression levels of regulated on activation, normal T cell expressed and secreted and eotaxin transcripts in toluene diisocyanate-induced allergic rats [J]. Acta Otolaryngol, 2005, 125(4):370-377.
- [6] 高贵民.嗜酸性粒细胞活化趋化因子与支气管哮喘的研究进展[J].国际免疫学杂志,2006, 29(2):93-96.
- [7] 欧维琳.嗜酸性粒细胞趋化因子的表达及影响因素[J].华夏医学,2006, 19(6):1288-1290.
- [8] Gounni AS, Hamid Q, Rahman SM, et al. IL-9-mediated induction of eotaxin1/CCL11 in human airway smooth muscle cells[J]. J Immunol, 2004, 173(4):2771-2779.
- [9] Balloy V, Sallenave JM, Wu Y, et al. Aspergillus fumigatus-induced interleukin-8 synthesis by respiratory epithelial cells is controlled by the phosphatidylinositol 3-kinase, p38 MAPK, and ERK1/2 pathways and not by the toll-like receptor-MyD88 pathway[J]. J Biol Chem, 2008, 283(45):30513-30521.
- [10] Bellanger AP, Millon L, Khoufache K, et al. Aspergillus fumigatus germ tube growth and not conidia ingestion induces expression of inflammatory mediator genes in the human lung epithelial cell line A549[J]. J Med Microbiol, 2009, 58(2):174-179.

(收稿日期:2013-07-23)

(1):47-53.

- [3] 陈道荣,王丕龙,黄爱龙,等.沉默 dnmt1 基因对胃癌细胞株 AGS 细胞周期、增殖及凋亡的影响[J].癌症,2006, 25(3):308-314.
- [4] 彭攸,赵卫卫,李晓娇,等.人 EZH2 基因编码区及 3'非翻译区融合蛋白重组慢病毒表达载体构建及其在 293T 细胞中的表达[J].中华临床医师杂志,2012, 6(24):8151-8155.
- [5] Wang YS, Chou WW, Chen KC, et al. MicroRNA-152 mediates DNMT1-regulated DNA methylation in the estrogen receptor α gene [J]. PLoS One, 2012, 7(1):e30635.
- [6] Sha Z, Yu W, Yun SL, et al. MicroRNA-126 regulates DNA methylation in CD4 $^{+}$ T cells and contributes to systemic lupus erythematosus by targeting DNA methyltransferase [J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(5):1376-1386.
- [7] Akemi T, Motoyuki O, Takeshi Y, et al. MiRNA-140 acts as a liver tumor suppressor by controlling NF- κ B activity via directly targeting Dnmt1 expression[J]. Hepatology, 2013, 57(1):162-170.
- [8] Zhao WG, Yu SN, Lu ZH, et al. The miR-217 microRNA functions as a potential tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting KRAS[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(10):1726-1733.
- [9] Kato M, Putta S, Wang M, et al. TGF- β activates Akt kinase via a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN[J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(7):881-889.
- [10] Rossella M, Viviana C, Marina C, et al. MicroRNA 217 modulates endothelial cell senescence via silent information regulator 1[J]. Circulation, 2009, 120(15):1524-1532.

(收稿日期:2013-08-28)