

• 检验技术与方法 •

支气管上皮细胞、中性粒细胞联合培养与细胞表面黏附分子产生的炎症通路研究*

唐红卫¹, 韩 铭², 向代军¹, 刘一凡³, 张洪瑞⁴, 吴小利⁴, 谢尹晶⁴, 李绵洋¹, 王成彬^{1△}

(中国人民解放军总医院: 1. 临床检验科; 2. 生化教研室, 北京 100853; 3. 中南大学湘雅医学院, 湖南长沙 410000; 4. 温州医科大学生命检验学院, 浙江温州 325000)

摘要:目的 探讨支气管上皮细胞(BEAS-2B 细胞)与中性粒细胞联合培养时细胞间黏附分子 1(ICAM-1)、ICAM-3、血管细胞黏附因子 1(VCAM-1)等细胞表面黏附分子的产生机制。方法 免疫磁珠法提取外周血中性粒细胞, 建立中性粒细胞与 BEAS-2B 细胞联合培养体系。流式细胞仪(FCM)检测 BEAS-2B 细胞和中性粒细胞中 ICAM-1、ICAM-3、VCAM-1 的表达量, 蛋白质印迹检测细胞内 NF- κ B 及 p38-MAPK 的表达。结果 BEAS-2B 细胞和中性粒细胞联合培养时, BEAS-2B 细胞表面黏附分子 ICAM-1、ICAM-3、VCAM-1 的表达量均较单独培养时明显增高($P < 0.05$), 加入抑制剂(MG-132、SB203580)表达量均明显下降($P < 0.05$); 两种抑制剂对 BEAS-2B 细胞 VCAM-1、ICAM-3 表达作用比较差异无统计学意义($P > 0.05$); 而 MG-132 对 ICAM-1 表达的抑制作用比 SB203580 强($P < 0.05$), 且在调控 ICAM-1 表达上两种抑制剂有协同作用。蛋白质印迹显示联合培养组 BEAS-2B 细胞内 Phospho-I κ B α 及 Phospho-p38-MAPK 蛋白水平明显增高($P < 0.05$)。结论 BEAS-2B 细胞与中性粒细胞联合培养可激活 BEAS-2B 细胞体内 NF- κ B 及 p38-MAPK 通路, 与 ICAM-1、ICAM-3、VCAM-1 的表达相关。

关键词: 中性粒细胞; 细胞表面黏附分子; 炎症通路

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.08.039

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)08-1026-03

The study of the inflammation pathway on the adhesion molecules induced by the
co-culture between neutrophils and bronchial epithelial cells*

Tang Hongwei¹, Han Ming², Xiang Daijun¹, Liu Yifan³, Zhang Hongrui⁴, Wu Xiaoli⁴,
Xie Yinjing⁴, Li Mianyang¹, Wang Chengbin^{1△}

(1. Department of Laboratory Medicine; 2. Department of Biochemistry, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; 3. Xiangya Medical College of Central South University, Changsha, Hunan 410000, China; 4. Academy of Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325000, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of adhesion molecules(ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1) upon the interaction between neutrophils and bronchial epithelial cells(BEAS-2B cells). **Methods** The system of human bronchial cells co-cultured with human neutrophils was constructed. The FCM method was used to explore levels of ICAM-1, ICAM-3 and VCAM-1 on BEAS-2B cells and neutrophils. The Western blot method was used to explore levels of NF- κ B and p38-MAPK proteins. **Results** The levels of ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1 were higher in co-culture system than those in cells cultured singly($P < 0.05$). When treated with inhibitors (MG-132, SB203580), the levels of ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1 were decreased($P < 0.05$). The ICAM-1 inhibition effect of MG-132 was much better than SB203580($P < 0.05$). The levels of Phospho-I κ B α and Phospho-p38-MAPK were higher in co-culture system than those in cells cultured singly($P < 0.05$). **Conclusion** In co-cultured system, the signal transduction pathway of NF- κ B and p38-MAPK in BEAS-2B can be activated, which can regulate the release of adhesion molecules.

Key words: neutrophils; interleukins; inflammatory pathways

气道炎症过程中, 受损的支气管上皮细胞释放一系列炎症介质, 诱导大量中性粒细胞聚集在支气管上皮细胞周围并释放大量炎症介质, 这些炎症介质介导支气管上皮的损伤、修复和重建过程^[1]。目前普遍认为中性粒细胞是气道炎症反应的主要作用细胞, 但近期研究表明, 气道上皮细胞在受外界刺激后, 也会释放一系列炎症介质, 调控炎症反应。因此, 支气管上皮细胞和中性粒细胞的相互作用是炎症发生的基础^[2]。作者前期研究表明, 支气管上皮细胞与中性粒细胞接触后, 细胞间黏附分子 1(ICAM-1)、ICAM-3、血管细胞黏附因子 1(VCAM-1)明显增加^[3]。本研究将继续探讨支气管上皮细胞(BEAS-2B

细胞)与中性粒细胞联合培养时细胞表面黏附分子产生的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂 Anti-CD16 免疫磁珠(Miltenyi Biotech, 德国), DMEM/F12 培养基(Hyclone, 美国), 白细胞介素 8(IL-8)酶联免疫吸附试验试剂盒(达科为, 中国), FITC Mouse Anti-Human CD50(BD, 美国), PE Mouse Anti-Human CD106(BD, 美国), PE Mouse Anti-Human CD54(BD, 美国), PE Mouse IgG1 κ Isotype Control (BD, 美国), FITC Mouse IgG2b κ Isotype Control (BD, 美国), Phospho-I κ B α (Ser32, 14D4) Rabbit mAb

(cellsignalTechnology, 美国), Phospho-p38-MAPK (Thr180/Tyr182) Rabbit mAb (CellSignalTechnology, 美国), 山羊抗兔 IgG/辣根酶标记(中杉金桥, 中国), SB-203580 (Selleck, 美国), MG-132 (Selleck, 美国), RIPA 高效裂解液(索莱宝, 中国)。

1.2 仪器 磁性分离器 (Miltenyi Biotec, 德国), LS 分离柱 (Miltenyi Biotec, 德国), FACS Calibur 流式细胞仪 (BD, 美国), Real-time PCR 热循环仪 (TL988-II 型, 西安天隆科技有限公司), 蛋白电泳仪 (BD, 美国), TransBlotSD 半干转印槽 (BD, 美国), 全自动血细胞分析仪 (SysmexXE-2100, 日本)。

1.3 细胞来源 采集健康成人新鲜血 20 mL (13.8% 枸橼酸钠抗凝), 用于提取中性粒细胞; BEAS-2B 细胞由军事医学科学院朱茂祥教授惠赠, 来自于健康人支气管上皮细胞 NHBE, 美国专利号: U. S. Pat. 4885238, 引进时细胞代龄为 22 代。

1.4 方法

1.4.1 中性粒细胞提取 取抗凝全血 20 mL, 离心 (4℃, 1 000 r/min, 5 min), 弃上清, 留取白细胞层和红细胞层; 加入 20 mL 蒸馏水, 1 min 后加入 1.8% NaCl, 充分混匀, 离心 (4℃, 1 000 r/min, 5 min), 弃上清液; PBS (含 2% FCS) 缓冲液清洗粒细胞, 加入 0.5 mL PBS (含 2% FCS) 制成细胞悬液; 白细胞计数; 每 5×10^7 个细胞需加入 50 μ L Anti-CD16 免疫磁珠^[4], 混匀, 在 4~8℃ 摇床上孵育 30 min, 孵育临近结束时准备 LS 分选柱, 并用 3 mL 预冷 PBS (含 2% FCS) 缓冲液灌注, 注意勿使气泡进入柱子; 孵育后, 用 1 mL PBS (含 2% FCS) 缓冲液稀释细胞-抗体溶液, 加入分选柱, 等待液体全部经过磁场, 移去磁场, 用 PBS 清洗 LS 分选柱, 收集中性粒细胞; PBS (含 2% FCS) 缓冲液清洗细胞。全自动血细胞分析仪鉴定中性粒细胞浓度, 台盼蓝染色鉴定细胞活力。取纯度大于 95%, 活力大于 90% 的中性粒细胞, 用 DMEM/F12 培养基重悬待用^[5]。

1.4.2 中性粒细胞与 BEAS-2B 细胞共培养体系建立 BEAS-2B 细胞培养于 DMEM/F12 培养基 (含 10% 胎牛血清), 37℃, 5% CO₂, 95% 湿度培养, 待形成单层细胞时加入中性粒细胞。抑制性实验中, BEAS-2B 细胞和中性粒细胞预先用 MAPK 抑制剂 (SB-203580) 和核因子 κ B (NF- κ B) 抑制剂 (MG-132) 处理 1 h^[6]。

1.4.3 实验分组 BEAS-2B 细胞单独培养组 (N 组), 两种细胞联合培养组 (B+N 组), 两种细胞联合培养加入 SB-203580 组 (B+N+S 组), 两种细胞联合培养加入 MG-132 组 (B+N+M 组), 两种细胞联合培养加入 SB-203580 和 MG-132 组 (B+N+S+M 组)。流式细胞分析时需将中性粒细胞及 BEAS-2B 细胞分离; 蛋白质印迹分析时需去除中性粒细胞, 取 BEAS-2B 细胞进行检测。

1.4.4 流式细胞分析 BEAS-2B 细胞按 3×10^5 /孔接种于 12 孔板, 待细胞融合大于 95%, 每孔加入 2×10^6 中性粒细胞, 共孵育 15 h^[7]。收集培养中的中性粒细胞, 用 PBS 清洗 BEAS-2B 细胞 3 次。加入细胞消化液, 置孵箱 37℃, 20 min, 收集 BEAS-2B 细胞。在 BD 专用管中分别加入 FITC Mouse Anti-Human CD50、PE Mouse Anti-Human CD106、PE Mouse Anti-Human CD54 各 10 μ L, 以及同型对照 PE Mouse IgG1 κ Isotype Control、FITC Mouse IgG2b κ Isotype Control 各 2 μ L, 4℃ 避光孵育 30 min, 洗涤后加入 FCAS 缓冲液重悬, 上机检测。通过平均荧光强度 (MFI) 分析细胞表面 ICAM-1、ICAM-3、VCAM-1 的表达。

1.4.5 蛋白质印迹 BEAS-2B 细胞按 5×10^5 /孔接种于 6 孔板中, 待形成单层细胞时, 每孔加入 4×10^6 中性粒细胞, 共孵育 15 min^[8], 加入 p38-MAPK 抗体孵育 30 min^[9], 去除中性粒细胞, 用 PBS 清洗 BEAS-2B 细胞 3 次。胰蛋白酶消化, 收集 BEAS-2B 细胞, 加入 RIPA 高效裂解液, 4℃ 12 500 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 即为所提取蛋白。加入上样缓冲液, 煮沸 15 min, 进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳。电泳结束后, 采用半干转膜法将蛋白转入 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭 4 h, 然后加入兔源性单克隆抗体, 4℃ 过夜。TBST 洗膜 3 次, 加入山羊抗兔 IgG/辣根酶标记抗体, 室温 1 h。洗膜 3 次, 加入发光液, 显影。

1.5 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间两两比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 BEAS-2B 细胞 ICAM-1、ICAM-3、VCAM-1 的表达

BEAS-2B 细胞和中性粒细胞联合培养时, BEAS-2B 细胞 ICAM-1、ICAM-3、VCAM-1 的表达比单独培养时明显增高 ($P < 0.05$); 加入抑制剂后, 3 种黏附蛋白的表达均有明显降低 ($P < 0.05$); ICAM-3、VCAM-1 对 2 种抑制剂的敏感程度比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 而 MG-132 对 ICAM-1 的抑制作用明显强于 SB203580, 并且 2 种抑制剂联合使用可进一步降低 ICAM-1 的表达。

2.2 各组中性粒细胞 ICAM-1、ICAM-3、VCAM-1 的表达

BEAS-2B 细胞和中性粒细胞联合培养并不会增强中性粒细胞表面 ICAM-3、VCAM-1 的表达, 而联合培养可极大刺激中性粒细胞表面 ICAM-1 的表达; 加入抑制剂后 ICAM-1 的表达量明显降低, 且加入 MG-132 后中性粒细胞表面 ICAM-1 表达水平较 SB203580 为低, 但差异并无统计学意义 ($P > 0.05$), 联合使用两种抑制剂并不会进一步降低 ICAM-1 的表达。

2.3 蛋白质印迹检测 BEAS-2B 细胞内 NF- κ B、p38-MAPK 蛋白的表达 BEAS-2B 细胞单独培养时, 细胞内不表达 Phospho-I κ B α ; 加入中性粒细胞联合培养后, 细胞内 Phospho-I κ B α 的表达量明显增加 ($P < 0.05$)。加入 MG-132 后, BEAS-2B 细胞内 Phospho-I κ B α 表达量下降 ($P < 0.05$)。BEAS-2B 单独培养时表达低水平的 Phospho-p38-MAPK, 受到中性粒细胞刺激后 Phospho-p38-MAPK 的表达量明显增加 ($P < 0.05$), 而加入 SB-203580 能有效抑制 BEAS-2B 细胞体内 Phospho-p38-MAPK 的表达 ($P < 0.05$)。见图 1 (见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

3 讨论

支气管上皮细胞作为呼吸系统的主要防御细胞, 除通过纤毛摆动和黏液运输病原体发挥物理屏障外, 还通过分泌各种炎症因子、趋化因子、巨噬细胞炎性蛋白等, 共同发挥防御作用^[10-11]。气道炎症过程中, 气道黏膜充血水肿, 黏液腺增生肥大, 体内中性粒细胞开始向炎症区域趋化、聚集。中性粒细胞释放一系列炎症介质, 可分解血管基底膜、结缔组织的胶原蛋白及弹性蛋白, 引起血管扩张和通透性增加^[12]。Kim 等^[13]研究表明, 在气道炎症过程中, 中性粒细胞释放的大量炎性介质可引起支气管上皮损伤。近年来研究表明, 支气管上皮细胞亦可影响中性粒细胞的功能。Patik 等^[14]研究表明, 支气管上皮细胞可释放粒细胞集落刺激因子来减缓中性粒细胞的凋亡。

作者前期研究表明,炎症过程中支气管上皮细胞 ICAM-1、ICAM-3、VCAM-1 表达增高^[3],这些黏附因子介导中性粒细胞与支气管上皮细胞之间的黏附,加强中性粒细胞的作用。因此,中性粒细胞和支气管上皮细胞的作用是双向的,二者相互进行信息传递以完成协调反应。本研究通过建立支气管上皮细胞与中性粒细胞共培养体系,探讨信号通路在调节细胞表面黏附分子表达中的作用。

本研究发现,BEAS-2B 细胞与中性粒细胞联合培养,可极大地刺激 BEAS-2B 细胞表面黏附分子的表达,而对中性粒细胞,除 ICAM-1 的表达明显增加外,另外 2 种黏附分子未见明显变化。这说明 BEAS-2B 细胞在接受中性粒细胞刺激后,可增加细胞表面黏附分子的表达。而对中性粒细胞本身黏附分子的表达影响相对较小(除 ICAM-1)。Wong 等^[9]发现 BEAS-2B 细胞与嗜酸性粒细胞共同孵育,是通过激活细胞内 NF-κB、p38-MAPK 通路等来调控表面黏附分子的表达。而 NF-κB、p38-MAPK 通路是否涉及中性粒细胞对支气管上皮细胞的刺激作用,是本研究的重点。因此,作者在实验中加入 NF-κB 通路抑制剂——MG-132 以及 p38-MAPK 通路抑制剂——SB203580,结果发现,SB203580、MG-132 可抑制 BEAS-2B 细胞表面黏附分子的表达,这说明 BEAS-2B 细胞在接受中性粒细胞刺激后会激活 BEAS-2B 细胞内 NF-κB、p38-MAPK 通路。对于中性粒细胞,2 种抑制剂对 ICAM-1 的表达亦有明显的抑制作用。本研究还发现 MG-132 对 ICAM-1 的抑制作用较 SB203580 强,ICAM-3、VCAM-1 对 2 种抑制剂的反应差别不大。这说明 NF-κB 通路对调节 ICAM-1 的表达起主要作用。而 BEAS-2B 细胞表面 ICAM-3、VCAM-1 的表达则是 2 种通路共同作用的结果。蛋白质印迹结果与流式细胞分析结果相一致,BEAS-2B 细胞在接受中性粒细胞刺激后,激活细胞内 NF-κB、p38-MAPK 通路。

综上所述,支气管上皮细胞直接参与气道炎症过程,中性粒细胞在与支气管上皮细胞接触后,主要通过激活支气管上皮细胞内的 NF-κB、p38-MAPK 通路,间接调控 ICAM-1、ICAM-3、VCAM-1 的表达,加重气道炎症反应。而 NF-κB、p38-MAPK 通路抑制剂可有效抑制表面黏附分子的表达。本研究探讨了炎症通路在气道炎症过程中细胞表面黏附分子表达的作用,为临床气道炎症治疗提供一定的实验基础。

参考文献

[1] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗和管理方案)[J]. 柳州医学,2012(3):

171-179.
[2] Chuang CY,Chang CH,Huang YL. Thioredoxin mediates remodeling factors of human bronchial epithelial cells upon interaction with house dust mite-stimulated eosinophils[J]. Inhal Toxicol, 2009,21(2):153-167.
[3] 邵伶俐,兰晓梅,王成彬,等. 葛根素对支气管上皮细胞和中性粒细胞共培养体系中黏附分子表达的影响[J]. 解放军医学杂志, 2012,37(4):308-311.
[4] Munoz NM,Leff AR. Highly purified selective isolation of eosinophils from human peripheral blood by negative immunomagnetic selection[J]. Nat Protoc,2006,1(6):2613-2620.
[5] Kassianos AJ,Jongbloed SL, Hart DN, et al. Isolation of human blood DC subtypes[J]. Methods Mol Biol,2010,595(5):45-54.
[6] Wang CB,Wong CK,Ip WK,et al. Induction of IL-6 in co-culture of bronchial epithelial cells and eosinophils is regulated by p38 MAPK and NF-kappa B[J]. Allergy,2005,60(11):1378-1385.
[7] 邵伶俐,兰晓梅,张立文,等. 葛根素对支气管上皮细胞和中性粒细胞共培养体系 VCAM-1 表达的影响[J]. 解放军药学报, 2012,28(2):102-105.
[8] Xie S,Li J,Wang JH,et al. IL-17 activates the canonical NF-kappaB signaling pathway in autoimmune B cells of BXD2 mice to up-regulate the expression of regulators of G-protein signaling 16[J]. J Immunol,2010,184(5):2289-2296.
[9] Wong CK,Wang CB,Li ML,et al. Induction of adhesion molecules upon the interaction between eosinophils and bronchial epithelial cells;involvement of p38 MAPK and NF-kappaB[J]. Int Immunopharmacol,2006,6(12):1859-1871.
[10] Oudijk EJ,Lo Tam Loi AT,Langereis JD,et al. Functional antagonism by GM-CSF on TNF-alpha-induced CD83 expression in human neutrophils[J]. Mol Immunol,2008,46(1):91-96.
[11] Wolach B,van der Lan LN. Growth factors G-CSF and GM-CSF differentially preserve chemotaxis of neutrophils aging in vitro [J]. Exp Hematol,2007,35(4):541-550.
[12] 文文,赖国祥. 慢性阻塞性肺疾病气道重构的研究进展[J]. 医学研究生学报,2008,21(11):1214-1218.
[13] Kim V,Kelemen S,Abuel-Haija M, et al. Small airway mucus metaplasia and inflammation in chronic obstructive pulmonary disease[J]. COPD,2008,5(6):329-338.
[14] Patick G. Holt antigen presentation in the lung[J]. Am J Respir Crit Care Med,2000,162(4):151-156.

(收稿日期:2013-12-28)

(上接第 1025 页)

[3] 汪海萍,邵燕,王志良,等. 分光光度法测定废水中草甘膦的探讨[J]. 环境监测管理与技术,2012,24(3):56-57.
[4] 范顺利,吕超,高建磊. 反相流动注射化学发光测定草甘膦[J]. 理化检验:化学分册,2001,37(7):289-291.
[5] 孙楠,胡宝祥,莫为民. 草甘膦的亚硝基化扫描示波极谱法测定及应用[J]. 药,2007,9(1):609-611.
[6] 薛铭华,杨万兴. N-亚硝基衍生化的紫外分光光度法测定草甘膦

[J]. 农药,1982,3(2):31-32.
[7] 陈姿如,吴名,陈礼明,等. 血清中佐匹克隆测定的紫外分光光度法[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2013,31(5):544-545.
[8] 杨水莲,匡兴亚,姚峰,等. 急性草甘膦中毒 4 例病理报道[J]. 中华职业医学,2008,35(2):135-137.

(收稿日期:2013-12-16)